



UNIVERSIDAD DE TALCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE  
SUBPOBLACIONES NEURONALES DE GANGLIOS ESPINALES EN MUESTRAS  
DE GANGLIO SUBMANDIBULAR DE RATÓN

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO  
EN TECNOLOGÍA MÉDICA

ALUMNO: MATÍAS IGNACIO OSORIO RODRÍGUEZ

PROFESOR GUIA: JUAN CARLOS TAPIA AMARO BQ.PhD

TALCA-CHILE  
2019

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCIÓN.....	7
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
3.1 Identificación y clasificación de tipos neuronales.....	9
3.2 Marcadores moleculares de subpoblaciones neuronales.....	13
3.2.1 Cerebelina 2 (Cbln2).....	13
3.2.2 Familia de proteínas con similitud de secuencia número 19 miembro a 1(Fam19a1).....	14
3.2.3 Heparanasa (Hpse).....	15
3.2.4 Familia de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas relacionados al protooncogén Mas, miembro D (Mrgprd).....	16
3.2.5 Neurotrimina (Ntm).....	17
3.2.6 Proteína de la glándula submandibular regulada por andrógenos tipo 2 (Smr2).....	18

3.2.7	Canal iónico de potencial del receptor transitorio para cationes, subfamilia A, miembro 1 (Trpa1).....	19
4.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	20
4.1	Hipótesis.....	20
4.2	Objetivo general.....	20
4.3	Objetivos específicos.....	20
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1	Preparación de reactivos.....	22
5.2	Diseño y síntesis de oligonucleótidos para la amplificación mediante PCR en tiempo real.....	22
5.3	Obtención de médula espinal y ganglio de la raíz dorsal a partir de ratones BALB/c.....	24
5.4	Purificación de RNA total a partir de muestras de médula espinal y ganglio de la raíz dorsal.....	26
5.5	Estimación de la concentración de RNA total.....	27
5.6	Síntesis de DNA complementario a partir de RNA total.....	28
5.7	Amplificación mediante PCR en tiempo real.....	29
5.8	Amplificación mediante PCR convencional.....	30
5.9	Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos en la PCR.....	34

6. RESULTADOS.....	36
6.1 Análisis del RNA total purificado desde muestras de tejido nervioso de médula espinal, ganglio espinal y ganglio submandibular desde ratones BALB/c adultos.....	36
6.2 Análisis relativo de la expresión mediante RT-qPCR de los genes candidatos a marcadores de subpoblaciones neuronales Cbln2, Fam19a1, Hpse, Mrgprd, Ntm, Smr2 y Trpa1, desde las muestras de cDNA generadas a partir del RNA total desde médula espinal, ganglios espinales y ganglio submandibular de ratón.....	40
6.3 Análisis de los partidores utilizados para la RT-qPCR de los genes Hpse y Mrgprd por medio de la curva de disociación.....	46
6.4 Análisis de la expresión mediante PCR de los genes Hpse, Gapdh y Mrgprd, desde las muestras de cDNA generadas a partir del RNA total desde médula espinal, ganglios espinales y ganglio submandibular de ratón.....	52
7. DISCUSIÓN.....	58
8. CONCLUSIÓN.....	64
9. BIBLIOGRAFÍA.....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.....	37
Figura 2.....	38
Figura 3.....	43
Figura 4.....	45
Figura 5.....	49
Figura 6.....	50
Figura 7.....	54
Figura 8.....	56

## 1. RESUMEN

Las neuronas son el componente primordial en la señalización cerebral. Es por ello que cualquier intento por comprender cómo funciona el sistema nervioso implica la investigación de las distintas subpoblaciones neuronales. Esta heterogeneidad neural puede ser caracterizada mediante el análisis de la expresión de los niveles de mRNA en búsqueda de marcadores moleculares específicos.

En este contexto, de intenso estudio en función de definir estas subclases de neuronas y sus diferentes funciones, pero focalizado a algunas regiones del sistema nervioso central y periférico, nos enfocamos en caracterizar molecularmente las neuronas ubicadas en el ganglio submandibular (GSM).

Para ello se analizaron 7 genes previamente asociados a caracterización de subpoblaciones neuronales en ganglio espinal de la raíz dorsal (DRG): *Cbln2*, *Fam19a1*, *Hpse*, *Mrgprd*, *Ntm*, *Smr2* y *Trpa1*. Estos genes fueron analizados por medio de ensayos de RT-qPCR y PCR, desde RNA total de ganglios submandibulares de ratones.

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019



El resultado de esta investigación mostró que el gen *Hpse* presenta una expresión preferencialmente en el ganglio submandibular. De igual forma, *Smr2* isoforma 1 se expresa en altos niveles en este ganglio, similares a los observados para *Hpse*. De forma contraria, *Mrgprd* y *Trpa1* mostraron ser genes de expresión específica en DRG.

## 2. INTRODUCCIÓN

La pregunta por la naturaleza de las sensaciones, emociones, de la capacidad de moverse, de hablar, reír o llorar es secular en el hombre. La relación de estos fenómenos con el sistema nervioso ha sufrido vaivenes históricos, hasta la emergencia de un cuerpo de doctrina enfocado al esclarecimiento de la estructura y función del sistema nervioso: la Neurociencia.

La neurociencia se refiere a aquellas disciplinas o especialidades que abordan el estudio y conocimiento de la anatomía y función del sistema nervioso. El cual está constituido por diversos tipos celulares altamente especializados, donde las neuronas cumplen el rol fundamental de conducir los impulsos nerviosos, mientras que la glía se encarga de dar soporte metabólico y modular la actividad neuronal.

En la actualidad, la neurociencia es el resultado de la convergencia de varias tradiciones científicas: la biología molecular, neurofisiología, anatomía, bioingeniería, embriología, biología celular y psicología, entre otras. El carácter interdisciplinario es singular y propio de la neurociencia entre otras ciencias y está en la base de su extraordinaria pujanza y atractivo.

Gracias al surgimiento de distintas técnicas moleculares, celulares y el uso de modelos animales en el laboratorio, se ha logrado establecer la conformación y el funcionamiento de este complejo sistema, permitiéndonos entender los fenómenos que allí ocurren.

Actualmente, no existe una clasificación absoluta de las distintas poblaciones neuronales, debido a que estas se agrupan en colecciones heterogéneas, lo cual dificulta aún más su estudio. Algunos investigadores han intentado clasificar los tipos neuronales según la forma en que algunos marcadores se relacionan con aspectos funcionales, en lugar de hacerlo mediante una estrategia integral que permita una clasificación objetiva basada en estados transcripcionales específicos. Por lo tanto, el establecimiento de una clasificación de los tipos neuronales, complementada con información sobre la expresión génica específica, servirá como un catálogo de las bases celulares y moleculares para su comprensión.

Por esta razón los análisis de perfiles de expresión génica, hoy en día, cumplen con un rol fundamental en la investigación. Dentro de las técnicas más tradicionales de esta clase de estudios, se encuentra la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Una de sus variantes, la RT-qPCR, permite medir cambios en la expresión génica de subpoblaciones celulares y corresponde a la técnica que empleamos en la presente investigación para analizar los niveles de expresión de 7 genes candidatos a marcadores de subpoblaciones neuronales (Cbln2, Fam19a1, Hpse, Mrgprd, Ntm, Smr2 y Trpa1), en muestras de médula espinal, ganglios espinales y ganglios submandibulares de ratón.

### 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Identificación y clasificación de tipos neuronales.

Desde el descubrimiento inicial del padre y fundador de la neurobiología, Santiago Ramón y Cajal, los científicos han podido diferenciar varios tipos neuronales. Sin embargo, hasta el día de hoy sigue sin encontrarse un sistema de clasificación unificado.

En general las neuronas pueden ser clasificadas de acuerdo a criterios que incluyen: características bioquímicas, propiedades electrofisiológicas, morfología, procedencia y patrones de las proyecciones, entre otras (1).

Desde el punto de vista morfológico las neuronas, han sido clasificadas de diferentes maneras. Una de ellas corresponde a 3 tipos A, B y C, identificadas en base a su tamaño y distribución de sus organelos. Luego, fueron subdivididas en 6 subtipos de acuerdo a la observación microscópica según la distribución de la sustancia cromatofílica Nissl en el citoplasma, generando los tipos: A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y C (2).

Ejemplos de clasificaciones basadas en la morfología celular, ya sea por la forma del soma, tamaño o patrones en sus dendritas, son probablemente el criterio de clasificación más común en la literatura. Alguno de ellos basados en la forma y el tamaño de sus prolongaciones pueden clasificarse en: Piramidales, Poliédricas, Esféricas, Estrelladas o Fusiformes (3).

Años más tarde, Sommer en el año 1985, publicó su clasificación basada en 7 criterios, con respecto a la subpoblación neuronal del ganglio de la raíz dorsal (DRG) en ratones. Utilizando una combinación de su ultraestructura junto con características citoquímicas (4).

Los tipos de células neuronales también pueden ser clasificados en base a sus propiedades electrofisiológicas. Como las neuronas neocorticales, las que presentan diferencias significativas en el tiempo de respuesta a potenciales de acción (5).

Del mismo modo se puede realizar una clasificación según la procedencia de las aferencias primarias, dividiéndose en viscerales, cutáneas y musculares. Las cuales pueden estar constituidas por fibras mielínicas o amielínicas, que dan origen a distintos grupos (6).

Si consideramos los diferentes grupos de canales iónicos y los tipos de fibras que conducen el impulso nervioso, las neuronas se pueden clasificar en tres grupos: las neuronas F, A y H. Las F conducen el impulso nervioso con fibras tipo II y III y su potencial de acción

es sensible a la tetrodotoxina. Por su parte las neuronas A utilizan fibras tipo IV y son sensibles a la tetrodotoxina mediado por iones sodio. Finalmente las H conducen el impulso nervioso con fibras tipo III y IV y son tetrodotoxina resistente mediados por iones sodio y calcio (7).

Se podría seguir enumerando las clasificaciones neuronales que se encuentran en la literatura, como la polaridad neuronal, característica de sus dendritas, según su mediador químico y algo tan sencillo como según su función, y aun así seguirían apareciendo más.

La necesidad de poder caracterizar diferentes subpoblaciones neuronales es un desafío vigente hasta el día de hoy. La identificación de los distintos subtipos neuronales juega un rol preponderante, por lo mismo con el transcurso de los años se han desarrollado distintas técnicas que facilitan el estudio neuronal.

En los años 70, con la aparición de métodos inmunohistoquímicos para la identificación de tipos celulares, los investigadores pudieron superar algunas de las dificultades técnicas asociadas otros métodos. Los investigadores comenzaron a utilizar la inmunohistoquímica para identificar neuronas que contenían enzimas de síntesis de las monoaminas: tirosina hidroxilasa (TH), dopamina beta hidroxilasa (DBH) y triptofano hidroxilasa (TrH) (8).

Tras la implementación de esta nueva técnica como una nueva herramienta para la identificación neuronal, de a poco fueron apareciendo marcadores específicos de este tipo celular, como el uso de las enolasas de cerebro (9), acetiltransferasa de colina (10), parvalbúmina (11) o la proteína de neurofilamentos (12,13). En la mayoría de los casos se desconocía la naturaleza y las propiedades de los antígenos neuronales que utilizaban.

En la actualidad se han desarrollado diversas estrategias moleculares para la identificación neuronal, como métodos que utilizan moduladores transcripcionales y recombinasas específicas de sitio, para el marcaje de poblaciones neuronales específicas (14).

Una de las técnicas más utilizadas para identificación de subtipos neuronales es el single-cell RNAseq (scRNAseq). Con esta metodología se puede examinar la secuencia de una célula individual, proporcionando una mayor resolución en las diferencias celulares entre una célula a otra, junto con poder ver el rol de esa célula en su microentorno (15).

Con la utilización del scRNAseq se han podido identificar subpoblaciones neuronales. Uno de esos estudios pudo identificar 7 subtipos de neuronas sensoriales en el colon. Se analizaron neuronas sensitivas de la región toracolumbar (TL) y lumbosacral (LS), las que estaban asociadas con ganglio de la raíz dorsal (DRG). En donde cada subpoblación identificada posee un marcador específico. Estos genes son: Cbln2, Fam19a1, Hpse, Mrgprd, Ntm, Smr2 y Trpa1 (16).

## 3.2 Marcadores moleculares de subpoblaciones neuronales.

### 3.2.1 Cerebelina 2 (Cbln2)

Cbln2 conforma la familia de proteínas precursoras de Cerebelina junto a Cbln1, Cbln3 y Cbln4. Dentro de ellos el más estudiado es Cbln1. Este último pertenece a la superfamilia de factores de necrosis tumorales C1q, y que en cerebelo es secretado por las células granulares del y que desempeña un rol crucial como regulador transneuronal de la integridad y plasticidad de sus sinapsis con las células de Purkinje (17).

