UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Nuevos mecanismos regulatorios de la actividad neurotrófica: posibles implicancias para el desarrollo y la función neuronal.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic. FERNANDO FEDERICCI

Director de tesis: Dr. Gustavo Paratcha

Directora adjunta: Dra. Fernanda Ledda

Consejera de estudios: Dra. Haydée Viola

Lugar de trabajo: Instituto de Biología Celular y Neurociencias “Prof. E. De Robertis” (IBCN-CONICET). Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 2024

INDICE

RESUMEN **6**

ABSTRACT **9**

HIPOTESIS Y OBJETIVOS **12**

Factores neurotróficos: Clasificación, vías de señalización, funciones biológicas y regulación de su actividad 13

Neurotrofinas 14

Ligandos de la familia de GDNF (GFLs) 18

Regulación de la señalización de los factores neurotróficos 21

Regulación cruzada de los factores neurotróficos 24

Los Glucocorticoides y sus efectos biológicos en el sistema nervioso 25

Modelos celulares empleados para el estudio de la regulación de la actividad y función neurotrófica 27

Hipocampo 27

Motoneuronas 30

Publicaciones **33**

Abreviaturas **34**

CAPITULO I: Sprouty4 como un mediador endógeno del efecto supresor de los glucocorticoides sobre la señalización y función de las neurotrofinas **36**

RESÚMEN DEL CAPÍTULO 37

INTRODUCCIÓN 38

RESULTADOS 41

DISCUSIÓN 56

CAPITULO II: TDAG51 como un regulador de la sobrevida neuronal dependiente de la vía de señalización GDNF/RET/AKT **61**

RESÚMEN DEL CAPÍTULO 62

INTRODUCCIÓN 63

RESULTADOS 67

DISCUSION 88

CONCLUSIONES GENERALES **93**

MATERIALES Y METODOS **96**

BIBLIOGRAFIA **102**

"El paso más importante que puede dar alguien. No es el primero, ¿verdad?

Es el próximo. Siempre el próximo paso."

"*Oathbringer*"
Brandon Sanderson

Agradecimientos

Esta debe ser quizás la parte más difícil de todo el doctorado: hacer justicia a todo lo que significaron y significan las personas que aportaron, aunque sea un poco a llegar a este final. No alcanza ni el espacio ni las palabras para decir gracias.

Gracias a quien sea que esté leyendo este trabajo, gracias por tomarte un tiempo para ver el resultado de una larga y difícil etapa. En cada cosa que hacemos dejamos una parte de nosotros y aquí se resume una parte, no pequeña, de mi vida. Sin embargo, omite tantas cosas, que no encuentro la forma de trasmitirlo. Lo que si puedo trasmitir es que nada de esto fue hecho en soledad; todo esto fue el resultado de muchas personas en distintos lugares y momentos haciendo la diferencia, esto se lo debo a todos.

Gracias a Gustavo y Fernanda, que me recibieron desde el primer momento mostrándome que mas haya de intentar ser grandes científicos hay que intentar ser grandes personas. Los pequeños gestos que tienen, el siempre poner a la persona antes que el trabajo son cosas que inspiran. Charlar de ciencia, de experimentos, de política, de vida. A mi director, gracias por esa intensidad que te caracteriza, por sufrir a veces más que nosotros cuando las cosas no salen, pero no quedarse ahí y buscarle la vuelta. Es incontable la cantidad de veces que Gustavo me ha dicho “lo vamos a sacar adelante” siempre que me hundía en la frustración y el enojo de que las cosas dentro o fuera del laboratorio no avanzaban. Ojalá algún día pueda trasmitir a los demás ese optimismo y esa seguridad que, aunque todo este yendo mal, todavía podemos intentarlo de nuevo. A Fernanda, por la alegría que contagias siempre, por siempre ponernos en centro, por aportar siempre una mirada más e imaginarse qué otra vuelta le podemos dar. Gracias a ambos por las charlas, por los consejos, por los cafés y las pizzas; por acompañarme dentro y fuera del laboratorio, por aguantarme en la etapa mas dura de mi vida. Gracias por enseñarme que se puede ser un excelente científico y aun así, que las personas son más importantes que un resultado.

Gracias a todo el MCNlab, por hacer que me divierta y disfrute cada día, por los debates de resultados y por hacerme sentir acompañado, por darme un mate cuando volvía cansado y enojado de no tener el resultado y motivarme a probar una vez más. Por vivir juntos las victorias y las derrotas. En si, por hacer posible que haya llegado a este punto. A Bonafina, por ser la persona que me marcó el espíritu del grupo, las locuras, las risas, los llantos, las preguntas, los consejos, el estar en pendiente de todos a la vez. A Anto Rios por ser un corazón en persona, por la paz y calma que irradias. A Facu por ser quien me guió en los primeros pasos de esta etapa, por ayudarme, aconsejarme, inspirarme, por debatir ideas, diseños y resultados conmigo; sin vos esta tesis no hubiera existido. A Ani, por ser la compañera de mates y mesada por todo este tiempo, por las infinitas charlas, por las risas hasta el llanto, por aguantarme en todos los estados de ánimo; gracias por los momentos locos y por los momentos serios, gracias por ser una persona admirable. Gracias a Delfi, Mica e Ivan por hacer que pasar horas y horas todos los días sea un disfrute, por las risas, por el apoyo, por compartir más que solo horas de laboratorio, por

pensar juntos y hacerme crecer con cada comentario. Sin personas así sería imposible aguantar un doctorado. Estoy feliz de ser parte de este grupo.

Gracias a todo el IBCN, por las charlas en los pasillos, por las juntadas de mates, por aguantarnos hasta tarde para que nadie quede solo y por luchar juntos por lo que creemos. Gracias a los secretarios, a los técnicos, a los no docentes, a todos. A Haydee por ayudarme con todo lo administrativo del doctorado, por firmar papeles hasta antes de irse de vacaciones para que pueda presentarlos, por las preguntas y comentarios en los seminarios para hacer crecer mi trabajo.

Gracias al CONICET y a la UBA, qué orgullo siento al decir que soy parte de esto.

Y por sobre todas las cosas, gracias a mi familia y amigos. Por estar ahí siempre, por preguntarme mil veces qué hago y volver a hacerme enamorar de lo que hago. Por usar cuando les convine el argumento de “Fer es un científico” o “vos sos biólogo, vos sabes de eso”. Por hacerme sentir orgullo y alentarme siempre a más.

Gracias a Mabel y José, no me alcanza la vida para decir gracias, por darlo todo y más por nosotros, por levantarse temprano aunque estaban cansados, por pasar frio, hambre, cansancio, miedo, por no darse por vencidos nunca; por ponernos un piso firme y dejarnos volar, por dejarnos soñar. A Guille, a Pablo y Romi, por ser quienes me guían y aguantan. A todos ustedes les debo tantas disculpas, por los malhumores, por los días que tenia que ir “al labo” en feriados o fines de semana, por “no puedo, tengo que quedarme laburando”. Y les debo más agradecimientos aún, por preguntarme cómo estoy, por intentar entenderme y entender lo que hago, por acompañarme, por alentarme, por felicitarme por las pequeñas cosas, por darme valor cuando no lo tenía, por quererme. Y lo que más les debo son las ocasiones para devolvérselos. Los amo con la vida.

Una mezcla de sentimientos me acompaña en este final, tristeza, alegría, miedo, valor y agradecimiento. Me siento orgulloso de no haberme dado por vencido y agradecido de no recorrer este camino solo. No encuentro la forma de expresar todo lo que quisiera decir, así que simplemente, ¡Gracias!

Nuevos mecanismos regulatorios de la actividad neurotrófica: posibles implicancias para el desarrollo y la función neuronal.

Resumen

Los factores neurotróficos (FN) son un grupo de proteínas secretadas y difusibles que cumplen un rol clave durante el desarrollo del sistema nervioso, promoviendo la sobrevida y proliferación neuronal, el crecimiento axonal y dendrítico y el establecimiento de los contactos sinápticos. Las señales disparadas por estos factores involucran la activación de receptores tirosina kinasa (RTK), que a su vez disparan vías de señalización intracelular claves para el control de la fisiología celular y la regulación del desarrollo neuronal.

Por lo tanto, estas vías requieren de un exquisito control, ya que fallas en estos mecanismos regulatorios pueden contribuir a la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas, patologías proliferativas y trastornos del neurodesarrollo. Debido a esto, diferentes mecanismos regulatorios han evolucionado para controlar la actividad neurotrófica dentro de niveles de activación compatibles con una respuesta fisiológica. Sin embargo, si bien las respuestas biológicas y las vías de señalización de los FN son ampliamente conocidas, los mecanismos que las regulan aún no se conocen en su totalidad.

El objetivo de la presente tesis consistió en identificar nuevos mecanismos de regulación de la función neurotrófica potencialmente relevantes para el desarrollo y la fisiopatología neuronal.

La exposición crónica a glucocorticoides (GC) produce efectos adversos para el desarrollo, la función y la plasticidad neuronal, en parte debidos a la interferencia que ejercen sobre la función neurotrófica. Aunque varios estudios han demostrado que el tratamiento con GC altera la señalización y la función biológica de las neurotrofinas, aún es necesaria una mejor comprensión de los mediadores moleculares que subyacen a esta interferencia. En particular, ha sido establecido que el tratamiento crónico con el GC sintético dexametasona (DEX) restringe el crecimiento de neuritas inducido por neurotrofinas al inhibir la activación de la vía de señalización Ras-Erk1/2 mediada por Trk. Sin embargo, el mecanismo molecular a través del cual DEX interfiere esta actividad neurotrófica aún no está claramente determinado. En la primera sección de esta tesis, demostramos que en células PC12 el tratamiento con DEX promueve la transcripción de

Sprouty4, una molécula reguladora que forma parte de un módulo de retroalimentación negativo que anula específicamente la señalización de Ras a Erk1/2 en respuesta al NGF y TrkA. La eliminación de Sprouty4 o la sobreexpresión de una forma dominante negativa de Sprouty4 (Y53A), rescata la inhibición ejercida por la DEX sobre el crecimiento de neuritas y la fosforilación de Erk1/2 inducida por NGF/TrkA.

Asimismo, el tratamiento de neuronas hipocampales con DEX induce la expresión del mensajero de *Sprouty4,* y su eliminación anula el efecto inhibidor de DEX sobre el desarrollo dendrítico y la activación de Erk1/2 inducida por BDNF. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la inducción del ARNm de *Sprouty4* por DEX se traduce en una inhibición significativa de la vía de señalización de Trk a Erk1/2. En conjunto, nuestros hallazgos aportan nuevos conocimientos sobre la interferencia entre DEX y la señalización de neurotrofinas, y demuestran por primera vez que Sprouty4, actuando a través de un mecanismo de señalización cruzada, media los efectos inhibitorios de la DEX sobre la función de las neurotrofinas.

Por otra parte, la activación de la vía PI3K/AKT por GDNF y su receptor RET, desempeña un papel fundamental en el control de la sobrevida de las neuronas motoras de la médula espinal. A pesar de que las vías de señalización mediante las cuales GDNF promueve la sobrevida neuronal están relativamente bien establecidas, los mecanismos moleculares que restringen su efecto antiapoptótico aún no se conocen en su totalidad. Así, en esta segunda parte de mi tesis doctoral demostramos que la proteína TDAG51 es capaz de inhibir la activación de la vía de PI3K/AKT, pero no la de MAPK/Erk1/2, en respuesta a GDNF. Además, la eliminación de *Tdag51,* mediante técnicas de RNA de interferencia, potencia la activación de AKT y la sobrevida de la línea celular MN1 derivada de motoneuronas en respuesta a GDNF y RET. Curiosamente, nuestros hallazgos también demuestran que la estimulación de células MN1 con alta concentración de NGF, un tratamiento que en condiciones oxidativas promueve la apoptosis de motoneuronas, induce TDAG51 y restringe la señalización de AKT mediada por GDNF y RET. Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que TDAG51 es un mediador clave de un mecanismo de crosstalk competitivo entre la señalización apoptótica promovida por NGF y su receptor de muerte $p75^{NTR}$ y la señalización de sobrevida inducida por GDNF y RET en células derivadas de motoneuronas.

En resumen, en este trabajo de tesis doctoral hemos caracterizado y descripto mecanismos de regulación que involucran al mismo tiempo a distintas vías de señalización de factores neurotróficos, formándose así redes de regulación molecular en

donde el balance entre las mismas resulta clave. La imposición de una vía de señalización sobre la otra, en determinado contexto, determina la función biológica resultante. Por lo tanto, alteraciones en el balance de estos mecanismos de regulación cruzada pueden ser determinantes para el correcto desarrollo neuronal. De esta manera, el entendimiento de estos mecanismos de regulación cruzada puede tener implicancias en el tratamiento de enfermedades neurológicas y en la promoción de terapias regenerativas.

Palabras claves: Factores neurotróficos, GDNF, RET, Neurotrofinas, BDNF, NGF, TrkA, TrkB, Glucocorticoides, Sprouty4, TDAG51, PI3K/AKT, MAPK/Erk1/2 y $p75^{NTR}$

New regulatory mechanisms of the neurotrophic activity: possible implications for neuronal development and function

Abstract

Neurotrophic factors (NF) are a group of secreted and diffusible proteins that play a key role during the development of the nervous system, promoting neuronal survival and proliferation, axonal and dendritic growth, and the establishment of synaptic contacts. The signals triggered by these factors involve the activation of receptor tyrosine kinases (RTKs), which in turn activate key intracellular signaling pathways for the control of cellular physiology and the regulation of neuronal development.

Therefore, the regulation of these signaling pathways is key for normal neuronal development, since failures in these regulatory mechanisms can contribute to the pathogenesis of neurodegenerative diseases, proliferative pathologies and neurodevelopmental disorders. Because of this, different regulatory mechanisms have evolved to control neurotrophic activity within activation levels compatible with a physiological response. However, although the biological responses and signaling pathways triggered by NF are widely known, the mechanisms that regulate them are still not fully understood.

The objective of this thesis was to identify new molecular mechanisms involved in the control of neurotrophic function and signaling, potentially relevant to neuronal development and pathophysiology.

Chronic exposure to glucocorticoids (GC) produces adverse effects on neuronal development, function and plasticity, in part due to the interference that they exert on neurotrophic function. Although several studies have shown that GC treatment alters the signaling and biological function of neurotrophins, a better understanding of the molecular mediators underlying this interference is still needed. In particular, it has been established that chronic treatment with the synthetic GC dexamethasone (DEX) restricts neurotrophin-induced neurite outgrowth by inhibiting Trk-mediated activation of the Ras-Erk1/2 signaling pathway. However, the molecular mechanism through which DEX interferes neurotrophic activity is not yet clearly determined. In the first section of this thesis, we demonstrate that in PC12 cells, DEX treatment promotes the transcription of Sprouty4, a regulatory molecule that is part of a negative feedback module that

specifically abrogates Ras signaling to Erk1/2 in response to NGF and TrkA. Deletion of Sprouty4, or overexpression of a dominant-negative form of Sprouty4 (Y53A), rescues the inhibition exerted by DEX on both NGF/TrkA-induced Erk1/2 phosphorylation and neurite outgrowth.

Likewise, treatment of hippocampal neurons with DEX induces the expression of *Sprouty4* mRNA, and its knockdown abrogates the inhibitory effect of DEX on dendritic development and BDNF-induced Erk1/2 activation. Therefore, these results suggest that induction of Sprouty4 mRNA by DEX results in a significant inhibition of Trk to Erk1/2 signaling pathway. Taken together, our findings provide new insights into the crosstalk between DEX and neurotrophin signaling, and demonstrate for the first time that Sprouty4, acting through a crosstalk signaling mechanism, mediates the inhibitory effects of DEX on neurotrophin function.

On the other hand, the activation of the PI3K/AKT pathway by GDNF and its receptor RET plays a fundamental role in controlling the survival of spinal cord motoneurons. However, although the signaling pathways through which GDNF promotes neuronal survival are relatively well established, the molecular mechanisms that restrict its antiapoptotic effect are not yet fully understood. Thus, in this second part of my doctoral thesis we demonstrated that TDAG51 protein is capable of inhibiting the activation of the PI3K/AKT pathway, but not that of MAPK/Erk1/2, in response to GDNF. Furthermore, the elimination of *Tdag51*, using RNA interference techniques, enhances the activation of AKT and the survival of the motoneuron-derived cell line, MN1, in response to GDNF and RET. Interestingly, our findings also demonstrate that stimulation of MN1 cells with high concentration of NGF, a treatment that under oxidative conditions promotes motoneuron apoptosis, induces TDAG51 and restricts GDNF/RET-mediated AKT signaling. Therefore, our results demonstrate that TDAG51 is a key mediator of a competitive crosstalk mechanism between apoptotic signaling promoted by NGF and its death receptor $p75^{NTR}$ and survival signaling induced by GDNF and RET in motoneuron-derived cells.

Therefore, in this doctoral thesis work we have characterized and described regulatory mechanisms that simultaneously involve different signaling pathways of neurotrophic factors, thus forming molecular regulatory networks where the balance among them critically determines biological responses. The imposition of one signaling pathway over the other, in a given context, determines the resulting biological function.

Therefore, alterations in the balance of these cross-regulatory mechanisms may be determining a physiological or a pathological output. In this way, understanding these cross-regulatory mechanisms may have implications for the treatment of neurological diseases and the promotion of regenerative therapies.

Keywords: Neurotrophic factors, GDNF, RET, Neurotrophins, NGF, BNDF, TrkA, TrkB, Glucocorticoids, Sprouty4, TDAG51, PI3K/AKT, MAPK/Erk1/2 and $p75^{NTR}$.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis a contrastar en el presente trabajo fue que tanto Sprouty4 como TDAG51 son proteínas capaces de modular la señalización y la función neurotrófica.

El objetivo general de esta tesis fue caracterizar los mecanismos a través de los cuales Sprouty4 y TDAG51 pueden regular vías específicas de señalización disparadas por los factores neurotróficos en células neuronales.

Para cumplir con este objetivo, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

Capítulo 1:

- Analizar la expresión de Sprouty4 inducida por factores neurotróficos y glucocorticoides en modelos neuronales
- Estudiar la capacidad de Sprouty4 de mediar los efectos inhibitorios ejercidos por los GCs sobre la señalización y función neurotrófica

Capítulo 2:

- Estudiar mediante ensayos de ganancia y pérdida de función la contribución de TDAG51 en la regulación de las vías de señalización inducidas por el factor neurotrófico GDNF en un modelo celular de motoneuronas.
- Estudiar el rol de TDAG51 en el efecto protector de GDNF frente a la estimulación de la vía de muerte apoptótica inducida por NGF/$p75^{NTR}$

INTRODUCCION GENERAL

Factores neurotróficos: Clasificación, vías de señalización, funciones biológicas y regulación de su actividad

El desarrollo del sistema nervioso depende de una serie de procesos coordinados que ocurren en un tiempo y espacio específicos. Las divisiones celulares, la diferenciación y maduración, la migración celular, el ordenamiento celular de manera específica, las interconexiones neuronales, y la sobrevida o la muerte celular están influenciados por una serie de factores tanto intrínsecos como extrínsecos [1]. La genética propia de una célula, su epigenética, y las señales que recibe del medio extracelular desempeñan un papel crucial en determinar el destino de las diversas poblaciones neuronales tanto en el sistema nervioso central como en el periférico [2], [3], [4] .

El correcto funcionamiento de estos procesos y su regulación aseguran las condiciones adecuadas para la vida, tanto en las diferentes etapas del desarrollo de un individuo como en los estadios adultos. Entre los factores extrínsecos responsables de controlar diversos procesos del desarrollo, se encuentran los factores neurotróficos. Estas proteínas desempeñan un papel fundamental en la promoción del crecimiento y sobrevida neuronal, contribuyendo así al establecimiento y mantenimiento de la conectividad y funcionalidad del sistema nervioso. Estas moléculas son secretadas por distintas poblaciones celulares y actúan de manera autocrina o paracrina sobre la célula blanco. Según sus características estructurales, las vías de señalización involucradas y los efectos biológicos producidos, los factores neurotróficos pueden ser clasificados principalmente en tres grandes grupos. La familia de las neurotrofinas (BDNF, NGF, NT3 y NT4), el grupo de ligandos de la familia de GDNF (GDNF, ARTN, NRTN, PSPN) y como tercer gran grupo encontramos a los ligandos CDNF (Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor) y MANF (Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor [5], [6], [7]

Neurotrofinas

El primer integrante de este grupo caracterizado fue NGF (sigla en inglés de "*Nerve Growth Factor"*), el cual fue descubierto en la búsqueda de factores promotores de la sobrevida de neuronas motoras y sensoriales [8], [9]. Posteriormente se identificaron otros miembros de la familia: BDNF, NT3 y NT4. Actualmente sabemos que las neurotrofinas no sólo son factores de sobrevida sino también controlan el desarrollo, la proliferación, la función y la plasticidad sináptica.

El grupo de las neurotrofinas está representado por cuatro miembros en el sistema nervioso de mamíferos: el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF "*Brain Derived Neurotrophic Factor*"), el factor de crecimiento neural (NGF "*Nerve Growth Factor*"), la neurotrofina 3 (NT3 "*Neurotrophin-3*") y la neurotrofina 4 (NT4 "*Neurotrophin-4*").

Las neurotrofinas y sus genes poseen una alta homología en su secuencia y su estructura. Esto evidencia que evolutivamente surgieron a partir de sucesivos eventos de duplicación génica. A partir de estos genes las neurotrofinas son sintetizadas inicialmente en su proforma inmadura denominada proneurotrofinas:(proBDNF, proNGF, proNT3 y proNT4), las cuales pueden ser secretadas en su proforma o clivadas intra- o extracelularmente por distintas proteasas [10].

Las neurotrofinas ejercen su función al interactuar con los receptores de tipo Trk (sigla en inglés de "*Tropomyosin receptor kinase"*). Si bien las neurotrofinas poseen una alta similitud entre sí, cada neurotrofinas posee afinidad por un receptor Trk específico (TrkA, TrkB o TrkC). Así, NGF posee especificidad por el receptor TrkA, BDNF y NT4 por TrkB, NT3 tiene la capacidad de unirse con mayor afinidad a TrkC y en menor medida a TrkA y TrkB.

Los receptores Trk son receptores tirosina kinasa, por lo que al producirse su estimulación con la neurotrofina madura se produce la dimerización del receptor Trk y la subsecuente trans-autofosforilación de los residuos tirosina de la porción intracelular del receptor. Esta activación por fosforilación es censada por proteínas adaptadoras que desencadenan procesos de señalización intracelular. Dentro de estas vías de señalización activadas se pueden destacar la vía de PLCɣ; la vía Ras-Erk y la vía PI3K-AKT, las cuales

tienen principalmente efectos biológicos relacionados con la sobrevida y la diferenciación neuronal.

A pesar de su preferencia por los receptores Trk, las neurotrofinas pueden unirse con menor afinidad al receptor $p75^{NTR}$, también conocido como "receptor de baja afinidad para neurotrofinas". Este receptor pertenece a la superfamilia del receptor para el factor de necrosis tumoral, e interactúa principalmente con las formas inmaduras de las neurotrofinas. Sin embargo, a diferencia de los efectos de los receptores Trk, durante el desarrollo, se ha demostrado que $p75^{NTR}$ media la muerte celular apoptótica de las neuronas motoras en respuesta a NGF [11], [12] o a su precursor inmaduro proNGF, liberado por astrocitos activados [13], [14].

Si bien en presencia de un receptor Trk, $p75^{NTR}$ tiene la capacidad de potenciar la señalización del receptor Trk por neurotrofinas, en ausencia de los receptores Trk, $p75^{NTR}$ *per se* o en complejo con coreceptores, como por ejemplo la proteína de membrana Sortilina, activa vías de señalización intracelulares antagónicas a las que activa cuando se une a los receptores Trk y que conducen a la muerte apoptótica través de la vía de Jun Kinasa (JNK). Esta vía resulta en la activación de una cascada de señalización apoptótica que involucra a las proteínas p53, BAD, BAX, Citocromo C y la activación de diferentes caspasas. Así, la interacción del receptor $p75^{NTR}$ con las neurotrofinas puede tener efectos duales dependiendo de su asociación con los receptores Trk y las condiciones del entorno celular [5]

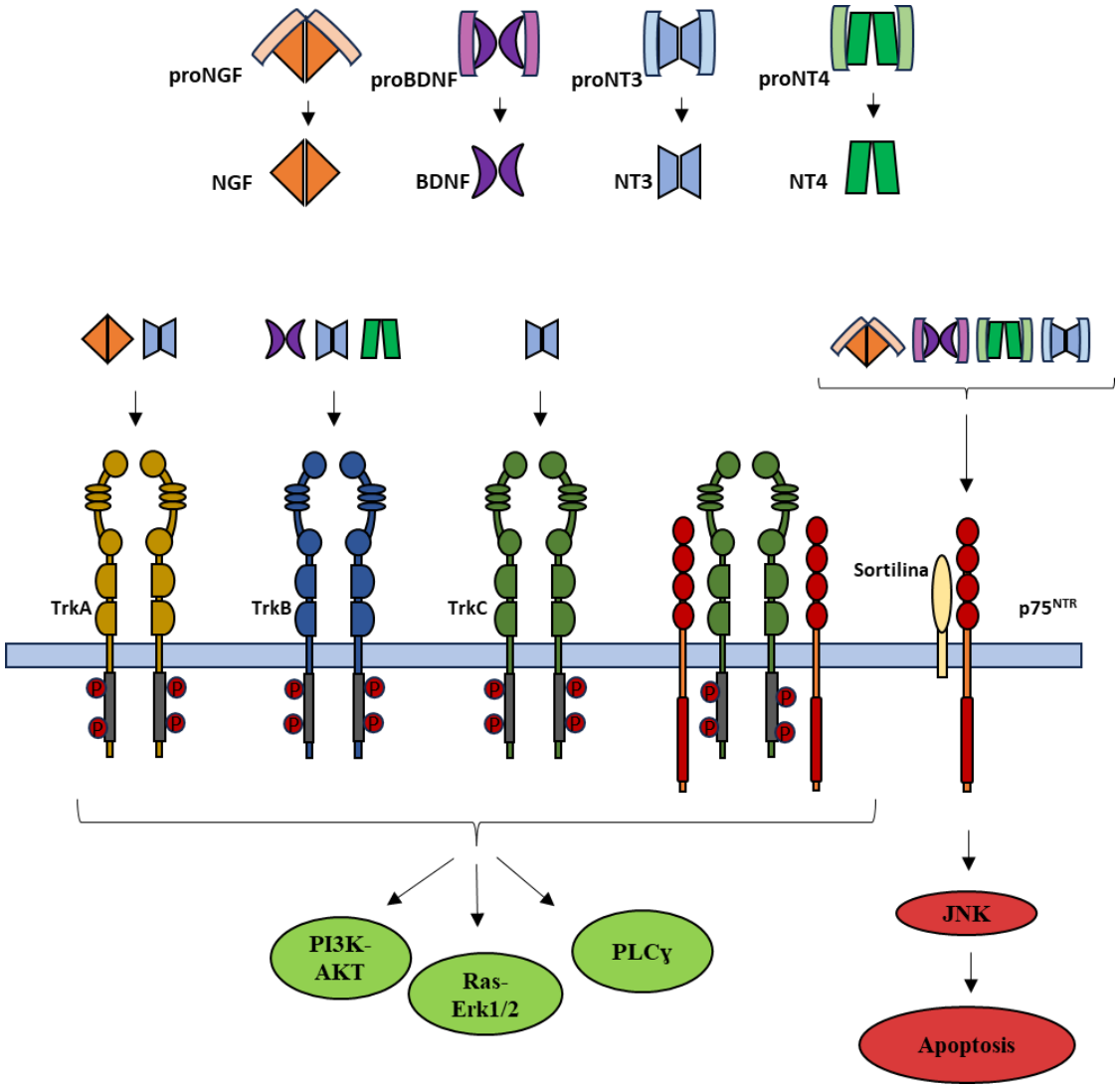

Figura 1. **Representación de la interacción de las neurotrofinas y sus receptores** Las neurotrofinas son sintetizadas en su proforma (proNGF, proBDNF, proNT3 o proNT4), luego de ser clivadas adquieren su conformación madura. Al dimerizar, las neurotrofinas interactúan con sus receptores Trk. Cada neurotrofina posee mayor afinidad por un receptor diferente, NGF tiene mayor afinidad por TrkA, BDNF y NT4 por TrkB y NT3 puede unirse tanto a TrkA, TrkB y TrkC. Una vez que ocurre la unión de la neurotrofina con el receptor, se produce la transfosforilación del homodímero del Trk en su porción intracelular. Esto activa las vías de señalización PI3K-AKT, Ras-Erk1/2 y/o PLCγ, las cuales promueven sobrevida y diferenciación, y plasticidad sináptica. La presencia del receptor $p75^{NTR}$ aumenta la afinidad y la activación de los receptores Trk por las neurotrofinas. Además, las proneurotrofinas pueden activar $p75^{NTR}$ formando un complejo con la proteína transmembrana Sortilina para inducir la muerte celular a través de la activación de JNK [15], [16].

Por mucho tiempo se postuló que el prodominio de las distintas proneurotrofinas correspondía a una porción de proteína cuya función era facilitar su correcto plegado. Sin embargo, desde comienzos de los años 2000 han surgido una cantidad creciente de trabajos que demuestran que las proneurotrofinas se encuentran involucradas en procesos de señalización diferentes a los de sus formas maduras. El balance entre las neurotrofinas y las proneurotrofinas ha comenzado a tomar relevancia como un determinante de la sobrevida o muerte celular [17] Así, desbalances hacia un aumento en los niveles de proneurotrofinas se ha asociado con enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer [18], depresión [19] o Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) [13]. Teniendo en cuenta los efectos antagónicos que pueden producir las proneurotrofinas respecto de sus formas maduras [17], el entendimiento del balance entre neurotrofinas y proneurotrofinas podrían ser fundamentales para comprender y tratar ciertas condiciones patológicas relacionadas con el sistema nervioso.

En el sistema nervioso periférico, las neurotrofinas son secretadas principalmente por células no neuronales, mientras que en el sistema nervioso central son sintetizadas y secretadas por distintas neuronas bajo condiciones fisiológicas [20]. En neuronas corticales e hipocampales se ha visto que BDNF y su receptor TrkB aumentan sus niveles de expresión luego de una isquemia cerebral [21]. Luego de la aplicación de BDNF o NT4 el tamaño de la lesión es reducido, lo que sugiere un rol neuroprotector en este contexto [21], [22], [23]. De igual manera se ha descripto que lesiones en nervios motores resultan en un aumento en la expresión de BDNF y TrkB en motoneuronas [24]. Las neuronas colinérgicas, que degeneran durante la enfermedad de Alzheimer, expresan el receptor de NGF, TrkA. De acuerdo con esto, la aplicación de NGF en modelos murinos ha demostrado capacidad preventiva de la atrofia de esta población neuronal [25].

Durante el desarrollo se produce un gran número de motoneuronas en la médula espinal, que luego son eliminadas en oleadas de muerte celular programada que selecciona las neuronas que hayan realizado las correctas conexiones con el tejido blanco [26]. Esta selección involucra al receptor $p75^{NTR}$ y la señalización de neurotrofinas. Durante el desarrollo del sistema nervioso, el receptor $p75^{NTR}$ se encuentra ampliamente expresado en diferentes poblaciones neuronales como por ejemplo en neuronas sensoriales, en neuronas de la corteza cerebral, del cerebelo y en motoneuronas espinales. En la médula espinal, la expresión del receptor finaliza en estadíos embrionarios, luego del período de muerte celular programada [27], [28]. Sin embargo, luego de un daño

neuronal o durante procesos patológicos, ocurre una reexpresión de $p75^{NTR}$. Por ejemplo, daños en la médula espinal pueden llevar a una expresión persistente del receptor, e incluso se ha detectado altos niveles de expresión de $p75^{NTR}$ en muestras de animales adultos en modelos de ELA [27]. Esta reexpresión es postulada como una de las principales responsables del aumento de motoneuronas apoptóticas en estos individuos al activarse nuevamente las vías de muerte desencadenadas por $p75^{NTR}$.

Los efectos de las neurotrofinas no se limitan únicamente a promover la sobrevida o la muerte neuronal; BDNF, por ejemplo, se ha visto implicado en la regulación de diferentes sistemas de neurotrasmisores [29], [30] además de la formación y modulación de la memoria. [31]. Numerosos estudios han identificado que BDNF aumenta la densidad de espinas dendríticas e induce "*long term potentiation*" (LTP) en neuronas piramidales hipocampales [32], [33] De igual manera, se ha encontrado que ratones deficientes del receptor de BDNF, TrkB, presentaban menos espinas dendríticas y una reducción en las sinapsis excitatorias en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo. [33], [34]. En el giro dentado de ratones adultos, se ha descripto que BDNF y TrkB se encuentran relacionados a la morfogénesis dendrítica de neuronas granulares hipocampales. [35]

Ligandos de la familia de GDNF (GFLs)

Los ligandos de la familia de GDNF (GFLs) incluye cuatro miembros: GDNF, Neuturina (NRTN), Artemina (ARTN) y Persefina (PSPN) los cuales están involucrados en sobrevida, proliferación y diferenciación de varias poblaciones neuronales en el sistema nervioso central y periférico. Estos factores neurotróficos poseen un sistema mixto de receptores, un receptor especializado en la unión por alta afinidad de los ligandos, el receptor GFRα, y un receptor especializado en la señalización intracelular. Así, el ligando se une a su receptor GFRα y este complejo puede interactuar con el receptor tirosina kinasa RET o la molécula de adhesión neuronal NCAM ("N*eural Cell Adhesion Molecule*"), que son moléculas transmembrana y hacen posible la traducción de la señal hacia el interior de la célula. Existen 4 receptores GFRα, con distintas afinidades por los diferentes miembros de la familia de ligandos de GDNF (GFL). GFRα1

presenta mayor afinidad por GDNF, GFRα2 por NRTN, GFRα3 por ARTN y GFRα4 por PSPN [36]

Los receptores de la familia de GFRα carecen de una porción de señalización intracelular, y están anclados a la membrana mediante un dominio glicosilfosfatidilinositol (GPI) en compartimentos especializados y caracterizados por su composición lipídica llamados "lipid rafts" o balsas lipídicas. Una vez que se produce la interacción del ligando con el receptor GFRα en las balsas lipídicas, se produce el reclutamiento del otro componente del sistema; el receptor tirosina kinasa RET (por su nombre en inglés, *"Rearranged during transfection"*). Posterior a su reclutamiento a las balsas lipídicas, RET es dimerizado y autofosforilado, adquiriendo su conformación activa [37].

Durante mucho tiempo se centró el estudio de la vía de señalización de GFLs a través del sistema GFRα/RET, sin embargo, trabajos posteriores identificaron a la molécula de adhesión NCAM como un receptor de membrana alternativo capaz de unirse a GFRα y desencadenar una respuesta de señalización intracelular [38]. En neuronas que carecen de RET, los GFL tienen la capacidad de señalizar a través de NCAM. Esta proteína de adhesión es una proteína ampliamente distribuida en el sistema nervioso y participa en procesos de migración celular, sobrevida, crecimiento neurítico y plasticidad sináptica [39].

Dependiendo del receptor transmembrana presente en el contexto celular (RET o NCAM), las señales y las respuestas biológicas disparadas por los ligandos de GDNF serán diferentes. Después de la activación del complejo GFL-GFRα-RET, se produce el reclutamiento de diversas proteínas adaptadoras en la porción intracelular del complejo. Este reclutamiento desencadena la activación de diferentes vías de señalización, incluyendo Ras-MAPK ("*Mitogen-Activated Protein Kinase*"), PI3K-AKT, PLC-ɣ y Src (ver Figura 2).

En relación a la respuesta a través de NCAM, se ha demostrado una asociación entre NCAM y Fyn, un miembro de la familia de tirosina kinasas Src [40]. La activación de Fyn por NCAM lleva al reclutamiento de FAK, una proteína kinasa relacionada con la señalización por Ras-MAPK y el reordenamiento del citoesqueleto [40]. De esta manera se ha visto a NCAM involucrada en diversos procesos del desarrollo como migración celular, crecimiento neurítico y plasticidad sináptica [41], [42], [43].

