



Carrera de
Doctorado en
Neurociencias



AGENCIA NACIONAL
DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN

I N I M E C

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
TESIS DE DOCTORADO EN NEUROCIENCIAS

“Caracterización de los mecanismos que modifican el citoesqueleto de actina en degeneración axonal de neuronas sensoriales y su impacto en el proceso degenerativo”

Estudiante: Mag. Gaby Fabiana Martínez

Laboratorio de Neurobiología

Instituto de Investigación Médica “Mercedes y Martín Ferreyra”

Director de tesis: Dr. Nicolás Unsain

Co-Director: Dr. Alfredo Cáceres

Córdoba, Argentina, 2019.

COMISIÓN ASESORA

Nombre y Apellido: Dra. Claudia Hereñú

Nombre y Apellido: Dr. Santiago Quiroga

Nombre y Apellido: Dr. Nicolás Unsain

Nombre y Apellido: Dr. Alfredo Cáceres

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

“El que sabe y puede está en deuda con el que no sabe y no puede”

Clemente Estable

INDICE

Indice	1
Resumen	2
Abstract.....	3
Glosario.....	4
Capítulo 1: Introducción	5
Antecedentes Generales	6
Desarrollo del Sistema Nervioso	6
Degeneración Axonal.....	7
Degeneración Walleriana.....	9
“La importancia de la citoarquitectura”	11
Citoesqueleto filamentoso de Actina	11
Rol del citoesqueleto axonal en procesos de degeneración.....	13
“La comunidad del anillo”	14
Evidencia de citoesqueleto asociado.....	14
a membrana actina/espectrina en el sistema nervioso	
Desestabilización de actina, su efecto en los	15
MPS y la estabilidad axonal.....	15
Microscopía de super-resolución por	
depleción de la emisión estimulada, <i>STED</i>	18
Microscopía de Expansión de Proteínas.....	19
Concepto básico de la Microscopía de Expansión (ExM).....	20
Motivación y organización de la tesis	21
Hipótesis y Objetivos	22
Capítulo 2: Resultados Objetivo específico #1.....	23
Introducción específica	24
Resultados	25
Conclusión específica	36
Capítulo 3: Resultados Objetivo específico #2.....	37
Introducción específica	38
Resultados	39
Discusión específica	48

Capítulo 4: Resultados Objetivo específico #3	49
Introducción específica	50
Resultado	51
Conclusión específica	61
Capítulo 5: Discusión	62
Discusión capítulo #2	63
Discusión capítulo #3	68
Discusión capítulo #4	72
Capítulo 6: Materiales y Métodos	80
Referencias	95
Agradecimientos	107

Resumen

La **Degeneración Axonal** (DA) es un proceso normal del desarrollo del sistema nervioso. La DA participa junto con otros procesos (como el guiado axonal, el colapso de conos de crecimiento o la retracción axonal) en la maduración de los circuitos neuronales para que lleguen a ser funcionales. Interesantemente, muchos mecanismos moleculares que controlan la DA del desarrollo, también participan de la DA en condiciones patológicas, como en el caso de una lesión axonal (como ocurre en la **Degeneración Walleriana**) o en enfermedades neurodegenerativas (como en Alzheimer o Parkinson). Es por todo esto que ha resultado de gran interés en los últimos años conocer en detalle los mecanismos involucrados en la destrucción del axón en diversos contextos. El **citoesqueleto axonal** participa directamente en la mantención estructural y funcional de los axones. Evidencias previas sugieren un rol de vías de señalización que controlan la dinámica del **citoesqueleto de actina** durante el desarrollo, lesiones axonales y algunas patologías. Sin embargo, hasta la realización del presente trabajo no existían evidencias de los cambios directos provocados por la degeneración en la estructura del **citoesqueleto de actina** y sus componentes asociados, como las **estructuras periódicas de citoesqueleto asociado a membrana de actina/espectrina** (**MPS**, por sus siglas en inglés). En este marco, el objetivo general de la tesis fue evidenciar cambios estructurales en el **citoesqueleto de actina** y el **MPS** de neuronas sensoriales en un modelo de DA del desarrollo (**Privación de NGF, PNGF**) y en un modelo de **Degeneración Walleriana** (**DW**, corte del axón), mediante métodos de microscopía de super-resolución (**STED y Microscopía de Expansión**) y microscopía confocal. En primer lugar evidenciamos que la privación de **NGF** provoca cambios tempranos en el **citoesqueleto de F-actina** (axones y conos de crecimientos) y por nanoscopia **STED** demostramos que el remodelado de **MPS** es temprano y que su posterior pérdida precede la fragmentación axonal. Identificamos su rol clave en la mantención axonal cuando evidenciamos que la protección farmacológica del **MPS** retarda la fragmentación de los axones en vías de degeneración. En el segundo objetivo, validamos la utilización de **Microscopía de Expansión** cuantitativa para evidenciar el **MPS** y evaluar cambios en su abundancia y organización. En el tercer objetivo de la tesis utilizamos esta técnica para evaluar cambios en el citoesqueleto de actina y en la organización del **MPS** axonales durante la **Degeneración Walleriana**. Pudimos evidenciar cambios tempranos de **F-actina** en conos de crecimiento de axones distales. La organización y abundancia del **MPS**, también fue afectada significativamente a tiempos tempranos de la **Degeneración Walleriana**. Esta pérdida del **MPS** precedió la fragmentación axonal y la disrupción farmacológica de los mismos aceleró el proceso de pérdidas de axones. En su conjunto, los resultados del presente trabajo de tesis, aportan por primera vez datos claves sobre el rol estructural del **citoesqueleto de F-actina** y componentes asociados (**MPS**) en la mantención axonal en dos modelos de degeneración. Sumado a esto, también se logró poner a punto la técnica de **Microscopía de Expansión** como método cuantitativo de súper-resolución para la observación del **MPS** utilizando microscopios de fluorescencia convencionales.

Abstract

Axonal degeneration (AD) is a normal process during the development of the nervous system. AD is essential, together with other processes such as axon guiding, growth cone collapse and axon retraction, in shaping functional and mature neuronal circuits. Interestingly, some molecular mechanisms that control AD during development also participate in AD in pathological conditions, such as in axonal injury (**Wallerian degeneration**) and in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. Hence, it is important to get to understand the mechanisms involved in axonal destruction in different contexts. Previous evidence suggests that regulators of actin dynamics play a role in AD in various contexts. However, by the time we started this project, it was not known if there was a change or remodeling of the actin cytoskeleton and associated structures such as the **actin/spectrin membrane-associated periodical skeleton (MPS)** in degenerating axons. Accordingly, the general objective of the thesis was to characterize possible structural changes in the actin cytoskeleton and the MPS of sensory neurons in a developmental AD model (NGF deprivation, PNGF) and in a Wallerian Degeneration model (DW, axon transection), using super-resolution methods of (STED nanoscopy and Expansion Microscopy) and confocal microscopy. First, we show that NGF deprivation causes early changes in the actin cytoskeleton (axons and growth cones) and by STED nanoscopy we show that remodeling and subsequent loss of the MPS is early and precedes axonal fragmentation, respectively. We identify a key role in axonal maintenance when we show that the protection of MPS retards the fragmentation of axons undergoing degeneration. In the second objective, we validate the use of quantitative **Expansion Microscopy** to evidence the MPS and evaluate changes in its abundance and organization. This allowed us to move forward with the third objective of the thesis that consisted in evaluating changes in the actin cytoskeleton and the MPS during Wallerian Degeneration. We were able to show early changes of F-actin in growth cones of degenerating axons. The organization and abundance of the MPS, was also significantly affected at the early time of the Wallerian Degeneration; with a further loss in organization preceding axonal fragmentation. Interestingly, pharmacological disruption of the MPS accelerated axon loss in the context of degeneration but not in uninjured axons. As a whole, the results of this thesis work, provide key data on the structural role of the F-actin cytoskeleton and associated components (MPS) in axonal maintenance in two degeneration models. In addition to this, we introduce quantitative Expansion Microscopy as a super-resolution method to study the MPS using conventional fluorescent microscopy.

Glosario y Siglas

Degeneración Axonal del Desarrollo: eliminación de neuritas (destrucción axonal) que ocurre durante el desarrollo embrionario. También conocida como “pruning”.

Pruning: eliminación de segmentos axonales o dendríticos, como mecanismo de refinamiento del circuito neuronal maduro durante el desarrollo del sistema nervioso.

Degeneración local: autodestrucción de ramas laterales o enteras de axones.

Degeneración por privación de NGF (PNGF): modelo *in vitro* de degeneración axonal local que se produce en neuronas periféricas por la falta de factor neurotrófico *NGF*. Emula la degeneración ocurrida en el desarrollo del sistema nervioso periférico en donde los axones compiten por cantidades limitantes de factores tróficos secretados por el tejido que inervan (por ejemplo, la dermis).

Degeneración Walleriana (DW): degeneración que ocurre en axones que quedan separados del soma neuronal luego de una lesión o corte (zona distal de los axones).

DA: Degeneración Axonal.

NGF: *del Inglés:* Never Growth Factor. Factor de crecimiento nervioso.

PNGF: Privación de *NGF*.

MPS: *del Inglés:* actin/spectrin Membrane-associated Periodic Skeleton. En este trabajo identificaremos con esta sigla a las estructuras llamadas: Esqueleto periódico de actina/espectrina asociado a membrana.

DRG: *del Inglés:* Dorsal Root Ganglion. En este trabajo identificaremos con esta sigla al Ganglio de la Raíz Dorsal y Neuronas Sensoriales.

CCs: Conos de Crecimientos de axones.

MT: Microtúbulos.

F-actina: Filamentos de Actina

ExM: *del Inglés:* Expansion Microscopy. Microscopía de Expansión.

STED: *del Inglés:* Stimulated Emission Depletion. Microscopía de super-resolución.

Capítulo. 1

Introducción

1. Desarrollo del Sistema Nervioso: señales que intervienen en la formación de un sistema maduro.

Las neuronas son células con morfología asimétricas, que durante su desarrollo extienden neuritas de su soma para formar la morfología que las caracteriza (cuerpo celular, árbol dendrítico y axón). Muchas de esas neuritas no llegan a formar parte del circuito neuronal maduro: durante el desarrollo del sistema nervioso, varios mecanismos de control intervienen para que algunas de esas neuritas crezcan y formen parte del circuito neuronal adulto, y para que otras sean activamente eliminadas. Esta serie de eventos progresivos sobre el guiado y crecimiento, pueden ser de efecto positivo o negativo para la extensión neurítica y/o axonal (McCormick y Leipzig. 2012; Riccomagno y Kolodkin. 2015).

Por ejemplo; el guiado de axones por señales de la Matriz Extracelular (MEC), señales físicas (proteínas de anclaje de la MEC) o químicas (proteínas difusibles de la MEC), puede controlar positiva o negativamente el crecimiento neurítico (McCormick y Leipzig. 2012). Dentro de las señales difusibles de impacto positivo, se encuentran los factores tróficos de crecimiento neuronal como las neurotrofinas (da Silva y Wang. 2011) y dentro de las señales negativas con un rol directo en el guiado axónico se encuentran las Semaforinas. Por ejemplo, la Semaforina Sema3A provoca el colapso de terminales axónicas (conos de crecimiento), un efecto repulsivo que hace que los axones eviten esa zona y puedan recomenzar su avance “buscando” el camino correcto a sus efectores finales (Yamamoto y col., 2003); (Fig. 1). Este balance entre señales positivas y negativas de regulación del desarrollo del sistema nervioso, tiene como único fin guiar a los axones de algunas neuronas a establecer sinápsis (neuronas-efectores) correctas, siendo el resultado final el desarrollo de un circuito neuronal maduro funcional.

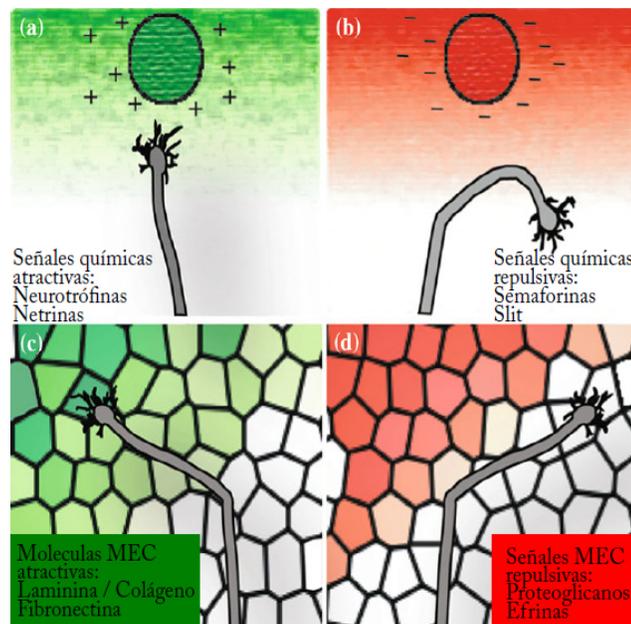


Fig. 1: Esquema que muestra la respuesta de axones ante señales del ambiente: positivas difusibles (a, verde) y no-difusibles (c, verde). En (b, rojo) se indica como el axón cambia su dirección frente a señales negativas difusibles, los mismo se muestra en el recuadro (d, rojo) pero frente a señales negativa no-difusibles. Imagen tomada y modificada de McCormick and Leipzig. 2012.

2. Degeneración Axonal: La degeneración axonal es un evento normal del desarrollo.

Durante el desarrollo del sistema nervioso, otro proceso muy común que participa en la maduración del sistema nervioso funcional es la degeneración axonal (DA), que puede tener lugar en segmentos pequeños del axón y sus colaterales (como en el “pruning” o poda) o puede eliminar todo un axón y culminar con la pérdida de esa neurona y la fragmentación de los axones (Yaron y Schuldiner. 2016). Lo interesante es, que dichos eventos son altamente conservado en la escala evolutiva, se ha evidenciado desde insectos hasta mamíferos, lo que sugiere el importante rol que cumplen los fenómenos de regulación en la formación de los circuitos maduros del sistema nervioso (Liquin Luo y Dennis D.M. O’Leary. 2005; Neukomm y Freeman. 2014).

Uno de los ejemplos más citados de la bibliografía es el mecanismo de remoción de neuritas que ocurre durante la formación del *mapa retinotópico* en modelos embrionarios de pollo (Nakamura and O’Leary. 1989), y ratón (Hindges y col., 2002; Hoopfer y col., 2006). Al comienzo del desarrollo el crecimiento neurítico es desorganizado y hay una gran proyección de neuritas arborizadas a la región del *teptum-óptico*. En ambos modelos se observó que durante el avance del desarrollo se produce una degeneración en estas proyecciones neuríticas y solo unas pocas forman las conexiones finales del *mapa retinotópico* maduro (Luo y O’Leary. 2005).

Esta degeneración axonal en el desarrollo ocurre tanto en el sistema nervioso central como en el periférico y varios estudios han demostrado que el proceso de “*pruning*” en los axones periféricos puede ser regulado por la integración de señales del ambiente. Por ejemplo, la competición de las neuritas al acceso de factores tróficos de crecimiento liberados en cantidad limitante por los tejidos que tienen que inervar (por ejemplo; *Neurite Growth Factor*, NGF) tiene como consecuencia que solo las terminales axonales que inervan correctamente su blanco reciben el suficiente soporte trófico y sobreviven (Hamburger & Levi-Montalcini 1949; Levi-Montalcini 1987; Harrington y Ginty 2013). Esta especie de “competencia trófica”, provoca la retracción local de los que no reciben el suficiente soporte trófico que puede continuar con la fragmentación axonal y finaliza con la muerte neuronal por apoptosis, tanto en neuronas sensoriales como simpáticas (Harrington & Ginty 2013, Levi-Montalcini 1987). Esta degeneración paradigmática en el desarrollo del sistema nervioso es de especial relevancia en el presente trabajo ya que nosotros usamos un modelo en cultivo que emula la degeneración axonal de neuronas sensoriales por la pérdida de soporte trófico ejercido por NGF.

Vías moleculares pro-degenerativas. Los mecanismos moleculares que participan en la degeneración axonal hasta el momento no son del todo entendidos. Se han postulado posibles vías de señalización que tienen un rol en la activación de mecanismos pro-apoptóticos durante el desarrollo (Wang y col., 2012); (Fig. 2). Las Caspasas son proteasas dependientes de cisteínas que desempeñan un rol fundamental en la regulación del control de la apoptosis (muerte celular programada) durante el desarrollo y el mantenimiento de tejidos, así como en algunas neuropatologías o lesiones (Li y Yuan. 2008; Degterev y Yuan. 2008). Por otra parte,

las vías de las caspasas son ampliamente conservadas ya que existen evidencias de su rol en apoptosis en todo el reino animal.

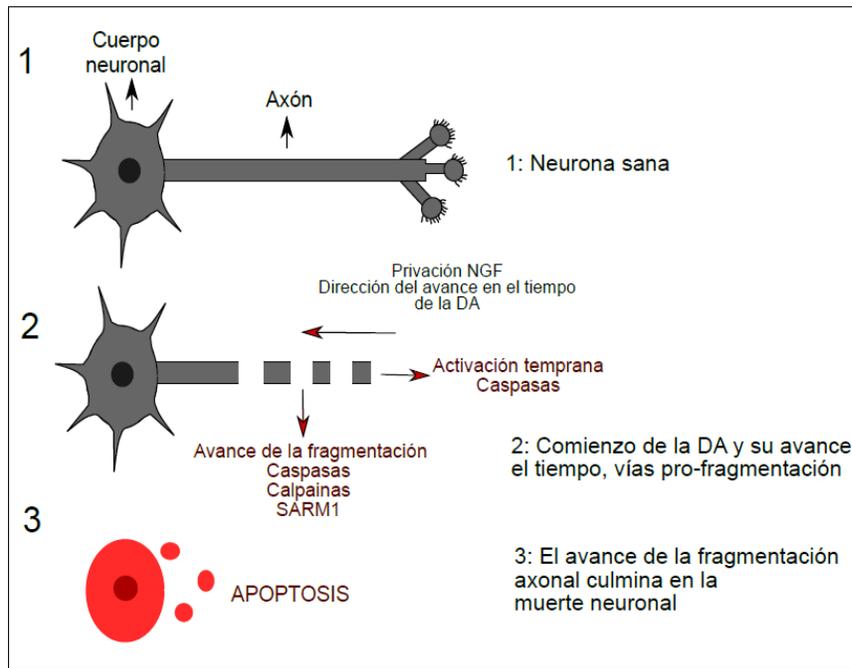


Fig. 2: Esquema de la Degeneración axonal que ocurre durante el desarrollo: A medida que avanza la DA (hasta fragmentación axonal) las flechas (relleno rojo) señala algunas de las vías pro-degenerativas que se las vinculan en los pasos de avance de la degeneración hasta llegar a la apoptosis.

En modelos de privación del factor trófico *NGF* en neuronas sensoriales *in vitro* (*PNGF*, que emulan la degeneración ocurrida durante el desarrollo) se evidenció que la eliminación genética de Caspasa-3 o de Caspasa-6 protegen de la degeneración axonal (Unsain y col., 2013; Cusack y col., 2013). Sumado a esto, en experimentos con ratones *knock-out* para Caspasas, evidenciaron un retraso en la poda de neuritas ocurrida durante el refinamiento del *mapa retinotópico* (Simon y col., 2012). En suma, estas evidencias sugieren que las Caspasas tienen una activación local en el axón provocada por la DA en el desarrollo y cuya actividad es necesaria para la fragmentación axonal.

Por otra parte, las Calpains (proteasas dependientes de Ca^{+}), también están vinculadas con procesos de remoción neurítica durante el desarrollo probablemente mediante su participación en la degradación de espectrina, clivaje de Caspasas y degradación de otros componentes del citoesqueleto, como actina y tubulina (Billgery col., 1988; Johnson y col., 1991; Spira y col., 2003). Por ejemplo, experimentos mostraron que el silenciamiento de Calpastatina (inhibidor endógeno de la actividad de Calpains) mediante la utilización de ARN de interferencia acelera la fragmentación axonal en modelos de privación de *NGF* (Yang y col., 2013).

Otra de las vías postulada recientemente en la degeneración axonal es la regulada por la proteína SARM1 (sterile alpha and TIR motif containing 1) (Osterloh y col., 2012; Geisler y col., 2016; Turkiew y col., 2017). Utilizando un modelo murino de *sarm1^{-/-}* se obtuvieron resultados robustos de la reducción de pérdida de axones en estos ratones, tanto durante la privación de NGF como luego de una injuria axonal (Killackey y col., 2018). En la próxima sección detallaremos lo que se conoce de esta vía de señalización, ya que ha sido mayormente estudiada en el contexto de Degeneración Walleriana.

3. Degeneración Walleriana: *mecanismos compartidos con la degeneración durante desarrollo y enfermedades neurodegenerativas.*

Cuando se produce un corte en axones, la porción distal (que queda separada del cuerpo neuronal) inicia una serie de eventos activos que producen su fragmentación y posterior degradación. Este fenómeno fue observado por primera vez por Augustus Waller en 1850 y por eso se la conoce como *Degeneración Walleriana* (DW, Waller A. 1850).

Interesantemente, los mecanismos que se disparan con el corte axonal y que inducen la DW son similares a los que ocurren durante la degeneración del desarrollo del sistema nervioso (Lou y O'Leary. 2005). Más aun, algunas evidencias han demostrado que el inicio de enfermedades neurodegenerativas, que comienzan con la pérdida de axones y avanzan hasta la muerte neuronal, comparte mecanismos de procesos locales que suceden en la DW (Dadon-Nachum y col., 2011; Kanaan y col., 2013; Neukomm y Freeman., 2014; Tagliaferro y col 2016). Esto hace que el modelo de DW sea interesante para el estudio *in vitro* de mecanismos de degeneración axonal. No solo por los mecanismos compartidos con algunas enfermedades neurodegenerativas, sino también porque el corte axonal desencadena procesos de degeneración simultáneos y rápidos en el tiempo, lo cual facilita su estudio (Coleman y col., 2005).

En base a esto, el posible rol de algunas vías degenerativas han sido estudiadas en este modelo, por ejemplo; vías Calpaínas y Caspasas (Unsain y col., 2013; Neukomm y Freeman., 2014). Estudios de DW en neuronas sensoriales *in vitro*, mostraron que las caspasas parecen no tener un rol clave en axones sensoriales distales durante esta degeneración (Unsain y col., 2013). Contrario a lo que se evidencio en vía Calpaínas y sus reguladores en numerosos trabajos. Por nombrar algunos, ensayos *in vivo*, evidenciaron una protección en el citoesqueleto axonal luego de una injuria en el nervio ciático de ratones transgénicos que sobreexpresan Calpatastina, un inhibidor endógeno de Calpaínas (Ma y col., 2013); las Calpains son proteasas dependientes de Ca²⁺ y se ha mostrado que luego del corte del axón se da un influxo de Ca²⁺ que podría activar estas proteasas (George y col., 1995); las Calpaínas aumentan su expresión luego de una injuria (Glass y col., 2002; Wang y col., 2012) y la inhibición farmacológica de las misma protege a los axones de su fragmentación durante la DW (Wang y col., 2000). Por otra parte, hace

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES GENERALES

un tiempo atrás ya habían sido vinculadas con la degradación de componentes proteicos del citoesqueleto, como los son los MT y espectrina, que contienen sitios consenso de clivaje por Calpaínas (Billger y col., 1988; Johnson y col., 1991).

Ensayos *in vitro*, demostraron que durante la degeneración de axones distales existe una reducción de Calpastatina, y por ende, el control que estas efectúan sobre las Calpaínas, lo cual podría ser el agente gatillador de la fragmentación axonal. Estos resultados coinciden con lo observado en ensayos de modelos de Privación de NGF (Yang y col., 2013), como discutimos en la sección precedente.

Otro mecanismo molecular que gatilla la degeneración axonal fue descubierta gracias a décadas de estudio de una mutación espontánea. Se observó que en ratones de de la cepa *C57/Wld^s* (por las siglas en ingles de “Wallerian Degeneration slow”) no presentan una destrucción rápida ni total de sus axones durante la DW, sino que los mismos se mantienen por semanas morfológicamente intactos (Lunn y col., 1989; Perry y col., 1991). Análisis genéticos demostraron que el re-arreglo genómico que explica esta protección se debía a la sobre expresión de la proteína Nmat1 (*del inglés*: Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase); (Mack y col., 2001).

Nmat1 está vinculada a la síntesis de NAD⁺ (*del inglés*: Nicotinamide Adenine Dinucleotide) y estudios posteriores demostraron que esa capacidad enzimática era la que explicaba la sobrevida axonal (Sasaki y col; 2010; Babetto y col; 2010), ya que con el solo agregado exógeno de NAD⁺ al cultivo la DA se ve drásticamente inhibida poniendo en manifiesto otra vía posible de control de la DW (Araky y col., 2004).

La identidad del sistema sensible al que prevenía la degeneración axonal fue un misterio durante décadas. La explicación vino de la mano del descubrimiento del rol fundamental de SARM1 en la degeneración axonal, cuando trabajos en *Drosophila melanogaster* como en ratón evidenciaron que la depleción de la proteína SARM1 retrasa la DW (Osterloh y col., 2012). Interesantemente, esta proteína tiene la capacidad enzimática de degradar el NAD⁺ celular y es esa actividad la que explica que cuando SARM1 se activa (por mecanismos aún desconocidos) induce la rápida degradación de NAD⁺ y esa pérdida drástica de una molécula central para el metabolismo celular inicia las vías irreversibles de la destrucción activa del compartimento axonal (Gerdtz y col., 2015; Sasaki y col., 2016). Esto resultados explican de qué manera el tratamiento con NAD⁺ protege de la fragmentación axonal al contrarrestar la actividad de SARM1 (Fig. 3).

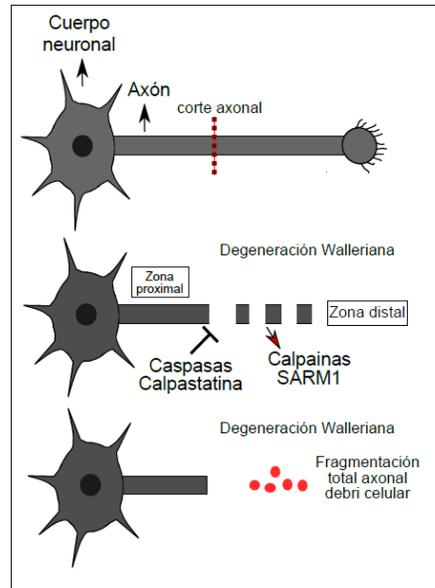


Fig. 3: Esquema de lo que ocurre en el axón durante el avance de la *Degeneración Walleriana*: Luego de un corte en los axones se activan diferentes mecanismo de procesos de fragmentación axonal-distal separados del cuerpo neuronal. Esto culmina con la fragmentación total y quedando solo debris celular.

En resumen, en esta primera parte de la introducción realizamos una revisión general de los mecanismos que intervienen en la Degeneración en el Desarrollo y/o pos-injuria axonal. Mecanismos que son compartidos, y vinculados en procesos iniciales/locales de algunas enfermedades neurodegenerativas.

Como puede verse en la literatura en degeneración axonal, los mecanismos moleculares descritos se centran en vías de señalización, pero poco o nada se conoce sobre cuáles son los eventos celulares o moleculares que inducen la desestabilización axonal, que continua con su fragmentación y pérdida. Como discutiremos mas adelante, son escasos los trabajos que estudiaron, por ejemplo, el efecto de la DA en el citoesqueleto axonal. Algunos trabajos evaluaron cómo se degrada en última instancia durante la fragmentación, pero poco o nada se conoce sobre si el citoesqueleto se remodela temprano durante el proceso de DA.

4. “La importancia de la citoarquitectura”: citoesqueleto axonal.

Citoesqueleto de Actina. Los filamentos de actina (F-actina) se presentan en las células eucariotas como una estructura helicoidal formada por monómeros de actina conocidos como Actina Globular o G-Actina. En las neuronas la F-actina se encuentra organizada principalmente en haces o redes por debajo de la membrana plasmática (*esqueleto subcortical*) y formando la lamelipodia en el extremo de sus neuritas (*conos de crecimiento*) (**Fig. 4**). La dinámica de sus polimerización y despolimerización y su asociación con otras estructuras celulares son reguladas por una variedad de proteínas de unión a actina, y en su conjunto son componentes cruciales de la dinámica y función de este citoesqueleto (Pollard y Borisy, 2003; Pak y col., 2008);

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES GENERALES

El citoesqueleto de actina participa en varios procesos del desarrollo neuronal, como el establecimiento de polaridad, elongación axonal y transporte vesicular. En el extremo axonal se encuentra otro compartimiento rico en F-actina, el *cono de crecimiento* (CC), que son estructuras dinámicas que dependen en gran medida de cambios en la organización de los filamentos de actina que se encuentran en su periferia. El CC es el encargado de sensar y de responder frente a diferentes señales del ambiente que los rodea para el correcto guiado de los axones durante el desarrollo (**Fig. 4b**; Dent y col., 2011; Vitriol y Zheng, 2012).

El esqueleto de actina que se forma por debajo de la membrana plasmática se encuentra entrelazado con arreglos tetraméricos de espectrina. Este esqueleto subcortical esta conservado en todas las células eucariotas y es fundamental para muchas funciones de la membrana plasmática, como la localización de receptores, la endo- y exocitosis y los cambios de forma de la célula. La microscopía de súper-resolución permitió descubrir que el esqueleto subcortical de actina/espectrina en axones se organiza periódicamente, con anillos de actina separados por tetrámeros de espectrina (Xu y col., 2013), en lo que ahora conocemos como el MPS (por las siglas en inglés de “Membrane-associated periodic skeleton”). La organización y funciones de esta estructura la discutiremos en las próximas secciones y es uno de los objetos de estudio de este trabajo de tesis.

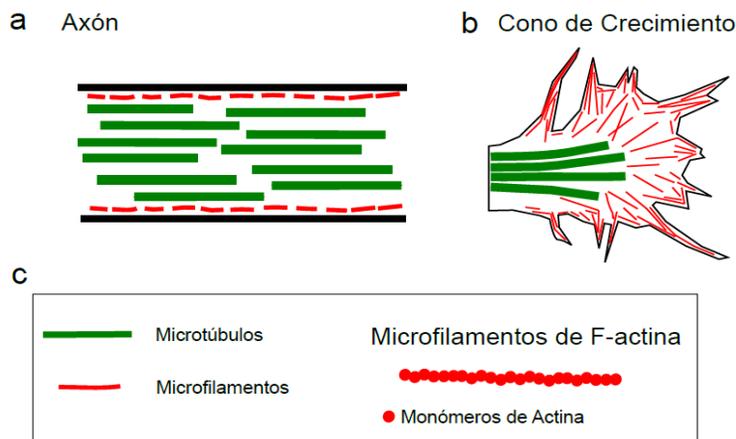


Fig. 4: Esquema de los componentes de citoesqueleto presentes en los compartimientos axonal. a) esquema de axón con Microtúbulos (líneas verdes), y Microfilamentos de F-actina formando una malla asociada a membrana plasmática (líneas rojas). b) esquema que representa el Cono de Crecimiento. Nótese, que estas estructuras son ricas en F-actina. c) dibujos de los diferentes componentes de citoesqueleto axonal.

Rol del citoesqueleto axonal en procesos de degeneración. Es sabido, que el citoesqueleto axonal tiene un rol fundamental en la estabilidad e integridad de los axones neuronales (Luo y O'Leary. 2005). La función y desarrollo de estas células depende en gran medida de un buen funcionamiento del citoesqueleto. Dado que este componente proteico celular es de gran importancia para la migración, proliferación, establecimiento de sinapsis (Kapitein y col., 2015; Dogterom y col., 2019) y polarización neuronal (Witte y col., 2008; Conde y col., 2009).

La gran cantidad de revisiones del tema publicadas en los último años reflejan el gran interes de la comunidad científica en el rol de los componentes del citoesqueleto microtubular para controlar varios fenómenos que ocurren en el axón desde su desarrollo, estabilidad, elongación, regeneración y en algunas neuropatías (Dent y Getler. 2003; Witte y col., 2008; Schafer y col., 2016; Miller y Suter. 2018; Malacrida y col., 2019).

Primeras aproximaciones demostraron que tratamientos farmacológicos que afectan la polimerización de la F-actina y microtúbulos (MT) mostraron que la disrupción de ambos componentes causa un efecto en la estructura y dinámica axonal (Solomon y Magendantz.1981). Esto sugiere que cambios en los componentes del citoesqueleto quizás puedan vincularse con la degeneración axonal. Esta idea es apoyada por ensayos que demostraron que la desestabilización farmacológica del citoesqueleto de actina (Citochalasina-D) puede activar vías pro-degenerativas *DLK* (*del inglés*: Dual Leucine Zipper Kinase) y *JNK* (*del inglés*: c-Jun N-terminal Kinase) en neuronas sensoriales (Valakh y col. 2015).

Por otra parte, se demostró que existe una degradación temprana de MT en el "pruning" axonales que ocurre durante el desarrollo. Lo que también fue observado en la *Degeneración Walleriana* donde se da una fragmentación de MT durante el proceso de desmantelamiento de los axones distales (Zhai y col., 2003). Estos hallazgos permiten pensar que vías de regulación del citoesqueleto pueden estar vinculadas en algunos de estos procesos normales y/o patológicos de DA.

Posible rol del citoesqueleto de F-actina en la degeneración axonal. Una de las vías más estudiadas de regulación del citoesqueleto de actina, son las vías de señalización de las familias de pequeñas proteínas Rho-GTPsas (como RhoA, Rac y cdc42). Esta familia de proteínas monoméricas-G es activada cuando se unen a GTP, por intercambio de guanina (GEFs), y son desactivadas por la unión a GDP (por intercambio por GAPs). Esta unión a proteínas activadoras y no activadoras de GTPsas promueve el mecanismo de control de las mismas (Hall y Lalli. 2010).

La unión a GTP de estas proteínas inicia la activación de cascadas de señalización que causan un efecto en la reorganización y dinámica del citoesqueleto de actina. Por ello, las mismas se vinculan en la regulación de cambios en la morfología interna del citoesqueleto neuronal y por ende tienen un alto impacto en los cambios morfológicos neuronales (Hall y Lalli. 2010; Spillane y Gallo. 2014).

Varios trabajos han sugerido que proteínas que modulan la dinámica del citoesqueleto de actina participan en procesos neuro-degenerativos en diferentes modelos. Por ejemplo, la activación de RhoA luego de realizar un corte a axones de neuronas Hipocampales juega un rol clave en la degeneración axonal (Garland y col., 2012). Sumado a esto, el tratamiento con fármacos que desestabilizan la F-actina axonal se ha evidenciado que promueven la activación de vías pro-degenerativa (Valakh y col., 2015).

Otro hallazgo interesante, fue que la reducción del complejo proteico *ENAVASP* que está implicado en el control de la neuritogénesis, más el tratamiento con un inhibidor de ROCK (vía *RhoA/ROCK*) causa un efecto en la neuritogénesis neuronal lo que enuncia la vinculación de esta vía en el control neuritogénico de la neurona (Franco y col., 2010). Sumado a esto, existen numerosos resultados que aportan evidencias del rol de las vías de regulación del citoesqueleto de F-actina como, la ADF/cofilina (Heredia y col. 2006), en modelos de neurodegeneración (Tonges y col. 2012; Cook, Bolkan y Kretzschmar 2014).

En su conjunto, estos estudios sugieren que la modificación del citoesqueleto de actina es un mecanismo común a diversos procesos de desarrollo y degenerativos. Sin embargo, no existen evidencias que vinculen cómo estas numerosas cascadas de señalización afectan la estructura y función del citoesqueleto de actina axonal durante procesos neurodegenerativos.

5. “La comunidad del anillo”: Esqueleto periódico de actina/espectrina asociado a membrana (MPS)

Cambios dinámicos en la estructura y forma de la membrana plasmática celular son clave para diversas actividades celulares, como puede ser la adhesión al sustrato, la migración, la excitabilidad celular, etc. Un complejo proteico de proteínas filamentosas (cuyos principales componentes son la actina y espectrinas) forman lo que se denomina el esqueleto subcortical, la cual esta conservadas evolutivamente (Bennett and Baines, 2001; Baines, 2010).