Cbln1 originalmente fue identificado como el precursor del hexadecapeptido específico del cerebelo (Cerebelina), por lo que fue denominado Precerebelina, y que presenta una secuencia homóloga al componente del complemento C1QB. En ratón Cbln1 y Cbln2 presentan una identidad en su secuencia de aminoácidos de un 88% en la región C-terminal (18).

Por medio de RT-qPCR se ha determinado que Cbln2 se expresa diferencialmente en regiones específicas del cerebro de ratón, con una alta expresión en la corteza cerebral e hipotálamo, seguida del bulbo olfatorio y tálamo (19). También se observan altos niveles de expresión de este gen en el cerebro embrionario.



### 3.2.2 Familia de proteínas con similitud de secuencia número 19, miembro a1 (Fam19a1)

Fam19a1 es un gen que codifica para una pequeña proteína secretada que comparte similitud en su secuencia con la familia de quimioquinas CC (20). Pertenece a la familia de proteínas con similitud de secuencia número 19 con función hasta el momento desconocida. En humanos, esta proteína ha sido denominada TAFAl. La familia está compuesta por 5 genes homólogos referidos como TAFAl del 1 al 5.

Los niveles de expresión de Fam19a1 son altos en regiones específicas del cerebro, como en las corteza: frontal, temporal, occipital y parietal, sumado a la médula, mientras que se ha visto una baja expresión en cerebelo (20).

Recientemente se ha determinado que FAM19A1 es el ligando para el receptor acoplado a proteína G huérfano GPR1, y que actúa como un factor regulador involucrado en la modulación de proliferación neural de células madres y su diferenciación (21).

### 3.2.3 Heparanasa (Hpse)

Heparán Sulfato y Proteoglicanos de Heparán Sulfato (HSPGs) son un componente principal de la membrana basal y de la matriz extracelular (22). Estas unen varias moléculas como factores de crecimiento y citoquinas modulando las funciones biológicas (23). Las heparanasas, como la Hpse, son endoglicosidasas que escinden la cadena lateral del HSPG para permitir la remodelación de la matriz extracelular para el movimiento celular o la liberación de moléculas bioactivas de la matriz extracelular o la superficie celular (24).

La escisión del heparán sulfato por la heparanasa está implicado en la extravasación de leucocitos y células tumorales metastásicas, identificando esta enzima como un posible blanco para terapias antiinflamatorias y antimetastásicas. Es más, se ha demostrado la correlación de la expresión de Hpse y la actividad heparanasa con el incremento en el potencial metastásico en tejido y líneas celulares de cáncer de mamas (25).

En modelo murino se ha visto que la expresión de Hpse se concentra en la piel, principalmente en el estrato granuloso y la primera capa del estrato córneo, en la parte superior de la epidermis (26). También se ha detectado en los folículos pilosos y en las glándulas sebáceas (27).

Por su parte, en los humanos se ha reportado una alta expresión de la heparanasa en placenta, bazo y débilmente expresado en linfonodos, timo, leucocitos de sangre periférica, médula ósea, células endoteliales, hígado fetal y tejido tumoral. Al igual que en ratón, se expresa en los folículos pilosos del humano, específicamente en la capa interna de Henle y Huxley (22,28–31)

#### 3.2.4 Familia de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas relacionados al protooncogén Mas, miembro D (Mrgprd)

En el año 2001 Dong X. y colaboradores identificaron tanto en humano como en ratón una familia de receptores acoplados a la proteína G (GPCRs) relacionados con el oncogen MAS1, incluyendo Mrgprd. La familia de receptores MRG 7 hélices transmembrana. Se ha reportado que en subgrupo de Mrgprd se expresa en subpoblaciones de neuronas sensoriales que detectan estímulos de dolor (32).

Los patrones de expresión de estos genes revelaron un grado inesperado de diversidad molecular entre neuronas nociceptivas. Algunos Mrgprd pueden activarse específicamente en células heterólogas por neuropéptidos de RFamide como NPF y NPAF, que son

analgésicos *in vivo*. Los autores concluyeron que los MRG pueden regular la función y/o el desarrollo del nociceptor, incluida la sensación o modulación del dolor (32).

La expresión de MRGPRD en humanos ha sido investigada mediante la técnica de RNA-seq. La data que se encuentra disponible en Bgee (*Gene Expression Data in Animals*), indica que el nivel de expresión más alto para este gen se localiza en la capa inferior del esófago muscular, seguido de la mucosa del estómago (33). En ratón, los genes *Mrgprd* se expresan en un subconjunto de neuronas sensoriales que incluye nociceptores, particularmente en la subclase de neuronas sensoriales no peptedérgicas que son IB4+ y VR1- (34).

### 3.2.5 Neurotrimina (Ntm)

Ntm pertenece a la familia IgLON de moléculas de adhesión celular ancladas a Glicosilfosfatidilinositol (GPI), que forma parte de la superfamilia que contienen el dominio inmunoglobulina (Ig). La familia IgLON recibe su nombre de sus 3 miembros LSAMP, OPCML y neurotrimina (NTM) (35).

Neurotrimina se expresa fuertemente en varios sistemas de proyección en el desarrollo: en neuronas del tálamo, láminas corticales inferiores en el prosencéfalo y en el núcleo pontino, células granulares del cerebelo y células de Purkinje en la parte posterior del cerebro. Neurotrimina también se expresa en niveles altos en el bulbo olfatorio, retina neural, ganglios de la raíz dorsal (DRG), médula espinal (SC) y en una distribución gradual en los ganglios basales e hipocampo (36).

### 3.2.6 Proteína de la glándula submandibular regulada por andrógenos tipo 2 (Smr2)

Smr2 pertenece a la familia de proteínas ricas en ácido glutámico/glutamina (GRP). Esta clase de proteínas abunda en la glándula submandibular (SMG) en ratas. Smr2 difiere de los otros 2 miembros descritos de su familia en que presenta niveles de mRNA 20 a 30 veces más altos en ratas machos que en hembras a nivel del SMG (37).

Smr2 es un inhibidor de endopeptidasas y participa en los procesos biológicos de regulación de percepción sensorial al dolor y respuesta a sustancias tóxicas (38). En modelo murino presenta 5 isoformas producidas por splicing alternativo, denominadas alfa, beta, gama, delta y épsilon. Sólo 3 de estas isoformas se describen en la base de datos de expresión de genes Bgee: alfa, gama y delta (33).

### 3.2.7 Canal iónico de potencial del receptor transitorio para cationes, subfamilia A, miembro 1 (Trpa1)

TRPA1 también conocido como ANKTM1 fue caracterizado en 2003 como un canal activado por el frío, con una temperatura de activación más baja que el receptor de frío y de mentol TRPM8. Trpa1 es un miembro distante de la familia de canales TRP que comparte poca similitud de aminoácidos con TRPM8. Se encuentra en un subconjunto de neuronas sensoriales nociceptivas que coexpresan TRPV1/VR1 (el receptor de capsaicina / calor) pero que no expresan TRPM8 (39).

Este canal de catión no selectivo cumple un papel central en la respuesta del dolor a los mediadores inflamatorios endógenos y a una amplia gama de irritantes volátiles, como el aceite de mostaza, cinamaldehído, ajo y acroleína, un irritante de gases lacrimógenos y gases de escape de vehículos (40). Puede ser un componente para el canal de transducción mecanosensible de las células ciliadas en el oído interno, participando así en la percepción de sonidos (41).

La expresión del gen Trpa1 en ratón se localiza en el oído interno, específicamente en un subconjunto de neuronas nociceptivas. Se ha reportado que se expresa en el ganglio cervical superior (40,42). Por otra parte, este gen se expresa a un nivel muy bajo en humanos, localizándose en los fibroblastos y a un nivel moderado en las células liposarcomas (43).

## **4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### 4.1 Hipótesis

Los genes *Cbln2*, *Fam19a1*, *Hpse*, *Mrgprd*, *Ntm*, *Smr2* y *Trpa1* definen conjuntos de subpoblaciones neuronales en el ganglio submandibular.

### 4.2 Objetivo general

Analizar los niveles de expresión de genes candidatos a marcadores de subpoblaciones neuronales: *Cbln2*, *Fam19a1*, *Hpse*, *Mrgprd*, *Ntm*, *Smr2* y *Trpa1*, en muestras de médula espinal, ganglios espinales y ganglios submandibulares de ratón.

### 4.3 Objetivos específicos

4.3.1 Purificar RNA total desde muestras de tejido nervioso de médula espinal, ganglio espinal y ganglio submandibular desde ratones BALB/c adultos y sintetizar librerías de cDNA.

4.3.2 Amplificación mediante PCR en tiempo real de los genes candidatos a marcadores de subpoblaciones y de los genes de referencia desde la librería de cDNA de cada tejido.

4.3.3 Analizar los valores de amplificación para cada gen candidato normalizado respecto al mejor gen de referencia.



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Preparación de reactivos

Para la realización de esta tesis, todos los reactivos empleados fueron de grado pro-análisis y las soluciones preparadas en agua libre de nucleasas (AM9930, Ambion).

### 5.2 Diseño y síntesis de oligonucleótidos para la amplificación mediante PCR en tiempo real

Para el diseño de partidores se empleó el programa AmplifX v1.5.4 (Centre de Recherche en Neurobiologie et Neurophysiologie de Marseille), eligiendo aquellos sets de partidores que fueran específicos para cada gen de interés (Primer Blast), que hibridaran en exones diferentes y cuya curva de disociación teórica mostrase un solo peak ( $\mu$ Melt, v2.0.2 University of Utah).

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Macrogen (Seúl, Corea del Sur) y fueron resuspendidos en 200 µl agua libre de nucleasas en condiciones de esterilidad dentro de una Cabina de Bioseguridad Tipo II (ESCO). Para su cuantificación se realizó una dilución de 1 µl de la solución stock en 49 µl agua libre de nucleasas. La concentración fue calculada empleando un factor de 33 ng/µl por cada unidad de absorbancia a 260 nm medida en un espectrofotómetro de micro volúmenes (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). La concentración micromolar [µM] fue calculada empleando la siguiente ecuación:

$$[\mu M] = \frac{\left[ \frac{ng}{\mu l} \right] \times 10^3 \times f. d.}{PM}$$

Donde [ng/µl] es la concentración obtenida desde la absorbancia de la dilución, *f.d.* el factor de dilución (en este caso 50) y PM el peso molecular teórico del oligonucleótido. En condiciones de esterilidad, se ajustó el volumen de la solución stock hasta obtener una concentración final de 50 µM. Las soluciones stock de oligonucleótidos fueron almacenados a -20°C.

### 5.3 Obtención de médula espinal y ganglio de la raíz dorsal a partir de ratones BALB/c

Los procedimientos fueron realizados según las normativas dispuestas por el Comité Institucional de Ética, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio CIEQUAL de la Universidad de Talca y por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica CONYCYT para el proyecto FONDECYT 1160888.

Para la realización de los experimentos se emplearon ratones postnatales de la cepa BALB/c de 14 a 21 días de vida, estos fueron anestesiados con isoflurano y sacrificados mediante decapitación. Para la obtención de médula espinal y ganglios de la raíz dorsal se utilizó el método de extracción hidráulica (44) donde por medio de la aplicación de presión directa sobre la estructura, se expulsa el tejido de interés.

Utilizando una tijera quirúrgica, se cortó la cabeza del animal justo en la parte inferior de la base del cráneo, se retiró la piel que cubre el dorso del animal realizando un corte longitudinal paralelo a la columna vertebral. Se realizaron cortes en las costillas, se retiró el tejido conectivo, músculos y órganos adheridos para desprender la columna vertebral. Una vez hecho esto se realizaron dos cortes en cada extremo con el fin de exponer el foramen vertebral, luego de esto y con ayuda de una jeringa llena de tampón salino frío (PBS 1×) se aplicó presión directa sobre la estructura provocando la eyección de la médula espinal desde la región cefálica de la columna. Una vez expulsada fue fraccionada en sus segmentos

cervical, torácico y lumbar, depositando cada fragmento en tubos cónicos de microcentrífuga de 1,5 ml almacenados en hielo.

La columna vertebral vacía que resultó del procedimiento anterior fue fijada con alfileres de disección en sus regiones anterior y posterior sobre una placa de Petri rellena en su base con silicona negra (Sylgard). Sobre la placa se volcó buffer PBS 1 × frío hasta cubrir el tejido, para evitar su descomposición. Bajo un estereoscopio de luz visible, se cortó cada vértebra con una tijera Vannas a través del foramen por la región ventral. Luego, se cortó cada vértebra por la región dorsal, obteniéndose 2 mitades en cuya región interna se aprecian fácilmente los ganglios espinales dentro del foramen intervertebral. El pool total de ganglios espinales fue llevado a un tubo de 1,5 ml y conservados también en hielo.

