

# **Caracterización espacio-temporal de la actividad de las proteínas Rho GTPasas durante la toxicidad inducida por $\beta$ -Amiloide.**

Tesina de Grado de Licenciatura en Ciencias Biológicas

**Tesista:** MELANO MAXIMILIANO GABRIEL      Firma: .....

**Director/a:** DR. BISBAL MARIANO              Firma: .....

Lugar de trabajo: Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC-CONICET-UNC)

**Universidad Nacional de Córdoba**  
**Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**



Córdoba, Argentina 2024.

“Caracterización espacio-temporal de la actividad de las proteínas Rho GTPasas durante la toxicidad inducida por  $\beta$ -Amiloide”

**Alumno/a:**

**Director/a:**

**Co-director/a:**

TRIBUNAL EXAMINADOR

- Nombre y Apellido: Eduardo Matias Clop                      Firma .....
- Nombre y Apellido: Héctor Alejandro Guidobaldi                      Firma .....
- Nombre y Apellido: Mauricio Martin                      Firma .....
- Calificación: .....
- Lugar y fecha: .....

*A mi familia, a mis amigxs y a todo aquel que estuvo en este largo camino...*

# Índice

Resumen.....	7
Summary .....	8
Introducción.....	9
1.1.....¿Qué es y por qué estudiamos la enfermedad de Alzheimer?	9
1.1.2 Epidemiología y más.....	9
1.1.2 Manifestaciones clínicas .....	10
1.1.3 Genes y ambiente .....	10
1.1.4 Histopatología .....	11
1.1.5 Hipótesis de la cascada $\beta$ -Amiloide ( $A\beta$ ).....	11
1.1.6 Biología del péptido $\beta$ -Amiloide.....	12
1.1.7 Déficits de memoria en EA.....	15
1.2 Rho GTPasas .....	15
1.2.1 Síntesis y estructura .....	16
1.2.2 Mecanismos de regulación .....	17
1.2.3 Relevancia biológica.....	18
1.2.4 Memoria y espinas dendríticas .....	19
1.2.5 Cambio de perspectiva de Rho GTPasas.....	21
1.2.6. Potencialidad como blancos terapéuticos en EA .....	22
1.2.7 Resultados contradictorios en EA .....	22
1.2.8 Medidas globales vs complejidad local.....	23
1.2.9 Biosensores FRET .....	23
OBJETIVOS .....	26
Hipótesis .....	26
Objetivo general.....	26
Objetivos específicos .....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1 Cultivo de Neuronas Hipocampales .....	28
3.1.1 Extracción y siembra .....	28
3.1.2 Mantenimiento .....	29
3.1.3 Vidrios de cultivo .....	29
3.2 Cultivo de líneas celulares.....	29
3.2.1 Descongelado .....	29
3.2.2 Mantenimiento .....	30

3.2.3 Repique .....	30
3.2.4 Vidrios de cultivo .....	30
3.3 Transfecciones.....	30
3.3.1 Neuronas hipocampales .....	30
3.3.2 Líneas celulares .....	31
3.4 Diferenciación líneas celulares Neuro2A .....	31
3.4.1 Evaluación de la diferenciación por morfometría .....	31
3.4.2 Evaluación de la diferenciación por inmunocitoquímica .....	31
3.5 Fijación .....	32
3.6 Inmunofluorescencia .....	32
3.7 Biosensores de actividad Rho GTPasas (RhoA, Cdc42 y Rac1).....	33
3.7.1 FRET Radiométrico .....	33
3.7.2 Macro .....	34
3.8 Preparación de Oligómeros y fibras de $\beta$ -Amiloide.....	34
3.8.1 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) .....	35
3.9 Tratamiento de neuronas hipocampales y líneas celulares.....	35
RESULTADOS .....	36
4.1 Caracterización de las estructuras conformacionales de $A\beta_{1-42}$ .....	36
4.2 Controles de los biosensores de FRET .....	37
4.3 Dinámica temporal de la actividad de Rho GTPasas en líneas celulares .....	38
4.4 Diferenciación de la Línea Neuro2A .....	40
4.5 Dinámica espacial la actividad de Rho GTPasas en líneas celulares diferenciadas .....	41
4.6 Dinámica espacio-temporal la actividad de Rho GTPasas en dendritas Neuronas hipocampales.....	41
4.6.1 Actividad RhoA .....	41
4.6.2 Actividad Cdc42.....	44
DISCUSIÓN.....	46
5.1 La activación de Rho GTPasas, provocada por oligómeros de $A\beta$ difiere entre líneas celulares y las neuronas piramidales del hipocampo. ....	46
5.2 Los oligómeros de beta amiloide alteran la activación de RhoA en neuronas .....	48
5.3 Los oligómeros de beta amiloide alteran la activación de Cdc42 en neuronas .....	48
CONCLUSIÓN .....	50
ANEXO .....	57
MACRO: MacroFRETMelanoM.3.0.....	57