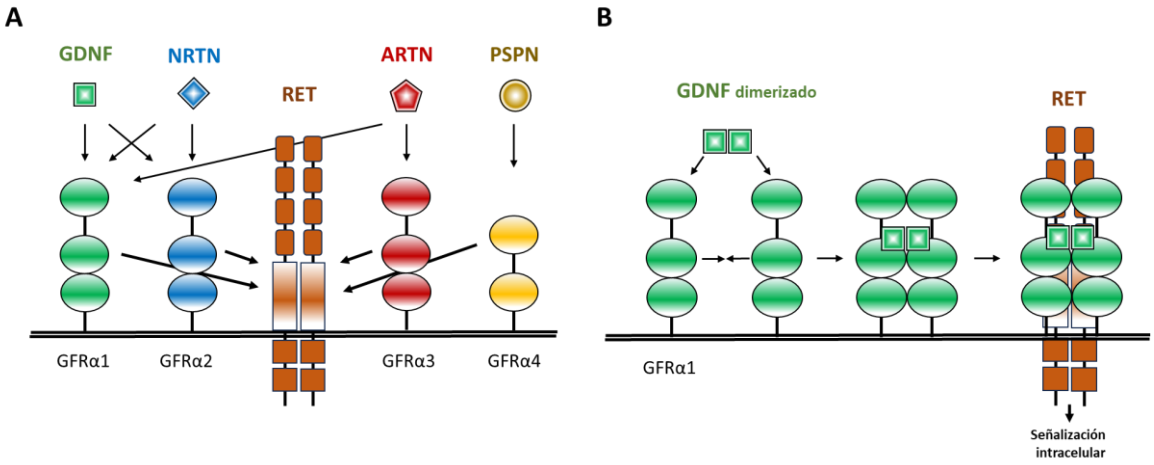

Figura 2 **Representación de la interacción de los ligandos de la familia de GDNF con sus receptores.** Adaptado de *Sariola y Saarma 2003*. **(A)** GDNF, ARTN, NRTN y PSPN interactúan con mayor afinidad con uno de los miembros de la familia GFRα (1-4 respectivamente). Una vez que se produce la unión, el receptor de señalización RET (vía canónica) es reclutado a los microdominios específicos de membrana denominados balsas lipídicas (lipid rafts) en donde homodimeriza y se transfosforila, y se produce la activación de diferentes vías de señalización intracelular **(B)** desencadenando diferentes tipos de respuestas biológicas contexto y tipo celular dependientes [36].

El primer miembro de la familia de ligandos de GDNF que se describió fue el propio GDNF, inicialmente identificado como un factor de sobrevida de neuronas dopaminérgicas y, desde entonces, ha sido el miembro más estudiado. Posteriormente se describieron roles importantes para GDNF en la sobrevida y diferenciación de motoneuronas y otras poblaciones neuronales del sistema nervioso periférico [6].

En motoneuronas, la sobreexpresión de GDNF en músculo esquelético induce la hiperinnervación de la placa neuromuscular [44] y participa del guiado axonal [45]. Estos resultados indican que, en condiciones fisiológicas normales, el principal rol de GDNF en motoneuronas postnatales es la promoción de la arborización axonal y la formación sináptica. Debido a la capacidad de promover la sobrevida y el crecimiento de motoneuronas, GDNF ha sido probado en terapias para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica [46], una patología en la cual las motoneuronas degeneran y mueren llevando a la atrofia muscular y finalmente a fallas respiratorias que es la principal causa

de muerte en esta enfermedad. GDNF también ha sido propuesto para el tratamiento de lesiones de médula espinal en la cual las motoneuronas se desconectan de sus tejidos blanco, llevando a la muerte progresiva de las mismas y la parálisis muscular [37], [47], [48].

Además, GDNF ha sido descripto como un factor importante para el desarrollo de neuronas del sistema periférico como por ejemplo las neuronas sensoriales no peptidérgicas de los ganglios de la raíz dorsal, y las neuronas simpáticas del ganglio cervical superior. En ambos casos GDNF promueve el crecimiento axonal y la arborización terminal. En las neuronas sensoriales no peptidérgicas los ligandos de la familia de GDNF, actuando a través de su receptor RET también participan en la respuesta al dolor térmico [37]

Finalmente, es importante señalar que además del sistema nervioso, GDNF y sus receptores son ampliamente expresados en distintos sistemas. GDNF es un morfógeno crucial en el desarrollo renal [49], además de ser un regulador de la espermatogénesis [50].

Regulación de la señalización de los factores neurotróficos

Si bien los factores neurotróficos se encuentran involucrados en diversos procesos celulares como pueden ser la sobrevida, crecimiento y proliferación, guiado axonal, arborización dendrítica, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico; estos procesos necesitan estar coordinados de manera espacio-temporal. La desregulación de estos procesos puede llevar a comportamientos celulares aberrantes o enfermedades. Para esto, evolutivamente han sido seleccionados distintos mecanismos endógenos de regulación de la señalización de factores tróficos. Estos mecanismos requieren en muchos casos de la cooperación de distintas moléculas reguladoras, que aseguran la intensidad y duración de las señales tróficas para garantizar así una respuesta fisiológica. Por lo que resulta importante estudiar los mecanismos que aumentan (señales positivas) o restringen (señales negativas) la actividad de señalización de los factores neurotróficos y sus receptores en diferentes contextos celulares [51]. Estos mecanismos regulatorios explican cómo una vía de señalización inducida por un receptor neurotrófico puede controlar diversos procesos biológicos, aumentando el repertorio de funciones controladas por los

factores neurotróficos [7]. Estas diferentes moléculas regulatorias actúan a diferentes niveles de la cascada de señalización, para regular la unión del ligando a su receptor, atenuar la activación del receptor, controlar vías específicas de señalización activadas río abajo y regular la internalización y degradación del receptor.

A la fecha, se han identificado diversos mecanismos que incrementan la actividad catalítica de los receptores tirosina kinasas (regulación positiva). Algunos de estos mecanismos involucran la translocación cromosomal, amplificación de receptores o mutaciones puntuales que generan una ganancia de función [52], [53]. Esta sobreactivación desproporcionada de los receptores se correlaciona con el desarrollo de diferentes desórdenes y procesos tumorales. En contraposición, los mediadores moleculares de desensibilización de la señal (regulación negativa) continúan siendo un importante campo de estudio. Estos mecanismos de regulación negativa de los factores neurotróficos pueden ser de tipo reversible o irreversible [7]

La proteína transmembrana Lrig1 es un ejemplo de regulación negativa reversible, ya que esta proteína de membrana es capaz de ser inducida por factores neurotróficos en distintas poblaciones celulares, y actúa como un modulador negativo de la activación de GDNF y neurotrofinas, como BDNF, al inhibir la activación de los receptores RET y TrkB respectivamente [54], [55]. En el caso de RET, Lrig1 restringe la unión de su ligando GDNF y su posterior reclutamiento y activación de RET en las balsas lipídicas de membrana [54]. Ha sido postulado que estos mecanismos ayudan a diversificar las respuestas neurotróficas en diferentes contextos celulares durante el neurodesarrollo.

La reducción de la afinidad del complejo ligando-receptor resulta un mecanismo posible de regulación negativa. Un ejemplo de esto es la evidencia de que E-Cadherina tiene la capacidad de interactuar con la porción extracelular del receptor de EGF, esto produce una disminución en la movilidad del receptor y por lo tanto disminuye su disponibilidad a presentarse al ligando [56].

Los mecanismos reversibles típicamente implican la inducción de la transcripción y/o traducción de diferentes moléculas que por lo general inhiben la activación de la misma vía de señalización que las indujo. Un ejemplo de esto pueden ser la familia de proteínas Sprouty, cuya expresión es inducida por la señalización Ras/Erk1/2 en respuesta a la activación de RTK. Estas proteínas actúan como inhibidores específicos de esta

misma vía de señalización, dejando activas a las demás vías activadas por el RTK como puede ser PI3K/AKT [57]

Otro mecanismo relevante es la defosforilación de residuos tirosinas de los RTKs, lo que lleva a su inactivación y una disminución de la cascada de señalización intracelular. Este efecto está mediado por diferentes proteínas fosfatasas específicas para residuos tirosinas, denominadas PTP (del ingles *Protein Tyrosine Phosphatases*). Ejemplos de proteínas involucradas en este mecanismo pueden ser: PTPRO, una fosfatasa capaz de regular los niveles de fosforilación de los receptores de neurotrofinas Trk y del receptor RET; donde se ha visto que la ablación de PTRPO en ratones resulta en un aumento en el crecimiento de neuronas trigeminales, un aumento en el tamaño y la complejidad dendrítica y un aumento en la respuesta a BDNF y GDNF [58]. SHP-1 también ha sido descripta como una fosfatasa de tirosinas que regula negativamente la activación del receptor de NGF, TrkA, reconociendo específicamente la fosforilación de tirosina 490 del receptor [59]. SAP (*SLAM-associated protein*), la cual interactúa con la activación por fosforilación en el residuo 674 de Trk suprimiendo su respuesta frente a la inducción [60]; o la proteína PTP1B, una fosfatasa que actúa defosforilando al receptor del EGF [61]. Esta especificidad por su sustrato demuestra que existe un amplio espectro de proteínas capaces de regular específicamente la fosforilación de los distintos RTKs en contextos celulares específicos.

Otra fosfatasa capaz de modular la actividad de los receptores RTK es la proteína PTEN (sigla en inglés de *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*), un conocido inhibidor de la vía de señalización PI3K/AKT. Al producirse la activación de los RTKs se produce el ensamblado de una maquinaria enzimática que reconoce la fosforilación del receptor y cataliza la conversión de PIP_2 a PIP_3. Este último es la señal a través de la cual AKT es traslocado a la membrana plasmática en donde sufre su activación continuando así con esta vía de señalización involucrada principalmente en la sobrevida, la proliferación y la inhibición de la apoptosis. Sin embargo, la fosfatasa PTEN antagoniza con la activación de AKT al defosforilar PIP_3 a su forma PIP_2, de esta forma disminuyendo la señal de activación de AKT [62].

Otro mecanismo de atenuación de la activación de los RTKs está representado por la inhibición de tipo irreversible por la ubiquitinación, endocitosis y degradación de los receptores. La ubiquitina ligasa Cbl, por ejemplo, reconoce los residuos fosforilados del receptor, lo ubiquitina, y luego se produce la endocitosis y la degradación del RTK. Esto

produce dos principales efectos que aseguran el correcto funcionamiento fisiológico del sistema: la terminación de la señalización, al retirar la disponibilidad en membrana a los receptores activados; y la generación de un período refractario hasta que pueda volver a ocurrir el reclutamiento de receptores en membrana para ser nuevamente activados [51].

Como se mencionó previamente, la desregulación de estos mecanismos de control negativo puede desencadenar diferentes tipos de procesos, resultando en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, trastornos en el comportamiento o incluso el desarrollo de procesos tumorales

Regulación cruzada de los factores neurotróficos

Si bien las neurotrofinas y GFLs actúan a través de distintos tipos de complejos ligando-receptor, existe un diálogo entre la señalización de estos factores neurotróficos. Por ejemplo, en algunas poblaciones de neuronas sensoriales tanto GDNF como BDNF son requeridos en simultáneo para la sobrevida celular [63]. Tetri y colaboradores demostraron que en células de neuroblastoma la activación de RET por ARTN lleva a la fosforilación de TrkA y, de manera inversa, la activación por NGF de TrkA puede llevar a la fosforilación y consecuente activación de RET. Evidenciando así un mecanismo de diálogo positivo entre las dos vías. [64]

Otro ejemplo de la regulación de la señalización de los factores neurotróficos por vías de señalización independientes son la regulación por glucocorticoides (GC). Está demostrado que los GC previenen el crecimiento dendrítico y el correcto funcionamiento de neuronas hipocampales y corticales inducido por BDNF al afectar la señalización de la vía de MAPK [65], [66], [67]. En astrocitos, la estimulación con glucocorticoides tiene una respuesta bifásica, caracterizada por un aumento en los niveles de ARNm de *Bdnf* y la respuesta de TrkB a tiempos cortos de estimulación. Sin embargo, en una exposición prolongada a GCs ocurren efectos opuestos, caracterizados por una disminución en la respuesta de BDNF y TrkB y una disminución en los niveles de ARNm de *Bdnf*.

Los Glucocorticoides y sus efectos biológicos en el sistema nervioso

Los glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores) son hormonas derivadas de colesterol secretadas por la zona fasciculada de la glándula adrenal. La síntesis y secreción de esta hormona se encuentra regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Aunque su biodisponibilidad en los tejidos blancos también puede estar regulada por su unión a globulinas en el suero o la inactivación por acción de enzimas deshidrogenasas.

La expresión de los receptores de glucocorticoides (GC) es prácticamente ubicua en todo el organismo y sus mecanismos de acción producen efectos celulares a distintos niveles, moleculares, transcripcionales y/o traduccionales.

Desde la década del ´40, los GC han ido aumentando su uso en el campo de la clínica, siendo recetados para el tratamiento de la inflamación crónica, inmunosupresión en pacientes trasplantados, tratamientos del dolor y en tratamientos contra el cáncer por su capacidad antiproliferativa y antiangiogénica [68]. Sin embargo, al estar presente el receptor de GC en el sistema nervioso, un gran cuerpo de evidencia sugiere que la exposición prolongada a glucocorticoides puede aumentar la susceptibilidad a desarrollar desordenes metabólicos, neuropsiquiátricos y neurodegenerativos. Específicamente se ha visto que la exposición prolongada a condiciones estresantes o a GC inducen el remodelamiento neuronal o alteraciones frecuentemente maladaptativas en las células gliales. [69]. Esto plantea que la regulación de los niveles de GC resulta clave para la homeostasis celular y sistémica, ya que desbalances en estos niveles pueden desencadenar diversas condiciones patológicas.

Clínicamente, los GC sintéticos como la dexametasona (DEX) se utilizan para la supresión del rechazo inmunitario después del trasplante de órganos y para limitar la propagación del daño neuronal que se produce después de una lesión nerviosa. Sin embargo, el control inflamatorio posterior a la lesión por parte de DEX parece estar en conflicto con las respuestas regenerativas inducidas por los factores neurotróficos. Varias líneas de evidencia han reportado efectos opuestos de GC y neurotrofinas con respecto a la plasticidad neuronal y el crecimiento axonal. Curiosamente, si bien la DEX parece promover la regeneración y la recuperación funcional de los axones después del

aplastamiento axonal (nerve crush) [70], [71], se ha demostrado que el GC previene el crecimiento dendrítico inducido por BDNF y el desarrollo y la maduración sináptica de neuronas corticales e hipocampales al reducir la vía de señalización MAPK [65], [66], [67]. Además, en un intento por descifrar el mecanismo a través del cual los GC podrían promover la depresión y afectar el desarrollo neurológico, Terada y sus colaboradores también demostraron que la unión de DEX a los receptores de glucocorticoides (GR) restringe el crecimiento de neuritas promovido por NGF a través de un mecanismo que previene las vías de PI3K-AKT y Ras-Erk1/2/MAPK [72]. Sin embargo, a pesar de toda esta evidencia, se requiere más investigación para comprender el mecanismo a través del cual DEX interrumpe la señalización de neurotrofinas y el crecimiento de neuritas mediado por los receptores Trk.

Tomando todo esto en cuenta, resulta de suma relevancia estudiar los mecanismos que regulan los distintos procesos moleculares y celulares desencadenados por los factores neurotróficos en el desarrollo del sistema nervioso y sus posibles implicancias en condiciones patológicas, con el objetivo final del desarrollo de nuevos fármacos y tratamientos.

Modelos celulares empleados para el estudio de la regulación de la actividad y función neurotrófica

Hipocampo

El hipocampo es una estructura del sistema nervioso central de mamíferos altamente conservada. Si bien se encuentran diferencias entre las distintas especies, su arquitectura básica se ha mantenido, lo que hace que resulte un modelo ampliamente utilizado para estudios anatómicos, funcionales e histológicos.

Estructuralmente el hipocampo puede ser dividido en diferentes regiones, áreas CA1, CA2 y CA3 y Giro Dentado (GD). Respecto a las conexiones sinápticas el hipocampo inicialmente se pensaba que representaba un circuito unidireccional en el cual, la corteza entorrinal provee la mayoría de las vías aferentes a través de la vía perforante hacia el GD. El GD proyecta hacia la región CA3 a través de las mossy fiber ("*fibras musgosas*") desde la cual se contacta con la región CA1 por la vía de las colaterales de Schaffer. Las neuronas de la región CA1 proyectan a la corteza entorrinal formando un ciclo.

Sin embargo, posteriormente se describió que el sistema de conectividad hipocampal es más complicado, con múltiples procesos y circuitos de retroalimentación ocurriendo en paralelo. La corteza entorrinal proyecta no solo al giro dentado, sino también directamente a las regiones CA3 y CA1. Al mismo tiempo la región CA3 provee de retroalimentación al GD. Además, existe evidencia de que la región CA2, que tradicionalmente se denominó como una zona de transición entre CA1 y CA3, posee sus propias funciones.

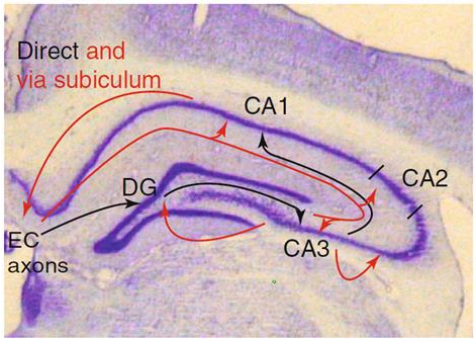

Figura 3. Tomada de *Knierim (2015)*. Las líneas negras representan la vía trisinaptica clásica. Las líneas rojas muestran las demás vías en el hipocampo, incluyendo las proyecciones de la

corteza entorrinal (EC) a las tres regiones CA, la retroalimentación a EC desde CA1 y la proyección de CA3 al giro dentado (GD) [73].

El hipocampo se encuentra formado principalmente por neuronas glutamatérgicas formando una única capa de somas. En las regiones CA1, CA2 y CA3 se encuentran las neuronas piramidales, las cuales poseen un cuerpo celular triangular y un árbol dendrítico basal y apical. Por su parte, el giro dentado se encuentra formado principalmente por neuronas granulares. Además, existen un grupo heterogéneo de interneuronas inhibitorias en toda la estructura formando diferentes tipos de conexiones.

Embriológicamente, el hipocampo se origina entre los días embrionarios 10 y 18 (E10 y E18) en el ratón y entre E16 y E21 en rata y continúa su maduración hasta adquirir su arquitectura final en el adulto. La neurogénesis tiene lugar en los últimos días del desarrollo embrionario y posteriormente durante las primeras semanas de vida postnatal ocurre la mayor proporción de dendritogénesis y la formación y maduración de espinas dendríticas.

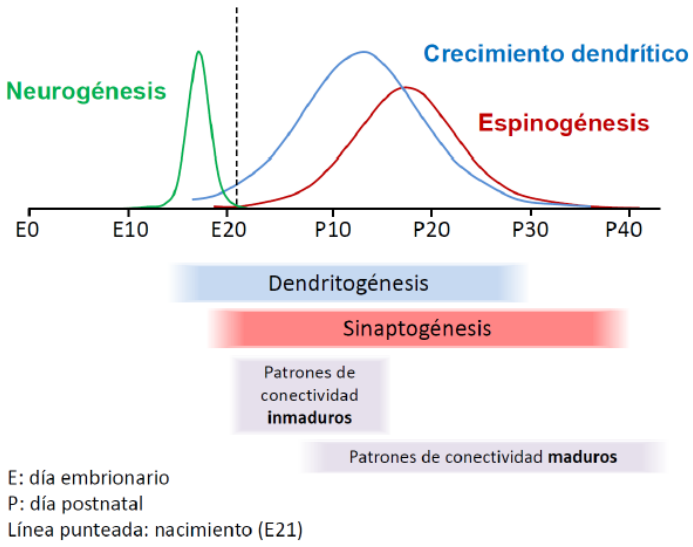

Figura 4 Esquematización de la escala temporal de los principales procesos del desarrollo neuronal en el hipocampo de rata. *Adaptado de Yehezkel Ben-Ari et al (2007)*[74]

El hipocampo es una de las estructuras más estudiadas del sistema nervioso y resulta de crucial interés por su rol en procesos de memoria y aprendizaje. Aunque se encuentra involucrado en otros tipos de procesos como puede ser la localización espacial,

el control del tiempo, memorias sociales, emocionales y la modulación de la respuesta al estrés.

En relación a la regulación del estrés, el hipocampo posee una conexión inhibitoria sobre el hipotálamo, afectando el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Sin embargo, la exposición a condiciones estresantes también se ha demostrado que afecta significativamente la morfología y la función del hipocampo. Ante condiciones de estrés crónico se ha observado una reducción del volumen del hipocampo, una disminución de la memoria verbal, espacial o episódica, disminución de la conectividad sináptica, así como cambios en la expresión génica y epigenética, entre otros efectos locales o sistémicos [75].

Respecto a los factores neurotróficos, BDNF y su receptor TrkB se encuentra altamente expresados en las áreas cerebrales relacionadas con el aprendizaje y la memoria, como es el hipocampo. Esta neurotrofina controla el desarrollo de la conectividad hipocampal regulando la diferenciación morfológica, la arborización dendrítica, la sinaptogénesis y la plasticidad neuronal tanto en neuronas piramidales de las áreas CA1 y CA3 como sobre las neuronas granulares del GD [31], [76]. Es por ello que resulta relevante entender los mecanismos de señalización, así como la regulación de estas señales.

Motoneuronas

Las motoneuronas son una población específica de neuronas gracias a las cuales el sistema nervioso es capaz de producir la contracción del músculo esquelético y por lo tanto controlar los movimientos esenciales para la vida, incluyendo la deglución y la respiración. Durante el desarrollo, las nuevas neuronas motoras son agrupadas en forma de columnas a lo largo del eje rostrocaudal del individuo. Dentro de una misma columna, un grupo de motoneuronas inervan en conjunto un único músculo esquelético, lo que las define como "pool motor". Esto demuestra que existe una organización y un correlato topológico de las motoneuronas a lo largo de la médula espinal.

Las motoneuronas son generadas durante el desarrollo en grandes cantidades, luego estos números son modulados por la competencia de señales de inducción de muerte celular y señales de sobrevida, mediante un proceso denominado como "Programed Cell Death (PCD)". Por este proceso, alrededor de la mitad de las motoneuronas postmitóticas embrionarias sobreviven [26]. Sin embargo, aún no están claros los mecanismos moleculares que regulan esta selección neuronal. Se conoce que las señales distales que envía el tejido blanco hacia la neurona son claves para su sobrevida [77], [78]. Para percibir esas señales ambientales, las motoneuronas deben expresar diferentes receptores de membrana que aseguren una correcta señalización.

Se ha determinado que tres de las neurotrofinas, BDNF, NT3 y NT4 promueven la sobrevida de motoneuronas; no así NGF [77], [79], [80]. BDNF, y su receptor de alta afinidad TrkB, se expresan normalmente durante el desarrollo de músculo esquelético y motoneuronas, respectivamente, durante el período de PCD. Sin embargo, tanto la ausencia de BDNF como de TrkB en modelos de ratones mutantes no demostraron un aumento en la pérdida de motoneuronas durante el período de PCD [81]. A pesar de esto, el agregado exógeno de BDNF promueve la sobrevida neuronal [82]. Además, este soporte trófico de las motoneuronas también es promovido por la familia de ligandos de GDNF, la familia del ligando CNTF (Ciliary neurotrophic factor), IGF1 o IGF2 (Insulin-like growth factor), HGF (Hepatocyte growth factor) o VEGF (vascular endotelial-derived growth factor) [83].

GDNF fue claramente determinado como un factor de sobrevida de motoneuronas tanto *in vivo* como *in vitro* [84]. Cuando una motoneurona comienza a proyectar axones fuera de la médula espinal (alrededor del día embrionario 10 en modelos murinos), la

única fuente de GDNF en el ambiente está representada por un grupo de células mesenquimales ubicadas en los miembros. Luego, la expresión comienza a producirse en diferentes células musculares hasta llegar al día embrionario 15, donde la expresión ocurre en todos los músculos. En modelos de ratones donde se produjo la sobreexpresión de GDNF en músculo se observó una sobreinnervación de la placa neuromuscular [44], mientras que cuando los niveles presentes de GDNF son insuficientes se compromete la estructura y la función neuromuscular [85]. Lo que evidencia la importancia de las señales enviadas por el tejido blanco sobre las motoneuronas para su correcta innervación.

Por otra parte, GDNF es expresado por las células de Schwann y el músculo esquelético durante el período de PCD y se ha visto un aumento en su expresión luego de una injuria [86]. Los receptores canónicos de los ligandos GDNF y NTRN (RET y GFRα1/2) son expresados por la gran mayoría de las motoneuronas espinales al comienzo del período de PCD. La ausencia de GDNF, RET o GFRα1 produce un aumento en la muerte de motoneuronas durante el desarrollo de entre 20-30%. [87] lo que sugiere que una subpoblación de motoneuronas es dependiente de esta señalización y, además, que existe un grado de compensación entre los distintos factores neurotróficos.

Como se mencionó previamente, las motoneuronas también expresan el coreceptor de neurotrofinas $p75^{NTR}$. Este receptor de baja afinidad tiene la capacidad de potenciar la respuesta de los distintos tipos de receptores Trk. Sin embargo, en ausencia de su receptor Trk específico, las neurotrofinas (o su proforma) tienen la capacidad de interactuar directamente con $p75^{NTR}$ y desencadenar señales intracelulares que conducen a la muerte celular [5].

Durante el desarrollo existe una correlación temporal entre un aumento de expresión de $p75^{NTR}$ y el proceso de muerte celular programada (PCD) en la médula espinal, y un posterior descenso en sus niveles de expresión luego de este período crítico del desarrollo. Esta observación junto con la reactivación de los niveles de expresión del receptor de baja afinidad $p75^{NTR}$ detectado luego de un daño neuronal [28], indican que las señales iniciadas por $p75^{NTR}$ inducen la muerte de motoneuronas. De acuerdo con esto se ha observado una reexpresión de los niveles de este receptor en condiciones de daño o enfermedades neurodegenerativas como la Esclerosis Lateral Amiotrófica. En modelos murinos de esta enfermedad se ha observado un aumento en los niveles de expresión de $p75^{NTR}$ en individuos adultos [88], [89]. Por otra parte, muestras de tejido de médula

espinal *postmortem* de pacientes con ELA, revelan altos niveles de expresión de $p75^{NTR}$ en motoneuronas y células de Schwann [90], [91], [92].

La gran cantidad de factores tróficos que pueden actuar sobre una motoneurona sugiere el alto grado de complejidad que existe entre los mecanismos de señalización desencadenados, además del solapamiento entre vías de señalización cooperativas y competitivas que balancean la respuesta neuronal. Adicionalmente, algunas de estas moléculas involucradas en la señalización de los factores neurotróficos varían su expresión a lo largo del desarrollo del individuo, indicando la importancia de la regulación espacio-temporal de su expresión.

Publicaciones

- Ferrero Restelli F, **Federicci F**, Ledda F and Paratcha G (2023) Sprouty4 at the crossroads of Trk neurotrophin receptor signaling suppression by glucocorticoids. *Front. Mol. Neurosci.* 16:1090824. doi: 10.3389/fnmol.2023.1090824

-**Federicci F**, Ledda F and Paratcha G (2024) TDAG51 regulates GDNF-induced survival signaling by inhibiting RET-mediated AKT activity in motor neuron-derived cells. **Enviado a publicación**

Abreviaturas

ARTN: Artemin, Artemina

BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor, Factor de crecimiento derivado del cerebro

CDNF: Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor, Factor neurotrófico dopaminérgico cerebral

CNTF: Ciliary neurotrophic factor, factor neurotrófico ciliar

DEX: Dexametasona

EGF: Epidermal Growth Factor; Factor de Crecimiento Epidermal

ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica. ALS por su sigla en inglés

Erk: Extracellular Signal Regulated Kinase, kinasa reguladora de la señal extracelular

GDNF: Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor, Factor de crecimiento derivado de las células de la glía

GFP: Green Fluorescent Protein, Proteína fluorescente verde

GFRα: GDNF family receptor alpha; Receptor de la familia de GDNF alfa

GC: Glucocorticoides

GR: Glucocorticoid receptor; Receptor de glucocorticoides

GPI: Glycosylphosphatidylinositol

HGF: Hepatocyte growth factor; Factor de crecimiento de hepatocitos

IGF: Insuline-like Growth Factor, Factor de crecimiento similar a insulina

JNK: Jun Kinasa

MANF: Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor

MAPK: Mitogen activated protein kinase, proteína kinasa activada por mitógenos

MN: Motor neuron; motoneurona

NRTN: Neurutin, Neuturina

NCAM: Neural Cell Adhesion Molecule, Molécula de adhesión de células neurales

NGF: Nerve Growth Factor, Factor de crecimiento nervioso

NT3: Neurotrophin 3, Neurotrofina 3

NT4: Neurotrophin 4, Neurotrofina 4

PCD: Programmed Cell Death; Muerte celular programada

PHLDA: Pleckstrin homology-like domain family A

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase, fosfoinositol 3 Kinasa

PIP: Fosfatidilinositol fosfato

PLCɣ: Phospholipase C-gamma; Fosfolipasa C-gamma

PSPN: Persephin, Persefina

P75NTR: Low-Affinity p75 Neurotrophin Receptor, Receptor de baja afinidad de neurotrofinas

Ras: Rat Sarcoma

RET: Rearranged during Transfection proto-oncogene

RTK: Receptor tyrosine kinase, receptor tirosina kinasa

Src: Sarcoma, (c-Src: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src)

Spry: Sprouty

TDAG51: T-cell Death Associated Gene 51

TrkA: Tropomyosin receptor kinase A, receptor kinasa A de tropomiosina

TrkB: Tropomysin receptor kinase B, receptor kinasa B de tropomiosina

TrkC: Tropomysin receptor kinase C, receptor kinasa C de tropomiosina

VEGF: Vascular endotelial-derived growth factor; factor de crecimiento vascular derivado del endotelio

CAPITULO I

Sprouty4 como un mediador endógeno del efecto supresor de los glucocorticoides sobre la señalización y función de las neurotrofinas

RESUMEN DEL CAPÍTULO

Los glucocorticoides (GC) son un grupo de hormonas de la familia de los esteroides que coordinan diversos procesos fisiológicos en respuesta a situaciones de estrés. En el sistema nervioso, los GC pueden afectar el desarrollo, la función y la plasticidad del sistema nervioso al inhibir la señalización por neurotrofinas. En particular, el tratamiento con el glucocorticoide sintético dexametasona (DEX) restringe el crecimiento neurítico inducido por neurotrofinas al inhibir la activación de la vía de Ras-Erk1/2 dependiente de Trk. Sin embargo, el mecanismo molecular a través del cual la DEX produce esta inhibición no ha sido esclarecido aún. En este capítulo demostramos que la DEX promueve la transcripción de Sprouty4, una proteína que regula negativamente la señalización de Ras-Erk1/2 activada por NGF en células PC12. Observamos que tanto la disminución de Sprouty4 como la sobreexpresión de un dominante negativo de Sprouty4 (Y53A) rescatan el efecto inhibitorio de DEX sobre la señalización y el efecto biológico de NGF. Asimismo, el tratamiento de las neuronas del hipocampo con DEX induce la expresión de Sprouty4 y la disminución de su expresión anula el efecto inhibidor de DEX sobre la formación de neuritas primarias, la ramificación dendrítica y la activación de Erk1/2 inducida por BDNF. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la inducción del ARNm de *Sprouty4* por DEX se traduce en una inhibición significativa de la vía de señalización de Trk a Erk1/2. En conjunto, estos hallazgos aportan nuevos conocimientos sobre los mecanismos de señalización cruzada (signaling crosstalk) entre DEX y neurotrofinas y demuestran que Sprouty4 media los efectos inhibidores de DEX sobre la función de neurotrofinas.

INTRODUCCIÓN

Tanto la unión de las neurotrofinas a sus receptores tirosina kinasa Trk, como la unión de los glucocorticoides (GC) a sus receptores intracelulares, desencadenan diversas respuestas a nivel molecular y celular que afectan el desarrollo, la estructura y el funcionamiento del sistema nervioso [93], [94]

Las neurotrofinas constituyen un grupo de factores neurotróficos relacionados tanto estructural como funcionalmente. La familia de las neurotrofinas se encuentra conformada por 4 miembros: el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF), el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF), la Neurotrofina3 (NT3) y la Neurotrofina4 (NT4). Ellas promueven la diferenciación y la sobrevida de poblaciones específicas de neuronas del sistema nervioso al actuar sobre sus receptores específicos de membrana de tipo tirosina kinasas Trk [5], [35]. Disrupciones de la señalización de las neurotrofinas se han relacionado con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, alteraciones comportamentales y fallas en la memoria dependiente del hipocampo [7], [95].

Una vez activados, los receptores Trk desencadenan la activación de vías de señalización intracelular como Ras/MAPK, PI3K-AKT, PLCɣ y vías reguladas por la familia de proteínas Rho. Al mismo tiempo los receptores Trk activan vías de señalización regulatorias negativas que modulan la intensidad y la duración de la señal trófica [7].

Los glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores) son hormonas derivadas de colesterol y secretadas por la zona fasciculada de la glándula adrenal. La síntesis y secreción de esta hormona se encuentra regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.

Desde la mitad del siglo XX los glucocorticoides han ido cobrando mayor relevancia en el campo de la clínica, por su capacidad de suprimir la respuesta inmune. La dexametasona (DEX), un análogo sintético de GC, y otros compuestos sintéticos, son usados comúnmente en clínica para reducir el rechazo inmunológico en el trasplante de órganos o para reducir la expansión del daño neural luego de una lesión. Sin embargo, dado que el receptor de glucocorticoides (GR) se encuentra expresado de manera ubicua en todo el organismo, los efectos adversos derivados de la exposición a DEX son diversos. A lo largo de las últimas décadas han surgido evidencias de un diálogo entre las vías de señalización de Trk y del receptor de GC, desde la modulación de los niveles de los

receptores a la inducción de proteínas reguladoras que funcionan a distintos niveles de la cascada de señalización [96], [97], [98].

Los GC se encuentran relacionados con la respuesta al estrés y regulan la expresión de genes que aseguran el mantenimiento de la homeostasis y la posibilidad de sobrellevarlo [68]. No obstante, la exposición prolongada a los glucocorticoides puede producir efectos adversos en el desarrollo del cerebro, afectando la conectividad neuronal de diversas regiones cerebrales, lo que puede aumentar la susceptibilidad al desarrollo de desórdenes cognitivos y/o trastornos psiquiátricos [69], [93], [99], [100], [101].

En distintos tipos celulares, se ha encontrado evidencia de los efectos antagónicos de los glucocorticoides y los factores neurotróficos. Los GC interfieren el crecimiento dendrítico, la maduración y el correcto funcionamiento de neuronas hipocampales y corticales inducido por BDNF al afectar la señalización de la vía de MAPK [66], [67], [102]. En astrocitos, la estimulación con glucocorticoides tiene una respuesta bifásica, caracterizada por un aumento en los niveles de ARNm de *Bdnf* y la respuesta de TrkB a tiempos cortos de estimulación. Sin embargo, en una exposición prolongada ocurren efectos opuestos, una disminución en la respuesta a BDNF por TrkB y una disminución en los niveles de ARNm de *Bdnf*. Se ha demostrado que la activación del receptor de glucocorticoides (GR) restringe el crecimiento neurítico inducido por NGF, al inhibir la activación de las vías PI3K-AKT y Ras-Erk1/2 [72].

Existen evidencias que indican que la exposición a DEX induce la expresión de distintas moléculas que regulan negativamente la señalización de factores tróficos, como Sprouty4, Mig6 y DUSP1 [97]. En particular, la familia de proteínas Sprouty ha surgido como un grupo de proteínas reguladoras de la señalización de diversos factores tróficos [103]. En mamíferos, esta familia de proteínas se encuentra representado por 4 miembros: Sprouty 1-4 (Spry1, Spry2, Spry3 y Spry4). Factores tróficos como el EGF son capaces de inducir la expresión y promover la fosforilación (activación) de las proteínas Spry [97], [103].

Si bien se ha determinado que las proteínas Spry son capaces de inhibir la vía de señalización Ras-MAPK de una variedad de factores como BDNF, GDNF o FGF [104], [105], también se ha reportado que Spry2 potencia los efectos biológicos inducidos por EGF [106], [107]. Esto sugiere que las proteínas Spry podrían tener un rol como

moduladores tanto negativos como positivos de la señalización de los receptores tirosina kinasas (RTKs).

Sprouty4 (Spry4) es una proteína reguladora capaz de inhibir la señalización de Erk/MAPK y la diferenciación neuronal, tanto en células PC12 como en neuronas sensoriales primarias, en respuesta a NGF. Además, la activación de TrkA por NGF induce la expresión de Sprouty4, lo que demuestra su función como un retroregulador negativo de la señalización NGF-TrkA [108].

El estrés crónico es una de las causas más importantes de depresión y los animales expuestos a la administración crónica de GC exhiben mayor ansiedad y comportamientos depresivos [109], [110]. Diversos estudios han relacionado una alteración de la señalización de BDNF/TrkB y de la vía MAPK/Erk1/2 con la patogénesis y el tratamiento de la depresión [111], [112], [113], [114], [115]. Por ejemplo, animales expuestos a la administración crónica de glucocorticoides presentan una disminución en los niveles de activación de la vía MAPK/CREB en regiones del cerebro implicadas en depresión y estrés crónico, como la corteza prefrontal y el hipocampo [116].