Para la disección de los ganglios submandibulares, los ratones fueron sacrificados en condiciones de anestesia profunda mediante dislocación cervical, evitando generar mayores daños en el tejido del cuello del animal. En posición dorsal, se desinfectó el cuello del animal con etanol 70% y luego se realizó un corte con una tijera Iris curva-angulada desde la escotadura yugular del esternón hasta la base de la mandíbula, a través de la piel del cuello en dirección rostral, evitando penetrar en el tejido glandular. Luego, se cortó desde la escotadura hacia los hombros, descubriendo el tejido profundo. Se retiró la grasa, glándulas superficiales y tejido muscular. Se disecó la glándula submandibular completa empleando la tijera Iris, tras lo cual el tejido fue transferido a una placa de Petri rellena en su base con

silicona negra (Sylgard) más buffer PBS 1× frío hasta cubrir el tejido, para evitar su descomposición. Bajo un estereoscopio de luz visible, se diseccionó cada uno de los ganglios submandibulares, los que se encuentran adheridos a los ductos principales de las glándulas submandibulares. El pool total de ganglios submandibulares de un ratón fue llevado a un tubo de 1,5 ml y conservados también en hielo.

A todos los tubos obtenidos anteriormente se les agregó 500 µl del reactivo TRIzol (Invitrogen). Con una mano de mortero desechable para tubos de 1,5 ml (pistilo) se molió cada tejido hasta no observar restos de ellos, posterior a esto se procedió a homogeneizar las muestras utilizando una jeringa con aguja de pequeño calibre. Luego, se adicionaron otros 500 µl del reactivo TRIzol y se mezcló con movimiento de vórtice, para finalmente almacenarlos a -20°C.

#### 5.4 Purificación de RNA total a partir de muestras de médula espinal y ganglio de la raíz dorsal

Los lisados preparados con TRIzol (Invitrogen) fueron descongelados, mezclados por movimiento de vórtice y divididos en dos tubos de 500 µl cada uno. Se agregaron 100 µL de cloroformo a cada tubo, agitando manualmente por 20 segundos, y luego se centrifugó a 13,000 g por 15 minutos a temperatura ambiente. Tras esto se obtuvieron aproximadamente

250  $\mu$ l de fase acuosa desde cada tubo, la cual fue tomada empleando una punta roma de micropipeta con filtro de 200  $\mu$ l evitando alterar la interfase y de esta forma no contaminar con DNA genómico la preparación del RNA total. Las fases acuosas correspondientes a la misma muestra se juntaron en un tubo de 1,5 ml libre de nucleasas (aproximadamente 500  $\mu$ l) y se añadieron 500  $\mu$ l de isopropanol, se agitó vigorosamente y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras una centrifugación a 13,000 g por 15 minutos a 4°C, se procedió a retirar el sobrenadante, se agregó 1 ml de etanol 75% y se agitó vigorosamente hasta que el pellet de RNA se despegó del tubo. El pellet fue recuperado mediante centrifugación a 13,000 g por 15 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante por inversión y se dejó secar por 10 minutos a temperatura ambiente, para luego resuspenderlo en 20  $\mu$ l de agua libre de nucleasas. Para aumentar el rendimiento de la resuspensión, se incubó la solución de RNA a 55°C durante 10 minutos, para luego depositarlas rápidamente en hielo por otros 10 minutos. Las preparaciones de RNA total fueron almacenadas a -80°C.

## 5.5 Estimación de la concentración de RNA total

Se preparó un gel de agarosa al 2 % en buffer TAE 0,5 $\times$  teñido con *GelRed (Biotium)* a una concentración final de 0,125 $\times$ . Las muestras de RNA fueron preparadas para la electroforesis en tubos de 1,5 ml, depositando en ellos 1  $\mu$ l de la muestra de RNA, 3  $\mu$ l de agua libre de nucleasas y 4  $\mu$ l de buffer de carga denaturante para *RNA 2 $\times$  (R0641, Thermo*

*Scientific*). Se preparó además un tubo 1,5 ml que contenía 1  $\mu$ l del *RiboRuler High Range RNA Ladder*, (SM1821, *Thermo Scientific*) diluido 1:8 más 7  $\mu$ l de buffer de carga denaturante para *RNA 2 $\times$* . Las preparaciones fueron mezcladas vigorosamente, y tras una centrifugación breve fueron incubados 5 minutos a 55°C, para luego ser incubados en hielo por otros 5 minutos. Tras una centrifugación breve, se cargaron las preparaciones en los pocillos del gel de agarosa y las muestras fueron resueltas en una cámara de electroforesis rellena de buffer TAE 0,5 $\times$  a 100 Volts por 40 minutos. El gel fue registrado en un fotodocumentador de luz UV (Enduro GDS, Labnet). La imagen obtenida fue analizada mediante densitometría empleando el programa ImageJ 1.52i (NIH) y la concentración de cada muestra fue estimada como la suma de las intensidades correspondientes a las bandas de los RNA ribosomales 28S, 18S y 5S/5,8S, y el total de intensidad fue transformado a cantidad (nanogramos) de RNA respecto de las intensidades obtenidas para las bandas del estándar de RNA de concentración conocida.

## 5.6 Síntesis de DNA complementario a partir de RNA total

En un tubo de 0,5 ml libre de nucleasas se mezclaron 2  $\mu$ g de RNA total, 50 ng de partidores aleatorios hexaméricos (Invitrogen) 1:5, 1  $\mu$ l de dNTPs 10 mM (Promega) y agua libre nucleasas (Ambion) hasta completar 7  $\mu$ l. Cada una de estas reacciones fueron incubadas a 23°C por 10 minutos, luego a 65°C por 5 minutos y luego rápidamente puestas

en hielo, para permitir la hibridación de los partidores a los RNA mensajeros. Tras centrifugar brevemente, a cada tubo se le agregó 1  $\mu$ l de la enzima transcriptasa reversa SuperScriptIV (Thermo Scientific), 4  $\mu$ l del buffer de reacción 5 $\times$  para SuperScriptIV y 1  $\mu$ l de DTT 100 mM. Se generó una reacción control de la transcripción reversa (No RT) que corresponde a una réplica del tubo de reacción hecho para la muestra más concentrada, pero a la que no se le añadió la enzima SuperScriptIV. Luego cada tubo fue incubado a 23°C por 10 minutos, seguido de 55°C por 40 minutos y la enzima inactivada por incubación a 80°C por 10 minutos. Las preparaciones de cDNA fueron centrifugadas, mezcladas y almacenadas a -20°C (45).

## 5.7 Amplificación mediante PCR en tiempo real

Se empleó para la detección relativa de los niveles de expresión de un mRNA de interés con respecto de un gen de referencia. Esto a través de la amplificación de un cDNA representativo de los mensajeros presentes en una muestra de RNA total, obtenida por transcripción reversa (RT-qPCR). En todos los ensayos se empleó el equipo Mx3000P (Stratagene). La sonda fluorescente empleada como agente intercalante de DNA fue “SYBR-Green”. El ciclo umbral (Ct) se definió como el ciclo en el que la fluorescencia del DNA amplificado fue mayor a la fluorescencia umbral, calculada mediante el método basado en amplificación (*amplification-based threshold*). La cuantificación relativa de la muestra se



realizó por el método del  $\Delta\Delta C_t$  (46). Básicamente, se determinó directamente la diferencia entre  $C_t$  del gen de interés (Cbln2, Fam19a1, Hpse, Mrgprd, Ntm, Smr2 o Trpa1) y  $C_t$  de un gen de referencia (B2m y Actb). Luego se contrastó esa diferencia con el  $\Delta C_t$  calculado para la muestra de Médula Cervical (MC), quedando normalizado los valores con respecto a este.

Las reacciones de amplificación (12,5  $\mu$ l final) fueron realizadas en tubos de 0,2 ml de tapa tipo domo transparentes (Axygen). Se empleó el kit 5 $\times$  HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus ROX (Solis Biodyne), 500 nM de cada partidor específico (sentido y antisentido para los genes Actb, B2m y Gapdh) y 2  $\mu$ l de cada reacción de DNA copia o del control (No RT) diluido 1:5 en agua libre de nucleasas. Se adicionó una reacción de control negativo de PCR (NTC) a la cual se agregó 2  $\mu$ l de agua libre de nucleasas como templado. Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo en un termociclador en tiempo real Mx3000P (Stratagene) con el siguiente programa de amplificación: 1 ciclo de 95°C por 12 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 20 segundos y 72°C por 20 segundos. Al final de la amplificación se realizó un ciclo de análisis de curva de disociación.

## 5.8 Amplificación mediante PCR convencional

Las reacciones de amplificación fueron realizadas en tubos de 0,2 ml de tapa plana transparentes (Axygen). Se empleó el kit GoTaq G2 Green Master Mix, 2 $\times$  (Promega), 500 nM de cada partidor específico (sentido y antisentido para los genes Hpse, Mrgprd y Gapdh

de ratón) y 2 µl de cada reacción de cDNA o del control (No RT) diluido 1:3 en agua libre de nucleasas. Se adicionó una reacción de control negativo de PCR (NTC) al cual se añadió 2 µl de agua libre de nucleasas como templado. Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo en un termociclador (Genemate T960 Heal Force), con los siguientes programas de amplificación. Hpse y Gapdh: 1 ciclo de 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, 60°C por 20 segundos y 72°C por 20 segundos, seguido de 1 ciclo de 72°C por 5 minutos y 1 ciclo de 4°C por 5 minutos. Para el gen Mrgprd se realizó el mismo programa disminuyendo la cantidad de ciclos de 35 a 27, manteniendo el resto del programa sin cambios.

A continuación, se indican las secuencias de los oligonucleótidos que se utilizaron:

### **Cbln2**

**#75 Fwd\_mCbln2\_02:** 5'- TCTTCCCTGGGCATTTCTGT - 3'

**#76 Rev\_mCbln2\_02:** 5'- GAGGCAAGGTCAAAGTGGTT - 3'

### **Fam19a1**

**#77 Fwd\_mFam19a1\_01:** 5'- CAAGAAACCGACCTTCCTGT - 3'

**#78 Rev\_mFam19a1\_01:** 5'- GGTTCTTGGGTGAATTCGTG - 3'

## **Hpse**

**#79 Fwd\_mHpse\_02:** 5'- TCTCCACTGCACTAACGTCT - 3'

**#80 Rev\_mHpse\_02:** 5'- TGACCGTTCAGTTGGACAGA - 3'

## **Mrgprd**

**#81 Fwd\_mMrgprd\_01:** 5'- TCTGCGTCCAATTCTGGCAT - 3'

**#82 Rev\_mMrgprd\_01:** 5'- TCTCTGCATCAGGCTGTTCT - 3'

## **Ntm**

**#83 Fwd\_Ntm\_03:** 5'- GCCACCTTTCCCAAAGCTAT - 3'

**#84 Rev\_mNtm\_03:** 5'- TACTGGGTCTGGGTGTTACT - 3'

## **Smr2**

**#85 Fwd\_mSmr2\_01:** 5'- GAACAGACTGCTTCTGACCA - 3'

**#86 Rev\_mSmr2\_01:** 5'- AAGAACCCAGAGGACAAATACC - 3'

## **Smr2**

**#87 Fwd\_mSmr2\_02:** 5'- GATGAAGCCACTGTGTTTGGTC - 3'

**#88 Rev\_mSmr2\_02:** 5'- GTGGTCTTGTAGGATCATGCTG - 3'

## **Trpa1**

**#89 Fwd\_Trpa1\_01:** 5'- CACAATGGCTGGACTGCTTT - 3'

**#90 Rev\_Trpa1\_01:** 5'- CATTGCAACAGCCTTGGCAT - 3'

## **Actb**

**#21 Fwd\_mrActb:** 5'- TGGCTCCTAGCACCATGAAGAT - 3'

**#22 Rev\_mrActb:** 5'- AAACGCAGCTCAGTAACAGTC - 3'

## **B2m**

**#31 Fwd\_mB2m\_02:** 5'- TCGGTGACCCTGGTCTTTCT - 3'

**#32 Rev\_mB2m\_02:** 5'- TCAATGTGAGGCGGGTGGAA - 3'

## **Gapdh**

**#101 Fwd\_Gapdh:** 5'- CATGGCCTTCCGTGTTTCCTA - 3'

**#102 Rev\_Gapdh:** 5'- CCTGCTTCACCACCTTCTTGAT - 3'

### 5.9 Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos en la PCR

Se preparó un gel de agarosa al 2 % en buffer TAE 0,5× teñido con GelRed (Biotium) a una concentración final de 0,125×. Para las muestras de DNA de los genes: Hpse y Gapdh fueron preparadas para la electroforesis mezclando 1 µl de la muestra del producto de PCR con 29 µl de agua libre de nucleasas, generando una dilución 1:30. Luego se tomó 5 µl de la dilución de Hpse y se cargó directamente, mientras que para la muestra de Gapdh se tomaron 5 µl de la dilución y 1 µl de DNA Gel Loading Dye 6× (R0611, Thermo Scientific). Para la muestra de DNA del gen Mrgprd se cargó 5 µl directamente de la PCR al gel de agarosa.