# Índice de abreviaturas

2pFLIM	Two-photon fluorescence lifetime microscopy
ADDL	Amyloid- $\beta$ derived diffusible ligands
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFM	Atomic force microscopy
APP	Amyloid Precursor Protein
A $\beta$	$\beta$ -Amiloide
Cdc42	Proteína de control de la división celular 42
DCL	Deterioro cognitivo leve
DIV	Días <i>in vitro</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSU	Disc Spinning Unit
EA	Enfermedad de Alzheimer
EOAD	Early onset Alzheimer's Disease
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GAP	GTPase-activating proteins
GDI	Rho GDP-dissociation inhibitor
GDP	Guanosina difosfato
GEF	Guanine nucleotide-exchange factor
GTP	Guanosina trifosfato
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol
LOAD	Late onset Alzheimer's Disease
LTD	Long-term depression

LTP	Long-term potentiation
MEM10	Minimum Essential Medium 10
NaN	Not a number
NFT	Neurofibrillary tangle
NMDA	N-methyl-D-aspartate
PBS	Phosphate Buffered Saline
PS	Placas seniles
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
RA	Retinoic acid
Rac1	Sustrato 1 de la toxina botulínica C3 relacionada con Ra
RBD	Rho binding domain
RhoA	Miembro homólogo A de Ras
SEM	Standard error of the mean
SNC	Sistema nervioso central
Wt	Wild type

## Resumen

La pérdida sináptica es un factor clave en la disfunción cognitiva asociada con la enfermedad de Alzheimer (EA). Se sabe que los oligómeros de  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) están relacionados con la alteración de las espinas dendríticas y la plasticidad sináptica, aunque los mecanismos moleculares aún no se conocen por completo. En este contexto las Rho GTPasas, que funcionan como interruptores moleculares, son cruciales para la dinámica de la actina y la estructura de la espina dendrítica. En la mayoría de los estudios que examinan la activación de estas proteínas en la EA, realizan ensayos de extracción bioquímica o utilizan mutantes constitutivamente activos y/o dominantes negativos, herramientas que no permiten resolver dinámicas espacio-temporales de activación. Actualmente se han desarrollado y perfeccionado una gran cantidad de sensores de transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET) que permiten mediciones radiométricas con alta precisión espacial y temporal. Adoptando el uso de esta técnica, observamos un patrón de activación espacio-temporal complejo de RhoA y Cdc42 en las neuronas expuestas a los oligómeros. En cuanto a RhoA, se observó una activación temprana a los 5 minutos en espinas dendríticas, seguida de una inactivación marcada a los 30 minutos. En cambio, Cdc42 mostró una activación temprana en las espinas dendríticas a los 5 minutos, que se extendió a toda la dendrita a los 30 minutos y se redujo a la hora. Estos resultados contrastan con estudios previos que han utilizado otras técnicas clásicas. Nuestras observaciones sugieren que los cambios en la actividad de las Rho GTPasas, relacionados con la EA, son más complejos de lo que se suponía, lo que subraya la necesidad de investigar más sobre las vías de señalización que rigen el inicio de la pérdida de espinas dendríticas en el inicio de la EA.

**Palabras Clave:**  $\beta$ -amiloide, RhoA, Cdc42, Activación, Alzheimer, Oligómeros, FRET, GEFs, GAPs.



## Summary

Synaptic loss is a key factor in the cognitive dysfunction associated with Alzheimer's disease (EA). Oligomers of  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) are known to be related to the alteration of dendritic spines and synaptic plasticity, although the molecular mechanisms are not fully understood. In this context, Rho GTPases, which function as molecular switches, are crucial for actin dynamics and dendritic spine structure. Most studies examining the activation of these proteins in EA use biochemical extraction assays or constitutively active and/or dominant-negative mutants, tools that do not allow for the resolution of spatial-temporal activation dynamics. Currently, a large number of Förster resonance energy transfer (FRET)-based sensors have been developed and refined, enabling radiometric measurements with high spatial and temporal precision. By adopting the use of this technique, we observed a complex spatial-temporal activation pattern of RhoA and Cdc42 in neurons exposed to oligomers.