Estas proteínas de citoesqueleto también se encuentran en neuronas y se las han vinculado en la importancia de la organización del fenotipo celular neuronal. Por ensayos de delección de diferentes miembros de la familia de las espectrinas, como las α II, β II, β III y β IV y mutaciones en humanos de estas, demostraron drásticos defectos fenotípicos del sistema nervioso (Parkinson y col., 2001; Ikeda y col., 2006). Por otra parte, la falta de estas proteínas también se la ha asociado con la desorganización de canales iónicos y defectos en la mielinización de nervios causando graves efectos funcionales (Komada and Soriano, 2002; Zhang y col., 2013; Huang y col., 2017).

Evidencia de citoesqueleto asociado a membrana de actina/espectrina en el sistema nervioso. Gracias a la microscopía de super-resolución, se descubrió que este complejo proteico presentaba un ordenamiento específico en los axones neuronales. Utilizando Microscopía de Reconstrucción Óptica Estocástica (STORM), se evidencio una ordenada micro-arquitectura a lo largo del axón, una periodicidad

de 190 nm y fueron denominadas como estructuras periódicas de citoesqueleto asociado a membrana de actina/espectrina (MPS; Xu et al, 2013).

Esta periodicidad que las caracteriza (190 nm) se encuentra por debajo del límite de resolución lo que evidencia la importancia de la aparición de las técnicas de nanoscopías para el descubrimiento de las mismas. Esta separación esta formada por el arreglo alternado de “anillos” de F-actina transversales al axon, vinculados entre ellos por “espaciadores” de tetrámeros de espectrina, lo cual forma un citoesqueleto periódico asociado a la membrana de los axones (**Fig. 5**; Xu y col., 2013).

Luego de su descubrimiento, otros grupos de investigación ampliaron las observaciones básicas del MPS, utilizando diferentes marcadores, nanoscopios, tanto *in vivo* como *in vitro* (Zhong y col., 2014; D'Este y col., 2016); y esta marca ha sido evidenciada en axones maduros y menos organizadas en dendritas, de todos los tipos neuronales examinados desde nematodos hasta el humano (Xu y col., 2013; D'Este y col., 2016; He y col., 2016).

Por otra parte, en zonas como el Segmento Inicial del Axón (AIS; *del inglés*: Axon Initial Segment) se observaron asociados con otras proteínas de citoesqueleto de membrana (Ankirina G y β -IVespectrina) distintas a las que componen los axones, donde sus componentes principales son F-actina/ β II-espectrina y Ankirina B (Leterrier y col., 2015; D'Este y col., 2017). Esto resultados aportan a la idea de que cada compartimiento neuronal tiene especificidad de componentes proteicos y ordenamiento de los MPS. Si bien se han evidenciado en nervios ciático y en el sistema nervioso central (Xu y col., 2013; D'Este et al., 2015), los trabajos más publicados de estas estructuras fueron hechos con cultivos neuronales.

Más allá de estos avances, aun no existen evidencias exactas de cuál es el rol de estas estructuras en el compartimiento axonal, si bien trabajos postulan de la importancia de los MPS en mantener el calibre axonal (Leite y col., 2016), otros hacen referencia que los componentes mínimos (F-actina y β II-espectrina) del MPS están íntimamente asociados para mantener la estructura de los axones. Esto último, lo demostraron utilizando tratamientos farmacológicos contra F-actina y un *Knock-down* de β II-espectrina, donde un efecto en alguno de los dos componentes da como resultado la pérdida estructural periódica del otro (Xu y col., 2013; Zhong y col., 2014).

Desestabilización de actina, su efecto en los MPS y la estabilidad axonal. El tratamiento con diferentes drogas que depolimerizan F-actina que actúan de diferente forma: Latrunculina sobre los monómeros y previene su incorporación en F-actina, mientras que la Citochalacina-D se une al extremo (+) de F-actina y previene la incorporación de nuevos monómeros. Estos tratamientos revelaron en distintas zonas axonales diferentes efectos en el MPS; por ejemplo, la Citochalacina-D afecta los MPS en dosis más bajas y más rápido que Latrunculina-A (Xu y col., 2013; Qu y col., 2017). Por otra parte, en la región del segmento inicial del axón ambas drogas en dosis altas no causan efecto en los MPS (Leterrier y col., 2015).

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES GENERALES

En base a esto, un grupo de investigación se focalizó en el estudio de qué tipos de reguladores de la polimerización de actina podría ser relevantes para la estabilidad del MPS. Demostraron que la delección en *D. melanogaster* de factores de elongación de actina (tipo *profilina* de mamíferos) no provocan cambios en la abundancia del MPS; y por lo contrario, la delección de nucleadores de actina si cambian la abundancia de estos (Qu y col., 2017). Lo que sugiere que los “anillos” de actina del MPS están formados por filamentos cortos de alto recambio.

Pero la importancia del MPS en la estabilidad axonal no se comprende con claridad hasta el momento. Estudios de desestabilización de F-actina demostraron que un efecto a este componente del MPS no se acompaña con la destrucción de axones en condiciones basales (Zhong y col., 2014; Valakh y col., 2015; Qu y col., 2017; Unsain y col., 2018b). Sumado a estos resultados, la utilización de herramientas moleculares en *D melanogaster* también evidenció que la delección de componentes de MPS no causan una destrucción axonal basal (Qu y col., 2017). Sin embargo, ensayos en *Caenorhabditis elegans*, mutantes para β -espectrina mostraron que sus axones son más frágiles y sufren ruptura axonal frente un movimiento mecánico (Hammarlund y col., 2007; Krieg y col., 2017). Si bien la falta de componentes del MPS en diferentes modelos parece no causar *per-se* la fragmentación axonal. En estos últimos datos citados podrían dar indicio que quizás la falta de componentes del MPS, como por ejemplo la espectrina, haga a los axones menos estables frente a una situación de estrés.

Sin embargo, no existen evidencias directas de la relación de los MPS y estabilidad de los axones. Si bien, los reportes antes mencionados dan indicios de que estas nuevas estructuras podrían ser claves para, el desarrollo, morfología y control de funciones del axón. Pero ninguna postula un rol directo en procesos fisiológicos y/o pos-injuria. Lo cual hace interesante saber cómo impactan cambios estructurales de los MPS durante estos procesos, y cuál es su efecto en la mantención y funcionalidad axonal.

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES GENERALES

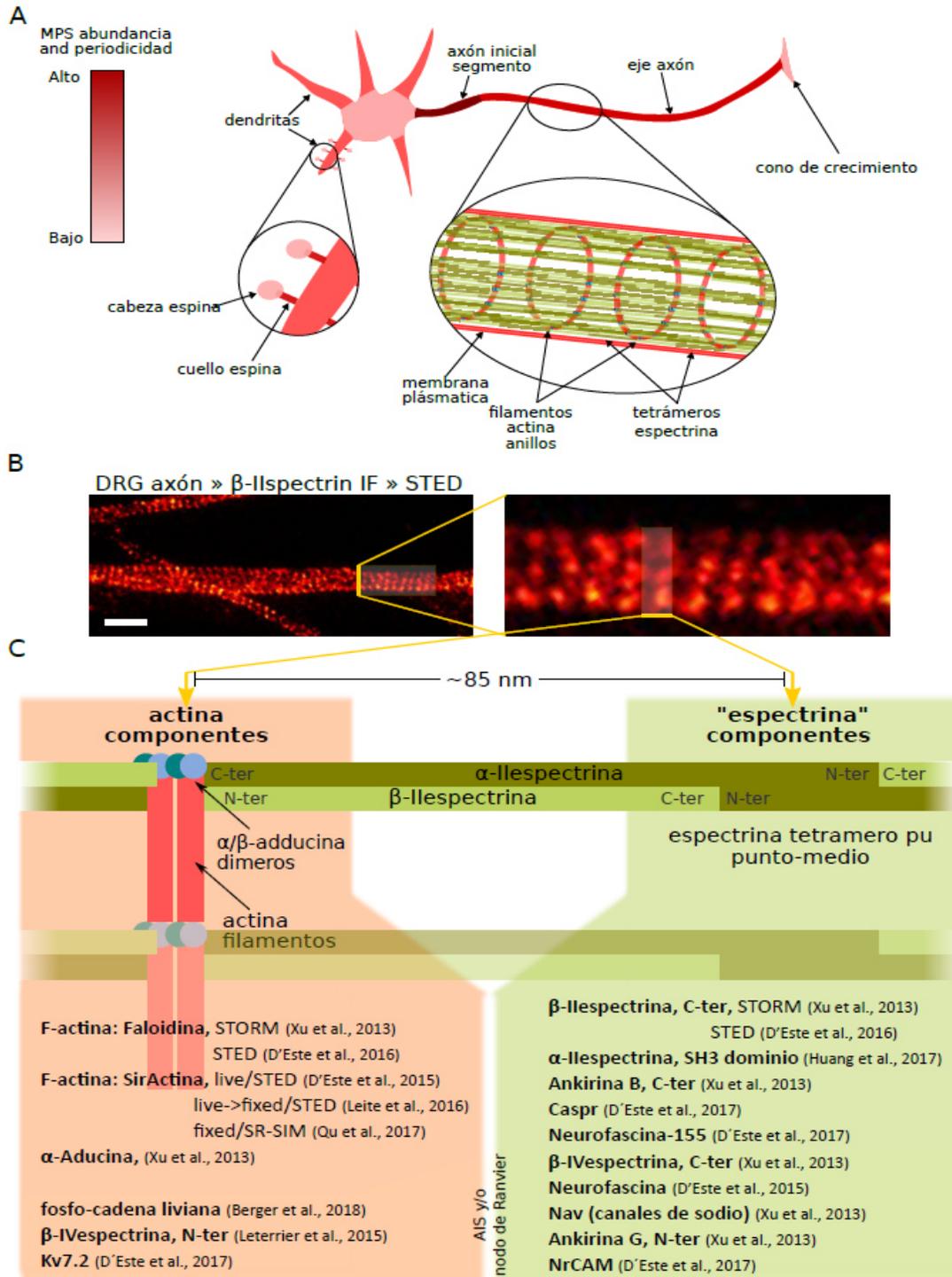


Fig. 5: Distribución y proteínas del MPS de células neuronales: A) esquema que muestra las zonas neuronales donde se encuentran MPS, su grado de organización y abundancia. B) imágenes STED de axones marcados para evidenciar β -IIspectrina (barra de escala 1 μ m). C) esquema que muestra componentes de actina y espectrina que conforman los MPS axonales. También se citan trabajos que marcan diferentes proteínas con diferentes microscopías de super-resolución. Imagen tomada y modificada de *Unsain y col., 2018b*.

6. Nanoscopía de fluorescencia: microscopías de super-resolución

Uno de los logros más relevantes de la física de los últimos tiempos fue poder “saltar” el límite de resolución en microscopías de fluorescencia. La luz tiene una difracción física característica, confiriendo a los sistemas ópticos un límite de resolución que está en el orden de los 200-300 nm; casi dos órdenes de magnitud más que el tamaño de una proteína típica. En los años 2009 y 2010, se propusieron diferentes técnicas que lograron “romper” esa limitante utilizando diferentes modelos de nanoscopías que podían sortear el límite de difracción lumínica, lo que fue una revolución científica y las diferentes técnicas de Microscopía de super-resolución (o nanoscopías de fluorescencia) prometen causar un gran impacto en investigación en ciencias biológicas y médicas (Stefan W Hell. 2009; Huang Bo. 2010).

La microscopía de STED (*del inglés*: Stimulated Emission Depletion, Hell y col., 1994), STORM (*del inglés*: Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, Klar y col., 2000) y PALM (*del inglés*: Photoactivated Localization Microscopy, Rust y col., 2006) constituyen las técnicas de super-resolución más utilizadas. En este trabajo utilizamos principalmente STED, por lo que nos centraremos a explicar en detalle su funcionamiento. Las técnicas de STORM y PALM son ejemplos de las técnicas que se conocen como de “localización de molécula única”, cuyos detalles puede leerse en diversas revisiones (Igarashi y col., 2018).

Microscopía de super-resolución por depleción de la emisión estimulada, STED. Es una microscopía de escaneo de campo lejano (*far-field*), que sobrepasa el límite de difracción normal de la luz. La misma consta de dos haces de luz, uno de excitación y otro de depleción. El haz de excitación es el haz de escaneo y excitación que es creado por un haz focalizado en el espacio, como en un microscopio confocal. A los pocos nanosegundos, se enfoca un segundo haz de “depleción”, que envía los fluoróforos recientemente excitados a un estado de desexcitación (estado cero sin emisión de fotones). La ganancia en resolución se da gracias que el haz de depleción tiene forma de rosquilla, lo que hace que en el centro su energía sea cero. La depleción así lograda hace que el ancho de la luz difractada por la primera excitación sea más angosta, porque lo que está alrededor es enviado a un estado “oscuro” (sin emisión de fotones gracias al impacto del haz de depleción). Así se obtiene, punto por punto durante el escaneo confocal, que la PFS efectiva sea más pequeña y por ende se logre una mayor resolución (disminuyendo el límite de resolución; **Fig. 6**). Cada fluoróforo tiene una longitud de onda particular a la que puede ser excitado, y otra a la que ese mismo fluoróforo puede ser “depletado” en el estado excitado. Y por tanto, esto condiciona los láseres y filtros de excitación y depleción de equipo de STED. En Materiales y Métodos (Capítulo 6) se detallan las particularidades del sistema óptico usado.

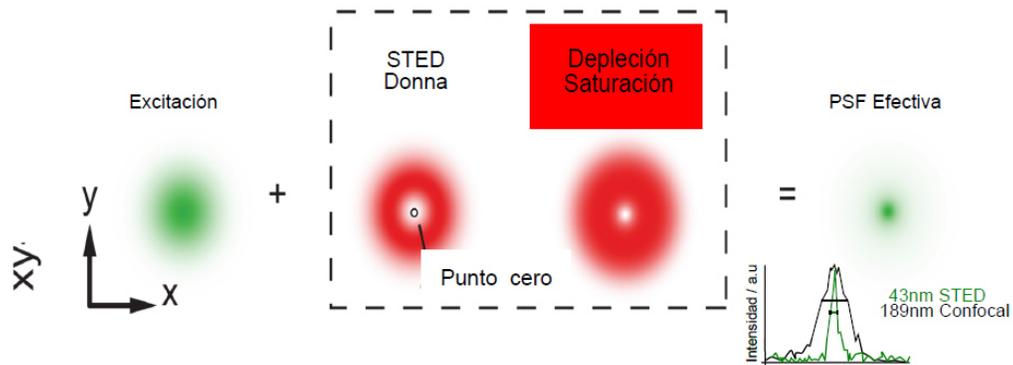


Fig. 6: Esquema del funcionamiento básico de microscopía de super-resolución STED: Se muestra la excitación en x/y. El recuadro indica el sistema de haces con la Donut, centro de la Donut punto cero (en el esquema identificada como Donna), al rededor zona de saturación y depleción de la luz. Como resultado da una PSF efectiva menor que microscopía confocal, 43nm vs. 189nm. Imagen tomada y modificada de *Huang y col., 2009*.

7. Microscopía de Expansión de Proteínas: “saltar” los límites de resolución utilizando microscopía de fluorescencia convencional

La microscopía de fluorescencia es una de las técnicas más utilizadas en las ciencias biológicas y médicas. El poder evidenciar una marca específica depende de la característica del microscopio, es decir, su límite físico de difracción de la luz que dará el límite de resolución del mismo. Hasta no hace mucho tiempo este límite se encontraba en unos pocos cientos de nanómetros, tamaño que es más grande que las moléculas biológicas. Las microscopías de super-resolución (nanoscopías de campo lejano) han permitido a investigadores poder evidenciar moléculas únicas o estructuras biológicas que estaban por debajo de este límite (*Huang y col., 2009; Hell, S.W.2010*).

El surgimiento de las nanoscopías ha sido un gran avance para el estudio de la micro-arquitectura celular por fluorescencia. Sin embargo, no todos los centros de investigación cuentan con este tipo de tecnologías, lo cual es una limitante a la hora de avanzar en algunas líneas de investigación. En el año 2015, Chen y colaboradores, desarrollaron la Microscopía de Expansión (ExM) que permite obtener super-resolución utilizando cualquier microscopio de fluorescencia convencional (confocal, epifluorescencia, etc; *Chen y col., 2015*).

La ExM consiste en anclar una muestra inmunomarcada en un hidro-gel, el cual recibirá una leve digestión enzimática, y posteriormente por diálisis de agua (gel-espécimen) será expandido. El resultado final de esta expansión, es la separación física e isométrica de los anticuerpos marcados (**Fig. 7 y “Materiales y Métodos”**). Los trabajos publicados hasta la fecha, evidencian que en una preparación de rutina el gel puede expandirse hasta ~4 veces por dimensión. (*Chen y col., 2015; Chozinski y col., 2016; Tillberg y col., 2016*). El resultado final, es la

obtención de imágenes que tiene una resolución lateral que es ~4 veces mejor que la del sistema óptico utilizado.

Desde entonces, varios trabajos se han publicado con la puesta a punto de dicha técnica con diferentes ajustes y/o variaciones metodológicas, dependiendo de la marca a utilizar (flouóforo, sondas, proteínas flourescentes) y el tipo de espécimen. Todos estos trabajos, aportaron al avance metodológico de la misma, lo que ha permitido ser utilizada para observar estructuras biológicas en, células, tejidos y hasta en diagnósticos de anatomía patológica, entre otros (Asmamaw y col., 2018; Wassie y col., 2019).

Por otra parte, esta técnica ha sido tan novedosa que trabajos se han focalizado, en el mejoramiento de la misma para aumentar su resolución. Con la Microscopía de Expansión (ExM) de rutina se obtiene aproximadamente una resolución entre 60-70nm y; la unión de ExM con microscopía de super-resolución STED ha mejorado esta resolución (~21nm); (Li y col., 2018). Por otra parte, la suma de protocolos que realizan cambios en la concentración del compuestos de solución que componen el hidro-gel y desnaturalizando las proteínas en vez degradarlas enzimáticamente (con Protinasa-K), se llegó a una resolución parecida ~20nm, lo que llamaron Ultra-Expansión, (Gambartto y col., 2019). Todos estos trabajos aportaron al crecimiento de la técnica y a la posibilidad de obtener super-resolución con la microscopía convencional que está disponible en la mayoría de los centros de investigación.

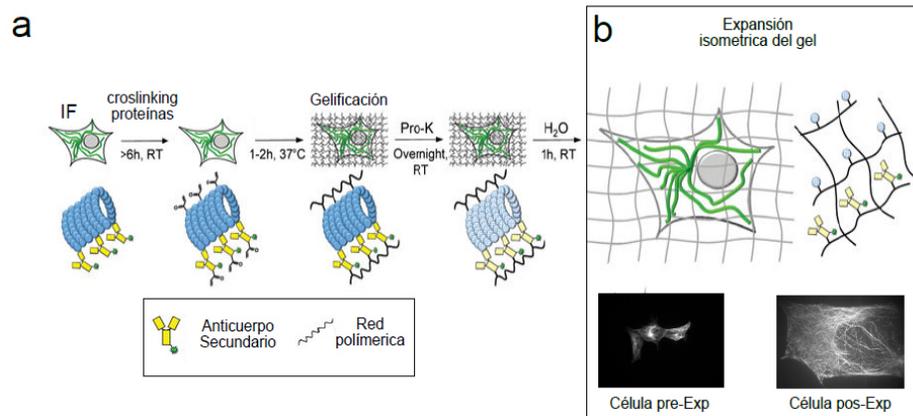


Fig. 7: Esquema que representa el procedimiento de la técnica de Microscopía de Expansión: a) pasos a seguir luego de realizar una inmunomarcación (IF) de la muestra a expandir. Anclaje de proteínas (“crosslinking”), inclusión en el hidrogel (gelificación), degradación (leve) enzimática (Pro-K) y b) expansión por diálisis de agua, esquema que representa la muestra expandida anclada a la red de polímero (hidrogel), debajo se muestran imágenes de células HEK293T (marcadas para evidenciar Tubulina) pre y pos-Expansión. Nótese, que en el campo de la imagen expandida no se llega a observar una célula entera. Imagen tomada y modificada de *Tillberg y col., 2016*.

8. Motivación y organización de la tesis

El trabajo de tesis se enmarca dentro de la caracterización de cambios en el citoesqueleto de actina en diversas modalidades de degeneración axonal en neuronas sensoriales. Si bien, existen publicaciones de la vinculación de vías de regulación del citoesqueleto de actina en procesos de degeneración aún se desconoce cuál es el efecto en el citoesqueleto axonal y si cambios estructurales de la F-actina tienen un impacto en la funcionalidad de los mismos. Por otra parte, el surgimiento de técnicas de nanoscopía hicieron posible el descubrimiento de estructuras nuevas del citoesqueleto de membrana de F-actina/espectrina, MPS, de los cuales hasta la fecha se han planteado diferentes hipótesis de su rol en condiciones basales en el compartimiento axonal, pero no existen evidencias de su rol en procesos de avances en la destrucción axonal (degeneración). En este sentido creemos que conocer el efecto en el citoesqueleto de actina nos permitirá evidenciar de qué manera esta estructura neuronal puede estar cumpliendo un rol en el avance de la destrucción axonal que ocurre al final del proceso de degeneración.

El trabajo de tesis se presenta en el siguiente orden, en primer lugar se realiza una introducción general del problema de estudio (**Capítulo 1**). Los **Capítulos 2, 3 y 4** detallan los resultados obtenidos de los 3 objetivos específicos del proyecto. En el **Capítulo 5** se presenta la discusión general de los resultados obtenidos y perspectivas a seguir. Por último, el **Capítulo 6** describe los materiales y metodologías utilizadas.

HIPÓTESIS

La degeneración axonal induce rápidamente un remodelado del citoesqueleto de actina y componentes asociados que intervienen en la mantención de los axones durante el avance de la degeneración hasta llegada la fragmentación axonal.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el remodelado del citoesqueleto de actina durante degeneración temprana y su efecto en la mantención y función axonal.

Objetivos Específicos

1. Caracterizar la respuesta del citoesqueleto de actina en axones sensoriales en un modelo de degeneración del desarrollo por *privación de NGF*.
2. Caracterizar y validar la técnica de Microscopía de Expansión para la observación y cuantificación del esqueleto periódico de actina/espectrina asociado a membrana.
3. Caracterizar la respuesta del citoesqueleto de actina en axones sensoriales en un modelo de *Degeneración Walleriana por corte de axones*.

Capítulo. 2

Respuesta del citoesqueleto de actina en axones sensoriales en un modelo de degeneración del desarrollo por privación de NGF.

Resultados del objetivo específico # 1

Introducción específica:

Durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso no todas las neuritas en crecimiento llegan a formar los circuitos neuronales maduros y la consecuente pérdida de neuritas es un evento normal durante el desarrollo. La Degeneración Axonal (DA) del desarrollo comienza como un evento local que induce fragmentación axonal y en la mayoría de los casos culmina con la muerte neuronal (Luo y O'Leary., 2005; Riccomagno y Kolodkin. 2015). Interesantemente, la pérdida temprana de neuritas y sinapsis caracteriza a diversas enfermedades neurodegenerativas (tales como Alzheimer, Parkinson, Glaucoma, etc) y muchas evidencias sugieren que los mecanismos de remoción de neuritas que ocurren durante el desarrollo embrionario también se activan en el transcurso de la degeneración axonal en dichas patologías (Luo y O'Leary 2005; Saxena y Caroni 2007; Tonges y col. 2012). Existen numerosos mecanismos moleculares de regulación del citoesqueleto neuronal (filogenéticamente conservados) que participan activamente en la remoción selectiva de neuritas durante el desarrollo, que pueden o no estar seguidas de la muerte neuronal. Pero poco se sabe cuál es el rol estructural y funcional del citoesqueleto de actina en la DA. Si bien, existen algunos trabajos que demuestra la participación de vías de señalización que modulan la dinámica del citoesqueleto de actina (polimerización y despolimerización) en procesos de degeneración axonal. Por ejemplo, el rol de la familia de las pequeñas GTPas, RhoA, donde su actividad aumenta luego de una lesión en el axón (Garland y col. 2012), o la intervención de ROCK en la retracción axonal dada por señales negativas (Franco y col., 2010). Como también existen evidencias que demuestran el rol de proteínas de unión a actina (*ADF/cofilina*) que desempeñan un papel central en la dinámica de los filamentos de la misma en modelos de la enfermedad de Alzheimer (Heredia y col., 2006). Sin embargo, no existían evidencias de cuáles son los cambios que ocurren en el citoesqueleto de actina y sus componentes asociados en la Degeneración Axonal.

En este contexto, el primer objetivo de la tesis se focalizó en el estudio del impacto de la Degeneración Axonal del Desarrollo en el citoesqueleto de actina y estructuras asociadas (como el MPS). Utilizando como modelo de estudio, cultivos de Explantos DRG (neuronas sensoriales) a los cuales se les realizó una privación de *NGF*. La elección del modelo fue tres razones: (a) a los 3 Días *In Vitro* (3DIV) presentan un crecimiento axonal hasta de 1mm de largo; (b) las mismas no desarrollan dendritas, por ende, todos los fenómenos observados son puramente axonales y (c) estas neuronas son capaces de responder a la falta de *NGF* degenerando sus axones (modelo que emula la Degeneración ocurrida en el Desarrollo del sistema sensorial).

1. Caracterización de los cambios del citoesqueleto de F-actina en los compartimientos neuronales, axón y cono de crecimiento durante el modelo de Degeneración por Privación de NGF.

1.a) Caracterización de la fragmentación axonal: lo primero que nos preguntamos fue en que momento de la Privación de NGF (*PNGF*) comienzan la fragmentación axonal para ello a cultivos de Ganglio de la Raíz Dorsal (DRG) de 3 días *in vitro* se les indujo Degeneración Axonal (DA) por *PNGF* a diferentes tiempos (3, 12, 18, 24 horas) de este modo realizamos un seguimiento temporal de la respuesta de los axones a dicha privación. Los resultados obtenidos, demostraron que a las 18 horas de provocada ésta los axones comienzan el proceso de la fragmentación axonal (**2-Fig.1 a**) que sigue hasta la 24 horas (**2-Fig.1 b**). Lo que nos sugiere que la fragmentación axonal es tardía en el tiempo en este modelo de DA.

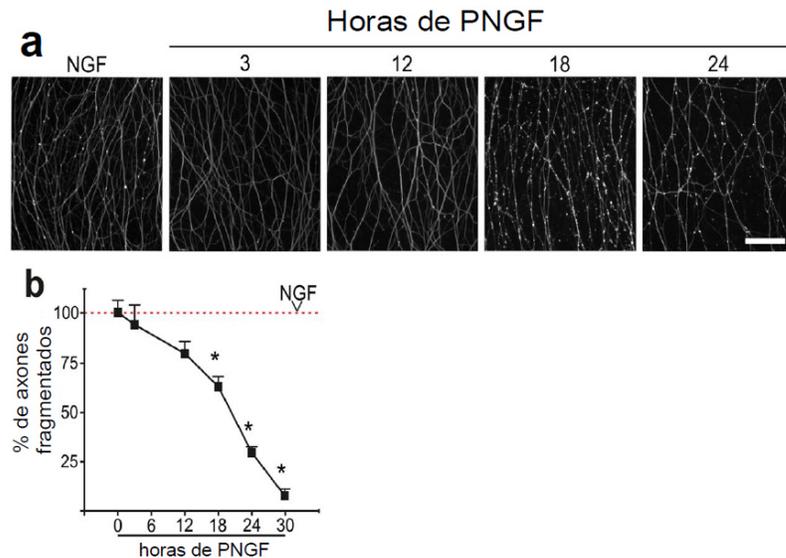


Fig. 1: **a)** Imágenes del proceso de fragmentación axonal, durante *PNGF* en el curso temporal (axones teñidos contra β III-tubulina). **b)** Gráfico que muestra la caída del % de axones fragmentados comparados con el control NGF, en el avance del tiempo de la *PNGF*. Nótese que las 18 horas se da una caída que es constante hasta las 24 horas. Se puede observar en las imágenes las zonas donde comienzan a perderse axones o la morfología que presentan los mismos en las imágenes control (*NGF*). Barra de escala: 100µm.

1.b) Efecto en el citoesqueleto de actina: en este punto evaluamos el efecto en la F-actina total en el compartimiento axonal en cultivos que estuvieron privados solo 3 horas (*PNGF*). Observamos un cambio en la intensidad de F-actina, en el compartimiento axonal que no es acompañada con la fragmentación de los axones (imágenes de axones teñidos contra α -tubulina) (**2-Fig.2 a**). Consistentemente, los estudios cuantitativos mostraron que existe una baja del 40% de F-actina en el axón privado de *NGF* en comparación con los axones control (**2-Fig.2 b**). Este resultado demuestra que el citoesqueleto de actina tiene una respuesta temprana a la degeneración axonal provocada por la falta de *NGF* y esto sucede antes que comience la fragmentación axonal (18 horas en adelante).

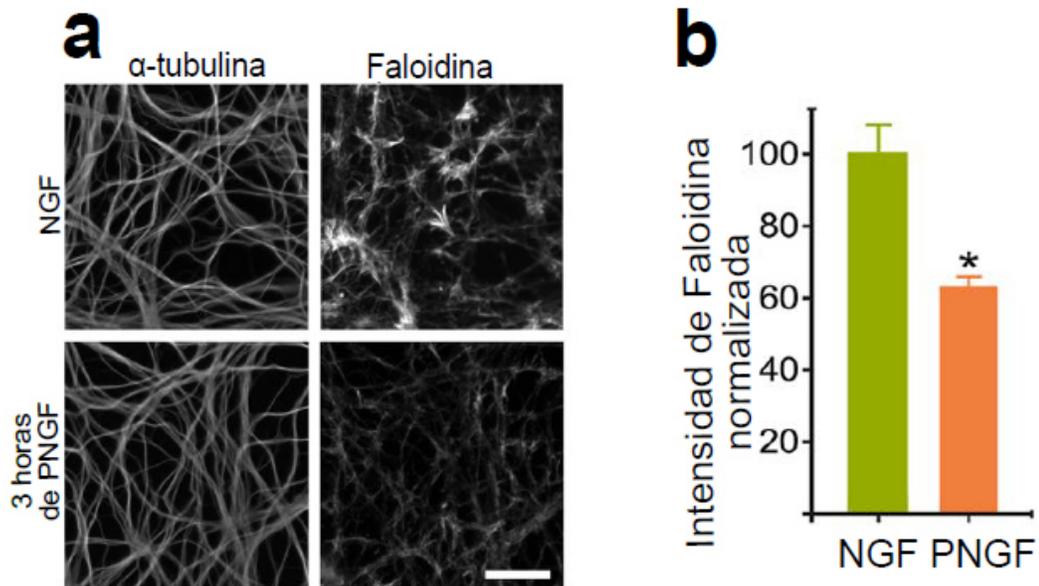


Fig. 2: Efecto de la PNGF en los niveles de F-actina en axones. a) Imágenes de axones DRG inmunomarcados para evidenciar α -tubulina y F-actina, en presencia de NGF o luego de 3 horas de privación de NGF. b) Cuantificación de la intensidad de la tinción con Faloidina-Rodamina en el compartimiento axonal (axones con *NGF* y *PNGF* por 3 horas). Barra de escala: 50 μ m. Los datos se representan como media \pm SEM con una repetición de un $n=3$ cultivos y la cuantificación al menos 20 imágenes por experimento.

1.c) Respuesta temprana de la actina en Conos de Crecimiento (CCs): Mediante el método cuantitativo que hemos puesto apunto en el Laboratorio (ver [Materiales y Métodos](#)), evidenciamos que la *PNGF* causa cambios en la estructura de citoesqueleto de F-actina de CCs. Observamos que a las 3 horas de ser inducida la privación, estructuras constituidas mayoritariamente por F-actina, como lo son los CCs, mostraron un notorio cambio morfológico (**2-Fig.3 a y c**). Se pudo evidenciar que a 3 horas de *PNGF* las estructuras Filopoidales o Lamelares (**2-Fig.3 b, b'**) de los CCs, se pierden, bajando significativamente la presencia de F-actina (**2-Fig.3 d, d'**); (**2-Fig.3 e**). En la literatura, este cambio drástico en la morfología de los CC se lo conoce como “cólapso” y es un fenómeno ampliamente descrito en respuesta, por ejemplo, a ligando repulsivos.

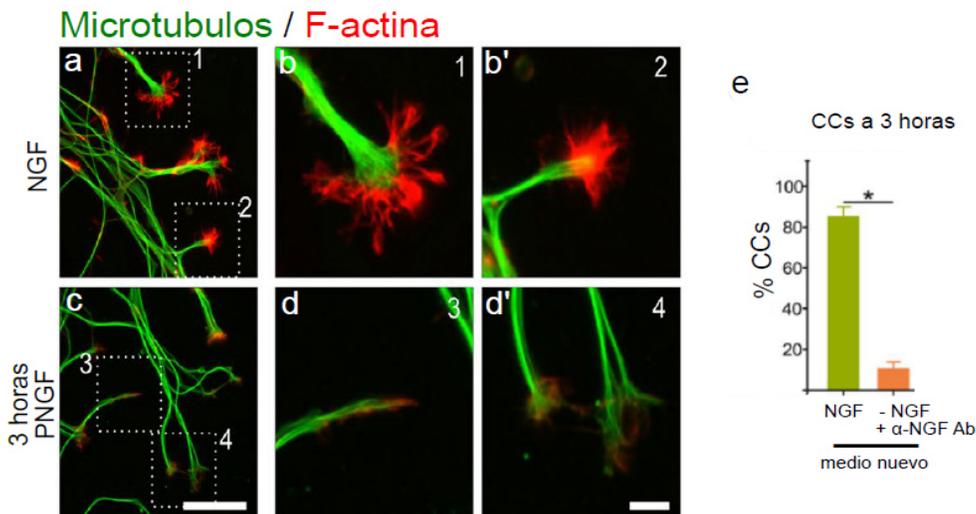


Fig. 3: La PNGF provoca el colapso temprano de conos de crecimiento. Imágenes de CCs control NGF y PNGF por 3 horas (a y c). Los insertos 1 y 2 muestran CCs sanos con una marcación de F-actina (estructuras Lamela y Filopodios) (b y b'). Los insertos 3 y 4 muestran los efectos tempranos de la PNGF en estas estructuras, mostrando una marcación baja o retraída de F-actina (d, d'). e) Cuantificación de pérdida de CCs sanos. Barra de escala: 10µm (d') y 2µm (c). Los datos se representan como media ± SEM. Con una repetición de un $n=3$ cultivos y la cuantificación de 10 campos que incluyeran al menos 4 tips (terminaciones del axón) por experimento.

2. Remodelación temprana del esqueleto periódico asociado a la membrana de actina/espectrina (MPS) de los axones durante la degeneración por PNGF.

2.a) Caracterización de MPS por microscopía STED: En este punto nos propusimos evidenciar el MPS utilizando dos tipos de marcas para ser observados en axones DRG control. Se utilizó por un lado faloidina (para evidenciar F-actina) y por el otro la inmunomarcación de β II-espectrina. En ambos casos se pudo observar la distribución periódica característica del MPS. Las medidas de los períodos fueron: 193 ± 21 nm, para F-actina y 191 ± 28 nm, para β II-espectrina (2-Fig. 4 c y f). Sin embargo, a lo largo de los experimentos notamos que la marca de β II-espectrina fue más robusta comparada con la de F-actina; ya que notamos que la cuantificación de la cantidad de MPS por segmento axonal con el *Software Gollum* (Barabas y col., 2017; ver Materiales y Métodos) fue más efectiva para la tinción de β II-espectrina. (2-Fig.4 g).

Creemos que esta diferencia podría darse principalmente porque la tinción contra F-actina también evidencia estructuras que no forman parte del MPS, y por ello se superpone con el mismo e impide distinguirlo con claridad, como puede observarse en la Figura 4. En base a esto, utilizamos la inmunomarcación de β II-espectrina para estudiar el MPS en los siguientes experimentos.

