

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS**



**INHIBICIÓN DE *Hm-Inx2* EN EL DESARROLLO DEL SISTEMA  
NERVIOSO CENTRAL DE *Hirudo medicinalis***

**TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
BIÓLOGA  
PRESENTA  
MARISELA YOLANDA PERZABAL CORONA**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ALEJANDRO SÁNCHEZ GONZÁLEZ**

**ENSENADA, BAJA CALIFORNIA  
20 DE DICIEMBRE DE 2018**

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

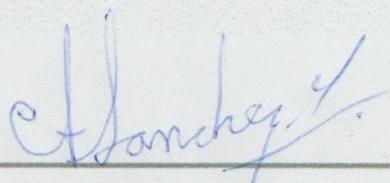
FACULTAD DE CIENCIAS

INHIBICIÓN DE *Hm-Inx2* EN EL DESARROLLO DEL SISTEMA  
NERVIOSO CENTRAL DE *Hirudo medicinalis*

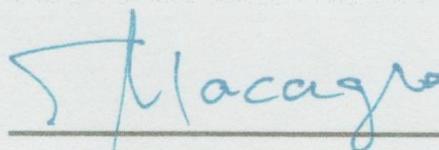
TESIS PROFESIONAL  
QUE PRESENTA

MARISELA YOLANDA PERZABAL CORONA

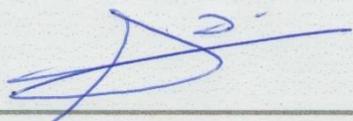
APROBADO POR:



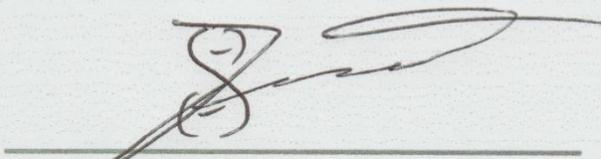
Dr. Alejandro Sánchez González  
Presidente del Jurado



Dr. Eduardo Macagno  
Secretario



Dr. Julio E. Valencia Suárez  
1er. Vocal



Dr. M. Alejandro Carballo Amador  
2do. Vocal

## Resumen de tesis

Inhibición de la *Hm-INX2* en el Desarrollo del sistema Nervioso central de *Hirudo medicinalis*.

La comunicación interneuronal desempeña un papel crítico durante el proceso de neurogénesis. Este acoplamiento se origina a través de uniones Gap, las cuales permiten la transmisión de impulsos eléctricos así como el intercambio iónico y metabólico entre células contiguas. La formación de estas uniones permite la estructuración de tejidos y el establecimiento de sinapsis eléctricas. Estos complejos proteicos se componen de un arreglo hexamérico de proteínas señalizadoras llamadas conexinas (Cx) en vertebrados o inexinas (Inx) en invertebrados. Por medio de la inhibición de estos componentes transmembranales resulta viable el estudio de la dinámica de acoplamiento durante las etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso. De esta manera, este trabajo pretende determinar efecto de la inexina 2 durante el desarrollo del sistema nervioso en la sanguijuela medicinal (*Hirudo medicinalis*) a través de la aplicación de péptidos miméticos y ARNip como mecanismos de inhibición.

Palabras clave: Uniones Gap, inexina, *Hirudo medicinalis*, péptido mimético.

Resumen aprobado por:



---

Dr. Alejandro Sánchez González  
Presidente del Jurado

# ***ÍNDICE***

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>13</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>34</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>35</b>

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Ubicación y estructura de uniones gap en células adyacentes.....	11
<b>Figura 2.</b> Disposición estructural de las proteínas transmembranales.....	12
<b>Figura 3.</b> Representación estructural de la <i>Hm-inx2</i> modelada en PYMOL.....	14
<b>Figura 4.</b> Resultados de la predicción de segmentos transmembranales para la Hm-Inx2.....	21
<b>Figura 5.</b> Predicción gráfica de la Hm-Inx2. En azul se resalta la secuencia elegida para la síntesis del péptido mimético a utilizar.....	22
<b>Figura 6.</b> . Resumen gráfico de la alineación del algoritmo BLASTp.....	23
<b>Figura 7.</b> Colonias bacterianas resultantes de las pruebas de transformación.....	25
<b>Figura 8.</b> Resultados inmunohistoquímicos 72 horas post inyección.....	28
<b>Figura 9.</b> Resultados inmunohistoquímicos 96 horas post inyección.....	30

**Figura 10.** Resultados inmunohistoquímicos 24 horas post  
inyección.....31

## ***ÍNDICE DE TABLAS***

**Tabla I.** Tamizado de la alineación realizada en BLASTp.....24

**Tabla II.** Cuantificaciones de ADN.....26

## *Agradecimientos*

Este trabajo es resultado del tiempo, esfuerzo, dedicación y cariño de todo un grupo de personas que son muy importantes para mí.

Me gustaría dar un agradecimiento especial al Dr. Alejandro Sánchez y al Dr. Eduardo Macagno por confiar ciegamente en mí y darme la oportunidad de trabajar en este proyecto. Su tiempo, sus enseñanzas y su paciencia son algo por lo que quedaré eternamente agradecida con ustedes.

También agradecer a Michael Baker, a Natasha y a Alina por recibirme siempre con los brazos abiertos y brindarme su ayuda siempre que les fue posible.

Por otro lado, quisiera extender un agradecimiento al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (LNMA-CICESE), y al Dr. Diego L. Delgado-Álvarez por la asistencia durante las sesiones de microscopía.

Gracias mi papá académico, el Dr. Julio V. Suárez, y al Dr. Alejandro Carballo. Muchas gracias por inculcarme valores al momento de trabajar (tanto en la teoría como en el laboratorio), por siempre decirme en qué aspectos debía mejorar. Pero sobre todo, gracias por hacer su trabajo con la alegría y el gusto con el que siempre lo hacen. Siempre agradeceré el hecho de que personas como ustedes hayan estado involucradas en mi formación profesional.

A mis muy queridos colegas, Nicole y Ernesto, quienes vivieron en carne propia esta odisea conmigo. Agradezco infinitamente el haber tenido la oportunidad de compartir un espacio de trabajo con ustedes. Ernesto, gracias por tu amistad y complicidad, y por no perder nunca la fe en mí, incluso cuando yo dejé de creer en mí misma.

Un agradecimiento enorme a esas bellísimas personas con las que la ciencia me permitió coincidir en el transcurso de mis estudios: Zhenia, Enrique, Manuel, Giovanni, Omar e Irak. Ustedes saben que mis días no serían lo mismo si no formaran parte de mi vida. Gracias a Irak por capturar todos los momentos y las risas, a Omar por quererme aun cuando soy bien mandona, a Manuelito por sus locuras, a Giovanni por todo su amor y apoyo incondicional (sin importar las circunstancias), a Enriquito por siempre escucharme y aconsejarme y a Yadhys por su invaluable amistad. Los adoro muchísimo, gracias por enseñarme el valor de la amistad, por nunca dejarme sola, por regañarme, consolarme, reír y aprender conmigo.

Gracias a Guadalupe, Rebeca, Alfonso, Gabriela y a la familia Daesslé por tanto cariño, apoyo, y por todos sus consejos a lo largo de estos años.

A Arturo y Mauricio, a quienes amo infinitamente y todos los días son una fuente de inspiración para continuar trabajando en mi formación profesional.

A Tere y Diego, por escuchar y aguantarme en los momentos más difíciles. Espero estar cumpliendo con mi papel de hermana mayor.

Y, finalmente, a Marisela y Agustín. A ustedes que han sacrificado todo en sus vidas para verme realizada. A ustedes, que se dieron a la tarea cuidarme, quererme, disciplinarme y guiarme. Gracias por nunca frenar mi curiosidad y por alentarme a buscar las respuestas a todas dudas que le surgieron a la pequeña científica que alguna vez quiso encontrar la cura para la calvicie, curar el cáncer, competir en ñoño-olimpiadas y estudiar ciencia.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS



INHIBICIÓN DE LA *Hm-Inx2* EN EL DESARROLLO DEL SISTEMA  
NERVIOSO CENTRAL DE *Hirudo medicinalis*

TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
BIÓLOGA  
PRESENTA

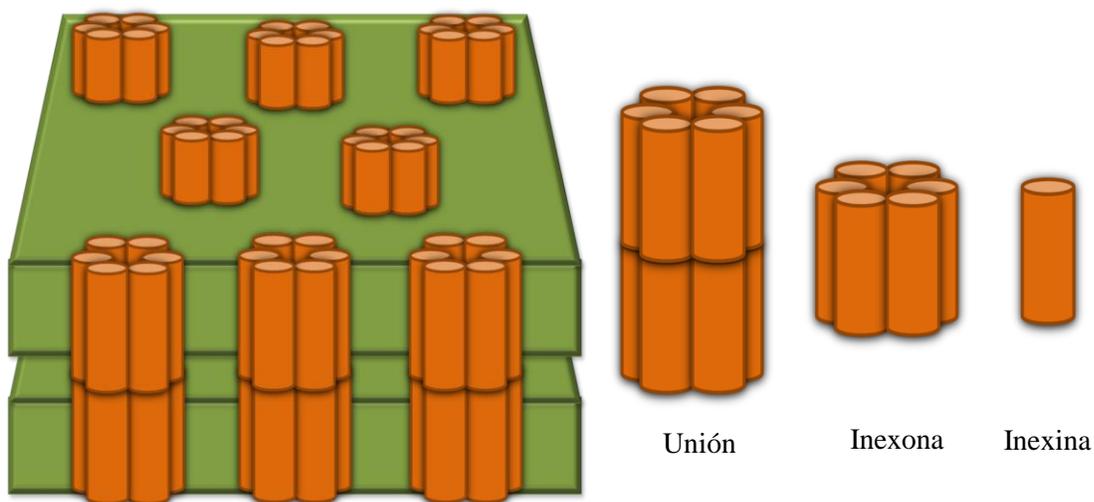
MARISELA YOLANDA PERZABAL CORONA

DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ALEJANDRO SÁNCHEZ GONZÁLEZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA  
20 DE DICIEMBRE DE 2018

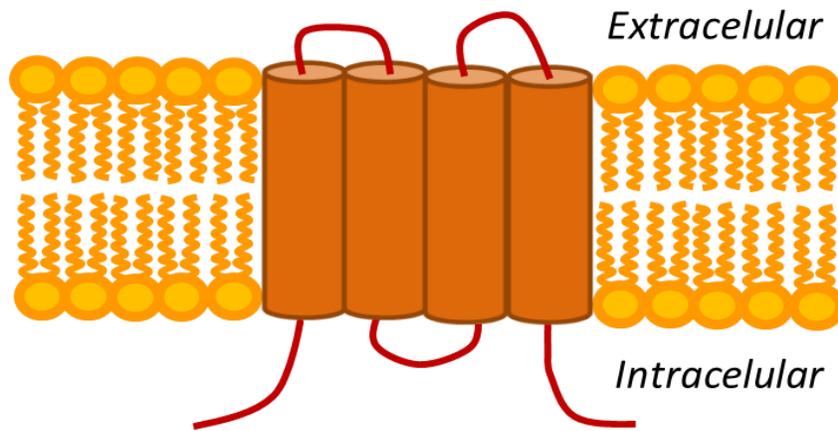
## Introducción

Durante el desarrollo del sistema nervioso, la comunicación interneuronal resulta esencial para la formación, estructuración y modulación de circuitos funcionales (Baker y Macagno, 2017). Esta comunicación entre neuronas se lleva a cabo por medio de uniones Gap, las cuales están presentes en casi todos los tejidos, sólo estando ausentes en músculo esquelético y algunas células sanguíneas (Dermietzel *et al.*, 1989).



**Figura 1.** Ubicación y estructura de uniones gap en células adyacentes.

También conocidas como “uniones de hendidura”, las uniones Gap son descritas como canales que permiten el intercambio de moléculas pequeñas y iones de hasta 1kDa (Dermietzel y Spray, 1993) entre células estrechamente unidas (Curti y Brien, 2016). Cada unión Gap consta de dos semi canales hexaméricos (figura 1), los cuales permiten la comunicación célula a célula (Hervé *et al.*, 2007). Estas uniones son un tipo importante de comunicación intercelular entre las neuronas y las células de la glía durante el desarrollo del sistema nervioso en la sanguijuela *Hirudo medicinalis* (Kandarian *et al.*, 2012; Todd, Kristan & French, 2010).



**Figura 2.** Disposición estructural de las proteínas transmembranales.

De acuerdo con la literatura, pese a que comparten similitudes en cuanto a la topología, existen tres familias distintas de proteínas transmembranales formadoras de uniones gap en el reino animal. En vertebrados, las proteínas responsables de la formación de estos canales pertenecen a la familia de las conexinas (*Cnx*), mientras que en invertebrados encontramos a las inexas (*Inx*) (Kandarian *et al.*, 2012). Las panexas (*Panx*), una familia de proteínas similares a las inexas, se encuentran presentes en algunos linajes de cordados (Panchin, 2005).

En relación con las conexinas, se sabe que juegan un rol importante en los seres humanos, ya que mutaciones en el gen que codifica estas proteínas pueden conducir a deficiencias en la audición, visión, condiciones cardíacas, fertilidad (Hervé *et al.*, 2005) y además verse relacionadas con desórdenes dermatológicos (Hervé *et al.*, 2007).

Dado que la expresión de ciertas inexas interviene en la formación de circuitos neuronales específicos (Baker y Macagno, 2017), resulta importante estudiar su expresión en neuronas durante su fase de desarrollo. Con base en lo anterior, en este trabajo se pretende determinar el papel y los efectos de la inexas 2 durante el desarrollo del sistema nervioso central utilizando como modelo biológico a la sanguijuela *Hirudo medicinalis*.

## Antecedentes

Como bien se mencionó, las unidades básicas formadoras de uniones Gap son las proteínas transmembranales conocidas como conexinas (en vertebrados) e inexinas (en invertebrados). Existen reportes de aproximadamente 20 conexinas codificadas en mamíferos, 37 conexinas en el pez *Danio rerio* (Eastman *et al.*, 2006) y 25 inexinas en el nematodo *C. elegans* (Altun *et al.*, 2010).

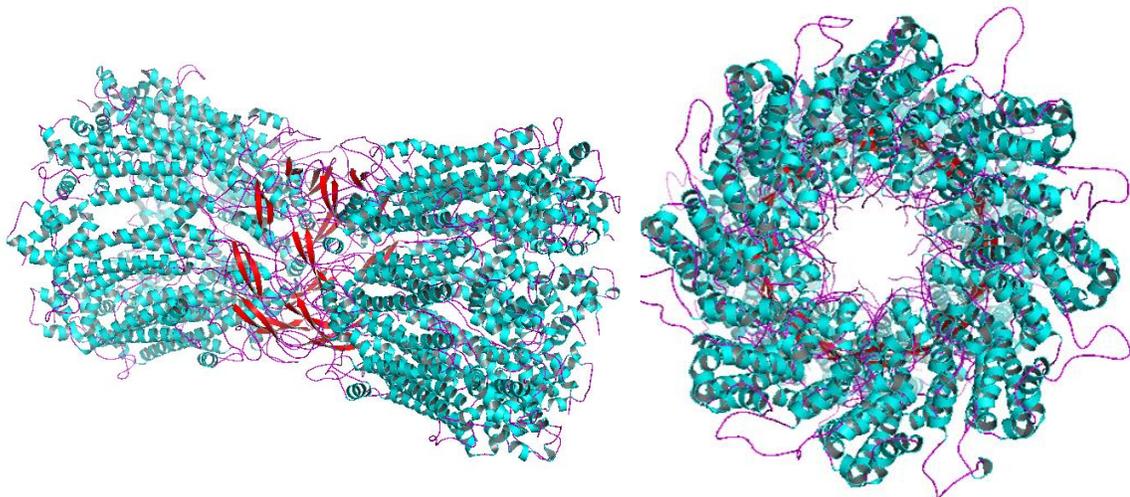
En el caso de la inexina 2 en *Drosophila* (*Dm-Inx2*), Bauer y colaboradores (2004) reportaron que en las uniones Gap esta proteína es esencial para la morfogénesis epitelial en los embriones de *Drosophila spp.* Su trabajo evidenció que tanto la pérdida de función como la ganancia producen graves defectos del desarrollo debido a la muerte celular y el fracaso de la morfogénesis epitelial.

Se ha demostrado que en pares de ovocitos de *Xenopus sp.*, la inyección de ARNm de *Dm-Inx2* genera la formación de canales sensibles al voltaje en el 40% de los pares de células (Stebbing *et al.*, 2000). Por otro lado, las investigaciones de Stebbings y colaboradores (2000) sobre los genes *Dm-Inx2* y *Dm-Inx3* muestran que se expresan en superposición de varios dominios a lo largo de la embriogénesis, sobre todo en las células epidérmicas bordeando cada uno de los segmentos. Además, en su trabajo se mostró que la expresión ectópica de *Dm-Inx2 in vivo* tiene efectos limitados sobre la viabilidad de *Drosophila melanogaster*.

Por otra parte, se ha confirmado que la ausencia de *Dm-Inx2* en *Drosophila* genera el fracaso de las células epiteliales a migrar e invaginar durante la organogénesis, teniendo como consecuencia defectos de alimentación en el organismo (Bauer *et al.*, 2002). Entre

otras cosas, Bauer y colaboradores (2003) han reportado que el gen que codifica para la *Dm-Inx2* controla el desarrollo de la parte anterior del intestino en respuesta a la señalización del gen *Wingless*.