Varios estudios han asociado la señalización de BDNF/TrkB con la depresión y la acción de los fármacos antidepresivos [111], [117]. Estos compuestos normalizan la vía BDNF-MAPK-CREB en el hipocampo y, por lo tanto, atenúan los síntomas depresivos [111], [118], [119]. Aunque la vía BDNF-MAPK-CREB juega un papel clave en la fisiopatología y el tratamiento de la depresión, los mecanismos moleculares a través de los cuales los GC inducen cambios en esta cascada de señalización no se conocen aún. Interesantemente, miembros de la familia Sprouty, como Spry2 y Spry4, han sido observados en neuronas hipocampales, y la disminución de estas moléculas promueve el crecimiento axonal en neuronas hipocampales en cultivo [120].

En vista de todas estas evidencias, en el presente capítulo de tesis doctoral decidimos investigar el papel desempeñado por el retroregulador negativo de la vía MAPK/Erk1/2, Sprouty4, en el mecanismo de señalización cruzada entre DEX y neurotrofinas.

RESULTADOS

Dexametasona induce la expresión del ARNm de *Sprouty4*

La Dexametasona (DEX) es un glucocorticoide sintético ampliamente utilizado en clínica al generar una respuesta de mayor intensidad que los glucocorticoides no sintéticos. Por su estructura química es prácticamente invulnerable a la inactivación por 11β-HSD2, la enzima encargada de convertir cortisol (forma activa) a cortisona (forma inactiva). Esta capacidad de evitar mecanismos de inactivación, a diferencia de los que ocurre con los glucocorticoides naturales [121] aumenta su biodisponibilidad y, por lo tanto, su capacidad de activar al receptor de glucocorticoides (GR).

DEX es un potente inhibidor de los efectos biológicos y las vías de señalización desencadenadas por algunos factores de crecimiento y neurotrofinas [65], [67], [72], [97], [102], [122]. Si bien no se conoce exactamente el mecanismo a través del cual los GC inhiben estos efectos, se ha reportado que DEX promueve la expresión de diferentes reguladores negativos de la vía Ras-MAPK/Erk1/2 [97], [123].

Dado que Sprouty4 ha sido identificado como un gen inducido por NGF que a través de un mecanismo de retroalimentación negativa (*negative feedback loop*) inhibe la activación de Erk1/2 mediada por TrkA [108]. Decidimos evaluar si el efecto inhibitorio que produce DEX sobre la señalización de los factores neurotróficos podría involucrar a esta molécula. Para esto, utilizamos la línea neuronal PC12, la cual representa un modelo celular robusto para estudiar la función de NGF, debido a que estas células expresan los receptores de NGF, $p75^{NTR}$ y TrkA, y en respuesta al tratamiento con esta neurotrofina se diferencian a un tipo neuronal que se asemeja a una neurona simpática [124].

En principio, exploramos si el tratamiento con DEX podía inducir la expresión del ARN mensajero de *Sprouty4* en células PC12. Para ello realizamos ensayos de RT-PCR semicuantitativa, en los cuales evaluamos los niveles de ARNm de *Sprouty4* en respuesta al tratamiento con DEX o NGF **(Fig. 5)**.

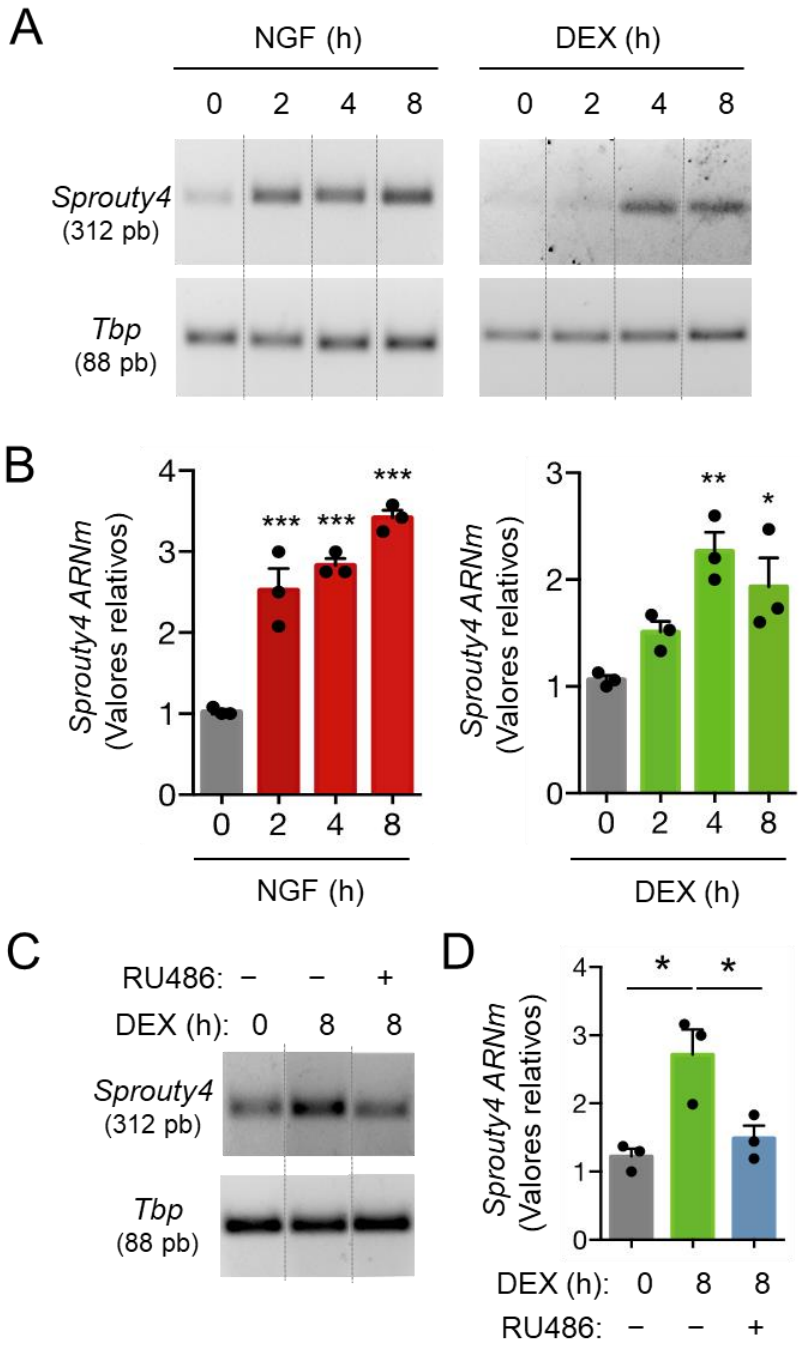

Figura 5 **La dexametasona promueve la expresión del ARN mensajero de *Sprouty4, un* retroregulador negativo de la vía TrkA/Ras-Erk1/2 inducida por NGF.**

(A) Análisis de ARNm *de Sprouty4* por RT-PCR semicuantitativa. Células PC12 fueron tratadas con DEX (1µM) o NGF (50ng/ml) por diferentes tiempos. Para cada molécula, el producto de amplificación de PCR es indicado en pares de bases (pb).

(B) Gráfico de barras representando los perfiles de inducción del ARNm de *Sprouty4* a diferentes tiempos luego de la estimulación con DEX o NGF. Los niveles de ARNm fueron normalizados a los niveles de expresión del gen housekeeping *Tbp*. Los valores

están relativizados al grupo control sin tratamiento (t=0h DEX o NGF). Los resultados son mostrados como la media ± sem de n=3 ensayos independientes. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 por ANOVA de una vía seguido de test de Dunnett.

(C) Análisis de RT-PCR semicuantitativa de ARNm de *Sprouty4*. Para este ensayo, células PC12 fueron pretratadas o no con el inhibidor del receptor de glucocorticoides RU486 (2 μM) y luego estimuladas por 8h con DEX (1μM).

(D) Gráfico de barras mostrando el bloqueo de la inducción de la expresión del ARNm de *Sprouty4* por DEX al pretratar con el antagonista del receptor de GC RU486. Los niveles de ARNm fueron normalizados a los niveles de expresión de *Tbp*. Los valores están relativizados al grupo control sin tratamiento (t=0h DEX, barra gris). *p<0.05 por ANOVA de una vía seguido de comparación múltiples por test de Tukey.

De acuerdo con resultados previos, observamos que NGF indujo un aumento significativo de los niveles de expresión del ARNm de *Sprouty4*. El tratamiento de las células PC12 con DEX también promovió un aumento significativo de aproximadamente 2 veces en la expresión de esta molécula, el cual se extiende por al menos 8 h posteriores a la estimulación **(Fig. 5B)**. La inducción de *Sprouty4* por DEX y NGF sugiere que Sprouty4 podría estar mediando la señalización cruzada entre GC y NGF. También confirmamos que la inducción por DEX de los niveles de mensajero de *Sprouty4* ocurre a través del receptor de glucocorticoides (GR), ya que el pretratamiento con el antagonista del receptor de GC, RU486, inhibió la inducción de *Sprouty4* en respuesta a DEX **(Fig.5C y 5D).**

Sprouty4 media el efecto inhibitorio de los glucocorticoides sobre la activación de la vía de Erk1/2 inducida por NGF/TrkA

Teniendo en cuenta que la DEX ha sido descripta previamente como un inhibidor de los efectos biológicos de las neurotrofinas y considerando que Sprouty4 es inducido por DEX, planteamos un mecanismos de señalización cruzada (crosstalk) a través del cual el pretratamiento con DEX resulta en un incremento en los niveles de Sprouty4, que inhibiría la vía de señalización inducida NGF/TrkA.

Para determinar si la inducción de Sprouty4 por DEX podría ser responsable de los efectos inhibitorios de DEX en la señalización de neurotrofinas, evaluamos el efecto de la DEX sobre la activación de la vía MAPK/Erk por NGF en células PC12.

En primera instancia confirmamos que, al igual que observamos a nivel de mensajero, también se produjo un incremento significativo en los niveles de expresión de la proteína Sprouty4 luego de 16 horas de estimulación con DEX (**Figura 6**).

Con el objeto de determinar si Sprouty inducido por DEX podría inhibir las vías de señalización de NGF, células PC12 fueron transfectadas con un plásmido de interferencia de Sprouty4 [108] (shRNA-*Sprouty4*-GFP) o shRNA-control-GFP. Una vez transfectadas, las células fueron pretratadas con DEX por 16h, luego estimuladas con NGF durante 15 minutos para determinar la fosforilación de Erk1/2 por inmunofluorescencia (IF) (**Fig. 7A**).

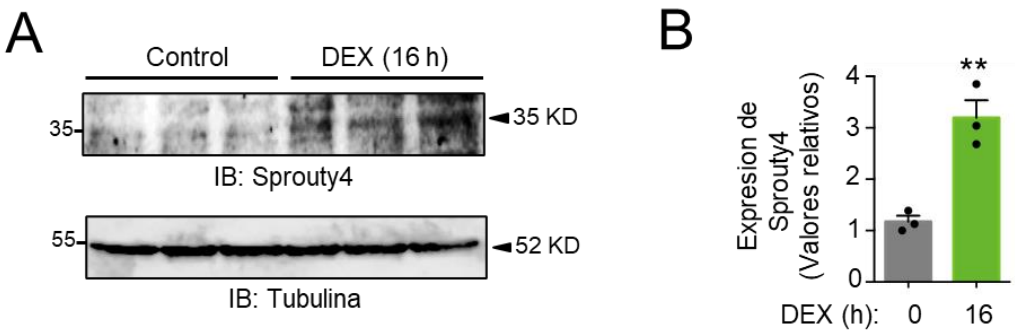

Figura 6. **Inducción de la expresión de Sporuty4 por DEX**

(A) Inmunoblot mostrando el incremento en los niveles de proteína Sprouty4 luego de 16h de tratamiento con DEX

(B) Cuantificación de los niveles de expresión de Sprouty4 en células control y tratadas con DEX por 16h. Los valores son expresados relativos a la condición control sin tratamiento. Las barras representan la media ± sem de n=3 muestras independientes. **p<0.01 por Student's t test.

La activación de MAPK/Erk1/2 fue determinada utilizando un anticuerpo fosfoespecífico para Erk1/2 activo (Thr202/Tyr204). Encontramos que mientras que en las células transfectadas con shRNA-control-GFP el pretratamiento con DEX por 16h inhibió la activación de Erk1/2 mediada por NGF, la disminución de Sprotuy4 bloqueó el efecto inhibitorio de la DEX (**Fig. 7B y 7C**).

La eficiencia del plásmido de interferencia utilizado fue analizada por inmunoblot. Este ensayo control fue realizado utilizando células MN1 que fueron cotransfectadas con un plásmido shRNA-control-GFP o shRNA-*Sprouty4*-GFP, junto con un plásmido de

sobreexpresión de Sprouty4 etiquetado con Myc (Sprouty4-Myc). Luego, se obtuvieron los extractos de las células y se realizó un inmublot contra el epitope myc. En estos ensayos se observó una disminución sustancial de la expresión ectópica del plásmido de sobreexpresión en las células MN1 transfectadas con shRNA-*Sprouty4* (**Fig. 7D**), lo que validó nuestro método para reducir los niveles de proteína Sprouty4. Además, al trabajar con transfecciones transientes, la expresión de la proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*, proteína fluorescente verde) nos permitió individualizar las células en las cuales se encontraba expresándose nuestro shRNA de interés.

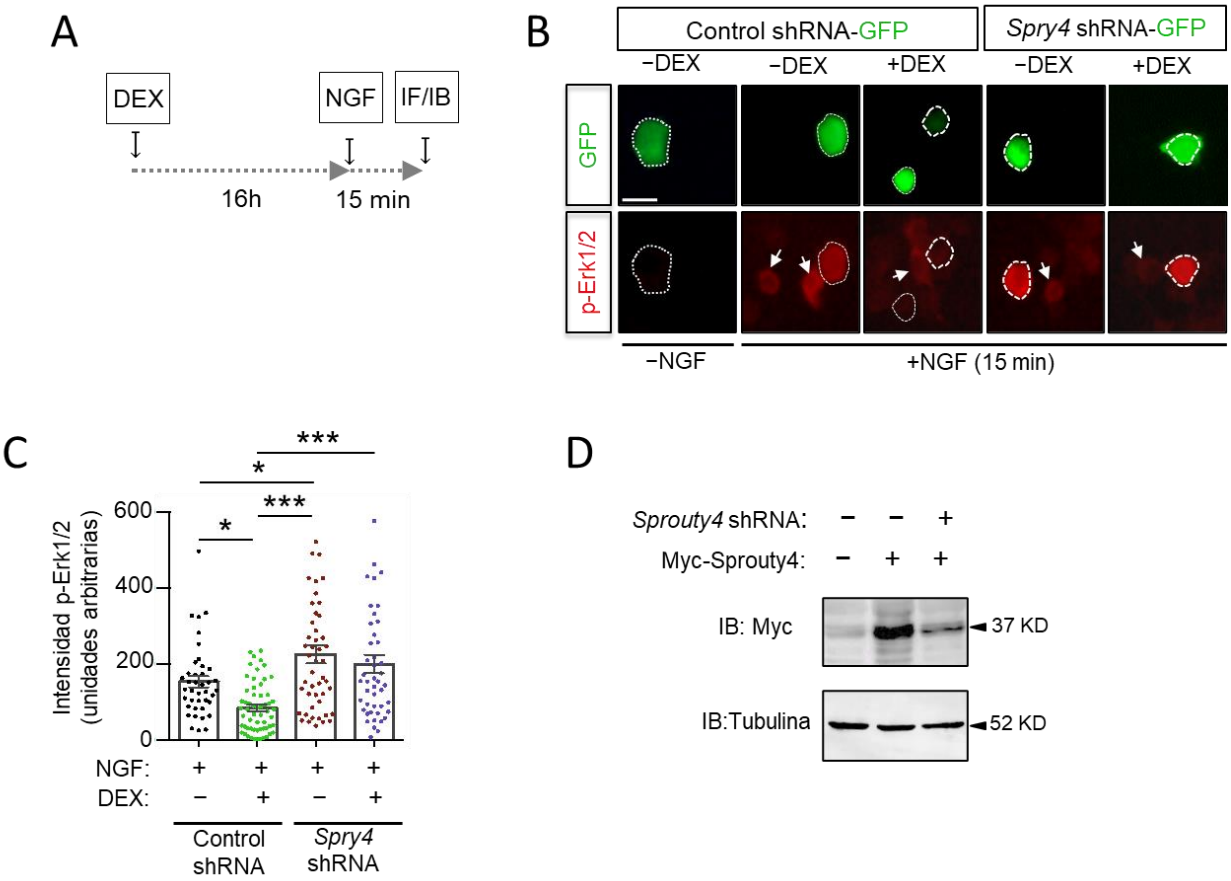

Figura 7. **Sprouty4 media el efecto inhibitorio de la DEX sobre la señalización de Erk1/2 inducida por NGF.**

(A) Representación del esquema experimental usado para medir la fosforilación de Erk1/2 en respuesta a DEX y NGF.

(B) Fotos representativas mostrando células PC12 transfectadas con plásmidos shRNA-control-GFP o shRNA-*Sprouty4*-GFP. Las células fueron pretratadas o no con DEX (1µM) por 16h, luego estimuladas 15 minutos con NGF (50ng/ml) y finalmente

fijadas con PFA 4%. La activación de Erk1/2 fue evaluada por inmunofluorescencia de fosfo- Erk1/2 (p-Erk1/2) en las células GFP positivas. Las flechas indican células vecinas no transfectadas. Barra de escala 15 μm

(C) Gráfico de los valores individuales de p-Erk1/2 expresados en unidades arbitrarias. Fueron evaluadas entre 40 y 60 células/condición experimental. Se expresa la media ± sem de n=3 experimentos independientes. *p<0.05, ***p<0.001 por ANOVA de una vía seguido de comparaciones múltiples por test de Tukey

(D) Los niveles de proteína Sprouty4 fueron analizados por inmunoblot (IB) en células MN1 transfectadas con shRNA-control o shRNA-*Sprouty4* junto a Sprouty4 etiquetado con la proteína Myc. Tubulina se muestra como control de carga

Para confirmar el resultado obtenido por knockdown de *Sprouty4*, realizamos un ensayo adicional utilizando una mutante de esta molécula en la cual un residuo conservado de tirosina fue reemplazado por alanina (Sprouty4-Y53A). Esta mutación resulta en un "dominante negativo" de Sprouty4 que potencia la activación de Erk1/2 dependiente de factores tróficos [125]. Para este ensayo, las células PC12 fueron transfectadas con el plásmido de expresión de la mutante Sprouty-Y53A o con un plásmido control, luego pretratadas o no con DEX y finalmente estimuladas con NGF siguiendo el mismo diseño experimental que en la Fig. 6A. En este caso, la activación de Erk1/2 fue evaluada por inmunoblot (IB), utilizando el mismo anticuerpo fosfoespecífico para Erk1/2 (p-Erk1/2) activo que usamos previamente (**Fig. 8**).

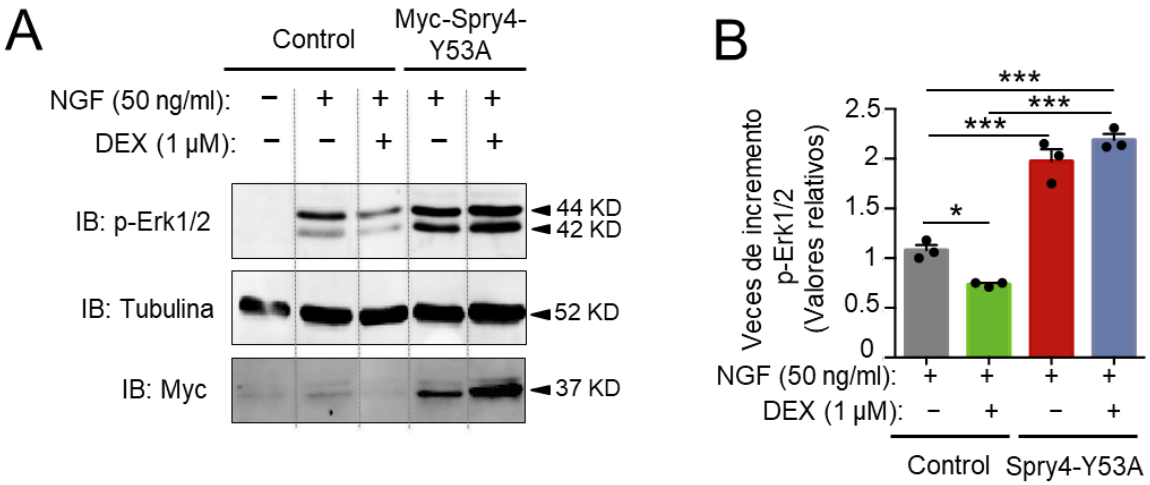

Figura 8. **Efecto del dominante negativo Sprouty4-Y53A sobre la activación de Erk1/2 por NGF y NGF más DEX**

A) IB representativos mostrando la activación de Erk1/2 (p-Erk1/2) en extractos de células PC12 transfectadas con plásmido control o Myc-Sprouty4-Y54A. Las células fueron pretratadas o no con DEX (1μM) por 16h y luego estimuladas por 15 minutos con NGF (50ng/ml).

B) Cuantificación de las veces de activación de Erk1/2 relativo a las células control tratadas únicamente con NGF por 15 minutos (barra gris). Se expresa la media ± SD de n=3 ensayos independientes. *p<0.05, ***p<0.001 por ANOVA de una vía seguido de test de Tukey

Los resultados de estos experimentos demuestran que el pretratamiento con DEX inhibe significativamente la activación de Erk1/2 inducida por NGF en células control, pero falla para hacerlo en células PC12 transfectadas con el dominante negativo (Sprouty-Y53A) de Sprouty4 (**Fig. 8**). Así, en conjunto, estos resultados demuestran que Sprouty4 media el efecto supresor de DEX sobre la inducción de la vía de MAPK/Erk1/2 disparada por NGF/TrkA.

Para confirmar que el mecanismo a través del cual DEX suprime la señalización de NGF no implica la regulación de los niveles de los receptores, TrkA y $p75^{NTR}$, evaluamos los niveles de expresión del ARNm de *TrkA* y los niveles de proteína $p75^{NTR}$ en células PC12 tratadas con DEX por 16h. No se observaron variaciones en los niveles de expresión de ninguno de los receptores indicando que DEX no actúa a ese nivel (**Fig. 9**).

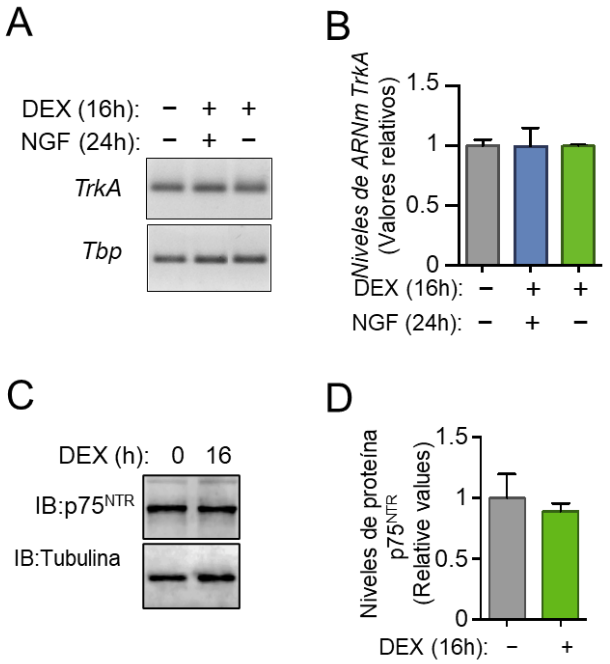

Figura 9 **El tratamiento de células PC12 con DEX no afecta los niveles de ARNm de *TrkA* ni los niveles proteicos de p75^{NTR}**

A) RT-PCR representativa de los niveles de ARNm de *TrkA* en células PC12 control, tratadas con DEX o tratadas con DEX y NGF en los tiempos indicados.

B) Gráfico de la cuantificación de los niveles de ARNm de *TrkA*. Los valores fueron normalizados a la expresión de *Tbp* y expresados como veces de cambio respecto a la condición control sin tratamiento.

C) IB representativos mostrando los niveles de proteína p75^{NTR} en extractos de células PC12 tratadas o no con DEX por 16h. Tubulina se muestra como control de carga.

D) Gráfico mostrando los niveles relativos de p75^{NTR} en extractos de células PC12 tratadas o no con DEX por 16h.

Sprouty4 media el efecto inhibitorio de los GC sobre el crecimiento neurítico inducido por NGF

Luego, exploramos las consecuencias biológicas de la interconexión entre la vía activada por glucocorticoides y el receptor TrkA. Teniendo en cuenta que el pretratamiento con glucocorticoides inhibe el crecimiento neurítico inducido por NGF en células PC12 [72], decidimos analizar si la disminución de los niveles de proteína Sprouty4 reduce el efecto inhibitorio de los GC sobre la función biológica de NGF. Para ello, transfectamos células PC12 con plásmido shRNA-*Sprouty4*-GFP o shRNA-control-GFP y evaluamos la capacidad del pretratamiento con DEX de bloquear el crecimiento

neurítico inducido por NGF. Las células PC12 fueron pretratadas o no con DEX y luego estimuladas con NGF a fin de inducir la diferenciación. Luego se realizó la fijación con 4% PFA y se analizó la diferenciación morfológica por microscopia (**Fig. 10**).

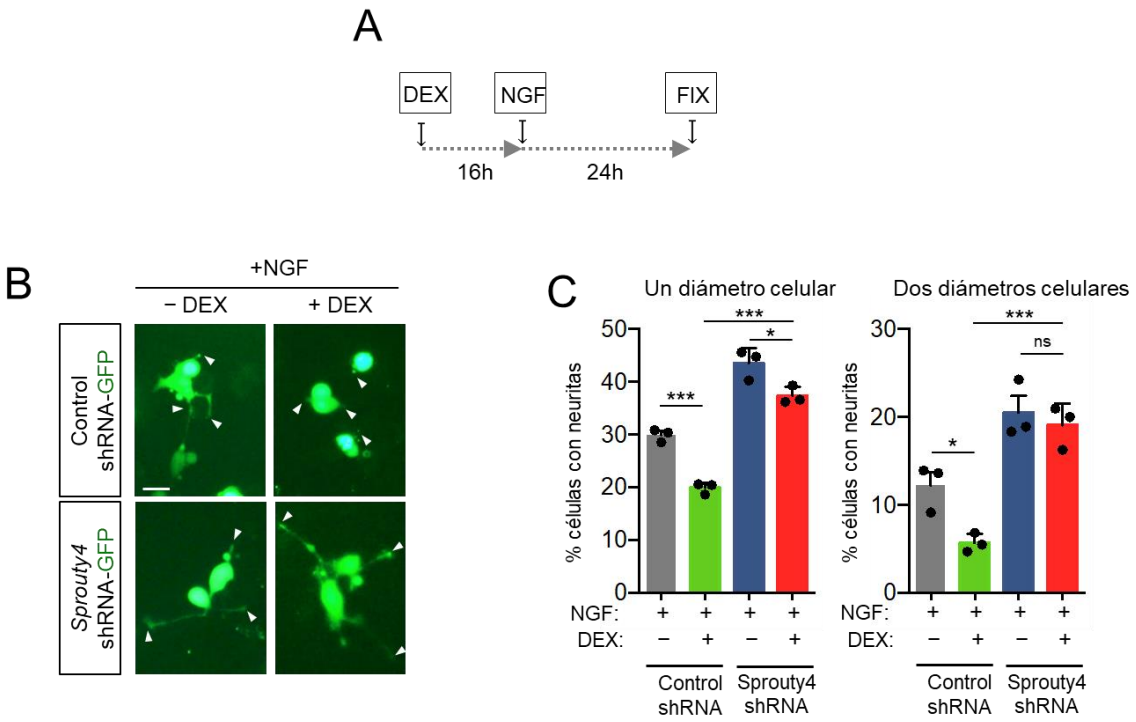

Figura 10. **Efecto de GC sobre el crecimiento neurítico inducido por NGF en células PC12 expresando un vector shRNA-*Control*-GFP o shRNA-*Sprouty4*-GFP.**

A) Esquema del diseño experimental del tratamiento con DEX y NGF para crecimiento neuritico en células PC12.

B) Fotos representativas de células PC12 transfectadas con shRNA-control-GFP o shRNA-*Sprouty4*-GFP que fueron pretratadas o no con DEX (1µM) y estimuladas por 24h con NGF (50ng/ml). Las cabezas de flecha indican las puntas neuríticas. Barra de escala 20µm.

C) El gráfico muestra el crecimiento neurítico de células PC12 transfectadas con shRNA-control o shRNA-*Sprouty4* y que fueron pretratadas o no con DEX y posteriormente estimuladas por 24h con NGF. Cuantificación del porcentaje de células GFP positivas que presentan neuritas más largas que uno o dos diámetros de los cuerpos celulares. Por cada condición experimental se cuantificaron 120 imágenes con aproximadamente 15 a 20 células por fotografía. Se muestra la media ± SD de n=3 experimentos independientes. *p<0.05, ***p<0.001 por ANOVA de una vía seguido de test de Tukey. ns, no significativo

Mientras que en células control pretratadas con DEX se observó una atenuación del crecimiento neurítico promovido por NGF, el *knockdown* de *Sprouty4* redujo sustancialmente este efecto inhibitorio de DEX, no observándose diferencias significativas al analizar las células con procesos de longitud mayor a dos diámetros celulares **(Fig.10).**

De igual manera, la sobreexpresión del dominante negativo de Sprouty4 (Y53A) rescató el efecto inhibitorio de DEX sobre el crecimiento neurítico inducido por NGF (**Fig. 11**).

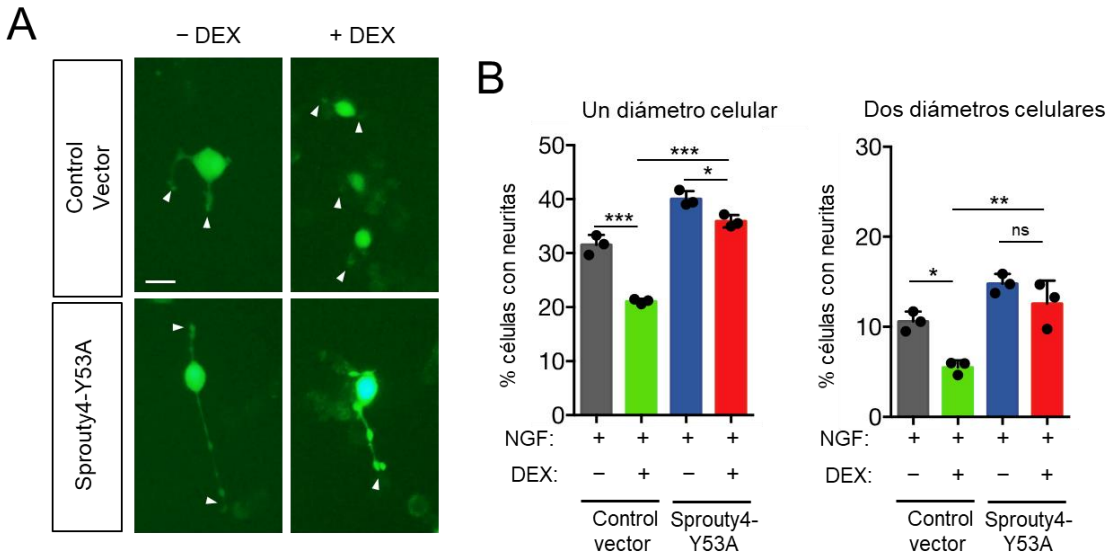

Figura 11. **Efecto de GC sobre el crecimiento neurítico inducido por NGF en células PC12 expresando un dominante negativo de Sprouty4 (Sprouty4-Y53A).**

A) Fotos representativas de células PC12 transfectadas con plásmido control o Sprouty4-Y53A junto a un vector de expresión GFP pretratadas o no con DEX (1µM) y luego estimuladas por 24h con NGF (50ng/ml). Las cabezas de flecha indican las puntas neuríticas. Barra de escala 20 µm.

B) Gráfico representando el crecimiento neurítico de células PC12 transfectadas con plásmido control o Sprouty4-Y53A junto a vector de expresión GFP y pretratadas o no con DEX (1µM) y luego estimuladas por 24h con NGF (50ng/ml). Se cuantifica el porcentaje de células GFP positivas que poseen procesos neuríticos mayores a uno o dos diámetros de cuerpos celulares. Por cada condición experimental se cuantificaron 120 imágenes con aproximadamente 15 a 20 células por fotografía. Se muestra la media ± SD de un n=3 experimentos independientes. *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 por ANOVA seguido por test de Tukey. ns, no significativo

En conjunto, estas observaciones indican que bloquear la función de Sprouty4 no sólo limita significativamente la habilidad de DEX de inhibir la señalización TrkA-Erk1/2, sino que también restringe el efecto inhibitorio de los GC sobre el crecimiento neurítico inducidos por NGF.

El Knockdown de *Sporuty4* suprime los efectos inhibitorios de DEX sobre la fosforilación de Erk1/2 y la diferenciación morfológica inducidas por BDNF en neuronas hipocampales.

Teniendo en cuenta trabajos previos que indican (i) que el pretratamiento con DEX previene el aumento inducido por BDNF del número de dendritas primarias y la maduración sináptica de neuronas hipocampales al afectar la actividad de la vía Erk1/2 [67], y (ii) dado que Sprouty2 y Sprouty4 se expresan en neuronas hipocampales durante el desarrollo y que su disminución promueve el crecimiento dendrítico [104], [120], decidimos explorar si las proteínas Sprouty podrían desempeñar un rol en el control de DEX sobre las funciones de BDNF en cultivos primarios de neuronas hipocampales.

En primer lugar, examinamos si el tratamiento con DEX podía aumentar la expresión de Sprouty2 y Sprouty4 en neuronas hipocampales. Utilizando RT-PCR semicuantitativa evaluamos la expresión del ARNm de *Sprouty2* y *Sprouty4* a diferentes tiempos luego del tratamiento con DEX en cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata de día embrionario 17.5 (E 17.5). Encontramos que mientras la DEX produjo un incremento leve, pero significativo, de la expresión de *Sprouty2*, el mismo tratamiento indujo un aumento mayor y muy significativo de *Sprouty4*, que duró por lo menos hasta las 8 horas posteriores a la estimulación. (**Fig. 12**)

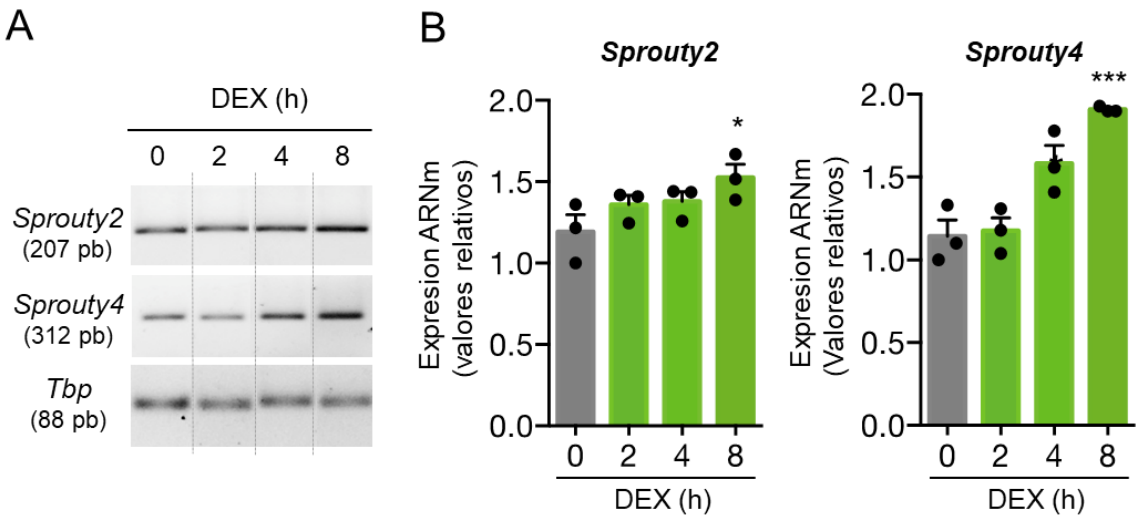

Figura 12. **DEX induce la expresión del ARNm de *Sprouty2* y *Sprouty4* en cultivo primario de neuronas hipocampales.**

A) Análisis semicuantitativo de RT-PCR de la expresión del ARNm de *Sprouty2* y *Sprouty4.* Los cultivos primarios de neuronas hipocampales fueron tratados con DEX (1μM) por diferentes tiempos. El producto de amplificación de PCR está indicado en pares de bases (pb).