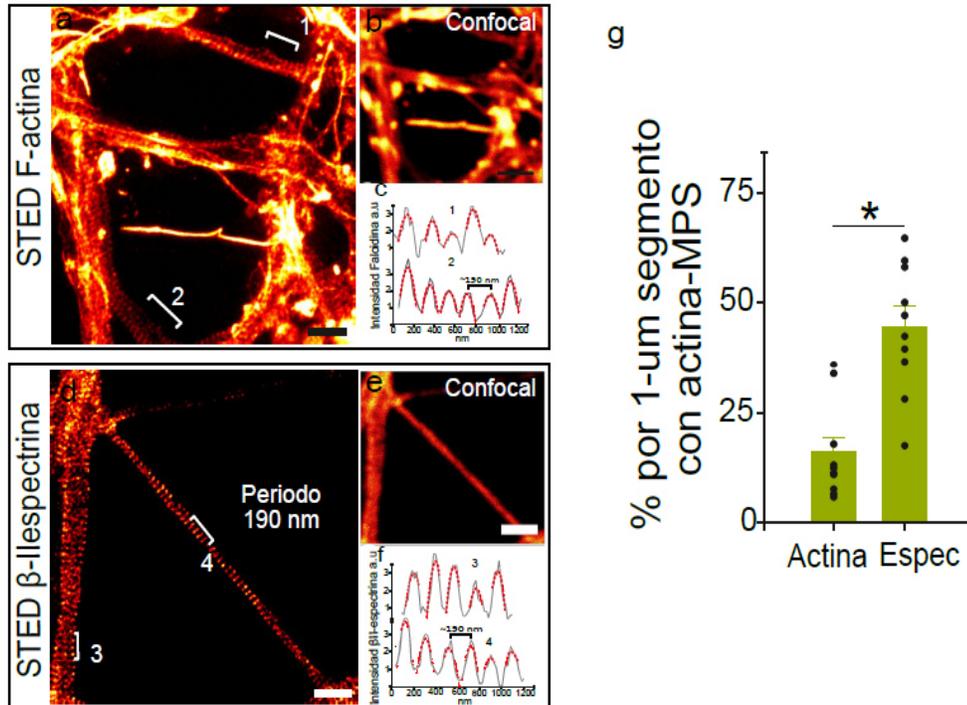


Fig. 4: Imágenes STED de axones DRG: a) axones teñidos para evidenciar F-actina en d) se evidencian axones teñidos contra β II-espectrina. Nótese, como pueden evidenciarse la marca periódica característica de los MPS. Sin embargo, en las imágenes confocales de ambas marcas esto no puede evidenciarse (b y e). En c y f se muestra la cuantificación de los picos de intensidad de ambas marcas evidenciando una marca más robusta de la β II-espectrina (~ 190 nm). Barras de escala: $10\mu\text{m}$ (STED), $20\mu\text{m}$ (confocal). g) gráfica que muestra la cuantificación de MPS con ambas marcas, la marca de β -IIespectrina muestra mayor cantidad de MPS por segmento contra la de actina.

2.b) Remodelado temprano del MPS durante de la *PNGF*: Como el ensamblaje de los MPS es próximo-distal durante el desarrollo axonal (Zhong y col., 2014) para la evaluación del efecto de la *PNGF* en los MPS se tomaron imágenes de axones a tres cuartos del explanto. De esta forma también es más fácil encontrar axones aislados, lo que hace mejor la visualización del MPS. Como primer resultado, pudimos evidenciar que a las 3 horas de provocada la *PNGF* ya se evidencia una desorganización de los MPS (2-Fig.5 a, b); la cuantificación demostró que tanto la abundancia como la organización de los mismos decae un 50% comparado con el control (2-Fig.6 a y b). Esta reducción es rápida (3 horas) y luego se mantiene hasta las 18 horas de privación, antes de que la fragmentación axonal comience (2-Fig.6 c y b).

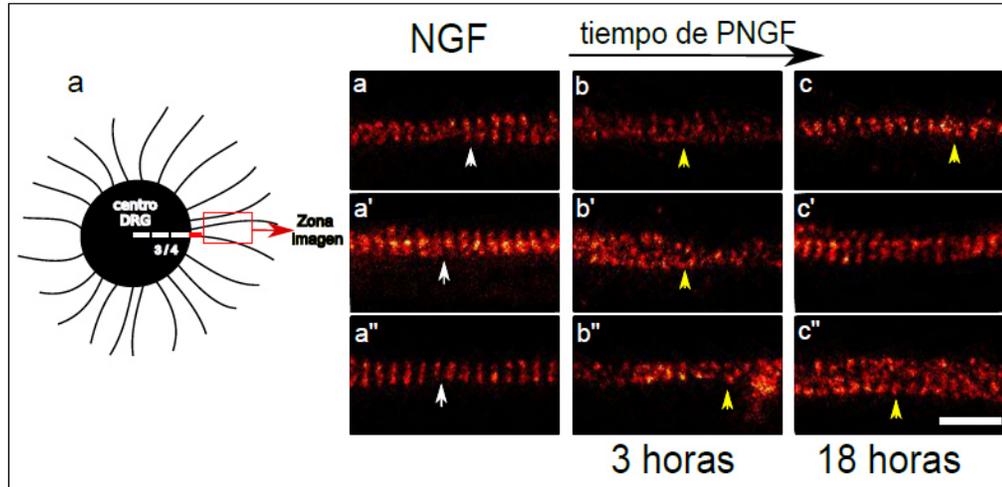


Fig. 5: Imágenes STED de axones DRG marcados para evidenciar β II-espectrina: (a-a'') axones que crecieron en medio suplementado con NGF. (b-b'') MPS de axones privados de NGF (3 horas) se puede observar la pérdida temprana de la organización de dichas estructuras (flechas amarillas). En (c-c'') se muestran estas estructura a las 18 horas de provocada la PNGF. Barra de escala: 1 μ m.

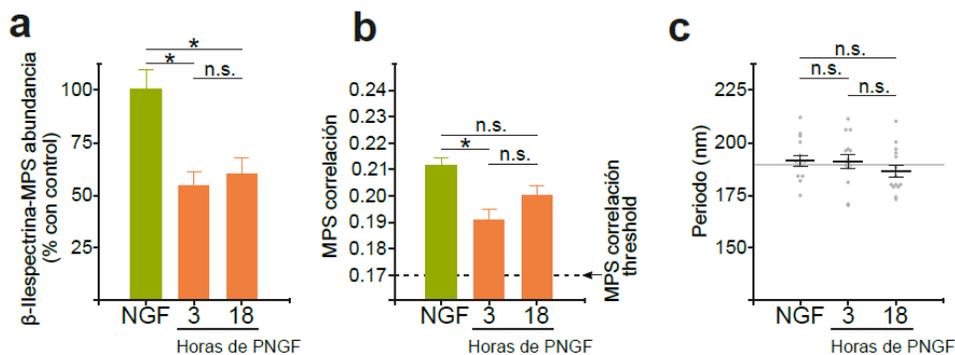


Fig. 6: Gráficas de la cuantificación de MPS: (a y b) abundancia y correlación de MPS a las 3 y 18 horas de la privación de NGF comparadas con el control (NGF). Nótese, que a las 3 horas hay una caída significativa en la abundancia y organización (correlación) de estas estructuras tal como se ve cualitativamente en las imágenes STED. En (c) la medida de los períodos en nm, en todos los grupos experimentales el periodo de MPS es aproximadamente 190nm. Los datos se representan como media \pm SEM; un $n=8-10$ imágenes por tratamiento de una repetición de $n=3$ cultivos.

2.c) La pérdida de MPS se correlaciona con la fragmentación axonal. La degeneración axonal culmina con la fragmentación de los axones y en base a esto nos propusimos cuantificar la abundancia y correlación de los MPS en axones que ya habían comenzado este proceso. Para ello, evaluamos si axones fragmentados conservaban el MPS y comparamos esta presencia de MPS con axones vecinos (que estaban en proceso de DA) pero no-fragmentados. Esta comparación nos permitiría saber si los MPS son necesarios para la mantención axonal durante la DA.

Por evidencias de nuestro grupo de trabajo sabíamos que entre las 21-24 horas de la *PNGF* se da la fragmentación axonal (**Ver Fig. 1**), la cuál es de duración rápida (20 minutos); (**datos obtenido por video microscopía no mostrados**). Se seleccionaron zonas por microscopía confocal, donde se evidenciaban ambas poblaciones axonales (no-fragmentados y fragmentados) (**2-Fig.7 a, b y c**). Luego de elegidas dichas zonas, se tomaron imágenes STED para evaluar los MPS. En primer lugar, evidenciamos que axones no-fragmentados luego de 24 horas de *PNGF* tienen una organización del MPS similar que a las 18 horas (**2-Fig.7**), ya que su abundancia es un 45% mas baja que en axones controles.

Interesantemente, los axones que estaban fragmentados o en proceso de fragmentación la abundancia de los MPS baja a un 30% comparado con los axones que estuvieron *PNGF* 24 horas pero no estaban fragmentados (**2-Fig.7 d**). Estos resultados demuestran que la pérdida casi total del MPS esta asociada con la fragmentación axonal, lo cual sugiere que esta estructura podría cumplir un rol clave en la mantención de la integridad axonal ante estímulos degenerativos.

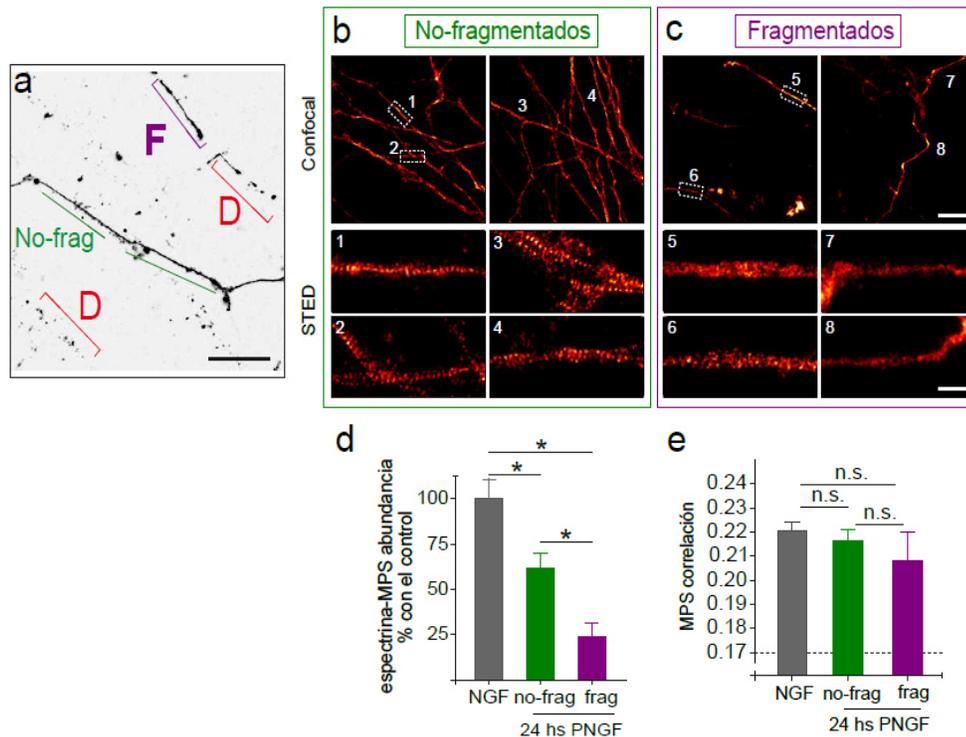


Fig. 7: a) esquema que muestra lo que tomamos como axones no-fragmentados (F) y fragmentados (No-frag). b) imágenes confocal y STED de axones no-fragmentados y c) axones fragmentados. (d y e) muestra la cuantificación de la abundancia y correlación de MPS. Barras de escala: 10µm (confocal) y 1µm (STED). En a) barra de escala 20µm.

2.d) Evaluación de otros componentes del citoesqueleto en el proceso de fragmentación axonal: la pérdida drástica del MPS en el proceso de fragmentación (**2-Fig. 7d**) nos sugiere preguntarnos si es particular del MPS o se da también en otros elementos del citoesqueleto axonal, como los microtúbulos (MTs). Para ello realizamos inmunocitoquímica para revelar diferentes componentes de los microtúbulos. Utilizando un modo de fijación que evidencia tubulina ensamblada en

MT observamos que no hay una diferencia en los niveles de MT totales (anti- α -tubulina) o “estables” (anti-glu- α -tubulina) entre axones no-fragmentados y fragmentados, así como en los debris celulares comparados con el control (*NGF*) (**2-Fig.8 a y b**). Esto indica que la caída del MPS durante la fragmentación es algo particular de este elemento del citoesqueleto y no algo generalizado con otros elementos.

Interesantemente, la *PNGF* induce un enriquecimiento en MT “estables”, ya que muestran un incremento en la marca contra glu- α -tubulina (**2-Fig.8 b**). Esta variante de tubulina se da por la de-tirosinación de alpha tubulina, y dado que esa reacción se produce en MTs, el aumento de variantes “glu” evidencia MTs mas viejos, y por tanto una red microtubular mas estable. Esto fue sorprendente ya que en el proceso de fragmentación axonal esperábamos una desestabilización de este componente del citoesqueleto. Para ampliar y corroborar este análisis nos propusimos una evaluación más abarcativa de otros componentes del citoesqueleto axonal, para estos análisis algunas muestras fueron fijadas mediante la metodología de preparación de microtúbulos (Pre-MT) a las 18 horas de *PNGF*.

Estos análisis mostraron que, tanto la α -tubulina (MT dinámicos, que en su extremo más se unen dímeros de Tubulina) y tubulina tirosinada (tir-tubulina, MT inestable y dinámicos), decaen un 25 y 40% respectivamente (**2-Fig.8 c y d**). Por otra parte, componentes de citoesqueleto como la actina filamentosa y la β II-espectrina también muestran una caída en su intensidad comparado con el control (**2-Fig.8 c y d**). La evaluación de la tubulina- α -acetilada (acetilación que ocurre en Glu-MT) mostró una caída de 26%. Por otro lado, como habíamos visto en 24 horas, comprobamos que la marca de intensidad de la Tubulina- α -detirosinada (Glu-MT, que son más estable) aumenta significativamente (**2-Fig.8 c y d**). Estos ensayos nos permiten inferir que durante la degeneración axonal se produce una baja en la dinámica de MTs y que estos permanecen ensamblados durante el proceso de fragmentación.

En base a estas observaciones, como siguiente paso evaluamos si lo observado en axones fragmentados y debris axonal eran realmente haces microtubulares. Utilizando microscopía de super-resolución pretendimos evidenciar la estructura filamentosa de los MT, que forman los haces a lo largo del axón. Para ello, fijamos por fijación-extracción ([Protocolo tomado de Witte y col., 2008](#)) explantos DRG privados de *NGF* por 24 horas y en condición control (*NGF*) y el análisis por nano-microscopía STED demostro que los haces de MT (marcados para evidenciar α -tubulina) presentaban una arquitectura filamentosa (**2-Fig.9 a-a'**) y parecen no cambiar de ancho comparados con axones (de mismo tamaño) privados de *NGF* por 24 horas (**2-Fig.9 b-b'**).

Sin embargo, en segmentos de los axones donde presentaban varicosidades, los que llamamos “debris”, observamos acumulos de MT, es decir no presentaban polímeros de tubulina filamentosos, tanto para α -tubulina y acetilada- α -tubulina a 24 horas de *PNGF* (**2-Fig.9 d-d'**) y (**2-Fig.9 e-e'**), sugiriendo que probablemente en estas estructuras esten presentes fragmentos de MT.

Por último, en axones no-fragmentados (control y *PNGF* 24 horas) evaluamos los filamentos de actina (**2-Fig.9 f**). No evidenciamos cambios en las estructuras de F-actina entre controles y *PNGF* de 24 horas, aunque en estos últimos evidenciamos la presencia de filamentos más delgados en algunos axones (**2-Fig.9 g**). Sin embargo, la comparación entre axones no-fragmentados y fragmentados (*PNGF* 24 horas) no evidenciaron grandes cambios en F-actina en los axones (**2-Fig.10 a**).

Estas observaciones nos permiten concluir que el MPS es específicamente desmantelado durante la fragmentación axonal, mientras que los microtúbulos son comparativamente mantenidos en este proceso. Es posible que los MT se hagan mas cortos, pero no sufren una depolimerización global que haga que sea notoria por nanoscopía ni por microscroscopía confocal semi-cuantitativa.

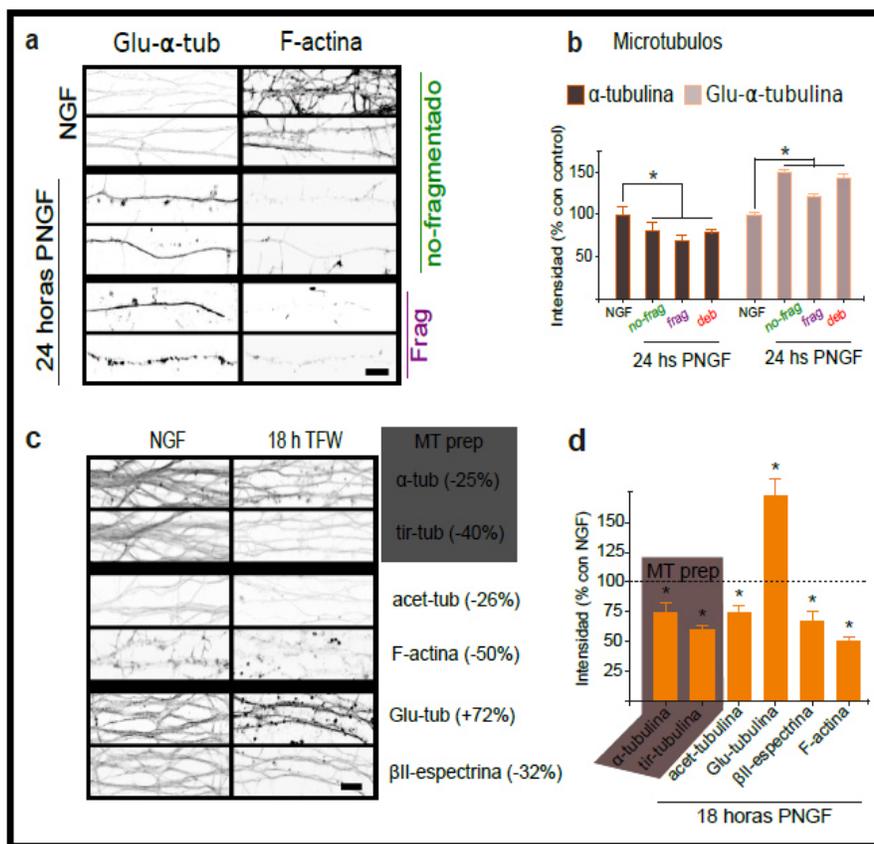


Fig. 8: Cambios de diferentes componentes del citoesqueleto durante la fragmentación axonal: **a)** imágenes confocal de axones DRG control (*NGF*) y en proceso de degeneración axonal por *PNGF*. **b)** cuantificación de intensidad de α -tubulina y Glu- α -tubulina. **c)** imágenes de axones marcados para evidenciar diferentes componentes de citoesqueleto axonal, control (*NGF*) y fijados a las 18 horas de la *PNGF*. **d)** gráfica de medidas de intensidad de los diferentes componentes del citoesqueleto. (**a y c**) Barra escala 10 μ m. Con una repetición de un $n=3$ cultivos y la cuantificación al menos de 20 imágenes por experimento.

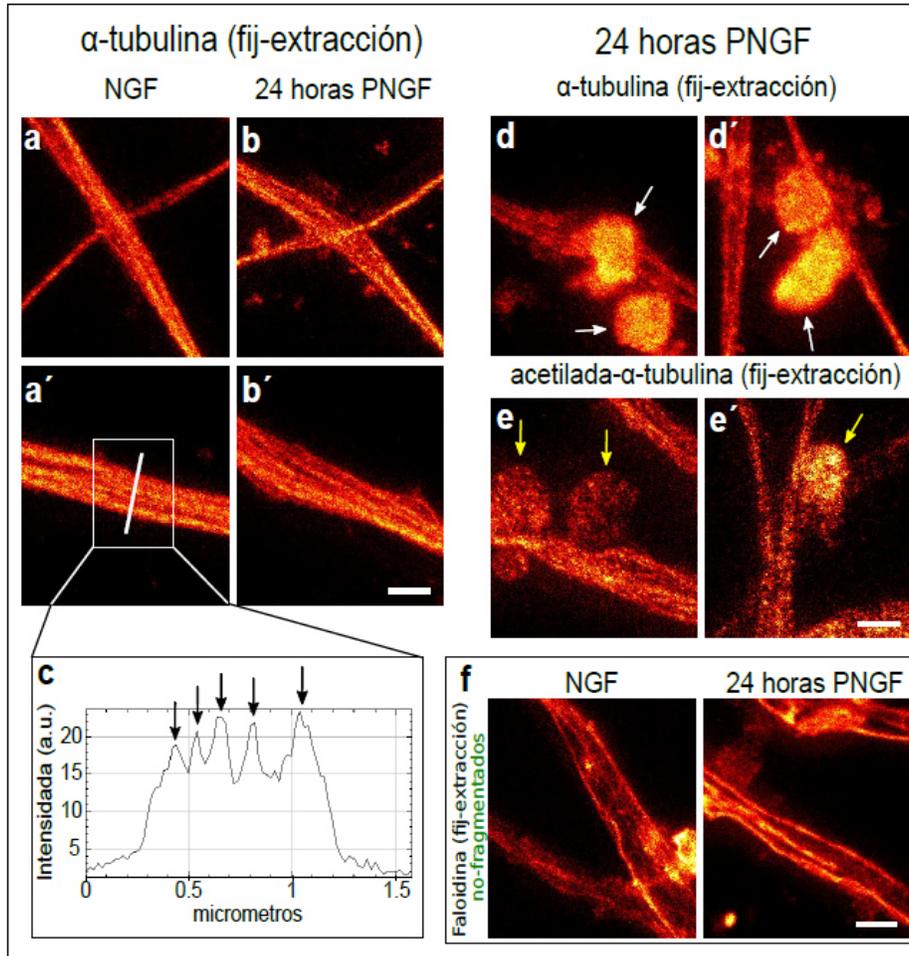


Fig. 9: Evaluación por STED de las estructuras de MTs en axones DRG: (a-a') imágenes STED de axones DRG control (NGF) y en proceso de degeneración axonal por PNGF 24 horas (b-b') en (c) se muestra la gráfica de la medida de intensidad que coincide con la medida en micrómetros de MTs individuales. (d y d') imágenes de axones fijados con extracción evidenciando acumulos de α -tubulina (flechas blancas) en (e y e') las flecha amarillas señalan acumulos de tubulina acetilada (también axones fijados por extracción) . f) tinción de F-actina por fijación por extracción en condición control (NGF) y 24 horas de PNGF. Barra escala 1 μ m.

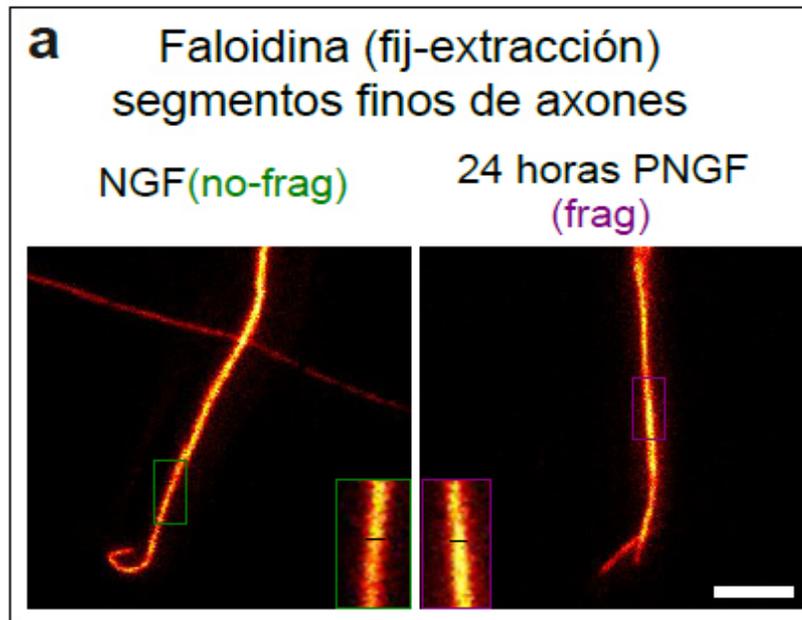


Fig. 10: (a) imágenes de axones control (*no-fragmentados*) y axones que fueron privados de *NGF* (*PNGF fragmentados*) teñidos con Faloidina para evidenciar F-actina. Los recuadros indican los axones no y fragmentado (verde y violeta). La línea negra muestra el ancho de los axones, evidenciando que no hay grandes diferencia de tamaño entre ambas condiciones. Barra de escala 1 μ m.

3. El tratamiento agudo con una droga que estabiliza los filamentos de actina previene tanto la pérdida de MPS como la posterior fragmentación axonal.

Sabiendo que la pérdida de MPS precede la fragmentación axonal y la de otros componentes del citoesqueleto neuronal, nos preguntamos si el tratamiento agudo con una droga que estabiliza F-actina, Curcubitacina-E (CE, 5nM), revierte la pérdida de MPS antes de comenzar el proceso de fragmentación axonal y si esta protección de MPS es suficiente para prevenir esta fragmentación.

En primer lugar observamos que el tratamiento con CE por 3 horas aumenta la abundancia de actina-MPS tanto en axones control como en axones que sufrieron PNGF por 3 horas (**2-Fig.11 a-b**). Interesantemente, este tratamiento agudo no afectó visiblemente la cantidad total de F-actina (**2-Fig.11 c**). Asimismo, ese mismo tratamiento pero durante la degeneración por PNGF (tratamiento a 18-21 horas o a 21-24 horas) causa una recuperación significativa de los MPS (abundancia y correlación) comparada con los axones que no recibieron la droga (**2-Fig.11 d-h**).

En base al resultado anterior, evaluamos si el tratamiento que protege los MPS también protege de la fragmentación axonal. Demostramos que se previene la pérdida de área axonal con el tratamiento agudo de 3 horas con CE (**2-Fig.11 i**). Este resultado fue significativo en comparación con la pérdida de área axonal que presentaron los que degeneraron por 24 horas (*PNGF*) sin el tratamiento agudo de CE (21-24 horas). Esto indica que el tratamiento agudo con una droga que estabiliza

la F-actina (componente de MPS) es suficiente para causar una reversión de la fragmentación axonal que ocurre a las 24 horas de *PNGF*.

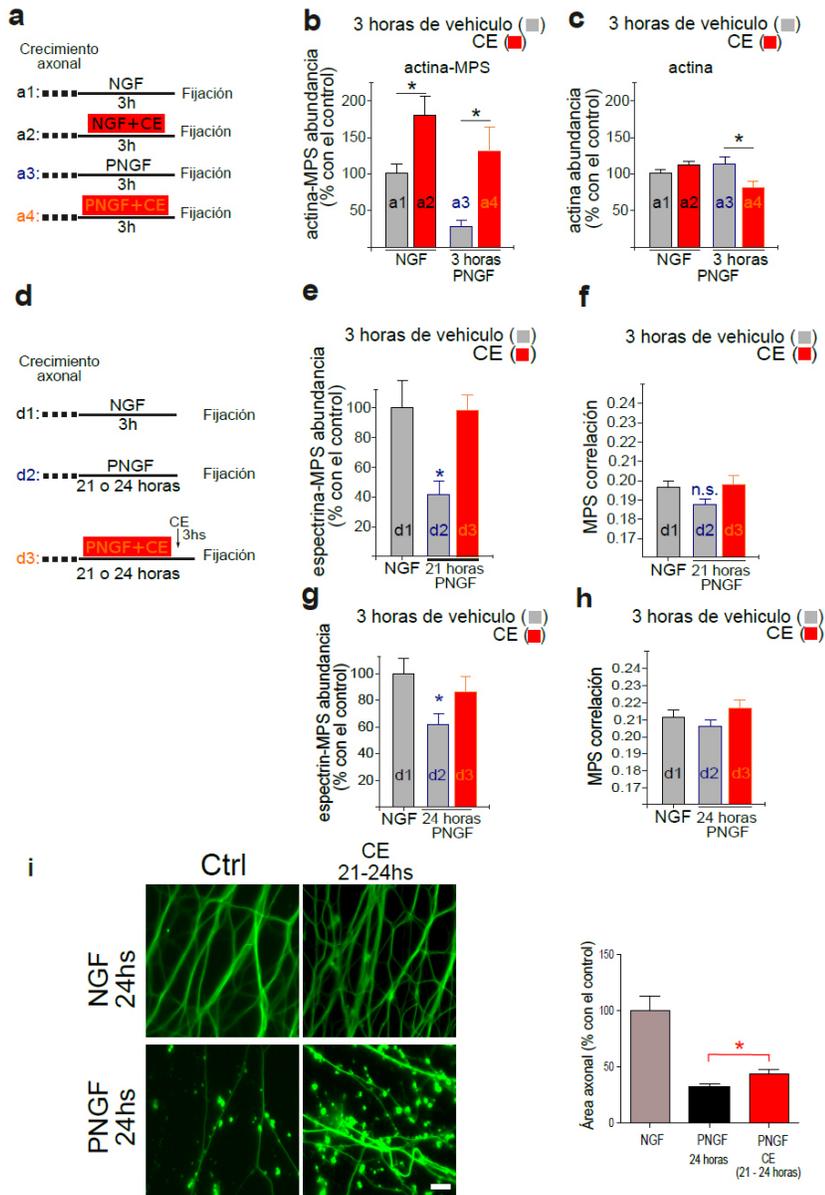


Fig. 11: La recuperación de los MPS revierte la fragmentación axonal: (a-c) Resultados de la cuantificación de la correlación y abundancia de actina-MPS de axones, control (*NGF*), *PNGF* y tratamiento con CE (5 nM) por 3 horas respectivamente. En (d-h) se muestra la cuantificación de espectrina-MPS en axones *PNGF* por 21 o 24 horas y del tratamiento de las últimas 3 horas con CE (5 nM, 21-24hs) (correlación y abundancia). (i) Imágenes confocales de axones DRG control (*NGF*) y en proceso de degeneración axonal (*PNGF* 24 horas) y del tratamiento de las últimas 3 horas con CE (5 nM, 21-24hs). El gráfico muestra la cuantificación de área axonal (Barra de escala 20 μ m). Los experimentos fueron realizados con una repetición $n=3$ cultivos y se cuantificaron al menos de 20 imágenes por experimento.

Capítulo #2: Conclusión Específica

En este capítulo mostramos que existe un cambio temprano en el citoesqueleto de F-actina provocado por el modelo de Degeneración en el Desarrollo (Privación de *NGF*), evidenciado por una baja de intensidad en el compartimiento axonal y una pérdida de conos de crecimiento, estructura compuesta mayoritariamente con esta proteína.

Por otra parte, mediante el uso de microscopía de super-resolución STED evidenciamos cambios en el citoesqueleto periódico asociado a membrana de actina/espectrina (*del inglés*: MPS). Demostramos que estas estructuras periódicas sufren un cambio temprano en su organización y abundancia durante la *PNGF* (3 horas).

Por otra parte, está pérdida de MPS precede la de otros componentes de citoesqueleto axonal (F-actina y tubulina total) y a la fragmentación axonal la cual comienza a las 18 horas de la *PNGF*. Sumado a estas evidencias, también demostramos la importancia de los MPS para el soporte estructural de los axones durante la degeneración, al realizar un tratamiento agudo con una droga que estabiliza la F-actina frenamos la pérdida de los mismos y la fragmentación axonal. Estos resultados mostraron por primera vez el importante rol de estas estructuras en la mantención de los axones en procesos de Degeneración Axonal que podrían suceder durante el desarrollo.

En este contexto, este capítulo de la tesis aporta resultados novedosos sobre el rol del citoesqueleto de F-actina y componentes asociados (MPS) en los procesos de Degeneración Axonal por privación de *NGF*.

PUBLICACIÓN:

Remodeling of the Actin/Spectrin Membrane-associated Periodic Skeleton, Growth Cone Collapse and F-Actin Decrease during Axonal Degeneration.

Nicolás Unsain, Martin D. Bordenave, Gaby F. Martinez, Jalil Samil, Catalina von Bilderling, Federico M. Barabas, Luciano A. Masullo, Aaron D. Johnstone, Philip A. Barker, Bisbal Mariano, Fernando D. Stefani & Alfredo O. Cáceres. Scientific Reports 8:3007 (2018). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29445221>.

Capítulo. 3

Caracterización y validación de la técnica de Microscopía de Expansión para la observación y cuantificación del esqueleto periódico de actina/espectrina asociado a membrana.

Resultados del objetivo específico # 2

Introducción específica:

El descubrimiento del MPS fue logrado gracias a las recientemente desarrolladas técnicas de súper-resolución, como STED y STORM. Como ya observamos, esto se debe a que el MPS presenta un ordenamiento regular en periodos de 190 nm a lo largo del axón y esa distancia se encuentra por debajo del límite de resolución que podemos obtener por microscopía de fluorescencia convencional.

Sin embargo, pocos grupos de investigación tienen acceso a estas tecnologías, lo que dificulta el avance en el estudio del rol y funciones del MPS en las neuronas. El desarrollo de una nueva técnica por el grupo de Edward Boyden (MIT - Massachusetts Institute of Technology, EEUU) ha revolucionado a la comunidad científica y fue publicada en una revista de alto prestigio (Chen y col., 2015). En este trabajo presentan una tecnología que logra realizar microscopía de super-resolución mediante la separación física de fluoróforos, Microscopía de Expansión (ExM, *por sus siglas en inglés*). La misma consiste en incluir células o tejidos inmunomarcados en un hidro-gel y anclar sus proteínas al mismo, que luego se expande isométricamente por diálisis de agua, ganando resolución en todas las dimensiones (Chen y col., 2015; Tillberg y col., 2016). Saltando de este modo el impedimento de la barrera de resolución con cualquier microscopio de fluorescencia convencional, ya que en su protocolo más comúnmente utilizado, cada dimensión se expande ~4 veces, aumentando por el mismo factor el poder de resolución de cualquier sistema óptico.

La Microscopía de Expansión ha sido muy bien recibida por las ventajas que presenta, y hasta la fecha se han publicado numerosos trabajos con protocolos acondicionados según el tipo de células o tejido a expandir, desde la variación de las concentraciones de las soluciones que se utilizan para realizar la solución monómerica (ver [Materiales y Métodos](#)), hasta variaciones en el anclaje de proteínas dependiendo del tejido y fluoróforo o marca a expandir (Chen y col., 2015; Tillberg y col., 2016; Chang y col., 2017; Tillberg y col., 2018). Más allá de todos estos avances, ninguno de estos trabajos se ha preocupado por el uso de ExM de manera cuantitativa. Como mencionamos anteriormente, los MPS presentan una periodicidad característica (190nm) lo cual es necesario medir correctamente para evaluar cambios estructurales, lo que nos obliga a encontrar un coeficiente de expansión preciso que permita la cuantificación de los mismos.

En este contexto, en el siguiente capítulo nos propusimos como objetivo general evidenciar las estructuras periódicas de actina/espectrina (MPS) por ExM y validar un coeficiente expansión que permita hacer un estudio cuantitativo preciso.

1. Caracterización a nano-escala del citoesqueleto periódico asociado a membrana de espectrina/actina (MPS) por Microscopía de Expansión.

1.a) Observación de MPS en neuronas sensoriales por Microscopía de Expansión (ExM). Para estos experimentos nos propusimos evidenciar el MPS en axones en cultivo mediante la técnica ExM (ver [Materiales y Métodos](#)) un abordaje no realizado hasta el momento. Para ello, realizamos la expansión de Ganglios de la Raíz Dorsal (DRG) controles de *3DIV* (tiempo en el que los axones están maduros y presentan estas estructuras). Para llegar a estos hallazgos y evidenciar estas estructuras por Microscopía de Expansión, en primer lugar nos tomó algunos meses la prueba de diferentes protocolos descritos en la bibliografía y su comparación para así llegar a un protocolo óptimo para evidenciar MPS.

En primer lugar nos focalizamos en la puesta a punto de la reacción y tiempo de incubación para realizar el entrecruzamiento proteico de la muestras inmunomarcadas, punto crítico para obtener una buena inclusión de la muestra al hidro-gel que luego será expandido isométricamente. Probamos dos tipos de procedimientos, ambos citados y utilizados por el grupo de Boyden: **a)** un reactivo químico que causa una modificación en aminas de proteínas con un grupo funcional para acrilamida (Acrilol-X); con una incubación de 18 horas a temperatura ambiente (TA); ([Tillberg y col., 2016](#)). **b)** incubación por 10 minutos con Glutaraldehído a bajo porcentaje (0.25% en PBS 1x), para provocar una reacción de función similar que el Acrilol-X pero su incubación es de menor tiempo y más rápida ([Chozinski y col., 2016](#)). Este último, fue un compromiso entre un paso más rápido e igual resultado que favoreció a un buen protocolo de realización y fue el utilizado durante este trabajo (ver [Materiales y Métodos](#)).