Regarding RhoA, early activation was observed at 5 minutes in dendritic spines, followed by marked inactivation at 30 minutes. In contrast, Cdc42 showed early activation in dendritic spines at 5 minutes, which spread to the entire dendrite at 30 minutes and reduced to baseline at one hour. These results contrast with previous studies using other classical techniques. Our observations suggest that changes in Rho GTPase activity, related to EA, are more complex than previously thought, underscoring the need for further research into the signaling pathways governing the onset of dendritic spine loss in early EA

**Keywords:**  $\beta$ -amiloide, RhoA, Cdc42, Activation, Alzheimer, Oligomers, FRET, GEFs, GAPs.

# 1

## Introducción

### 1.1 ¿Qué es y por qué estudiamos la enfermedad de Alzheimer?

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo del Sistema Nervioso Central (SNC) que progresa durante décadas, afectando de manera inicial la corteza entorrinal, hipocampo y neocorteza, culminando con una atrofia cerebral generalizada (Roland & Jacobsen, 2009).

#### 1.1.2 Epidemiología y más.

La EA es la principal causa de demencia representando entre el 60 y 80 % de los casos a nivel global (Deture & Dickson, 2019). Actualmente, afecta a alrededor de 50 millones de personas en el mundo y se estima que esta cifra irá en aumento a raíz de las modificaciones en la demografía mundial, llegando a triplicarse para el 2050 donde el 71% de los nuevos casos estarán concentrados en países de medianos a bajos ingresos (Siva, 2021)

Aunque han pasado más de 100 años desde las primeras observaciones de Alois Alzheimer (a quien se atribuye el descubrimiento) y que se han llevado a cabo numerosos estudios para entender la naturaleza de esta enfermedad, aún quedan muchas incógnitas, sobre todo en cuanto a los mecanismos patobiológicos celulares y moleculares de este padecimiento. Esto ha repercutido en la baja eficiencia de los tratamientos. Actualmente solo unos pocos fármacos son utilizados a nivel mundial para tratar la progresión de los síntomas clínicos de la enfermedad (Janeiro et al., 2021).

Algunas drogas utilizadas como “potenciadores cognitivos” se administran con el objetivo de regular la disminución de la cognición, el comportamiento y las actividades de

la vida diaria. Estas afecciones se sabe que están provocadas por las anomalías en los niveles de neurotransmisores, involucrados en los sistemas colinérgicos, monoaminérgicos y glutamatérgicos del SNC, que están afectados desde etapas tempranas en esta patología. Actualmente dos tipos de “potenciadores cognitivos” son los más utilizados, en estos se incluyen los inhibidores de la acetilcolinesterasa y antagonistas del receptor de N-methyl-D-aspartate (NMDA) (Scheltens et al., 2021).

Desafortunadamente, estos tratamientos son incapaces de detener por completo la progresión de este padecimiento. Es así que la falta de tratamientos efectivos, el aumento de la esperanza de vida, junto con el aumento de hábitos poco saludables, han convertido a esta enfermedad en uno de los principales retos sanitarios del siglo (Janeiro et al., 2021b; Kilian & Kitazawa, 2018).

### 1.1.2 Manifestaciones clínicas

La enfermedad inicia con una fase pre clínica o asintomática, progresando luego a un deterioro cognitivo leve (DCL), luego se desarrollan cambios de personalidad moderados, concluyendo hacia una demencia total en etapas avanzadas de la enfermedad, con alteraciones del habla e incluso disfunción motora y procesos neurológicos vitales (Jack et al., 2018).