B) Gráfico de barras representando los perfiles de inducción de ARNm de *Sprouty2* y *Sprouty4* luego de distintos tiempos de estimulación con DEX. Los niveles de ARNm fueron normalizados a los niveles de expresión de *Tbp*. Los valores están relativizados al grupo control no tratado (t=0h DEX, barra gris). Los resultados se expresan como media ± sem de n=3 ensayos independientes. *p<0.05, ***p<0.001 por ANOVA y luego test de Dunnett.

En base a estos resultados, decidimos explorar si Sprouty4 podía mediar el diálogo entre las vías de GR y BDNF/TrkB en neuronas hipocampales. Para ello, transfectamos cultivos primarios de neuronas hipocampales con shRNA-control-GFP o sh-*Sprouty4*-GFP y evaluamos la capacidad de DEX de bloquear los efectos biológicos promovidos por BDNF en estas neuronas, como por ejemplo la formación de neuritas primarias y la arborización proximal en respuesta a BDNF.

Mientras que el tratamiento con DEX produjo una reducción significativa tanto en la formación de dendritas primarias como en la arborización dendrítica, el shRNA de *Sprouty4* bloqueó el efecto inhibitorio de DEX sobre estos cambios morfológicos inducidos por BDNF **(Fig. 13).** Así, en conjunto, estos resultados muestran que Sprouty4

también media el efecto inhibitorio de DEX sobre la diferenciación morfológica inducida por BDNF en neuronas hipocampales.

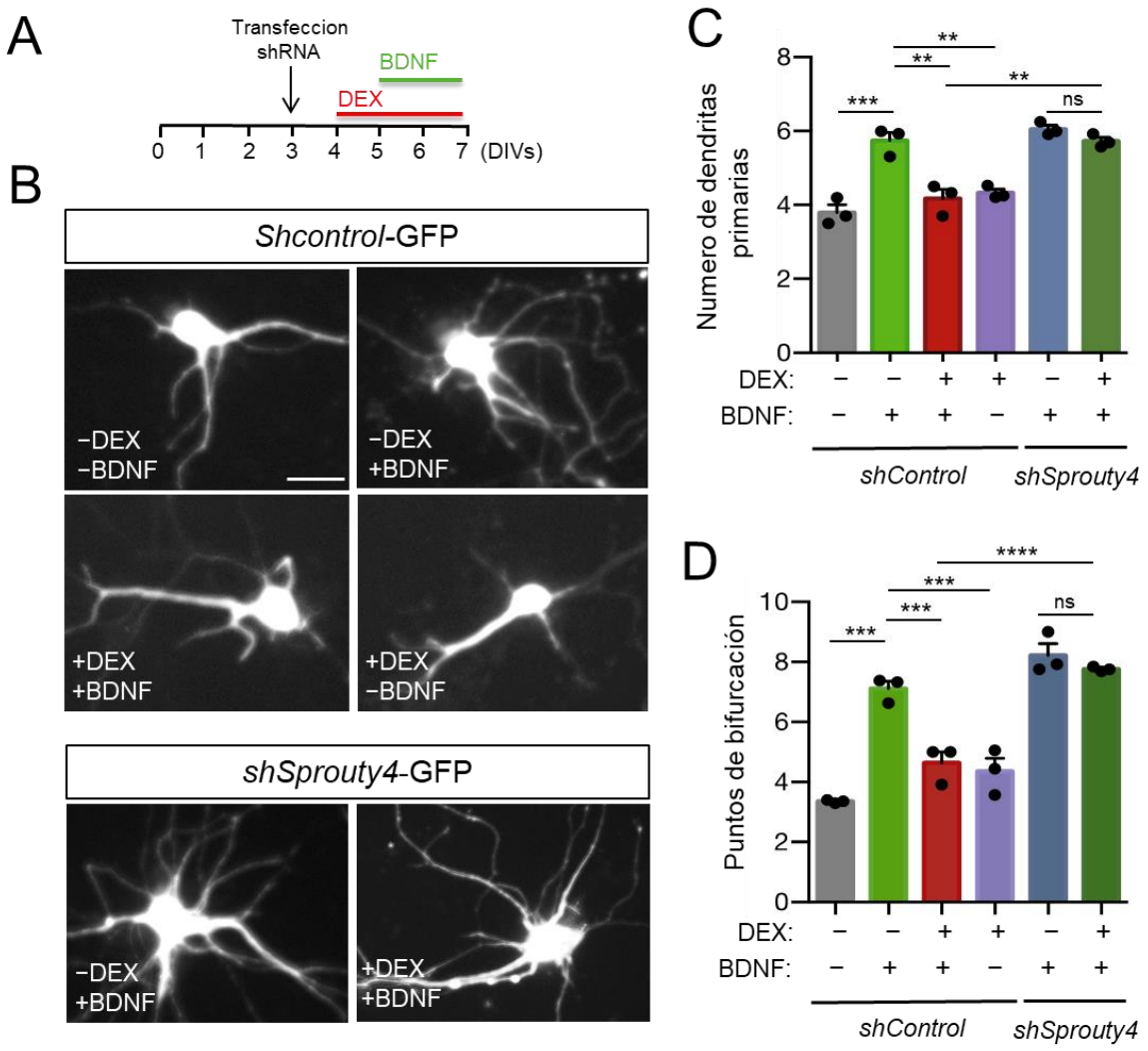

Figura 13. **Knockdown de *Sprouty4* bloquea el efecto inhibidor de DEX sobre la diferenciación morfológica inducida por BDNF en neuronas hipocampales.**

A) Esquema representativo del diseño experimental de neuronas transfectadas con shRNA control o *Sprouty4* tratadas con DEX y/o BDNF por los días in vitro (DIV) indicados.

B) Imágenes representativas de neuronas hipocampales de rata transfectadas con vector control o shRNA-*Sprouty4*, tratadas o no con DEX y/o BDNF como indicado en **(A)**. Barra de escala 20µm.

C) Cuantificación de dendritas primarias de neuronas hipocampales transfectadas con control o shRNA-*Sprouty4*-GFP tratadas con DEX y/o BDNF como fue indicado en **(A)**

D) Cuantificación de la ramificación dendrítica de neuronas hipocampales transfectadas con shRNA-control-GFP o shRNA-*Sprouty4*-GFP tratadas con DEX y/o BDNF como fue indicado en **(A)**. Un total de 36-45 neuronas fueron analizadas por condición

experimental. Los resultados se muestran como media ± sem de n=3 ensayos independientes **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 por ANOVA seguido de test de Tukey. ns, no significativos

Trabajos previos han demostrado que el aumento promovido por BDNF de la formación de dendritas primarias y la arborización dendrítica, ocurre vía la activación de MAPK/CREB [126]. Dado que Sprouty4 media el efecto inhibitorio de la DEX sobre la diferenciación morfológica inducida por BDNF en neuronas hipocampales en desarrollo, decidimos analizar si la disminución de Sprouty4 tiene consecuencias en el efecto inhibidor de GC sobre la inducción de Erk1/2 vía BDNF/TrkB. Para esto, neuronas hipocampales fueron transfectadas con plásmido control (shRNA-control-GFP) o shRNA-*Sprouty4*-GFP y pretratadas o no con DEX. Luego, las neuronas fueron estimuladas con BDNF y fijadas con 4% PFA (**Fig. 14**). Nuevamente, evaluamos la activación de Erk1/2 dependiente de BDNF en aquellas células que presentaban fluorescencia positiva para GFP por inmunofluorescencia, utilizando para ello un anticuerpo fosfoespecifico para Erk1/2 (pErk1/2) (Thr202/Tyr204). Interesantemente, mientras que en las neuronas control, el pretratamiento con DEX inhibió significativamente la fosforilación de Erk1/2, el knockdown de *Sprouty4* produjo una disminución significativa del efecto inhibitorio de DEX sobre la fosforilación de Erk1/2 inducida por BDNF (**Fig. 14B y 14C**). En conjunto, estos resultados demuestran que Sprouty4 también media el efecto inhibitorio de la DEX sobre la señalización y la función biológica de BDNF en neuronas hipocampales.

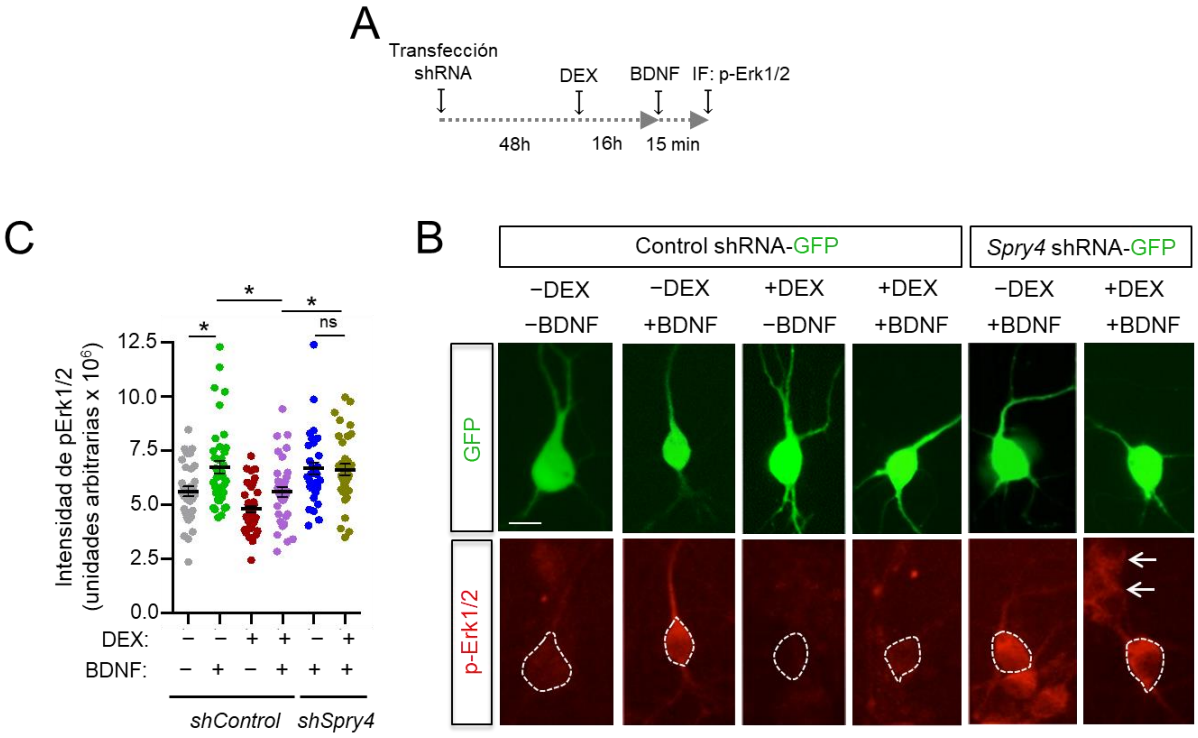

Figura 14. **Sprouty4 media el efecto inhibitorio de DEX sobre la activación de Erk1/2 dependiente de BDNF en neuronas hipocampales.**

A) Esquema del diseño experimental usado para medir la fosforilación de Erk1/2 (p-Erk1/2) en respuesta a DEX y BDNF. Neuronas hipocampales fueron transfectadas a DIV3 con plásmido shRNAcontrol-GFP o shRNA*Sprouty4*-GFP.

B) Fotos representativas mostrando neuronas hipocampales transfectadas con shRNA-control o shRNA-*Sprouty4*. Las neuronas fueron pretratadas o no con DEX por 16h, estimuladas por 15 minutos con BDNF (25ng/ml) y fijadas con PFA 4% conteniendo inhibidores de fosfatasas. La activación de Erk1/2 fue evaluada por inmunofluorescencia (IF) de p-Erk1/2 en las células GFP positivas. Las flechas indican células vecinas no transfectadas. Barra de escala, 20um.

C) Gráfico mostrando los valores individuales de p-Erk1/2 expresado en unidades arbitrarias. Un total de 33-43 neuronas individuales fueron analizadas por condición experimental. Se muestra la media ± sem de n=3 ensayos independientes. *p<0.05 por ANOVA seguido de test de Tukey.

DISCUSIÓN

Está ampliamente establecido que la exposición crónica a glucocorticoides (GC) ya sea por estrés crónico o tratamiento excesivo con GC o glucocorticoides sintéticos como la dexametasona (DEX) conlleva una alta gama de efectos adversos. En el contexto del sistema nervioso, la exposición crónica a GC, tanto en el desarrollo como en la edad adulta del individuo, puede desencadenar dificultades para el desarrollo y funcionamiento normal de las neuronas. Desde un punto de vista celular esto se manifiesta principalmente como una reducción del crecimiento neurítico, disminución de la arborización dendrítica y reducción de la neurogénesis hipocampal y la plasticidad sináptica [76], [93], [102], [127], [128], [129], [130]. Estos efectos sobre el sistema nervioso pueden llevar al surgimiento de enfermedades neurodegenerativas o trastornos en los procesos cognitivos o el comportamiento [131].

Es crucial destacar que el estrés representa un espectro amplio de señales que varían en intensidad y duración, y desencadenan distintos tipos de respuesta dependiendo de estas condiciones. En exposiciones cortas o leves a situaciones estresantes, se desencadenan procesos celulares y comportamentales que permiten al individuo hacer frente a la causa del estrés, como la potenciación de la memoria y la toma de decisiones a través de mecanismos de plasticidad sináptica. No obstante, en condiciones de estrés elevado, estos mismos mecanismos, u otros activados durante exposiciones prolongadas e intensas, pueden resultar en efectos perjudiciales. El estrés durante períodos perinatales puede tener consecuencias a largo plazo, transitorias o permanentes, afectando la estructura y la funcionalidad de los circuitos neuronales, la regulación de las emociones, las interacciones o comportamientos sociales, o la cognición [131].

Notablemente, la exposición sostenida a GC también interfiere con la función biológica disparada por neurotrofinas (NGF y BDNF) en el sistema nervioso central y periférico, por lo tanto, los efectos adversos de los GC en el desarrollo neuronal pueden deberse a una reducida actividad neurotrófica [94]. En relación a esto, se ha demostrado que los GC previenen el crecimiento dendrítico inducido por BDNF y la maduración sináptica en neuronas hipocampales y corticales, al reducir la señalización de MAPK/Erk1/2 [65], [66], [102]. Investigaciones del dialogo entre GC y las neurotrofinas provienen de estudios realizados en células PC12, que demuestran que DEX previene la señalización de NGF y el crecimiento neurítico mediado por TrkA [72]. A pesar de que

varios estudios han mostrado que el tratamiento con GC disrumpe la señalización y función de las neurotrofinas, un mejor entendimiento de los mediadores moleculares subyacentes a este efecto resulta necesario. En este capítulo de tesis, demostramos que el regulador negativo Sprouty4 media el efecto inhibidor del glucocorticoide sintético DEX sobre la acción de las neurotrofinas. En línea con lo reportado previamente por Lauriola y colaboradores[97], nuestros resultados demostraron que el pretratamiento con DEX induce la expresión de Sprouty4 (Spry4) a través de la activación del receptor de glucocorticoides (GR) (**Fig. 4**). Este aumento de Sprouty4 produce una reducción significativa sobre la activación de la vía Ras/Erk1/2 desencadenada por NGF en células PC12. En relación con esto, al interferir la expresión de Sprouty4 logramos atenuar significativamente el efecto inhibitorio de DEX sobre la fosforilación de Erk1/2 y la diferenciación celular promovida por NGF (**Fig. 6 y Fig. 10**). Además, nuestros ensayos utilizando una proteína mutante dominante negativo de Sprouty4 confirman adicionalmente estos resultados. (**Fig. 7 y Fig. 11**).

Respecto a la señalización de BDNF en cultivos de neuronas hipocampales, la estimulación con DEX promueve la expresión de Sprouty2 y Sprouty4. Similar a lo observado en el modelo de células PC12, el aumento de la expresión de Sprouty4 con DEX genera una reducción en la fosforilación de Erk1/2 mediada por BDNF/TrkB (**Fig. 14**). Al interferir la expresión de Sprouty4 en neuronas hipocampales, observamos un rescate en la fosforilación de Erk1/2 y una disminución en el efecto inhibitorio de la DEX sobre la formación y arborización dendrítica desencadenada por BDNF (**Fig. 13 y Fig. 14**).

En su conjunto todos estos resultados nos llevan a proponer un mecanismo de comunicación entre las vías de señalización de los glucocorticoides y las neurotrofinas a través de moléculas reguladoras en distintos contextos y tipos celulares (**Fig. 15**), y este diálogo resulta clave para el mantenimiento de la homeostasis celular ante diferentes estímulos.

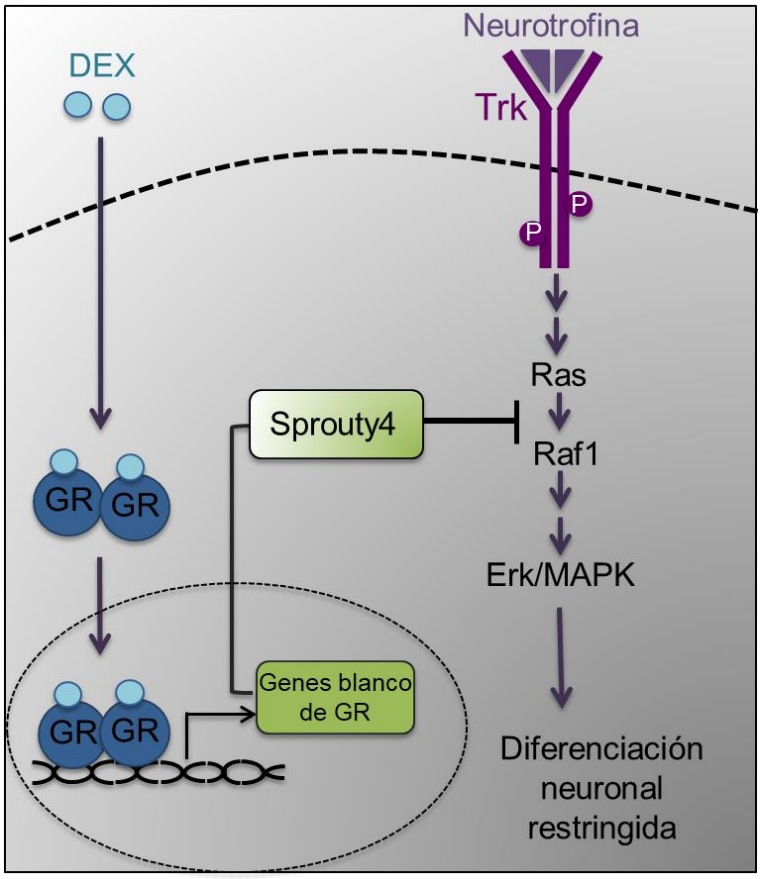

Figura 15. **Modelo propuesto para describir el posible rol de Sprouty4 en la señalización de DEX y neurotrofinas.**

Luego de la unión de DEX al receptor de glucocorticoides (GR) este es traslocado hacia el núcleo donde cumple la función de factor de transcripción. Dentro de los genes producto de la estimulación de GR se encuentra Sprouty4 el cual funciona como un regulador negativo de la vía de señalización de neurotrofinas al prevenir la fosforilación de Erk1/2, de esta manera afectando negativamente la respuesta biológica de las neurotrofinas.

Nuestros resultados son consistentes con estudios previos que muestran que el knockdown de *Sprouty3* causa un exceso de la arborización axonal en neuronas motoras de la medula espinal *in vivo* y regulan negativamente la señalización río debajo de BDNF-TrkB [132].

En línea con nuestros hallazgos, ha sido reportado que, en diferentes líneas celulares, los GC inhiben la señalización de EGF al promover la transcripción de diferentes reguladores negativos de EGFR y Erk1/2 como Lrig1-3, Mig6, DUSP1 y Sprouty4 [97], [123], [133]. Recientemente, ha sido descripto que DUSP1 y Sprouty1/4 son también inducidos en una línea celular de leucemia (SUP-B15) luego de tratamiento

con DEX por 6 horas, indicando que estos reguladores negativos son parte de un programa regulador disparado por GC en diferentes contextos celulares [134]. A pesar de esta evidencia, los mecanismos moleculares a través de los cuales DEX induce la expresión de Sprouty4 aún son desconocidos y requieren investigación adicional.

Un estudio previo mostró que la exposición crónica de neuronas corticales maduras a DEX reduce la respuesta biológica de BDNF al suprimir la expresión de miR-132, un ARN no codificante relacionado a la regulación de expresión de diversos genes en células neuronales [67]. Por lo tanto, además de facilitar la expresión de reguladores negativos de la vía TrkB-Erk1/2, DEX suprime la expresión vía BDNF de reguladores positivos de Erk1/2. Fosfatasas desconocidas que previenen la activación de Erk1/2 han sido sugeridas como potenciales blancos del microARN miR-132. Además, Kumamura y colaboradores han encontrado que el tratamiento crónico con DEX en neuronas corticales en desarrollo suprime la activación mediada por BDNF de Erk1/2 a través de la inhibición de la interacción de TrkB con la proteína adaptadora Shp2 [65]. Además de inhibir la vía Erk1/2 mediada por TrkB, la exposición crónica a glucocorticoides puede también regular la activación de la Phospholipasa C-ɣ (PLC-ɣ) en respuesta a BDNF. Por lo tanto, a través de reducir la interacción de TrkB con receptores de GC citosólicos, la exposición crónica a GC debilita la activación de la vía PLC-ɣ/Ca2+ y así suprime la liberación, inducida por BDNF, de glutamato en cultivos de neuronas corticales [66].

Sin embargo, los GC pueden también producir efectos fisiológicamente positivos en neuronas. En estudios previos, Jeanneteau y colegas, reportaron que una estimulación de corto plazo con DEX promueve la sobrevida neuronal al inducir la fosforilación de TrkB y la activación de la vía AKT, Erk1/2 y PLCɣ a través de un mecanismo que no requiere la producción o la co-estimulación con neurotrofinas [135]. Esta activación de la señalización de TrkB fue máxima entre las 2 y las 4 horas después de la aplicación de DEX y regresó a su nivel basal a las 6 horas. Contrariamente, en el presente trabajo realizamos pretratamientos largos con GC (16h) seguidos de estimulación con neurotrofinas (NGF o BDNF) para evaluar como el pretratamiento con DEX inhibe la señalización de las neurotrofinas, en vez de evaluar directamente como la estimulación de corto termino *per se* de DEX promueve la activación del receptor Trk, independientemente de una estimulación con neurotrofinas.

Toda esta evidencia muestra que los GC pueden inhibir o promover la función y señalización neurotrófica al actuar por múltiples mecanismos de acción, que dependen

principalmente del tipo de estimulación (crónico o agudo), la población neuronal y el estadío del desarrollo en que se encuentran las células.

El estrés crónico es una de las principales causas de depresión, y los animales expuestos a GC de manera crónica muestran un incremento en comportamientos relacionados a la depresión y la ansiedad. [109]. Una variedad de estudios se ha centrado en el rol que juegan las vías de BDNF/TrkB y MAPK/Erk1/2 en la patogénesis y el tratamiento de la depresión [111], [112], [113], [114], [115]. Por ejemplo, la vía MAPK/CREB está desregulada en regiones del cerebro implicadas en conductas depresivas por estrés crónico, como por ejemplo la corteza prefrontal y el hipocampo [116]. Además, BDNF señalizando a través de su receptor TrkB es requerido para el efecto de las drogas antidepresivas [111], [117]. De hecho, muchas drogas antidepresivas normalizan la vía de señalización BDNF-MAPK-CREB en el hipocampo e inducen cambios plásticos para disminuir los síntomas depresivos [111], [118], [119]. Por lo tanto, la cascada BDNF-MAPK-CREB es un blanco para el desarrollo de fármacos antidepresivos [113]. En este capítulo demostramos que en neuronas hipocampales el tratamiento con DEX induce la expresión de Sprouty4, el cual reduce la señalización Ras/MAPK en respuesta a BDNF. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que Sprouty4 podría resultar un potencial blanco para tratamientos antidepresivos. Adicionalmente, la relación entre glucocorticoides y los reguladores de la señalización de BDNF/TrkB como Sprouty4, resultan de interés para entender la contribución de las señales disparadas por neurotrofinas en los trastornos relacionados con estados de ánimo.

CAPÍTULO II

TDAG51 como un regulador de la sobrevida neuronal dependiente de la vía de señalización GDNF/RET/AKT

RESÚMEN DEL CAPÍTULO

GDNF es un potente promotor de la sobrevida y la diferenciación de motoneuronas y otras poblaciones neuronales del sistema nervioso central y periférico. Sin embargo, mientras que las vías de señalización a través de las cuales GDNF promueve estos procesos han sido ampliamente estudiadas, los mecanismos moleculares que regulan estos efectos permanecen sin esclarecerse aún.

En este capítulo, demostramos que TDAG51 desempeña un papel clave en el control de la vía de sobrevida PI3K/AKT inducida por GDNF/RET. En particular, demostramos que la proteína TDAG51 es capaz de inhibir la activación de la vía de PI3K/AKT, pero no la de MAPK/Erk1/2, en respuesta a GDNF/RET. La eliminación de *Tdag51,* mediante técnicas de shRNA, potencia la activación de AKT y la sobrevida de la línea celular MN1 derivada de motoneuronas en respuesta a GDNF y RET.

La estimulación a corto plazo con GDNF de células MN1 derivadas de motoneuronas promueve la localización y el reclutamiento de TDAG51 a microdominios de membrana plasmática resistentes a detergentes, a través de un mecanismo dependiente de PI3K. Por lo tanto, a través de su relocalización en estos microdominios de membrana, TDAG51 podría antagonizar la activación de AKT al competirle su unión a PIP_3.

Nuestros resultados demuestran que la estimulación de MN1 con dosis altas de NGF, un tratamiento que bajo condiciones de estrés oxidativo, promueve la muerte celular apoptótica vía $p75^{NTR}$, induce la expresión de TDAG51. Esto produce un efecto restrictivo sobre la señalización de AKT desencadenada por GDNF/RET. En línea con esto, la eliminación de *Tdag51* potencia la capacidad de GDNF para activar AKT y así proteger a las células MN1 de la muerte celular inducida por NGF/$p75^{NTR}$. En conjunto, nuestros resultados demuestran que TDAG51 es un mediador clave del equilibrio entre la señalización apoptótica promovida por NGF/$p75^{NTR}$ y la señalización de sobrevida mediada por GDNF/RET en células neuronales MN1.

INTRODUCCION

Los factores neurotróficos son moléculas solubles que regulan el desarrollo, mantenimiento y función del sistema nervioso. Dentro de estas proteínas podemos encontrar al grupo representado por los ligandos de la familia de GDNF (GFLs por sus siglas en ingles). Este grupo se encuentra constituidos por GDNF (Glial-cell Derived Neurotrophic Factor), siendo este el miembro más estudiado y caracterizado; Neuturina (NTRN), Artemina (ARTN) y Persefina (PSPN).

El primer miembro de esta familia en ser caracterizado fue GDNF, descripto inicialmente por su capacidad de promover la sobrevida de neuronas dopaminérgicas que típicamente degeneran en enfermedad de Parkinson [136]. Además, los ligandos de la familia de GDNF promueven la sobrevida y controlan la diferenciación de las neuronas motoras [48], [78], [86] y de poblaciones de neuronas periféricas, incluidas las neuronas simpáticas y sensoriales [137]

Todos los miembros de la familia de ligandos de GDNF actúan a través de un sistema receptor dual, formado por el correceptor GFRα, especializado en la unión del ligando, y el receptor tirosina kinasa RET, especializado en la señalización transmembrana [6].

Se han caracterizado cuatro tipos de receptores GFRα (*GDNF-family receptor-α*) con diferente afinidad por los distintos miembros de GFLs. GDNF se une principalmente a GFRα1, NRTN a GFRα2, ARTN a GFRα3 y PSPN a GFRα4. Sin embargo, existe cierto grado de promiscuidad que permite a NRTN y ARTN interactuar con menor afinidad con GFRα1, y a GDNF interactuar con menor afinidad con GFRα2 [37]. Los receptores GFRα se encuentran unidos a la membrana plasmática celular a través de un dominio GPI (Glycosylphosphatidylinositol). En presencia de GDNF, los receptores RET pueden activarse mediante GFRαs expresados en la misma célula (señalización en *cis*) o por moléculas de GFRαs clivadas y liberadas a partir de células vecinas (señalización en *trans*) [138], [139]. Se ha demostrado que esta activación en *trans* diversifica y potencia la señalización de RET [138], [140], [141]

Las proteínas ancladas a membrana por un dominio GPI se encuentran altamente representadas en las balsas lipídicas de la membrana plasmática (*lipid rafts*). Estos dominios complejos de membrana compuestos por colesterol y esfingolípidos [142] son

una estructura dinámica, que permite compartimentalizar las señales y hacer más eficientes los mecanismos de señalización mediados por estos receptores.

Según el modelo canónico, el dímero de GDNF interactúa con un monómero o dímero de GFRα1. Este complejo resultante recluta dos moléculas de RET a las balsas lipídicas, al interactuar con la porción extracelular del receptor de tirosina kinasa. La formación de este complejo GDNF/GFRα1/RET induce la transactivación del receptor RET e inicia la cascada de señalización intracelular. La fosforilación de los residuos tirosina de RET actúa como señal de reconocimiento y unión para diversas proteínas adaptadoras, iniciando así diversas cascadas de señalización intracelular, que incluyen la vía de Ras/MAPK, la vía de PI3K/AKT, la de PLC-γ y Src. La activación de estas vías de señalización lleva a la inducción de diversos procesos biológicos tales como sobrevida, diferenciación, migración celular y formación de sinápsis en diferentes poblaciones del sistema nervioso central y periférico.

Las motoneuronas que inervan los músculos esqueléticos fueron de las primeras poblaciones neuronales en caracterizarse como dependientes de la presencia de su blanco para su sobrevida y correcto desarrollo [143]. Durante el desarrollo embrionario, aproximadamente la mitad de las motoneuronas espinales generadas inicialmente se pierden durante una ola de muerte celular programada (PCD) [26]. Estudios en ratones con deficiencia en la expresión de factores neurotróficos mostraron una reducción en el número total de motoneuronas [144], lo que sugiere que el correcto desarrollo de las neuronas de la médula espinal requiere de la presencia de factores tróficos. Tanto IGF (Insulin Growth Factor) [145], HGF (Hepatocyte Growth Factor), Citoquinas [146], miembros de la superfamilia de TGF-β como GDNF y las neurotrofinas, con excepción de NGF, son capaces de promover la sobrevida de motoneuronas *in vivo* [147].

En particular, GDNF previene la apoptosis de motoneuronas durante el desarrollo de la médula espinal [78], protege a las motoneuronas en procesos degenerativos crónicos y rescata motoneuronas de la muerte celular inducida por axotomía [6], [48]. GDNF promueve el crecimiento neurítico y la neuroprotección a través de la activación de las vías de MAPK/Erk y PI3K/AKT. La activación de PI3K/AKT previene la muerte celular al inhibir proteínas pro-apoptoticas como Bad [148], p53 [149]], GSK3-β [150], [151] y Caspasa 9 [152]

En contraposición a lo descripto para GDNF, la neurotrofina NGF induce la muerte de motoneuronas. Al carecer del receptor TrkA, este efecto inductor de la apoptosis desencadenado por NGF ocurre a través del receptor de baja afinidad $p75^{NTR}$. Las motoneuronas expresan el receptor $p75^{NTR}$ sólo durante el desarrollo embrionario, luego de una injuria o durante una condición patológica [153]. La producción de NGF o su precursor inmaduro proNGF secretado por astrocitos activos produce la muerte apoptótica dependiente de $p75^{NTR}$ [11], [12], [13], [14], [91]. Estudios previos han establecido que la competencia entre las señales pro-apoptoticas y anti-apoptóticas determinaran el mantenimiento o la eliminación de las poblaciones de motoneuronas a lo largo de la médula espinal [87], [143], [154].

A pesar de que la vía de señalización a través de la cual GDNF promueve la sobrevida está relativamente bien establecida, los mecanismos que restringen el efecto pro-apoptótico restan por ser determinados. TDAG51 (T cell Death-Associated gene 51) fue inicialmente descripto como un mediador esencial para la inducción de la apoptosis vía Fas en hibridomas de células T [155]. TDAG51 es una proteína principalmente citoplasmática cuya desregulación ha sido reportada en diversos estudios a lo largo de los últimos años. La microinyección de un anticuerpo neutralizante de la actividad de TDAG51 en células H19-7, un modelo de células hipocampales, aumenta la sobrevida. Además, la expresión transitoria de TDAG51 disminuye la sobrevida tanto de células H19-7 diferenciadas como de células no diferenciadas[156]. La sobreexpresión de TDAG51 en células endoteliales lleva a cambios morfológicos y disminuye la adhesión, lo que promueve la muerte celular [157]. En diferentes líneas celulares derivadas de melanoma se observó un aumento en los niveles de TDAG51 que llevan a una reducción del crecimiento, una disminución en la formación de colonias y un aumento en la apoptosis por caspasa 9 [158]. En células epiteliales, el aumento de TDAG51 está asociado con un incremento de la transición epitelio-mesenquimal y un aumento en la apoptosis [159]. En líneas celulares de cáncer de mama, se observó un aumento en TDAG51 luego de la inducción de apoptosis por rapamicina [160]. En muestras de corteza cerebral de pacientes epilépticos se observó un aumento en los niveles de TDAG51 [161]. Además, TDAG51 ha comenzado a utilizarse como un marcador de pronóstico tumoral, ya que se observa una disminución en la expresión de esta proteína en melanoma, cáncer de mama, carcinoma oral y adenocarcinoma gástrico [158], [162], [163], [164].

Además de estos estudios que asocian a TDAG51 con el proceso de muerte celular, se ha reportado que la expresión de TDAG51 puede estar mediada por diferentes estímulos como, factores de crecimiento, estrógenos y estrés reticular [165]

TDAG51 también conocido como PHLDA1 (*Pleckstrin homology-like domain family A member 1*) pertenece a una familia compuesta por tres proteínas PHLDA (PHLDA1-3). Esta familia se caracteriza por poseer un dominio PH (*pleckstrin homology domain*) [166]. Este dominio estructural altamente conservado se encuentra en numerosas proteínas, y representa el undécimo dominio más común en el proteoma humano. Principalmente, confiere a las proteínas que lo poseen la capacidad de interactuar con elementos de membrana, como los fosfatidilinositol fosfatos (PIP). Aproximadamente la mitad de las proteínas que poseen este dominio interactúan con PIP [167]. Trabajos sobre PHLDA2 y PHLDA3 han descripto que estos miembros de la misma familia que TDAG51 tienen la capacidad de reprimir la activación de AKT al competir por su interacción por PIP_3 en la membrana plasmática [166], [168]. Chen y colaboradores propusieron el mismo modelo de interacción para TDAG51, siendo el primer trabajo en intentar esclarecer el mecanismo a través del cual TDAG51 puede estar involucrado en los distintos procesos biológicos en los que se vio alterada su expresión [169].

Interesantemente, la expresión de TDAG51 ha sido detectada en neuronas de cuerpo grande de la porción anterior de la médula espinal de ratones [170], correspondiente con motoneuronas. Además, análisis del transcriptoma de células pluripotentes inducidas derivadas de motoneuronas humanas obtenidas de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA) mostraron un aumento en los niveles del ARNm de *Tdag51* [171]. Estos resultados sugieren una implicancia de TDAG51 en la patogénesis de ELA al aumentar la vulnerabilidad de las motoneuronas.

A pesar de la creciente cantidad de evidencia que indica que TDAG51 puede actuar como un regulador de la señalización de factores de crecimiento [169], [172], [173] actuando por un mecanismo de retroalimentación negativa, todavía resta estudiar a TDAG51 como un posible modulador de la señalización y la función de los factores neurotróficos. Por lo tanto, en este capítulo de la presente tesis, nos propusimos investigar si TDAG51 podría actuar como un regulador endógeno de la señalización del receptor tirosina kinasa RET y su respuesta biológica inducida por GDNF en la línea celular derivada de motoneuronas embrionarias de ratones MN1.

RESULTADOS

TDAG51 restringe la activación mediada por GDNF de la vía de señalización de AKT, pero no de MAPK/Erk1/2.

Con el objetivo de determinar si TDAG51 podría regular la señalización del receptor tirosina kinasa RET inducida por GDNF, examinamos la capacidad de controlar la activación ligando dependiente de efectores río abajo de RET como son las vías de señalización de Ras/Erk1/2 y PI3K/AKT. Para esto, usamos la línea celular derivada de motoneuronas embrionarias de ratón MN1, la cual expresa endógenamente a los receptores de GDNF, GFRα1 y RET. Los niveles de activación de MAPK/Erk1/2 y AKT fueron evaluados por western blot a partir de extractos celulares de la línea parental (células transfectadas con plásmido control) y MN1 transfectadas con un plásmido de expresión de TDAG51 unido a la etiqueta Flag (Flag-TDAG51). En estos ensayos, las células fueron deprivadas de suero por 16 horas a fin de disminuir los niveles basales de activación de ambas vías de señalización y luego estimuladas con concentraciones saturantes de GDNF (50ng/ml) por 15 minutos. Luego, se tomaron los extractos celulares y los niveles de activación de MAPK/Erk1/2 y AKT fueron evaluados por western blot con anticuerpos fosfoespecíficos. (**Fig. 16**).