Posteriormente, realizamos pruebas de incubación con buffer de digestión con Proteinasa-K, en diferentes tiempos y temperaturas, **a)** 18 horas a TA o **b)** 6 horas a 37°C. El fin de estos pasos fue obtener una digestión que no comprometiera la pérdida de marca fluorescente. Estas pruebas dieron como mejor protocolo de procedimiento la incubación durante toda la noche a TA (ver [Materiales y Métodos](#)). En su conjunto, estas pruebas nos permitieron obtener un protocolo óptimo, que permitió visualizar la estructura característica del MPS en axones sensoriales. El protocolo final obtenido se detalla en el Capítulo 6.

Mediante el uso del protocolo puesto a punto anteriormente, utilizando un microscopio de fluorescencia convencional logramos evidenciar la nano-arquitectura periódica característica del MPS en axones sensoriales expandidos, los cuales estaban marcados para evidenciar β II-espectrina. Para corroborar lo observado cualitativamente, medimos los picos de intensidad de esta marca (β II-espectrina), lo que evidenció una distribución periódica de la misma (marca de β II-espectrina), que es similar a la observada por microscopía STED (**3-Fig. 1**). Cabe destacar, que para esta medida, dividimos los resultados por 4, que es el coeficiente de expansión que se obtiene en un protocolo de rutina de ExM según la bibliografía.

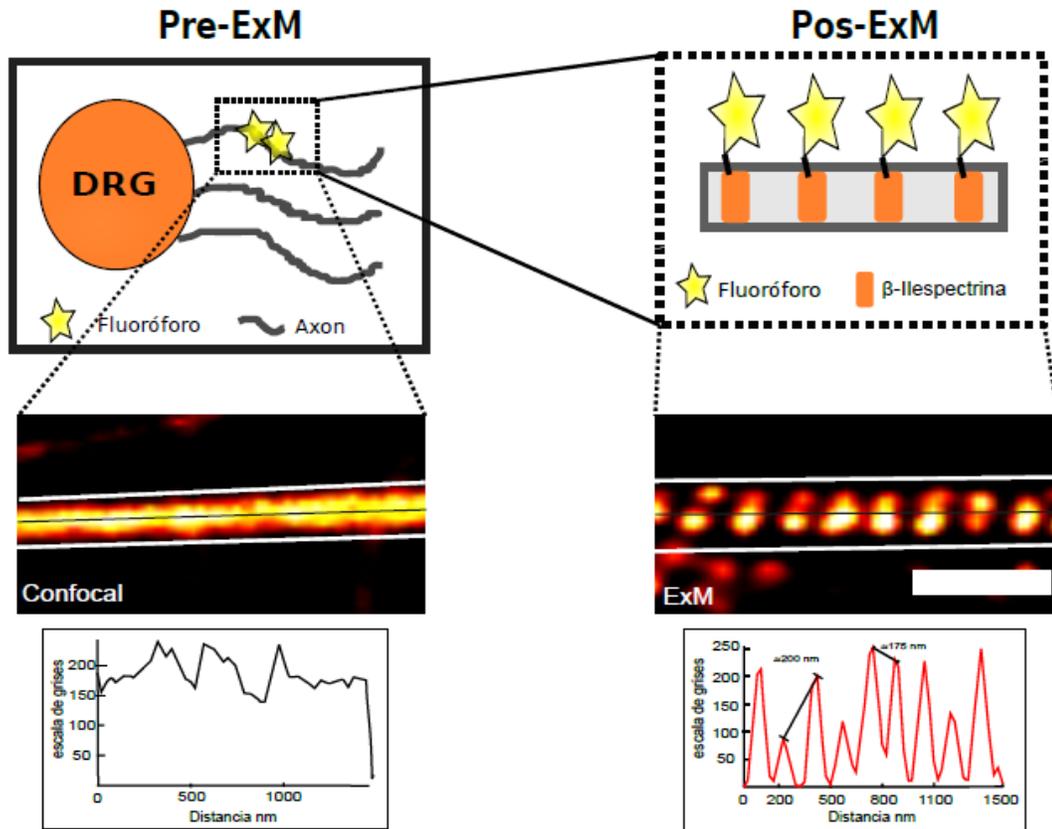


Fig. 1: Recuadro Pre-ExM muestra esquema que representa el explanto DRG con sus axones, debajo una imagen confocal de un axón marcado para evidenciar β II-espectrina no expandido (se observa una marca continua de la misma). En el recuadro Pos-ExM se esquematiza la separación de los fluoróforos luego de expandir el hidro-gel. Debajo se observa una imagen de fluorescencia de un axón expandido marcado con β II-espectrina, donde se observó la estructura periódica de los MPS. Barra escala $0.5\mu\text{m}$. En las imágenes de microscopia se delimitan los axones con las líneas blancas. Los Plot-Profile (gráficas) muestran los picos de intensidad de β II-espectrina a lo largo de axones pre y pos ExM. Las líneas grises en el centro de los axones ejemplifica la línea que se utilizó para medir los picos por ImageJ-FIJI.

En la Figura **3-2a**, se compara la marca de β II-espectrina observada previo a la expansión (izquierda) o posterior a la expansión, donde se observa la distribución periódica, evidenciando el MPS. Como mencionábamos anteriormente, la marca pre-expansión es continua comparada con la obtenida por Microscopía de Expansión, donde se observa en todos los axones la marca periódica característica del MPS (**3-Fig.2 a**).

Por otra parte, para mejorar la calidad de las imágenes, a los *Z-Stack* obtenidos se les realizó un procesamiento de imágenes utilizando el *plugin ImageJ-FIJI-Deconvolution Lab*. En la figura **2a** se muestra la diferencia entre dos imágenes (un solo corte), una no procesada y otra procesada. Donde se nota una clara mejoría de imagen de la marca β II-espectrina en las procesadas (“deconvolucionadas”); (**3-Fig.2 a**). El algoritmo de deconvolución utilizado utiliza parámetros de la adquisición (fluoróforo usado, objetivos, tamaño del pixel, etc) para eliminar luz fuera de foco que proviene de otros planos.

Para la obtención de imágenes 3D de axones con MPS, realizamos un escaneo en el plano Z de cada gel, las cuales se capturaron comenzando de la región próxima al vidrio (*bottom*) y alejándose del mismo (*top*), los geles se muestrearon hasta donde se observaban axones con esta periodicidad, con esta estrategia logramos captar axones con MPS en casi todo el eje Z de la muestra (**3-Fig.2 b**).

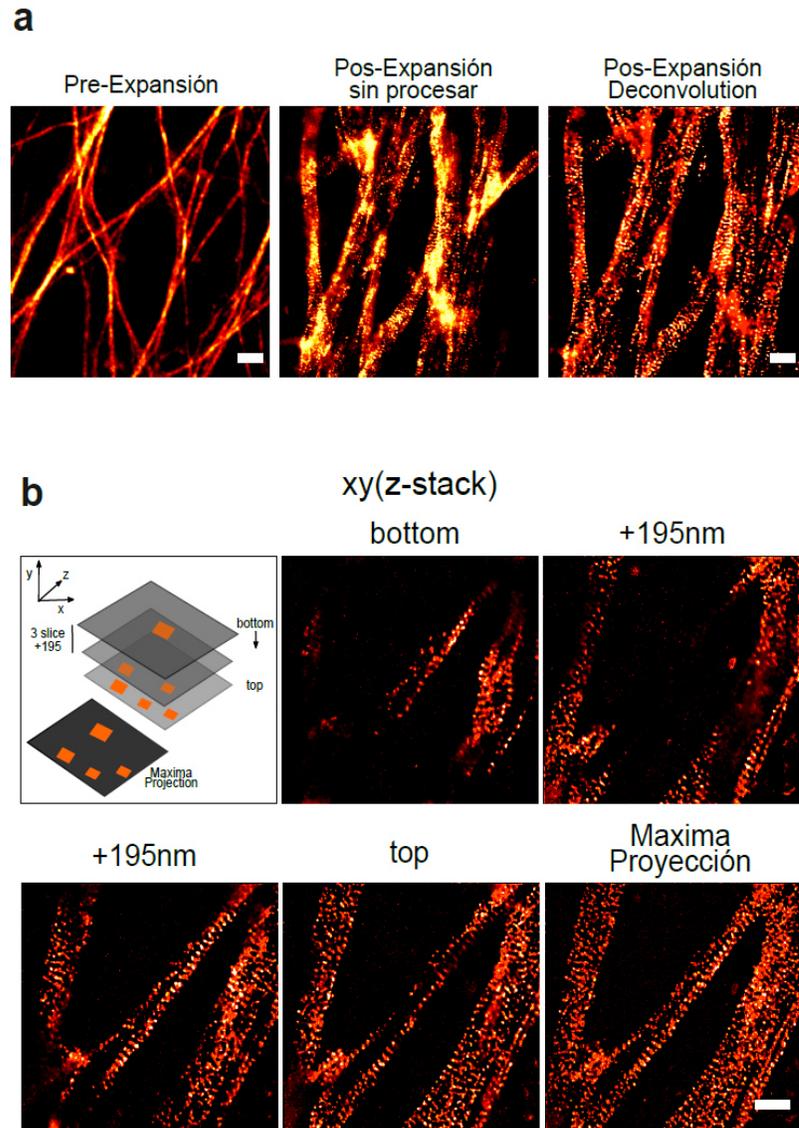


Fig. 2: Imágenes de microscopía de fluorescencia de MPS de axones sensoriales inmunomarcados contra β II-espectrina: **a**) Imagen confocal (no expandida), las imágenes expandidas son de un solo slice de axones pos-ExM. Sin procesar y la última imagen en **(a)** es un solo slice pos-ExM “deconvolucionado”. **b**) Esquema que representa los slices en Z, las imágenes de axones con MPS tomadas desde bottom (vidrio) hasta top (más profundo al gel). La imagen final es la proyección máxima de todo el stack. Nótese, que al avanzar en el plano Z van apareciendo diferentes axones con MPS en foco. Barras de escala: 1 μ m **(a-b)**.

1.b) Cálculo del Coeficiente de Expansión. Uno de los propósitos de este capítulo además de poner a punto un protocolo para evidenciar MPS por Microscopía de Expansión, fue poder realizar un análisis cuantitativo de los mismos, dado que hasta la fecha no existen trabajos que realicen una cuantificación de nano-estructuras utilizando dicha técnica (ver [Introducción, Capítulo 1](#)). Para obtener un método cuantitativo fue necesario calcular el Coeficiente de Expansión. Como primera aproximación medimos el tamaño de los geles Pos-ExM ya que el Pre-ExM es de tamaño conocido ([descripto en Materiales y Métodos](#)) los que llamamos Coef.Gel-Block (**3-Fig.3 a**). El Coef Gel-Block obtenido fue de $\sim 3,6$ (**3-Fig.3 b**). Utilizando este coeficiente medimos los períodos que presentaban los MPS en imágenes de axones expandidos, y encontramos como resultado que los períodos median ~ 240 nm (por encima de 190 nm característico); (**3-Fig.4 a**).

Estas observaciones, nos sugirieron que quizás la expansión macroscópica del gel (Coef Gel-Block) no coincida con la expansión que ocurre en las proteínas celulares incluidas en el mismo. Para corroborar esta hipótesis, en colaboración con la Bióloga Guadalupe Gazal, realizamos el cálculo del tamaño de una estructura proteica celular conocida pre y pos-expansión ([núcleos de fibroblastos, ver Materiales y Métodos](#)).

El cálculo del tamaño de la red microtubular que delimita el núcleo de fibroblastos pre y pos expansión arroja un coeficiente de expansión de $\sim 4,6$, al cual llamamos Coef. Proteico (**3-Fig.3 c-d**). Posteriormente estimamos los periodos de MPS en axones expandidos utilizando este Coef.Proteico, obteniendo periodos de ~ 188 nm, similar al evidenciado por Microscopía de súper-resolución (STED, STORM). (**3-Fig.4 a**). Esto es coherente con la relación del Coef.Proteico comparada con el Coef Gel-Block aumentó casi en un 32% (**3-Fig.4 b**). Lo que nos demuestra una mayor expansión en la porción del gel con alta densidad de proteínas. Cabe aclarar que las comparaciones mostradas en la [Figura 4b](#) corresponden a las medidas de Coef Gel-Block y Coef.Proteico hechas en el mismo gel ([ver el esquema en la Figura 2 del Capítulo 5](#)).

Estos resultados se apoyan también con resultados de nuestro laboratorio ([resultados mostrados en el trabajo enviado a publicar, ver final de la tesis](#)), que muestran que el Coef Gel-Block de un gel con extracto de proteínas es mayor que el coeficiente de un gel solo (sin extracto proteico), evidenciando que un gel con una red de proteínas ancladas se expande mas que un gel sin proteínas, similar a lo que sucedería con las proteínas propias de la célula.

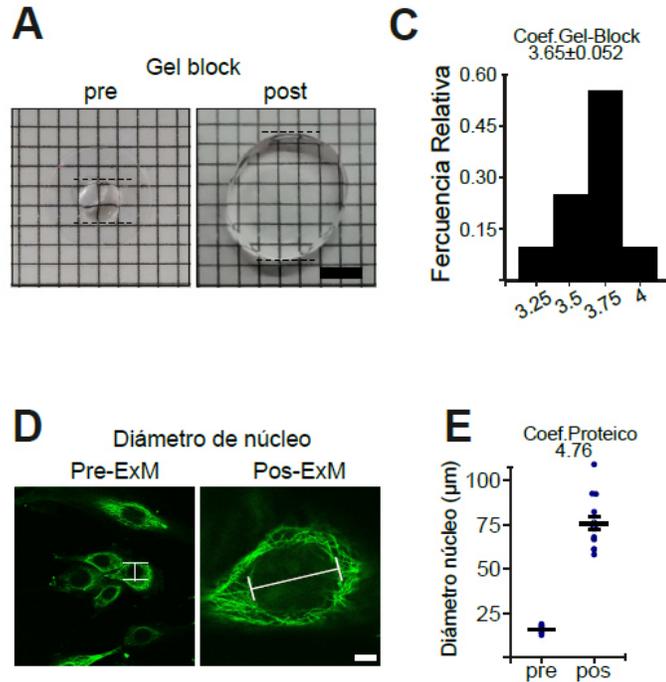


Fig. 3: Diferentes formas de calcular el coeficiente de expansión. a) Imágenes de geles Pre y Pos ExM, b) Gráfico de la frecuencia relativa del Coef. Gel-Block. c) Imágenes confocales de fibroblastos marcados con α -3A1 tubulina, se evidencia la red de microtubulos que delimita el núcleo celular. d) Gráfica de medidas de diámetros de núcleo (Pre y Pos ExM) y el coef. Proteico resultantes. Escala barra. Los experimentos de Fibroblastos fueron realizados en colaboración con la Biól. Guadalupe Gazal del Laboratorio Unsain. Barra de escala: 2,5 μm (gel) y 15 μm (células). Se realizaron la medida de un $n=6$ se midieron 3 geles en cada uno. En los experimentos de fibroblastos se midieron al menos $n=40$ células.

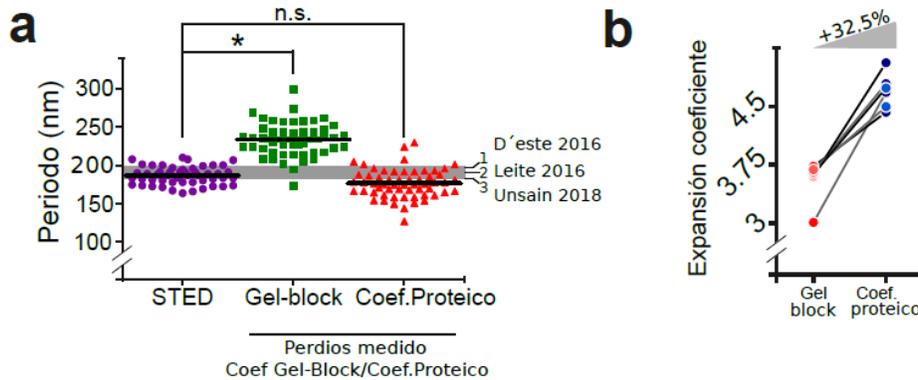


Fig. 4: Períodos estimados usando los diferentes coeficientes de expansión. (a) Gráfica que evidencia la medida de los periodos de MPS: por STED (≈ 190 nm), con la utilización del Gel-Block (≈ 240 nm) y Coef. Proteico (≈ 188 nm). Nótese, que las medidas con el Coef. Proteico dan similares a las obtenidas por microscopia de súper-resolución (con las que fueron caracterizados los MPS). (b) La diferencia entre Coeficientes Gel-Block y Proteico. (a) Círculos violetas, 197.7 ± 10.61 (media \pm SD); cuadrados verdes 240.6 ± 20.69 nm (media \pm SD) y Triángulos rojos, 188.9 ± 16.96 nm (media \pm SD).

1.c) Comparación de Microscopías de Expansión y Microscopía STED. La ExM tiene varios pasos de manipulación de los arreglos proteicos en donde es posible que hubiera alguna “distorsión” o artefacto de los arreglos nativos que hicieran que algunas MPS se pierdan o que se desorganicen. Entonces, con el fin de validar la observación de MPS en imágenes ExM hicimos una comparación con imágenes que tomamos de DRG control marcados para evidenciar β II-espectrina por microscopía de super-resolución STED (microscopía ya validada para la cuantificación de estas estructuras, y que no involucra pasos invasivos para la muestra). La comparación de imágenes mostró en primer lugar que las imágenes obtenidas por ambas técnicas son muy similares, sobretodo cuando las obtenidas por ExM son procesadas con el *plugin* de procesamiento de imágenes *Decovolution Lab* para eliminar luz de otros planos focales (**3-Fig.5 a**).

En la figura **5b** se muestran los pasos seguidos para una cuantificación de la organización y abundancia del MPS de manera semi-cuantitativa. Esta cuantificación se basa en el uso de un *software* desarrollado por nuestro grupo para la cuantificación de estructuras periódicas, y llamamos *Gollum* (Barabas y col., 2017). Brevemente, el programa divide la muestra en segmentos de $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$, luego correlaciona la señal que encuentra con respecto a una señal “modelo” de un MPS y arroja un valor de correlación de Pearson para cada segmento de $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ (**3-Fig.5 b1**). De esas correlaciones se tomó un “*umbral*” (normalmente entre 0,10 y 0,12) que caracteriza a un segmento con MPS distinguible para un observador y todas las correlaciones que estaban por encima de ese valor umbral se las considera como conteniendo MPS. Con este dato se calculó la abundancia de los mismos haciendo una relación entre todas las correlaciones de un mismo axón y cuantos de ellas presentaban MPS (**3-Fig.5 b2-3**). Gracias a este método cuantitativo semi-automático pudimos corroborar que las frecuencias relativas de MPS cuantificados de imágenes obtenidas de ExM y STED son indistinguibles (**3-Fig.5 c**). Como consecuencia, la estimación de la abundancia de MPS no mostró diferencias significativas entre ambas microscopías (**3-Fig.5 d**).

Luego evaluamos si utilizando microscopía de expansión evidenciábamos cambios en la estructura del MPS en condiciones fisiológicamente relevantes. Tal como mostramos en el Capítulo 2 y sumado a un reciente estudio mediante el uso de STORM, el MPS sufre una remodelación significativa antes de la fragmentación axonal en un modelo de “*pruning*” de axones en el desarrollo (Unsain et al., 2018b – mostrados en el Capítulo 2 de esta tesis; Wang et al., 2019). Después de 3 días de crecimiento en cultivo, realizamos una privación de *NGF* a explantos DRG, durante 12 horas. Con este ensayo, demostramos que con el uso de ExM también se puede evidenciar la remodelación del MPS previamente reportada por otros métodos (**3-Fig.5 e**).

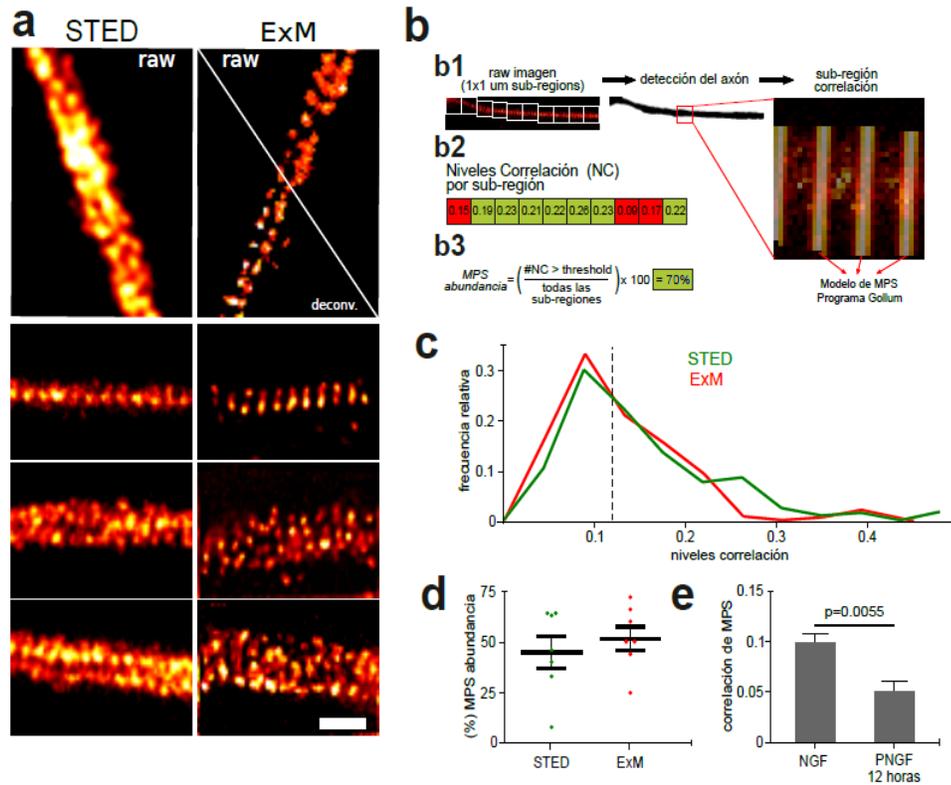
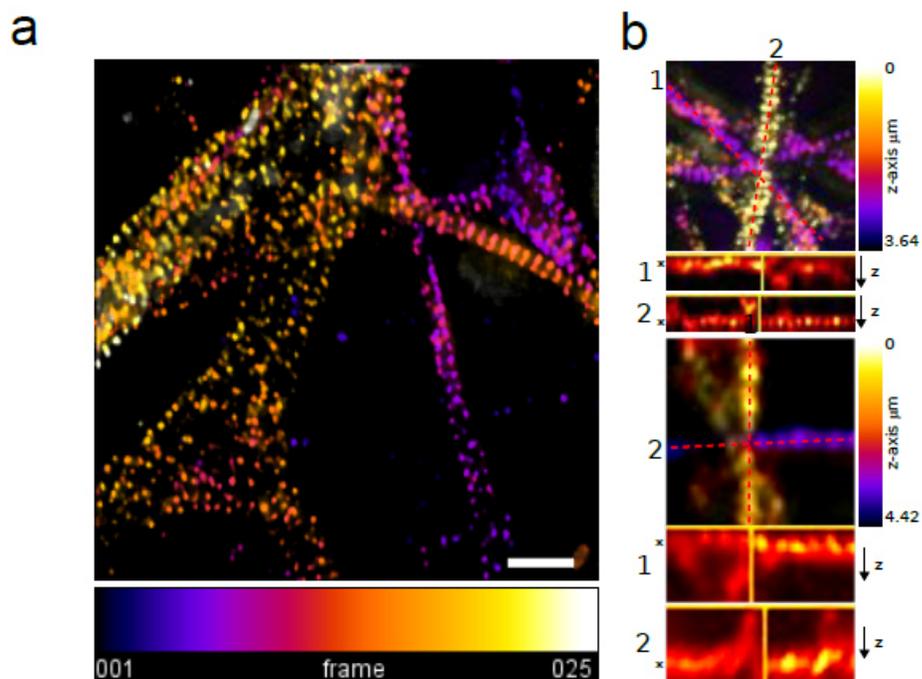


Fig. 5: Comparación cuantitativa entre STED y ExM para la observación del MPS. (a) Comparación de imágenes de axones marcados para evidenciar β II-espectrina por microscopías STED y ExM (raw, son imágenes crudas) las imágenes ExM están Deconvolucionadas. (b) Demostración y, cuantificación de correlación y abundancia para ambas microscopías, (b1) esquema que muestra la cuantificación de MPS, (b2) cuantificación de los niveles de correlación (b3) ejemplo del cálculo de la abundancia de MPS. (c) Gráfico de la Frecuencia Relativa de la correlación de MPS totales para ExM y STED. (d) Gráfico de la dispersión de abundancia de MPS para ambas microscopías (Media \pm SEM, n=7 para correlación y abundancia). (e) Cuantificación de correlación de MPS en axones con NGF y PNGF por 12 horas. Barra de escala: 0,5 μ m. (e) Valores medios de correlación obtenidos de los axones sensoriales de control (NGF), en comparación con los axones sometidos a retirada de NGF durante 12 horas (Media \pm SEM. n=20).

1.d) Observación de MPS en el eje axial (z) por ExM. En esta sección evaluamos si estas estructuras pueden ser evidenciadas en los distintos planos Z de la muestra, lo cual sería de gran utilidad para muestras con mucha densidad de axones y a la vez constituiría una clara ventaja con respecto a las nanoscopías mas utilizadas. La asignación de pseudo colores en las distintas imágenes en el plano axial mostró que en axones en diferentes alturas en z podia ser evidenciado su MPS (3-Fig.6 a). Luego, utilizando vistas ortogonales al plano de adquisición xy (función *Orthogonal Views en ImageJ-Fiji*) observamos que a diferentes profundidades se evidenciaron MPS en axones superpuestos que de otra forma se hubieran desestimado (3-Fig.6 b). Por otra parte, reconstrucciones 3D (función *3D-Viewer-ImageJ-Fiji*) de los axones expandidos nos dieron un indicio de la micro-arquitectura 3D de MPS la cual parece ser conservada por la técnica de expansión de proteínas (3-Fig.6 c). En suma estos resultados fueron interesantes, porque se evidencia una clara

mantención de la micro-arquitectura del MPS en todos los planos, xyz. La resolución en Z permitió evidenciar MPS en distintos planos de la muestra, incluyendo donde existían superposiciones de axones.



C Imágenes de tiempos de video de reconstrucción 3D de MPS

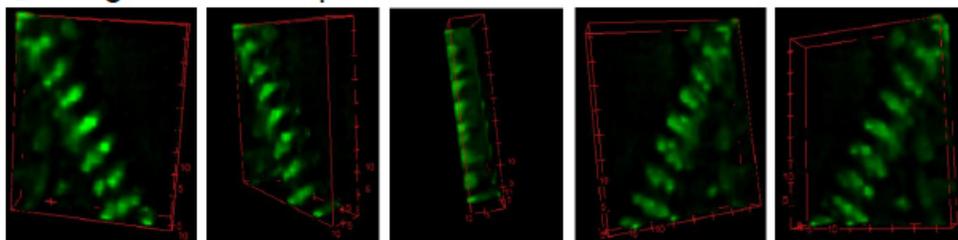


Fig. 6: Observación de MPS en el eje axial (z) por ExM. a Código de color de un Z-stack de 25 frames de axones marcados para evidenciar β II-espectrina, se evidencia la profundidad en Z (siendo el color azul más cercano al vidrio y blanco más profundo al gel) en casi todos los frames se observan axones con MPS. **b**) Cortes ortogonales de un Z-stack, que muestra axones en diferentes planos-Z, observando MPS en distintos alturas en Z. **c**) Imágenes de diferentes tiempos de un video de reconstrucción 3D de un axón marcado para evidenciar β II-espectrina. Escala de barra $1\mu\text{m}$.

Capítulo #3: Conclusión Específica

Los experimentos presentados en este capítulo fueron los resultados obtenidos de la puesta a punto y validación de la técnica de Microscopía de Expansión (ExM) en nuestro Laboratorio. Se logró adaptar la misma para evidenciar MPS, y más interesante aún, fue poder identificar un coeficiente de expansión que permitió poder aplicar dicha microscopía como método cuantitativo preciso de las estructuras periódicas de 190nm presente en axones neuronales.

Lo importante a destacar del presente capítulo es que no solo se logró identificar por primera vez MPS por ExM, sino que se pudo lograr una cuantificación de los mismos la cual se validó por microscopía de super-resolución STED.

La introducción de dicha técnica en nuestro Laboratorio nos permitió realizar y avanzar más rápido en el estudio y caracterización del rol de los MPS en modelos de Degeneración Axonal sin la necesidad de contar con microscopios de alta tecnología como los son los microscopios de super-resolución (STED, STORM).

Por ultimo estos experimentos forman parte de un trabajo que se ha enviado para ser revisado para su publicación.

PUBLICACIÓN EN PREPARACIÓN:

Quantitative expansion microscopy and its validation characterizing the spectrin periodic distribution in axons. *Submitted to Scientific Reports Ref: Submission ID 4a91f2e0-8d71-478e-9f75-7925596811e3.*

Gaby F. Martínez, Nahir Guadalupe Gazal, Gonzalo Quassollo, Alan Szalai, Esther del Cid-Pellitero, Thomas Durcan, Edward Fon, Mariano Bisbal, Fernando Stefani, Nicolás Unsain.

Capítulo. 4

Respuesta y rol del citoesqueleto de actina en axones sensoriales en un modelo de Degeneración Walleriana por corte de axones.

Resultados del objetivo específico # 3

Introducción específica:

La degeneración Walleriana (DW) es un tipo de degeneración que sucede en la porción distal de un axón cuando es separado del soma. Este fenómeno fue descrito por August Waller en 1850 al caracterizar morfológicamente el proceso de degeneración de la sección distal de nervios de rana al ser seccionados (Waller A. 1850). Luego de casi dos siglos, estas observaciones iniciales fueron revalorizadas cuando se pudo demostrar que el corte de un nervio (o axón) es un “gatillador” para la activación de vías moleculares conservadas de destrucción de axones (Araki y col., 2004; Coleman y col., 2005; Neukomm y Freeman., 2014; Ding y Hammarlund, 2019).

Lo interesante es que muchos factores involucrados en la DW son compartidos con la degeneración en el desarrollo (*PNGF*) (ver capítulo 1), y entre especies filogenéticamente distanciadas (desde nemátodos hasta el humano, pasando por la mosca y roedores) lo que indica que hay un mecanismo de degeneración axonal que ha sido seleccionado positivamente durante la evolución. Sin embargo, existen pocas evidencias de qué efecto tiene la DW en el citoesqueleto de actina axonal y sus componentes (como el MPS), lo cual nos resulta curioso ya en este proceso de degeneración culmina con la fragmentación axonal y, el citoesqueleto es componente clave para la mantención estructural de las células. Apoyando esta pregunta, experimentos han demostrado que existe una degradación temprana de espectrina (Saatman y col., 2003; Hall y col., 2005) y citoesqueleto axonal luego de una injuria (Schumacher y col., 2000; Büki y col., 2000).

En su conjunto, estos hallazgos hicieron crecer nuestro interés en explorar si esa degradación de espectrina, componente del MPS, se ve acompañada por un cambio temprano en la organización de los mismos. Bajo este contexto, en el presente capítulo nos propusimos evaluar el impacto de la Degeneración Walleriana en la estructura del citoesqueleto de actina y del MPS y su posible rol en la mantención de axones en este proceso degenerativo.

1. Caracterización de cambios del citoesqueleto de actina en los diferentes compartimientos neuronales (axón y conos de crecimiento) durante Degeneración Walleriana.

1.a) Caracterización de la fragmentación axonal en la Degeneración Walleriana (DW) en cultivo: A cultivos de 3DIV de DRG se le provocó la DW mediante un corte en los axones separando la zona distal del cuerpo neuronal (ver [Materiales y Métodos](#)). El objetivo principal fue realizar una curva de tiempo del proceso de degeneración axonal fijándolos a 1, 3, 6 horas posteriores al corte. Luego se midió el área axonal (axones marcados para evidenciar β III-tubulina) y evidenciamos que a partir de las 3 horas de realizado el corte comienza el proceso de fragmentación axonal que avanza progresivamente hasta las 6 horas (**4-Fig.1 a y b**).

1.b) Efecto de la DW en el citoesqueleto de actina axonal: Para evaluar la pérdida de F-actina total en el compartimiento axonal, medimos la intensidad de la misma en axones que llevaban 3 horas de DW y la intensidad de F-actina de los mismos fue normalizada con la medida de intensidad de axones intactos (**4-Fig.2 a y b**). El análisis cuantitativo mostro que a las 3 horas de realizado el corte (previo a comenzada la fragmentación) no se evidencia una pérdida significativa de la intensidad de F-actina (**4-Fig.2 b y c**).

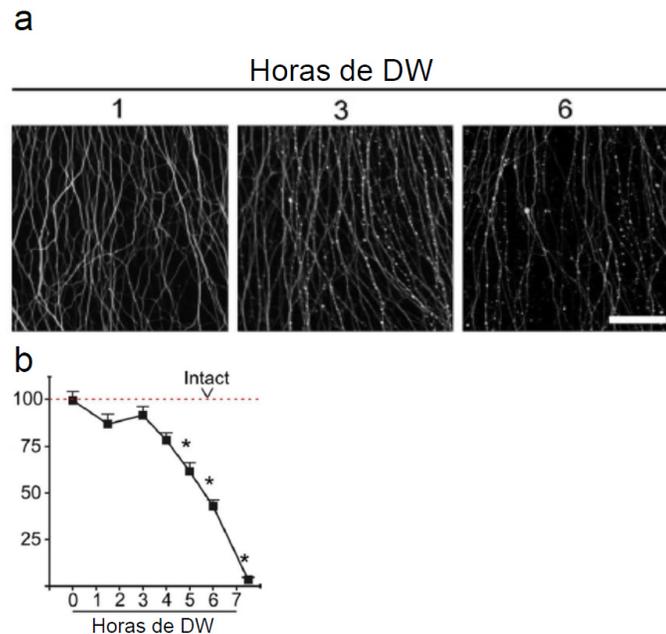


Fig. 1: Imágenes del proceso de fragmentación axonal durante en el curso temporal de la DW: a). b) gráfico que muestra la caída de axones no-fragmentados en el avance del tiempo de la DW. Nótese, que entre las 4 y 5 horas se da una caída constante de la fragmentación axonal hasta las 7 horas. Se observan los cambios de morfología axonal. Axones marcados para observar β III-tubulina. Barra de escala: 100 μ m.

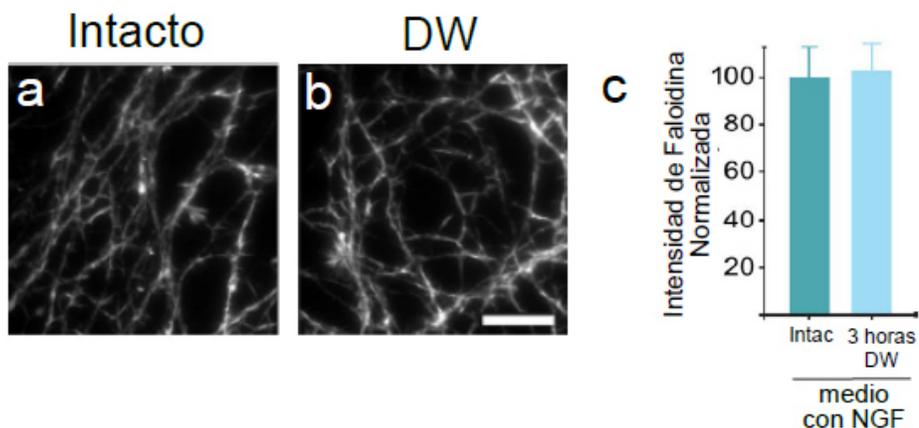


Fig. 2: (a y b) Marcación de axones con Faloidina-Rodamina. c) cuantificación de la intensidad de F-actina. Barra de escala: 50µm. Los datos son representados como media ± SEM. Los datos se representan como media ± SEM con una repetición de un $n=3$ cultivos y la cuantificación al menos 20 imágenes por experimento.

1.c) Respuesta de los CCs a la Degeneración Walleriana: Al igual que para la degeneración PNGF en este punto también evaluamos si en un compartimento axonal que está compuesto casi en su totalidad por F-actina, como los son los CCs, la DW causaba un impacto a tiempos cortos. Observamos que a las 3 horas de realizado el corte hay una pérdida de CCs, es decir se observó una mayor proporción de conos colapsados comparado con los axones intactos que presentaban mayor cantidad de CCs con presencia de filopodios o con lamelas (los que llamamos CCs sanos, **4-Fig.3 a-a' y b-b'**). Estas observaciones fueron acompañadas por los datos cuantitativos que evidenciaron un cambio significativo (**4-Fig.3 c**).