En cuanto a la sanguijuela medicinal *Hirudo medicinalis*, se ha determinado que su genoma codifica un total de 21 inexas (Kandarian *et al.*, 2012). Por lo que se refiere a la inexina 2 de *H. medicinalis* (*Hm-Inx2*; Figura 3), se sabe que es una proteína de 398 aminoácidos con una masa teórica de 46.7 kDa (Dykes *et al.*, 2004). Los trabajos de Dykes y colaboradores (2004; 2006) sugieren que la *Hm-Inx2* (estructura mostrada en figura 3) se encuentra expresada en todas las células macrogliales del Sistema Nervioso Central (SNC) de las sanguijuelas embrionales y adultas (Dykes y Macagno, 2006). También, se sabe que las Uniones Gap de *Hm-Inx2* desempeñan un rol crítico en la respuesta neuro-inmunológica de *H. medicinalis* en respuesta a intervenciones traumáticas como lesiones en los nervios a nivel inter-ganglionar (Samuels *et al.*, 2010).



**Figura 3.** Representación estructural de la *Hm-inx2* modelada en PYMOL.

## Hipótesis

Experimentos preliminares sugieren que la inexina 2 de *Hirudo medicinalis* (*Hm-Inx2*) juega un papel fundamental para la gangliogénesis (resultados no publicados; comunicación privada de A.S.G.). En experimentos relacionados, la expresión de un transgen mutante de Inexina 2 que bloquea la expresión de la inexina 2 endógena resulta en el desacoplamiento de las células gliales en el ganglio (Yazdani *et al.*, 2013).

Por ello, se postula que, durante el desarrollo embrionario inicial en *H. medicinalis*, la inhibición de la expresión de la *Hm-Inx2* generará defectos en el sistema nervioso, probablemente al nivel morfo-fisiológico, así afectando el génesis normal de los ganglios segmentarios.

## Objetivos

### *Objetivos generales*

- Identificar los efectos de la inhibición de la expresión de la inexina 2 durante el desarrollo temprano del sistema nervioso central en el modelo de estudio *Hirudo medicinalis*.

### *Objetivos específicos*

- Reprimir la expresión de la *Inx2* de *H. medicinalis* utilizando ARNip específico y péptidos miméticos.
- Generar el patrón de expresión de *Hm-Inx2* por medio de la técnica de tinción inmunohistoquímica.

## **Materiales y métodos**

### *Modelo biológico*

Se utilizaron embriones de edad E7-E10 y adultos de la colonia de *H. medicinalis* desarrollada en el laboratorio del Doctor Eduardo Macagno en la sección de Biología Celular y del Desarrollo de la División de Ciencias Biológicas de la Universidad de California, San Diego (UCSD). Los capullos recolectados se mantenían dentro de cajas de plástico agujereadas y rellenas con musgo de turbera húmedo, hasta que los embriones cumplieran la edad requerida para los experimentos. Posteriormente, los capullos fueron disectados cuidadosamente de uno de los extremos con ayuda de una navaja y los embriones se colocaron dentro de una solución de Wennings 1X (40 mM ácido málico, 4 mM Cloruro de potasio, 10 mM ácido succínico, 10 mM Tris-HCl, 1.8 mM Cloruro de calcio, pH 7.4).

### *Síntesis de péptidos miméticos*

La secuencia de aminoácidos utilizada fue obtenida de la base de datos de *Uniprot* (Q8I6U1\_HIRME). Ésta fue sometida a un análisis de predicción de segmentos transmembranales utilizando la plataforma PRED-TMR (figura 4). Posterior a esto, se utilizó el algoritmo BLASTP 2.6.1+ (Altschul *et al.*, 1997) para confirmar que la secuencia no coincidiera con alguna otra proteína de nuestro modelo de estudio (*H. medicinalis*). Finalmente, se mandó sintetizar a la compañía *GenScript USA Inc.*

### *Purificación de ADN*

Se tomó 1 ml de bacterias portadoras del plásmido pEGFP-N1 resistente a kanamicina y se centrifugó durante 2 minutos a 14,000 rpm. Después, se eliminó el sobrenadante por inversión de tubo, procurando dejar el pellet lo más seco posible. Acto seguido, se resuspendió el pellet en 250  $\mu$ l de tampón de resuspensión (50 mM Glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. Cumplido el lapso de tiempo, se añadieron 250  $\mu$ l de solución de lisis (0.2 M NaOH, 1% SDS) y se agitó el tubo por inversión suave. Posteriormente, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 300  $\mu$ l de acetato de potasio 3 M y se mezcló el contenido del tubo y se incubó durante 10 minutos en hielo. Concluido este periodo, se centrifugó durante 10 minutos a 14,000 rpm para después transferir la fase acuosa sobrenadante a un tubo nuevo. Hecho esto, se añadieron dos volúmenes de etanol absoluto frío, se mezcló por inversión y se guardó a -20 °C durante 20 minutos. La mezcla se centrifugó durante 30 minutos a 14,000 rpm a 4 °C y posteriormente se eliminó todo el sobrenadante. El pellet se lavó con 500  $\mu$ l de etanol al 70% frío y se centrifugó durante veinte minutos a 14,000 rpm. Finalmente, se eliminó el sobrenadante para después disolver el pellet resultante en 25  $\mu$ l de agua estéril. El producto final fue almacenado a -20 °C.

### *Transformación*

Se tomaron 50  $\mu$ l de células DH5 $\alpha$  químicamente competentes y se añadió 1  $\mu$ l de plásmido (50 ng/ $\mu$ l) en un tubo de microcentrífuga estéril. La mezcla se dejó en hielo durante 45 minutos en agitación constante. Luego, se dio un shock térmico durante 20 segundos a una temperatura de 42 °C e inmediatamente después se pasó a hielo durante 2

minutos. Acto seguido, se agregaron 500 ml de medio LB líquido y se incubó a 37 °C durante una hora en agitación constante. Finalmente, las células se sembraron en placas con medio LB y kanamicina (0.1 mg/ml).

#### *Amplificación de ADN*

Los fragmentos de interés fueron amplificados en reacciones que contenían un volumen final de 25 µl, siguiendo el protocolo descrito por Ausubel (1995) [45 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 36°C y 2 min. a 72°C, con una extensión final de 10 min. a 72°C; y una desnaturalización inicial de 2 min].

Los productos amplificados fueron separados por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % (velocidad de corrimiento= 50 volts por 10 minutos y posteriormente 100 Volts por 30 minutos), teñidos con *GelRed (Biotium)* y visualizados en un transiluminador UV.

#### *Síntesis de ARNip*

La síntesis de ARNip se realizó por medio del *MEGAscript® RNAi Kit* de Thermo Fisher. La secuencia del promotor T7 se añadió al ADN amplificado previamente utilizando primers diseñados especialmente para generar templates e incluirlos directamente a la reacción de transcripción por medio de PCR (Forward- AAGCTTTAATACGACTCACTATAATGGACAAGATTCTCGGAG; Reverse- CTGCAGCTCAGGCAGACTTAATACGACTCACTATAGGATCC). Ambos primers corresponden a los primeros y últimos 17 nucleótidos de la secuencia de ARN mensajero de la *Hm-Inx2*. Finalmente, el producto de ese PCR fue sometido a las reacciones de transcripción, digestión y purificación que utiliza el kit para sintetizar el producto final.

### *Microinyección de péptido mimético y ARN de interferencia*

Se preparó una solución 20 mM con el péptido mimético liofilizado y agua ultrapura. Después, se mezcló una solución de microinyección (4 µl de la solución con péptido mimético o ARN de interferencia, 0.5 µl del tinte fluorescente Alexa Fluor 568 y 0.5 µl de Solución de Wenning 10 X), para proceder con la microinyección a embriones de *H. medicinalis* a nivel extracelular (del octavo ganglio en adelante).