### 1.1.3 Genes y ambiente

Existen diferentes mutaciones en genes involucrados en el procesamiento de la Proteína Precursora Amiloidea (o APP por sus siglas en inglés). Estas mutaciones son a menudo determinantes de la enfermedad, como por ejemplo, mutaciones particulares en los genes de Presenilina 1 o 2 que se correlacionan con el inicio temprano de la enfermedad aproximadamente a los 40 años de edad o menos. Sin embargo, estos casos representan alrededor del 1% de los casos. Este subtipo es el denominado Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano o familiar (EOAD por sus siglas en inglés), mientras que el resto de los casos de EA corresponden a los casos de inicio tardío o esporádico de la enfermedad de Alzheimer (LOAD por sus siglas en inglés) que ocurre predominantemente en adultos mayores de 65 años, cuya incidencia aumenta progresivamente con la edad, alcanzando una incidencia del

50 % en personas mayores de 80 años. En estos casos de inicio tardío, las causas no son tan claras. Se sabe que pueden estar implicados múltiples genes, algunos muy estudiados como alelo e4 de la Apolipoproteína E (siendo el factor de riesgo genético de mayor importancia), y otros genes aún no identificados. También se han estudiado diversos factores ambientales, la edad y otras comorbilidades con influencia en las probabilidades de padecer la enfermedad (Epis et al., 2009).

#### 1.1.4 Histopatología

Alois Alzheimer fue uno de los pioneros en establecer la relación entre la demencia y la acumulación de cambios histológicos en el tejido nervioso central. Al analizar cuidadosamente el cerebro *post mortem* de personas en estadios avanzados de la enfermedad, descubrió la presencia de unas estructuras particulares que luego fueron llamadas Placas Seniles (PS) y Ovillos Neurofibrilares (NFT por sus siglas en inglés) (Castellani et al., 2008).

Posteriormente, con el desarrollo de técnicas más sofisticadas y un interés generalizado de la comunidad científica por conocer la naturaleza química de estas marcas, se descubrió que la proteína Tau hiperfosforilada es el componente proteico principal de los NTF(Grundke-Iqbal et al., 1986). Por otro lado, las PS están formadas en gran parte por fragmentos de diferente longitud de la proteína  $\beta$ -Amiloide, junto a otras proteínas, que interactúan fuertemente formando un agregado en el espacio extracelular de las neuronas (Atwood et al., 2002).

#### 1.1.5 Hipótesis de la cascada $\beta$ -Amiloide ( $A\beta$ )

El descubrimiento de la naturaleza química de las PS a principios de la década de 1990, situando a los péptidos  $\beta$ -Amiloide como principales componentes, sentó las bases para la introducción de la “hipótesis de la cascada  $\beta$ -Amiloide”, que se ha mantenido durante los últimos años, aunque con algunas modificaciones. En su forma más básica, establece que la acumulación y depósito de péptidos  $A\beta$  en el sistema nervioso central, ya sea por su sobreproducción o algún defecto en su remoción (“clearance”), desencadena una cascada citopatogénica que progresa lentamente y culmina en una patología sistémica compleja (Scheltens et al., 2021).

Esta hipótesis se basa en algunas líneas de evidencia concretas como: 1) La acumulación de  $\beta$ -Amiloide en pacientes con EA, 2) Las mutaciones genéticas puntuales que causan acumulación de  $A\beta$  y EA familiar de inicio temprano, 3) el aumento del número de copias de la Proteína Precursora de  $\beta$ -Amiloide y observación del desarrollo de la patología EA en personas con síndrome de Down (Castellani et al., 2006), y 4) La introducción de múltiples modelos animales con mutaciones puntuales relacionadas a la acumulación de  $A\beta$  que recapitulan aspectos claves de la enfermedad (Jakob-Roetne et al., 2009).

Con el tiempo, la débil correlación de los depósitos de agregados de  $A\beta$  y el deterioro cognitivo llevó a la comunidad científica a revisar y modificar esta hipótesis. Es así que se estableció como principal agente etiológico causante de disfunción sináptica, a la fracción soluble y difusible (a menudo denominada como ADDL por sus siglas en inglés) de estas proteínas. Estas están compuestas principalmente por formas oligoméricas globulares y relativamente pequeñas que van desde desde trímeros hasta 24-meros, en lugar de las fibras insolubles y agregados más grandes como se pensaba inicialmente (Klein, 2002).

Hoy en día, esta idea es respaldada por múltiples estudios tanto *in vitro* como *in vivo* con animales transgénicos, donde se ha estudiado minuciosamente la relación entre el aumento de la producción de oligómeros, la afección en procesos neurocelulares como la potenciación a largo plazo (LTP) y los deterioros cognitivos asociados, mucho antes de la formación clara de PS (Jakob-Roetne et al., 2009.; Look et al., 2007.; Castellani et al., 2008).