Se preparó también 1 µl del GeneRuler 100 bp DNA Ladder, ready-to-use (SM0243, Thermo Scientific) diluido 1:8 más 7 µl de DNA Gel Loading Dye 6×. Las muestras fueron cargadas en los pocillos del gel de agarosa y resueltas en una cámara de electroforesis rellena

de buffer TAE 0,5× a 100 Volts por 40 minutos. El gel fue registrado en un fotodocumentador de luz UV (Enduro GDS, Labnet).

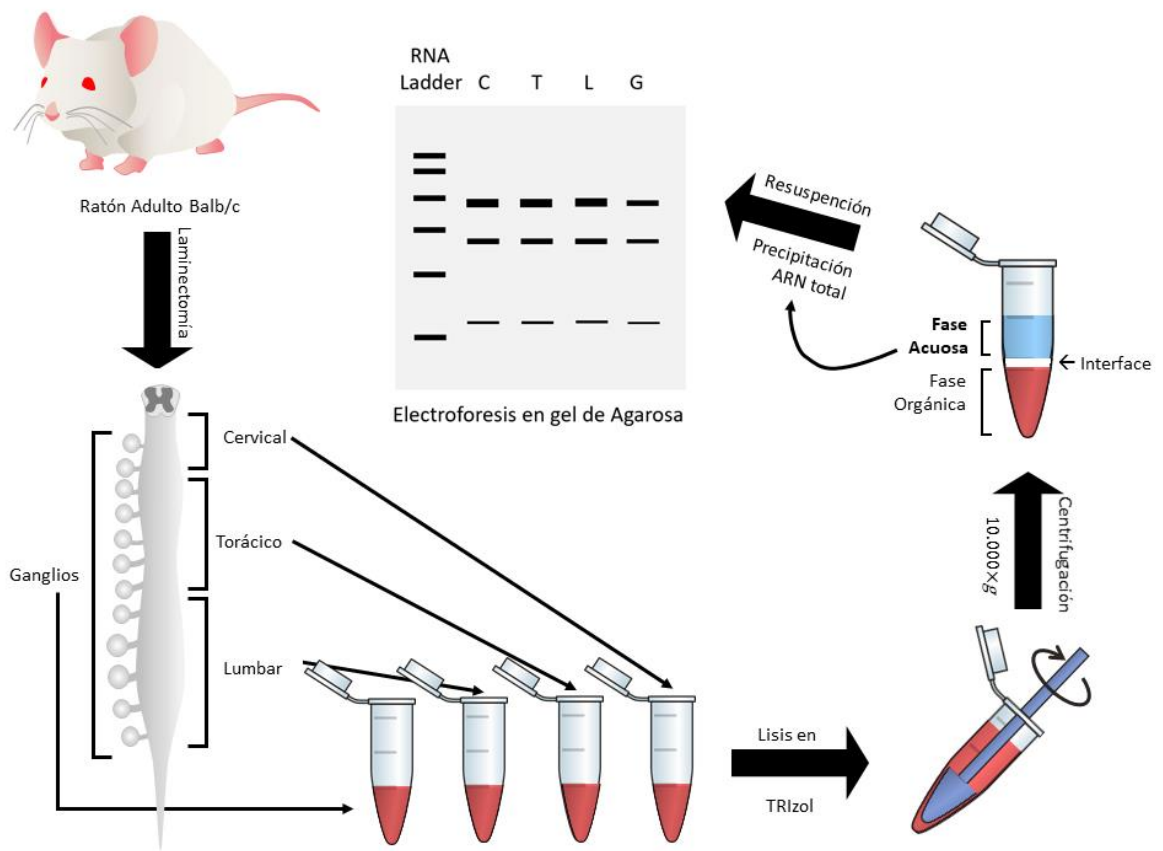
#### 5.10 Análisis de la electroforesis por densitometría

Para el análisis densitométrico de la PCR convencional para el gen Hpse, se utilizó el gen de referencia Gapdh para normalizar la expresión. Para ello se relaciona el área bajo la curva que genera la señal de la banda de Hpse, en pixeles y se divide por la medida correspondiente a la misma muestra del gen de referencia. De esa forma se puede calcular, estimando una relación entre la banda del gen de interés Hpse, con el gen de referencia. Luego se calcula la expresión relativa del gen utilizando la muestra base, en este caso la correspondiente a médula cervical (MC). Se utilizó el programa *ImageJ 1.5n* de *Fiji*, para realizar el análisis de densitometría.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Análisis del RNA total purificado desde muestras de tejido nervioso de médula espinal, ganglio espinal y ganglio submandibular desde ratones BALB/c adultos.

Inicialmente, se diseccionaron ratones BALB/c adultos (N=4) desde los cuales sólo se obtuvo secciones cervicales, torácicas y lumbares de la médula espinal (*spinal cord*, SC) y un *pool* de ganglios espinales de la raíz dorsal (*dorsal root ganglia*, DRG) según se indica en métodos. Para la purificación del RNA total, y bajo un protocolo estricto de manipulación para prevenir la contaminación con RNAsas, las muestras de tejido fueron lisadas en presencia del reactivo TRIzol (Thermo Scientific). Tras agregar cloroformo, agitar y centrifugar, se generan 2 fases siendo la fase acuosa superior la fracción que contiene el RNA total. Este RNA total fue precipitado con isopropanol, lavado con etanol 70% y resuspendido en agua libre de nucleasas, para luego ser analizado mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 2).

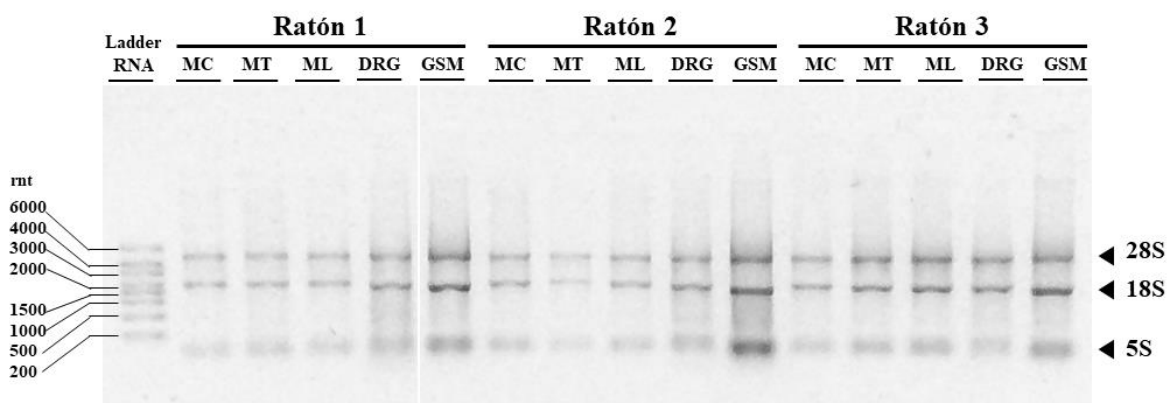


**Figura 1: Esquema secuencial de las etapas de obtención y procesamiento de las muestras de médula espinal: porciones cervical (C), torácica (T), lumbar (L) y ganglios espinales (G).**

Los tejidos fueron obtenidos a partir de expulsión hidráulica y el procesamiento de extracción de RNA por medio del método de TRizol. La adición de cloroformo seguida de centrifugación promueve la separación en dos fases, una acuosa superior y otra inferior orgánica. El RNA permanece exclusivamente en la fase acuosa, mientras que el DNA genómico se encuentra en la interfase. Las proteínas permanecen en la fase orgánica. Fuente: Villegas, M. Caracterización molecular de subpoblaciones neuronales presentes en médula



espinal, ganglio espinal de la raíz dorsal y ganglio submandibular de ratón Adaptado de Villegas, M. (47).



**Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa del RNA total obtenido de las muestras de médula espinal y ganglio espinal desde ratones BALB/c adultos.**

Se indican los RNA totales purificados desde los segmentos cervical, torácico y lumbar de médula espinal (MC, MT y ML, respectivamente), el *pool* de ganglios de la raíz dorsal (DRG) y ganglio submandibular (GSM), por cada ratón. Se cargó además un estándar de RNA (*RiboRuler High Range RNA Ladder*, Thermo Scientific) de concentración conocida, el que fue empleado para el análisis densitométrico para la estimación de la concentración de las muestras de RNA total. La electroforesis fue realizada en un gel de agarosa nativo al 1% en buffer TAE 0,5× teñido previo a la corrida con 0,125× GelRed (Biotium). La corrida electroforética se realizó a 100 volts por 40 minutos. Se indican las bandas correspondientes

a los RNA ribosomales de las subunidades mayor (28S y 5S-5,8S) y menor (18S) del ribosoma. rnt: ribonucleótidos. La imagen ha sido editada entre la muestra de DRG y GSM del ratón 1 debido a errores de carga para facilitar la comprensión de los resultados. Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 2 se observan las bandas correspondientes a los RNA ribosomales 28S, 18S y 5S-5,8S, en los tamaños en los que deberían migrar (4.800 rnt, 1.900 rnt y 120-160 rnt, respectivamente) lo que indica que no existe degradación evidente en las muestras purificadas. La concentración de las muestras fue estimada mediante densitometría de la imagen de la electroforesis en gel de agarosa, lo que tiene dos ventajas: la primera, su sensibilidad (2 ng de RNA por banda en un gel teñido con GelRed, 5 veces más sensible que el bromuro de etidio) lo que permite cuantificar muestras con bajo rendimiento, y la segunda es que no es susceptible a interferentes como si ocurre con la cuantificación por absorbancia (compuestos fenólicos, alcoholes y azúcares) que comúnmente co-purifican con el RNA proveniente de tejidos ricos en ellos (músculo esquelético, hígado y tejido nervioso). La concentración de cada RNA se estima a partir de la suma de intensidades de las tres bandas de RNA visibles en el gel. El rendimiento de esta purificación fue bajo (30 ng/μl como mínimo), lo que obligó a realizar una sola reacción de DNA copia por muestra, reduciendo el número de genes de referencia que se pudo analizar por PCR en tiempo real.

6.2 Análisis relativo de la expresión mediante RT-qPCR de los genes candidatos a marcadores de subpoblaciones neuronales *Cbln2*, *Fam19a1*, *Hpse*, *Mrgprd*, *Ntm*, *Smr2* y *Trpa1*, desde las muestras de cDNA generadas a partir del RNA total desde médula espinal, ganglios espinales y ganglio submandibular de ratón.

Se realizaron las amplificaciones mediante PCR en tiempo real de los genes de interés: *Cbln2*, *Fam19a1*, *Hpse*, *Mrgprd*, *Ntm*, *Smr2* y *Trpa1* desde las librerías de cDNA generadas desde las diferentes muestras de médula espinal y ganglio espinal. Para esto, se utilizó el método de  $\Delta\Delta Ct$  para el análisis de datos de expresión relativa, utilizando como genes de referencia *Actb* y *B2m*.

Este método consiste en determinar directamente la diferencia entre Ct del gen de interés y Ct de gen de referencia para una condición determinada y luego contrastarla con una condición control (46). Primero se calculó el  $\Delta Ct$  restando el Ct del gen de referencia al Ct del gen de interés. Luego se consideró la muestra de médula cervical (MC) como el estado basal de expresión de los genes de interés, condición control, y con ello se calculó el valor del  $\Delta\Delta Ct$ . Siendo este valor la sustracción entre el estado basal de expresión, correspondiente al MC y el  $\Delta Ct$  del gen de interés calculado anteriormente.