### *Inmunohistoquímica*

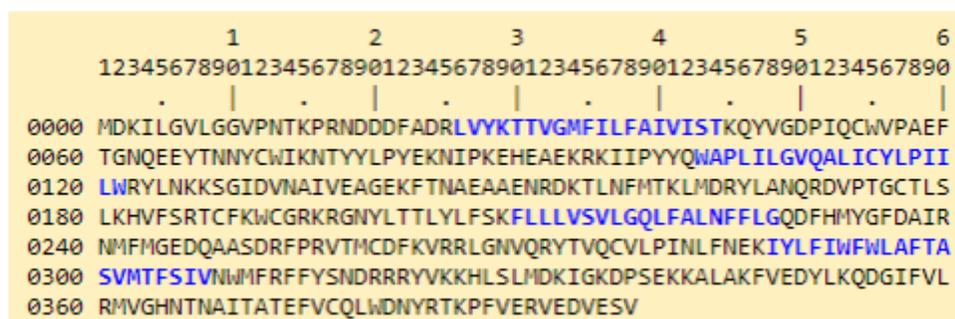
24,72 y 96 horas posteriores a la microinyección, los embriones tratados fueron anestesiados con una solución 8% v/v ETOH/Wenning's, para después abrirlos a lo largo de la línea media dorsal y quitar los remanentes del vitelo. Una vez abiertos, se aseguraron individualmente en placas cubiertas con *Sylgard* de aproximadamente 35 mm. Después, inició la fijación de los embriones por medio de un baño de 4% v/v paraformaldehído en PBS. Concluido el tiempo, las muestras se enjuagaron tres veces cada treinta minutos con una solución 0.3% v/v Triton X-100 en PBS (PBX). Hecho esto, los embriones fueron cubiertos con solución de bloqueo (PBX combinado con suero de cabra al 5% v/v) y se dejaron en agitación aproximadamente cuatro horas. Para finalizar el primer día de tratamiento, se removió la solución de bloqueo y se añadieron 50 µl de anticuerpo primario (dilución 1:200 de  $\alpha$ -tubulina en ratón y solución de bloqueo). Éstas se dejaron dentro de una caja oscura a una temperatura de 4 °C con fondo humedecido con el propósito de evitar la desecación. Para el segundo día, bastó con remover la solución del anticuerpo primario y dar lavados de PBX con agitación cada media hora. Al final de este día, se agregaron 50 µl de anticuerpo secundario (dilución 1:200 de anticuerpo Alexa 568 cabra anti-ratón/ 1:200

de Alexa 488 cabra anti-ratón y PBS). Las muestras se dejaron bajo las mismas condiciones que la noche anterior. Al día siguiente, se retiró la solución de anticuerpo secundario para proceder a lavar las muestras cada media hora con PBX con agitación durante un mínimo de tres horas. Alcanzado este tiempo, el tejido se removió de las placas de *sylgard* para preparar las laminillas con glicerol al 80%, se tiñeron con DAPI y proceder a observarlas bajo el microscopio confocal.

## Resultados

### *Síntesis de secuencia para péptidos miméticos*

Una vez obtenida la secuencia de la base de datos, ésta fue sometida a un análisis de predicción de segmentos transmembranales, dando como resultado lo siguiente:



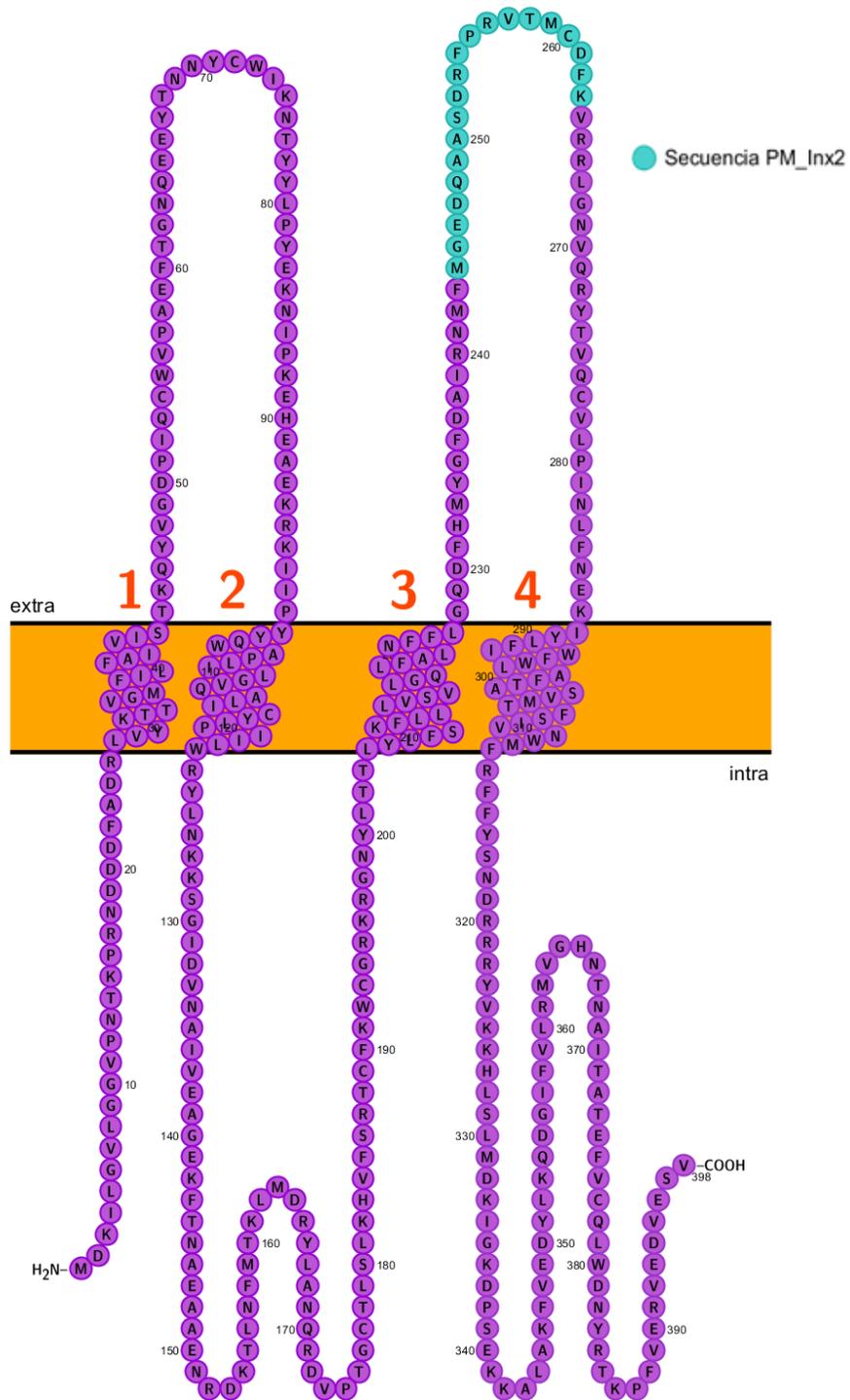
**Figura 4.** Resultados de la predicción de segmentos transmembranales para la *Hm-Inx2*.

Las regiones transmembranales predichas están resaltadas en color azul.

Utilizando la información del segundo loop extracelular:

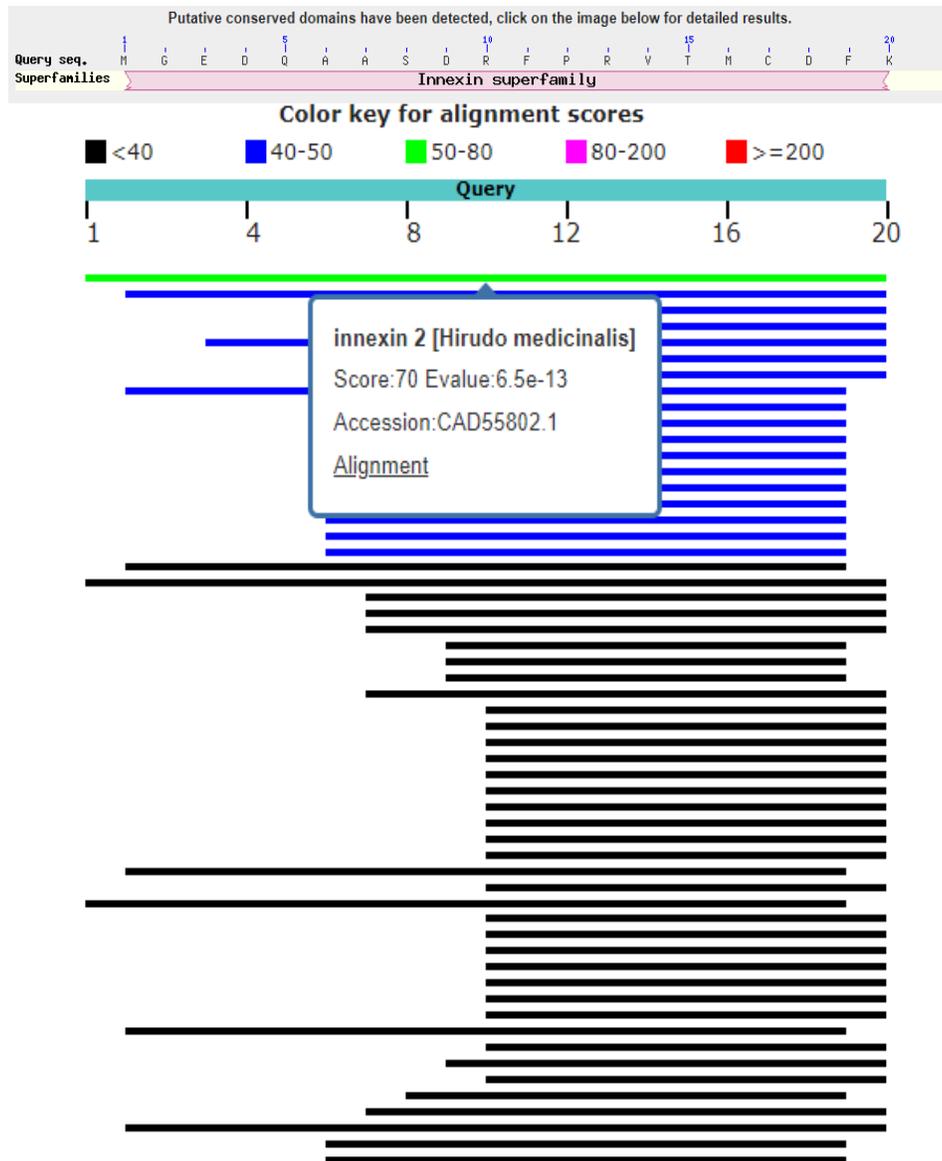
GQDFHMYGFDAIRNMFMGEDQAASDRFPRVTMCDFKVRRLGNVQRYTVQCVLPI  
NLFNEKIY

El péptido mimético resultante es el siguiente: MGEDQAASDRFPRVTMCDFK



**Figura 5.** Predicción gráfica de la *Hm-Inx2*. En azul se resalta la secuencia elegida para la síntesis del péptido mimético a utilizar.

De acuerdo con los resultados de BLASTp, nuestra secuencia no mostró coincidencia con alguna otra inxina presente en la sanguijuela medicinal.



**Figura 6.** Resumen gráfico de la alineación del algoritmo BLASTp. Los resultados reconocen la secuencia como parte de la súper familia de inxinas. Las barras en colores representan los valores de alineación (*Hm-Inx2*=70).

<i>Descripción</i>	<i>Max score</i>	<i>Total score</i>	<i>Query cover</i>	<i>E value</i>	<i>Ident</i>
<i>Innexin 2 [Hirudo medicinalis]</i>	70.6	70.6	100%	6e-13	100%
<i>Hypothetical protein CAPTEDRAFT_21345 [Capitella teleta]</i>	47.3	47.3	95%	1e-04	84%
<i>Hypothetical protein CAPTEDRAFT_114804 [Capitella teleta]</i>	44.8	44.8	65%	8e-04	92%
<i>Hypothetical protein CAPTEDRAFT_174539 [Capitella teleta]</i>	44.8	44.8	65%	8e-04	92%
<i>Hypothetical protein HELRODRAFT_185033 [Helobdella robusta]</i>	44.3	44.3	65%	0.001	82%
<i>Hypothetical protein CAPTEDRAFT_214312 [Capitella teleta]</i>	43.9	43.9	85%	0.002	92%
<i>Hypothetical protein HELRODRAFT_73579 [Helobdella robusta]</i>	42.2	42.2	55%	0.006	100%
<i>Hypothetical protein CAPTEDRAFT_93311 [Capitella teleta]</i>	41.8	41.8	90%	0.009	78%
<i>Hypothetical protein A3Q56_03864 [Intoshia linei]</i>	40.0	40.9	60%	0.018	92%
<i>Hypothetical protein A3Q56_02040 [Intoshia linei]</i>	40.5	40.5	60%	0.026	92%
<i>Hypothetical protein C0Q70_01685 [Pomacea canaliculata]</i>	40.1	40.1	65%	0.036	92%
<i>Innexin [Chaetopterus variopedatus]</i>	40.1	40.1	65%	0.036	92%
<i>Hypothetical protein A3Q56_02039 [Intoshia linei]</i>	40.1	40.1	65%	0.036	92%
<i>PREDICTED: innexin unc-9-like isoform X3 [Biomphalaria glabrata]</i>	40.1	40.1	65%	0.036	92%
<i>PREDICTED: innexin unc-9-like isoform X2 [Biomphalaria glabrata]</i>	40.1	40.1	65%	0.036	92%
<i>LOW QUALITY PROTEIN: innexin unc-9-like [Pomacea canaliculata]</i>	40.1	40.1	65%	0.036	92%

**Tabla I.** Tamizado de la alineación realizada en BLASTp. En la tabla se observan las descripciones de las especies que muestran un valor de identidad cercano al de la *Hm-Inx2*.

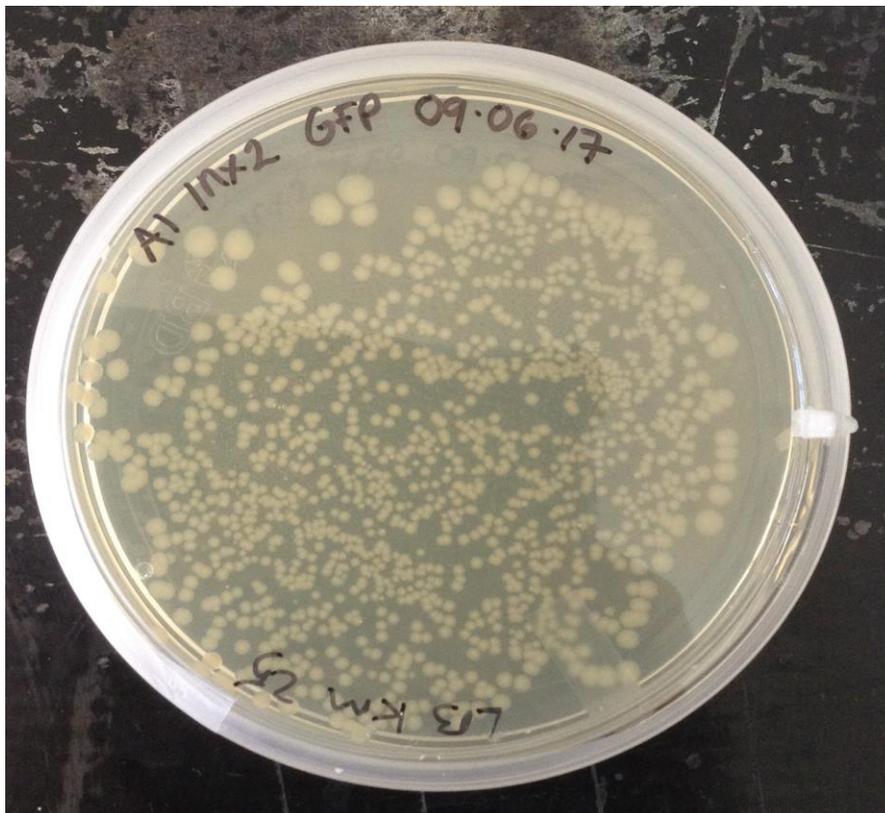
### *Transformación de E. coli DH5α (técnica de shock térmico)*

La eficiencia de transformación de DH5α con Inx2 GFP fue la siguiente:

$$ufc\ transformadas = \frac{(1145)(10^{-11})(50\ \mu l)}{25\ \mu l} = 22.9 \times 10^{13}\ ufc$$

Donde 1145 corresponde al número de colonias observada en la placa después de incubarla toda la noche,  $10^{-11}$  corresponde al coeficiente de dilución, 50  $\mu l$  se refiere al volumen de células competentes sembradas y 25  $\mu l$  al medio utilizado para llenar la placa. Así, eficiencia de transformación de ésta cepa de *E. coli*, es la siguiente:

$$Eficiencia\ de\ transformación = \frac{22.9 \times 10^{13}}{0.05\ \mu g} = 45.8 \times 10^{14}\ ufc/\mu g$$



**Figura 7.** Colonias bacterianas resultantes de las pruebas de transformación.

## *Purificación de ADN*

Con las colonias transformadas resultantes de los experimentos previos, se realizaron un total de seis purificaciones con el fin de evaluar la cantidad de material genético.