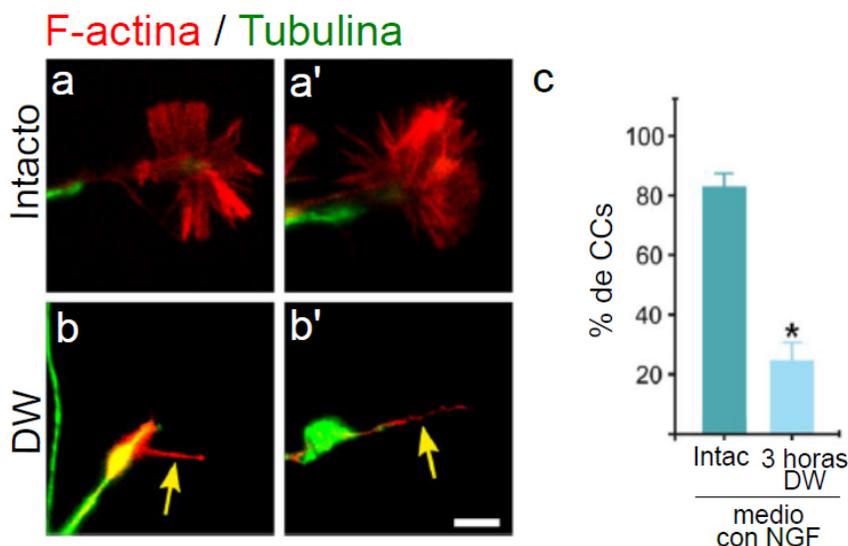


Fig. 3: (a, a') Imágenes de CCs de axones Intactos, donde se observa estructuras Filopoidales y gran marcación de F-actina. (b, b') CCs después de 3 horas DW, Las flechas amarillas indican la baja marcación de F-actina y la retracción de la misma los que llamamos CCs colapsados (no sanos). c) gráfica que evidencia la caída significativa de CCs sanos a las 3 horas de la DW. Escala barra 2 μ m. Los datos son representados como media \pm SEM. Con una repetición de un $n=3$ cultivos y la cuantificación de 10 campos que incluyeran al menos 4 tips (terminaciones del axón) por experimento.

2) Caracterización del efecto de la Degeneración Walleriana en el citoesqueleto periódico asociado a membrana de espectrina/actina (MPS) por Microscopía de Expansión (ExM).

2.a) Evaluación del efecto de la Degeneración Walleriana temprana en MPS. En este punto evaluamos el efecto de la Degeneración Walleriana (DW) en la nanoarquitectura de los MPS por ExM, microscopía que validamos en el capítulo anterior. Para ello se realizó un corte en axones DRG y se fijaron una hora después. Elegimos este tiempo que es ampliamente previo al comienzo de la fragmentación axonal y nos permitiría determinar un remodelado *temprano* no relacionado con un proceso de fragmentación axonal (**4-Fig.1 a**). En primer lugar, observamos que los axones intactos presentaban la periodicidad que caracteriza a los MPS (**4-Fig.4 a**). Sin embargo, cuando observamos los axones expandidos que habían sufrido el corte (1 hora DW) se evidenció una marca de β II-espectrina con una periodicidad no tan organizada como las observadas en los controles (**4-Fig.4 a**). La cuantificación de la abundancia de MPS mostro una caída significativa a la hora (**4-Fig.4 b**), la cual fue acompañada con la pérdida de la organización de los mismos, tanto en los MPS totales, como en los que consideramos MPS (valor umbral de correlación de MPS de 0,1; **4-Fig.4 b**).

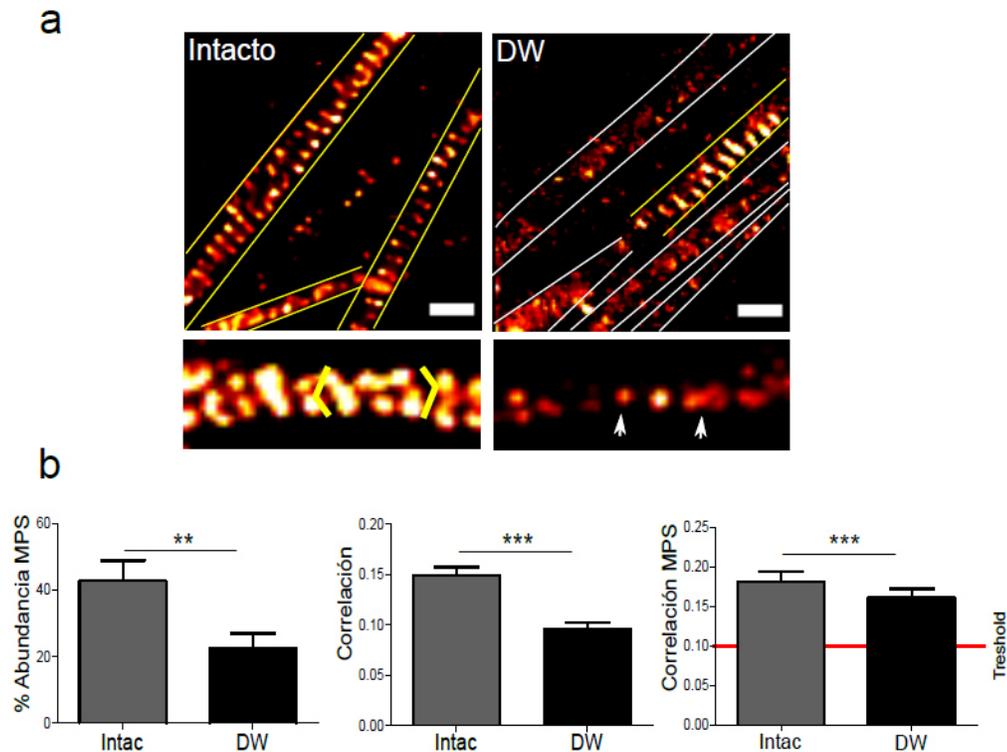


Fig. 4: Imágenes de ExM de axones Intactos y a la hora de la DW: a) Las líneas amarillas delimitan axones que muestran la micro-arquitectura característica del MPS. Las líneas blancas muestran axones en procesos durante la DW que no presentan la organización característica del MPS. Las flechas blancas señalan una marca desorganizada de β II-espectrina. **b)** Cuantificación de la abundancia de MPS y; la correlación de MPS totales y los que estaban por encima del Treshold (0,10), (t-test, Mann-Whitney; Medianas $p < 0.05$). Para la correlación de MPS el umbral escogido fue de 0,1; t-tets, varianza $p < 0.0001$. Barra de escala $0,5\mu\text{m}$. $n=6$, cuantificando ≥ 4 imágenes por cada uno.

2.b) Prevención de la pérdida temprana de MPS durante la DW utilizando drogas que previenen la fragmentación axonal. En esta sección nos propusimos evaluar si el uso de una droga que previene la fragmentación axonal, como el NAD^+ (*del inglés:* Nicotinamida Adenina Dinucleótido; Wang y col., 2005; Wang y col., 2012), puede prevenir también la pérdida temprana del MPS. Primero verificamos el efecto protector de NAD^+ durante la fragmentación axonal. En la **Figura 5** se muestra que 5 horas de tratamiento a axones en proceso de DW (DW+ NAD^+) efectivamente hay una menor fragmentación axonal.

Luego realizamos el siguiente protocolo de tratamiento: a cultivos DRG se los trato con NAD^+ 15 minutos antes de recibir el corte y luego del mismo se los dejo 1 hora (tiempo que evidenciamos que la DW causa cambios en MPS; ver esquema 1 y 4-Fig. 4). Observamos, que los axones cortados en presencia de NAD^+ (DW+ NAD^+) presentaban estructuras periódicas más ordenadas comparados con los que estaban cortados pero sin tratamiento (4-Fig.6 a). La cuantificación confirmó esto, ya que la organización de los mismo mostró un aumento significativo en

axones DW+NAD en comparación con los DW (4-Fig.6 b); y lo mismo fue evidenciado en las medidas de abundancia de MPS, que también aumentó en un ~20% (4-Fig.6 c).

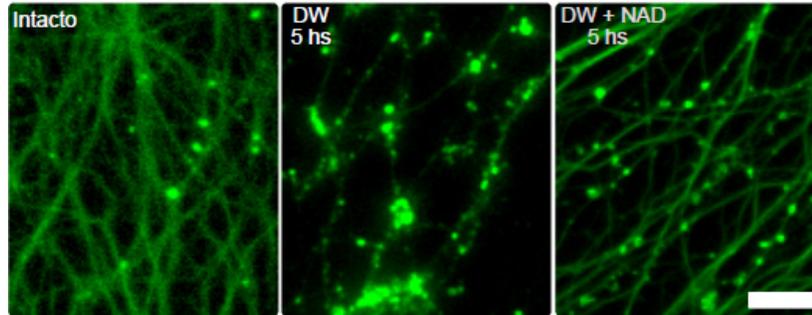
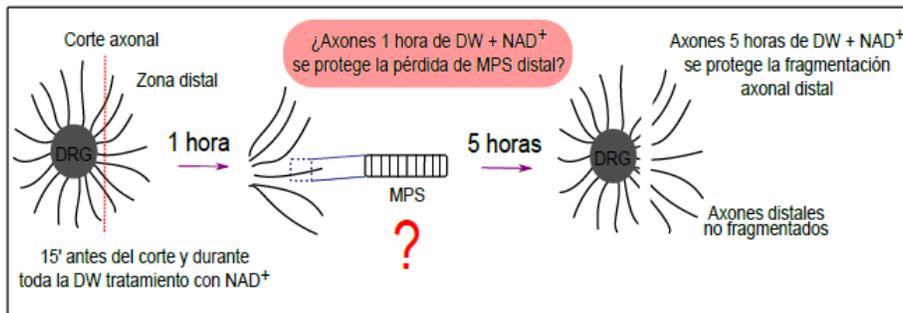


Fig. 5: Imágenes de epifluorescencia de axones marcados para evidenciar α -tubulina: Axones Intactos, Degeneración Walleriana (DW) y DW+NAD⁺. La DW y el tratamiento fueron por 5 horas y la inmunomarcación contra α -tubulina. Nótese, la prevención de la fragmentación axonal a 5 horas de DW+NAD⁺ comparada con los axones DW 5 horas sin tratamiento. Barra de escala: 20



Esquema 1: Gráficos representativos de ganglios sensoriales (DRG) que fueron cortados para inducir DW: El resultado de la sección anterior (4-Fig 4) demostró que a la hora de DW existe una pérdida del MPS. Este esquema representa la pregunta sobre si en ese mismo tiempo de DW pero con el tratamiento con NAD⁺ existe la protección del MPS. En este gráfico también se muestra lo que ocurre a las 5 horas de DW+NAD⁺ donde se protege la fragmentación axonal distal que ocurre en ese tiempo.

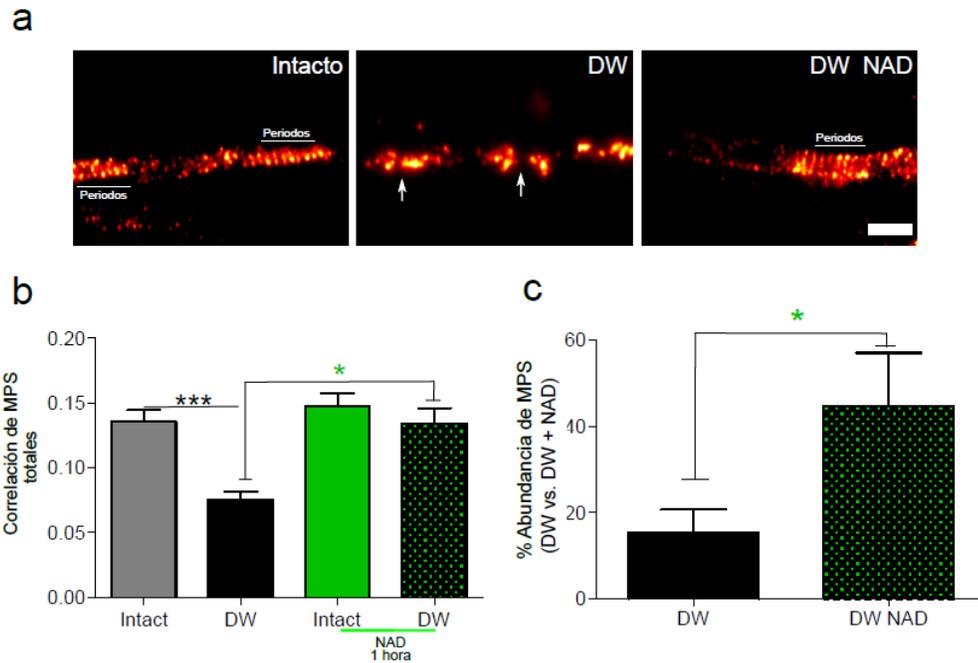


Fig. 6: Prevención de la pérdida temprana de MPS por NAD⁺. **a)** Imágenes de axones expandidos, Intactos, DW y DW+NAD⁺ (1 hora) marcados para evidenciar β II-espectrina. Las líneas indican los periodos (Intactos y DW+NAD⁺); las flechas blancas indican la desorganización de MPS a la hora de la DW. **b)** Cuantificación de la correlación total de MPS (Tukey's Multiple Comparison Test; Medias, $p < 0,05$). **c)** Gráfico que muestra el aumento significativo de la cantidad (abundancia) de MPS con 1 hora de tratamiento de NAD⁺ durante la DW. Mann Whitney; Medianas $p < 0,05$. Barra de escala 1 μ m. Cultivos $n=6$, cuantificando ≥ 4 imágenes por cada tratamiento.

2.c) La pérdida del MPS correlaciona con la fragmentación axonal. Al igual que en el **Capítulo. 2**, los resultados obtenidos en la sección anterior nos llevó a preguntarnos si esta disminución temprana que observamos de los MPS, que precede la fragmentación axonal (3 horas en adelante) se profundiza durante el proceso de fragmentación. Para ello fijamos ganglios DRG a las tres horas de provocado el corte, tiempo que encontramos una población heterogénea de axones, no-fragmentados, en proceso de fragmentación y fragmentados (**4-Fig.7 a**).

Las imágenes obtenidas mostraron la heterogeneidad de la población axonal esperada, pudimos encontrar axones en diferentes estadios de fragmentación en los que comparamos la abundancia y organización del MPS entre axones fragmentados y no-fragmentados (**4-Fig.7 b**).

La cuantificación de la abundancia de MPS mostro que la misma baja significativamente en axones que ya están fragmentados comparados con los que aún están sin fragmentar, evidenciando menos MPS en los axones fragmentados (**4-Fig.7 c**) a mismo tiempo de DW. Sin embargo, la cuantificación de la organización de esos periodos (correlación) mostro que en los fragmentos pequeños (axones ya fragmentados) esta organización es mayor comparados con los MPS que están en los axones no-fragmentados (**4-Fig.7 d**). Esto lo atribuimos a que quizás los segmentos de axones pequeños se mantienen adheridos al sustrato porque aún tienen la presencia organizada de MPS.

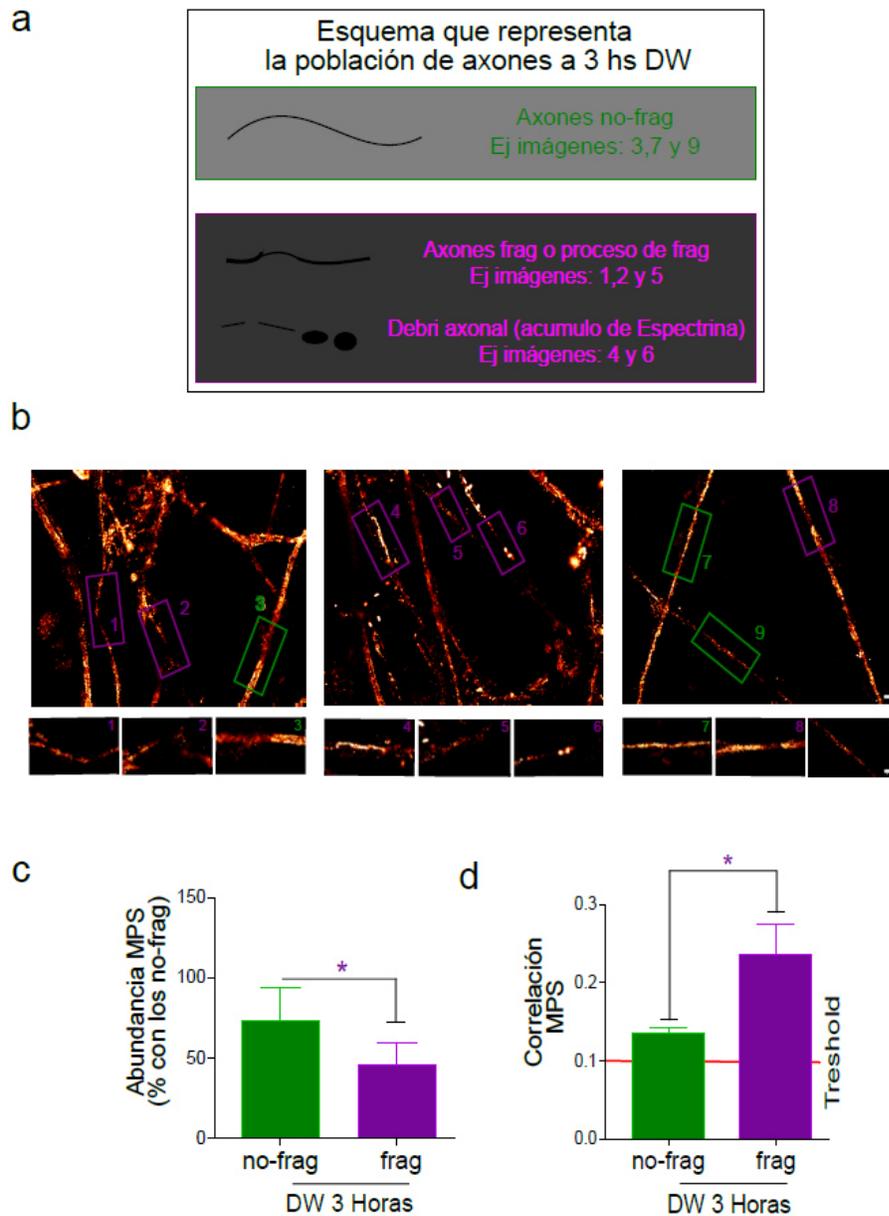


Fig. 7: Comparación de MPS entre axones no-fragmentados con axones fragmentados. a) Esquema representativo de la población axonal que se encuentra luego de 3 horas del corte de los mismos. b) Imágenes de axones expandidos tomadas en confocal, a las 3 horas de haberles provocado el corte, marcados para evidenciar β II-espectrina. Los recuadros verdes y violetas indican axones no fragmentados y fragmentados. c y d) Cuantificación de la abundancia y correlación de MPS. Mann Whitney; Medianas $p < 0.05$. Escala de barra 10 μ m. $n = 2$, cuantificando ≥ 4 imágenes por cada uno.

2.d) La disrupción farmacológica de los MPS acelera el proceso de fragmentación axonal en DW. Para evaluar que tan importante son los MPS para la mantención axonal, realizamos un tratamiento con Latrunculina-B (Lat-B). Esta droga captura monómeros de actina y previene su incorporación en F-actina afectando su polimerización (Peterson y Mitchison. 2002; Allingham y col., 2006). Trabajos recientes demostraron que el tratamiento con esta droga disrumpe los MPS *per-se* en axones de neuronas en cultivo (3DIV) (Zhong y col., 2014).

Es importante destacar que antes de la elección de Lat-B, probamos de forma comparativa otra droga que desestabiliza la F-actina: Citochalasina-D (Cito-D), que también se demostró que disrumpe el MPS (Zhong y col., 2014). Cito-D se une al extremo más dinámico de filamentos de actina e impide la incorporación de nuevos monómeros (Peterson y Mitchison. 2002). La comparación de la marca de F-actina entre axones tratados con estas drogas de manera aguda muestra que Lat-B disminuye la marca de F-actina, mientras que Cito-D provoca acúmulos de F-actina en los axones (**4-Fig.8**). Por esa razón, elegimos utilizar Lat-B para el tratamiento farmacológico de disrupción del MPS.

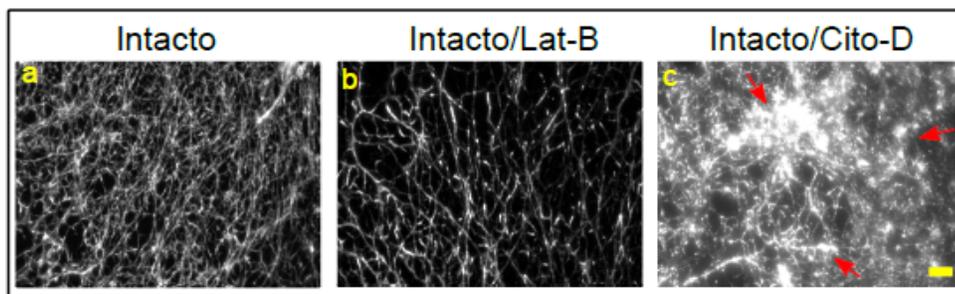


Fig. 8: Imágenes confocales de axones DRG marcados para evidenciar F-actina tratados con drogas que afectan los filamentos de actina. a) Axones intactos, b) axones intactos + Lat-B y c) axones intactos + Cito-D. En este último se evidencia una marca de acúmulos de actina (flechas rojas) comparada con la marca de axones tratados con Lat-B, que presentan una marca más “limpia”. Barra de escala: 50 μ m.

En primer lugar, validamos el tiempo y dosis de tratamiento con esta droga y observamos por ExM que una dosis de 20 μM por 2 horas con Lat-B causa una pérdida tanto en la abundancia como en la organización del MPS (4-Fig.9 a y b).

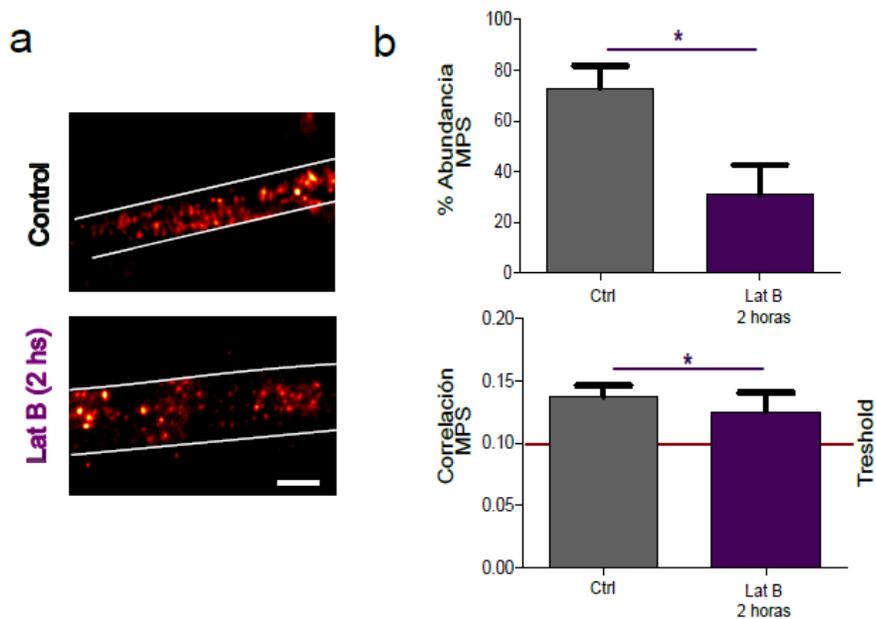


Fig. 9: a) Imágenes de axones marcados para revelar β -Illespectrina por ExM. **b)** Cuantificación de la Abundancia y Correlación de MPS; Correlación Wilcoxon test; mediana ($P < 0.05$). Abundancia Mann Whitney-test; mediana ($P < 0.05$). Escala de barra $1\mu\text{m}$. Líneas blancas delimitan los axones.

Posteriormente, realizamos DW por 2 horas, y un grupo fue tratado con Lat-B (durante esas 2 horas) y el otro no recibió este tratamiento (grupo control). La cuantificación del área axonal evidenció que el tratamiento con Lat-B incrementa la pérdida axonal inducida por DW (**4-Fig.10 a y b**). Es importante destacar que el tratamiento con LatB *per se* no induce fragmentación axonal.

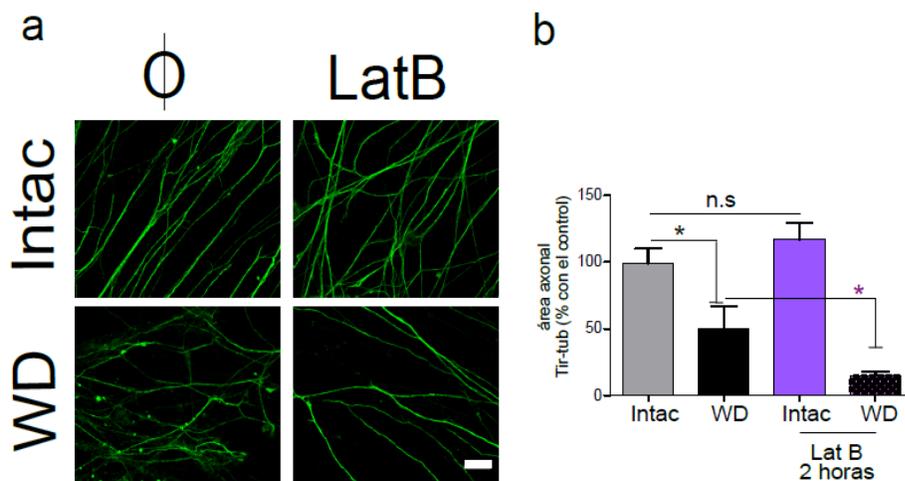


Fig. 10: Latrunculina-B acelera la pérdida axonal inducida por DW. a) Imágenes confocales de axones marcados para evidenciar Tir-tubulina. b) cuantificación de área axonal. Mann Whitney; Medias $p < 0.05$. Barra de escala: 10 μ m.

Capítulo #4: Conclusión Específica

Mostramos que en el modelo de *Degeneración Walleriana* (corte de axones) se inducen cambios tempranos en la F-actina en los conos de crecimiento. Evidenciamos que existe una caída de conos de crecimiento sanos de axones de la zona distal (axones separados del soma neuronal). Pero contrariamente a lo observado en el **Capítulo 2**, la F-actina total del compartimiento axonal no mostró una baja en su intensidad. En su conjunto, estos resultados nos podrían estar sugiriendo que quizás se vean involucrados mecanismos diferentes durante la DW en la regulación global del citoesqueleto de F-actina en ambos compartimientos.

Por otra parte, evidenciamos que existe un remodelado temprano en los MPS, y que a la hora del corte axonal observamos una caída en la organización y cantidad de MPS y que este cambio precede la fragmentación axonal (que se observó a las 3 horas de la DW). Luego demostramos que durante el proceso mismo de fragmentación, axones ya fragmentados presentan una drástica pérdida del MPS comparado con axones vecinos aún sin fragmentar. Esto apoya nuestra hipótesis del rol que cumplen los MPS en la mantención de la estructura axonal en procesos degenerativos, tal como observamos en el modelo de Degeneración en el Desarrollo en el **Capítulo 2**.

El tratamiento con NAD⁺ protege la fragmentación axonal ([Araky y col., 2004](#); [Wang y col., 2005](#); [Wang y col., 2012](#)). En este objetivo demostramos que ese mismo tratamiento protege de la pérdida temprana en organización y abundancia del MPS. Para sustentar la idea de que la pérdida del MPS correlaciona con la fragmentación axonal, demostramos que la desorganización farmacológica de los MPS (con Lat-B) acelera la pérdida de área axonal durante la DW.

En su conjunto, en este capítulo logramos caracterizar el efecto de otro modelo de degeneración axonal (*Degeneración Walleriana*) en el citoesqueleto de F-actina y MPS axonales. Evidenciamos que la DW desarma el citoesqueleto de F-actina en los conos de crecimiento y al igual que la degeneración por *PNGF* en este modelo los MPS parecen también tener un rol clave en la mantención estructural de los axones distales en el proceso de fragmentación.

Capítulo 5

Discusión

DISCUSIÓN CAPÍTULO # 2

Cambios estructurales del citoesqueleto de actina y del MPS axonal ocurridos durante la Degeneración en el Desarrollo, modelo de PNGF.

1. La degeneración axonal por privación de *NGF* causa cambios estructurales en el citoesqueleto de F-actina.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron un cambio en la F-actina global en axones y conos de crecimiento, provocado por la privación del factor trófico de crecimiento nervioso *NGF* (*PNGF*), modelo que emula la degeneración axonal que ocurre en el desarrollo. Este cambio de F-actina global fue evidenciado en tiempos tempranos de la privación (3 horas), cuando aún no han comenzado los procesos de fragmentación axonal. Dicho remodelado continuó en ese nivel hasta las 18 horas, cuando comienzan a encontrarse axones en proceso de fragmentación y aumento paulatinamente hasta las 24 horas. (Ver Fig. 1, Cap.2).

Estos resultados coinciden y amplían observaciones previas presentes en la bibliografía donde postulan la vinculación de vías de regulación de F-actina en procesos de degeneración en el desarrollo y algunas patologías neurodegenerativas (Heredia y col., 2006; Bernstein y col., 2010; Valakh y col., 2013; Saal y col., 2015). Sumado a esto, datos de proteómica mostraron un enriquecimiento de moduladores del citoesqueleto de actina en axones lesionados (Garland y col., 2013) y recientes estudios en muestras de plasma de pacientes con glaucoma (enfermedad con denegeración axonal temprana) mostraron un enriquecimiento de proteínas de unión de F-actina (Gan y col., 2019).

Nuestros resultados son novedosos y aportan nuevo conocimiento del impacto que provoca la degeneración del desarrollo en el citoesqueleto de F-actina en dos compartimientos neuronales (axones y CCs). Estos efectos de la ausencia de *NGF* podrían interpretarse como fenómenos tendientes a guiar a los axones en crecimiento hacia su blanco, que secretan *NGF*. Dado que una regulación normal de la dinámica de actina y los conos de crecimiento axonal participan en la elongación y guiado axonal, respectivamente (Gomez y Letourneau. 2014; Glebova y Ginty. 2005).

Los resultados de este trabajo, sugieren que el desarreglo de estas estructuras causado por la ausencia aguda (experimental) de *NGF* sirve para redireccionar los axones hacia fuentes de mayor concentración de *NGF*, y así poder llegar al blanco generador de la neurotrofina. Sabiendo que existen evidencias que postulan efectos antagónicos del *NGF* dependiente de concentración con respecto al crecimiento axonal (Sainath y Gallo. 2014). Por debajo de un nivel umbral, se producen respuestas axonales típicas de moléculas repulsoras (como Sema 3A; Dent y col., 2004; Brown y Bridgman. 2009) y por encima de ese umbral se producen respuestas típicas de una molécula de atracción (Seeley y Greene, 1983; Goldberg y col., 2000).

En base a esto, el estudio del efecto que causa la degeneración ocurrida durante el desarrollo en la F-actina nos dio indicios de que su regulación estructural temprana jugaría un rol importante en los procesos de cableado y posterior degeneración ocurridos en el desarrollo del sistema nervioso.

2. La pérdida de MPS durante la degeneración provoca la inestabilidad estructural axonal y su posterior fragmentación.

La utilización de nanoscopía hizo posible el descubrimiento de que actina, espectrina y otras proteínas asociadas forman una estructura periódica de asociación a membrana (MPS, Xu y col., 2013). Este hallazgo ha sido de gran interés para muchos grupos de investigación, quienes han generado evidencia para las posibles funciones del MPS axonal. Algunas evidencias postulan que estas estructuras pueden estar vinculadas con la mantención del calibre axonal y su funcionalidad (Leite y col., 2016). Por otra parte, trabajos previos mostraron que en *C. elegans* nulos para la proteína β -espectrina (proteína que forma parte del MPS) existe una pérdida de integridad física de los axones motores del gusano (Hammarlund y col., 2007). Estos antecedentes nos llevaron a postular que los MPS podrían cumplir un rol en la mantención axonal en procesos degenerativos.

En este trabajo aportamos evidencia sobre el rol que tienen los MPS en la mantención de la integridad axonal durante la degeneración por *PNGF* (Ver Fig. 5-6, Capítulo. 2). Observamos que a las 3 horas de la privación existe un cambio estructural de los mismos y eso se acompaña con una caída rápida de su abundancia (caída 50%) y duradera en el tiempo. Lo interesante, es que este cambio temprano precede la fragmentación axonal (18 horas en adelante). Esto fue evidenciado cuando evaluamos en cultivos DRG una población heterogénea de axones (no-fragmentados y fragmentados) en el tiempo de 18 o 21 horas de *PNGF*, donde observamos que los axones fragmentados presentan una reducción de la abundancia del MPS en un 75% comparados con los que aún no se disrumpieron (no-fragmentados).

Nuestra interpretación de estos datos es que el desarmado del MPS avanza rápidamente durante o inmediatamente anterior a la fragmentación axonal, y es por eso que es extraño encontrar fragmentos axonales con un MPS organizado. Esto implica una relación directa entre la organización del MPS y la estabilidad del axón, lo que no llevó a realizar los experimentos farmacológicos que se detallan a continuación.

Evidencias con tratamiento de pequeñas moléculas conocidas que alteran la polimerización y la despolimerización de los filamentos de actina apoyan la idea de que los MPS no son estructuras estables, sino todo lo contrario presentan una dinámica continua. Más sabiendo que la F-actina trabaja en un proceso de equilibrio dinámico (Dent y Gertler. 2003), en donde el continuo agregado de monómeros en un extremo es equilibrado con la salida de monómeros en el otro, en un proceso conocido como "treadmiling". En este contexto, para corroborar si un cambio en la dinámica de F-actina causa un efecto en la fragmentación axonal realizamos

tratamientos agudos con Curcubitacina-E (CE, droga que interactúa con la F-actina y la estabiliza, [Sörensen y col., 2012](#)).

Evidenciamos que se previene la pérdida de MPS cuando el tratamiento se realiza a axones ya avanzados en el proceso de degeneración (21 horas), observando que 3 horas de tratamiento revierte la pérdida de MPS que observamos a las 24 horas de degeneración. El tratamiento con CE aumenta la abundancia de MPS tanto medidos por tinciones contra F-actina como β II-espectrina. Estos resultados evidencian la dinámica de estas estructuras y que la estabilidad de un componente de los mismos (F-actina) causa un impacto positivo para la recuperación de MPS y la fragmentación axonal durante la degeneración (**Ver Fig. 11, Capítulo 2**).

Estos resultados son apoyados por evidencias anteriores que mostraron que el tratamiento agudo con drogas que desestabilizan la actina, mediante unión a G-actina o F-actina (Latrunculina-A y Citochalasina-D) causa el desarmado de los MPS ([Zhong y col., 2014](#); [Qu, y col 2017](#)). Lo que nos sugiere que el MPS tiene filamentos de actina relativamente dinámicos. En su conjunto, nuestros resultados aportan una nueva visión, postulando que la estabilización de actina protege los MPS, que juegan un rol en la integridad axonal y eso provoca un retraso en la fragmentación. Este resultado evidencia el rol clave del MPS para la mantención de integridad axonal en un contexto de degeneración.

Interesantemente, a principios del presente año (2019) se publicó un trabajo que valida nuestros resultados ([publicados en Unsain y col., 2018](#)) lo que hace que sean más robustos en la bibliografía. Este nuevo trabajo ([Wang y col., 2019](#)), además de corroborar nuestras observaciones, sugiere que la vía pro-degenerativa caracterizada por la participación *DLK* (*del inglés: Dual Leucine zipper Kinase*) y *c-Jun* pueden ser activadas tanto por el desarmado farmacológico del MPS y por la degeneración por *PNGF* ([Wang y col., 2019](#)). Postulando posibles vías moleculares activadas por cambios estructurales del MPS.

3. La pérdida de MPS precede la pérdida de otros componentes del citoesqueleto axonal.

La degeneración axonal es un proceso que culmina con la fragmentación y pérdida total de axones. En la última parte del **Capítulo 2** realizamos experimentos para evaluar si la población de microtúbulos también sufría una drástica disminución durante la fragmentación. Para nuestra sorpresa, observamos que las tinciones de MT no mostraron diferencias entre axones no fragmentados y fragmentados a las 24 horas de PNGF. Luego corroboramos la estructura nanoscópica de estos microtubulos mediante nanoscopia de STED.