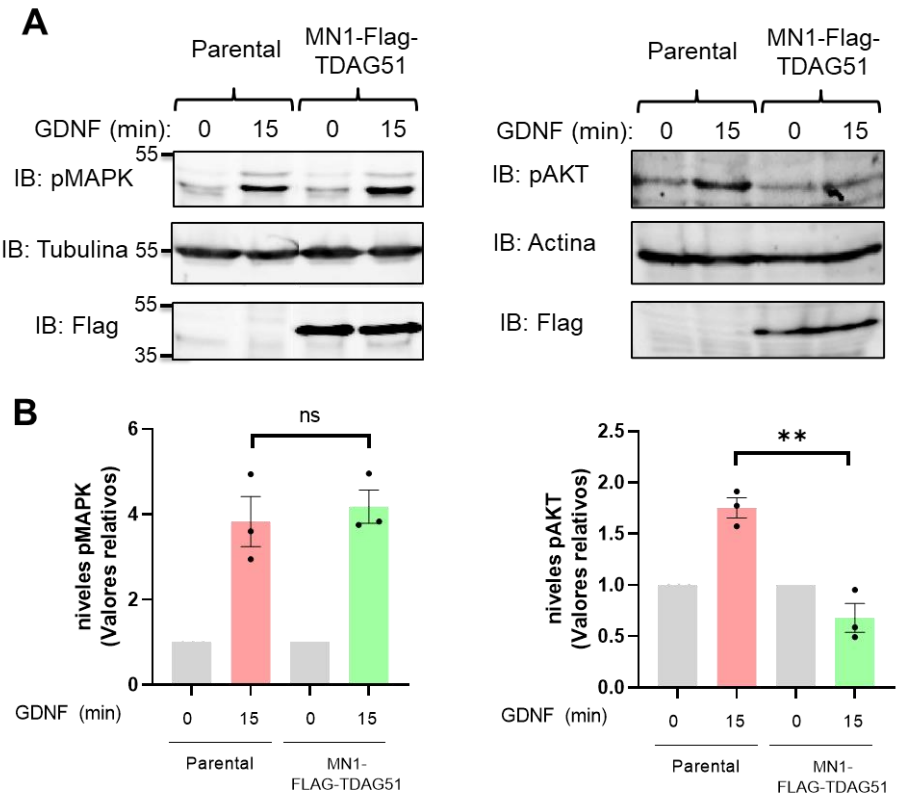

Figura 16 **TDAG51 restringe la activación mediada por GDNF de AKT, pero no de MAPK/Erk1/2.**

A) Inmunoblots (IB) representativos mostrando la activación de MAPK/Erk1/2 (Thr202/Tyr204) (pMAPK) y AKT (S473) (pAKT) en extractos celulares de células MN1 parentales y MN1-Flag-TDAG51 tratadas con GDNF (50ng/ml) por 15 minutos. Tubulina y actina fueron usados como control de carga y Flag como control de transfección.

B) Gráficos de cuantificación de fosforilación de MAPK y AKT. Los resultados fueron normalizados al control de carga y expresados de manera relativa a su grupo control sin estimular. Los resultados son presentados como media ± sem de n=3 ensayos independientes. *p<0.05 por t Student.

Observamos que, al revelar con un anticuerpo específico para fosfo-Erk1/2 (Thr202/Tyr204) no encontramos diferencias en los niveles de activación luego de la estimulación con GDNF entre las células parentales y aquellas que sobreexpresaban TDAG51. Sin embargo, al evaluar la activación de AKT (S473) observamos que la

sobreexpresión de TDAG51 produjo una reducción significativa en los niveles de AKT activado (pAKT) en comparación con su condición control **(Fig. 16).**

GDNF promueve el reclutamiento de TDAG51 a microdominios de membrana resistentes a detergentes a través de un mecanismo dependiente de PI3K.

Teniendo en cuenta este efecto inhibitorio sobre la vía de AKT, nos propusimos explorar el mecanismo a través del cual TDAG51 podría regular negativamente su activación. Evidencia previa muestra que TDAG51 es una proteína citoplasmática que puede ser relocalizada ~~a~~ en la membrana plasmática gracias a su dominio de homología a pleckstrina (PH), el cual media la unión al inositol-3,4,5-trifosfato (PIP_3) en la membrana [169], [172]. En función de esto, decidimos explorar si TDAG51, al igual que los otros dos miembros de su familia, podría estar bloqueando la activación de AKT al competirle su unión a los sitios PIP_3 de la membrana [168], [169]. Para explorar esta posibilidad utilizamos dos métodos. En primer lugar, cotransfectamos células MN1 con el plásmido de sobreexpresión Flag-TDAG51 junto a GFP. La presencia de la proteína fluorescente verde (Green Fluoresent Protein, GFP) nos permitió, por microscopía de fluorescencia, identificar a las células que sobreexpresaban la proteína de interés. Para realizar estos ensayos, las células MN1 control o sobreexpresando TDAG51 fueron hambreadas en medio libre de suero por 16 horas, luego estimuladas con GDNF por 15 minutos y finalmente fijadas con 4% PFA (Paraformaldehido). Utilizando un anticuerpo específico para TDAG51 evaluamos la localización subcelular de la proteína por microscopía de fluorescencia. Se consideró que una célula presentaba un enriquecimiento de TDAG51 en la membrana plasmática cuando, al evaluar el perfil de intensidad de fluorescencia, se observaba mayor intensidad de marca en la membrana que en el citoplasma (perfil en forma de U) (**Fig. 17A y B**).

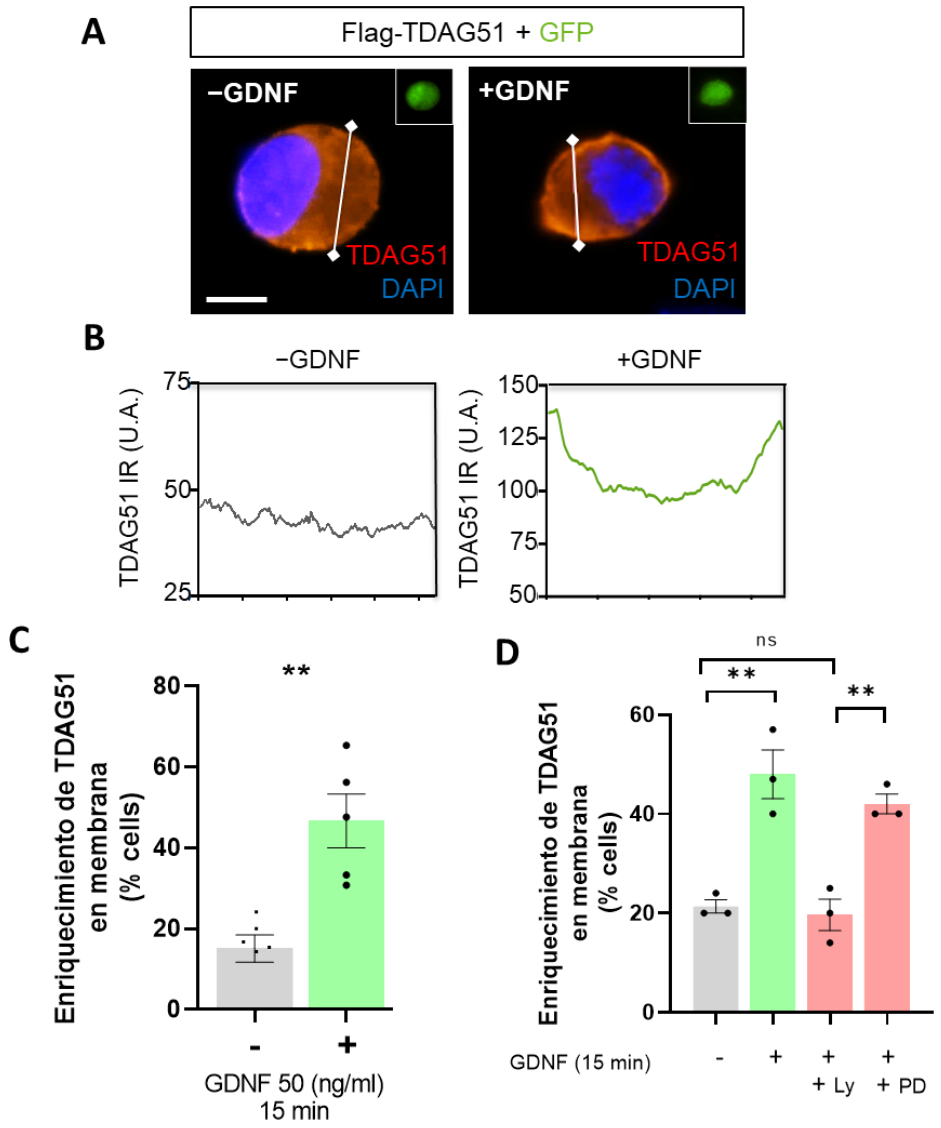

Figura 17 **GDNF promueve el reclutamiento de TDAG51 a la membrana plasmática por un mecanismo dependiente de PI3K.**

A) Microfotografías representativas de ensayo de cuantificación de la localización de TDAG51 en membrana plasmática. Las células MN1 fueron cotransfectadas con Flag-TDAG51 junto a GFP. Luego de ser deprivadas de suero, las células fueron estimuladas con GDNF (50ng/ml) por 15 minutos y fijadas con 4% PFA. Se realizó inmunofluorescencia para TDAG51 y DAPI para marcación nuclear.

B) Gráficos de intensidad en unidades arbitrarias de marca anti-TDAG51 a lo largo de la línea blanca de las células mostradas en A. Las células fueron consideradas positivas para un enriquecimiento en la membrana de TDAG51 cuando mostraban mayor intensidad en la membrana plasmática que en el citoplasma (perfil en forma de U)

C) Gráfico de barras mostrando la cuantificación del porcentaje de células GFP positivas que presentaron enriquecimiento de TDAG51 en la membrana plasmática luego de la estimulación con GDNF. Los resultados son expresados como media ± sem de n=5 ensayos independientes **p<0.01 por test t de Student.

D) Gráfico de barras mostrando la cuantificación del porcentaje de células GFP postivas que presentaron enriquecimiento de TDAG51 en la membrana plasmática luego de ser pretratadas o no con inhibidores farmacológico de PI3K (LY294002) o MAPK (PD98059) y estimuladas luego con GDNF. Los resultados se expresan como media±sem de n=3 ensayos independientes. **p<0.01 por ANOVA seguido comparaciones por test de Tukey.

En estos ensayos encontramos que el tratamiento con GDNF promovió un aumento significativo del porcentaje de células MN1 que presentan un enriquecimiento de TDAG51 en la membrana plasmática (**Fig. 17C**). Para determinar la o las vías principales activadas por la señalización de GDNF/RET que se encuentran involucradas en la relocalización de TDAG51 a la membrana, pretratamos a las células cotransfectadas con inhibidores farmacológicos dos horas antes de realizar la estimulación con GDNF (**Fig. 17D**). Encontramos que, a diferencia del pretratamiento con el inhibidor de la vía de MAPK (PD98059), el inhibidor de PI3K (LY294002) produjo una disminución significativa en la proporción de células que presentan una relocalización de TDAG51 a la membrana, indicando que la relocalización de TDAG51 inducida por GDNF es dependiente de PI3K y no de la vía de MAPK.

Ha sido demostrado que luego de estimular con factores tróficos, AKT se activa en compartimentos de membrana resistentes al detergente tritónX100 (DRM), denominados balsas lipídicas (o lipid rafts) que están enriquecidas en lípidos específicos y colesterol [174]. Además, la localización de RET en estos dominios es necesaria para una señalización eficiente de GDNF [138], [140]. Basándonos en estas evidencias, primero analizamos si el tratamiento con GDNF podía reclutar TDAG51 a estos microdominios de membrana resistentes al detergente tritónX100. Para este fin, preparamos DRM a partir de células MN1 tratadas con GDNF a diferentes tiempos post-estimulación. Usando este enfoque, encontramos que la estimulación con GDNF promovió un reclutamiento sustancial de TDAG51 a los DRM (**Fig. 18A**), una fracción de membrana que contiene a las balsas lipídicas, donde el receptor RET es reclutado y

activado (pRET) luego de la estimulación con GDNF (**Fig. 18B**). Estos ensayos sugieren que TDAG51 podría estar antagonizando la señalización de RET/PI3K/AKT en respuesta a GDNF específicamente en estos microdominios de membrana.

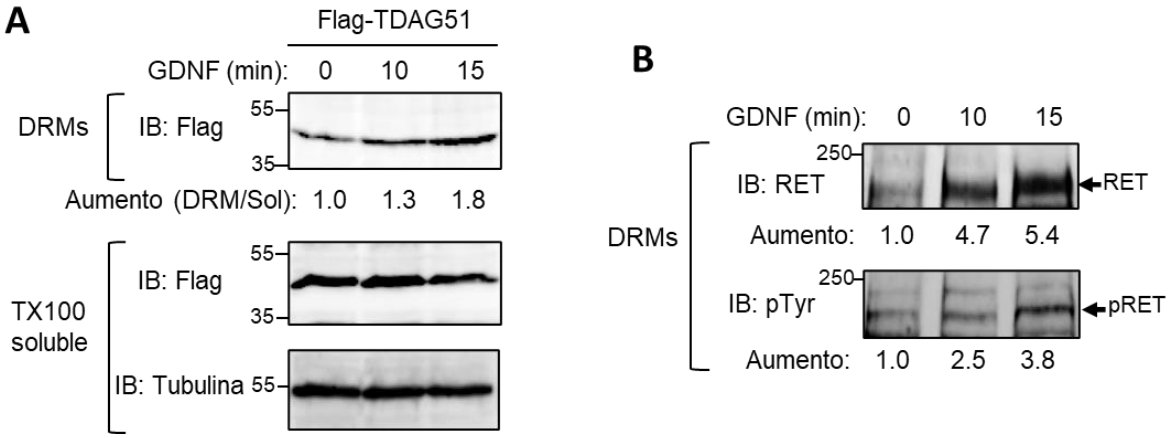

Figura 18. **TDAG51 y RET son reclutados a los dominios de membrana resistentes a Tritón X-100 (fracción DRM) luego de la estimulación con GDNF**

- **A)** Inmunoblot representativo mostrando los niveles tanto en DRM (Detergent Resistant Membranes) como en fracción soluble de Flag-TDAG51. Las fracciones fueron preparadas a partir de células MN1 transfectadas con Flag-TDAG51 y tratadas con GDNF (50 ng/ml) por el tiempo indicado. Las veces de aumento se indican relativas a la fracción soluble.
- **B)** Inmunoblot evidenciando el aumento de RET y pRET en DRM en células MN1-Flag-TDAG51 luego de la estimulación con GDNF (50 ng/ml) por los tiempos indicados. Las veces de aumento son expresadas respecto a la condición sin estimulación.

El conjunto de estos resultados nos muestra que, el tratamiento con GDNF promueve un aumento significativo en el porcentaje de células mostrando localización de TDAG51 en la membrana plasmática, más específicamente en regiones enriquecidas en balsas lipídicas. Probablemente esto se deba a que al producirse la estimulación de RET por GDNF se produce la activación de PI3K y por lo tanto un aumento en la generación de PIP_3, los cuales son sustrato de AKT y permiten su localización a membrana y posterior activación por proteínas kinasas. Por lo tanto, el reclutamiento de TDAG51 a la membrana podría estar produciendo un efecto inhibitorio sobre la activación de AKT al competirle su unión a PIP_3. En línea con esto, el inhibidor de PI3K (LY294002), pero no el inhibidor de MAPK/ERK1/2 (PD98059), redujo significativamente el reclutamiento de

TDAG51 a la membrana, indicando que este proceso es dependiente de PI3K (**Fig. 17D**). Todo esto sugiere fuertemente que TDAG51 inhibe la fosforilación de AKT mediada por RET al competir la unión de AKT a los PIP_3 en la membrana plasmática.

TDAG51 inhibe la sobrevida de la línea derivada de motoneuronas MN1 inducida por GDNF

Teniendo en cuenta que GDNF promueve la sobrevida de motoneuronas al inducir la vía PI3K/AKT, decidimos evaluar si TDAG51, al interferir esta vía de señalización puede provocar un efecto detrimental sobre la sobrevida de las células MN1 en un modelo de inducción de apoptosis por deprivación de suero.

En primera instancia definimos los tiempos en los cuales observamos una disminución de las señales de sobrevida (AKT fosforilado) y un aumento de los mediadores de la señal apoptótica (Caspasa 3 activa). Para ello, mantuvimos a las células en medio DMEM sin soporte trófico, y los niveles de las señales de sobrevida e inducción de apoptosis fueron evaluadas por western blot a diferentes tiempos luego de la deprivación de suero. Encontramos así que la deprivación de suero resulta un modelo dinámico claro para el estudio de la apoptosis y la señalización de factores tróficos, ya que observamos que la reducción en la activación de AKT precede al aumento de los niveles de Caspasa3 activa (**Fig. 19A**). Con esto en mente, decidimos evaluar el impacto de TDAG51 sobre la capacidad protectora de GDNF sobre las células MN1. Para realizar estos ensayos, células MN1 fueron transfectadas con plásmido control o Flag-TDAG51, y mantenidas en condiciones de deprivación de suero con ausencia total de soporte trófico o mantenidas con GDNF por 32 horas. Realizando inmunofluorescencia para Caspasa 3 activa determinamos el porcentaje de células apoptóticas (**Fig. 19B**).

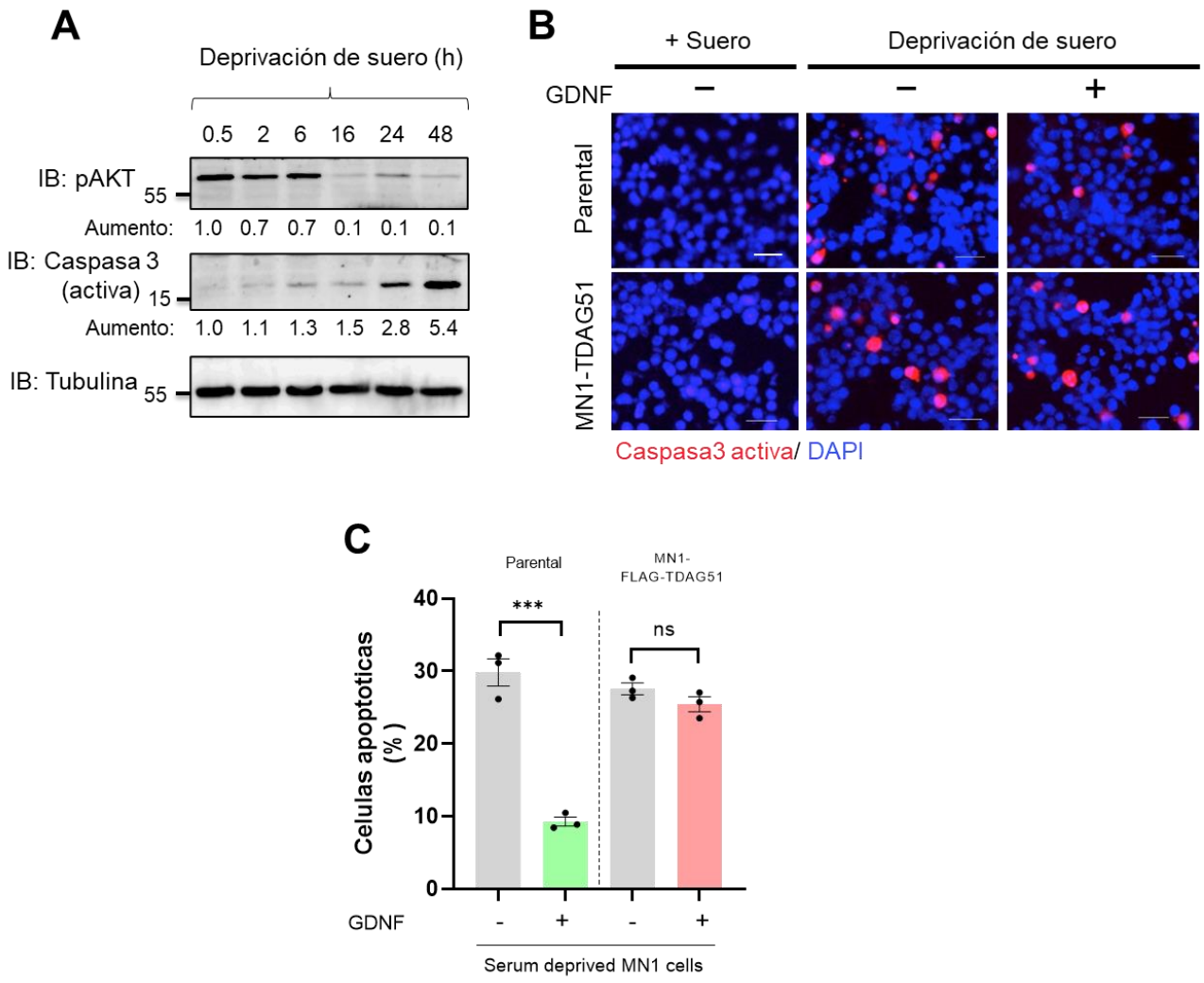

Figura 19 **TDAG51 inhibe la protección de GDNF sobre células MN1 ante la deprivación de suero.**

A) Inmunoblot representativo (IB) mostrando pAKT y Caspasa 3 activa en extractos de células MN1 deprivadas de suero durante distintos tiempos. Los valores relativizados al control de carga (Tubulina) expresan las veces de cambio.

B) Fotomicrografías de células MN1 parental o Flag-TDAG51 mantenidas en condición de deprivación de suero por 32 horas suplementadas o no con GDNF (50ng/ml). Inmunofluorescencia con anticuerpo contra Caspasa3 activa. Los núcleos fueron marcados con DAPI.

C) Cuantificación del porcentaje de células parentales o MN1-TDAG51 en proceso apoptótico expresando Caspasa3 activa. Los resultados son expresados como media±sem de n=3 ensayos independientes. *p<0.05 por ANOVA de una vía seguido de test de Tukey.

Encontramos que, si bien en la condición parental, GDNF tuvo la capacidad de reducir significativamente el porcentaje de células apoptóticas, la sobreexpresión de TDAG51 bloqueó el efecto protector de GDNF, indicando que TDAG51 actúa como un regulador negativo del efecto promotor de la sobrevida de GDNF al inhibir la activación de la vía PI3K/AKT (**Fig. 19C**)

La disminución de TDAG51 potencia la activación de AKT, la sobrevida y la diferenciación de células MN1 en respuesta a GDNF.

Teniendo en cuenta estos resultados, planteamos que una disminución de los niveles de TDAG51 podría potenciar la respuesta de la vía PI3K/AKT por GDNF y por consecuencia sus efectos biológicos.

Para ello utilizamos plásmidos de interferencia que nos permitieron disminuir en forma eficaz los niveles de expresión de TDAG51 (sh1 y sh2). Verificamos la efectividad de estos plásmidos en células HEK293T cotransfectadas con plásmido de sobreexpresión de TDAG51 junto a un shRNA-Control o dos secuencias diferentes de shRNA-*Tdag51* (sh1 y sh2) (**Fig. 20A**).

Dado que el plásmido de interferencia confiere la resistencia al antibiótico puromicina, la selección en presencia de este antibiótico permitió enriquecer el cultivo en células MN1 que tienen una expresión reducida de TDAG51 luego de la transfección con el plásmido.

En estos cultivos enriquecidos evaluamos los niveles de activación de AKT dependiente de GDNF por western blot sobre extractos totales de células MN1 interferidas para la expresión de TDAG51 o tratadas con un plásmido shRNA-Control (**Fig. 20B**). En contraposición a lo observado para la sobreexpresión de TDAG51, la disminución de los niveles de TDAG51 potenció la activación de AKT dependiente de GDNF (**Fig. 20B y 20C**)

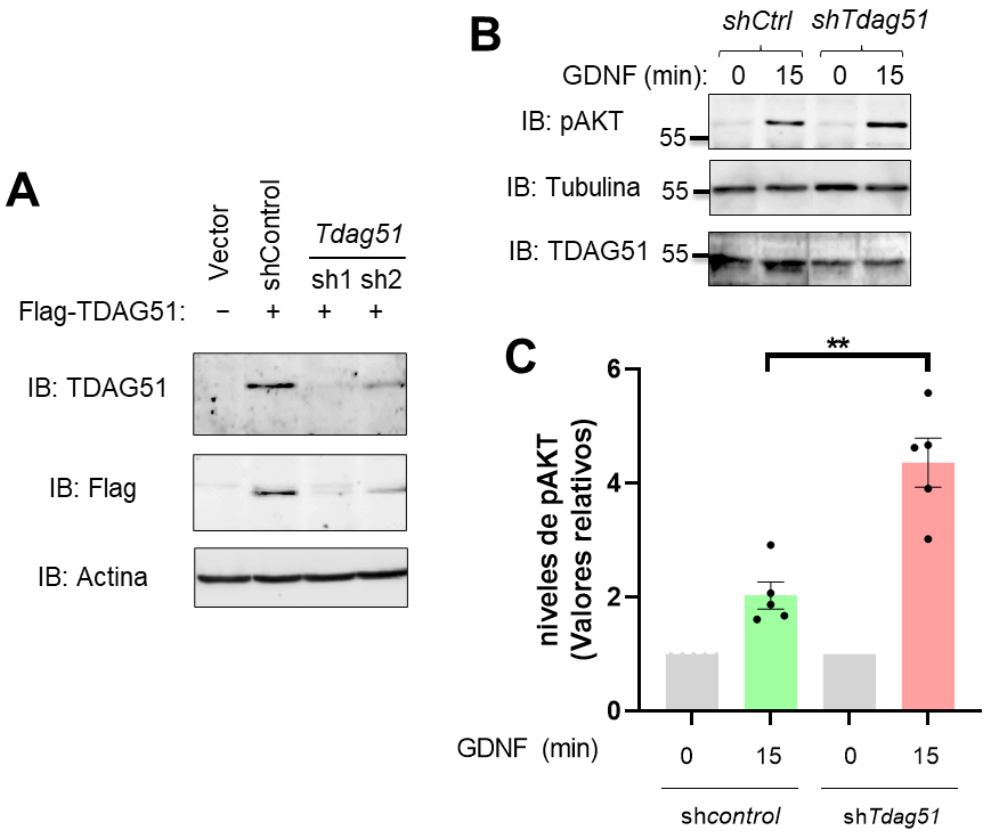

Figura 20 **La disminución de TDAG51 potencia la activación de AKT por GDNF**

A) Validación de plásmidos shRNA-*Tdag51*. Los niveles de proteína TDAG51 fueron analizados por inmunoblot (IB) de células HEK293T cotransfectadas con Flag-TDAG51 junto a shRNA-*control* o shRNA-*Tdag51*. Se muestra actina como control de carga. Dos diferentes plásmidos de interferencia fueron evaluados (sh1 y sh2).

B) Inmunoblot representativo mostrando la activación de AKT (pAKT) en extractos de células MN1 parentales y *shTdag51*-MN1 que fueron tratadas con GDNF (25ng/ml) por 15 min Como control se evaluó los niveles de tubulina y TDAG51 endógeno.

C) Cuantificación de los niveles de fosforilación de AKT. Los valores fueron normalizados a tubulina y relativizados a su condición control. Los resultados se muestran como media±sem de n=5 ensayos independientes. **p<0.01 t Student.

Una vez establecido el efecto sobre la activación de la vía PI3K/AKT decidimos evaluar el efecto sobre la respuesta biológica desencadenada por GDNF en células con niveles disminuidos de TDAG51. Las células interferidas fueron sometidas a la condición de deprivación de suero y mantenidas con diferentes concentraciones de GDNF. Luego,

las células fueron fijadas y la muerte celular fue monitoreada por inmunofluorescencia contra el marcador de apoptosis Caspasa3 activa (**Fig. 21A**).

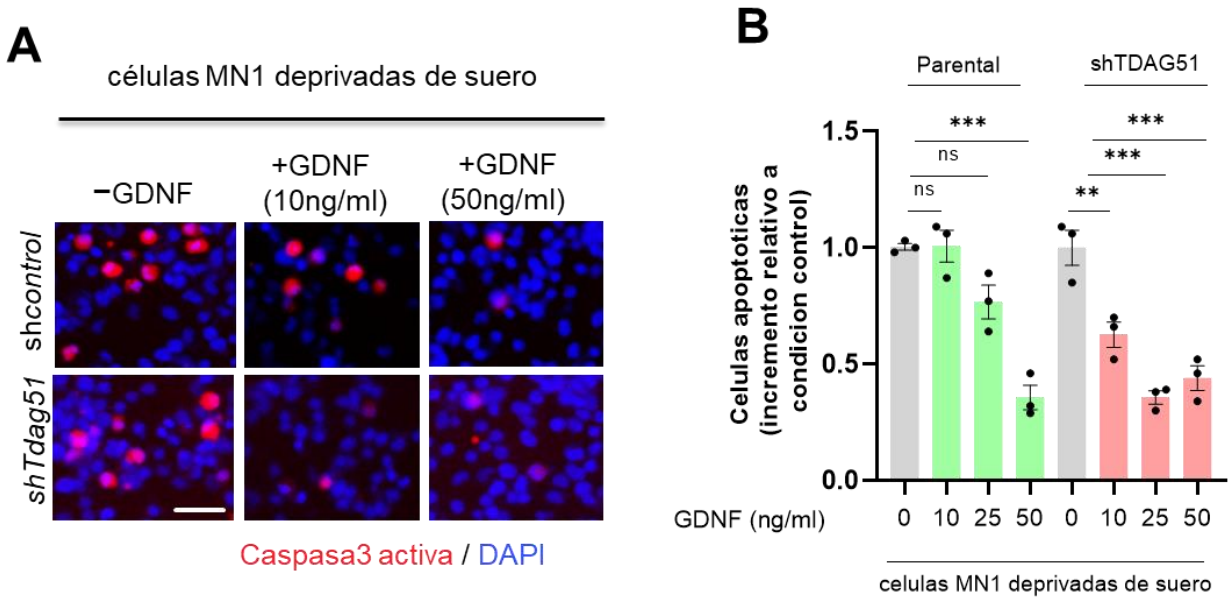

Figura 21. **La disminución de TDAG51 potencia el efecto protector de GDNF ante la deprivación de suero.**

A) Imágenes representativas de células MN1 parental y shRNA*Tdag51* mantenidas por 32h en medio sin suero con diferentes concentraciones de GDNF. Inmunofluorescencia contra Caspasa3 activa. DAPI se utilizó para identificar los núcleos celulares. Barra de escala 100µm

B) Cuantificación del porcentaje de células MN1 control o *shtdag51* apoptóticas con marca positiva para Caspasa3 activa en cada uno de los grupos. Los valores se muestran relativos a la condición control sin GDNF de cada grupo. Los resultados se expresan como media±sem para n=3 experimentos independientes. **p<0.0, *** p<0.001 ANOVA seguido de comparación por test de Tukey.

Encontramos que mientras que bajas concentraciones (10 y 25 ng/ml) de GDNF no produjeron un efecto significativo en la protección frente a la deprivación de suero, la disminución de TDAG51 por shRNA redujo significativamente los porcentajes de células apoptóticas en todas las concentraciones evaluadas (**Fig. 21**). Estos resultados indican que una reducción de los niveles de TDAG51 potencia los efectos antiapoptóticos de GDNF en células MN1 deprivadas de suero, al disminuir la regulación negativa sobre la vía de AKT.

Ha sido reportado que la inhibición farmacológica de la vía de señalización PI3K/AKT inducida por el receptor RET bloquea no solamente la sobrevida en respuesta a GDNF sino también la diferenciación celular [138], [175]. Basándonos en esto, junto con nuestros resultados previos, decidimos investigar si la disminución de los niveles de TDAG51 podía regular la diferenciación de las células MN1 promovida por GDNF/RET. Para esto, células MN1 fueron transfectadas con plásmido shRNA-control o shRNA-*Tdag51*. Luego, realizamos un ensayo de diferenciación sembrando las células a baja densidad sobre colágeno en medio DMEM suplementado con baja concentración de suero, y tratando o no con GDNF (100 ng/ml) y el receptor soluble GFRα1-Fc (300 ng/ml) (estimulación en trans) [138] . Luego de 48h, las células fueron fijadas con 4% PFA y teñidas con faloidina para analizar por microscopia la morfología celular (**Fig. 22A**).

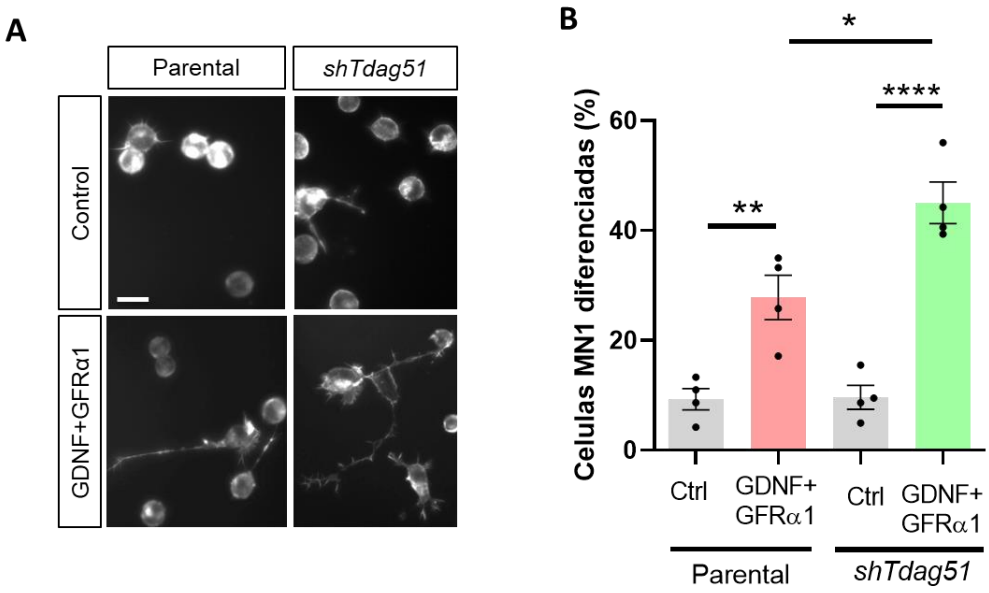

Figura 22. **La disminución de los niveles de TDAG51 produce un aumento en la diferenciación celular dependiente de GDNF/RET**

A) Fotomicrografías representativas de células MN1 parentales (shRNA-*control*) y sh*Tdag51* teñidas con faloidina para identificar filamentos de actina. Barra de escala 25 μm.

B) Cuantificación del número relativo de células MN1 parentales o *shTdag51* con procesos dendríticos de longitud mayor o igual a dos cuerpos celulares luego de 48h de estimulación con GDNF en presencia de GFRα1-Fc soluble. Los resultados se muestran

como media±sem de n=3 ensayos independientes realizados como triplicados. *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001 por ANOVA seguido de comparación múltiple por Tukey.

En línea con la potenciación de la activación de AKT en respuesta a GDNF, encontramos que mientras GDNF promovió la diferenciación morfológica de las células MN1, la disminución de TDAG51 tuvo la capacidad de potenciar significativamente este efecto luego de 48h. (**Fig. 22**)

NGF induce la expresión de TDAG51 en células MN1

Teniendo en cuenta la relevancia de los mecanismos de retroregulación negativa sobre el control de la señal de los factores neurotróficos [7], [51], [176], decidimos explorar si TDAG51 podía antagonizar la activación de AKT inducida por GDNF actuando mediante un mecanismo de retroregulación negativa para frenar en forma controlada la señal disparada inicialmente por el factor neurotrófico. Para ello, estudiamos la capacidad de GDNF de inducir la expresión proteica de TDAG51 en células MN1. Mediante este análisis, no fuimos capaces de detectar cambios significativos en los niveles de TDAG51 luego de estimular con GDNF (**Fig. 23A**). Estos resultados indicaron que la inhibición ejercida por TDAG51 sobre la activación de AKT dependiente de GDNF, no involucraría un mecanismo de retroalimentación negativa.