### 1.1.6 Biología del péptido $\beta$ -Amiloide

Los péptidos  $\beta$ -Amiloide ( $A\beta$ ) se generan luego del procesamiento proteolítico de una proteína denominada Proteína Precursora de  $\beta$ -Amiloide (APP). Esta presenta diferentes isoformas debido a mecanismos de splicing alternativo, siendo la forma APP695 la forma predominante en neuronas (Annaert & De Strooper, 2002).

Esta proteína presenta diferentes mecanismos de modificación post traduccionales como glicosilaciones, sulfataciones, fosforilaciones y, como ya se mencionó, procesamiento proteolítico.

La APP puede seguir dos caminos diferentes, una vía no amiloidogénica y otra vía amiloidogénica. La vía no amiloidogénica inicia cuando APP es escindida por una  $\alpha$ -secretasa, generando el fragmento APPs $\alpha$  y un fragmento de C-terminal asociado a la membrana denominado APP-CTF $\alpha$ . Este último es sustrato de una enzima denominada  $\gamma$ -

secretasa, que cliva en el dominio transmembrana de APP-CTF $\alpha$ , liberando el péptido *p3* del lado extracelular y otro fragmento del lado citoplasmático, denominado AICD (Figura 1; Izquierda). Por otro lado, la vía amiloidogénica comienza cuando la proteína APP sigue la proteólisis mediada  $\beta$ -secretasa, generando un fragmento denominado APPs $\beta$  y otro fragmento asociado a la membrana llamado APP-CTF $\beta$ . Este último es clivado por una  $\gamma$ -secretasa, liberando el fragmento AICD al espacio intracelular y el fragmento A $\beta$  al espacio extracelular, el cual podrá, si existen las condiciones necesarias, adoptar diferentes estructuras conformacionales (Figura 1; Derecha) (Annaert & De Strooper, 2002; Cai et al., 2021; Tang, 2005).