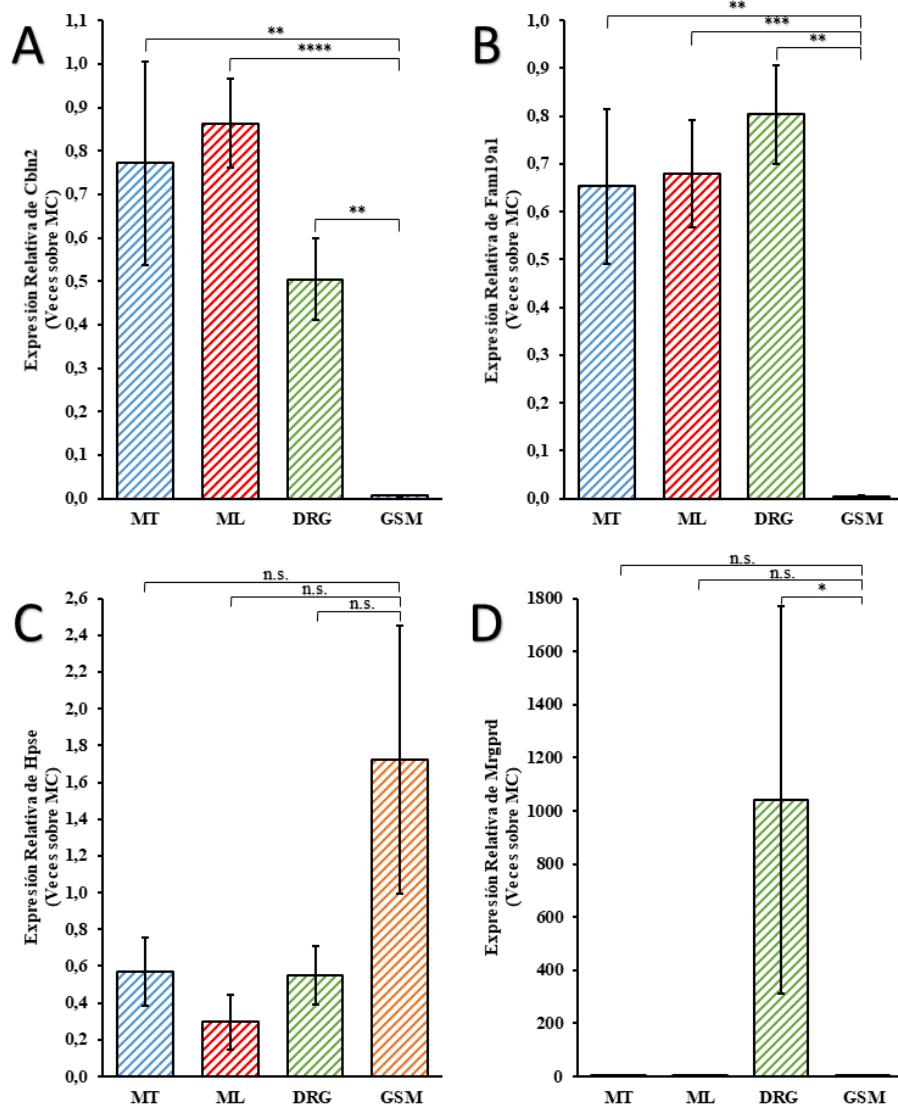
El valor del  $\Delta\Delta Ct$  obtenido para cada gen de referencia, tanto Actb como B2m, es utilizado en la ecuación:  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . El valor obtenido determina la expresión relativa del gen de interés con respecto a la expresión en médula cervical (Figura 3 y Figura 4).

En la Figura 3 se evidencia que los niveles de los genes candidatos Cbln2, Fam19a1, Hpse y Mrgprd se expresa en niveles similares en los tejidos correspondientes a la médula en sus tres niveles: cervical, torácica y lumbar. Sin embargo, el gen Mrgprd se expresa de forma exclusiva en el ganglio espinal (DRG) (Figura 3D), con una expresión relativa promedio de 1000 veces sobre MC y que corresponde a una nula expresión en MC, MT, ML y GSM. De igual forma, Trpa1 presenta una expresión específica en DRG (Figura 4D).

A pesar de presentar una expresión similar en médula y ganglio espinal, Cbln2, Fam19a1 y Ntm no se expresan en el tejido de ganglio submandibular (GSM) (Figura 3A y 3B, Figura 4A). Sin embargo, Hpse mostró los niveles más altos en GSM (Figura 3C), aunque no se encontró una diferencia significativa en la expresión relativa de este gen entre los tejidos, debido a que este set de partidores genera dímeros de primer (Figura 5).

Para el gen Smr2, se probaron 2 set de partidores, el primero (Smr2 1) amplifica las isoformas 1, 2 y 3, mientras que el segundo (Smr2 2) amplifica las isoformas 2, 3 y 4. En la Figura 4 se observa que Smr2 se expresa sólo en DGR y GSM, sin embargo el set de partidores Smr2 1 mostró valores de expresión relativa mayores al set 2, y similares a los

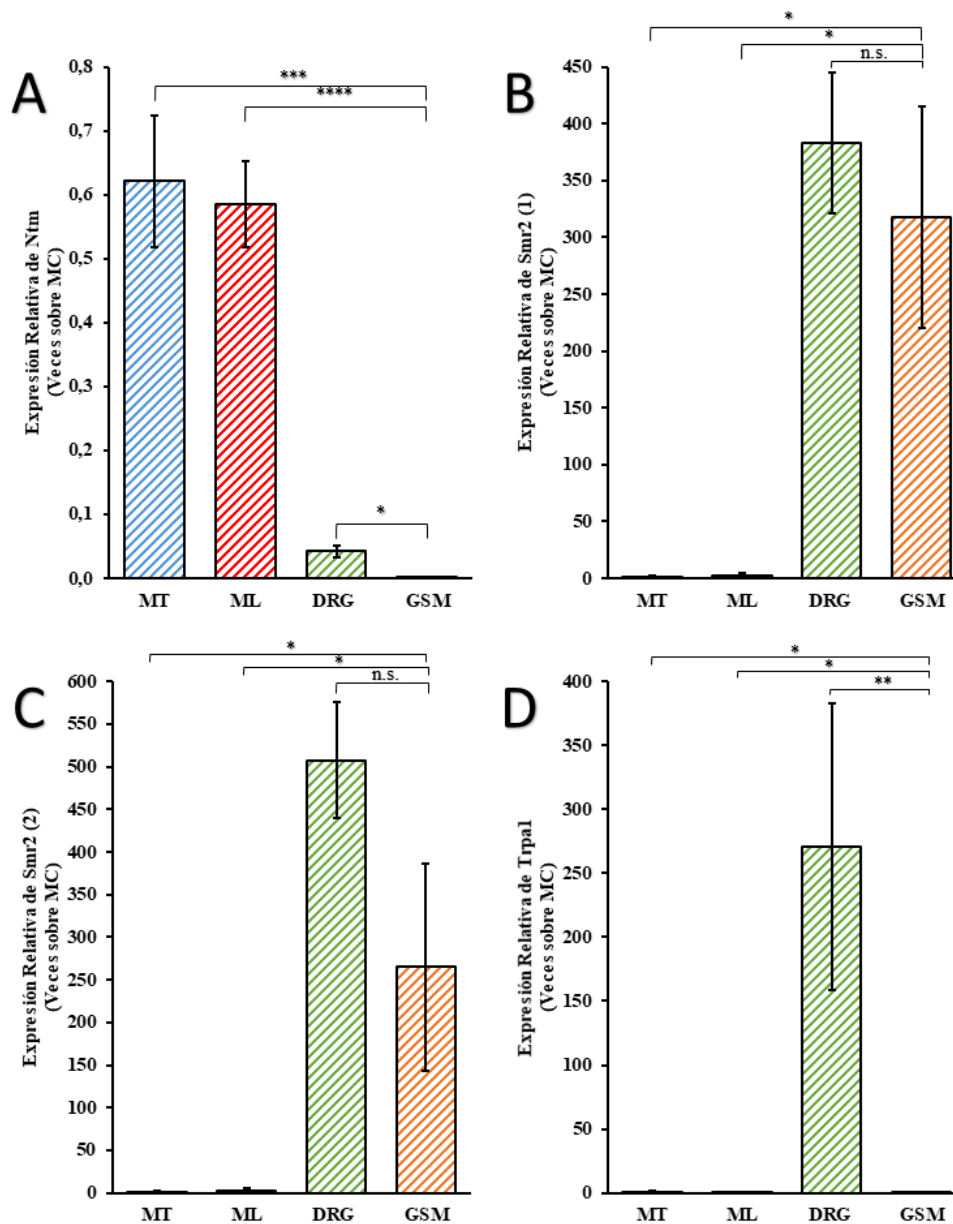
niveles de expresión en DRG. El set de partidores 1 amplifica diferencialmente la isoforma 1 de Smr2, por lo que estos resultados sugieren que a pesar de que más de una isoforma se expresa en GSM, la isoforma 1 de Smr2 sería la isoforma preferencial en el ganglio parasimpático.



**Figura 3: Expresión relativa de los mRNA de los genes candidatos de marcadores de subpoblaciones neuronales Cbln2, Fam19a1, Hpse y Mrgprd, en muestras de médula espinal y ganglio espinal de ratón.**

Gráfico de barras indicando el promedio de los valores de expresión relativa de cada gen, analizados mediante RT-qPCR y contrastado con la condición control. A) Cbln2. B)

Fam19a1. C) Hpse. D) Mrgprd. Los datos calculados son presentados como veces sobre el promedio de los valores de expresión del gen en médula cervical. Las barras de error indican el error estándar (SE). Se realizó una comparación sobre los promedios de los valores para cada gen entre los tejidos versus el GSM, mediante un test de *Student* no apareada de dos colas, que se indica como corchetes. (n.s.: no significativo; \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ). MC, MT y ML hacen referencia a las muestras de médula espinal cervical, torácica o lumbar, respectivamente. DRG: ganglio espinal de la raíz dorsal. GSM: ganglio submandibular. Fuente: Elaboración propia.



**Figura 4: Expresión relativa de los mRNA de los genes candidatos de marcadores de subpoblaciones neuronales Ntm, Smr2 (1), Smr2 (2) y Trpa1, en muestras de médula espinal y ganglio espinal de ratón.**



Gráfico de barras indicando el promedio de los valores de expresión relativa de cada gen, analizados mediante RT-qPCR y contrastado con la condición control. A) Ntm. B) Smr2 (1). C) Smr2 (2). D) Trpa1. Los datos calculados son presentados como veces sobre el promedio de los valores de expresión del gen en médula cervical (MC). Las barras de error indican el error estándar (SE). Se realizó una comparación sobre los promedios de los valores para cada gen entre los tejidos versus el GSM, mediante un test de *Student* no apareada de dos colas, que se indica como corchetes. Para el gen Smr2 se utilizaron 2 pares de partidores, indicados como (1) y (2), ya que este gen presenta 4 isoformas. El primer Smr2 (1) se diseñó en la región conservada de las isoformas 1, 2 y 3. Mientras que el primer Smr2 (2) para las isoformas 2, 3 y 4. (n.s.: no significativo;  $*p \leq 0,05$ ;  $**p \leq 0,01$ ;  $***p \leq 0,001$ ;  $****p \leq 0,0001$ ). MC, MT y ML hacen referencia a las muestras de médula espinal cervical, torácica o lumbar, respectivamente. DRG: ganglio espinal de la raíz dorsal. GSM: ganglio submandibular. Fuente: Elaboración propia.

6.3 Análisis de los partidores utilizados para la RT-qPCR de los genes Hpse y Mrgprd por medio de la curva de disociación.

Como quedó en evidencia en la Figura 3C, el gen Hpse puede ser un buen candidato para caracterizar una subpoblación neuronal en el ganglio submandibular, pese a no presentar una diferencia significativa en la expresión relativa de este gen. Esto es debido a que el set de

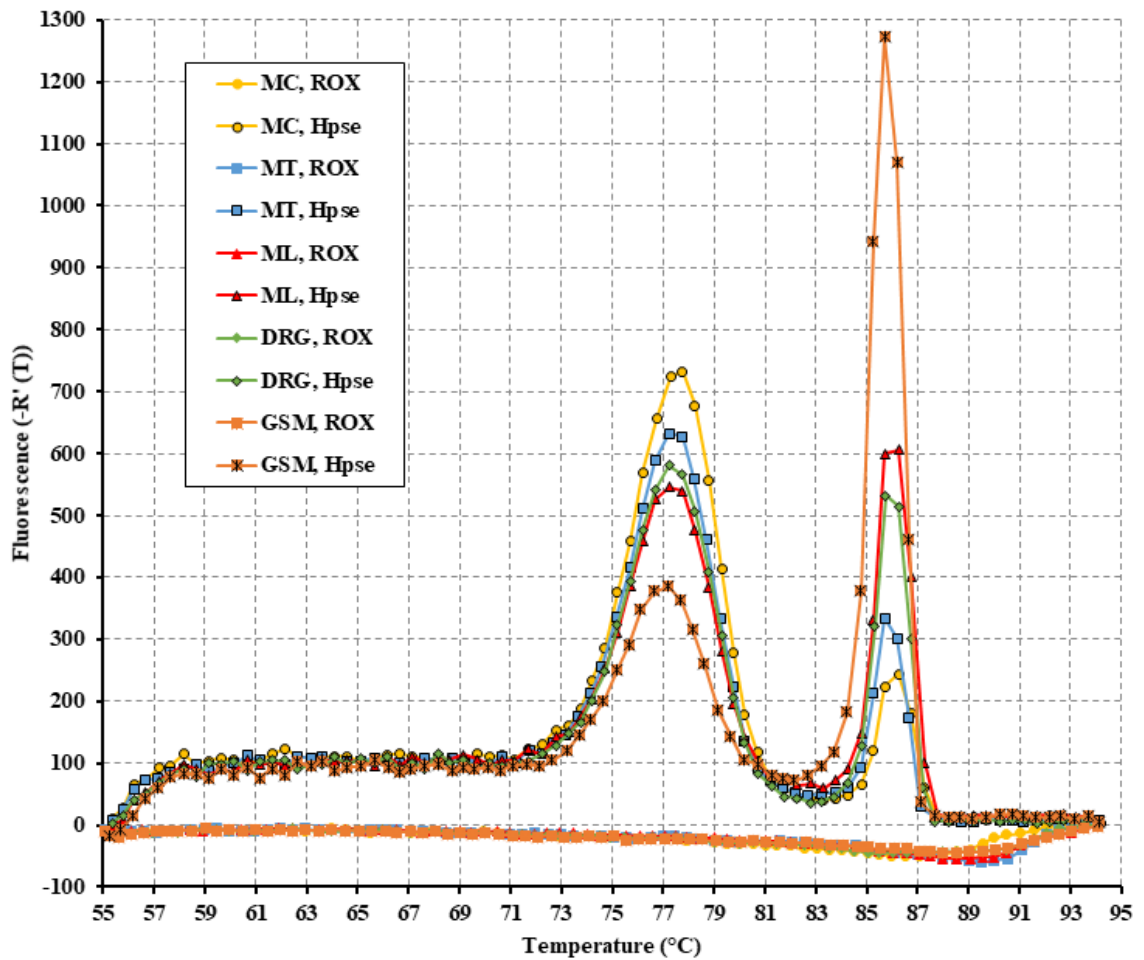
partidores diseñados genera dímeros de partidores (Figura 5), explicando así la similar expresión relativa en los diferentes tejidos. Caso similar, pero en menor escala, ocurre con el gen *Mrgprd* (Figura 6), que también forma dímeros de partidores que interfieren con el análisis de expresión.