Otra observación llamativa de esta sección fue el enriquecimiento de MTs con α -glu-tubulina, lo que indica que existe un aumento de MT estables, en detrimento de MTs más dinámicos, ya que la marca contra α -tir-tubulina disminuyó proporcionalmente.

cuál sería el efecto de la degeneración (en la etapa de fragmentación) en otros componentes del citoesqueleto neuronal. En tiempos de fijación donde ya sabíamos que la fragmentación axonal da comienzo (18-24 horas) y existe una población axonal heterogénea (axones fragmentados y no-fragmentados). Es sabido que el desamblaje de MT con el tratamiento de Nocodazol causa una desorganización de los MPS *per-se* (Zhong y col., 2013). En base a esto, por la contraria, en nuestros experimentos evaluamos si el efecto que causa la *PNGF* en los MPS causa un impacto en la estructura de microtúbulos (Ver Fig. 9-10, Capítulo. 2).

Midiendo la intensidad de las tubulinas total (α -tubulina) y tubulina detirosinada (α -glu-tubulina, tubulina estable); (Maor-Nof y col., 2013). Observamos que la intensidad de α -tubulina (tubulina total que está formando MT) baja con respecto al control a las 24 horas de *PNGF*, donde los axones están casi en su totalidad fragmentados. Estos resultados nos sugirieron, que la pérdida de MPS que demostramos anteriormente es específica y a su vez convierte al MPS en una estructura clave en la integridad axonal en procesos degenerativos.

La **Figura 5-Fig. 1** resume las principales observaciones de este capítulo.

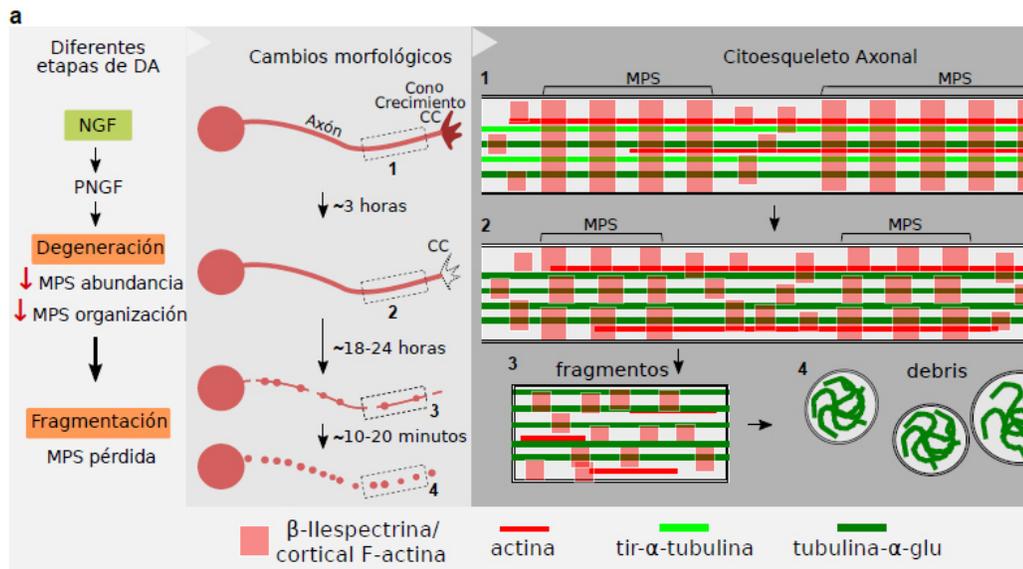


Fig. 1: Diferentes estadios del proceso de degeneración axonal por privación de NGF. Se muestra el impacto provocado en cada componente del citoesqueleto axonal y de conos de crecimiento. Nótese, que en la degeneración temprana se desorganizan y baja de abundancia de MPS (2). (3) comienzo de la fragmentación axonal donde ocurre una pérdida del MPS (rápida) que se ve seguida por la pérdida de α -tubulina y actina. Mientras que α -glu-tubulina (MT estables), perduran en axones fragmentados y debris celular.

DISCUSIÓN CAPÍTULO # 3

Validación de Microscopía de Expansión para evidenciar y cuantificar cambios en el MPS axonal.

1. Visualización de MPS por Microscopía de Expansión.

Los MPS están presentes con una nano-arquitectura particular a lo largo de los axones de todas las poblaciones neuronales. Esta organización se presenta como períodos de 190 nm formados por las proteínas asociadas a membrana actina y espectrina (Xu y col., 2013; revisado en Unsain y col., 2018b). Esta particularidad hace que solo sea posible ser evidenciados y estudiados utilizando microscopía de super-resolución (STED, STORM). En el **Capítulo 3** validamos el uso de una nueva técnica de super-resolución, Microscopía de Expansión (ExM), para la observación del MPS. Desde su primera publicación en 2015, números protocolos en prestigiosas revistas han surgido para adaptar dicha técnica para diferentes especímenes y marcaciones de proteínas (Asmamaw y col., 2019).

Algunos de los trabajos que han sido publicados hasta la fecha, han podido valorar la retención de diferentes fluoróforos (Tillberg y col., 2016), la visualización de proteínas (Chen et al., 2015; Chozinski y col., 2016), así como también, otros han conseguido obtener una mayor expansión (mejor resolución) mediante cambios en la concentración de los compuestos que hacen la solución del gel y procedimientos de digestión de los mismos (Gambarotto y col. 2018). En esta línea, otro ejemplo, es el novedoso protocolo llamado Expansión 10X, donde un gel es expandido 10 veces del tamaño original y logran una resolución 25-30nm por microscopía de epifluorescencia convencional (Truckenbrodt y col., 2019). Más allá de todos estos avances y validación de esta técnica, hasta este trabajo no existían publicaciones del uso de ExM para la observación de MPS y su cuantificación. Mediante el seguimiento de varios protocolos logramos poner a punto un protocolo específico para expandir axones sensoriales (en cultivo) inmunomarcados para evidenciar β II-espectrina (Ver Fig. 1 y 2, Capítulo. 3).

Utilizando un microscopio de fluorescencia convencional obtuvimos una separación de los fluoróforos que marcaban β II-espectrina que nos permitió ver la nano-arquitectura característica del MPS, es decir una marca periódica de β II-espectrina. Lo valioso de esta técnica es la ganancia de super-resolución en el plano Z. La resolución efectiva ganada puede ser de ~70 nm, si partimos de una expansión lineal de ~4,5 y utilizamos un microscopio con límite de refracción ~300 nm (300 nm/4,5, Asmamaw y col., 2019). Mediante el escaneo en Z en toda la muestra (Z-stack) logramos realizar una reconstrucción 3D, así como cortes ortogonales de cada plano demostrando que con la técnica de ExM podemos obtener imágenes de MPS en los axones en todo el eje axial.

Para validar nuestras observaciones con ExM, las comparamos con imágenes de STED de las mismas muestras. Elegimos esta microscopía como control ya que la misma es altamente utilizada por nuestro laboratorio y otros grupos de investigación para analizar estas estructuras (Leite y col., 2016; Unsain y col., 2018b). Interesantemente, al principio nuestra medida de coeficiente de expansión era calculada macroscópicamente (tamaño del gel) y ese coeficiente luego era el utilizado para la calibración de las imágenes post-ExM para cuantificar los periodos presente e los axones.

Cuando realizamos la calibración de las imágenes y medimos la periodicidad del MPS nos encontramos con la sorpresa que los mismo median ~240 nm, es decir mayor tamaño a lo registrado en la bibliografía por microscopía de super-resolución STED, de 190 nm (D'Este y col., 2016; Leite y col., 2016; Unsain y col., 2018).

Atribuimos esta observación a que quizás la proteína dentro del gel no se expande igual que el gel macroscópicamente. Revisando la bibliografía, notamos que la mayoría de los trabajos publicados de ExM el coeficiente de expansión era medida tomando dos puntos de referencia en imágenes pre y post-expansión (Chen y col., 2015; Tillberg y col., 2016; Chozinski y col., 2016; Gambarotto y col. 2018). Pero también existen registros, donde toman el coeficiente de expansión midiendo el gel macroscópicamente, pero los resultados son ambiguos, ya que algunos coeficiente del gel dan un poco menor al registrado por la medida de separación de dos puntos de referencia con las imágenes (Pre y Pos Expansión, Ku y col., 2016; Gao y col., 2018; Sheard y col., 2019).

Para abordar esta problemática, expandimos fibroblastos marcados para evidenciar la red de microtúbulos, de esa forma el núcleo celular queda delimitado y fue posible medirlo poblacionalmente en células pre y pos-expansión. Estos experimentos evidenciaron un coeficiente de expansión ~4,7 lo que significó un 32% mayor que el coeficiente de expansión del Gel-Block, que era de ~3,6. Utilizando ese coeficiente (el cual llamamos, Coef. Proteico; **5-Fig. 2**). Con ese nuevo coeficiente de expansión, medimos los períodos en imágenes expandidas y obtuvimos medidas de ~188 nm, similar a la que se obtiene por STED (~190 nm; **Ver Fig. 4, Capítulo 3**). Este resultado muestra que la expansión proteica es mayor a la del Gel-Block y postula un nuevo procedimiento de obtener un coeficiente de expansión más preciso de las proteínas y justifica el uso de ExM como método cuantitativo.

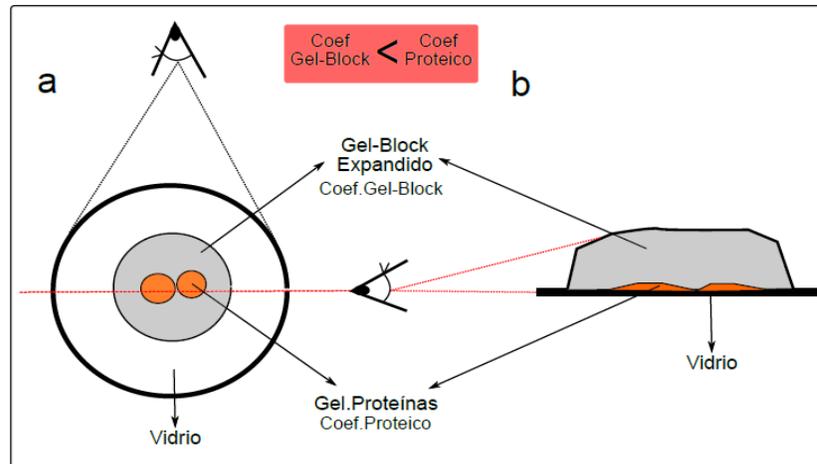


Fig. 2: El esquema representa el Gel.Block y Gel.Proteínas: **a)** Se representa de una visión superior del gel-muestra, en imágenes tomadas en esa perspectiva se midió el Coef. Gel-Block, promediando su medida de diámetro. **b)** Vista ortogonal del gel en **a)**. Se observa dónde está la muestra incluida en el mismo (cerca del vidrio), en donde se da la expansión proteica, de las cuales se toman las imágenes de estructura referentes Pre y Pos-expandidas, para luego estimar el Coef. Proteico.

2. Cuantificación de correlación y abundancia de MPS por Microscopía de Expansión.

Utilizando el coef. Proteico analizamos imágenes de STED y ExM por el programa de cuantificación de correlación de MPS, *Gollum* (Barabas y col., 2017). Las frecuencias relativas de correlaciones de imágenes tomadas con ambas microscopías no dieron diferencia y el % de MPS (abundancia) presentes en las muestras fue el mismo. Además, la cuantificación de la organización y abundancia del MPS en axones en una condición de relevancia fisiológica, como lo es la degeneración axonal del desarrollo embrionario, mostro una pérdida de los mismos en imágenes tomadas por ExM al igual de los datos registrados por STED y STORM en mismas condiciones (Unsain y col., 2018; Wang y col., 2019).

Esto resultados fueron contundentes y validan la utilización de una nueva técnica de super-resolución para observar y cuantificar las estructuras periódicas MPS. Lo valioso es que como describimos en Materiales y Métodos, la ExM no necesita de equipos de microscopias de alta tecnología, como lo son los microscopios de super-resolución. En resumen, esta puesta a punto, nos permitió avanzar con mi tercer objetivo de tesis, y ha sido implementada como técnica de rutina en nuestro Laboratorio, lo que aportara a estudios futuros y en la profundización del estudio del rol de los MPS en axones.

DISCUSIÓN CAPÍTULO # 4

Rol del citoesqueleto de actina y del MPS durante la fragmentación ocurrida en axones distales cortados, modelo de Degeneración Walleriana.

1. El efecto temprano de la *Degeneración Walleriana* en la F-actina total.

Al igual que el Capítulo. 2, en primer lugar evaluamos cual era el efecto de la *Degeneración Walleriana* (DW) *in vitro* (corte de axones) en la F-actina total de axones y conos de crecimiento en la zona distal (separada del soma). Desde hace mucho tiempo es sabido que este tipo de degeneración es local en el compartimiento axonal y es un mecanismo que sucede tempranamente y culmina con una destrucción total de los axones distales (Lee JC.1963; Thomas PK. 1964). Además, algunos moduladores de F-actina también se los han identificado en procesos de degeneración e injuria axonal (Valakh y col., 2013; Saal y col., 2015). Pero no existen evidencias de que cambios estructurales tempranos ocurren en la F-actina en estos compartimientos. Primero evidenciamos que a las 3 horas de provocado el corte axonal, existe un generalizado colapso de los conos de crecimiento. Esta respuesta de colapso es típica de axones en crecimiento cuando se encuentran con señales negativas del ambiente durante el desarrollo de las conexiones sinápticas (Gallo y Letourneau. 2004; Gomez y Letourneau. 2014). Por otro lado, nuestros resultados eran los esperados sabiendo que en la bibliografía existen varias evidencias que vías de control de F-actina están vinculadas en varios procesos de degeneración (Bamburg y col., 2010; Valakh y col., 2013; Saal y col., 2015). Este fenómeno de colapso de CC replica lo observado en la primera fase de la degeneración por PNGF.

Sin embargo, en el compartimiento axonal no identificamos un impacto temprano en la F-actina, ya que los niveles de intensidad no mostraron diferencia entre axones en procesos de DW e intactos. Esto podría darse porque quizás sean diferentes los mecanismos de control de la dinámica de polimerización/despolimerización de F-actina durante la DW en el compartimiento axonal que los de los Conos de Crecimiento.

2. La *Degeneración Walleriana* causa una desorganización temprana en los MPS.

La lesión de un nervio causa una degeneración axonal que culmina con una fragmentación total de los axones distales a la lesión (Lee JC.1963 y Thomas PK. 1964; Neukomm y Freeman, 2014). *In vitro* es posible emular este procesos por el modelo de DW por corte de axones (Coleman y col., 2005; Unsain y col., 2013; Calliari y col., 2014). En el **Capítulo 2** de este trabajo de tesis demostramos que los MPS juegan un rol clave en la mantención de la integridad axonal en el modelo de degeneración que ocurre en el desarrollo, *PNGF*. En este punto quisimos elucidar si existen cambios tempranos similares en los MPS durante la DW.

Utilizando ExM cuantitativa, fijamos y expandimos axones sensoriales a la hora de realizado el corte de los mismos, y la marcación para evidenciar β II-espectrina nos mostró cualitativamente que hay una desorganización temprana de MPS. La cuantificación con el programa *Gollum* mostro una baja en la abundancia que fue acompañada con la baja de correlación del MPS (**5-Fig. 3**). Podríamos decir que está pérdida temprana del MPS quizás sea por una activación temprana de Calpaína, proteasa que tiene como blanco la degradación de espectrina, componente proteico de estas estructuras. Esto es apoyado por evidencias que postulan la expresión temprana de espectrina clivada (proteína degradada por Calpaínas) durante la degeneración (Saatman y col., 2003; Hall y col., 2005) y sugiere que la pérdida del MPS temprana puede darse por la degradación de sus componentes mediada por calpaínas. Trabajos posteriores podrían evaluar la participación de calpaínas en el remodelado del MPS mediante experimentos de pérdida de función genética o con inhibidores farmacológicos.

Por otra parte, las Calpaínas también degradan Caspasas (vía retrograda de apoptosis neuronal) y la activación temprana de Caspasas ha sido vinculada con la pérdida estructural axonal durante la degeneración por privación, previo la fragmentación axonal (Schoenmann y col., 2010; Simon y col., 2012; Unsain y col., 2013). Sin embargo, recientes evidencias demostraron que la desorganización del MPS precede la actividad de vías Caspasas en modelos de *PNGF* (Wang y col., 2019). Sumado a esto, las Caspasas parecen no tener un rol durante la degeneración distal temprana ocurrida durante la DW (Unsain y col., 2013). Lo que apoya la idea que la pérdida temprana del MPS por la DW, esté vinculada por la activación de vías de degeneración que preceden la fragmentación axonal (por ejemplo, Calpaínas) y quizás esos efectos tempranos en el MPS sean inducidos por mecanismos aun sin elucidar, aunque como se discutira mas adelante, es posible que esa vía sea sensible a NAD^+ , ya que esta molécula previene tanto el remodelado temprano del MPS como la posterior fragmentación axonal.

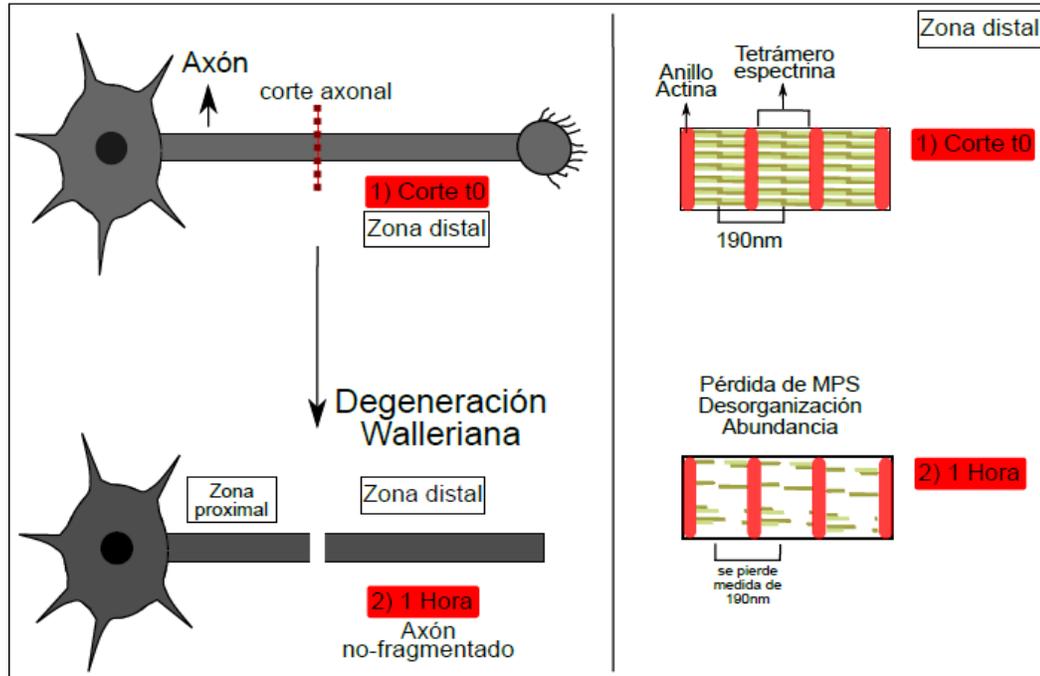


Fig. 3: Esquema que representa la Degeneración Walleriana: 1) representa el t0 momento del corte de los axones. 2) representa 1 hora después de realizado el corte, se indica que los axones distales no están fragmentados a ese tiempo pero si existe una pérdida estructural del MPS.

En base a estas observaciones, nos propusimos analizar en una población axonal heterogénea, donde la fragmentación axonal está dando comienzo (a 3 horas de DW), la organización y estructural del MPS. Evidenciamos que axones que no estaban fragmentados presentaban una mayor cantidad de MPS (abundancia) por segmento axonal en comparación con los que ya estaban fragmentados. Interesantemente, la organización de los MPS mostró el resultado inverso, pequeños segmentos fragmentados, pero que no eran aun debri axonal, presentaban un mayor ordenamiento en sus MPS.

Estas observaciones, sugieren que la presencia ordenada de estas estructuras en pequeños segmentos axonales, podría mantenerlos para no llegar a la destrucción total, y apoyan la hipótesis del rol del MPS en la mantención de integridad axonal, en consonancia con los resultados que obtuvimos en el modelo de degeneración del desarrollo.

3. El tratamiento farmacológico que protege la fragmentación axonal protege la pérdida temprana de MPS.

Trabajos previos han demostrado que durante la degeneración axonal Walleriana se da un decaimiento de NAD⁺ (*del inglés*: Nicotinamide Adenine Dinucleotide) en los axones en procesos de fragmentación (Akary y col., 2004). Es sabido, que esta molécula está vinculada en la protección de axones sensoriales, previniendo su fragmentación en modelos de DW *in vitro* (Coleman y col., 2005; Unsain y col., 2013; Calliari y col., 2014). Bajo este contexto, realizamos un tratamiento con NAD⁺ a cultivos DRG que llevaban 1 hora de DW, tiempo donde evidenciamos que los MPS comienzan a modificar su organización y decaen en su abundancia.

Evidenciamos que 1 hora de tratamiento con NAD⁺ (DW+NAD⁺) causa una prevención de la pérdida de MPS y su ordenamiento estructural, en comparación con los que no habían recibido este tratamiento (DW). Lo interesante de estos resultados es que, si los asociamos con resultados ya publicados, que demuestran que NAD⁺ exógeno contrarresta la pérdida de NAD⁺ endógeno provocada por la actividad de SARM1 durante la DA, lo que estaría protegiendo la fragmentación de los axones (Sasaki y col., 2016). Más aun, SARM1 es postulada como posible activador de vías pro-degenerativas tempranas durante la degeneración axonal (Osterloh y col., 2012; Simon y Watkins. 2018).

Por otra parte, las vías directas de intervención de SARM1 no están del todo claras hasta la fecha. Una de las postuladas es la vía *DLK>JNK* (pro-degenerativa), la cual puede ser activada por la desestabilización farmacológica del citoesqueleto de actina en neuronas sensoriales (Valakh et al. 2015). Pero resultados recientes, demostraron que la activación SARM1 es importante en la degeneración axonal distal. Sin embargo, la eliminación genética de esta proteína no previene la actividad somal de la vía *DLK>JNK*, ni la apoptosis neuronal, lo que sugiere que SARM1 es importante para los procesos de DA pero no para la activación de la vía *DLK>JNK*, que podría ser activada por otra vía de señalización de SARM1 no identificada aun (Fernandes y col., 2018).

En su conjunto, nuestros resultados más los datos bibliográficos publicados, dejan la pregunta abierta de cuáles son los intermediarios entre vías de activación de la DW (fragmentación axonal) y las disrupción del citoesqueleto axonal temprana.

4. La disrupción de MPS por el tratamiento con Latrunculina-B acelera la pérdida de axones en la DW.

Los resultados discutidos en la sección anterior deja indicios claros del rol de lo MPS en la mantención de la integridad axonal durante la degeneración. Estos hallazgos son relevantes ya que antes no existían evidencias bibliográficas del rol del MPS en procesos de degeneración en general.

En esta sección, discutimos los resultados obtenidos cuando a cultivos DRG se les realizó un tratamiento con una droga que desestabiliza la actina (Latrunculina-B), capturando los monómeros de G-actina (Allingham y col., 2006).

Latrunculina tiene un efecto en los monómeros de actina, los cuales son importantes para la nucleación y posterior elongación de filamentos de actina (Allingham y col., 2006). Estudios en mosca demostraron que el silenciamiento de nucleadores de actina disminuye la abundancia de los MPS (Qu y col., 2017).

Nuestros resultados con el tratamiento con Latrunculina en axones sensoriales demuestran una baja *per-se* en la organización y abundancia de los MPS como ya había sido reportado (Xu y col., 2013; Zhong y col., 2014). Lo interesante, es que nuestros resultados *in vitro* evidenciaron que una disrupción farmacológica de los mismos tiene un efecto en la mantención axonal durante la DW temprana. Cabe destacar que tanto en nuestros experimentos como en trabajos previos no se evidencia fragmentación axonal por drogas que desarman el MPS en condiciones basales (Zhong y col., 2014; Valakh y col., 2015; Qu y col., 2017; Unsain y col., 2018b). Lo que sigue fortaleciendo la idea del rol específico que puede cumplir el MPS en la integridad axonal en contextos de degeneración.

Además, los estudios con tratamientos agudos con Latrunculina B resaltan la importancia de la nucleación de los filamentos cortos de actina para la integridad del MPS, idea que ya había sido propuesta por ensayos de pérdida de función en *D melanogaster* por otros (Qu y col., 2017).

Por último, los resultados obtenidos durante esta tesis y la reciente publicación de Wang y colaboradores (Wang et al., 2019) esclarecen que el efecto inicial de la degeneración axonal es un cambio estructural de los MPS. Nuestros resultados postulan un nuevo rol de los MPS y sus componentes, que puede ser clave para el avance de la degeneración axonal en general, ya que sus cambios nano-estructurales tempranos y efectos en la dinámica de los anillos de actina podrían desencadenar y acelerar la pérdida axonal.

Conclusión general

Utilizando el modelo de *Privación de NGF* en cultivos de neuronas sensoriales, evidenciamos por primera vez que la degeneración causa un impacto en el citoesqueleto actina de axones y conos de crecimiento. Por otra parte, aportamos al conocimiento del rol que cumplen las estructuras periódicas del citoesqueleto cortical (MPS) en axones, a los cuales la privación de factor trófico les causó una desorganización y caída de abundancia temprana. Este cambio estructural precede la fragmentación axonal y tratamientos con drogas que estabilizaron la actina revirtió la pérdida de MPS y la fragmentación de los axones, lo que confirmó la importancia de estas estructuras para la mantención de la integridad axonal durante el avance de la degeneración.

En el presente trabajo logramos poner a punto la técnica de Microscopía de Expansión Cuantitativa, la cual nunca había sido utilizada como método cuantitativo desde su aparición. Con la misma, evidenciamos y cuantificamos por primera vez MPS axonales, en condiciones basales y en procesos de *Degeneración Walleriana* (DW). Mostramos que ocurren cambios tempranos estructurales en los MPS durante la DW ocurrida en axones distales. Además, estos cambios parecieron ser clave en la pérdida de la mantención de los axones y para que la fragmentación de los mismos comience. Esta última hipótesis, fue confirmada realizando un tratamiento farmacológico que causa la pérdida de MPS, lo cual provocó la pérdida más rápida de axones durante la DW.

En conclusión, el presente trabajo de tesis aportó novedosos datos sobre el impacto que causa la degeneración en la estructura del citoesqueleto de actina axonal en dos modelos de degeneración, evidencias que no habían sido reportadas anteriormente. Sumado a esto, introduce un nuevo rol de los MPS en el proceso de degeneración y fragmentación en axones. En su conjunto, demuestran el impacto de un cambio estructural del citoesqueleto de actina en la mantención de la integridad axonal durante la degeneración.

Perspectivas

En un futuro, sería interesante indagar cuáles son los posibles intermediarios entre mecanismos de degeneración y estos cambios estructurales de la actina y componentes asociados. Por ejemplo, regulación de vías de control de dinámica de actina y, posibles mecanismos de activación de la degeneración y apoptosis neuronal.

Para seguir adelante con esta línea de investigación, sería necesario realizar experimentos de manipulaciones moleculares en vías pro-degenerativas caracterizadas por *DLK*, *JNK* y *SARM1* y su vinculación con los cambios estructurales de MPS durante la *Degeneración Walleriana*. Por otra parte, sería interesante abordar experimentalmente la relación entre inductores de los cambios estructurales de actina (Rho-GTPasas y en cofilina) en la degeneración (*PNGF* o *DW*) con las vías pro-degenerativas antes mencionadas. Encontrar estos intermediarios entre ambos fenómenos sería de gran relevancia por aportar un nuevo grupo de posibles blancos terapéuticos para enfermedades neurodegenerativas.

Por último, estudiar cómo se produce la formación y desarrollo de los MPS en condiciones basales de neuronas sensoriales *in vitro* en diferentes tiempos del desarrollo, aportarían al conocimiento básico de cómo estas estructuras esenciales para la integridad axonal en la degeneración se desarrollan basalmente en las neuronas. Realizar una curva espacio-temporal durante el desarrollo y extensión axonal aportaría información importante sobre la función que tienen los MPS en el desarrollo neuronal, extensión y guiado de los axones durante el desarrollo. Así mismo, estas observaciones permitirían elaborar hipótesis testeables sobre el mecanismo de mantención y desarmado de estas estructuras en condiciones basales o patológicas.

Capítulo. 6

Materiales y Métodos

1. Animales

Se utilizaron ratones de la sepa C57Bl/6 para cultivos de Ganglio de la Raíz Dorsal (DRG) proporcionados por el Bioterio de animales libres de patógenos específicos instalado en el Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra (IMMF). Todos los procedimientos que involucran animales fueron aprobados por el CICUAL (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales NIMEC-CONICET). Departamento Nacional de Cuidado y Salud Animal (SENASA, Argentina) y cumplieron con las pautas generales del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH, E.E.U.U.). Se realizaron esfuerzos por minimizar el número de animales usados así como el número de manipulaciones.

2. Cultivos

Explantos de neuronas sensoriales DRG (*del inglés: Dorsal Root Ganglion*).

Los explantos de DRG se diseccionaron a partir de embriones de ratón de edad gestacional 13,5 (E13,5) bajo mesa de flujo laminar vertical, en Buffer HBSS-Hank's 1x estéril (Thermo Fisher Gibco, #14185-052) con pinzas esterilizadas. Los explantos fueron cultivados en cubre-objetos de 12 mm recubiertos secuencialmente con 2% del polímero de etilenimina (PEI) (Sigma-Aldrich), laminina (10 mg/ml, Sigma) y colágeno (0,1 mg/ml, Thermo Fisher Gibco). Se utilizó como medio de cultivo Neurobasal (Thermo Fisher Gibco; Cat Number: 21103049) suplementado con 2% B-27 (Thermo Fisher Gibco; Cat Number: A3582801), 1% L-glutamina (Wisent) o Glutamax (Thermo Fisher Gibco; Cat Number: A1286001), 1% penicilina/estreptomicina (Thermo Fisher Gibco; Cat Number: 15140122). Dichos cultivos se dejaron crecer durante 72 horas en presencia de Factor de Crecimiento Nervioso NGF (50ng/ml, Harlan); ([Unsain y col., 2013](#); [Unsain y col., 2014](#), [video Jove](#)).

Línea celular NIH-3T3.

Los cultivos de fibroblastos (*Línea celular NIH-3T3*) se mantuvieron en Medio Esencial Mínimo (MEM, Thermo Fisher Gibco; Número de Gato: 61100-061) suplementado con Suero Fetal Bovino al 10% (Thermo Fisher Gibco; Número de Gato: 16050122) y 1% penicilina/estreptomicina (Thermo Fisher Gibco; Cat Number: 15140122). Las células se sembraron en cubreobjetos circulares de 12 mm y fueron fijadas cuando se encontraban en el 80% de confluencia.

3. Modelo de Degeneración axonal en el Desarrollo: *Privación de NGF*

Para emular la degeneración axonal que ocurre durante el desarrollo del sistema nervioso, utilizamos el modelo de degeneración axonal por privación de *NGF* (*PNGF*). La utilización de este modelo es posible ya que las neuronas de explantos DRG son capaces de responder a la falta de este factor de crecimiento ([Unsain y col., 2013](#)). Para ello, a las 72 horas (3 DIV) de sembrado el cultivo se realiza un cambio de medio, suplementado con *NGF* al grupo control, mientras que al grupo que será

expuesto a la privación de *NGF*, se le colocó un medio desprovisto del mismo y suplementado con anticuerpo anti-*NGF* Rab1 (1mg/ml; Abcam), para captura *NGF* que pueden sintetizar basalmente estas neuronas, de este modo aseguramos que no existe presencia de *NGF* en el medio donde se está dando la degeneración axonal por privación. Los tiempos de privación fueron: 3, 12, 18 y 24 horas (**Fig. 1**)

Modelo de Privación de NGF

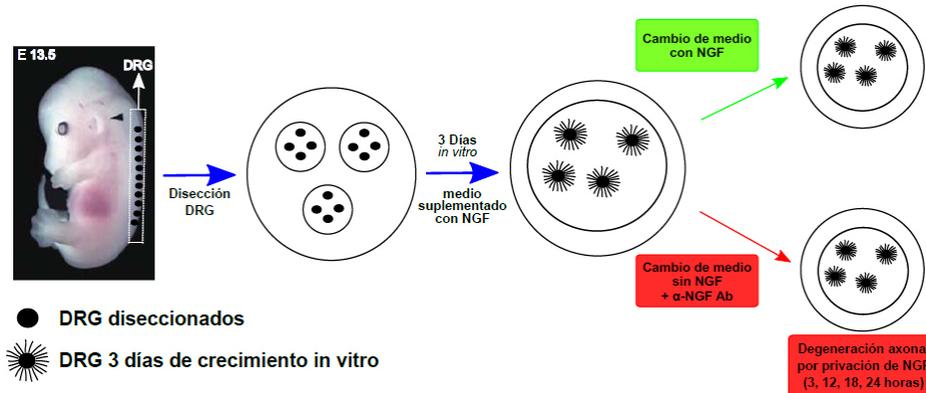


Fig. 1: Esquema representativo del modelo de Degeneración axonal por Privación de NGF en ganglios DRG.

4. Modelo de Degeneración Walleriana: Axotomía (corte de axones)

Los cortes fueron realizados en axones de DRG que llevaban 3DIV de crecimiento. El corte a los mismos se realizó con una hoja de bisturí estéril bajo una mesa de flujo laminar horizontal y posteriormente se observaron los explanto por contraste de fase verificando de esta forma que los axones cortados se encontraran totalmente separados de su cuerpo neuronal, para valorar en la zona distal de estos (separados del soma) la Degeneración Walleriana. La zona contralateral (no-cortados) se utilizó como zona control (Unsain y col., 2013; Unsain y col., 2014, *video Jove*) (**Fig. 2**). Lo interesante, de este modelo es que todos los axones distales (cortados) sufren el proceso de fragmentación axonal en simultáneo y algunas de las vías moleculares activadas en este fenómeno también han sido identificadas en otros procesos de degeneración axonal (degeneración en el desarrollo o alguna patologías).

Modelo de Axotomía (Degeneración Walleriana)

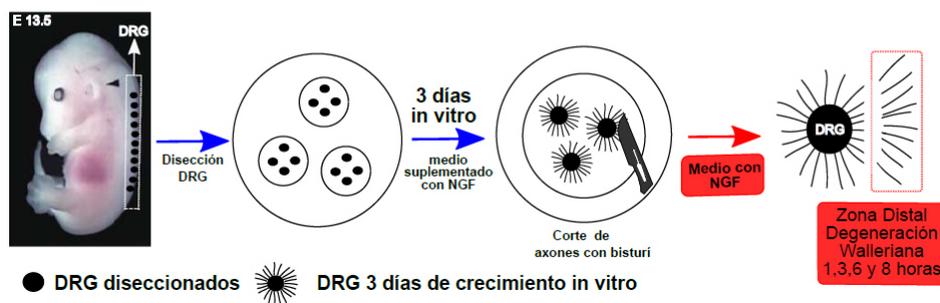


Fig. 2: Esquema representativo del modelo de axotomía (corte de axones) Degeneración Walleriana en ganglios DRG.

5. Tratamientos

Para evaluar el rol del citoesqueleto axonal de actina durante la degeneración se utilizaron diferentes drogas que causan efecto en la estabilidad del citoesqueleto de actina las concentraciones utilizadas fueron tomadas basándonos en datos bibliográficos. (Cuadro. 1). Los tratamientos con Curcubitacina-E fueron agudos de 3 horas en cada experimento. Para el tratamiento con Latrunculina B, el tiempo utilizado fue de 2 horas.

Cuadro 1: Drogas y concentraciones utilizadas

Citoesqueleto	Estabilidad del Polímero	Droga	Mecanismo de Acción	Concentración utilizada
Actina	↑	Curcubitacina-E	Se une a F-actina y previene su depolimerización	[5 nM]
Actina	↓	Latrunculina-B	Secuestra la G-actina y previene el ensamblaje de la F-actina	[20 μM]

Fuente: Zhuang 2013; Zhong y col., 2014.

Respecto al tratamiento con NAD⁺ (Sigma-Aldrich), se utilizó una concentración de 5mM (Unsain y col., 2013), durante 1hora.