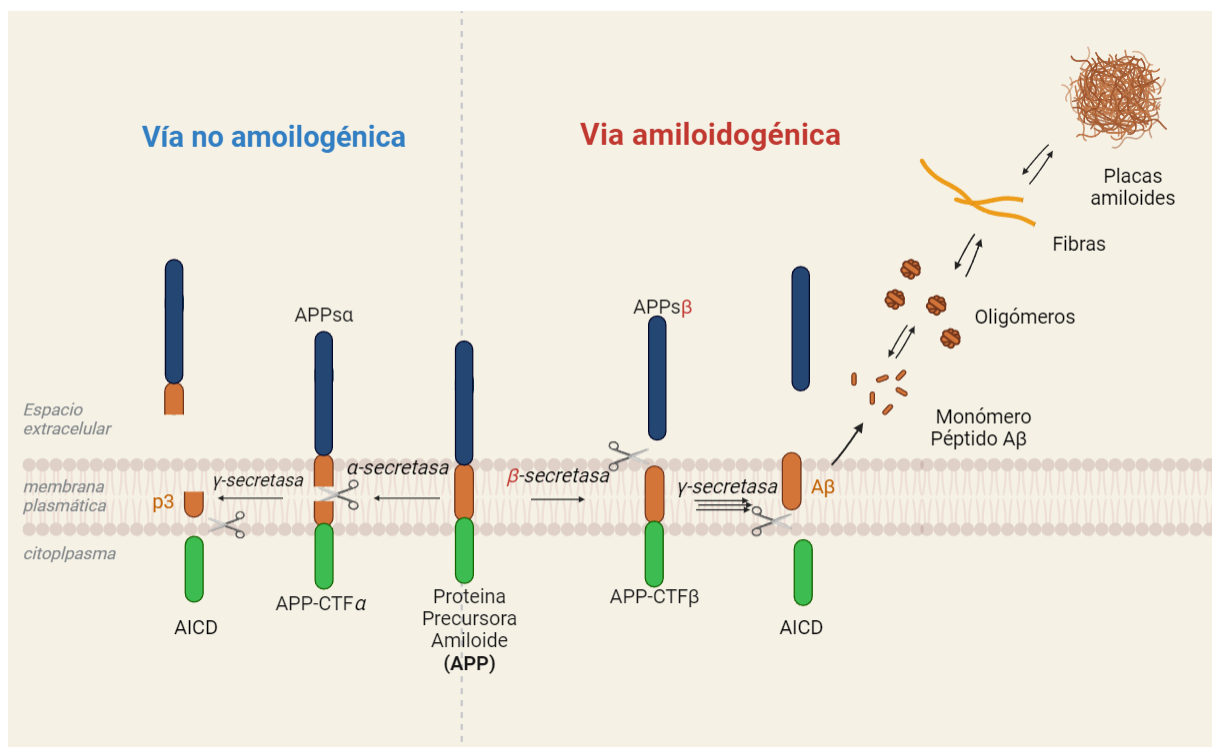


Figura 1: **Procesamiento proteolítico de la proteína APP:** Representación esquemática de la vía no amiloidogénica (izquierda) y la vía amiloidogénica (derecha) que lleva a la producción de monómeros de  $\beta$ -Amiloide de diferente longitud, que podrán, bajo condiciones particulares, adoptar la conformación de oligómeros, protofibras, fibras y agregados más grandes como placas Amiloides. Ilustración propia creada con BioRender.com

La  $\gamma$ - secretasa es una enzima multimérica de alto peso molecular compuesta de las subunidades APH1, PEN2, nicastrina y presenilina (PS1 o PS2) (Zhang et. al.,2014).

Esta secretasa tiene la capacidad de romper la secuencia peptídica de su sustrato en diferentes posiciones vecinas, lo que genera un grupo de péptidos A $\beta$  de diferentes longitudes en su extremo C-terminal. La especie cuya longitud consta de 40aa (A $\beta$ <sub>1-40</sub>) es la más abundante, representando entre el 80 y 90% de la totalidad de los A $\beta$  generados en una

persona sana. La segunda más abundante (entre 5 y 10 % aproximadamente) es la especie que contiene 42 aa de longitud ( $A\beta_{1-42}$ ). Las especies restantes son fragmentos más cortos, que incluyen  $A\beta_{1-37}$  y  $A\beta_{1-38}$  (Roland & Jacobsen, 2009).

Los fragmentos de  $A\beta_{1-42}$  tienden a ser más hidrofóbicos y fibrilogénicos, y son estas las principales especies tendientes a agregarse y depositarse en el tejido cerebral, siendo los constituyentes principales de las PS descritas anteriormente en cerebros de personas con EA (Jin et. al., 2011).

Hoy se sabe que las diferentes estructuras multiméricas de estas proteínas patológicas pueden desencadenar diferentes tipos de respuestas biológicas. Aunque en un principio las investigaciones revisaron la toxicidad de los depósitos amorfos y fibrilares de  $\beta$ -Amiloide, con el tiempo se comprendió que estos depósitos pueden representar más una consecuencia final de la patogénesis que una causa etiológica inicial de la neurodegeneración. Se entiende que entre los diferentes estados de agregación (monómero, oligómero, protofibrillas, fibras y agregados más grandes), los oligómeros resultan ser los principales agentes neurotóxicos en las fases tempranas de la EA (Sakono & Zako, 2010).

En cuanto a los mecanismos de acción neurotóxica, existen múltiples explicaciones propuestas dependiendo del tipo de célula analizada, del área del SNC, del estado metabólico o incluso de la existencia de comorbilidad con otras enfermedades (como diabetes y enfermedades cardiovasculares). Se menciona, por ejemplo, el aumento de estrés oxidativo, la activación de la microglia, la inducción de la apoptosis, la hipercolesterolemia, alteraciones en la homeostasis de calcio, el daño mitocondrial, entre otros (Santiago & Potashkin, 2021).

Con respecto a la interacción física proteína-célula, se observó que bloqueando o previniendo la unión de  $A\beta$  a la superficie neuronal se previene la pérdida de espinas dendríticas *in vitro* y se restauran los déficits cognitivos en modelos de ratón de la EA, lo que da una idea clara de la interacción de esta proteínas patógenas con ciertos tipos de receptores o moléculas de la matriz extracelular o incluso componentes estructurales de la membrana plasmática (Izzo et al., 2014; Verdier et al., 2004).

Además, se sabe que estos ADDL se unen con una alta especificidad a regiones postsinápticas de subpoblaciones neuronales específicas, donde son capaces de desatar una rápida y persistente cascada de señalización que involucra la activación de proteínas, la expresión génica y la desregulación del metabolismo celular basal, lo que termina desencadenando la patogenia como la conocemos (Look et al., 2007).

### 1.1.7 Déficits de memoria en EA

Una de las marcas distintivas de las etapas tempranas de la EA es el deterioro cognitivo leve con defectos en el aprendizaje y la memoria de trabajo, siendo estos primeros síntomas sutiles e intermitentes pero que empeoran gradualmente hasta pasar a ser un inconveniente en el desenvolvimiento cotidiano (Jahn, 2013; Walsh & Selkoe, 2004).