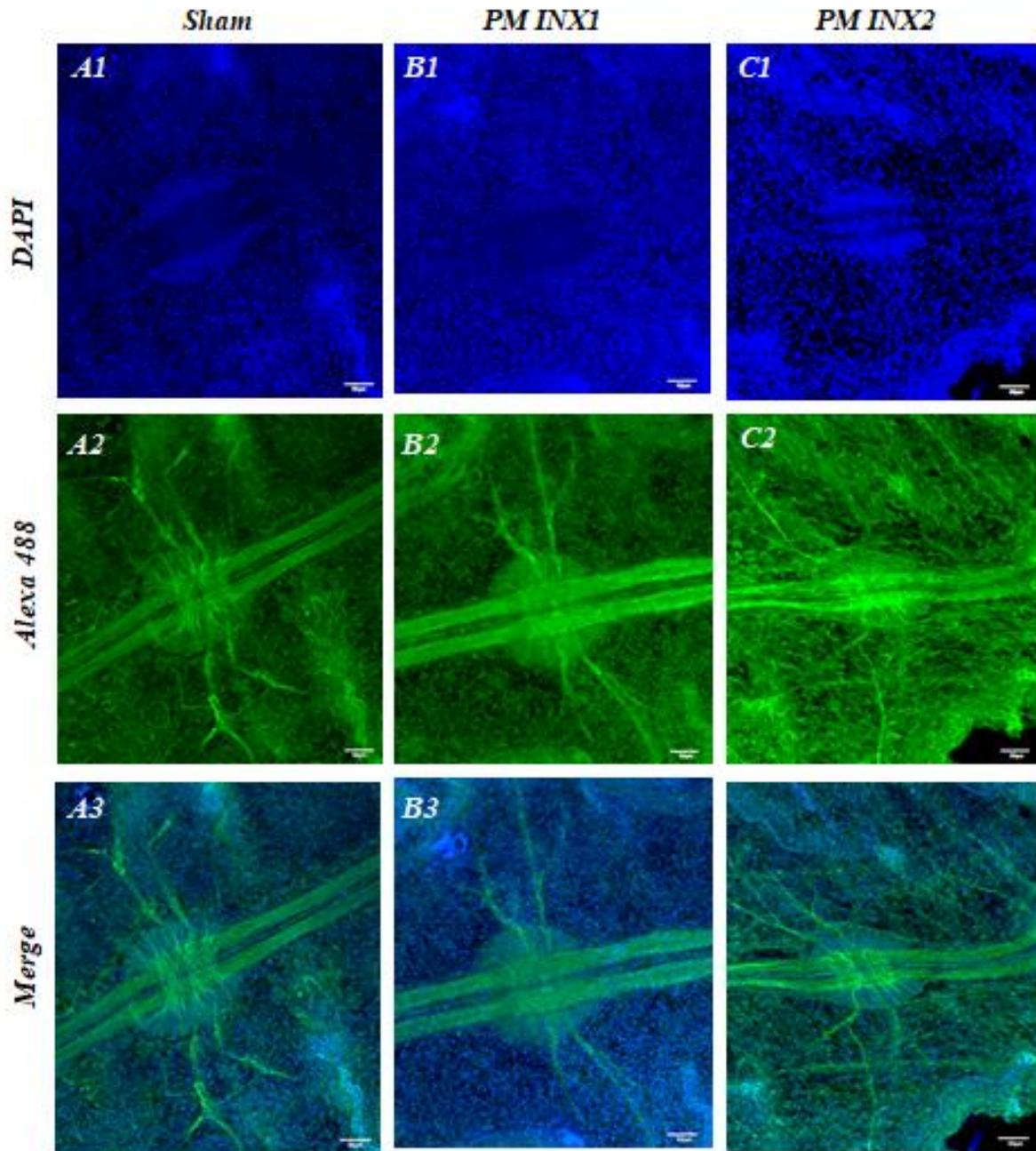
<i>Sample ID</i>	<i>ng/ul</i>	<i>A260</i>	<i>A280</i>	<i>260/280</i>
<i>INX2_GFP_1</i>	244.5	4.89	3.133	1.56
<i>INX2_GFP_2</i>	1694.7 4	33.895	16.194	2.09
<i>INX2_GFP_3</i>	3509.5 9	70.192	34.122	2.06
<i>INX2_GFP_4</i>	253.47	5.069	2.498	2.03
<i>INX2_GFP_5</i>	461.1	9.222	4.37	2.11
<i>INX2_GFP_6</i>	261.75	5.235	2.555	2.05

**Tabla II.** Cuantificaciones de ADN. Los resultados fueron obtenidos por medio de análisis de Espectrofotometría (NanoDrop ND-1000).

### *Microinyección e inmunohistoquímica*

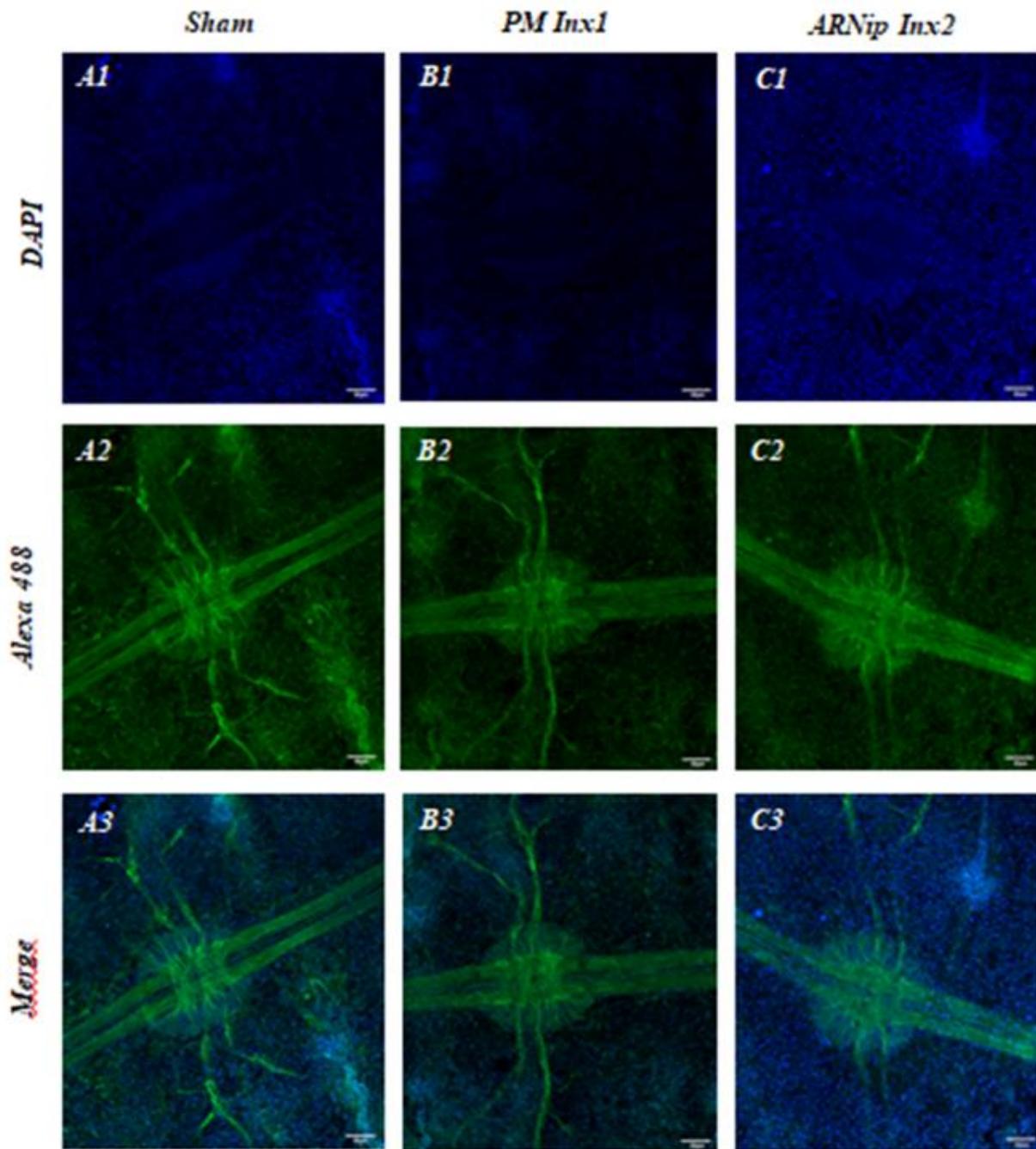
Con el fin de comprobar la acción de los péptidos miméticos y del ARN de interferencia, las pruebas de microinyección se realizaron en distintos intervalos de inyección. Como punto de comparación, consideramos un ganglio como el control *Sham* (Fig. 8), que fue inyectado solamente con solución de Wennings 10X y colorante para poder visualizar al momento del procedimiento de microinyección. Éste muestra un patrón de ramificaciones en buen estado, así como la conexión de cada célula nerviosa hacia la zona del neurópilo. Las conectivas no muestran nada fuera de lo común. El DAPI denota una buena distribución de núcleos celulares (Fig. 8A) y de igual manera se observa la distribución de la tubulina (Fig. 8D).