6. Inmunocitoquímica

Los explantos de DRG fueron fijados con Paraformaldehído-Sucrosa (Sigma-Aldrich) al 4% en PBS 1x, pH=7,4 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se permeabilizó con PBS-Tritón 0,2% durante 5 minutos y se realizaron dos tiempos de 5 minutos de bloqueo con PBS-Teewn al 0,1%. Los anticuerpos primarios fueron incubados 1 hora a temperatura ambiente (TA) o *overnight* (o.n) a 4°C para los ensayos de Microscopía de Expansión (ExM). Los anticuerpos secundarios se incubaron 1 hora a TA, excepto para los ensayos de ExM que se incubaron durante 2 horas. Cada vidrio fue montado con Mowiol (2.4%, poly-vinyl-alcohol, Sigma), y guardados a 4°C protegidos de la luz hasta ser observados al microscopio.

Preparaciones de microtúbulos: a explantos DRG se les realizó una extracción de componentes del citoesqueleto solubles con detergente durante el proceso de fijación, este procedimiento lo llamamos fijación-extracción, y utilizamos un protocolo de preparación ya descrito (Witte y col., 2008). La fijación se realizó con una solución: 60mM PIPES, 25mM HEPES, 5mM EGTA, 1mM MgCl (pH 6,9), glutaraldehído (0,25%), paraformaldehído-sacarosa (3.7%) y Tritón X-100 al 0.1% durante 20 minutos a T.A.

Anticuerpos primarios: para la marcación de Microtúbulos se utilizaron anticuerpos anti-tubulina-tirosinada, (Abcam-clone YL1/2, cat#ab6160), anti-glu-tubulina (Dr Gregg G. Gundersen, Columbia University Medical Center, US), anti-alfa-tubulina (clon DM1A, Sigma) en diluciones de (1:1000; 1:500) para microscopía confocal y para ExM (1:200). Para evidenciar las proteínas de citoesqueleto cortical se utilizó anti-βII-espectrina de unión al N-terminal del tetrámero (mono-clonal, BD Biosciences, US, cat#612563) para microscopía confocal (1:500) y para microscopía ExM y STED se utilizó una dilución 1:100.

Anticuerpos secundarios: para microscopía confocal y ExM se utilizaron AlexaFluo 488 y 568 en una dilución de 1:500 o 1:1000 (confocal) y 1:100 (βII-espectrina) o 1:200 (tubulina) para ExM. Para los ensayos de STED se utilizó Atto 647 a una dilución 1:100. Los filamentos de actina se evidenciaron marcándolos con Faloidina-Rodamina (1:1500) (Invitrogen).

7. Microscopías

Microscopía de súper-resolución STED (del inglés: Stimulated Emission Depletion Nanoscopy).

Desde el año 2016 nuestro Laboratorio ha establecido una colaboración con el Laboratorio CiBion del Polo Científico de Buenos Aires, dirigido por el Dr. Fernando Stefani. Dicho Laboratorio cuenta con un equipo STED (*Stimulated Emission Depletion Nanoscopy*) el cual fue construido por un grupo de científicos multidisciplinarios (Físico, químicos, etc). Lo a resaltar de esta colaboración es que nos ha permitido caracterizar las recientes estructuras periódicas de 190nm del citoesqueleto cortical de axones de actina/espectrina, MPS (*siglas del inglés*) en modelos de Degeneración axonal. Como se mencionó anteriormente estas estructuras presentan un periodo característico que está por debajo del límite de resolución, lo cual hizo que el surgimiento de la tecnologías de microscopía de super-resolución fueran de gran importancia para el hallazgo de MPS en axones neuronales (Xu y col, 2013). Por ende, esta colaboración ha sido de gran importancia para gran parte el primer objetivo de esta tesis.

Para la toma de imágenes se utilizó un láser pulsado linealmente polarizado (1ns) a 775nm (Onefive Katana HP), el mismo fue acoplado en una polarización que mantiene la fibra en monomodo (PMF3; Thorlabs P3-630PM-FC-5) utilizando un colimador de fibra (L3; Schäffer und Kirchoff 60FC-4-A11-02). De esta forma se colimó la luz STED de salida de la fibra (L6; $f = 30$ mm) y se envía a través de una placa de fase $0-2\pi$ (VPP; RPC Photonics VPP-1a). La polarización circular fue ajustada utilizando una placa de cuarto de onda de banda ancha (690 nm-1200 nm) ($\lambda/4$; Thorlabs AQWP05M-980) y una banda ancha (690nm–1200nm) placa de media onda ($\lambda/2$; ThorlabsAHWP05M-980). Los haces de excitación se combinaron utilizando un espejo dicroico de paso largo (D1; Chroma ZT594RDC), filtro de muesca a 22 grados (NFE; Semrock NF03-658-25) y espejo dicroico de paso corto de 5mm (D2; Chroma Z780sprdc) respectivamente. La exploración de haz lateral se realizó mediante un sistema compuesto por un galvanómetro casero.

El escaneo se realizó con una lente de escaneo (SL; Leica) y una lente de tubo (TL; Leica). Para control posicional adicional y enfoque fino, la muestra se montó en una etapa de posicionamiento nano pieza-eléctrico XYZ (Thorlabs NanoMax MAX311D / M). La luz se enfocó al límite de difracción con un objetivo de 1.4 NA (O; Leica HCX PL APO 100x / 1.40-0.70 aceite CS). La alineación correcta de los tres haces se realizó midiendo la dispersión de nanopartículas de oro de 40nm. Divisor de haz de la película montado magnéticamente recubierto para 400 nm–700 nm, 45:55 (R: T) (mP; Thorlabs BP145B1). Dispersión de la luz dirigida a un tubo fotomultiplicador de banda ancha (280 nm-850 nm) (PMT; Thorlabs PMM02). La longitud de onda STED se rechazó de la ruta de detección utilizando un filtro de muesca (NFF; Semrock NF03-785-25), fluorescencia se dividió en dos canales utilizando un espejo dicroico de paso largo (DF; Chroma ZT647RDC) y luz para cada canal se seleccionó utilizando filtros de paso de banda (FF1; Semrock FF01-623 / 24-25 y FF2; Semrock FF01-676 / 37-25). Luego se acopló la luz (L8 y L9; $f = 50$ mm) en una fibra multimodo de NA de 25 μ m, 0.1 (MMF1 y MMF2; Thorlabs M67L01) del detector

confocal (APD1 y AP2; MPD PD-050-CTC-FC). Tiempo de puerta de Los fotones de fluorescencia se realizaron utilizando una tarjeta electrónica hecha a medida (MPI para química biofísica).

Microscopía de Super-resolución: STED Quad Scan. Las imágenes STED de la **figura 5 del capítulo 3**, fueron tomadas por *STED Quad Scan (Abberior Instruments, Germany)*, el cual se encuentra en el centro de Microscopía “Neuro Microscopy Imaging Center”, Instituto de Neurología de Montreal, Universidad de McGill. El mismo fue instalado en un microscopio invertido Olympus IX 83 presente en la institución. Las imágenes fueron tomadas en un solo plano (2D) con una excitación de láser de 635nm y la depleción fue realizada con una excitación de 775nm, ambas con una apertura del “*pinhole*” de 1 Ayri Unit.

Microscopía de Expansión (ExM)

En el año 2015, surge la técnica de Microscopía de Expansión (ExM; [Chen y col., 2015](#)). La misma consiste en incluir en una red polimérica (hidro-gel), una muestra inmunomarcada, gel-muestra-fluoroforo, la cual pasa por un proceso de degradación enzimática leve de proteínas para que no haya impedimentos a la hora de realizar la expansión física de proteínas y flouoroforos por diálisis continuas de agua, de tal forma que el límite de difracción óptica se puede separar isotrópicamente y resolver ópticamente, ganando una resolución aproximadamente de 70nm. Lo interesante es que esa ganancia de resolución se puede obtener en cualquier microscopio de flouescencia convencional. Desde el año 2017 nuestro Laboratorio se focalizo en esta técnica y logro poner a punto la observación y cuantificación de MPS (Objetivo Especifico #2) así como poder avanzar en el estudio del efecto de la Degeneración axonal en los mismos (Objetivo Especifico #3). A continuación se detalla los pasos y reactivos utilizados para esta técnica.

1. Retención de proteínas (*del inglés: Anchory*):

A las muestras ya fijadas e inmunomarcadas (en nuestro caso con anticuerpo primario anti- β II-espectrina y un anticuerpo secundario AF488). Se le realizo un “crosslinking” a sus proteínas para realizar el anclaje o retención de las mismas en el hidro-gel donde fueron incluidas posteriormente. En nuestro caso, incubamos con 50 μ l de Glutaraldeído al 0,25% en PBS 1x (cada vidrio de 12mm) durante 10 minutos. Basándonos en el protocolo publicado por ([Chozinski y col., 2016](#)). Posteriormente se realizó un lavado de 10 minutos con PBS 1x (**Fig. 4 box 2**).

2. Inclusión y polimerización de las muestras en el hidro-gel:

El hidro-gel fue preparado con una solución monomérica compuesta por Acrilato de Sodio (8,6gr/ml) (Sigma), Acrilamida 2,5 (gr/ml) (Sigma), N,N'-Methylenebisacrylamide (0,15 gr/ml) (Sigma), Cloruro de Sodio (11,7 gr/ml), PBS 10x (Gibco) y agua bi-destilada. Posteriormente para realizar la reacción de gelificación se agregó el acelerador de tetrametiletilendiamina (TEMED, Bio-Rad) y el activador de reacción Persulfato de Amonio (APS), ambos diluidos en agua bi-destilada al

0.2%; (**Tablas 1.1-2**), todos los pasos fueron realizados manteniendo la mezcla de la solución monómerica en hielo hasta el momento de incluir la muestra (**Fig. 4 box 3**).

De la solución resultante se colocaron 35 μ l (por pocillo) lo que están realizados en una placa de silicona con una medida conocida (5 mm), a esa solución monómerica se le apoyó el vidrio, contactando directamente la muestra con la solución, luego de apoyar el vidrio se realizó una leve presión (haciendo un efecto de adherencia vidrio-gel para que no circule aire) este paso es importante para lograr una buena gelificación. El gel-muestra se los dejo gelificar durante 1 hora a temperatura ambiente cubiertos de la luz (**Fig. 3**).



3.

Fig. 3: Imágenes de los pasos de inclusión-gelificación de las células

Digestión:

Para que la muestra se pueda expandir junto con el hidro-gel es necesario realizarle una leve digestión con Proteinasa-K (Invitrogen). Este paso es necesario para poder “romper” posibles acúmulos de proteínas que podrían causar un impedimento a la hora de expandirla isométricamente. El tiempo justo entre el equilibrio de digerir proteínas pero con el compromiso de no digerir y despegar el anticuerpo que tienen el fluoróforo fue el de una incubación “*over night*” en cámara húmeda a TA. La proteinasa-K se usó a 8 unidades/mL en Buffer de digestión (Tris pH 8,50 mM, Bio-Pak), EDTA (1 mM, Invitrogen,#15576/028), 0,5% Tritón X-100 (Bio-Rad) y 0,8 M Guadine HCl (Sigma) (**Tabla 1.3**). La incubación se realizó sin despegar el vidrio del

gel, cada vidrio de 12 mm fue colocado en pocillos de 24 Well, con 350 μ l de la solución Proteinasa-K + Buffer de Digestión (**Fig. 4 box 4**).

4. Expansión (diálisis del hidro-gel):

Para realizar la expansión del gel se realizaron diálisis con agua destilada de 3 tiempos de 2 horas dentro de pocillos de placas de petri de 12Well. Finalizado este periodo los geles fueron guardados en agua a 4°C protegidos de la luz hasta ser observados al Microscopio (**Fig.4 box 5**).

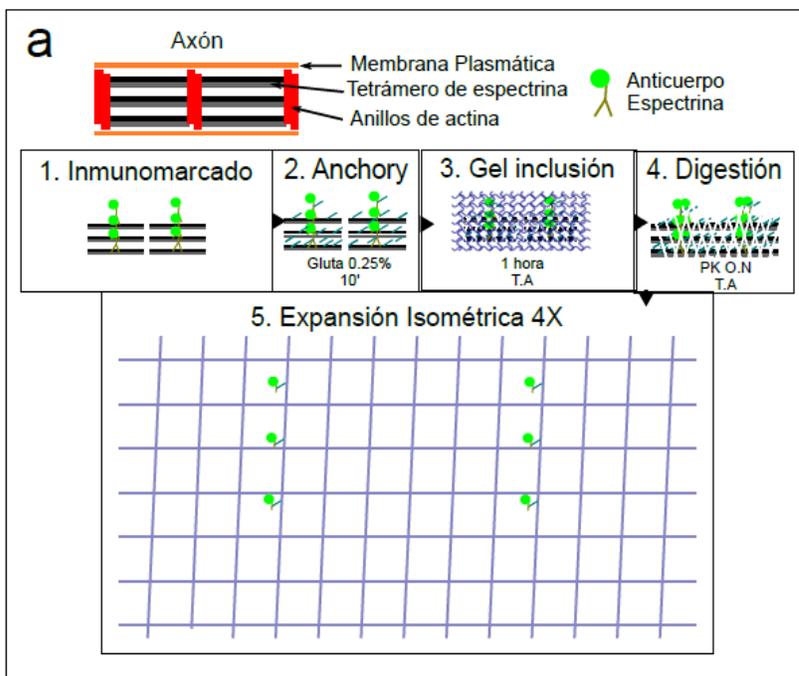


Fig. 4: Esquema representativo de la técnica Microscopia de Expansión (ExM): 1) Muestra inmunomarcada. 2) "Crosslinking" de proteínas. 3) Inclusión de la muestra en el gel. 4) digestión. 5) Expansión isométrica de gel-muestra.

5. Coeficiente de Expansión Gel:

Luego de obtener un gel isométricamente expandido para poder realizar una cuantificación de las imágenes tomadas con esta técnica, se debe calcular el coeficiente de expansión el cual se utilizara para calibrar las mismas. Para ello, basándonos en la bibliografía (Ku y col., 2016). Como primera aproximación en cada experimento tomamos una foto del gel expandido con una regla de referencia, luego con el programa ImageJ-Fiji mediante una línea segmentada tomamos por lo menos diez medidas diferentes de 10mm de la regla. Posteriormente, la imagen del gel expandido fue medida con un cuadrado, con la precaución de tomar la totalidad del gel, se midió al menos diez radios del mismo, para tomar cada medida se giró la imagen 15° (sentido horario). Luego se promedió cada dato (medidas de la regla y gel), para obtener la relación de medida del gel en mm, eso se dividió por 5mm (medida ya conocida del gel Pre-Expansión), de este modo el número resultante es el coeficiente de expansión que llamamos Gel-Block (**Fig. 5**).

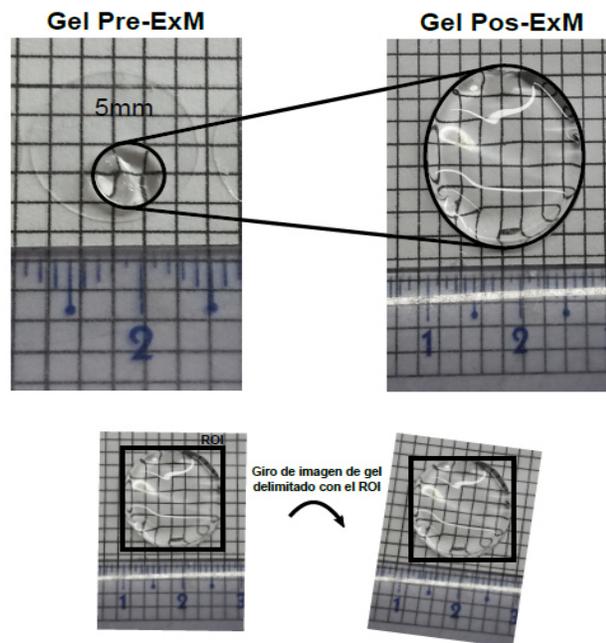


Fig. 5: Imágenes del Gel pre y pos-expansión: Nótese, la rotación de la imagen delimitada por el ROI con el cual se tomaban las medidas del gel expandido.

6. Coeficiente de Expansión Proteico:

Cuando realizamos las mediciones de los periodos de imágenes expandidas utilizando el coeficiente de expansión descrito en la sección anterior (Coeficiente Gel-Block), notamos que la periodicidad daba más de 200nm (~240nm) mayor que la que se ha evidenciado por microscopía de super-resolución (190nm) ([ver resultados capítulo 3](#)). Esto nos llevó a pensar que quizás la expansión proteica incluida en el gel no era la misma que el Gel macro. Para abordar esta pregunta, realizamos el siguiente procedimiento experimental, calculamos el coeficiente de expansión de proteínas de la siguiente forma: tomamos como referencia el tamaño de una estructura celular conocida, como por ejemplo el núcleo celular (en nuestro caso núcleos de fibroblastos).

A cultivos de fibroblastos (*Línea celular NIH-3T3*) se les realizó un inmunocitoquímica para evidenciar tubulina total (anticuerpo primario α 3A1-tubulina) marcando así la red microtubular que rodea el núcleo celular, al contorno nuclear evidenciado se les midió el diámetro más largo pre y pos-expansión (utilizando ImageJ-Fiji), cada medida fue promediada y se realizó una relación de los promedios pre y pos expansión de esta forma se obtuvo el coeficiente de expansión, el cual lo llamamos coeficiente de Expansión Proteico (Coef. Proteico). (**Fig. 6**).

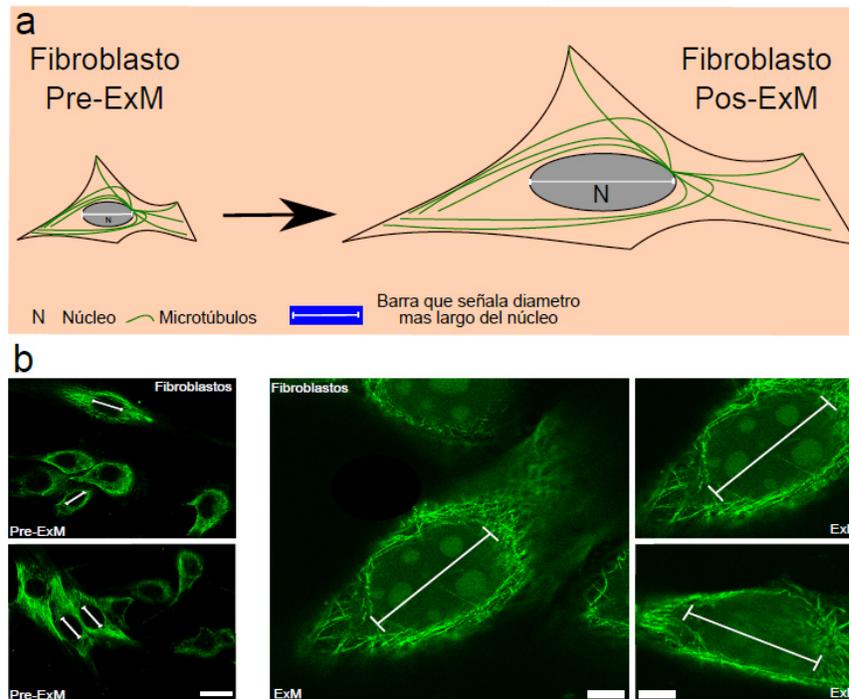


Fig. 6: a) esquema que representa Fibroblastos y sud red Microtubular pre y pos-expansión. b) Imágenes confocales de Fibroblasto (pre y pos-expansión), línea blanca determina el radio más largo del núcleo celular. Las imágenes confocales de Fibroblastos fueron tomadas por *la Biol. Guadalupe Gazal*, Laboratorio Unsain. Escala de barra Pre-ExM 20 μ m; pos-ExM 5 μ m.

8. Cuantificación de fragmentación axonal y conos de crecimiento

Cuantificación de la Degeneración Axonal:

Como indicador del proceso de la degeneración axonal se cuantifico el área axonal de explantos DRG, los cuales estaban marcados para revelar tubulina total (α 3A1-tubulina). Para cada muestra se tomaron imágenes a “ciegas” (muestreo aleatorio sistemático), 3-4 imágenes por explanto, a 400 μ m del centro del mismo, y se recolectaron al menos 20 imágenes por tratamiento. Utilizando el software ImageJ-Fiji, el área axonal se determinó por el número total de píxeles detectados después de la binarización de la imagen mediante la función “Threshold”. Para estimar el área ocupada por los píxeles de axones no fragmentados, axones fragmentados y “debrí” estos últimos fueron excluidos por tamaño (definidos como partículas pequeñas utilizando la función “Particle Analyzer” de ImageJ). Se evaluaron al menos dos cubreobjetos para cada condición, siendo el *n* experimental tres cultivos. Para los experimentos de DW, se cuantifico el área ocupada por axones intactos (no cortados) con el mismo criterio antes descrito y; para los axones cortados se tomaron imágenes de los mismos y se cuantifico el área axonal de la zonas distales (**ver Figura 2**). Para ambos análisis se utilizó un objetivo 20x del Microscopio Confocal FV800 que se encuentra en la plataforma de Microscopías del IMMF.

Análisis del colapso de los conos de crecimiento:

Con el fin de cuantificar los cambios provocados por la Degeneración Axonal en los conos de crecimiento (CCs), se tiñeron los explantos DRG con doble tinción para revelar Tubulina y F-actina. La cuantificación fue cualitativa, directamente en el microscopio siguiendo el siguiente procedimiento **(a)** utilizando el canal verde (Fluorescencia de la Tubulina marcada con Alexa 488), en una observación a ciegas se eligió un campo que presentaba, por lo menos, más de dos tips (extremo de los axones); **(b)** luego de escoger la zona se cambió al canal rojo (Fluorescencia de la F-Actina marcada con Faloidina-Rodamina) y se contabilizaron cuántos de esos tips presentaban estructura tipos: lamelas, filopodiales o no presentaban marcación de F-actina, siendo estos últimos los tomados como conos no sanos (colapsados) **(Fig. 7)**. Al igual que el análisis anterior utilizamos un objetivo 20x del Microscopio Confocal FV800 que se encuentra en la plataforma de Microscopías del IMMF.

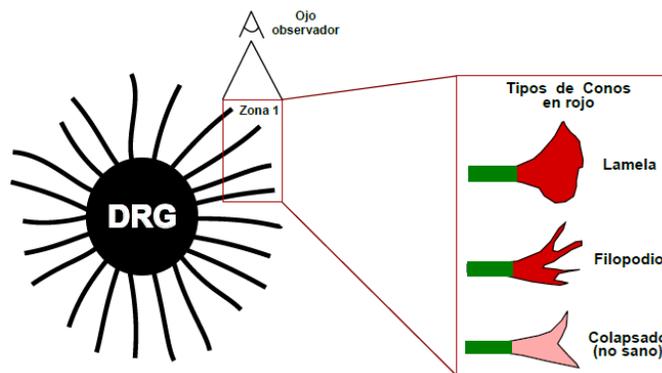


Fig.7: Esquema representativo de las diferentes morfologías de los CCs de cuantificados bajo microscopio.

9. Análisis de abundancia y organización de MPS utilizando Software Gollum.

Para la evaluación cuantitativa de la organización y abundancia de MPS utilizamos el programa computacional que fue elaborado por nuestros colaboradores del Laboratorio CiBion de Buenos Aires (Barabas y col., 2017). Dicho programa fue diseñado para scanear las imágenes con una cuadrilla de $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$, cada cuadrado es correlacionado con un pico Gaussiano separados 190nm (la medida de periodicidad de los MPS descrita en la bibliografía) cada valor de correlación indica cuanto si se conservan en cada tramo los MPS. Este algoritmo es efectivo midiendo correlaciones tanto en tinciones de F-Faloidina como β II-espectrina. El conjunto de software *Gollum* está escrito en Python 3 con Qt como interfaz gráfica de usuario (GUI) Marco, haciéndolo multiplataforma. El código fuente, de los programas ejecutables de Python con interfaces gráficas de usuario, y la documentación detallada se mantiene en un repositorio público en <https://github.com/cibion-conicet/Gollum>. **(Fig. 8)**.

Para el análisis cuantitativo de correlación primero determinamos un Threshold, siendo el mismo el número de correlación que observábamos MPS, los valores tomados por encima del Threshold seleccionado (para cada experimento) fueron las medidas tomadas como MPS. Para la evaluación de la abundancia de MPS en cada imagen STED y/o de ExM se dividió en cuadrantes de $1\mu\text{m}\times 1\mu\text{m}$. Cada una de esas sub-áreas fue decidida visualmente bajo el criterio si el segmento presentaba o no periodicidad (teñidos contra βII -espectrina) luego se calculó la abundancia de MPS como porcentaje de segmentos con MPS (por encima de valor *Threshold* designado) sobre el número total de segmentos con marca de βII -espectrina en el axón.

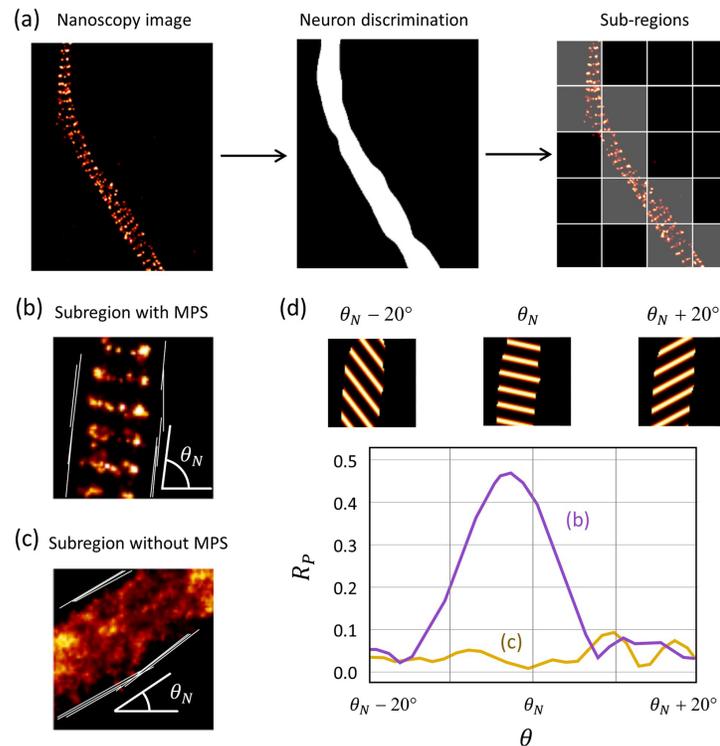


Fig. 8: Figura tomada del trabajo publicado en *Scientific Reports*: **a)** imagen de axón tomada por nanoscopía se evidencia los MPS. Se muestra la discriminación de área del axón y los cuadrantes de $1\mu\text{m}\times 1\mu\text{m}$. **b)** las sub-areas con MPS y los diferentes ángulos que el software Gollum correlaciona si existen MPS o no. **c)** muestra una sub-área sin MPS. Imagen tomada de *Federico M. Barabas y col., 2017*.

10. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos en el Objetivo #1 se presentaron como media \pm SEM. La prueba t de Student (dos colas) se utilizó para experimentos grupales de dos, mientras que ANOVA de una vía para más de dos comparaciones, seguido por Tukey. Comparaciones post hoc, a menos que se indique lo contrario en las leyendas de las figuras. Los asteriscos denotan valores de $p < 0.05$. En graficas de barras con más de dos condiciones, las líneas superiores indican si la comparación de pares indicada entre los conectados. Las barras son significativas ($*p < 0.05$) o no

significativas (n.s.). Cuando los supuestos para una prueba t no se cumplieron. Se usó la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica.

Los estudios de los objetivos #2 y 4 se analizaron con el programa GraphPad Prism4. Para comparaciones de dos grupos se utilizó Mann Whitney (t-test, Mann-Whitney; Medianas $p < 0.05$). Para comparaciones de más de dos grupos se utilizó Tukey's Multiple Comparison Test se tomaron como significativos los valores de ($p < 0.05$). Para la correlación de $MPS \geq 0,1$ (*Threshold*), t-tets, varianza $p < 0.0001$.

11. Procesamiento de imágenes de ExM.

Procesamiento de imágenes de ExM para cuantificar:

Parte de las imágenes de las muestras expandidas fueron tomadas con un objetivo 100x (medio de sumersión Oil, AN:1.49) en el microscopio invertido Olympus IX81 equipado con una unidad de giro de disco (DSU), iluminación de epifluorescencia (lámpara de xenón de 150 W) y un microprocesador. Algunas imágenes también fueron tomadas con un Microscopio Confocal FV1000 con el objetivo 60x (medio de sumersión Oil, AN:). Las imágenes provenientes del microscopio Olympus IX81 fueron muestreadas en Z tomando imágenes de "slice" con una ventana de 260nm, en GFP y RFP a un tiempo de exposición de 800s. El procesamiento de cada z-stack se realizó con el software ImageJ-Fiji, substrayendo el "background" con el comando "subtractbackground" y deconvolución. Para obtener un máxima proyección de Z-stack, se tomaron "slice" teniendo el criterio de encontrar un axón o más de uno con MPS en foco, a ese número de "slice" se les realizó una proyección máxima obteniendo una imagen 2D. El resultado de esa proyección máxima es la imagen que se utilizó para cuantificar en el software *Gollum*. Las imágenes tomadas en el confocal fueron 2D se utilizó el "Pinhole" abierto 100 y 20s, las mismas se les realizo un "subtractbackground" para mejorarlas.

Deconvolución de imágenes ExM:

Imágenes de ExM fueron deconvolucionadas utilizando el software ImageJ-Fiji. En primer lugar con la utilización del plugins "PSF-Generation", tomamos los *Z-stack* de cada imagen y calculamos sus PSF, luego con el plugins "*Deconvolution Lab*" utilizando el Algoritmo: *Richardson-Lucy with TV regularization*, regulando los parámetros con un número de 0.001 y 100 interacciones. Terminadas las interacciones realizamos una proyección de intensidad máxima en Z, obteniendo una imagen 2D de un z-stack Deconvolucionada.

Código de color de Z-Stack. Algunas imágenes Z-Stack deconvolucionadas se les realizó un código de colores en Z utilizando el macro del Código de color-temporal (Fire-Lut) en el software ImageJ-Fiji. Como resultado, se obtiene una imagen 2D con un código de color de ubicaciones en el plano Z.

Tablas de reactivos y sus concentraciones para Microscopía de Expansión

1.1 Solución Monómerica (stock a -20 °C)

Componentes	Concentración Stock	Volumen (ml)	Concentración Final
Sodium Acrylate	38 gr/ml	2.25	8.6 gr/ml
Acrylamide	50 gr/ml	0.5	2.5 gr/ml
N,N-Methylenebissacrylamide	2 gr/ml	0.75	0.15 gr/ml
Sodium Chloride	29.2 gr/ml	4	11.17 gr/ml
PBS	10x	1	1x
Agua MQ		0.9	
Total		9.4	

1.2 Gel solución (realizar a 4°C, hasta el momento de utilizar)

Componentes	200 µl (final)	100 µl (final)
Solución Monómerica	188 µl	94 µl
Solución Aceleradora (TEMED) (Stock, 10% en Agua MQ)	4 µl	2 µl
Solución Iniciación (APS) (Stock, 10% en Agua MQ)	4 µl	2 µl
Agua MQ	4 µl	2 µl

1.3 Buffer de Digestión (Stock a -20 °C)

Componentes	concentración (final)	pH
Tris-p.a (solución de dilución)	50 mM	8.5
EDTA	1 mM	
Tritón X-100	0,5 %	
Guadine-HCl	0,8M	

Referencias bibliográficas

- Alessio Malacrida, Cristina Meregalli y, Virginia Rodriguez-Menendez and Gabriella Nicolini. Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy and Changes in Cytoskeleton. *Int. J. Mol. Sci.* (2019);20:2287; doi:10.3390/ijms20092287.
- Allingham. J.S., Klenchin. V.A., Rayment. I. Actin-targeting natural products: structures, properties and mechanisms of action. *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (2006);2119:2134.
- Annu Rev Neurosci.* (2005);28:127:56.
- Araki T, Sasaki Y, Milbrandt J. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science.* (2004);305(5686):1010:3.
- Babetto. E, Beirowski. B, Janeckova. L, Brown. R, Gilley. J, Thomson. D, Ribchester. R.R, Coleman. M.P.. Targeting NMNAT1 to axons and synapses transforms its neuroprotective potency in vivo. *J Neurosci.* (2010);30,13291:13304. [PubMed: 20926655].
- Bagri. A, Cheng. H.J, Yaron A, Pleasure. S.J, Tessier-Lavigne. M. Stereotyped pruning of long hippocampal axon branches triggered by retraction inducers of the semaphorin family. *Cell.* (2003);(3):285-99.
- Baines, A. J. Evolution of spectrin function in cytoskeletal and membrane networks. *Biochem. Soc. Trans.* (2009);37;796:803.
- Baines, A. J. The spectrin-ankyrin-4.1-adducin membrane skeleton: adapting eukaryotic cells to the demands of animal life. *Protoplasma* (2010);244;99:131.
- Bamburg. J.R, Bernstein. B.W, Davis. R.C, Flynn. K.C, Goldsbury. C, Jensen. J.R, Maloney. M.T, Marsden. I.T, Minamide. L.S, Pak. C.W, Shaw. A.E, Whiteman. I, Wiggan. O. Curr. ADF/Cofilin-actin rods in neurodegenerative diseases. *Alzheimer Res.* (2010);7(3):241:50.
- Barabas, F.M., Masullo, L.A., Bordenave, M.D., A. Giusti, S., Unsain, N., Refojo, D., Cáceres, A., and Stefani, F.D. Automated quantification of protein periodic nanostructures in fluorescence nanoscopy images. *Sci Rep.* (2017);7(1):16029.
- Beirowski. B, Babetto. E, Gilley. J, Mazzola. F, Conforti. L, Janeckova. L, Magni. G, Ribchester. R.R, Coleman. M.P.. Non-nuclear Wld(S) determines its neuroprotective efficacy for axons and synapses in vivo. *J Neurosci.* (2009); 29,653:668. [PubMed: 19158292].
- Bennett V, Baines A.J. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev.* (2001);(3):1353:92.
- Bernstein, B. W. & Bamburg, J. R. ADF/Cofilin: A functional node in cell biology. *Trends Cell Biol.* (2010);20,187:195.
- Billger M, Wallin M, Karlsson. J.O. Proteolysis of tubulin and microtubule-associated proteins 1 and 2 by calpain I and II. Difference in sensitivity of assembled and disassembled microtubules. *Cell Calcium.* (1988);9(1):33:44.
- Brown J.A and Bridgman P.C. The Disruption of the Cytoskeleton during Semaphorin 3A induced Growth Cone Collapse Correlates with Differences in Actin Organization and Associated Binding Proteins. *Dev Neurobiol.* (2009);69(10):633:646. doi:10.1002/dneu.20732.
- Büki A, Okonkwo. D.O, Wang KK, Povlishock. J.T. Cytochrome c release and caspase activation in traumatic axonal injury. *J Neurosci* (2000);15;20(8),2825:34.