Para ambos genes se analizó la curva de disociación de la RT-qPCR realizada arrojando para el gen *Hpse* un peak elevado de producto inespecífico por dímero de primer a una temperatura menor que la del producto específico ( $T_m$  dímero de primer =  $78^\circ\text{C}$ ,  $T_m$  producto específico =  $86^\circ\text{C}$ ). Este peak de dímero de primer es más pronunciado en las muestras que amplifican poca cantidad del producto específico, lo cual se puede observar en la Figura 6, donde la muestra de médula cervical (MC, *Hpse*) posee una gran señal a una baja temperatura, que no corresponde a la del producto específico del primer. Patrón observado tanto en las muestras No RT y NTC (no mostradas en el gráfico) para ambos genes analizados.

El análisis de la expresión relativa de este gen en las diferentes muestras (MC, MT, ML, DRG y GSM), se ve afectado por el gran peak de señal generado por los dímeros de primer. Junto a ello, si se analiza el peak del producto específico ( $T_m = 86^\circ\text{C}$ ), se desprende que la mayor expresión ocurre en la muestra de ganglio submandibular, seguido de la médula lumbar, ganglio espinal de la raíz dorsal, médula torácica y médula cervical. En donde en la mayoría de ellos el peak del dímero de primer es superior al del producto específico.

Para el caso del gen *Mrgprd* (Figura 6), también se evidencia un peak a una temperatura inferior a la del producto específico ( $T_m$  dímero de primer =  $78^\circ\text{C}$ ,  $T_m$  producto específico =  $89^\circ\text{C}$ ), pero en este caso en particular, a diferencia del *Hpse*, la señal del producto específico registrado es generada sólo por un tejido (DRG).

Como los partidores para ambos genes de interés generan dímero de primer, se recurrió a la PCR convencional para el análisis de la expresión de estos en los diferentes tejidos. Para ello se analizó el Ct registrado por la RT-qPCR y se estimó un programa con un menor número de ciclos para poder compensar la presencia de los dímeros de primer. Para este protocolo se utilizó un gen de referencia (*Gapdh*), que al igual que el gen *Hpse* se utilizó un programa de 35 ciclos, mientras que para *Mrgprd* se disminuyó a 27 ciclos.

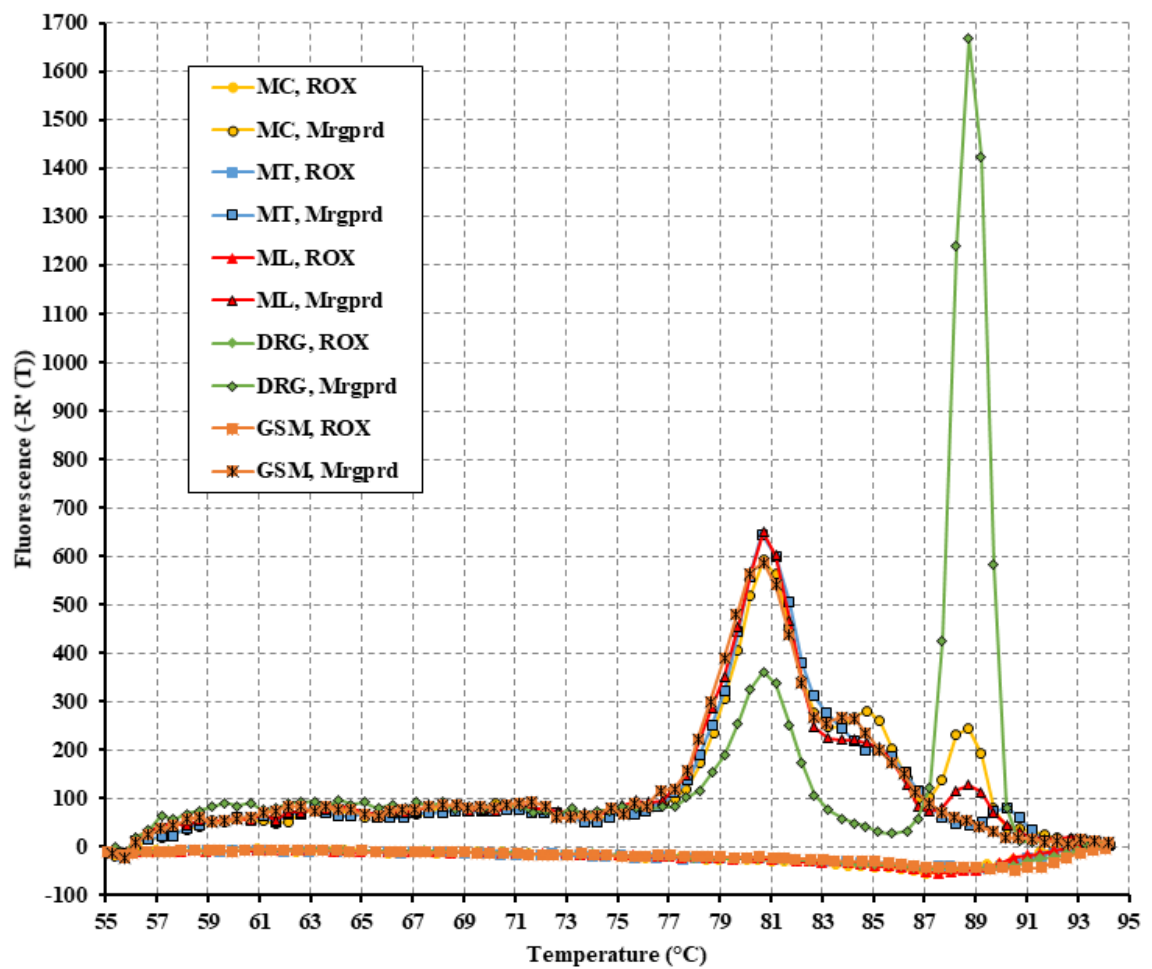


**Figura 5: Curva de disociación correspondiente a la RT-qPCR del gen Hpse.**

Análisis de la curva de disociación del ensayo RT-qPCR para el gen Hpse. El rango de temperatura de disociación se extiende desde los 55°C hasta los 94°C. El peak a menor temperatura (78°C) corresponde a dímeros de primer que pueden formarse durante la reacción. El peak de mayor intensidad (ubicado a la derecha, 86°C), corresponde al producto específico amplificado del gen estudiado. MC, MT y ML hacen referencia a las muestras de médula espinal cervical (amarillo), torácica (azul) o lumbar (rojo), respectivamente.

DRG: ganglio espinal de la raíz dorsal (verde). GSM: ganglio submandibular (naranja).

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 6: Curva de disociación correspondiente a la RT-qPCR del gen Mrgprd**

Análisis de la curva de disociación del ensayo RT-qPCR para el gen Mrgprd. El rango de temperatura de disociación se extiende desde los 55°C hasta los 94°C. El peak a menor

temperatura (80°C) corresponde a dímeros de primer que pueden formarse durante la reacción. El peak de mayor intensidad (ubicado a la derecha, 88°C), corresponde al producto específico amplificado del gen estudiado. MC, MT y ML hacen referencia a las muestras de médula espinal cervical (amarillo), torácica (azul) o lumbar (rojo), respectivamente. DRG: ganglio espinal de la raíz dorsal (verde). GSM: ganglio submandibular (naranja).  
Fuente: Elaboración propia.

6.4 Análisis de la expresión mediante PCR de los genes Hpse, Gapdh y Mrgprd, desde las muestras de cDNA generadas a partir del RNA total desde médula espinal, ganglios espinales y ganglio submandibular de ratón.

Como se mostró anteriormente, los primers utilizados para los genes candidatos: Hpse y Mrgprd, forman dímeros de primer durante la RT-qPCR (Figura 5 y Figura 6). Es por ello por lo que el análisis de las expresiones relativas, que utilizan los Ct obtenidos de ese ensayo no reflejan la expresión real del mRNA (Figura 3C y 3D). Para ello se realizó una PCR convencional con los mismos partidores, pero disminuyendo los ciclos del programa.

Se analizó el gráfico de amplificación de cada gen para determinar la cantidad de ciclos necesarios para poder observar el producto específico. Para el caso de Hpse, se redujo el programa de RT-qPCR que contemplaba 40 ciclos, quedando en un programa de 35 ciclos de PCR convencional. Mientras que para el gen Mrgprd se estipuló un programa de 27 ciclos. Se utilizó el gen Gapdh como referencia para la realización del ensayo.

Al realizar el análisis de la electroforesis de los productos del ensayo de PCR (Figura 7), se tiene que para el gen Hpse, se obtuvo una banda cercana a los 200pb, la que corresponde al amplicon esperado (192 pb). Banda que queda en evidencia tanto para las muestras de DRG como de GSM.

En la corrida electroforética para el gen *Mrgprd*, se observa una banda entre los 100 y 200pb, la cual corresponde al producto específico de 152 pb, que se puede apreciar claramente en las muestras de DRG. Además de esa banda queda en evidencia en todas las muestras, un fragmento de tamaño inferior a los 100 pb, lo que corresponde a los dímeros de primer.

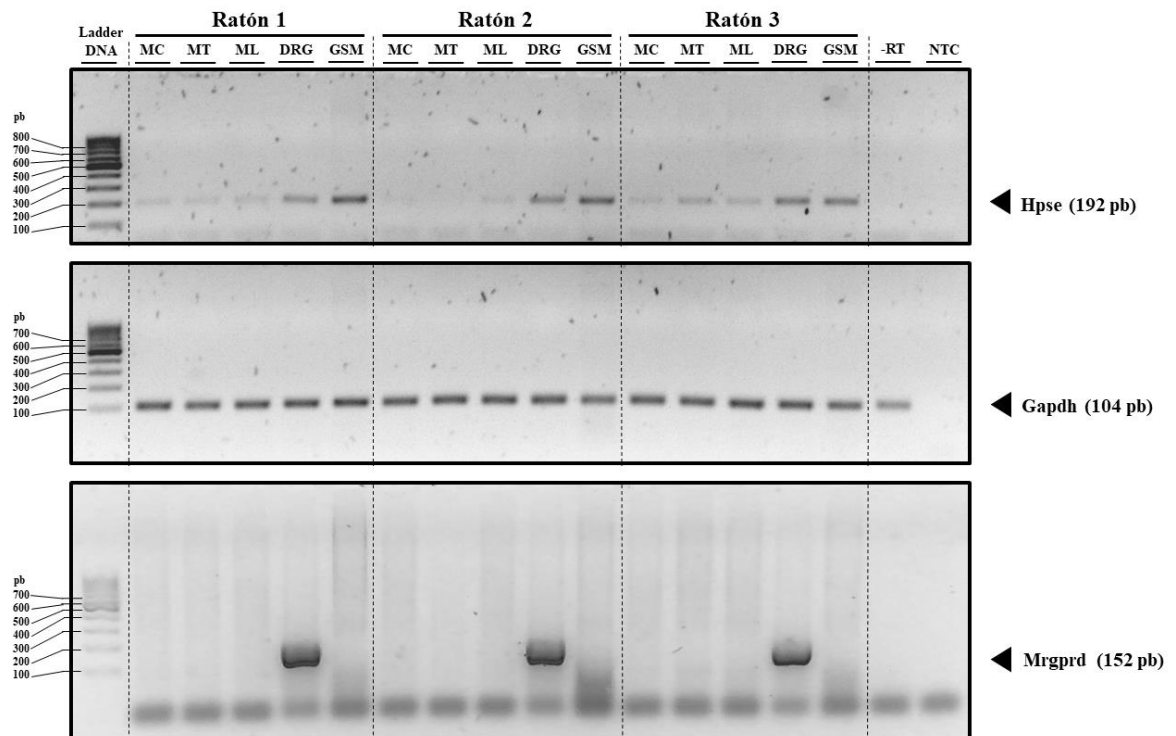
Al analizar el gen de referencia (*Gapdh*), se puede apreciar una homogeneidad de las bandas presentadas en todos los tejidos, de un tamaño un poco mayor a los 100 pb. Además, de presentarse en todos los tejidos de forma similar, también se registra una banda del producto específico en la muestra -RT, del cual se abordará más adelante.