Los resultados a las 72 horas posteriores a la inyección (Fig. 8) mostraron algunos cambios: en el ganglio inyectado con inxina 1, las células marcadas con DAPI (Fig. 8B) muestra una mayor difusión de núcleos celulares en comparación con el *Sham*. Además, la cápsula se ve más opaca y no se ven definidas las proyecciones dentro del ganglio (Fig. 8I). Con el fluoróforo Alexa 488 no se observa algún cambio significativo en la cuestión de las ramificaciones laterales (incluso se observa un patrón de ramificación muy concentrado entre este tratamiento y los controles), así como la definición de las conectivas a lo largo de la muestra (Fig. 8F). Con péptido mimético de inxina 2 (Fig. 8J), se observa un cambio de forma estructural del ganglio totalmente evidente. Aun cuando la cápsula no opaca, también se observa cambio en cuanto a la integridad de las conectivas (se ven menos densas y más frágiles). Las ramificaciones laterales se ven distintas.



**Figura 8.** Resultados inmunohistoquímicos 72 horas post inyección. Columnas de izquierda a derecha: (A) ganglio *sham*, (B) ganglio inyectado con péptido mimético de inexina 1 y (C) ganglio inyectado con péptido mimético de inexina 2. Todas las muestras fueron teñidas con Alexa 488 para  $\alpha$ -tubulina + DAPI y revisadas bajo microscopio confocal a un aumento de 20X. Barra de escala= 50  $\mu$ m. PM= Péptido mimético.

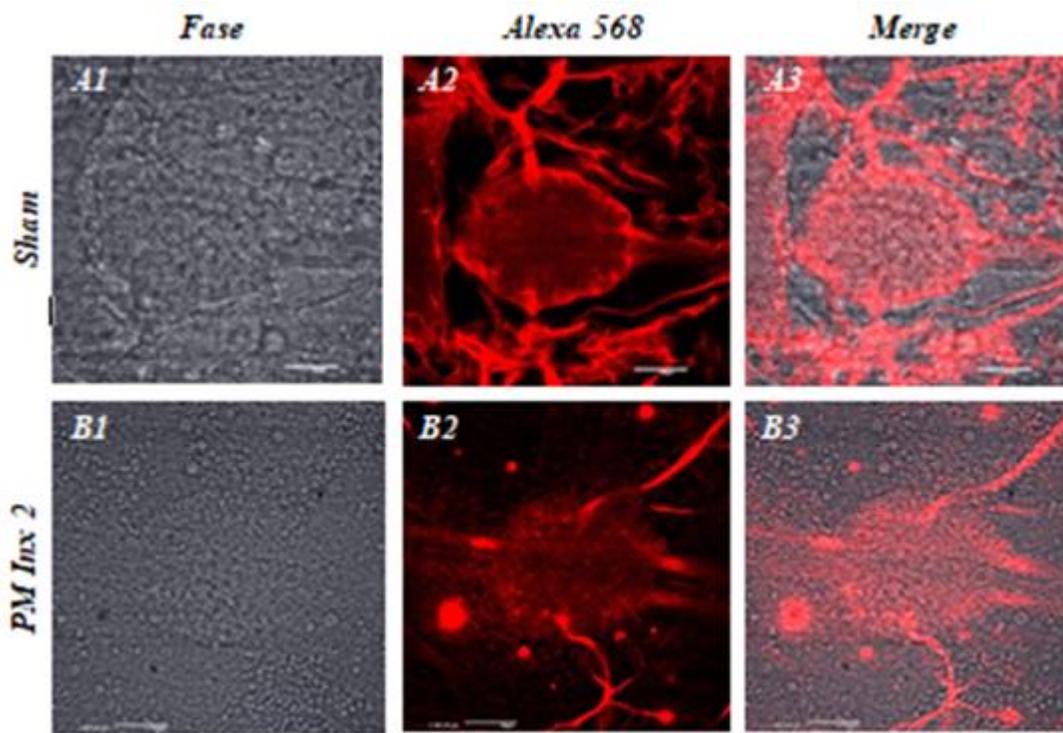
Para las 96 horas, con péptido mimético de inxina 1 (Fig. 9G) sí se observa diferencia en cuanto a la definición de todas las estructuras (conectivas, ramificaciones, proyecciones). Además, la cápsula no muestra la misma opacidad. Por otra parte, la concentración de núcleos celulares parece regresar a la normalidad (Fig. 9A). El ganglio inyectado con ARN de interferencia para inxina 2 muestra un cambio de forma estructural evidente (cambia de ovalada a globular; Fig. 9I). También se observa un mayor contraste de concentración nuclear en comparación con las muestras *Sham* y PM Inx1 (mayor concentración; Fig. 9C).



**Figura 9.** Resultados inmunohistoquímicos 96 horas post inyección. Columnas de izquierda a derecha: (A) ganglio sham, (B) ganglio inyectado con péptido mimético de inexina 1 y (C) ganglio inyectado con ARNip de inexina 2. Todas las muestras fueron teñidas con Alexa 488 para  $\alpha$ -tubulina + DAPI y revisadas bajo microscopio confocal a un aumento de 20X. Barra de escala= 50  $\mu$ m. PM= péptido mimético.

Finalmente, podemos observar cambios interesantes del ensayo de microinyección de péptido mimético para la Hm-Inx2 después de 24 horas (Figura 10). Se observa que la integridad de la cápsula se encuentra bien conservada en el control Sham (Fig. 10B),

mientras que el ganglio tratado con péptido mimético no alcanza a vislumbrarse (Fig. 10E). Además, en dicho ganglio se muestra cómo las neuronas se encuentran distribuidas a lo largo del espacio que debería corresponder a los límites de la cápsula ganglionar. Las conectivas se mantienen visibles en ambos casos, así como es el caso con las ramificaciones laterales.



**Figura 10.** Resultados inmunohistoquímicos 24 horas post inyección. Filas de arriba hacia abajo: (A) ganglio *Sham* (24 horas post inyección; teñido con Alexa 568 para  $\alpha$ -tubulina) y (B) ganglio inyectado con péptido mimético de inxina 2 (24 horas post inyección; teñido con Alexa 568 para  $\alpha$ -tubulina). Ambas muestras fueron revisadas bajo microscopio confocal a un aumento de 20X. Barra de escala= 50  $\mu$ m. *Pm*= péptido mimético.

## Discusión

Para que el desarrollo del sistema nervioso se concrete de manera exitosa, es necesario que las células involucradas en el proceso actúen de manera sumamente organizada. Además del papel desempeñado en las redes neuronales, las uniones gap están involucradas tanto en la homeostasis como en el desarrollo embrionario del organismo, ya que median el paso de moléculas de señalización de bajo peso molecular de una célula a otra (Dykes *et al.*, 2004). Para los fines de este trabajo, se inyectaron embriones E7-E10 con péptidos miméticos correspondientes a cada inxina trabajada, así como de *ARNip* para el caso de la *HmInx-2*; y posteriormente fueron teñidos con la técnica de inmunohistoquímica.

La técnica de péptidos miméticos ha sido ampliamente utilizada con el fin de evaluar la funcionalidad de proteínas como las conexinas en diversos procesos (Dora *et al.*, 1999; Evans y Boitano, 2001; Wang, 2007). Estos péptidos son derivados de secuencias de proteínas transmembranales como las conexinas e inxinas, y se ha demostrado que atenúan los procesos actividad de las uniones Gap. (Warner *et al.*, 1995). Por otro lado, la implementación de técnicas como el ARN de interferencia ha sido usado para el estudio de la interacción de conexinas y su papel regulador de otras proteínas (Wei *et al.*, 2005). Dado que los usos y beneficios de ambos protocolos se encuentran bien descritos en la literatura actual, nos apoyamos en estas dos innovadoras opciones para realizar los experimentos de inhibición.

Se sabe que inxina 2 está presente en las células gliales del sistema nervioso de *Hirudo medicinalis*, mientras que inxina 1 se expresa en todas las neuronas de su sistema nervioso, e inxina 6 se localiza solamente en tres neuronas de los ganglios embrionarios

(Dykes *et al.*, 2004; Dykes y Macagno, 2006). De acuerdo con los resultados, ninguno de los tratamientos mostró signo de alteración vital. No obstante, se pueden observar ciertos cambios morfológicos en los ganglios inyectados, así como algunos patrones consistentes presentes sólo en ciertos casos. Los rasgos visibles incluyen cambios en la opacidad de la cápsula y en la forma del ganglio cuando se inyectó con péptido mimético de inexina 1 y *ARNip* (figura 9). Para el caso particular de inexina 2, observamos un cambio drástico en la morfología del ganglio, así como de las conectivas (figura 9). Esto podría deberse a que *HmInx-2* se encuentra directamente relacionada con el neurópilo y la glía conectiva (Dykes y Macagno, 2006) y ya se ha comprobado que la glía es necesaria para dar inicio al ensamblaje del sistema nervioso, pues se encarga de guiar neuronas y axones a través de diversas señales (Rapti *et al.*, 2017).