- Cahoon, C.K., Yu, Z., Wang, Y., Guo, F., Unruh, J.R., and Slaughter, B.D. Superresolution expansion microscopy reveals the three-dimensional organization of the Drosophila synaptonemal complex.(2017);1:10.
- Cahoon. C.K, Yu. Z, Wang. Y, Guo. F, Unruh. J.R, Slaughter. B.D, Hawley. R.S.Superresolution expansion microscopy reveals the three-dimensional organization of the Drosophila synaptonemal complex.Proc Natl Acad Sci U S A. (2017);15;114(33):E6857-E6866. doi: 10.1073/pnas.1705623114.
- Calliari Aldo, Natalia Bobba, Carlos Escande, Eduardo N. Chini. Resveratrol delays Wallerian degeneration in a NAD⁺ and DBC1 dependent manner.Experimental Neurology (2014);91:100.
- Chang J.B, Chen F, Yoon Y.G, Jung E.E, Babcock H, Kang J.S, Asano S, Suk H.J, Pak N, Tillberg P.W, Wassie A.T, Cai D, Boyden E.S.Iterative expansion microscopy.Nat Methods. (2017);(6):593-599.
- Chen, F., Tillberg, P. W. & Boyden, E. S. Expansion microscopy. Science. (2015);347,543:548.
- Cheng. H.J, Bagri. A, Yaron. A, Stein. E, Pleasure. S.J, Tessier-Lavigne. M.Plexin-A3 mediates semaphorin signaling and regulates the development of hippocampal axonal projections.Neuron. (2001);25;32(2):249:63.
- Chozinski, T.J, Halpern. A.R, Okawa. H, Kim. H.J, Tremel. G.J, Wong. R.O, Vaughan. J.C.. Expansion microscopy with conventional antibodies and fluorescent proteins. Nat. Methods. (2016);13,485:488.
- Coleman, M.P., Adalbert, R., Beirowski, B.Neuroprotective strategies in MS: Lessons from C57BL/WldS mice.Journal of the Neurological Sciences 233 (2005);133:138.
- Conde, C.; Cáceres, A. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. Nat. Rev. Neurosci. (2009);10, 319:332.
- Cook M, Bolkan BJ, Kretschmar D. Increased Actin Polymerization and Stabilization Interferes with Neuronal Function and Survival in the AMPKc Mutant Loechrig. PLoS ONE (2014); 9(2);e89847.
- Cusack. C.L, Swahari V, Hampton Henley W, Michael Ramsey J, Deshmukh M.Distinct pathways mediate axon degeneration during apoptosis and axon-specific pruning.Nat Commun. (2013);4:1876. doi: 10.1038/ncomms2910.
- D'Este, E., Kamin, D., Balzarotti, F., and Hell, S. W. Ultrastructural anatomy of nodes of Ranvier in the peripheral nervous system as revealed by STED microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. (2017); E191:E199. doi: 10.1073/pnas.1619553114.
- D'Este, E., Kamin, D., Göttfert, F., El-Hady, A., and Hell, S. W. STED nanoscopy reveals the ubiquity of subcortical cytoskeleton periodicity in living neurons. Cell Rep. (2015);10,1246:1251.
- D'Este, E., Kamin, D., Göttfert, F., El-Hady, A., and Hell, S.W. STED nanoscopy reveals the ubiquity of subcortical cytoskeleton periodicity in living neurons. Cell Rep.(2015);10, 1246:1251.
- D'Este, E., Kamin, D., Velte, C., Göttfert, F., Simons, M., and Hell, S. W. Subcortical cytoskeleton periodicity throughout the nervous system. Sci. Rep. 6:22741. (2016);doi: 10.1038/srep22741.
- D'Este, E., Kamin, D., Velte, C., Göttfert, F., Simons, M., and Hell, S.W. Subcortical cytoskeleton periodicity throughout the nervous system. Sci. Rep. (2016);6,22741.
- da Silva S, Wang F.Retrograde neural circuit specification by target-derived neurotrophins and growth factors.Curr Opin Neurobiol.(2011);21(1):61:7.
- Dadon-Nachum M, Melamed E, Offen D: The “dying-back” phenomenon of motor neurons in ALS. J Mol Neurosci. (2011);43:470:477.

- Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2008);9:378:379-390.
- Denault JB, Salvesen GS. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev.* (2002); 102:4489:4500.
- Dent E.W., Gupton E.L., and Gertler F.b., (2011). The Growth Cone Cytoskeleton in Axon Outgrowth and Guidance. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3:a001800.
- Dent. E.W, Barnes. A.M, Tang. F, Kalil. K. Netrin-1 and semaphorin 3A promote or inhibit cortical axon branching, respectively, by reorganization of the cytoskeleton. *J Neurosci.* (2004);24;24(12):3002:12.
- Dent. E.W, Gertler. F.B. Cytoskeletal Dynamics and Review Transport in Growth Cone Motility and Axon Guidance. *Neuron*,(2003); 40, 209:227.
- Ding C, Hammarlund M. Mechanisms of injury-induced axon degeneration. *Curr Opin Neurobiol.* (2019);57:171:178.
- Dogterom M, Koenderink G.H. Actin-microtubule crosstalk in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2019);20(1):38:54.
- Dunn, R. C. Near-field scanning optical microscopy. *Chem. Rev.* (1999);99,2891:2928.
- Dürig, U., Pohl, D. W. & Rohner, F. Near-field optical-scanning microscopy. *J. Appl. Phys.* (1986);59,3318:3327.
- Erekat NS. Editors In: Stoker TB1, Greenland JC1, editors. *Source Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2018 Dec. Chapter 4.
- Fernandes, K. A., Mitchell, K. L., Patel, A., Marola, O. J., Shrager, P., Zack, D. J., ... Welsbie, D. S. (2018). Role of SARM1 and DR6 in retinal ganglion cell axonal and somal degeneration following axonal injury. *Experimental Eye Research.* (2018);171:54:61.
- Franco D. Lorena, Carolina Rezával, Alfredo Cáceres, Alejandro F. Schinder, M. Fernanda Ceriani. ENA/VASP downregulation triggers cell death by impairing axonal maintenance in hippocampal neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience* 44 (2010);154:164.
- Gallo Gianluca and Letourneau Paul C. Localized Sources of Neurotrophins Initiate Axon Collateral Sprouting. *The Journal of Neuroscience*, (1998);18(14):5403:5414.
- Gallo, G y Letourneau, P.C. Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues. *J Neurobiol.* (2004);58(1),92:102.
- Gambarotto D, Zwettler. F.U, Le Guennec. M, Schmidt-Cernohorska. M, Fortun. D, Borgers. S, Heine. J, Schloetel. J.G, Reuss. M, Unser. M, Boyden. E.S, Sauer. M, Hamel. V, Guichard. P. Imaging cellular ultrastructures using expansion microscopy (U-ExM). *Nat Methods.* (2019);(1),71:74.
- Gambarotto, D., Zwettler, F.U., Guennec, M. Le, Schmidt-cernohorska, M., Fortun, D., Borgers, S., Heine, J., Schloetel, J., Reuss, M., Unser, M., et al. Imaging cellular ultrastructures using expansion microscopy (2018);(U-ExM).
- Gan Y-J, Fang A-W, Liu C, Liu B-J, Yang F-M, Guan J-T, Lan C-L, Dai X-D, Li T, Cao Y, Ran Y, Gong X-H, Jin Z-B, Cui R-Z, Iwata T, Qu J, Lu F and Chi Z-L. Elevated Plasma Levels of Drebrin in Glaucoma Patients With Neurodegeneration. *Front. Neurosci.* (2019);13:326.
- Gao, M., Maraschini, R., Beutel, O., Zehtabian, A., Eickholt, B., Honigmann, A., and Ewers, H. Expansion Stimulated Emission Depletion Microscopy (ExSTED). *ACS Nano* 12, (2018);4178:4185.

REFERENCIAS

- Garland P, Broom LJ, Quraisha S, Dalton PD, Skipp P, et al. Soluble Axoplasm Enriched from Injured CNS Axons Reveals the Early Modulation of the Actin Cytoskeleton. *PLoS ONE* (2012);(10): e47552.
- Geisler S, Doan R.A, Strickland A, Huang X, Milbrandt J, DiAntonio A. Prevention of vincristine-induced peripheral neuropathy by genetic deletion of SARM1 in mice. *Brain*. (2016);3092:3108.
- George. E.B, Glass. J.D, Griffin. J.W. Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *J Neurosci*. (1995);(10):6445:52.
- Geraldo S, Gordon-Weeks P.R. Cytoskeletal dynamics in growth-cone steering. *J Cell Sci*. (2009);15;122(Pt 20):3595:604.
- Gerdts J, Brac E.J, Sasaki. Y, DiAntonio. A, Milbrandt. J. SARM1 activation triggers axon degeneration locally via NAD⁺ destruction. *Science*. 2015 Apr 24;348(6233):453:7.
- Gilley J, Coleman MP: Endogenous Nmnat2 is an essential survival factor for maintenance of healthy axons. *PLoS Biol* 2010, 8:e1000300.
- Glass J.D, Culver D.G, Levey A.I, Nash N.R. Very early activation of m-calpain in peripheral nerve during Wallerian degeneration. *J Neurol Sci*. (2002);196(1-2):9:20.
- Glebova, N. O. & Ginty, D. D. Growth and survival signals controlling sympathetic nervous system development. *Annu. Rev. Neurosci*. (2005);28,191:222.
- Goldberg D.J, Foley M.S, Tang D, Grabham P.W. Recruitment of the Arp2/3 complex and mena for the stimulation of actin polymerization in growth cones by nerve growth factor. *J Neurosci Res*. (2000);15;60(4):458:67.
- Gomez, T. M. & Letourneau, P. C. Actin dynamics in growth cone motility and navigation. *J. Neurochem*. (2014);129,221:234.
- Hall A, Lalli G. Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a001818; PMID:20182621; <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a001818>.
- Hall. E.D, Sullivan. P.G, Gibson. T.R, Pavel. K.M, Thompson. B.M, Scheff. Spatial and temporal characteristics of neurodegeneration after controlled cortical impact in mice: more than a focal brain injury. *S.W. J Neurotrauma*. (2005);22(2):252:65.
- Hamburger V, Levi-Montalcini R. Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *J Exp Zool*. (1949); 111:457:501.
- Hammarlund, M., Jorgensen, E. M., and Bastiani, M. J. Axons break in animals lacking b-spectrin. *J. Cell Biol*. (2007);176,269:275.
- Harrington AW, Ginty DD. Long-distance retrograde neurotrophic factor signalling in neurons. *Nat Rev Neurosci*. (2013); 14:177:187.
- He J, Zhou R, Wu Z, Carrasco M.A, Kurshan P.T, Farley J.E, Simon D.J, Wang G, Han B, Hao J, Heller E, Freeman M.R, Shen K, Maniatis T, Tessier-Lavigne M, Zhuang X. Prevalent presence of periodic actin-spectrin-based membrane skeleton in a broad range of neuronal cell types and animal species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2016);(21):6029-34.
- Hell SW: Microscopy and its focal switch. This review discussed the principles of super-resolution optical microscopy and the technical aspects of its operations in detail. *Nat Methods* (2009);6,24:32.
- Hell, S.W. Far-field optical nanoscopy. In *Proc. 2010 23rd Annual Meeting of the IEEE Photonics Society* (eds Jagadish, C. et al.) 3–4 (IEEE, New York, 2010).

- Hell. S.W, Wichmann. J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated-emission stimulated-emission depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett.* (1994);19,780:782.
- Heredia, L. y col. Phosphorylation of actin-depolymerizing factor/cofilin by LIM-kinase mediates amyloid-induced degeneration: a potential mechanism of neuronal dystrophy in alzheimer's disease. *J. Neurosci.* (2006);26,6533:6542.
- Hindges R, McLaughlin T, Genoud N, Henkemeyer M, O'Leary DDM. EphB forward signaling controls directional branch extension and arborization required for dorsal ventral retinotopic mapping. *Neuron* (2002);35,475:87.
- Honigsmann, A., and Ewers, H. Expansion Stimulated Emission Depletion Microscopy (ExSTED). *ACS Nano* (2018);12,4178:4185.
- Hoopfer D. Eric, Todd McLaughlin, Ryan J. Watts, Oren Schuldiner, Dennis D.M. O'Leary and Liquan Luo. Wlds Protection Distinguishes Axon Degeneration following Injury from Naturally Occurring Developmental Pruning. *Neuron.* (2006);50:883:895.
- Hou Y.J, Banerjee R, Thomas B, Nathan C, García-Sastre A, Ding A, Uccellini M.B. SARM is required for neuronal injury and cytokine production in response to central nervous system viral infection. *J Immunol.* (2013);15;191(2):875:83.
- Huang B, Bates M, Zhuang XW: Super-resolution fluorescence microscopy. This review is a comprehensive description of super-resolution optical microscopy, its principle, development, application, and limitations. *Annu Rev Biochem.* (2009);78:993:1016.
- Huang, B., Bates, M. & Zhuang, X. Super-resolution fluorescence microscopy. *Annu. Rev. Biochem.* (2009);78,993:1016.
- Huang, C. Y.-M., Zhang, C., Ho, T. S.-Y., Osés-Prieto, J., Burlingame, A. L., Lalonde, J., et al.. all spectrin forms a periodic cytoskeleton at the axon initial segment and is required for nervous system function. *J. Neurosci.* (2017);37,11311:11322.
- Igarashi M, Nozumi M, Wu L.G, Cella Zanacchi. F, Katona. I, Barna. L, Xu. P, Zhang. M, Xue. F, Boyden. E. .New observations in neuroscience using superresolution microscopy. *The Journal of Neuroscience,* (2018);38(44):9459:9467 • 9459.
- Ikeda, Y., Dick, K. A., Weatherspoon, M. R., Gincel, D., Armbrust, K. R., Dalton, J. C., et al.. Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5. *Nat. Genet.* (2006);38,184:190.
- Jiang, N., Kim, H., Chozinski, T.J., Azpurua, J.E., Eaton, B.A., and Montell, D. Superresolution imaging of *Drosophila* tissues using expansion microscopy. (2018);29.
- Johnson, G.V., J.M. Litersky, and R.S. Jope. 1991. Degradation of microtubule-associated protein 2 and brain spectrin by calpain: a comparative study. *J. Neurochem.* 56:1630:1638.
- Kampfl, A., R. Posmantur, R. Nixon, F. Grynspan, X. Zhao, S.J. Liu, J.K. Newcomb, G.L. Clifton, and R.L. Hayes.. mu-calpain activation and calpain-mediated cytoskeletal proteolysis following traumatic brain injury. *J. Neurochem.* (1996);67,1575:1583.
- Kanaan NM, Pigino GF, Brady ST, Lazarov O, Binder LI, Morfini GA: Axonal degeneration in Alzheimer's disease: when signaling abnormalities meet the axonal transport system. *Exp Neurol.* (2013);246:44:53.
- Kapitein, L.C.; Hoogenraad, C.C. Building the Neuronal Microtubule Cytoskeleton. *Neuron.* (2015);5;87(3):492:506.

REFERENCIAS

- Killackey, Samuel A, Muhammed A. Rahman, Fraser Soares, Ashley B. Zhang, Mena Abdel-Nour. Dana J. Philpott, Stephen E. Girardin. The mitochondrial Nod-like receptor NLRX1 modifies apoptosis through SARM1. *Molecular and Cellular Biochemistry* (2018); <https://doi.org/10.1007/s11010:018:3444:3>.
- Klar. T.A, Jakobs. S, Dyba. M, Egner. A, Hell. S.W. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000);97,8206:8210.
- Komada, M., and Soriano, P.. bIV-spectrin regulates sodium channel clustering through ankyrin-G at axon initial segments and nodes of Ranvier. *J. Cell Biol.* (2002);156;337:348.
- Krieg, M., Stühmer, J., Cueva, J. G., Fetter, R., Spilker, K., Cremers, D., et al. Genetic defects in b-spectrin and tau sensitize *C. elegans* axons to movement-induced damage via torque-tension coupling. (2017);*Elife* 6:e20172.
- Ku.Taeyun, Justin Swaney, Jeong-Yoon Par, Alexandre Albanese, Evan Murray, Jae Hun Cho, Young-Gyun Par, Vamsi Mangena, Jiapei Chen & Kwanghun Chung. Multiplexed and scalable super-resolution imaging of three-dimensional protein localization in size-adjustable tissues. *nature biotechnology* (2016);34,973:983.
- Kyle E. Miller and Daniel M. Suter. An Integrated Cytoskeletal Model of Neurite Outgrowth. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. *Front. Cell. Neurosci.* (2018); 12:447.
- Lee JC. Electron microscopy of Wallerian degeneration. *J Comp Neurol.* (1963);120,65:79.
- Leite, S. C. C., Sampaio, P., Sousa, V. F. F., Nogueira-Rodrigues, J., Pinto-Costa, R., Peters, L. L. L., et al.. The actin-binding protein a-adducin is required for maintaining axon diameter. *Cell Rep.* (2016);15,490:498.
- Leterrier, C., Potier, J., Caillol, G., Debarnot, C., Rueda Boroni, F., and Dargent, B.. Nanoscale architecture of the axon initial segment reveals an organized and robust scaffold. *Cell Rep.* (2015);13,2781:2793.
- Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science.* (1987);237:1154:1162.
- Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* (2008);27:6194:6206.
- Li R , Chen X , Lin Z , Wang Y , Sun Y. Expansion enhanced nanoscopy. *Nanoscale.* (2018);(37):17552:17556.
- li, R. Chen, X. li, Z. Wang, Y. and Sun, Y. Expansion Enhanced Nanoscopy. *Nanoscale.* (2018); DOI: 10.1039/C8NR04267E.
- Liquin Luo and Dennis D.M. O'Leary. Axon Retraction and Degeneration in Development and Disease. *Annu. Rev. Neurosci.* (2005);28:127:56.
- Lunn ER, et al. Absence of Wallerian Degeneration does not Hinder Regeneration in Peripheral Nerve. *Eur J Neurosci.* 1989;1,27:33.
- Luo L, O'Leary D.D. Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annu Rev Neurosci.* 2005;28:127:56.
- Ma, M., Ferguson, T.A., Schoch, K.M., Li, J., Qian, Y., Shofer, F.S., Saatman, K.E., and Neumar, R.W. Calpains mediate axonal cytoskeleton disintegration during Wallerian degeneration. *Neurobiol. Dis.* (2013);56,34:46.

- Mack TG, et al. Wallerian degeneration of injured axons and synapses is delayed by a Ube4b/ Nmnat chimeric gene. *Nat Neurosci.* (2001);4,1199:1206.
- Maor-Nof M, Homma N, Raanan C, Nof A, Hirokawa N, Yaron A. Axonal pruning is actively regulated by the microtubule-destabilizing protein kinesin superfamily protein 2A. *Cell Rep.* (2013);(4):971:7.
- Martin M. Riccomagno and Alex L. Kolodkin. Sculpting Neural Circuits by Axon and Dendrite Pruning
Martin M. Riccomagno and Alex L. Kolodkin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* (2015);31:779:805.
- Mccormick and Nic D. Leipzig. Neural Regenerative Strategies Incorporating Biomolecular Axon Guidance Signals. Aleesha M. Biomedical Engineering Society. *Ann Biomed Eng.* (2012); Mar;40(3):578:97.
- Michael K. Schäfer, Sarah Bellouze, Arnaud Jacquier, Sébastien Schaller Laurence Richard, Stéphane Mathis, Jean-Michel Vallat, Georg Haase. Sensory neuropathy in progressive motor neuronopathy (pmn) mice is associated with defects in microtubule polymerization and axonal transport. *Brain Pathol.* (2017);27(4):459:471.
- Miller K.E, Suter D.M. An Integrated Cytoskeletal Model of Neurite Outgrowth. *Front Cell Neurosci.* (2018);12:447.
- Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, et al. Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. *J Neural Transm (Vienna).* (2000);107(3):335:41.
- Nakamura H, O'Leary D.D. Inaccuracies in initial growth and arborization of chick retinotectal axons followed by course corrections and axon remodeling to develop topographic order. *J Neurosci.* (1989);(11):3776-95.
- Neukomm. M.J and Freeman. R.F. Diverse cellular and molecular modes of axon degeneration. *Trends Cell Biol.* (2014);24(9),515:523.
- Osterloh, J.M., Yang, J., Rooney, T.M., Fox, A.N., Adalbert, R., Powell, E.H., Sheehan, A.E., Avery, M.A., Hackett, R., Logan, M.A., MacDonald, J.M., Ziegenfuss, J.S., Milde, S., Hou, Y.J., Nathan, C., Ding, A., Brown Jr., R.H., Conforti, L., Coleman, M., Tessier-Lavigne, M., Zuchner, S., Freeman, M.R. dSarm/Sarm1 is required for activation of an injury-induced axon death pathway. *Science* (2012);337,481:484.
- Pak, C.W., Flynn, K.C., y Bamberg, J.R. Actin-binding proteins take the reins in growth cones. *Nat Rev Neurosci* 9, (2008);136:147.
- Parkinson, N. J., Olsson, C. L., Hallows, J. L., McKee-Johnson, J., Keogh, B. P., Noben-Trauth, K., et al. Mutant α -spectrin 4 causes auditory and motor neuropathies in quivering mice. *Nat. Genet.* (2001);29,61:65.
- Perry VH, et al. Very Slow Retrograde and Wallerian Degeneration in the CNS of C57BL/Ola Mice. *Eur J Neurosci.* (1991);3,102:105.
- Peterson, J. R., and Mitchison, T. J. Review small molecules, big impact: a history of chemical inhibitors and the cytoskeleton. *Chem. Biol.* (2002);9,1275:1285.
- Pollard T.D, Borisy G.G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* (2003);(4):453:65.
- Qu, Y., Hahn, I., Webb, S. E. D., Pearce, S. P., and Prokop, A. Periodic actin structures in neuronal axons are required to maintain microtubules. *Mol. Biol. Cell.* (2017);28,296:308.

- Riccomagno M.M, Kolodkin A.L.Sculpting neural circuits by axon and dendrite pruning.*Annu Rev Cell Dev Biol.* (2015);31:779:805.
- Rust MJ, Bates M, Zhuang XW: Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods.* (2006);3,793:795.
- Saal, K.-A. y col. AAV.shRNA-mediated downregulation of ROCK2 attenuates degeneration of dopaminergic neurons in toxininduced models of Parkinson's disease in vitro and in vivo. *Neurobiol. Dis.* (2015); 73,150:162.
- Saatman. K.E, Abai. B, Grosvenor. A, Vorwerk. C.K, Smith.D.H, Meaney. D.F.Traumatic Axonal Injury Results in Biphasic Calpain Activation and Retrograde Transport Impairment in Mice.*Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* (2003); 23:34–42.The International Society for Cerebral Blood Flow and Metabolism Published by Lippincott Williams & Wilkins, Inc., Philadelphia.
- Sainath R y Gallo G.The Dynein Inhibitor Ciliobrevin D Inhibits the Bidirectional Transport of Organelles Along Sensory Axons and Impairs NGF-Mediated Regulation of Growth Cones and Axon Branches.*Dev Neurobiol.* (2015);75(7):757:77.
- Sasaki Y and Milbrandt J. Axonal degeneration is blocked by nicotinamide mononucleotide adenyltransferase (Nmnat) protein transduction into transected axons. *J Biol Chem.* (2010); 31;285(53):41211:5.
- Sasaki Y, Nakagawa T, Mao X, DiAntonio A, Milbrandt J.NMNAT1 inhibits axon degeneration via blockade of SARM1-mediated NAD⁺ depletion.*Elife.* (2016);5. pii: e19749.
- Saxena, S. & Caroni, P. Mechanisms of axon degeneration: From development to disease. *Progr. Neurobiol.* (2007);83,174:191.
- Schäfer Michael K, Sarah Bellouze, Arnaud Jacquier, Sébastien Schaller, Laurence Richard, Stéphane Mathis, Jean-Michel Vallat, Georg Haase.Sensory neuropathy in progressive motor neuronopathy (pmn) mice is associated with defects in microtubule polymerization and axonal transport. *Brain Pathology.* (2016);(24);459:471.
- Schoenmann Z, Assa-Kunik E, Tiomny S, Minis A, Haklai-Topper L, Arama E, Yaron A. Axonal degeneration is regulated by the apoptotic machinery or a NAD⁺-sensitive pathway in insects and mammals. *Journal of Neuroscience* (2010);30,6375:6386.
- Schumacher. P.A, Siman. R.G, Fehlings. M.G.Pretreatment with calpain inhibitor CEP-4143 inhibits calpain I activation and cytoskeletal degradation, improves neurological function, and enhances axonal survival after traumatic spinal cord injury.*J Neurochem.* (2000);74(4):1646:55.
- Seeley PJ, Greene LA.Short-latency local actions of nerve growth factor at the growth cone.*Proc Natl Acad Sci U S A.* (1983);80(9):2789:93.
- Sheard TMD, Hurley ME, Colyer J, et al. Three-Dimensional and Chemical Mapping of Intracellular Signaling Nanodomains in Health and Disease with Enhanced Expansion Microscopy. *ACS Nano.* 2019;13(2):2143:2157.
- Simon D.J, Watkins T.A.Therapeutic opportunities and pitfalls in the treatment of axon degeneration.*Curr Opin Neurol.* (2018);31(6):693-701.
- Simon DJ, Weimer RM, McLaughlin T, Kallop D, Stanger K, Yang J, O'Leary DD, Hannoush RN, Tessier-Lavigne M. A caspase cascade regulating developmental axon degeneration. *Journal of Neuroscience* (2012);32,17540:17553.

REFERENCIAS

- Simon, D.J., Weimer, R.M., McLaughlin, T., Kallop, D., Stanger, K., Yang, J., O'Leary, D.D., Hannoush, R.N., and Tessier-Lavigne, M. A caspase cascade regulating developmental axon degeneration. *J. Neurosci.* (2012);32,17540:17553.
- Solomon F, Magendantz M. Cytochalasin separates microtubule disassembly from loss of asymmetric morphology. *J. Cell. Biol.* (1981);89:157:61.
- Sörensen. Pia M, Jacob. Roxana E, Fritzsche. Marco, Engen. John R, Brieher. William M, Charras. Guillaume and Eggert. Ulrike S. The natural product cucurbitacin E inhibits depolymerization of actin filaments. *ACS Chem. Biol.* (2012);7,1502:1508.
- Spillane M, Gallo G. Involvement of Rho-family GTPases in axon branching. *Small GTPases* (2014);5:e2797.
- Spira, M.E., R. Oren, A. Dormann, and D. Gitler. Critical calpain-dependent ultrastructural alterations underlie the transformation of an axonal segment into a growth cone after axotomy of cultured *Aplysia* neurons. *J Comp Neurol.* (2003);10;457(3):293:312.
- Tagliaferro P, Burke RE: Retrograde axonal degeneration in Parkinson disease. *J Parkinson's Dis* (2016);6:1-15.
- Thomas PK. Changes in the endoneurial sheaths of peripheral myelinated nerve fibres during Wallerian degeneration. *J Anat.* (1964);98,175:182.
- Tillberg, P. W, Chen. F, Piatkevich. K.D, Zhao. Y, Yu C.C, English. B.P, Gao. L, Martorell. A, Suk. H.J, Yoshida. F, DeGennaro. E.M, Roossien. D.H, Gong. G, Seneviratne. U, Tannenbaum. S.R, Desimone. R, Cai. D, Boyden. E.S.. Protein-retention expansion microscopy of cells and tissues labeled using standard fluorescent proteins and antibodies. *Nat. Biotechnol.* (2016);34,987:992.
- Tönges L, Frank T, Tatenhorst L, Saal K.A, Koch J.C, Szego É.M, Bähr M, Weishaupt J.H, Lingor P. Inhibition of rho kinase enhances survival of dopaminergic neurons and attenuates axonal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Brain.* (2012);:3355:70.
- Truckenbrodt, S., Sommer, C., Rizzoli, S.O., and Danzl, J.G. A practical guide to optimization in X10 expansion microscopy. *Nat. Protoc.* 14,(2019);832:863.
- Turkiew, E., Falconer, D., Reed, N., Hoke, A. Deletion of Sarm1 gene is neuroprotective in two models of peripheral neuropathy. *J. Peripher. Nerv. Syst.* (2017);22,162:171.
- Unsain N, Barker P.A. New Views on the Misconstrued: Executioner Caspases and Their Diverse Non-apoptotic Roles. *Neuron.* (2015);4;88(3):461:74.
- Unsain N, Bordenave M.D, Martinez G.F, Jalil S, von Bilderling C, Barabas F.M, Masullo L.A, Johnstone A.D, Barker P.A, Bisbal M, Stefani F.D, Cáceres A.O. Remodeling of the Actin/Spectrin Membrane-associated Periodic Skeleton, Growth Cone Collapse and F-Actin Decrease during Axonal Degeneration. *Sci Rep.* (2018);12:8(1):6002.
- Unsain N, Heard K.N., Higgins J.M., Barker P.A. Production and isolation of axons from sensory neurons for biochemical analysis using porous filters. *J Vis Exp.* (2014);8;(89).
- Unsain N, Higgins J.M, Parker K.N, Johnstone A.D, Barker P.A. XIAP regulates caspase activity in degenerating axons. *Cell Rep.* (2013);4(4):751-63.
- Unsain. N, Stefani FD and Cáceres A. The Actin/Spectrin Membrane-Associated Periodic Skeleton in Neurons. *Front. Synaptic Neurosci.* (2018);10:10.

REFERENCIAS

- Valakh, V., Frey, E., Babetto, E., Walker, L. J., and DiAntonio, A. Cytoskeletal disruption activates the DLK/JNK pathway, which promotes axonal regeneration and mimics a preconditioning injury. *Neurobiol. Dis.* (2015);77,13:25.
- Valakh, V., Walker, L. J., Skeath, J. B. & DiAntonio, A. Loss of the spectraplakins short stop activates the DLK injury response pathway in *Drosophila*. *J. Neurosci.* (2013); 33,17863:17873.
- Vitriol E.A and Zheng J.Q. Growth Cone Travel in Space and Time: the Cellular Ensemble of Cytoskeleton, Adhesion, and Membrane. *Trends in Neurosciences.* (2012);6:1068:81.
- Vohra, B.P., Sasaki, Y., Miller, B.R., Chang, J., DiAntonio, A., and Milbrandt, J. Amyloid precursor protein cleavage-dependent and -independent axonal degeneration programs share a common nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 1-sensitive pathway. *J. Neurosci.* (2010);30,13729:13738.
- Waller A. Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.* (1850);140:423:429.
- Wang G, Simon D.J, Wu Z, Belsky D.M, Heller E, O'Rourke M.K, Hertz N.T, Molina H, Zhong G, Tessier-Lavigne M, Zhuang X. Structural plasticity of actin-spectrin membrane skeleton and functional role of actin and spectrin in axon degeneration. *Elife.* (2019);1;8. pii: e38730.
- Wang J, Zhai Q, Chen Y, Lin E, Gu W, McBurney M.W, He Z.A local mechanism mediates NAD-dependent protection of axon degeneration. *J Cell Biol.* (2005);170(3):349:55.
- Wang, J.T., Medress, Z.A., and Barres, B.A. (2012). Axon degeneration: molecular mechanisms of a self-destruction pathway. *J. Cell Biol.* 196,7:18.
- Wang, M.S., Y. Wu, D.G. Culver, and J.D. Glass. Pathogenesis of axonal degeneration: parallels between Wallerian degeneration and vincristine neuropathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* (2000);59:599:606.
- Wassie A.T, Zhao Y, Boyden E.S. Expansion microscopy: principles and uses in biological research. *Nat Methods.* 2019;16(1):33:41.
- Wassie. Asmamaw T, Zhao. Yongxin, and Boyden. Edward S. Expansion microscopy: principles and uses in biological research. *Nature Methods.* (2019);16:33:41 www.nature.com/naturemethods.
- Witte H, Neukirchen D, Bradke F. Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J Cell Biol.* (2008);180(3):619-32. doi:
- Xu, K., Zhong, G., and Zhuang, X. Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science.* (2013);339,452:456.
- Yamamoto N, Tamada A, Murakami F. Wiring of the brain by a range of guidance cues. *Prog Neurobiol.* (2002);68(6),393:407.
- Yang J, Weimer R.M, Kallop D, Olsen O, Wu Z, Renier N, Uryu K, Tessier-Lavigne M. Regulation of axon degeneration after injury and in development by the endogenous calpain inhibitor calpastatin. *Neuron.* (2013);80(5):1175:89.
- Yaron A, Schuldiner O. Common and Divergent Mechanisms in Developmental Neuronal Remodeling and Dying Back Neurodegeneration. *Curr Biol.* (2016);26(13):R628:R639.

REFERENCIAS

Zhai Qiwei, Jing Wang, Anna Kim, Qing Liu, Ryan Watts, Eric Hoopfer, Timothy Mitchison, Liqun Luo and Zhigang He. Involvement of the Ubiquitin- Report Proteasome System in the Early Stages of Wallerian Degeneration. *Neuron*, (2003);39;217:225.

Zhang, C., Susuki, K., Zollinger, D. R., Dupree, J. L., and Rasband, M. N. (2013). Membrane domain organization of myelinated axons requires a II spectrin. *J. Cell Biol.* 203, 437:443.

Zhong G, He J, Zhou R, Lorenzo D, Babcock H.P, Bennett V, Zhuang X. Developmental mechanism of the periodic membrane skeleton in axons. *Elife*. 2014 Dec 23;3.

AGRADECIMIENTOS

A mis orientadores Nicolás Unsain y Alfredo Cáceres por permitirme formarme en su Laboratorio, por la disponibilidad de reactivos y tiempo para instancias de discusiones de experimentos.

A mi orientador Nico, refiriendo a lo académico por aceptarme en su Laboratorio, la confianza, sus ideas, por apostar en mi para ser su primera estudiante de Doctorado. Por sus constantes aportes, que hicieron que pensara y tuviera una actitud crítica hacia nuestro trabajo, por todo lo que me ENSEÑÓ en esta etapa de crecimiento. Con respecto a lo personal, gracias por demostrarme que en este sistema se puede ser solidario y empático con el de al lado, por escucharme y bancarme, bancarnos, por la amistad que hemos formado entre nuestras familias, esta amistad que seguro seguirá compartiendo momentos, acá, allá o donde sea el hogar que nos junte. GRACIAS!

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación de Uruguay (ANII) quien me otorgó la beca doctoral.

A los miembros de la comisión asesora del Doctorado en Neurociencias, Claudia Hereñú, Santiago Quiroga, Alfredo Cáceres y Nicolás Unsain, por sus devoluciones durante estos tres años de trabajo, por siempre estar bien predispuestos. Al evaluador externo por aceptar ser miembro del tribunal de tesis.

Al Laboratorio M.M.A.N, a los jefes, Mariano y Agustín, por siempre estar frente a cualquier duda, por transmitir su conocimiento SIEMPRE, por estar por cada cosa que les pedí o pregunté.

A mis compañeras incondicionales de Laboratorio, Jose y Mile, gracias, por estar desde el comienzo, donde empezamos a construir todo esto, por los momentos que compartidos fuera del trabajo, por ser mi familia en esta ciudad, por acompañarnos, abrazarnos y caminar juntas en esta etapa, que tanto nos enseñó, que tanto crecimos y nos desconstruimos, siempre JUNTAS. A las más peques, Guada y Mili, por traer aire nuevo, por su entusiasmo, por siempre estar. A Guada, mi nueva compa, que hemos coexistido poco tiempo en el labo pero el suficiente como para saber que es una comapeñera de fierro. A Sami, mi primer y mi viejo compa, por todo lo que me enseñó y a Gala la peque nueva por su buena onda.

Al instituto Ferreyra, por abrirme las puertas para poder realizar mi doctorado y por estar dispuestos a prestarnos de reactivos o equipamientos. Por todos los equipamientos disponibles y a todos los técnicos por siempre ayudarme en todo lo que necesité. En lo personal, a la personas que apenas llegué a Argentina me ayudaron con prestamos de cosas para formar un nuevo hogar, que no fue tarea fácil para nosotras. Gracias, Moni S, Vicky R, Carlos W y seguro muchos más.

Al piso de Neurobiología por su disposición y ayuda académica.

Al Dr. Fernando Stefani del Laboratorio Investigaciones en Bionanociencias (CIBION, CONICET) de Buenos Aires y a su equipo de trabajo. Por sus aportes en

AGRADECIMIENTOS

Microscopía de Super-resolución, en especial a Alan Szalai y Luciano Masullo por su paciencia en mis instancias de entrenamiento de utilización del Microscopio STED.

A Thomas M Durcan del Department of Neurology and Neurosurgery, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, QC, Canada.

A Dra. Cecilia Sampedro y Dr. Carlos Mas del CIQUIBIC por sus aportes en la obtención de imágenes confocales.

A los chicos del Bioterio, gracias por su trabajo.

A mi familia, Colo y Maru, gracias por siempre apoyarme en todo, son parte de todo esto, sin ustedes no hubiera sido posible.

A mis amiguxs de allá, que siempre que pudieron vinieron a visitarnos, que cuando dudaba un poco de mi venida a este país se hacían un tiempo para escucharme y decirme “solo es tiempo, quedate tranquilo que acá te esperamos”. Gracias por el aguante de siempre!

A mis amigas de acá, Cyn, Gise, Tefi, Vicky, Euge, Consti y Pau, por todos esos momentos compartidos, por esos fútbol con asados, porque ahora ya se que la amistad no respeta fronteras. GRACIAS POR TODO EL AGUANTE!

A las abriendas, compañeras, por todo lo compartido, por todo lo que me enseñaron con su militancia, lucha que práctico como una política de vida en todo los espacios que habito. **“Donde rueda la pelota hay encuentro”**, y si lo habrá con ustedes compas, GRACIAS!

A Poly, mi compañera de camino, por animarse a compartir esta aventura que nos transformó para siempre, GRACIAS! **“si no hay amor que no haya nada entonces”** vieja!

A TODXS lxs que fueron parte de algun modo de esta historia de tres años, GRACIAS!