Trabajos previos han demostrado que la regulación de la vía PI3K/AKT es crítica para el balance entre las señales de sobrevida y muerte en el sistema nervioso central [177], [178], pero poco se sabe sobre cómo podrían actuar estos reguladores sobre las señales disparadas por los factores neurotróficos en motoneuronas. Basados en la evidencia que indica un rol antagónico de NGF y GDNF sobre la sobrevida de motoneuronas, decidimos analizar si TDAG51 podría actuar como un intermediario común de las 2 vías de señalización regulando la actividad de PI3K/AKT. El receptor de neurotrofinas de baja afinidad $p75^{NTR}$ ha sido reportado como un mediador de la muerte apoptótica de motoneuronas en respuesta a altos niveles de NGF durante el desarrollo embrionario [11], [12] o a su forma inmadura (proNGF) secretada por astrocitos reactivos [13], [14]. Al mismo tiempo, se sabe que GDNF, producido por las células blanco de estas neuronas actúa como un potenciador del desarrollo y la sobrevida. Esto plantea la posible comunicación entre estas dos vías de señalización, donde las motoneuronas que

respondan con mayor intensidad a las señales inducidas por NGF (o su proforma) se debilitarán y morirán, mientras que las que responden con mayor intensidad a GDNF sobrevivirán [11], [179].

Dado que tanto la línea celular derivada de motoneuronas embrionarias MN1 como los cultivos de motoneuronas responden de forma similar a NGF, disparando vías de señalización apoptótica que llevan a la activación de caspasas [180], y a GDNF induciendo sobrevida, decidimos utilizar esta línea celular para continuar los estudios. En este modelo evaluamos si la activación de la vía NGF/$p75^{NTR}$, podría a través de la inducción de la expresión de TDAG51, actuar a través de un mecanismo de "crosstalk competitivo" sobre la vía de GDNF/RET/AKT interfiriendo las señales de sobrevida.

En principio y para confirmar que el efecto apoptótico inducido por NGF es mediado por $p75^{NTR}$ en ausencia del receptor de sobrevida, TrkA; analizamos la expresión de estos receptores por inmunoblot en la línea celular MN1. Nuestros resultados revelaron la presencia de altos niveles del receptor $p75^{NTR}$ y ausencia del receptor TrkA (**Fig. 23B**) indicando que el tratamiento con un exceso de NGF podría desencadenar, bajo ciertas circunstancias, la activación de vías de inducción de apoptosis por $p75^{NTR}$ en lugar de mecanismos de sobrevida dependientes de TrkA [28], [180]. Con el objeto de explorar si la señalización de NGF a través de $p75^{NTR}$ podría regular la expresión de TDAG51 en células MN1, realizamos ensayos de inmunodetección de TDAG51 en extractos de células estimuladas con NGF a distintos tiempos. Aquí encontramos que las células MN1 que fueron tratadas con NGF evidenciaron un rápido incremento en los niveles de TDAG51 hasta al menos las 4h posteriores a la estimulación (**Fig. 23C**).

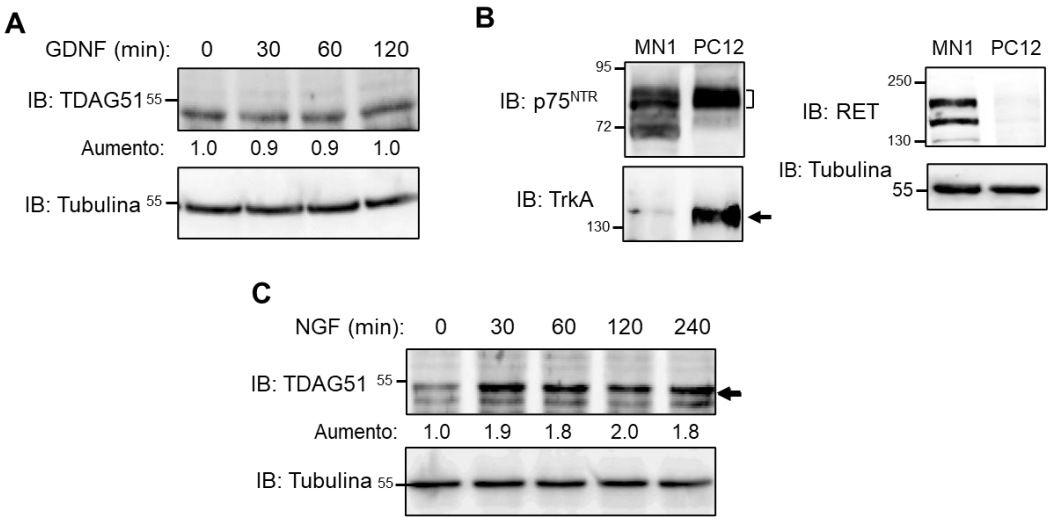

Figura 23. **NGF, pero no GDNF, produce un aumento en los niveles de TDAG51**

A) Inmunoblot representativo mostrando los niveles de proteína TDAG51 en extractos de células MN1 estimuladas con GDNF (50 ng/ml) por diferentes tiempos. Los valores fueron relativizados a tubulina y expresados como veces de aumento respecto al tiempo inicial. Resultados similares fueron obtenidos en n=2 experimentos.

B) Inmunoblots representativos mostrando la presencia de RET y $p75^{NTR}$, pero no TrkA, en extractos de células MN1, y $p75^{NTR}$ y TrkA en células PC12. Tubulina fue utilizado como control de carga.

C) Inmunoblot representativo mostrando la cinética de expresión de TDAG51 en extractos totales de células MN1 tratadas con NGF (100ng/ml) a diferentes tiempos. Los datos se expresan relativizados a tubulina y expresados como veces de cambio relativas a la condición sin estimular. Resultados similares fueron obtenidos en n=3 ensayos independientes.

A pesar de observarse un aumento significativo en los niveles de proteína TDAG51 en las células MN1 luego de la estimulación con NGF (**Fig. 24A y 24B**), este aumento no requiere de síntesis *de novo* de ARNm. Realizando una extracción de ARN de extractos de células MN1 estimuladas con NGF a distintos tiempos, no encontramos un aumento en los niveles de ARN mensajero para TDAG51 (**Fig. 24C**), lo que sugiere que el aumento en los niveles de proteína se debería a procesos post-transcripcionales.

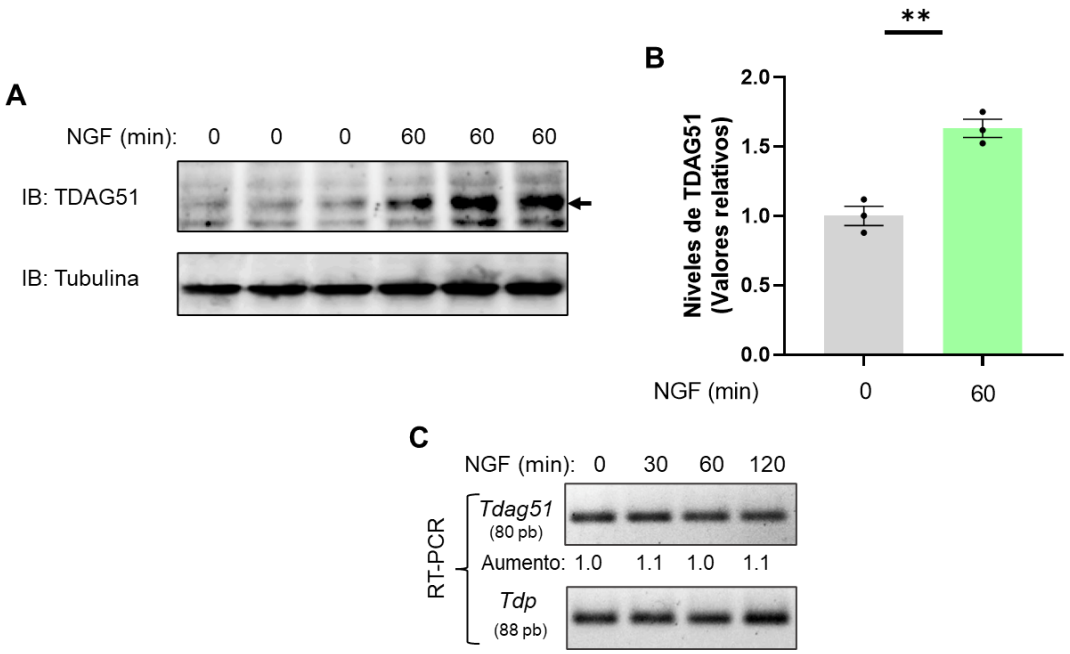

Figura 24. **NGF produce un aumento en los niveles de proteína, pero no de ARNm de *Tdag51.***

A) Inmunoblot mostrando la expresión de TDAG51 en n=3 lisados independientes de células MN1 tratadas con NGF por 60 minutos.

B) Cuantificación de los niveles de expresión de proteína TDAG51 en lisados totales de células MN1 tratadas o no con NGF por 60 minutos. Los valores se muestran normalizados a tubulina y expresados como veces de cambio respecto a la condición control sin estimular. Los resultados se presentan como media±sem **p<0.01 por t Student.

C) Expresión de ARNm de *Tdag51* por análisis de RT-PCR de células MN1 tratadas con NGF por distintos tiempos. Los valores son relativizados a la expresión del gen control *Tbp* y expresados como veces de aumento respecto a la condición control sin estimular. El tamaño del producto de PCR amplificado es expresado como pares de bases (pb). Resultados similares se obtuvieron en n=3 ensayos independientes.

La disminución de TDAG51 permite la activación de AKT dependiente de GDNF aún en presencia de NGF

Con el objetivo de determinar si el aumento de los niveles de proteína TDAG51 por la inducción de NGF podría inhibir la fosforilación de AKT dependiente de GDNF/RET, evaluamos las consecuencias de tratar a las células MN1 con NGF previo a

la estimulación con GDNF. Para llevar a cabo este análisis, las células MN1 fueron pretratadas durante 2 horas con NGF, en condiciones de deprivación de suero, y luego estimuladas por 15 minutos con GDNF. Luego se analizaron los niveles de fosforilación de AKT (pAKT) por western blot en extractos celulares provenientes de células MN1 tratadas con NGF, GDNF o NGF + GDNF (**Fig. 25A**). Nuestros resultados mostraron que mientras que el tratamiento con GDNF indujo la activación de AKT, el pretratamiento con NGF produjo un efecto atenuador de la activación de AKT dependiente de GDNF (**Fig. 25A**), indicando una regulación cruzada de las 2 vías de señalización. De acuerdo con la ausencia de expresión de TrkA en estas células, la estimulación con NGF no produjo una activación de la vía AKT **(Fig.25A).**

Para determinar si la inducción de la expresión de TDAG51 por NGF podría mediar la inhibición de AKT inducida por GDNF analizamos la activación de esta vía en células en las que la expresión de TDAG51 fue suprimida con un plásmido de interferencia *shTdag51*. Las células parentales o *shTdag51* fueron tratadas, en condiciones de deprivación de suero, con NGF (100ng/ml) por 2 horas y luego estimuladas con GDNF (50 ng/ml) por 15 minutos. Los extractos celulares fueron analizados para determinar los niveles de fosforilación de AKT por inmunoblot (**Fig.25B**). Encontramos que la reducción de los niveles de TDAG51 potenció la activación de AKT inducida por GDNF aún en presencia de altas concentraciones de la neurotrofina NGF, indicando que TDAG51 media el efecto inhibidor de NGF sobre la activación de AKT en respuesta a GDNF (**Fig. 25C**).

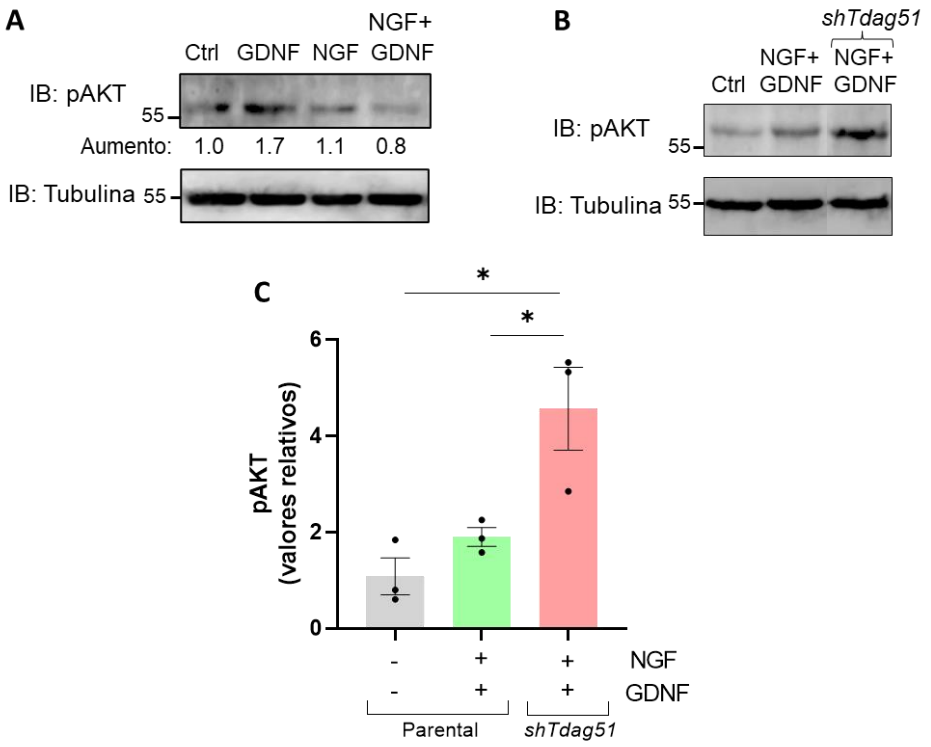

Figura 25. **TDAG51 media el efecto inhibidor de NGF sobre la activación de AKT en respuesta a GDNF.**

A) Inmunoblot de pAKT a partir de extractos de células MN1 estimuladas por 15 min con GDNF (50ng/ml), pretratadas o no con NGF (100ng/ml) por 2 horas. Los valores fueron relativizados a tubulina y expresados como veces de aumento respecto de la condición control. Se muestra imagen representativa de n=2 ensayos independientes.

B) Inmunoblot de pAKT de extractos totales de células MN1 parentales o *shTdag51* pretratadas con NGF (100ng/ml) y luego estimuladas con GDNF (50ng/ml) por 15 minutos. Tubulina se utilizó como control de carga. Imagen representativa de n=3 ensayos independientes.

C) Gráfico de cuantificación de niveles de pAKT en extractos de células parentales y *shTdag51* pretratadas con NGF y estimuladas con GDNF. Los valores fueron relativizados al control de carga y expresados como incremento respecto de la condición control. Los resultados se muestran como media±sem de n=3 ensayos independientes. *p<0.05 por ANOVA seguido test de Tukey.

Esto nos llevó a plantear que TDAG51 estaría funcionando como un mediador entre las señales de activación de la vía de sobrevida (GDNF/AKT) y las vías de inducción de muerte (NGF/Caspasa 3). Basados en esta observación decidimos evaluar el efecto de

TDAG51 en el proceso de protección de GDNF ante la activación de muerte inducida por neurotrofinas.

Trabajos previos han establecido que NGF secretado por astrocitos reactivos inducen la muerte celular apoptótica a través de $p75^{NTR}$ en motoneuronas y en la línea celular MN1 por un mecanismo que involucra la formación de óxido nítrico [14], [180], [181]. Debido a esto, decidimos utilizar el donor de óxido nítrico NOC-18 para inducir las condiciones de apoptosis dependientes de NGF en nuestro modelo celular. Mediante análisis de inmunofluorescencia contra Caspasa 3 activa determinamos que la presencia de NOC-18 en la concentración evaluada no generó *per se* un aumento en el número de células apoptóticas, sin embargo, generó las condiciones para que el tratamiento con NGF induzca un aumento significativo de células MN1 apoptóticas (positivas para Caspasa 3 activa) respecto a la condición control y al grupo tratado solamente con NOC-18 (**Fig. 26A y 26B**).

Para determinar el rol de TDAG51 en la protección de GDNF ante el efecto apoptótico inducido por el tratamiento con NOC-18 junto a NGF transfectamos células MN1 con el plásmido que interfiere la expresión de *Tdag51*. Las células fueron expuestas durante 24 horas a NGF junto a NOC-18 en ausencia o presencia de distintas concentraciones de GDNF, fijadas con 4% PFA y analizadas por inmunofluorescencia para detectar Caspasa 3 activa. Observamos, que mientras en las células parentales, una concentración baja de GDNF (10 ng/ml) no produjo un efecto protector sobre la muerte inducida por NGF/$p75^{NTR}$, la disminución de los niveles de TDAG51 aumentó significativamente la capacidad protectora de GDNF (**Fig. 26C**).

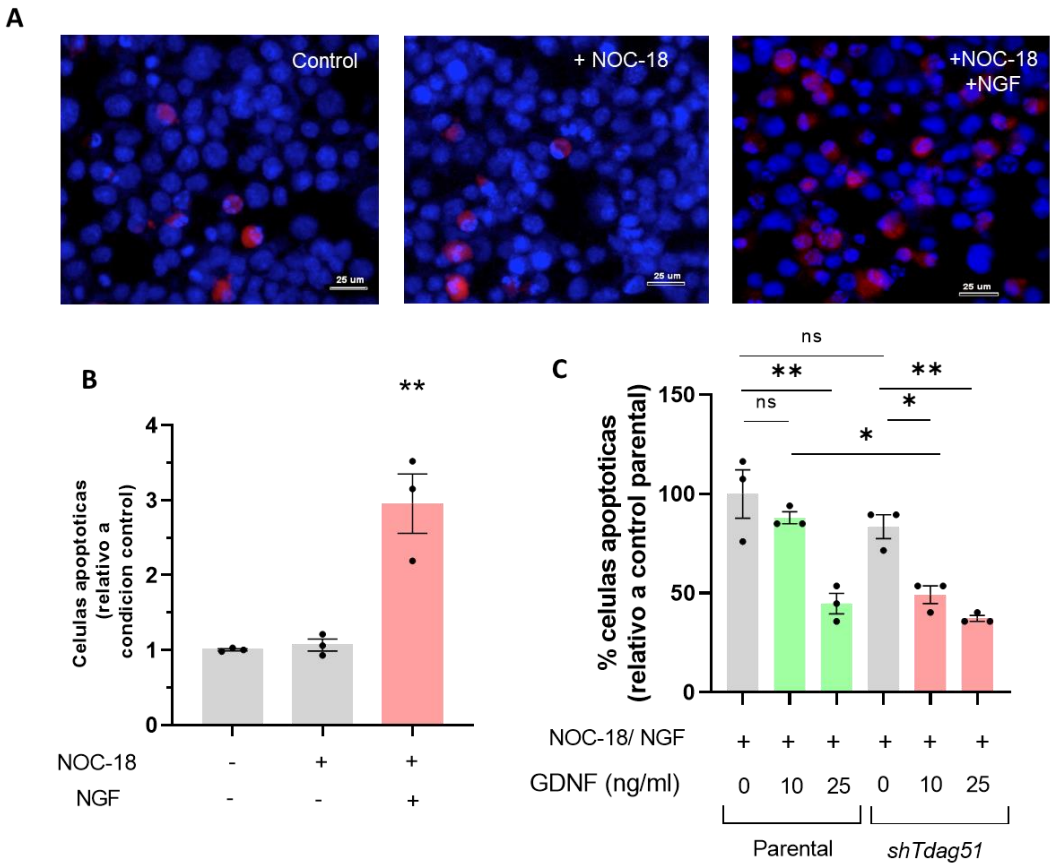

Figura 26. **En presencia de la señalización de muerte disparada por NGF/p75^{NTR}/NOC-18, la eliminación de *Tdag51* potencia la sobrevida neuronal inducida por GDNF**

A) Fotomicrografías de células MN1 marcadas contra Caspasa 3 activa (rojo) y DAPI (azul). Las células fueron mantenidas por 24h en ausencia de soporte trófico (control), el donor de óxido nítrico (NOC-18) o la combinación de condiciones junto a NGF (100ng/ml). Imágenes representativas de las distintas condiciones de n=3 ensayos independientes. Escala 25 µm

B) Cuantificación del número de células MN1 apoptoticas representado en A. Los valores se expresan como veces de incremento relativos a la condición control. Los resultados se expresan como media±sem para n=3 ensayos independientes. **p<0.01 por ANOVA seguido de test de Tukey.

C) Cuantificaciones del porcentaje de células MN1 parentales y *shTdag51* apoptoticas expresando Caspasa 3 activa. Las células fueron tratadas por 24 horas con NGF (100ng/ml) y NOC-18 (10 µM) en ausencia o presencia de dos concentraciones de GDNF (10 o 25 ng/ml). Los resultados se muestran como la media±sem de n=3 ensayos independientes. *p<0.05, **p<0.01 por ANOVA seguido de test de Tukey.

Nuestros resultados mostraron que en la ausencia de GDNF, la disminución de TDAG51 no produjo un efecto significativo sobre la inducción de muerte por NGF/NOC18, lo que indica que TDAG51 no participa directamente en la inducción de la vía apoptótica inducida por NGF, sino que es necesario para suprimir la señalización de sobrevida de AKT inducida por GDNF.

En conjunto, nuestros resultados nos llevan a proponer un mecanismo de "crosstalk competitivo" en el cual TDAG51 media el equilibrio entre la señalización pro-apoptótica promovida por NGF/$p75^{NTR}$ y la señalización de sobrevida mediada por GDNF/RET en células neuronales MN1 **(Fig. 27).**

DISCUSION

Los factores neurotróficos (FN) desempeñan un rol clave durante el desarrollo del sistema nervioso, ya que se encuentran involucrados en el control de un amplio espectro de procesos biológicos, tales como la proliferación, sobrevida, migración y diferenciación celular [5]. Por lo que un control fino sobre el momento y el lugar en el que estos factores gatillan su actividad resulta crítico para el apropiado funcionamiento y desarrollo del sistema nervioso. Es así que a lo largo de la evolución han surgido distintos mecanismos capaces de regular la intensidad y duración de las señales desencadenadas por los factores neurotróficos en contextos celulares específicos.

A lo largo del desarrollo embrionario, un proceso de muerte celular programada (PCD del inglés *Programmed Cell Death*) asegura que de la gran cantidad de neuronas que fueron producidas durante las etapas embrionarias sean seleccionadas únicamente aquellas que hayan establecido sus conexiones sinápticas correctas y dispongan de un soporte trófico apropiado. Es así, que luego de esta etapa, solo alrededor del 50% de las motoneuronas producidas sobreviven y son mantenidas hasta estadios posteriores del desarrollo [26]. A pesar de que aún no se conoce completamente la manera en la cual las neuronas son seleccionadas, este proceso resulta regulado por la presencia de factores secretados por tejidos blanco o distintas células del entorno, y por la capacidad de responder a estos. En línea con esto, se ha demostrado que el músculo esquelético secreta factores neurotróficos que promueven la sobrevida de motoneuronas durante este período clave del desarrollo. [78], [143], [182], [183], [184]. La gran cantidad de factores neurotróficos involucrados en el mantenimiento y desarrollo de las motoneuronas [185] evidencia el alto grado de complejidad de los mecanismos de señalización que ocurren al mismo tiempo en la célula.

GDNF es un potente factor de sobrevida de diferentes poblaciones neuronales del sistema nervioso periférico y central, incluyendo las motoneuronas de la médula espinal. Sin embargo, mientras los mecanismos de señalización a través de los cuales GDNF promueve la sobrevida han sido ampliamente estudiados, los mecanismos moleculares a través de los cuales se produce una regulación de estos efectos anti-apoptóticos permanecen aún poco claros.

En este capítulo de tesis demostramos que TDAG51 es una proteína capaz de inhibir de forma específica la activación de AKT mediada por GDNF, y no así la activación de la vía de señalización MAPK/ERK1/2 [**Fig. 16**]. La estimulación del sistema GDNF/RET promueve la localización de TDAG51 a la membrana plasmática, particularmente a dominios específicos de membrana que contienen a las balsas lipídicas, a través de un mecanismo dependiente de PI3K [**Fig. 17**]. Esta fracción de membrana es la misma fracción en la cual se produce el reclutamiento y activación del receptor tirosina kinasa RET, el cual da comienzo a la señalización por GDNF. Estos resultados sugieren que como se ha demostrado para otros integrantes de la familia, TDAG51, por intermedio de su dominio PH (Pleckstrin Homology Domain) podría estar inhibiendo la activación de AKT a través de un mecanismo de competencia por su unión a PIP_3 en la membrana plasmática [169], [172]. Como consecuencia de este efecto sobre AKT encontramos que la sobreexpresión de TDAG51 puede además afectar la protección de GDNF ante la muerte apoptótica desencadenada por la deprivación de suero [**Fig. 19**]. Además, encontramos que la disminución, mediante un plásmido de interferencia de *Tdag51* potencia la activación de AKT por GDNF [**Fig. 20**] y la capacidad de proteger de la apoptosis por deprivación de suero a las células derivadas de motoneuronas MN1 [**Fig. 21**].

En las neuronas de vertebrados, la activación de la vía PI3K/AKT en respuesta a la estimulación con factores neurotróficos media la inhibición de las principales vías de inducción de la apoptosis. En respuesta a la deprivación de factores tróficos u otras señales de muerte se produce la homo-oligomerización y translocación desde el citoplasma hasta la membrana exterior de la mitocondria de la proteína Bax. Esta proteína pertenece a la familia de proteínas con repeticiones de dominio homólogos a Bcl2 que poseen roles pro-apoptoticos. Una vez que se produce la llegada de Bax a la mitocondria se dispara la creación de poros que permiten el pasaje de Citocromo C (Cyt C) al citosol. Cyt C se une a proteínas facilitadoras de la apoptosis que producen la activación de Caspasa 9 que a su vez produce la activación de caspasas efectoras como Caspasa 3, que lleva a la muerte por apoptosis [185]. Además, la activación de $p75^{NTR}$, asociándose con alguna de sus proteínas interactoras como NRAGE, aumenta los niveles de Jun kinasa (JNK) activa, la cual induce la vía de Bax y la activación de Caspasa 3 [186].

Nuestros resultados también demostraron que la estimulación de células MN1 con altas concentraciones de NGF, un tratamiento que promueve la apoptosis a través de la

señalización de $p75^{NTR}$, induce la expresión de TDAG51 [**Fig. 23 y 24**] llevando a la restricción de la activación de AKT gatillada por GDNF/RET.

De esta manera, TDAG51 actuaría como un mediador clave del balance entre la señalización pro-apoptótica de NGF/$p75^{NTR}$ y la señal de sobrevida activada por GDNF/RET en células MN1, lo que nos llevó a proponer el modelo descripto en la **Fig.27**. TDAG51 es una proteína citoplasmática que posee un dominio PH de unión a PIP_3. La activación de la proteína PI3K inducida por GDNF/RET, genera un aumento de los niveles de PIP_3 en la membrana plasmática. Este incremento de PIP_3 en las balsas lipídicas resulta en la localización de AKT en la membrana a través de su dominio PH [167], [169]. Una vez posicionado en la membrana plasmática, AKT es fosforilado y como consecuencia activado. Dado que TDAG51 a través de su dominio PH compite con AKT por su unión a PIP_3, el incremento en los niveles de TDAG51, inducido por factores pro-apotóticos, resulta en la inhibición de la activación de AKT, inducida por factores que estimulan la sobrevida. En motoneuronas, el aumento en los niveles de proteína de TDAG51 generados como consecuencia de la activación de $p75^{NTR}$ por NGF produciría la inhibición de la vía de sobrevida PI3K/AKT inducida por GDNF/RET (**Fig. 27**).

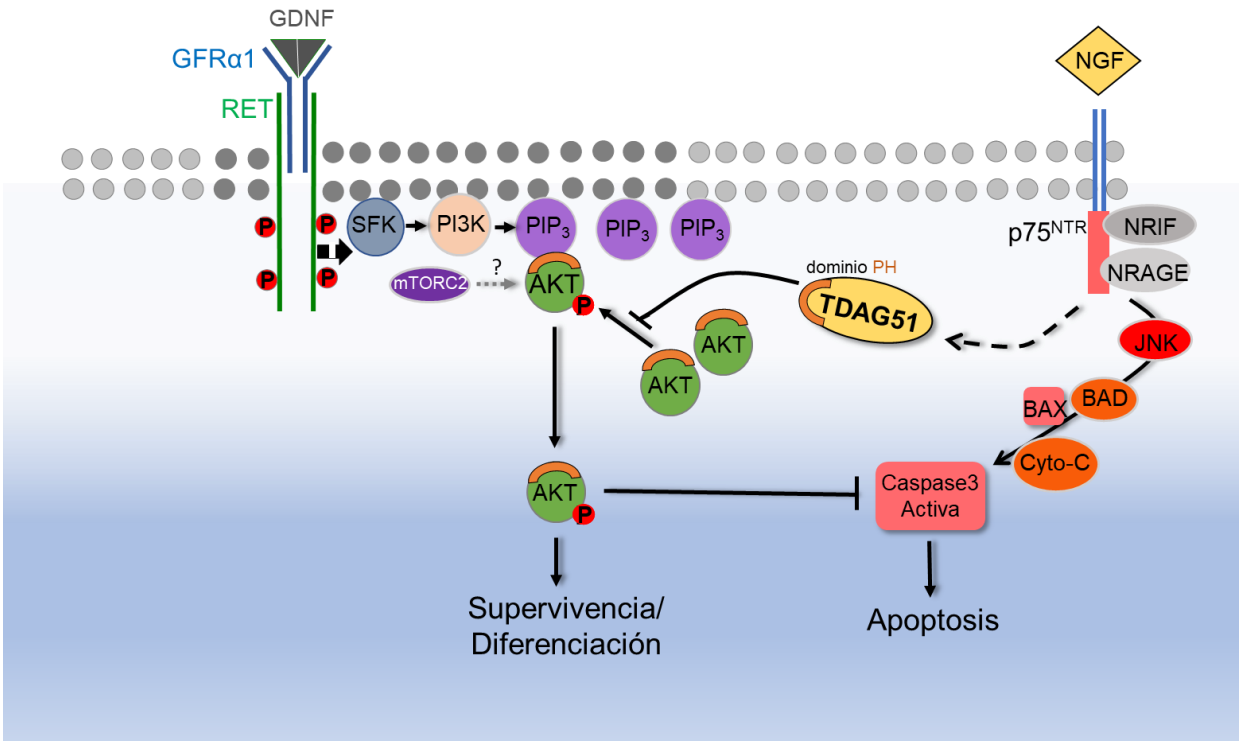

Figura 27. **Modelo propuesto para el rol de TDAG51 en el "crosstalk competitivo" entre GDNF/RET y NGF/p75^{NTR}**

Diagrama mostrando la interacción de la señalización de NGF/p75^{NTR} y GDNF/RET en células MN1. La apoptosis inducida por NGF/p75^{NTR} requiere de TDAG51 para efectuar la inhibición de la señalización de AKT inducida por GDNF/RET. Mecanisticamente, nuestros resultados indican que TDAG51 antagoniza con AKT mediante un mecanismo competitivo por la unión a PIP_3. Cuando se produce una disminución de TDAG51, GDNF/RET es capaz de inhibir, mediante la vía de AKT, la activación de la apoptosis.

Nuestros resultados están de acuerdo con trabajos previos que muestran la inducción de la fosfatasa PTEN en respuesta a proNGF/p75^{NTR}. PTEN es una fosfatasa capaz de desfosforilar e inactivar a PI3K, un mecanismo a través del cual se produce la supresión de la señal de sobrevida de AKT mediada por BDNF/TrkB en neuronas hipocampales. Al mismo tiempo, este trabajo revela la importancia del control endógeno del balance entre las señales de sobrevida y de apoptosis celular [177]. Por lo tanto, nuestros resultados expanden el conocimiento sobre los mecanismos a través de los cuales la señalización desencadenada por p75^{NTR} puede competir con la activación de la vía de sobrevida inducida por AKT en diferentes poblaciones neuronales del sistema nervioso.

Estudios previos han mostrado que, dependiendo del contexto celular, TDAG51 posee tanto funciones anti-apoptóticas como pro-apoptóticas [165]. Como un factor pro-apoptótico, TDAG51 se encuentra involucrado en la inducción de la muerte en células T [155], y se ha descripto que un aumento de TDAG51 produce apoptosis mediada por la disminución de adhesión en células endoteliales vasculares [157]. En línea con nuestros resultados, se ha reportado que la deficiencia de TDAG51 protege a podocitos frente al daño inducido por alta glucosa a través de la activación dependiente de AKT-GSK3β del factor nuclear Nrf2 (nuclear E2-related factor 2) [187]. En otro sistema se ha observado que la sobreexpresión de TDAG51 promueve la apoptosis de células de músculo cardiaco no sólo por la inhibición de AKT sino a través de la activación de la vía de p53 [188].

TDAG51 se encuentra expresado en neuronas del sistema nervioso central [155], [189], y diversos estudios han descripto la importancia de TDAG51 en la apoptosis neuronal [156], [190], [191]. En particular, se ha demostrado que la disminución del mensajero de *Tdag51* reduce la apoptosis y el daño por estrés oxidativo causado por la deprivación de oxígeno/glucosa y reoxigenación en cultivos de neuronas hipocampales,

al aumentar la activación de Nrf2 a través de AKT-GSK3β [191]. En línea con esto, nuestras observaciones muestran que la disminución de TDAG51 protege a las células MN1 de la apoptosis inducida por $p75^{NTR}$ y el estrés oxidativo desencadenado por el generador de óxido nítrico NOC-18, posiblemente a través de un mecanismo que podría estar involucrando la fosforilación de GSK3β mediada por AKT y la posterior activación de Nrf2.

Estudios previos han mostrado expresión alterada de TDAG51 en la corteza temporal de pacientes con epilepsia y en médula espinal, en un modelo de esclerosis lateral amiotrófica [161], [170]. Además, TDAG51 se encuentra altamente expresado en corteza cerebral e hipocampo luego de exposición a estrés crónico y en el hipocampo luego de una isquémia [192], [193]. Es interesante resaltar que estudios previos también sugieren que TDAG51 podría estar involucrado en la patogénesis de la esclerosis lateral amiotrófica, incrementando la vulnerabilidad de las motoneuronas [171].

Durante el desarrollo del sistema nervioso, la perdida fisiológica de neuronas contribuye a eliminar el exceso de neuronas producidas durante la neurogénesis [26]. En particular, en la etapa embrionaria donde ocurre normalmente el proceso de muerte celular programada, las motoneuronas que expresan el receptor $p75^{NTR}$ sufren apoptosis en respuesta a NGF o proNGF secretado por astrocitos activados [11], [12], [13], [14]. Desbalances en este proceso, o su reactivación posterior en el desarrollo, resulta fisiológicamente inapropiado para el ensamblado y mantenimiento del sistema nervioso y puede contribuir a la neurodegeneración y a desórdenes asociados a defectos del neurodesarrollo [194], [195], [196]. Por lo tanto, dilucidar los mecanismos moleculares que contribuyen al control de la apoptosis neuronal puede contribuir al entendimiento de los principios básicos que rigen el neurodesarrollo y las neuropatologías [197]. Por esto, la habilidad de NGF/$p75^{NTR}$ de inducir TDAG51 y así suprimir la activación mediada por GDNF de AKT podría desempeñar un rol importante durante el período de muerte de motoneuronas durante el desarrollo, pero también durante condiciones patológicas como la axotomía de motoneuronas [91], [198] y la esclerosis lateral amiotrófica [14]. En su conjunto, nuestros resultados brindan nuevos conocimientos sobre el mecanismo de acción de TDAG51, a la vez que contribuyen a comprender cómo la interconexión y el diálogo entre las señales pro-apoptóticas y anti-apoptóticas determina el resultado biológico (sobrevida/muerte) de la motoneurona.

CONCLUSIONES GENERALES

La señalización inducida por factores neurotróficos, a través de sus receptores tirosina kinasa (RTK), desempeña un papel crítico controlando el desarrollo, mantenimiento y función del sistema nervioso. Mientras que la sobreactivación de la señalización inducida por RTK, debido a fallas en los mecanismos de desactivación de estas vías, se asocia con procesos tumorales, también es posible que alteraciones en los mecanismos de control neurotrófico puedan contribuir a la patogénesis de enfermedades del neurodesarrollo y a trastornos neurodegenerativos [7].

En este trabajo de tesis doctoral hemos ampliado nuestro conocimiento de los mecanismos a través de los cuales ciertas proteínas moduladoras (como por ejemplo Sprouty4 y TDAG51) controlan vías de señalización activadas por los factores neurotróficos y sus receptores tirosina kinasas. Las señales de "crosstalk" identificadas y los resultados obtenidos en este trabajo expanden el conocimiento sobre los mecanismos regulatorios de la señalización neurotrófica.

En el primer capítulo de esta tesis demostramos que la proteína Sprouty 4 es un mediador clave del efecto inhibitorio ejercido por los glucocorticoides sobre la actividad y la función neurotrófica. En particular, encontramos que el GC sintético DEX regula la expresión de Sprouty4, un retro-regulador negativo de la vía de Ras/Erk1/2/MAPK activada por NGF y TrkA. Más precisamente demostramos que el pretratamiento de células de tipo neuronal PC12 y de neuronas hipocampales primarias con DEX produce una atenuación de la vía de Trk/Ras/Erk1/2/MAPK inducida por neurotrofinas. Además, mediante ensayos de pérdida de función demostramos que Sprouty4 inhibe la diferenciación de células PC12 y la complejidad dendrítica de neuronas hipocampales inducidas por NGF y BDNF, respectivamente.