Por otro lado, también se observan cambios a través del tiempo en los individuos inyectados. Para estos experimentos, se tomaron en cuenta rangos de 24, 72, y 96 horas después de la inyección de péptido mimético o *siARN*, dependiendo del caso. Anteriormente se ha demostrado que la técnica con péptidos miméticos homólogos a una región específica del segundo bucle extracelular de Conexinas son capaces de inhibir selectivamente la actividad de las uniones gap (Kwak y Jongsma, 1999). Sin embargo, debemos tomar en cuenta el fenómeno de reciclaje de Inexinas por parte de las Uniones Gap, pues se ha reportado que, en conexinas, la más antigua que reaparece en la superficie celular actúa como sitio de nucleación para la formación de nuevas placas de unión de las células hijas (Boassa *et al.*, 2010).

Además, descartamos que la edad de los embriones haya causado algún problema, pues se ha reportado que no es sino hasta el onceavo día de desarrollo en el que el sistema nervioso termina de formarse (Fernández y Stent, 1982).

## **Conclusión**

Como ya se ha demostrado, la *inexina 2* juega un papel fundamental para el desarrollo de diversos organismos. Específicamente en el caso de la *Hm-Inx2*, ésta es una proteína que sólo se expresa en células gliales, por lo que la inhibición de la misma podría tener un efecto en el ensamblaje del sistema nervioso en etapas tempranas del desarrollo.

Aunque los resultados conseguidos durante estos experimentos no son suficientes como para afirmar que se logró una inhibición contundente en las células gliales de los ganglios tratados, sí contribuyen al perfeccionamiento de técnicas como a la microinyección de ARN de interferencia y péptidos miméticos para fines terapéuticos.

Pese a que lo obtenido de este trabajo podría ser adjudicado a diversos factores (como la calidad de los animales utilizados para el estudio, problemas para estandarizar las técnicas experimentales, escasez de material, etc.), se recomienda el desarrollo de la técnica de introducción de péptidos miméticos y ARNiP, ya sea por microinyección o con el uso de biobalística, además de la repetición de ensayos que corroboren estos resultados.

## Bibliografia

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25 (17), 3389–3402.
- Altun, Z. F., Chen, B., Wang, Z., & Hall, D. H. (2010). High resolution map of neuronal circuits. *Developmental dynamics*, 238 (8), 1936–1950.  
<https://doi.org/10.1002/dvdy.22025>.High.
- Ausubel, F.M. (1995). Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. 3rd ed. [New York]: Wiley.
- Baker, M. W., & Macagno, E. R. (2017). Gap Junction Proteins and the Wiring (Rewiring) of Neuronal Circuits. <https://doi.org/10.1002/dneu.22429>.
- Bauer, R., Lehmann, C., Fuss, B., Eckardt, F., & Hoch, M. (2002). The Drosophila gap junction channel gene innexin 2 controls foregut development in response to Wingless signalling. *Journal of Cell Science*, 115 (Pt 9), 1859–67.  
<https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185>
- Bauer, R. , Lehmann, C., Martini, J., Eckardt, F., Hoch, M. (2004). Gap junction channel protein innexin 2 is essential for epithelial morphogenesis in the Drosophila embryo. *Molecular Biology of the Cell*, 15 (6), 2992-3004.
- Boassa, D., Solan, J., Papas, A., Thornton, P., Lampe, P., Sosinsky, G. (2010). Trafficking and recycling of the connexin 43 Gap Junction Protein during mitosis. *Traffic*; 11: 1471–1486

Curti, S., & Brien, J. O. (2016). Characteristics and plasticity of electrical synaptic transmission. *BMC Cell Biology*, 17 (Suppl 1).

<https://doi.org/10.1186/s12860-0160091-y>

Deitmer, J., Rose, C., Munsch, T., Schmidt, J., Nett., W., Schneider, H., Lohr, C.

(1999). Leech Giant Glial Cell: Functional Role in a Simple Nervous System.

*GLIA* 28:175–182

Dermietzel, R; Traub, O; Hwang, T.K.; Beyer, E.; Bennett, M.V.L.; Spray, D.C.;

Willecke, K. (1989). Differential expression of three gap junction proteins in

developing and mature brain tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86 (24), 10148–10152.

Dermietzel, R., Spray, D.C. (1993). Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why?. *Trends in Neuroscience*, 16 (5), 186-192.

Desplantez, T., Verma, V., Leybaert, L., Evans, W. H., & Weingart, R. (2012). Gap26, a connexin mimetic peptide, inhibits currents carried by connexin43 hemichannels and gap junction channels. *Pharmacological research*, 65(5), 546-552.

Dykes, I. M., Freeman, F. M., Bacon, J. P., & Davies, J. A. (2004). Molecular Basis of Gap Junctional Communication in the CNS of the Leech *Hirudo medicinalis*. *Journal of Neuroscience*, 24(4), 886–894.

- Dykes, I. M., & Macagno, E. R. (2006). Molecular characterization and embryonic expression of innexins in the leech *Hirudo medicinalis*. *Development genes and evolution*, 216 (4) 185–197. <https://doi.org/10.1007/s00427-005-0048-1>.
- Dora, K. A., Martin, P. E., Chaytor, A. T., Evans, W. H., Garland, C. J., & Griffith, T. M. (1999). Role of heterocellular Gap junctional communication in endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: inhibition by a connexin-mimetic peptide. *Biochemical and biophysical research communications*, 254(1), 27-31.
- Eastman, S. D., Chen, T. H., Falk, M. M., Mendelson, T. C., & Iovine, M. K. (2006). Phylogenetic analysis of three complete gap junction gene families reveals lineage-specific duplications and highly supported gene classes. *Genomics*, 87 (2), 265–274. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2005.10.005>.
- Evans, W. H., & Boitano, S. (2001). Connexin mimetic peptides: specific inhibitors of gap-junctional intercellular communication. *Biochemical Society Transactions* Aug 01,,29(4)606-612
- Fernández, J., Stent, G. (1982). Embryonic development of the hirudinid leech *Hirudo medicinalis*: structure, development and segmentation of the germinal plate. *J. Embryol. exp. Morph.* Vol. 72, pp. 71-96.
- Hervé, J.C., Phelan, P., Bruzzone, R., White, T.W., 2005. Connexins, innexins and pannexins: bridging the communication gap. *Biochimica et Biophysica Acta* 1719 (1), 3-5.

- Hervé, J. C., Bourmeyster, N., Sarrouilhe, D., & Duffy, H. S. (2007). Gap junctional complexes: From partners to functions. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 94(1–2), 29–65. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2007.03.010>
- Kandarian, B., Sethi, J., Wu, A., Baker, M., Yazdani, N., Kym, E., ... Macagno, E. (2012). The medicinal leech genome encodes 21 innexin genes: Different combinations are expressed by identified central neurons. *Development Genes and Evolution*, 222(1), 29–44. <https://doi.org/10.1007/s00427-011-0387-z>
- Martinez S, Geijo E, Sanchez Vives MV, Puelles L, Gallego R (1992) Reduced junctional permeability at interrhomboameric boundaries. *Development* 116:1069–1076
- Panchin, Y. V. (2005). Evolution of gap junction proteins – the pannexin alternative. *Journal of Experimental Biology*, 208 (8), 1415–1419. <https://doi.org/10.1242/jeb.01547>
- Rapti, G., Li, C., Shan, A., Lu, Y., Shaham, S. (2017). Glia initiate brain assembly through non-canonical Chimaerin/ Furin axon guidance in *C. elegans*. *Nature Neuroscience* 20(10): 1350–1360
- Samuels, S. E., Lipitz, J. B., Dahl, G., & Muller, K. J. (2010). Neuroglial ATP release through innexin channels controls microglial cell movement to a nerve injury. *The Journal of general physiology*, 136(4), 425-442.
- Stebbing, L., Todman, M. G., Phelan, P., Bacon, J. P., & Davies, J. (2000). Two *Drosophila* innexins are expressed in overlapping domains and cooperate to

form gap junction channels. *Molecular Biology of the Cell*, 11 (7), 2459–2470.

<https://doi.org/10.1091/mbc.11.7.2459>

Todd, K. L., Kristan, W. B., & French, K. A. (2010). Gap junction expression is required for normal chemical synapse formation. *Journal of Neuroscience*, 30(45), 15277-15285.

Yazdani, N., Firme III, C. P., Macagno, E. R., & Baker, M. W. (2013). Expression of a dominant negative mutant innexin in identified neurons and glial cells reveals selective interactions among gap junctional proteins. *Developmental neurobiology*, 73 (8), 571-586.

Wang, J., Ma, M., Locovei, S., Keane, R. W., & Dahl, G. (2007). Modulation of membrane channel currents by gap junction protein mimetic peptides: size matters. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 293(3), C1112-C1119.

Warner, A., Clements, D. K., Parikh, S., Evans, W. H., & DeHaan, R. L. (1995). Specific motifs in the external loops of connexin proteins can determine gap junction formation between chick heart myocytes. *The Journal of Physiology*, 488(3), 721-728.