Cabe señalar que tanto la muestra de *Hpsc* como la de *Gapdh* fueron diluidas 1:30 antes de ser cargadas. Mientras que la muestra de *Mrgprd* fue cargada sin dilución previa. Es por ello por lo que se evidencia los dímeros de primer.

Al realizar un análisis por densitometría de la electroforesis correspondiente al gen *Hpsc*, se pudo evidenciar pequeñas intensidades de bandas bajo los 100 pb, lo que indica la presencia de dímeros de primer. Estos no se perciben de manera tan evidente como los de la muestra *Mrgprd*, debido a la dilución antes de cargar las muestras. Los resultados de la densitometría indican que existe una diferencia significativa en la cantidad de expresión



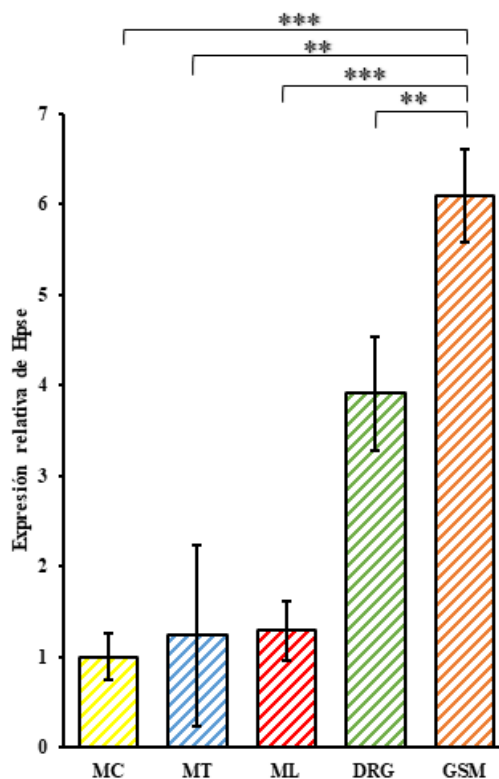
relativa de este gen en comparación con las muestras de médula cervical (MC), torácica (MT), lumbar (ML) y de la muestra de ganglios dorsales (DRG).



**Figura 7: Análisis electroforético de los productos de amplificación obtenidos desde las reacciones de RT-PCR para Hpse, Gapdh y Mrgprd en las muestras de médula espinal, ganglio espinal y ganglio submandibular.**

Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación por PCR para los genes Hpse y Mrgprd, junto al gen de referencia Gapdh (indicados al lado derecho de la figura), desde los segmentos cervical, torácico y lumbar de la médula espinal (MC, MT y ML, respectivamente), junto al pool de ganglios de la raíz dorsal (DRG) y ganglio

submandibular (GSM) para cada ratón. Las muestras fueron diluidas 1:30 (excepto para Mrgprd que se cargó sin diluir). En el pocillo de la izquierda se cargó el marcador de peso molecular *100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific)* diluido 1:30. La corrida electroforética se realizó a 100 volts por 40 minutos, en donde tanto para Hpse como para Gapdh se utilizó un programa de 35 ciclos, mientras que para Mrgprd uno de 27. Fuente: Elaboración propia.



**Figura 8: Análisis por densitometría de la expresión del gen de interés Hpse en las muestras de médula espinal, ganglio espinal y ganglio submandibular.**

Gráfico de barras indicando el promedio de la expresión relativa de Hpse con respecto la muestra basal (MC). Las barras de error indican el error estándar (SE). Se realizó un análisis densitométrico del gel de agarosa al 2%, en donde se calculó la expresión relativa de la muestra Hpse, normalizando el valor con el gen de referencia Gapdh. La comparación sobre los promedios de los valores para cada gen entre los tejidos versus el GSM se realizó mediante un test de *Student* no apareada de dos colas, que se indica como corchetes. (\*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ). MC, MT y ML hacen referencia a las muestras de médula espinal

cervical, torácica o lumbar, respectivamente. DRG: ganglio espinal de la raíz dorsal. GSM: ganglio submandibular. Fuente: Elaboración propia.

## 7. DISCUSIÓN

Por medio de los experimentos de RT-qPCR y PCR convencional descritos anteriormente, se buscó definir subpoblaciones neuronales a partir del perfil de expresión de genes marcadores, en tres tejidos distintos: médula espinal (MC, MT y ML), ganglio de la raíz dorsal (DRG) y ganglio submandibular (GSM). Los genes analizados *Cbln2*, *Fam19a1*, *Hpse*, *Mrgprd*, *Ntm*, *Smr2* y *Trpa1*, fueron seleccionados pues según recientes reportes, hay evidencia de que estos genes permiten la identificación de subtipos de neuronas sensoriales (16). Pese a que no se expresen de forma homogénea en todos los tejidos, la determinación de la expresión en distintas muestras resulta útil para poder diferenciar una población neuronal de otra.

Primero se analizó la expresión relativa de *Cbln2* (Figura 3A), en donde se obtuvo una baja expresión en ganglio submandibular (GSM), con respecto a la muestra de médula cervical (MC), utilizada como condición basal en el análisis de la expresión. Mientras que para las muestras de médula espinal (MT y ML) como la de ganglio de la raíz dorsal (DRG), se ve una expresión similar a la de la MC. Caso similar ocurre para el gen *Fam19a1* (Figura 3B), donde la expresión relativa de este gen es casi nula en la muestra correspondiente a GSM, teniendo una diferencia significativa con las demás muestras. Al igual que con *Cbln2*, los niveles de expresión relativos para MT, ML y DRG se asemejan bastante a la condición

basal seleccionada (MC), lo cual coincide con la literatura, ya que se ha reportado que existe altos niveles de expresión de mRNA en áreas del cerebro y médula (20).

El análisis por  $\Delta\Delta C_t$  para el gen *Hpsc* no arroja diferencias significativas al comparar la expresión relativa calculada (Figura 3C) para los tejidos analizados. Pero si se observa la curva de disociación de la RT-qPCR para este gen (Figura 5), se evidencia la presencia de dímero de primers, por el peak a una  $T_m$  inferior a la esperada por el producto específico. Es más, si se analizaran los valores de  $C_t$ s (*Threshold Cycle*) obtenidos para la qPCR de este gen, de inmediato se infiere que algo difiere de lo esperado, debido a que los controles utilizados (-RT y NTC) dan ciclos de amplificación umbral similares a los de las muestras. Situación parecida ocurre con el gen *Mrgprd*, que también presenta dímeros de primer evidenciados en la curva de disociación (Figura 6). En este caso no es tan evidente como para *Hpsc*, debido a la elevada expresión relativa de este gen en DRG aminora en cierta forma el producto inespecífico generado en la qPCR. La exacerbada expresión relativa de *Mrgprd* en DRG era esperada, debido a que se conoce que en el modelo murino la expresión de este gen es elevado en un subconjunto de neuronas sensoriales (34), es más un subgrupo de neuronas sensoriales que detectan estímulos de dolor expresa MRG. Siendo este gen un perfecto marcador de subpoblación neuronal para este tejido (DRG).

Aun así, para ambos genes que presentaron dímero de primer (*Hpsc* y *Mrgprd*), se optó por volverlos a analizar, pero mediante una PCR convencional, utilizando el mismo par de

partidores. Se disminuyó la cantidad de ciclos para asegurar la generación del amplicon específico esperado, para ello se utilizó el gráfico de amplificación de la qPCR y se determinó el número de ciclos necesarios para ver expresión del gen de interés. Como el gen *Mrgprd* tiene una expresión relativa mucho mayor en DRG que en los demás tejidos, se disminuyó la cantidad de ciclos de 40, utilizados en la qPCR a 27 para el protocolo de la PCR convencional. Mientras que el gen *Hpse* quedó en 35 ciclos al igual que el gen de referencia utiliza *Gapdh*, debido al nivel de expresión en los distintos tejidos.

En el análisis electroforético de los productos de ampliación obtenidos por PCR, se visualiza claramente los dímeros de primer para el gen *Mrgprd*, evidenciándose como una banda de un tamaño inferior a los 100 pb en todos los carriles, incluidas las muestras control -RT (no RT) y de -templado (NTC). Para el gen de interés *Hpse*, no se evidencia los dímeros de primer como en la muestra de *Mrgprd*, y esto es debido a la dilución realizada antes de cargar. Tanto las muestras de *Hpse* como *Gapdh*, fueron diluidas 1:30. Lo que explicaría la ausencia de bandas de dímeros de primers para *Hpse*.

Ahora si se analizase el gen de referencia utilizado, *Gapdh*, se puede apreciar bandas homogéneas en todas las muestras. Es más, en la muestra -RT se evidencia un producto específico cuando no debiese de haber amplificación. El tubo de -RT, a diferencia del NTC posee muestra de RNA total, pero carece de la enzima *SuperScript IV RT*, con lo cual no

debiese tener templado alguno para poder producir un producto específico. Este fenómeno ya ha sido descrito anteriormente (48).

Se ha reportado que la enzima Taq DNA polimerasa, utilizada habitualmente en los protocolos de PCR, a concentraciones de magnesio por sobre los 2 mM de MgCl<sub>2</sub> presenta actividad transcriptasa inversa (48). Si se revisa el protocolo de trabajo utilizado para la PCR convencional, la mezcla de reacción utilizando *GoTaq G2 Green Master* presenta una concentración de MgCl<sub>2</sub> de 2 mM y explicaría la aparición de la banda de Gapdh en el control negativo de RT (no RT) ya que es el mensajero más abundante en nuestro estudio.

Lo que se desprende del análisis por densitometría (Figura 8) es que los niveles de expresión de Hpse presentan una diferencia significativa con las muestras de médula espinal (MC, MT y ML) y a la del ganglio de la raíz dorsal (DRG). Con este análisis se puede comprobar los errores que puede conllevar el no revisar la curva de disociación en protocolos de qPCR. Los niveles de expresión relativa de Hpse no presentaron diferencias significativas con ninguna muestra analizada, debido a que la señal de los dímeros de primer generó un falso positivo para las muestras (Figura 3C). Luego de realizar una PCR convencional, y utilizando el mismo par de partidores, se puede mejorar el resultado, ya que en el análisis densitométrico sí existe una diferencia significativa en la cantidad de Hpse del GSM con el resto de las muestras. El gen Hpse presenta una expresión preferencialmente en el ganglio submandibular



Si se sigue analizando los niveles de expresión de los demás genes, se tiene que para el gen *Ntm* (Figura 4A), la expresión relativa entre las muestras de médula espinal son superiores a las de DRG y GMS. Sin embargo, y pese a que estos dos últimos tejidos presentan niveles relativos de expresión bajos de *Ntm*, aun así, existe una diferencia significativa entre ellos. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado previamente, donde *Ntm* mostró altos niveles de expresión en ganglios de la raíz dorsal (DRG) y médula espinal (SC) (36).

Los resultados de la expresión relativa del gen *Trpa1*, confirman que puede servir como un marcador de neuronal para DRG. Debido a que su expresión es significativamente mayor que las demás muestras. El gen *Mrgprd*, también es un candidato para una clasificación de poblaciones neuronales en DRG. Se ha reportado que *Trpa1* se expresa en el ganglio cervical superior, aunque al tratarse de un canal catiónico no selectivo activado por el frío, su expresión en un subconjunto de neuronas sensoriales debiese ser mucho mayor, como el reportado en la Figura 4D (25-27).

Finalmente se tiene al gen *Smr2*, que se analizó con 2 pares de partidores debido a las 4 isoformas que presenta. Como su región conservada sólo permitía genera un partidor para las isoformas 1, 2 y 3, se generaron 2 partidores. *Smr2* (1) como se mencionó para las primeras 3 isoformas, mientras que el set de partidores *Smr2* (2) servía para las isoformas 2, 3 y 4.

Debido a la peculiar confección de oligonucleótidos para este gen se puede analizar un poco más que el resto.

Primero se tiene la expresión relativa de Smr2 (1) (Figura 4B), en donde se desprende que para las muestras de DRG como GSM se obtienen valores elevados con respecto a la muestra de MC. Aun así, no presenta una diferencia significativa entre ellos, mientras que las muestras de médula espinal tienen una expresión relativa menor. Ocurre lo mismo con la expresión del otro set de primer Smr2 (2) (Figura 4C), tanto DRG como GSM presentan una elevada expresión relativa con respecto a MC. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado previamente sobre la expresión de Smr2 en GSM. A su vez, este gen participa en la regulación de percepción sensorial al dolor, lo que explicaría su nivel de expresión en DRG (38).