El estrés crónico es una de las principales causas de depresión. En relación a esto, animales expuestos a GC de manera crónica mostraron un incremento en comportamientos relacionados a la depresión y la ansiedad. [109]. Una variedad de estudios se ha centrado en el rol que juegan las vías de BDNF/TrkB y Erk1/2/MAPK en la patogénesis y el tratamiento de la depresión [111], [112], [113], [114], [115]. En este

sentido, ha sido reportado que la vía de MAPK/CREB está desregulada en regiones del cerebro implicadas en conductas depresivas por estrés crónico, como por ejemplo la corteza prefrontal y el hipocampo [116]. Además, la señalización de BDNF a través de su receptor TrkB es requerida para el efecto de las drogas antidepresivas [111], [117]. De hecho, muchas drogas antidepresivas normalizan la vía de señalización BDNF-MAPK-CREB en el hipocampo e inducen cambios plásticos para disminuir los síntomas depresivos [111], [118], [119]. Por lo tanto, la cascada BDNF-MAPK-CREB representa un blanco para el desarrollo de fármacos antidepresivos [113]. Así, nuestros datos sugieren que Sprouty4 podría resultar un potencial blanco para tratamientos antidepresivos. Además, la relación entre los glucocorticoides, la función de BDNF y los reguladores negativos de la vía Ras/Erk1/2/MAPK, como Sprouty4, representa una vía prometedora para comprender la contribución de la señalización de TrkB mediada por neurotrofinas en los trastornos del estado de ánimo.

En el segundo capítulo, demostramos que TDAG51 desempeña un papel clave en el control de la vía de sobrevida PI3K/AKT inducida por GDNF. En particular, demostramos que la proteína TDAG51 es capaz de inhibir la activación de la vía de PI3K/AKT, pero no la de Erk1/2/MAPK, en respuesta a GDNF/RET. La eliminación de *Tdag51,* mediante técnicas de shRNA, potencia la activación de AKT y la sobrevida de la línea celular MN1 derivada de motoneuronas en respuesta a GDNF y RET. La estimulación de células MN1 con GDNF promueve la localización y el reclutamiento de TDAG51 a microdominios de membrana plasmática resistentes a detergentes, a través de un mecanismo dependiente de PI3K. Por lo tanto, a través de su relocalización en estos microdominios de membrana, TDAG51 podría antagonizar la activación de AKT al competirle su unión a PIP_3.

Además, encontramos que la expresión de TDAG51 es inducida por altas concentraciones de NGF y no así por GDNF, descartando un mecanismo de retroalimentación negativa. La inducción de la expresión de TDAG51 por NGF en este sistema ocurriría a través del receptor de baja afinidad para neurotrofinas $p75^{NTR}$, el cual se expresa en estas células en ausencia de TrkA y está involucrado en la activación de cascadas de señalización relacionadas con la muerte celular apoptótica. Nuestros hallazgos también demuestran que la estimulación de células MN1 con NGF, un tratamiento que en condiciones oxidativas promueve la apoptosis de las neuronas motoras

dependiente del receptor de neurotrofina $p75^{NTR}$, induce TDAG51 y restringe de esta manera la señalización de AKT mediada por GDNF/RET. La eliminación de *Tdag51* potenció la capacidad de GDNF de activar AKT y proteger a las células MN1 de la muerte celular dependiente de NGF y $p75^{NTR}$. Así, nuestros resultados nos llevaron a proponer un mecanismo de "crosstalk competitivo" en el cual TDAG51 media el equilibrio entre la señalización pro-apoptótica promovida por NGF/$p75^{NTR}$ y la señalización de sobrevida mediada por GDNF/RET en células neuronales MN1.

Dilucidar los mecanismos moleculares subyacentes al control de la apoptosis neuronal puede contribuir a nuestra comprensión de los principios básicos que gobiernan el neurodesarrollo y los procesos neuropatológicos [197]. La capacidad de NGF/$p75^{NTR}$ para inducir TDAG51 y así suprimir la activación de AKT dependiente de GDNF puede ser potencialmente relevante durante el período de muerte celular programada que ocurre durante el desarrollo embrionario de las motoneuronas de la médula espinal, pero también en condiciones patológicas como la axotomía de la neurona motora [91], [198] y en modelos de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) [14]. Por lo tanto, nuestros hallazgos brindan información sobre el modo de acción de TDAG51, al mismo tiempo que contribuyen a expandir nuestra comprensión de cómo el balance entre las vías de señalización apoptótica y anti-apoptóticas podrían determinar la muerte o la sobrevida de las motoneuronas.

El conjunto de resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral nos lleva a proponer nuevos mecanismos de regulación de la actividad neurotrófica. Los mecanismos propuestos en este estudio son un claro ejemplo de la importancia del contexto celular y la coordinación espacio-temporal de la señalización neurotrófica. La regulación cruzada entre vías de señalización neurotróficas conforma una red exquisitamente regulada que determina el estado celular, con implicancias en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso.

Comprender los mecanismos subyacentes a la actividad de estos factores es crucial para el desarrollo de nuevas terapias destinadas a tratar enfermedades asociadas con desequilibrios en los niveles de actividad de los receptores tirosina kinasa. El enfoque en estos mecanismos como potenciales blancos terapéuticos podría utilizarse para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema nervioso, que van desde trastornos neurodegenerativos como la ELA hasta trastornos conductuales como la depresión.

MATERIALES Y METODOS

Líneas celulares, proteínas recombinantes e inhibidores

La línea MN1 es una línea celular inmortalizada derivada de motoneuronas embrionarias de ratón capaz de responder a GDNF vía sus receptores GFRa1 y RET. Esta línea fue cultivada en medio DMEM (Dulbecco´s modified Eagle´s médium) suplementada con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Invitrogen), Hepes 10mM (Invitrogen) [54], [199]. La línea celular HEK-293T fue crecida en medio DMEM suplementado con 10% SFB. Las células PC12 son una línea celular de feocromocitoma de rata que responden a NGF, por lo que son ampliamente utilizadas como un modelo celular para estudiar las vías de señalización y el crecimiento neurítico inducido por esta neurotrofina. La línea PC12 fue cultivada en DMEM suplementada con 5% de suero de caballo y 10% SFB.

El factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y el dominio extracelular del receptor GFRa1 (GFRa1-Fc) fueron comprados en R&D Systems. NGF fue obtenido de Promega. El generador de óxido nítrico NOC-18, la dexametasona (DEX) y el inhibidor del receptor de glucocorticoides RU486 (2uM) fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, Missouri, EEUU). Los inhibidores de las vías MEK y PI3K (PD98059 y LY294002 respectivamente) fueron adquiridos en Calbiochem y usados a una concentración de 50 uM.

RT-PCR

La expresión de los RNA mensajeros de *Sprouty4, TrkA*, *Tdag51* y *TATA box-binding protein* (*Tbp*) fueron analizados por PCR semicuantitativa a partir del RNA total aislado de células PC12, MN1 y cultivos primarios de neuronas hipocampales utilizando el kit de extracción NucleoSpin (Macherey-Nagel, Duren, Alemania). cDNA fue sintetizado utilizando M-MLV transcriptasa reversa (Invitrogen) y oligodT (Macrogen, Seoul, Korea). El cDNA fue amplificado utilizando los siguientes sets de primers: *Sprouty4* forward 5´-GCCCATTGACCAGATGAAGAC-3´; reverse 5´-TCCAGTGGCTTACAGTGGAC-3´; *TrkA*: forward 5´-CTGCAAGGACAAACAGAACAC-3´; reverse 5´-GTGGTTGGCTTCGTCTGAGTA-3´: *TATA box binding protein* (*Tbp*): forward, 5´-GGG GAG CTG TGA TGT GAA GT-3; reverse, 5´-CCA GGA AAT AAT TCT GGC TCA-3´; *Tdag51*: forward, 5´-GAG TGC TGG AAA GCG AAG C-3´; reverse 5´ -CAG TAG CCC TTC CTC GGT GA-3´.

Las muestras fueron corridas en un gel de agarosa y reveladas y cuantificadas utilizando el software Gel Pro Analyzer.

Transfección de células y plásmidos

Las células PC12 fueron transfectadas usando X-treme GENE (Roche). Utilizando presión de selección con el antibiótico neomicina se generó un pool de células estables PC12-Myc-Sprouty4-Y53A.

La transfección de neuronas hipocampales primarias de rata fue realizada utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) en 300uL de medio Neurobasal conteniendo 1 µg de DNA plasmídico por pocillo en una placa multi-well 24 conteniendo 1.2 X 10^5 celulas/well.

Para los ensayos de downregulación, las células PC12 y las neuronas hipocampales fueron transfectadas con 1 µg de shRNA-control o shRNA-*Sprouty4* que expresan la proteína GFP. Ambos constructos fueron comprados en OriGene (Rockville, MD, EEUU). El vector retroviral pGFP-V-RS fue usado para la expresión de shRNA contra Sprouty4 de rata. La secuencia blanco de *Sprouty4* fue 5´-GTGCAAGGTATCTTCTACCACTGTACTAA-3´, la cual corresponde a los nucleótidos 610-638 de *Sprouty4* de rata. La especificidad del knockdown de Sprouty4 fue confirmada previamente por PCR en tiempo real y western blot [108].

Para los experimentos de sobreexpresión, las células PC12 fueron cotransfectadas con Myc-Sprouty4-Y53A (0.9ug) y un vector de expresión GFP (0.1ug) por well en una placa multiwell de 24 pocillos conteniendo entre 0.6 y 0.75 X 10^5 células/well. El constructo Myc-Sprouty4-Y53A fue provisto por el Dr. Akihiko Yoshimura (Universidad Kyushu, Fukuoka, Japón).

Células HEK-293 y MN1 fueron transfectadas utilizando Polyethylenimine-PEI (Polysciences). Los plásmidos de *Tdag51*-shRNA-GFP y Flag-TDAG51 fueron obtenidos de Cellogenetics Inc. El plásmido de la proteína fluorescente GFP fue obtenido de Clontech. Para los ensayos de perdida de función, las células MN1 transfectadas con un plásmido shRNA fueron seleccionadas por presión de selección con puromicina para enriquecer el pool de células transfectadas.

El vector de expresión shRNA-*Tdag51*-GFP fue comprado en Cellogenetics Inc. El vector retroviral pRetro-U6G shRNA fue usado para la expresión de shRNA-*Tdag51* dirigido a *Tdag51* de ratón. La secuencia blanco de shRNA-*Tdag51*-1 (sh1) es 5′-GCT GAA GGA AGG AGT GCT GGA-3´ y corresponde a los nucleótidos 578-598 de ARNm

de *Tdag51* de ratón. La secuencia blanco del shRNA-*Tdag51*-2 (sh2) es 5´-AGG AAG GGC TAC TGC TCA TAC-3´ que corresponde a los nucleótidos 655-675 del ARNm de *Tdag51* de ratón. La eficiencia de interferencia de los plásmidos fue confirmada por Western Blot a partir de extractos de células HEK-293.

Utilizando puromicina como presión de selección se generó un pool de células estables MN1-shRNA-*Tdag51*-GFP.

Cultivo primario de neuronas hipocampales

Ratas (Sprague Dawley) fueron obtenidas del bioterio del Instituto de Biología Celular y Neurociencias, CONICET-UBA y neuronas hipocampales de día embrionario (E) 17.5 fueron disociadas manualmente y cultivadas en medio Neurobasal (Gibco) suplementado con B27 (Gibco), penicilina, estreptomicina y GlutaMax (Gibco) como se describió previamente [55].

Para la transfección, las neuronas hipocampales fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de 1.2 X 10^5 células /well. Los cultivos fueron crecidos por 3 días in vivo (DIVs) previo a la transfección.

Lisados totales y western blots

Las células fueron lisadas con buffer de lisis a 4°C (0.5% Tritón X-100, inhibidor de proteasas, ortovonadato de sodio 1mM y fluoruro de sodio 20mM). Los lisados fueron centrifugados y los sobrenadantes analizados por Western Blot [54]. Las membranas fueron escaneadas con un Storm 845 PhosphorImager (GE Healthcare Life Sciences), y las cuantificaciones fueron hechas con el software ImageQuant (Molecular Dynamics). Brevemente, las bandas fueron delimitadas manualmente y se generó un perfil de intensidad automático. Luego de restar el background la intensidad de banda fue medida. Los anticuerpos primarios fueron: Anti-Myc tag (1:2000; A190-105^a) de Bethyl Laboratories; anti-phospo Erk1/2/MAPK (p44/p42 1:3000; #9101, anti-Erk1/2 MAPK (p44/p42; 1:5000, #4695), anti-$p75^{NTR}$ (1:2000; D4B3, #8238), anti-pAKT (Ser 473, 9271; 1/1000), y anti-Caspasa 3 activa (Asp175, 9661, 1/1500) fueron adquiridos en Cell Signaling Technology; anti-Sprouty4 (1:800; H-100), anti-TDAG51, anti-phosphotyrosine (p-Tyr, clone PY99, sc-7020; 1/1000) y anti-RET (c-20, sc-1290; 1/1000) fueron obtenidos en Santa Cruz Biotechnology; y anti-alfa-tubulina (1:6000; T9026-DM1A) anti-Flag M2 antibody (F1804; 1/2500) de Sigma; anti-βIII-Tubulina (1/5000) de Promega; y anti-TrkA (AF1056; 1/800) de R&D Systems.

Ensayo de crecimiento de células PC12 y neuronas hipocampales

Las células PC12 fueron transfectadas con shRNA-control o shRNA-*Sprouty4*, o sobreexpresión de un dominante negativo Myc-Sprouty4-Y53A o vector vacío con un plásmido de expresión de GFP. Las células fueron sembradas en placa de 24 pocillos y pretratadas o no con dexametasona (DEX) 1uM por 16h en condiciones libres de suero. Luego, las células fueron incubadas por 24 horas en medio DMEM conteniendo NGF (50ng/ml). Luego, las células fueron fijadas con 4% paraformaldehido (PFA). El porcentaje de células diferenciadas con procesos más largos que uno o dos diámetros de su cuerpo celular fueron cuantificadas [200].

Los cultivos hipocampales fueron crecidos y transfectados a DIV3 con shRNA-control-GFP o ShRNA-*Sprouty4*-GFP. 24 horas después (DIV4) los cultivos fueron pretratados con DEX 10μM [102]. Luego, a DIV5 fue agregado BDNF (50ng/ml) en presencia de DEX. A las 48 horas posteriores al agregado de BDNF las neuronas fueron fijadas.

El número de neuritas primarias y puntos de bifurcación se calculó sobre las células GFP positivas que mostraron una morfología piramidal, con una dendrita principal gruesa y varias finas. Los procesos menores a 5μm no fueron considerados [55]. En todos los casos las imágenes fueron obtenidas con un microscopio invertido Olympus IX-81 con aumento de 20X.

Inmunofluorescencia

Para los ensayos de fosforilación de Erk1/2 (pErk1/2), cultivos primarios hipocampales o células PC12 fueron fijadas con PFA 4% conteniendo inhibidores de fosfatasas (ortovonadato de sodio 1 mM y fluoruro de sodio 20mM), permeabilizadas con 0.25% Triton X-100, bloqueadas con 10% suero de burro (Jackson ImmunoResearch), y luego incubados con diferentes anticuerpos primarios. Los anticuerpos usados en esta sección incluyen: anti-GFP (1:1000) de Invitrogen y anti-pErk1/2 (p44/p42; 1:500; 9109) de Cell Signaling Technology. Los anticuerpos secundarios fueron obtenidos en Jackson InmunoResearch (1:300).

Las células MN1 fueron fijadas por 20 minutos con 4% PFA, permeabilizadas por 10 minutos a temperatura ambiente con PBS y 0.3% Triton X-100. El bloqueo se realizó con PBS junto a 10% suero normal de burro y 0.2% Triton X-100. Luego, las células fijadas fueron incubadas durante 16h (ON, Over Night) con anticuerpos primarios. Los

siguientes anticuerpos fueron utilizados para inmunofluorescencia: anticuerpo policlonal anti-Caspasa 3 activa (Asp175, 9661, Cell signalling; 1/800) y anti TDAG51 (RN-6E2, SC-23866; 1/100). Anticuerpo fluorescente secundario (1/300) de Jackson Immuno Research. Las imágenes fueron obtenidas y analizadas usando microscopios invertidos Olympus IX-81 y Olympus IX-83.

Adquisición de imágenes y cuantificación

Las imágenes para la cuantificación de pErk1/2/MAPK fueron obtenidas con un microscopio invertido Olympus IX-81 con objetivo 20X. Las imágenes fueron obtenidas con los mismos parámetros en una resolución de 1360 X 1024 pixeles. Las imágenes fueron analizadas con Fiji ImageJ.

Ensayo de localización de TDAG51

Las células MN1 fueron cotransfectadas con un plásmido de sobreexpresión de TDAG51 con la etiqueta Flag y un plásmido de expresión de la proteína fluorescente GFP. Luego de deprivar a las células de suero por 16h, éstas fueron tratadas o no (grupo control) con GDNF (50ng/ml) por 15 minutos y luego fijadas con 4% PFA. La localización subcelular de TDAG51 fue evaluada por inmunofluorescencia utilizando un microscopio Olympus IX-83. La localización de TDAG51 en la membrana plasmática fue considerada positiva cuando se detectó mayor inmunoreactividad en la membrana que en el citoplasma. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa Fiji ImageJ 1.47v NIH (Olympus Viewer plugin).

Ensayo de muerte celular apoptótica

Para inducir la muerte celular por $p75^{NTR}$ las células MN1 fueron tratadas por 24h con NGF (100ng/ml) y el generador de óxido nítrico NOC-18 (10 μM) [14], [201]. Las células apoptóticas fueron detectadas por inmunodetección contra Caspasa 3 activa. Brevemente, las células MN1 fueron lavadas una vez con PBS, fijadas por 20 minutos a temperatura ambiente con 4% PFA, permeabilizadas por 10 minutos a temperatura ambiente con PBS conteniendo 0.3% Tritón X-100, bloqueadas in PBS con 10% suero normal de burro y 0.3% Tritón X-100. Luego, las células fijadas fueron incubadas a 4°C por una noche con anticuerpo anti-Caspasa 3 activa (1/800) seguido de incubación con anticuerpo secundario fluorescente (Jackson ImmunoResearch 1/300). Las imágenes fueron obtenidas y analizadas usando un microscopio invertido Olympus IX-81. Para

estimar la muerte celular en los distintos grupos, las células apoptóticas fueron normalizadas al número total de células identificadas con DAPI como marcador nuclear (Sigma). El porcentaje de células apoptóticas son presentadas como valores relativos a su grupo control. Las imágenes fueron adquiridas usando los mismos valores de saturación a una resolución 1360 X 1024 pixeles. Las imágenes fueron analizadas utilizando el software Fiji ImageJ 1.47v NIH. El fondo fue sustraído y se determinó el umbral de intensidad para todas las imágenes. Las células positivas fueron contadas de forma automatizada utilizando la función "Analyza Particle".

Ensayo de diferenciación neuronal

La diferenciación de células MN1 fue realizada en células transfectadas con plásmido control o shRNA-*Tdag51*-GFP. Luego de la transfección, las células fueron seleccionadas con puromicina para enriquecer el pool de células transfectadas. Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos tratadas con colágeno de rata (Millipore) y cultivadas con 1% SFB en DMEM suplementado con GDNF (100ng/ml) junto a GFRα1-Fc (300 ng/ml) [199]. Luego de 48h, las células fueron fijadas con 4% PFA y marcadas con faloidina conjugada con Alexa (Invitrogen). El número de células MN1 mostrando prolongaciones neuríticas mayores en longitud que un cuerpo celular fue cuantificado relativo al número de células control contando 10 campos al azar de 3 ensayos independientes. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio invertido Olympus IX-81.

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como media±sem o desvíos estándar según se indica en cada caso, la significancia se consideró $p<0.05$. El análisis estadístico se realizó en GraphPad Prim 8.0. Análisis por test t de Student o ANOVA de una vía seguida del respectivo test post-hoc fueron los estadísticos realizados. El número (n) de ensayos independientes y el test estadístico utilizado en cada caso están indicados en la leyenda de cada figura.

BIBLIOGRAFIA

[1] H. Park and M. Poo, “Neurotrophin regulation of neural circuit development and function,” *Nat Rev Neurosci*, vol. 14, no. 1, pp. 7–23, Jan. 2013, doi: 10.1038/nrn3379.

[2] A. M. Davies, “Regulation of neuronal survival and death by extracellular signals during development,” *EMBO J*, vol. 22, no. 11, pp. 2537–2545, Jun. 2003, doi: 10.1093/emboj/cdg254.

[3] M. R. Freeman, “Sculpting the nervous system: Glial control of neuronal development,” *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 16, no. 1. pp. 119–125, Feb. 2006. doi: 10.1016/j.conb.2005.12.004.

[4] T. Yagi, “Genetic basis of neuronal individuality in the mammalian brain,” *Journal of Neurogenetics*, vol. 27, no. 3. pp. 97–105, Sep. 2013. doi: 10.3109/01677063.2013.801969.

[5] L. F. Reichardt, “Neurotrophin-regulated signalling pathways,” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 361, no. 1473. Royal Society, pp. 1545–1564, Sep. 29, 2006. doi: 10.1098/rstb.2006.1894.

[6] G. Paratcha and F. Ledda, “GDNF and GFRα: a versatile molecular complex for developing neurons,” *Trends Neurosci*, vol. 31, no. 8, pp. 384–391, Aug. 2008, doi: 10.1016/j.tins.2008.05.003.

[7] F. C. Alsina, F. Ledda, and G. Paratcha, “New insights into the control of neurotrophic growth factor receptor signaling: Implications for nervous system development and repair,” *Journal of Neurochemistry*, vol. 123, no. 5. pp. 652–661, Dec. 2012. doi: 10.1111/jnc.12021.

[8] R. Levi-Montalcini, “The Nerve Growth Factor: thirty-five years later,” *EMBO J*, vol. 6, no. 5, pp. 1–145, 1987, doi: 10.1126/science.3306916.

[9] E. M. Shooter, “Early days of the nerve growth factor proteins,” *Annu Rev Neurosci*, pp. 601–629, 2000, doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.601.

[10] R. Lee, P. Kermani, K. K. Teng, and B. L. Hempstead, “Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins,” *Science (1979)*, vol. 294, no. 5548, pp. 1945–1948, Nov. 2001, doi: 10.1126/science.1065057.

[11] D. Matusica *et al.*, “Title Inhibition of motor neuron death in vitro and in vivo by a p75 neurotrophin receptor intracellular domain fragment,” 2015.

[12] F. Â. De Â Ric Sedel, C. Be, Â. Chade, and A. Triller, “Nerve growth factor (NGF) induces motoneuron apoptosis in rat embryonic spinal cord in vitro,” *Eur J Neurosci*, 1999.

[13] M. Domeniconi, B. L. Hempstead, and M. V. Chao, “Pro-NGF secreted by astrocytes promotes motor neuron cell death,” *Molecular and Cellular Neuroscience*, vol. 34, no. 2, pp. 271–279, Feb. 2007, doi: 10.1016/j.mcn.2006.11.005.

[14] M. Pehar *et al.*, “Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: Implications for amyotrophic lateral sclerosis,” *J Neurochem*, vol. 89, no. 2, pp. 464–473, Apr. 2004, doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02357.x.

[15] B. L. Hempstead, “Deciphering Proneurotrophin Actions,” 2014, pp. 17–32. doi: 10.1007/978-3-642-45106-5_2.

[16] A. Nykjaer *et al.*, “Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death,” *Nature*, vol. 427, no. 6977, pp. 843–848, Feb. 2004, doi: 10.1038/nature02319.

[17] R. O. Costa, T. Perestrelo, and R. D. Almeida, “PROneurotrophins and CONSequences,” *Molecular Neurobiology*, vol. 55, no. 4. Humana Press Inc., pp. 2934–2951, Apr. 01, 2018. doi: 10.1007/s12035-017-0505-7.

[18] M. Fahnestock, B. Michalski, B. Xu, and M. D. Coughlin, “The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer’s disease,” *Molecular and Cellular Neuroscience*, vol. 18, no. 2, pp. 210–220, 2001, doi: 10.1006/mcne.2001.1016.

[19] N. H. Woo *et al.*, “Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression,” *Nat Neurosci*, vol. 8, no. 8, pp. 1069–1077, Aug. 2005, doi: 10.1038/nn1510.

[20] H. Thoenen, “Neurotrophins and Neuronal Plasticity,” Electrochemical Society, 1995. doi: 10.1126/science.270.5236.593.

[21] T. Tsukahara, K. Iihara, N. Hashimoto, T. Nishijima, and T. Taniguchi, “International Increases in levels of brain derived neurotrophic factor mRNA and its promoters after transient forebrain ischemia in the rat brain,” *NEUROCHEMISTRY*, pp. 201–207, 1998.

[22] Kokaia, “Rapid Alterations of BDNF Protein Levels in the Rat Brain after Focal Ischemia: Evidence for Increased Synthesis and Anterograde Axonal Transport,” *Exp Neurol* ., pp. 289–301, 1998.

[23] T. Beck, D. Lindholm, E. Castren, and A. Wree, “Brain-Derived Neurotrophic Factor Protects Against Ischemic Cell Damage in Rat Hippocampus,” *J Cereb Blood Flow Metab*, pp. 689–692, 1994.

[24] N. R. Kobayashi1p2, A. M. Bedard, M. T. Hincke3, and W. Tetzlaff1s2, “Increased Expression of BDNF and trkB mRNA in Rat Facial Motoneurons after Axotomy,” 1996.

[25] F. Hefti, “Development of Effective Therapy for Alzheimer’s Disease Based on Neurotrophic Factors,” *Neurobiol Aging*, vol. 15, pp. 193–194, 1994.

[26] R. W. Oppenheim, “Cell death during development of the nervous system,” *Annu Rev Neurosci*, pp. 453–501, 1991, doi: 10.1146/annurev.ne.14.030191.002321.

[27] C. F. Ibáñez and A. Simi, “P75 neurotrophin receptor signaling in nervous system injury and degeneration: paradox and opportunity,” *Trends in Neurosciences*, vol. 35, no. 7. pp. 431–440, Jul. 2012. doi: 10.1016/j.tins.2012.03.007.

[28] P. Ernfors, A. Henschen, L. Olson, and H. Persson, “Expression of Nerve Growth Factor Receptor mRNA Is Developmentally Regulated and Increased after Axotomy in Rat Spinal Cord Motoneurons,” 1989.

[29] N. K. Popova, T. V. Ilchibaeva, and V. S. Naumenko, “Neurotrophic factors (BDNF and GDNF) and the serotonergic system of the brain,” *Biochemistry (Moscow)*, vol. 82, no. 3. Maik Nauka Publishing / Springer SBM, pp. 308–317, Mar. 01, 2017. doi: 10.1134/S0006297917030099.

[30] O. Guillin, J. Diaz, P. Carroll, N. Griffon, J.-C. Schwartz, and P. Sokoloff, “BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization,” *Nature*, vol. 411, no. 6833, pp. 86–89, May 2001, doi: 10.1038/35075076.

[31] P. Bekinschtein, M. Cammarota, and J. H. Medina, “BDNF and memory processing,” *Neuropharmacology*, vol. 76, no. PART C. pp. 677–683, Jan. 2014. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.024.

[32] G. Leal, C. R. Bramham, and C. B. Duarte, “BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity,” 2017, pp. 153–195. doi: 10.1016/bs.vh.2016.10.004.

[33] O. von Bohlen und Halbach and V. von Bohlen und Halbach, “BDNF effects on dendritic spine morphology and hippocampal function,” *Cell and Tissue Research*, vol. 373, no. 3. Springer Verlag, pp. 729–741, Sep. 01, 2018. doi: 10.1007/s00441-017-2782-x.

[34] B. W. Luikart *et al.*, “TrkB Has a Cell-Autonomous Role in the Establishment of Hippocampal Schaffer Collateral Synapses,” *The Journal of Neuroscience*, vol. 25, no. 15, pp. 3774–3786, Apr. 2005, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0041-05.2005.

[35] A. P. De Vincenti, A. S. Ríos, G. Paratcha, and F. Ledda, “Mechanisms that modulate and diversify BDNF functions: Implications for hippocampal synaptic plasticity,” *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 13. Frontiers Media S.A., Jan. 29, 2019. doi: 10.3389/fncel.2019.00135.

[36] H. Sariola and M. Saarma, “Novel functions and signalling pathways for GDNF,” *J Cell Sci*, vol. 116, no. 19, pp. 3855–3862, Oct. 2003, doi: 10.1242/jcs.00786.

[37] M. S. Airaksinen and M. Saarma, “The GDNF family: Signalling, biological functions and therapeutic value,” *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 3, no. 5. pp. 383–394, 2002. doi: 10.1038/nrn812.

[38] G. Paratcha, F. Ledda, and C. F. Ibáñez, “The Neural Cell Adhesion Molecule NCAM Is an Alternative Signaling Receptor for GDNF Family Ligands,” *Cell*, vol. 113, pp. 867–879, 2003, [Online]. Available: www.cell.com/cgi/content/full/113/7/867/DC1

[39] S. Gattenlöhner *et al.*, “Specific detection of CD56 (NCAM) isoforms for the identification of aggressive malignant neoplasms with progressive development,” *American Journal of Pathology*, vol. 174, no. 4, pp. 1160–1171, 2009, doi: 10.2353/ajpath.2009.080647.

[40] H. E. Beggs, S. C. Baragona, J. J. Hemperly, and P. F. Maness, “NCAM140 Interacts with the Focal Adhesion Kinase p125 and the SRC-related Tyrosine Kinase p59,”

Journal of Biological Chemistry, vol. 272, no. 13, pp. 8310–8319, Mar. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.13.8310.

[41] M. Schachner, "Neural recognition molecules and synaptic plasticity," *Curr Opin Cell Biol*, vol. 9, no. 5, pp. 627–634, Oct. 1997, doi: 10.1016/S0955-0674(97)80115-9.

[42] L. C. B. Rønn, P. Doherty, A. Holm, V. Berezin, and E. Bock, "Neurite Outgrowth Induced by a Synthetic Peptide Ligand of Neural Cell Adhesion Molecule Requires Fibroblast Growth Factor Receptor Activation," *J Neurochem*, vol. 75, no. 2, pp. 665–671, Aug. 2000, doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0750665.x.

[43] K. L. Crossin and L. A. Krushel, "Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily," *Developmental Dynamics*, vol. 218, no. 2, pp. 260–279, Jun. 2000, doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(200006)218:2<260::AID-DVDY3>3.0.CO;2-9.

[44] Q. T. Nguyen, A. Sh. Parsadanian, W. D. Snider, and J. W. Lichtman, "Hyperinnervation of Neuromuscular Junctions Caused by GDNF Overexpression in Muscle," *Science (1979)*, vol. 279, no. 5357, pp. 1725–1729, Mar. 1998, doi: 10.1126/science.279.5357.1725.

[45] E. R. Kramer *et al.*, "Cooperation between GDNF/Ret and ephrinA/EphA4 Signals for Motor-Axon Pathway Selection in the Limb," *Neuron*, vol. 50, no. 1, pp. 35–47, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.neuron.2006.02.020.

[46] D. Krakora *et al.*, "Synergistic effects of GDNF and VEGF on lifespan and disease progression in a familial ALS rat model," *Molecular Therapy*, vol. 21, no. 8, pp. 1602–1610, 2013, doi: 10.1038/mt.2013.108.

[47] R. Eggers, F. de Winter, M. R. Tannemaat, M. J. A. Malessy, and J. Verhaagen, "GDNF Gene Therapy to Repair the Injured Peripheral Nerve," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 8. Frontiers Media S.A., Oct. 30, 2020. doi: 10.3389/fbioe.2020.583184.

[48] L. Li, W. Wu, L.-F. H. Lin1, M. Lei, R. W. Oppenheim, and L. J. Houenou, "Rescue of adult mouse motoneurons from inJury-induced cell death by glial cell line-derived neurotrophic factor (avulsion/spinal cord/amyotrophic lateral sclerosis)," 1995.

[49] R. Shakya *et al.*, "The role of GDNF in patterning the excretory system," *Dev Biol*, vol. 283, no. 1, pp. 70–84, Jul. 2005, doi: 10.1016/j.ydbio.2005.04.008.

[50] X. Meng *et al.*, "Regulation of Cell Fate Decision of Undifferentiated Spermatogonia by GDNF," *Science (1979)*, vol. 287, no. 5457, pp. 1489–1493, Feb. 2000, doi: 10.1126/science.287.5457.1489.

[51] G. Paratcha and F. Ledda, "Negative Regulation of Receptor Tyrosine Kinase (RTK) Signaling: A Developing Field," 2007. [Online]. Available: http://www.la-press.com/copyright.htm

[52] P. Blume-Jensen and T. Hunter, "Oncogenic kinase signalling," *Nature*, vol. 411, no. 6835, pp. 355–365, May 2001, doi: 10.1038/35077225.

[53] L. Lamorte and M. Park, “The receptor tyrosine kinases: role in cancer progression.,” *Surg Oncol Clin N Am*, vol. 10, no. 2, pp. 271–88, viii, Apr. 2001.

[54] F. Ledda, O. Bieraugel, S. S. Fard, M. Vilar, and G. Paratcha, “Lrig1 is an endogenous inhibitor of ret receptor tyrosine kinase activation, downstream signaling, and biological responses to GDNF,” *Journal of Neuroscience*, vol. 28, no. 1, pp. 39–49, Jan. 2008, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2196-07.2008.

[55] F. C. Alsina *et al.*, “ Lrig1 is a cell-intrinsic modulator of hippocampal dendrite complexity and BDNF signaling ,” *EMBO Rep*, vol. 17, no. 4, pp. 601–616, Apr. 2016, doi: 10.15252/embr.201541218.

[56] C. D. Andl and A. K. Rustgi, “No one-way street: Cross-talk between E-cadherin and receptor tyrosine kinase (RTK) signaling—A mechanism to regulate RTK activity,” *Cancer Biol Ther*, vol. 4, no. 1, pp. 35–38, Jan. 2005, doi: 10.4161/cbt.4.1.1431.

[57] I. Gross, B. Bassit, M. Benezra, and J. D. Licht, “Mammalian Sprouty Proteins Inhibit Cell Growth and Differentiation by Preventing Ras Activation,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 49, pp. 46460–46468, Dec. 2001, doi: 10.1074/jbc.M108234200.

[58] G. Gatto *et al.*, “Protein tyrosine phosphatase receptor type O inhibits trigeminal axon growth and branching by repressing TrkB and ret signaling,” *Ann Intern Med*, vol. 158, no. 6, pp. 5399–5410, 2013, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4707-12.2013.

[59] H. N. Marsh *et al.*, “SHP-1 negatively regulates neuronal survival by functioning as a TrkA phosphatase,” *J Cell Biol*, vol. 163, no. 5, pp. 999–1010, Dec. 2003, doi: 10.1083/jcb.200309036.

[60] K. Y. Lo, W. H. Chin, Y. P. Ng, A. W. Cheng, Z. H. Cheung, and N. Y. Ip, “SLAM-associated Protein as a Potential Negative Regulator in Trk Signaling,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 50, pp. 41744–41752, Dec. 2005, doi: 10.1074/jbc.M506554200.

[61] R. Lammers *et al.*, “Differential activities of protein tyrosine phosphatases in intact cells.,” *J Biol Chem*, vol. 268, no. 30, pp. 22456–62, Oct. 1993.

[62] C. A. Worby and J. E. Dixon, “Pten,” *Annual Review of Biochemistry*, vol. 83. Annual Reviews Inc., pp. 641–669, 2014. doi: 10.1146/annurev-biochem-082411-113907.

[63] J. T. Erickson, T. A. Brosenitsch, and D. M. Katz, “Brain-Derived Neurotrophic Factor and Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Are Required Simultaneously for Survival of Dopaminergic Primary Sensory Neurons *In Vivo*,” *The Journal of Neuroscience*, vol. 21, no. 2, pp. 581–589, Jan. 2001, doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-02-00581.2001.

[64] L. Tetri *et al.*, “RET receptor expression and interaction with TRK receptors in neuroblastomas,” *Oncol Rep*, Apr. 2020, doi: 10.3892/or.2020.7583.

[65] E. Kumamaru, T. Numakawa, N. Adachi, and H. Kunugi, “Glucocorticoid suppresses BDNF-stimulated MAPK/ERK pathway via inhibiting interaction of Shp2 with TrkB,” *FEBS Lett*, vol. 585, no. 20, pp. 3224–3228, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.febslet.2011.09.010.