## 8. CONCLUSIÓN

Tras el análisis de los niveles relativos de expresión de los genes candidatos: *Cbln2*, *Fam19a1*, *Hpse*, *Mrgprd*, *Ntm*, *Smr2* y *Trpa1*, en muestras de ganglio espinal, médula dorsal y ganglio submandibular de ratón, de acuerdo a sus perfiles de expresión se puede definir a *Mrgprd* y *Trpa1* como marcador específico o de expresión preferencial en DRG, mientras que *Hpse* se puede definir como marcador específico o de expresión preferencial en GSM.

Pese que *Smr2* no presente una diferencia significativa con respecto a los niveles de expresión relativa entre GSM y DRG, es un gen de interés que se debiese seguir estudiando debido a representa una subpoblación neuronal.

En el caso del *Hpse*, mostró ser un gen de alta expresión en ganglio submandibular respecto de DRG, a pesar de que el set de partidores diseñados distó de lo óptimo, por lo que el análisis de los datos para el ensayo de qPCR, se vieron afectados por la presencia de los dímeros de primer, lo cual influyó en el valor de los Cts, arrojando que no existe diferencia significativa en la expresión relativa de este gen en los distintos tejidos estudiados. Es por

ello por lo que se deben diseñar otros oligonucleótidos que no generen dímeros de primer y así lograr cuantificar la diferencia de expresión relativa.

De todas formas, se diseñó otro protocolo experimental para poder sobrellevar la presencia de dímeros de primer en el estudio. Se realizó una PCR convencional a menor cantidad de ciclos, para prevenir que la formación de los dímeros de primer puedan afectar el análisis de los datos nuevamente. Tras el análisis del gel de agarosa al 2% por densitometría y utilizando un gen de referencia, como el Gapdh, se pudo ver la expresión relativa de Hpse con respecto a la muestra de médula cervical. Arrojando una diferencia significativa de la expresión del gen en ganglio submandibular (GSM) frente a todas las demás muestras, MC, MT, ML y DRG. Verificando la hipótesis del trabajo, debido a que el gen Hpse define una subpoblación neuronal.

Para el caso del Smr2, este estudio deja la posibilidad abierta a que una de sus isoformas, del RNA mensajero, en específico la 1, pueda servir como un marcador de subpoblaciones neuronales en GSM. Mientras que la isoforma 4, pueda servir como marcador para DRG.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Tanapat P. Neuronal Cell Markers. Mater Methods. 2013;
2. Rambourg A, Clermont Y, Beaudet A. Ultrastructural features of six types of neurons in rat dorsal root ganglia. J Neurocytol [Internet]. 1983 Feb [cited 2019 Jul 8];12(1):47–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6842273>
3. Paniagua R, España M-H. Citología e histología: vegetal y animal: histología vegetal y animal. Vol. II (4a. ed.). 2011.
4. Sommer EW, Kazimierzak J, Droz B. Neuronal subpopulations in the dorsal root ganglion of the mouse as characterized by combination of ultrastructural and cytochemical features. Brain Res. 1985;
5. Mountcastle VB, Talbot WH, Sakata H, Hyvärinen J. Cortical neuronal mechanisms in flutter-vibration studied in unanesthetized monkeys. Neuronal periodicity and frequency discrimination. J Neurophysiol. 1969;
6. Harper AA, Lawson SN. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. J Physiol [Internet]. 1985 Feb [cited 2019 Jul 8];359:31–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3999040>
7. Ninomiya T, Barakat-Walter I, Droz B. Neuronal phenotypes in mouse dorsal root

- ganglion cell cultures: enrichment of substance P and calbindin D-28k expressing neurons in a defined medium. *Int J Dev Neurosci* [Internet]. 1994 Apr [cited 2019 Jul 8];12(2):99–106. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7524272>
8. Joh TH, Shikimi T, Pickel VM, Reis DJ. Brain tryptophan hydroxylase: purification of, production of antibodies to, and cellular and ultrastructural localization in serotonergic neurons of rat midbrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1975 Sep [cited 2019 Jul 8];72(9):3575–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1059145>
  9. Schmechel D, Marangos PJ, Zis AP, Brightman M, Goodwin FK. Brain endolases as specific markers of neuronal and glial cells. *Science* [Internet]. 1978 Jan 20 [cited 2019 Jul 8];199(4326):313–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/339349>
  10. Houser CR, Crawford GD, Salvaterra PM, Vaughn JE. Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase in rat cerebral cortex: a study of cholinergic neurons and synapses. *J Comp Neurol* [Internet]. 1985 Apr 1 [cited 2019 Jul 8];234(1):17–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3980786>
  11. Celio MR, Heizmann CW. Calcium-binding protein parvalbumin as a neuronal marker. *Nature*. 1981;
  12. Borit A, Brooks TE, Ordóñez NG, Kakulas BA. Central neural antigens: detection and diagnostic application. *Crit Rev Clin Lab Sci* [Internet]. 1986 [cited 2019 Jul 8];23(3):219–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2426036>

13. Hayashi K, Motoi M, Nose S, Horie Y, Akagi T, Ogawa K, et al. An immunohistochemical study on the distribution of glial fibrillary acidic protein, S-100 protein, neuron-specific enolase, and neurofilament in medulloblastomas. *Acta Pathol Jpn* [Internet]. 1987 Jan [cited 2019 Jul 8];37(1):85–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3107340>
14. Jefferis GSXE, Livet J. Sparse and combinatorial neuron labelling. *Curr Opin Neurobiol* [Internet]. 2012 Feb [cited 2019 Jul 8];22(1):101–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22030345>
15. Eberwine J, Sul J-Y, Bartfai T, Kim J. The promise of single-cell sequencing. *Nat Methods*. 2014;
16. Hockley JRF, Taylor TS, Callejo G, Wilbrey AL, Gutteridge A, Bach K, et al. Single-cell RNAseq reveals seven classes of colonic sensory neuron. *Gut* [Internet]. 2019 [cited 2019 Jul 7];68(4):633–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29483303>
17. Iijima T, Miura E, Matsuda K, Kamekawa Y, Watanabe M, Yuzaki M. Characterization of a transneuronal cytokine family Cbln - Regulation of secretion by heteromeric assembly. *Eur J Neurosci*. 2007;
18. Kavety B, Jenkins NA, Fletcher CF, Copeland NG, Morgan JI. Genomic structure and mapping of precerebellin and a precerebellin-related gene. *Mol Brain Res*. 1994;
19. Wei P, Pattarini R, Rong Y, Guo H, Bansal PK, Kusnoor S V., et al. The Cbln family of proteins interact with multiple signaling pathways. *J Neurochem*. 2012;

20. Tom Tang Y, Emtage P, Funk WD, Hu T, Arterburn M, Park EEJ, et al. TAFA: A novel secreted family with conserved cysteine residues and restricted expression in the brain. *Genomics*. 2004;
21. Zheng C, Chen D, Zhang Y, Bai Y, Huang S, Zheng D, et al. FAM19A1 is a new ligand for GPR1 that modulates neural stem-cell proliferation and differentiation. *FASEB J* [Internet]. 2018 May 25 [cited 2019 Jul 7];fj201800020RRR. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29799787>
22. Kussie PH, Hulmes JD, Ludwig DL, Patel S, Navarro EC, Seddon AP, et al. Cloning and functional expression of a human heparanase gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;
23. Toyoshima M, Nakajima M. Human heparanase. Purification, characterization, cloning, and expression. *J Biol Chem*. 1999;
24. McKenzie E, Tyson K, Stamps A, Smith P, Turner P, Barry R, et al. Cloning and expression profiling of Hpa2, a novel mammalian heparanase family member. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;
25. Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, et al. Mammalian heparanase: Gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 1999;
26. Zcharia E, Philp D, Edovitsky E, Aingorn H, Metzger S, Kleinman HK, et al. Heparanase regulates murine hair growth. *Am J Pathol* [Internet]. 2005 Apr [cited 2019 Jul 7];166(4):999–1008. Available from:



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15793281>

27. Brown AJ, Alicknavitch M, D'Souza SS, Daikoku T, Kirn-Safran CB, Marchetti D, et al. Heparanase expression and activity influences chondrogenic and osteogenic processes during endochondral bone formation. *Bone* [Internet]. 2008 Oct [cited 2019 Jul 7];43(4):689–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18589009>
28. Smith PN, Freeman C, Yu D, Chen M, Gatenby PA, Parish CR, et al. Heparanase in primary human osteoblasts. *J Orthop Res* [Internet]. 2010 Oct [cited 2019 Jul 7];28(10):1315–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20309870>
29. Malgouries S, Donovan M, Thibaut S, Bernard BA. Heparanase 1: a key participant of inner root sheath differentiation program and hair follicle homeostasis. *Exp Dermatol* [Internet]. 2008 Dec [cited 2019 Jul 7];17(12):1017–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18557927>
30. Dempsey LA, Plummer TB, Coombes SL, Platt JL. Heparanase expression in invasive trophoblasts and acute vascular damage. *Glycobiology* [Internet]. 2000 May [cited 2019 Jul 7];10(5):467–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10764835>
31. Hulett MD, Freeman C, Hamdorf BJ, Baker RT, Harris MJ, Parish CR. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. *Nat Med* [Internet]. 1999 Jul [cited 2019 Jul 7];5(7):803–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10395326>

32. Dong X, Han S kyou, Zylka MJ, Simon MI, Anderson DJ. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell*. 2001;
33. Bastian F, Parmentier G, Roux J, Moretti S, Laudet V, Robinson-Rechavi M. Bgee: Integrating and comparing heterogeneous transcriptome data among species. In: *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*. 2008.
34. Dong X, Han S, Zylka MJ, Simon MI, Anderson DJ. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* [Internet]. 2001 Sep 7 [cited 2019 Jul 7];106(5):619–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11551509>
35. Sellar GC, Watt KP, Rabiasz GJ, Stronach EA, Li L, Miller EP, et al. OPCML at 11q25 is epigenetically inactivated and has tumor- suppressor function in epithelial ovarian cancer. *Nat Genet*. 2003;
36. Struyk A, Canoll P, Wolfgang M, Rosen C, D'Eustachio P, Salzer J. Cloning of neurotrimin defines a new subfamily of differentially expressed neural cell adhesion molecules. *J Neurosci*. 2018;
37. Rosinski-Chupin I, Rougeot C, Cour'iy Y, Rougeon F. Localization of mRNAs of Two Androgen-dependent Proteins, SMR1 and SMR2, by In Situ Hybridization Reveals Sexual Dserences in Acinar Cells of Rat Submandibular Gland'. Vol. 41, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry Original Article*. 1993.
38. Gaudet P, Livstone MS, Lewis SE, Thomas PD. Phylogenetic-based propagation of

- functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Brief Bioinform* [Internet]. 2011 Sep [cited 2019 Jul 7];12(5):449–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21873635>
39. Hricik TR, Hwang SW, Andersson DA, Jegla T, Patapoutian A, Bevan S, et al. ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures. *Cell*. 2004;
  40. Nagata K, Duggan A, Kumar G, García-Añoveros J. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci* [Internet]. 2005 Apr 20 [cited 2019 Jul 7];25(16):4052–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15843607>
  41. Corey DP, Garcia-Añoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA, et al. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature*. 2004;
  42. Smith MP, Beacham D, Ensor E, Koltzenburg M. Cold-sensitive, menthol-insensitive neurons in the murine sympathetic nervous system. *Neuroreport* [Internet]. 2004 Jun 28 [cited 2019 Jul 7];15(9):1399–403. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15194861>
  43. Jaquemar D, Schenker T, Trueb B. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *J Biol Chem* [Internet]. 1999 Mar 12 [cited 2019 Jul 7];274(11):7325–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066796>

44. Richner M, Jager SB, Siupka P, Vaegter CB. Hydraulic Extrusion of the Spinal Cord and Isolation of Dorsal Root Ganglia in Rodents. *J Vis Exp* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jul 6];(119). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28190031>
45. Haymerle H, Herz J, Brcssan GM, Frank R, Stanley KK. Efficient construction of cDNA libraries in plasmid expression vectors using an adaptor strategy. *Nucleic Acids Res.* 1986;
46. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 C T Method. *METHODS.* 2001;25:402–8.
47. Villegas M. Caracterización Molecular de Subpoblaciones Neuronales presentes en Médula Espinal, Ganglio Espinal de la Raíz Dorsal y Ganglio Submandibular de Ratón. Universidad de Talca; 2018.
48. Grabko VI, Chistyakova LG, Lyapustin VN, Korobko VG, Miroshnikov AI. Reverse transcription, amplification and sequencing of poliovirus RNA by Taq DNA polymerase. *FEBS Lett.* 1996;