[66] T. Numakawa, E. Kumamaru, N. Adachi, Y. Yagasaki, A. Izumi, and H. Kunugi, “Glucocorticoid receptor interaction with TrkB promotes BDNF-triggered PLC-signaling for glutamate release via a glutamate transporter,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 647–652, 2009, [Online]. Available: www.pnas.org/cgi/content/full/

[67] H. Kawashima *et al.*, “Glucocorticoid attenuates brain-derived neurotrophic factor-dependent upregulation of glutamate receptors via the suppression of microRNA-132 expression,” *Neuroscience*, vol. 165, no. 4, pp. 1301–1311, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.11.057.

[68] M. Kadmiel and J. A. Cidlowski, “Glucocorticoid receptor signaling in health and disease,” *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 34, no. 9. pp. 518–530, Sep. 2013. doi: 10.1016/j.tips.2013.07.003.

[69] S. Vyas *et al.*, “Chronic stress and glucocorticoids: From neuronal plasticity to neurodegeneration,” *Neural Plasticity*, vol. 2016. Hindawi Limited, 2016. doi: 10.1155/2016/6391686.

[70] Y. Feng, S. Lu, J. Wang, P. Kumar, L. Zhang, and A. J. Bhatt, “Dexamethasone-induced neuroprotection in hypoxic-ischemic brain injury in newborn rats is partly mediated via Akt activation,” *Brain Res*, vol. 1589, pp. 68–77, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.brainres.2014.09.073.

[71] W. Gao, D. Tong, Q. Li, P. Huang, and F. Zhang, “Dexamethasone promotes regeneration of crushed inferior alveolar nerve by inhibiting NF-κB activation in adult rats,” *Arch Oral Biol*, vol. 80, pp. 101–109, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.03.025.

[72] K. Terada, Y. Kojima, T. Watanabe, N. Izumo, K. Chiba, and Y. Karube, “Inhibition of Nerve Growth Factor-Induced Neurite Outgrowth from PC12 Cells by Dexamethasone: Signaling Pathways through the Glucocorticoid Receptor and Phosphorylated Akt and ERK1/2,” *PLoS One*, vol. 9, no. 3, pp. e93223-, Mar. 2014, [Online]. Available: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093223

[73] J. J. Knierim, “The hippocampus,” *Current Biology*, vol. 25, no. 23, pp. R1116–R1121, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.cub.2015.10.049.

[74] Y. Ben-Ari, J.-L. Gaiarsa, R. Tyzio, and R. Khazipov, “GABA: A Pioneer Transmitter That Excites Immature Neurons and Generates Primitive Oscillations,” *Physiol Rev*, vol. 87, no. 4, pp. 1215–1284, Oct. 2007, doi: 10.1152/physrev.00017.2006.

[75] E. J. Kim, B. Pellman, and J. J. Kim, “Stress effects on the hippocampus: a critical review,” *Learning & Memory*, vol. 22, no. 9, pp. 411–416, Sep. 2015, doi: 10.1101/lm.037291.114.

[76] A. M. Magariños *et al.*, “Effect of brain-derived neurotrophic factor haploinsufficiency on stress-induced remodeling of hippocampal neurons,” *Hippocampus*, vol. 21, no. 3, pp. 253–264, Mar. 2011, doi: 10.1002/hipo.20744.

[77] C. E. Henderson, Y. Yamamoto, J. Livet, V. Arce, A. Garces, and O. deLapeyrière, “Role of neurotrophic factors in motoneuron development,” *Journal of Physiology-Paris*, vol. 92, no. 3–4, pp. 279–281, Jun. 1998, doi: 10.1016/S0928-4257(98)80033-8.

[78] R. W. Oppenheim *et al.*, “Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF,” *Nature*, vol. 373, no. 6512, pp. 344–346, Jan. 1995, doi: 10.1038/373344a0.

[79] M. Sendtner, B. Holtmann, and R. A. Hughes, “The Response of Motoneurons to Neurotrophins*,” 1996.

[80] R. A. Hughes, M. Sendtner, and H. Thoenen, “Members of several gene families influence survival of rat motoneurons in vitro and in vivo,” *J Neurosci Res*, vol. 36, no. 6, pp. 663–671, Dec. 1993, doi: 10.1002/jnr.490360607.

[81] I. Silos-Santiago, A. M. Fagan, M. Garber, B. Fritzsch, and M. Barbacid, “Severe Sensory Deficits but Normal CNS Development in Newborn Mice Lacking TrkB and TrkC Tyrosine Protein Kinase Receptors,” *European Journal of Neuroscience*, vol. 9, no. 10, pp. 2045–2056, Oct. 1997, doi: 10.1111/j.1460-9568.1997.tb01372.x.

[82] S. E. McKay, A. Garner, J. Caldero, R. P. Tucker, T. Large, and R. W. Oppenheim, “The expression of *trk* B and p75 and the role of BDNF in the developing neuromuscular system of the chick embryo,” *Development*, vol. 122, no. 2, pp. 715–724, Feb. 1996, doi: 10.1242/dev.122.2.715.

[83] M. Sendtner, G. Pei, M. Beck, U. Schweizer, and S. Wiese, “Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors,” *Cell and Tissue Research*, vol. 301, no. 1. pp. 71–84, 2000. doi: 10.1007/s004410000217.

[84] C. E. Henderson, E. Bloch-Gallego, W. Camu, A. Gouin, C. Lemeulle, and C. Mettling, “Motoneuron survival factors: Biological roles and therapeutic potential,” *Neuromuscular Disorders*, vol. 3, no. 5–6, pp. 455–458, Jan. 1993, doi: 10.1016/0960-8966(93)90096-3.

[85] J. Springer, “cDNA sequence and differential mRNA regulation of two forms of glial cell line-derived neurotrophic factor in Schwann cells and rat skeletal muscle,” *Exp Neurol*, vol. 131, no. 1, pp. 47–52, Jan. 1995, doi: 10.1016/0014-4886(95)90006-3.

[86] C. E. Henderson *et al.*, “GDNF: A Potent Survival Factor for Motoneurons Present in Peripheral Nerve and Muscle,” *Science (1979)*, pp. 1062–1064, 1994, [Online]. Available: www.sciencemag.org

[87] T. W. Gould and H. Enomoto, “Neurotrophic modulation of motor neuron development,” *Neuroscientist*, vol. 15, no. 1. pp. 105–116, Feb. 2009. doi: 10.1177/1073858408324787.

[88] J. C. V. M. Copray *et al.*, “Expression of the low affinity neurotrophin receptor p75 in spinal motoneurons in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis,” *Neuroscience*, vol. 116, no. 3, pp. 685–694, Feb. 2003, doi: 10.1016/S0306-4522(02)00755-8.

[89] K. S. Smith, R. A. Rush, and M. L. Rogers, “Characterization and changes in neurotrophin receptor p75N-expressing motor neurons in SOD1G93AG1H mice,” *Journal of Comparative Neurology*, vol. 523, no. 11, pp. 1664–1682, Aug. 2015, doi: 10.1002/cne.23763.

[90] E. Trias *et al.*, “Schwann cells orchestrate peripheral nerve inflammation through the expression of CSF1, IL-34, and SCF in amyotrophic lateral sclerosis,” *Glia*, vol. 68, no. 6, pp. 1165–1181, Jun. 2020, doi: 10.1002/glia.23768.

[91] K. S. Lowry *et al.*, “Systemic Administration of Antisense p75 NTR Oligodeoxynucleotides Rescues Axotomised Spinal Motor Neurons,” *J Neurosci Res* ., vol. 64, pp. 11–17, 2001.

[92] L. Ferraiuolo, J. Kirby, A. J. Grierson, M. Sendtner, and P. J. Shaw, “Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis,” *Nat Rev Neurol*, vol. 7, no. 11, pp. 616–630, Nov. 2011, doi: 10.1038/nrneurol.2011.152.

[93] C. Liston and W. B. Gan, “Glucocorticoids are critical regulators of dendritic spine development and plasticity in vivo,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, no. 38, pp. 16074–16079, Oct. 2011, doi: 10.1073/pnas.1110444108.

[94] D. Suri and V. A. Vaidya, “Glucocorticoid regulation of brain-derived neurotrophic factor: Relevance to hippocampal structural and functional plasticity,” *Neuroscience*, vol. 239. pp. 196–213, Jun. 03, 2013. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.08.065.

[95] Z. C. Baquet, J. A. Gorski, and K. R. Jones, “Early Striatal Dendrite Deficits followed by Neuron Loss with Advanced Age in the Absence of Anterograde Cortical Brain-Derived Neurotrophic Factor,” *Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 17, pp. 4250–4258, Apr. 2004, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3920-03.2004.

[96] B. Shi and I. Mocchetti, “Dexamethasone induces TrkA and p75NTR immunoreactivity in the cerebral cortex and hippocampus,” *Exp Neurol*, vol. 162, no. 2, pp. 257–267, 2000, doi: 10.1006/exnr.2000.7360.

[97] M. Lauriola *et al.*, “Diurnal suppression of EGFR signalling by glucocorticoids and implications for tumour progression and treatment,” *Nat Commun*, vol. 5, 2014, doi: 10.1038/ncomms6073.

[98] G. D’Uva and M. Lauriola, “Towards the emerging crosstalk: ERBB family and steroid hormones,” *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 50. Academic Press, pp. 143–152, Feb. 01, 2016. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.11.004.

[99] A. Harris and J. Seckl, “Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease,” *Hormones and Behavior*, vol. 59, no. 3. pp. 279–289, Mar. 2011. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.06.007.

[100] M. Joëls, “Impact of glucocorticoids on brain function: Relevance for mood disorders,” *Psychoneuroendocrinology*, vol. 36, no. 3, pp. 406–414, Apr. 2011, doi: 10.1016/j.psyneuen.2010.03.004.

[101] N. Sousa and O. F. X. Almeida, “Disconnection and reconnection: The morphological basis of (mal)adaptation to stress,” *Trends in Neurosciences*, vol. 35, no. 12. pp. 742–751, Dec. 2012. doi: 10.1016/j.tins.2012.08.006.

[102] E. Kumamaru *et al.*, “Glucocorticoid prevents brain-derived neurotrophic factor-mediated maturation of synaptic function in developing hippocampal neurons

through reduction in the activity of mitogen-activated protein kinase," *Molecular Endocrinology*, vol. 22, no. 3, pp. 546–558, Mar. 2008, doi: 10.1210/me.2007-0264.

[103] J. M. Mason, D. J. Morrison, M. Albert Basson, and J. D. Licht, "Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling," *Trends Cell Biol*, vol. 16, no. 1, pp. 45–54, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.tcb.2005.11.004.

[104] I. Gross *et al.*, "Sprouty2 inhibits BDNF-induced signaling and modulates neuronal differentiation and survival," *Cell Death Differ*, vol. 14, no. 10, pp. 1802–1812, Oct. 2007, doi: 10.1038/sj.cdd.4402188.

[105] M. Ishida *et al.*, "Sprouty2 regulates growth and differentiation of human neuroblastoma cells through RET tyrosine kinase," *Cancer Sci*, vol. 98, no. 6, pp. 815–821, Jun. 2007, doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00457.x.

[106] E. S. M. Wong, "Sprouty2 attenuates epidermal growth factor receptor ubiquitylation and endocytosis, and consequently enhances Ras/ERK signalling," *EMBO J*, vol. 21, no. 18, pp. 4796–4808, Sep. 2002, doi: 10.1093/emboj/cdf493.

[107] C. Rubin, V. Litvak, H. Medvedovsky, Y. Zwang, S. Lev, and Y. Yarden, "Sprouty Fine-Tunes EGF Signaling through Interlinked Positive and Negative Feedback Loops," *Current Biology*, vol. 13, no. 4, pp. 297–307, Feb. 2003, doi: 10.1016/S0960-9822(03)00053-8.

[108] F. C. Alsina, D. Irala, P. A. Fontanet, F. J. Hita, F. Ledda, and G. Paratcha, "Sprouty4 is an endogenous negative modulator of trka signaling and neuronal differentiation induced by ngf," *PLoS One*, vol. 7, no. 2, Feb. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0032087.

[109] S. L. Gourley, F. J. Wu, and J. R. Taylor, "Corticosterone regulates pERK1/2 map kinase in a chronic depression model," in *Annals of the New York Academy of Sciences*, Blackwell Publishing Inc., 2008, pp. 509–514. doi: 10.1196/annals.1410.076.

[110] S. L. Gourley, D. D. Kiraly, J. L. Howell, P. Olausson, and J. R. Taylor, "Acute Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor Restores Motivational and Forced Swim Performance After Corticosterone," *Biol Psychiatry*, vol. 64, no. 10, pp. 884–890, Nov. 2008, doi: 10.1016/j.biopsych.2008.06.016.

[111] C. Björkholm and L. M. Monteggia, "BDNF - A key transducer of antidepressant effects," *Neuropharmacology*, vol. 102. Elsevier Ltd, pp. 72–79, Mar. 01, 2016. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.10.034.

[112] E. Castrén and M. Kojima, "Brain-derived neurotrophic factor in mood disorders and antidepressant treatments," *Neurobiology of Disease*, vol. 97. Academic Press Inc., pp. 119–126, Jan. 01, 2017. doi: 10.1016/j.nbd.2016.07.010.

[113] J. Q. Wang and L. Mao, "The ERK Pathway: Molecular Mechanisms and Treatment of Depression," *Molecular Neurobiology*, vol. 56, no. 9. Humana Press Inc., pp. 6197–6205, Sep. 15, 2019. doi: 10.1007/s12035-019-1524-3.

[114] Q. Chen *et al.*, "Neonatal DEX exposure leads to hyperanxious and depressive-like behaviors as well as a persistent reduction of BDNF expression in developmental

stages," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 527, no. 1, pp. 311–316, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.04.084.

[115] E. Castrén and L. M. Monteggia, "Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in Depression and Antidepressant Action," *Biological Psychiatry*, vol. 90, no. 2. Elsevier Inc., pp. 128–136, Jul. 15, 2021. doi: 10.1016/j.biopsych.2021.05.008.

[116] X. Qi *et al.*, "Fluoxetine increases the activity of the ERK-CREB signal system and alleviates the depressive-like behavior in rats exposed to chronic forced swim stress," *Neurobiol Dis*, vol. 31, no. 2, pp. 278–285, Aug. 2008, doi: 10.1016/j.nbd.2008.05.003.

[117] T. Saarelainen *et al.*, "Activation of the TrkB Neurotrophin Receptor Is Induced by Antidepressant Drugs and Is Required for Antidepressant-Induced Behavioral Effects," *J Neurosci*, pp. 349–357, 2002.

[118] H. D. Schmidt and R. S. Duman, "Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models," *Neuropsychopharmacology*, vol. 35, no. 12, pp. 2378–2391, 2010, doi: 10.1038/npp.2010.114.

[119] P. C. Casarotto *et al.*, "Antidepressant drugs act by directly binding to TRKB neurotrophin receptors," *Cell*, vol. 184, no. 5, pp. 1299-1313.e19, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.cell.2021.01.034.

[120] B. Hausott *et al.*, "Sprouty2 and -4 regulate axon outgrowth by hippocampal neurons," *Hippocampus*, vol. 22, no. 3, pp. 434–441, Mar. 2012, doi: 10.1002/hipo.20910.

[121] R. S. Weinstein, "Glucocorticoid-induced osteonecrosis," *Endocrine*, vol. 41, no. 2. Humana Press Inc., pp. 183–190, 2012. doi: 10.1007/s12020-011-9580-0.

[122] Y. Matsushima, K. Terada, J. Takata, Y. Karube, C. Kamei, and Y. Sugimoto, "Effects of fluvoxamine on nerve growth factor-induced neurite outgrowth inhibition by dexamethasone in PC12 cells," *Biosci Biotechnol Biochem*, vol. 83, no. 4, pp. 659–665, Apr. 2019, doi: 10.1080/09168451.2018.1553607.

[123] V. Gelfo *et al.*, "Glucocorticoid receptor modulates EGFR feedback upon acquisition of resistance to monoclonal antibodies," *J Clin Med*, vol. 8, no. 5, May 2019, doi: 10.3390/jcm8050600.

[124] R. Rydel and L. Greene, "Acidic and basic fibroblast growth factors promote stable neurite outgrowth and neuronal differentiation in cultures of PC12 cells," *The Journal of Neuroscience*, vol. 7, no. 11, pp. 3639–3653, Nov. 1987, doi: 10.1523/JNEUROSCI.07-11-03639.1987.

[125] A. Sasaki, T. Taketomi, T. Wakioka, R. Kato, and A. Yoshimura, "Identification of a Dominant Negative Mutant of Sprouty that Potentiates Fibroblast Growth Factor- but Not Epidermal Growth Factor-induced ERK Activation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 39, pp. 36804–36808, Sep. 2001, doi: 10.1074/jbc.C100386200.

[126] M. Kwon, J. R. Fernández, G. F. Zegarek, S. B. Lo, and B. L. Firestein, "BDNF-promoted increases in proximal dendrites occur via CREB-dependent

transcriptional regulation of cypin," *Journal of Neuroscience*, vol. 31, no. 26, pp. 9735–9745, Jun. 2011, doi: 10.1523/JNEUROSCI.6785-10.2011.

[127] C. L. Wellman, "Dendritic Reorganization in Pyramidal Neurons in Medial Prefrontal Cortex after Chronic Corticosterone Administration," 2001.

[128] J. L. Mayer, L. Klumpers, S. Maslam, E. R. de Kloet, M. Joëls, and P. J. Lucassen, "Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalises the corticosterone-induced reduction of adult hippocampal neurogenesis," *J Neuroendocrinol*, vol. 18, no. 8, pp. 629–631, Aug. 2006, doi: 10.1111/j.1365-2826.2006.01455.x.

[129] P. J. Lucassen *et al.*, "Regulation of adult neurogenesis and plasticity by (Early) stress, glucocorticoids, and inflammation," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 7, no. 9, Sep. 2015, doi: 10.1101/cshperspect.a021303.

[130] F. Agasse *et al.*, "Chronic Corticosterone Elevation Suppresses Adult Hippocampal Neurogenesis by Hyperphosphorylating Huntingtin," *Cell Rep*, vol. 32, no. 1, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.celrep.2020.107865.

[131] Y. Chen and T. Z. Baram, "Toward understanding how early-life stress reprograms cognitive and emotional brain networks," *Neuropsychopharmacology*, vol. 41, no. 1. Nature Publishing Group, pp. 197–206, Jan. 01, 2016. doi: 10.1038/npp.2015.181.

[132] N. Panagiotaki, F. Dajas-Bailador, E. Amaya, N. Papalopulu, and K. Dorey, "Characterisation of a new regulator of BDNF signalling, Sprouty3, involved in axonal morphogenesis in vivo," *Development*, vol. 137, no. 23, pp. 4005–4015, Dec. 2010, doi: 10.1242/dev.053173.

[133] D. Xu, A. Makkinje, and J. M. Kyriakis, "Gene 33 is an endogenous inhibitor of Epidermal Growth Factor (EGF) receptor signaling and mediates dexamethasone-induced suppression of EGF function," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 4, pp. 2924–2933, Jan. 2005, doi: 10.1074/jbc.M408907200.

[134] K. Shah, M. Ahmed, and J. U. Kazi, "The Aurora kinase/β-catenin axis contributes to dexamethasone resistance in leukemia," *NPJ Precis Oncol*, vol. 5, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41698-021-00148-5.

[135] F. Jeanneteau, M. J. Garabedian, and M. V. Chao, "Activation of Trk neurotrophin receptors by glucocorticoids provides a neuroprotective effect," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no. 12, pp. 4862–4867, Mar. 2008, doi: 10.1073/pnas.0709102105.

[136] L.-F. H. Lin, D. H. Doherty, J. D. Lile, S. Bektesh, and F. Collins, "GDNF: a Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor for Midbrain Dopaminergic Neurons," *Science (1979)*, vol. 260, no. 5111, pp. 1130–1132, May 1993, doi: 10.1126/science.8493557.

[137] M. S. Airaksinen, A. Titievsky, and M. Saarma, "GDNF Family Neurotrophic Factor Signaling: Four Masters, One Servant?," *Mol Cell Neurosci*, pp. 313–325, 1999, [Online]. Available: http://www.idealibrary.com

[138] G. Paratcha *et al.*, “Released GFR1 Potentiates Downstream Signaling, Neuronal Survival, and Differentiation via a Novel Mechanism of Recruitment of c-Ret to Lipid Rafts c-Ret kinase (cis signaling).,” *Neuron*, vol. 29, pp. 171–184, 2001.

[139] F. Ledda, G. Paratcha, and C. F. Ibáñez, “Target-Derived GFRα1 as an Attractive Guidance Signal for Developing Sensory and Sympathetic Axons via Activation of Cdk5,” *Neuron*, vol. 36, no. 3, pp. 387–401, Oct. 2002, doi: 10.1016/S0896-6273(02)01002-4.

[140] M. G. Tansey, R. H. Baloh, J. Milbrandt, and E. M. Johnson, “GFRα-Mediated Localization of RET to Lipid Rafts Is Required for Effective Downstream Signaling, Differentiation, and Neuronal Survival,” *Neuron*, vol. 25, no. 3, pp. 611–623, Mar. 2000, doi: 10.1016/S0896-6273(00)81064-8.

[141] M. S. Fleming *et al.*, “Cis and trans RET signaling control the survival and central projection growth of rapidly adapting mechanoreceptors,” *Elife*, vol. 4, Apr. 2015, doi: 10.7554/eLife.06828.

[142] K. Simons and D. Toomre, “Lipid rafts and signal transduction,” *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 1, no. 1, pp. 31–39, Oct. 2000, doi: 10.1038/35036052.

[143] R. W. Oppenheim Ronald W, “The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death,” *Trends Neurosci*, pp. 252–255, 1989, doi: 10.1016/0166-2236(89)90021-0.

[144] J. Strelau *et al.*, “Progressive postnatal motoneuron loss in mice lacking GDF-15,” *Journal of Neuroscience*, vol. 29, no. 43, pp. 13640–13648, Oct. 2009, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1133-09.2009.

[145] N. T. Neff,’ *et al.*, “Insulin-Like Growth Factors: Putative Muscle-Derived Trophic Agents that Promote Motoneuron Survival,” *J Neurobiol* ., vol. 24, no. 12, pp. 1578–1588, 1993, doi: 10.1002/neu.480241203.

[146] K. Nakashima *et al.*, “Developmental Requirement of gp130 Signaling in Neuronal Survival and Astrocyte Differentiation,” *J Neurosci*, vol. 19, no. 13, pp. 5429–5434, 1999, doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-13-05429.1999.

[147] E. J. Huang and L. F. Reichardt, “Neurotrophins: Roles in neuronal development and function,” *Annual Review of Neuroscience*, vol. 24. pp. 677–736, 2001. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.677.

[148] M. B. Jarpe *et al.*, “Anti-apoptotic versus pro-apoptotic signal transduction: Checkpoints and stop signs along the road to death,” *Oncogene*, pp. 1475–1482, 1998, [Online]. Available: http://www.stockton-press.co.uk/onc

[149] A. G. Abraham and E. O’Neill, “PI3K/Akt-mediated regulation of p53 in cancer,” in *Biochemical Society Transactions*, Portland Press Ltd, 2014, pp. 798–803. doi: 10.1042/BST20140070.

[150] J. M. Beaulieu, R. R. Gainetdinov, and M. G. Caron, “The Akt-GSK-3 signaling cascade in the actions of dopamine,” *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 28, no. 4. pp. 166–172, Apr. 2007. doi: 10.1016/j.tips.2007.02.006.

[151] J.-M. Beaulieu *et al.*, “Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKTglycogen synthase kinase 3 signaling cascade,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 5099–5104, 2004, [Online]. Available: www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0307921101

[152] L. A. Allan, N. Morrice, S. Brady, G. Magee, S. Pathak, and P. R. Clarke, “Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK,” 2003.

[153] S. Wiese, F. Metzger, B. Holtmann, and M. Sendtner, “The role of p75 NTR in modulating neurotrophin survival effects in developing motoneurons,” 1999.

[154] K. C. Kanning, A. Kaplan, and C. E. Henderson, “Motor neuron diversity in development and disease,” *Annual Review of Neuroscience*, vol. 33. pp. 409–440, 2010. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135722.

[155] C. G. Park and S. Young, “A Novel Gene Product that Couples TCR Signaling to Fas(CD95) Expression in Activation-Induced Cell Death,” 1996.

[156] I. Gomes, W. Xiong, T. Miki, and M. Rich Rosner, “A Proline-and Glutamine-Rich Protein Promotes Apoptosis in Neuronal Cells,” 1999.

[157] G. S. Hossain *et al.*, “TDAG51 is induced by homocysteine, promotes detachment-mediated programmed cell death, and contributes to the development of atherosclerosis in hyperhomocysteinemia,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 32, pp. 30317–30327, Aug. 2003, doi: 10.1074/jbc.M212897200.

[158] R. Diger Neef, M. A. Kuske, E. Pröls, and J. P. Johnson, “Identification of the Human PHLDA1/TDAG51 Gene: Down-Regulation in Metastatic Melanoma Contributes to Apoptosis Resistance and Growth Deregulation 1,” 2002. [Online]. Available: http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/62/20/5920/2498512/ch2002005920.pdf

[159] J. G. Dickhout *et al.*, “TDAG51 mediates epithelial-to-mesenchymal transition in human proximal tubular epithelium,” *Am J Physiol Renal Physiol*, vol. 303, no. 3, 2012, doi: 10.1152/ajprenal.00481.2011.

[160] A. I. H. Moad, T. S. Tengku Muhammad, C. E. Oon, and M. L. Tan, “Rapamycin Induces Apoptosis When Autophagy is Inhibited in T-47D Mammary Cells and Both Processes are Regulated by Phlda1,” *Cell Biochem Biophys*, vol. 66, no. 3, pp. 567–587, Jul. 2013, doi: 10.1007/s12013-012-9504-5.

[161] Z. qin Xi *et al.*, “TDAG51 in the anterior temporal neocortex of patients with intractable epilepsy,” *Neurosci Lett*, vol. 425, no. 1, pp. 53–58, Sep. 2007, doi: 10.1016/j.neulet.2007.08.016.

[162] M. A. Nagai, J. H. T. G. Fregnani, M. M. Netto, M. M. Brentani, and F. A. Soares, “Down-regulation of PHLDA1 gene expression is associated with breast cancer progression,” *Breast Cancer Res Treat*, vol. 106, no. 1, pp. 49–56, Nov. 2007, doi: 10.1007/s10549-006-9475-6.

[163] C. M. Coutinho-Camillo *et al.*, “Expression of PAR-4 and PHLDA1 is prognostic for overall and disease-free survival in oral squamous cell carcinomas,” *Virchows Archiv*, vol. 463, no. 1, pp. 31–39, Jul. 2013, doi: 10.1007/s00428-013-1438-9.

[164] P. Zhao, X. Li, Y. Lu, and L. Liu, “Downregulated expression of PHLDA1 protein is associated with a malignant phenotype of cholangiocarcinoma,” *Oncol Lett*, vol. 10, no. 2, pp. 895–900, 2015, doi: 10.3892/ol.2015.3316.

[165] M. A. Nagai, “Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 (PHLDA1) and cancer (Review),” *Biomedical Reports*, vol. 4, no. 3. Spandidos Publications, pp. 275–281, Mar. 01, 2016. doi: 10.3892/br.2016.580.

[166] D. Frank, C. L. Mendelsohn, E. Ciccone, K. Svensson, R. Ohlsson, and B. Tycko, “A novel pleckstrin homology-related gene family defined by Ipl/Tssc3, TDAG51, and Tih1: tissue-specific expression, chromosomal location, and parental imprinting,” *Mamm Genome*, pp. 1150–1159, 1999, [Online]. Available: http://www.resgen.com

[167] G. Powis, E. J. Meuillet, M. Indarte, G. Booher, and L. Kirkpatrick, “Pleckstrin Homology [PH] domain, structure, mechanism, and contribution to human disease,” *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 165. Elsevier Masson s.r.l., Sep. 01, 2023. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115024.

[168] T. Kawase *et al.*, “PH Domain-Only Protein PHLDA3 Is a p53-Regulated Repressor of Akt,” *Cell*, vol. 136, no. 3, pp. 535–550, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.cell.2008.12.002.

[169] Y. Chen *et al.*, “PHLDA1, another PHLDA family protein that inhibits Akt,” *Cancer Sci*, vol. 109, no. 11, pp. 3532–3542, Nov. 2018, doi: 10.1111/cas.13796.

[170] T. Mimoto *et al.*, “Expression of heat shock transcription factor 1 and its downstream target protein T-cell death associated gene 51 in the spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis,” *Brain Res*, vol. 1488, pp. 123–131, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.brainres.2012.10.012.

[171] R. De Santis *et al.*, “FUS Mutant Human Motoneurons Display Altered Transcriptome and microRNA Pathways with Implications for ALS Pathogenesis,” *Stem Cell Reports*, vol. 9, no. 5, pp. 1450–1462, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.stemcr.2017.09.004.

[172] A. E. Fearon *et al.*, “PHLDA1 Mediates Drug Resistance in Receptor Tyrosine Kinase-Driven Cancer,” *Cell Rep*, vol. 22, no. 9, pp. 2469–2481, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.celrep.2018.02.028.

[173] G. Li, X. Wang, H. Hibshoosh, C. Jin, and B. Halmos, “Modulation of ErbB2 blockade in ErbB2-positive cancers: The role of ErbB2 mutations and PHLDA1,” *PLoS One*, vol. 9, no. 9, Sep. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0106349.

[174] X. Gao and J. Zhang, “Akt signaling dynamics in plasma membrane microdomains visualized by FRET-based reporters,” *Commun Integr Biol*, vol. 2, no. 1, pp. 32–34, Jan. 2009, doi: 10.4161/cib.2.1.7420.

[175] H. J. Wang, J. P. Cao, J. K. Yu, and D. S. Gao, “Role of PI3-K/Akt pathway and its effect on glial cell line-derived neurotrophic factor in midbrain dopamine cells,” *Acta Pharmacol Sin*, vol. 28, no. 2, pp. 166–172, Feb. 2007, doi: 10.1111/j.1745-7254.2007.00494.x.

[176] G. Gur *et al.*, "LRIG1 restricts growth factor signaling by enhancing receptor ubiquitylation and degradation," *EMBO J*, vol. 23, no. 16, pp. 3270–3281, Aug. 2004, doi: 10.1038/sj.emboj.7600342.

[177] W. Song, M. Volosin, A. B. Cragnolini, B. L. Hempstead, and W. J. Friedman, "ProNGF induces PTEN via p75NTR to suppress Trk-mediated survival signaling in brain neurons," *Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 46, pp. 15608–15615, Nov. 2010, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2581-10.2010.

[178] M. Volosin, W. Song, R. D. Almeida, D. R. Kaplan, B. L. Hempstead, and W. J. Friedman, "Interaction of survival and death signaling in basal forebrain neurons: Roles of neurotrophins and proneurotrophins," *Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 29, pp. 7756–7766, 2006, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1560-06.2006.

[179] A. R. Taylor *et al.*, "Motoneuron programmed cell death in response to proBDNF," *Dev Neurobiol*, vol. 72, no. 5, pp. 699–712, May 2012, doi: 10.1002/dneu.20964.

[180] A. Palandri, V. R. Salvador, J. Wojnacki, A. L. Vivinetto, R. L. Schnaar, and P. H. H. Lopez, "Myelin-associated glycoprotein modulates apoptosis of motoneurons during early postnatal development via NgR/p75 NTR receptor-mediated activation of RhoA signaling pathways," *Cell Death Dis*, vol. 6, Sep. 2015, doi: 10.1038/cddis.2015.228.

[181] P. Cassina *et al.*, "Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis," *J Neurosci Res*, vol. 67, no. 1, pp. 21–29, Jan. 2002, doi: 10.1002/jnr.10107.

[182] A. L. Calof and L. F. Reichardt, "Motoneurons Purified by Cell Sorting Respond to Two Distinct Activities in Myotube-Conditioned Medium," 1984.

[183] K. A. Phelan and M. Hollyday, "Embryonic development and survival of brachial motoneurons projecting to muscleless chick wings," *Journal of Comparative Neurology*, vol. 311, no. 3, pp. 313–320, 1991, doi: 10.1002/cne.903110302.

[184] U. Grieshammer, M. Lewandoski, D. Prevette, R. W. Oppenheim, and G. R. Martin, "Muscle-Specific Cell Ablation Conditional upon Cre-Mediated DNA Recombination in Transgenic Mice Leads to Massive Spinal and Cranial Motoneuron Loss," *Dev Biol*, vol. 197, no. 2, pp. 234–247, May 1998, doi: 10.1006/dbio.1997.8859.

[185] T. W. Gould and R. W. Oppenheim, "Motor neuron trophic factors: Therapeutic use in ALS?," *Brain Research Reviews*, vol. 67, no. 1–2. pp. 1–39, Jun. 24, 2011. doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.10.003.

[186] A. H. Salehi, S. Xanthoudakis, and P. A. Barker, "NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 50, pp. 48043–48050, Dec. 2002, doi: 10.1074/jbc.M205324200.

[187] C. Liu, Y. Li, and X. Wang, "TDAG51-Deficiency Podocytes are Protected from High-Glucose-Induced Damage Through Nrf2 Activation via the AKT–GSK-3β Pathway," *Inflammation*, vol. 45, no. 4, pp. 1520–1533, Aug. 2022, doi: 10.1007/s10753-022-01638-9.

[188] J. Wang, F. Wang, J. Zhu, M. Song, J. An, and W. Li, “Transcriptome Profiling Reveals PHLDA1 as a Novel Molecular Marker for Ischemic Cardiomyopathy,” *Journal of Molecular Neuroscience*, vol. 65, no. 1, pp. 102–109, May 2018, doi: 10.1007/s12031-018-1066-6.

[189] H. Yun *et al.*, “TDAG51 is a crucial regulator of maternal care and depressive-like behavior after parturition,” *PLoS Genet*, vol. 15, no. 6, Jun. 2019, doi: 10.1371/journal.pgen.1008214.

[190] Y. Liu *et al.*, “PHLDA1 knockdown alleviates mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress-induced neuronal apoptosis via activating PPARγ in cerebral ischemia-reperfusion injury,” *Brain Res Bull*, vol. 194, pp. 23–34, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.brainresbull.2023.01.007.

[191] F. Yang and R. Chen, “Loss of PHLDA1 has a protective role in OGD/R-injured neurons via regulation of the GSK-3β/Nrf2 pathway,” *Hum Exp Toxicol*, vol. 40, no. 11, pp. 1909–1920, Nov. 2021, doi: 10.1177/09603271211014596.

[192] Y. Liu, N. Yang, and P. Zuo, “CDNA microarray analysis of gene expression in the cerebral cortex and hippocampus of BALB/c mice subjected to chronic mild stress,” *Cell Mol Neurobiol*, vol. 30, no. 7, pp. 1035–1047, Oct. 2010, doi: 10.1007/s10571-010-9534-8.

[193] T. Nagata *et al.*, “Profiling of genes associated with transcriptional responses in mouse hippocampus after transient forebrain ischemia using high-density oligonucleotide DNA array,” *Molecular Brain Research*, vol. 121, no. 1–2, pp. 1–11, Feb. 2004, doi: 10.1016/j.molbrainres.2003.10.023.

[194] M. J. Arends and A. H. Wyllie, “Apoptosis.-Mechanisms and Roles in Pathology,” *Int Rev Exp Pathol*, vol. 32, 1991.

[195] Mattson Mark, “Neuronal life-and-death signaling, apoptosis, and neurodegenerative disorders,” *Antioxid Redox Signal*, pp. 11–12, 2006.

[196] B. Pettmann and C. E. Henderson, “Neuronal Cell Death Review system, and probably also in unicellular organisms (re,” 1998.

[197] S. R. D’mello and P. C. Chin, “Treating Neurodegenerative Conditions Through the Understanding of Neuronal Apoptosis,” *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, pp. 3–23, 2005.

[198] C. C. Ferri, F. A. Moore, and M. A. Bisby, “Effects of facial nerve injury on mouse motoneurons lacking the p75 low-affinity neurotrophin receptor.,” *J Neurobiol*, vol. 34, no. 1, pp. 1–9, Jan. 1998.

[199] A. P. De Vincenti, F. C. Alsina, F. Ferrero Restelli, H. Hedman, F. Ledda, and G. Paratcha, “Lrig1 and Lrig3 cooperate to control Ret receptor signaling, sensory axonal growth and epidermal innervation,” *Development*, vol. 148, no. 16, Aug. 2021, doi: 10.1242/dev.197020.

[200] F. Ferrero Restelli, P. A. Fontanet, A. P. De Vincenti, T. L. Falzone, F. Ledda, and G. Paratcha, “Tetraspanin1 promotes NGF signaling by controlling TrkA receptor

proteostasis," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 77, no. 11, pp. 2217–2233, Jun. 2020, doi: 10.1007/s00018-019-03282-3.

[201] M. Pehar *et al.*, "Peroxynitrite transforms nerve growth factor into an apoptotic factor for motor neurons," *Free Radic Biol Med*, vol. 41, no. 11, pp. 1632–1644, Dec. 2006, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.08.010.