Por otro lado, múltiples estudios han demostrado que la disminución en el número y la densidad de las sinapsis, así como los defectos funcionales de las espinas dendríticas, ocurren en etapas tempranas de la enfermedad, precediendo mucho antes a la muerte neuronal (Walsh & Selkoe, 2004).

Las espinas dendríticas funcionan como verdaderas estructuras anátomo funcionales y permiten la compartimentalización de diferentes tipos de sinapsis, siendo esencialmente importantes en sinapsis excitatorias. Son extremadamente plásticas tanto morfológica como funcionalmente, y esta plasticidad es la base de procesos psicobiológicos como el aprendizaje y la memoria (Matsuzaki, 2007). Esta plasticidad morfofuncional depende en mayor medida de cambios en su citoesqueleto, principalmente en el citoesqueleto de actina (Hotulainen et al., 2009).

La pérdida sináptica relacionada a la pérdida de espinas dendríticas, precediendo la muerte neuronal, se ha observado en múltiples modelos animales de la enfermedad y se ha propuesto a los oligómeros de  $\beta$ -Amiloide como principales responsables. (Dorostkar et al., 2015; Fu & Ip, 2017; Knobloch & Mansuy, 2008).

Teniendo en cuenta la creciente evidencia de que los oligómeros de  $\beta$ -Amiloide son capaces de modificar la forma y función de estructuras sinápticas claves como las espinas dendríticas, resta aún identificar correctamente tanto los mediadores moleculares como sus modos de regulación implicados en las modificaciones morfológicas y funcionales de estas estructuras (Walsh & Selkoe, 2004).

## 1.2 Rho GTPasas

Las GTPasas, junto con sus reguladores y efectores, son elementos esenciales en el control de las vías de transducción de señales, las cuales impactan en prácticamente todos los aspectos de la biología celular. La mayoría de estas proteínas son miembros de una superfamilia conocida como RAS, la cual toma su nombre de la oncoproteína Ras. Los



análisis basados en la homología de sus secuencias establecieron cinco familias relacionadas evolutivamente dentro de la superfamilia RAS, a ser 1) Ras; 2) Rho; 3) Rab; 4) Arf y 5) Ran (Tetlow & Tamanoi, 2013).

### 1.2.1 Síntesis y estructura

Todas estas proteínas comparten una característica bioquímica básica, la de unir guanosina trifosfato (GTP) e hidrolizado a guanosina difosfato (GDP) y fosfato inorgánico (Pi), siendo éste un punto clave de regulación de su actividad. Para esto presentan en su estructura primaria una secuencia denominada “G box”. La unión de GTP a la “G box” se asocia a cambios conformacionales que permiten exponer una superficie de unión con alta afinidad por proteínas efectoras, mientras que la hidrólisis de GTP conduce a la reorientación de los sitios de unión a efectores hacia el interior provocando su liberación y la atenuación de la señalización. Estos cambios estructurales se limitan principalmente a dos regiones de bucle llamadas “switch1” y “switch2” (Tetlow & Tamanoi, 2013).

Dentro de la familia Rho se encuentran tres miembros muy estudiados y caracterizados hasta la fecha, siendo: el sustrato 1 de la toxina botulínica C3 relacionada con Ras (Rac1), la proteína de control de la división celular 42 (Cdc42) y el miembro homólogo A de Ras (RhoA) (Colicelli, 2004).

Las Rho GTPasas son sintetizadas en el citosol y son rápidamente preniladas por una geranilo farnesil transferasa. Posteriormente, se insertan en la hemicapa externa de la membrana del retículo endoplasmático donde diferentes enzimas inducen modificaciones postraduccionales (Figura 2A). Al completar su maduración, las Rho GTPasas se asocian con otras proteínas denominadas “Factores Inhibitorios de Disociación de Rho GTPasas” (Rho GDIs) que las mantienen en el citosol hasta tanto sean activadas evitando su degradación por los proteosomas. (Figura 2B). La adición del grupo lipofílico geranilo o farnesilo es lo que permite que las Rho GTPasas se inserten en la hemicapa interna de membrana plasmática donde, al ser activadas, se unen y activan a sus proteínas efectoras (Figura 2C). (Garcia-Mata et al., 2011).

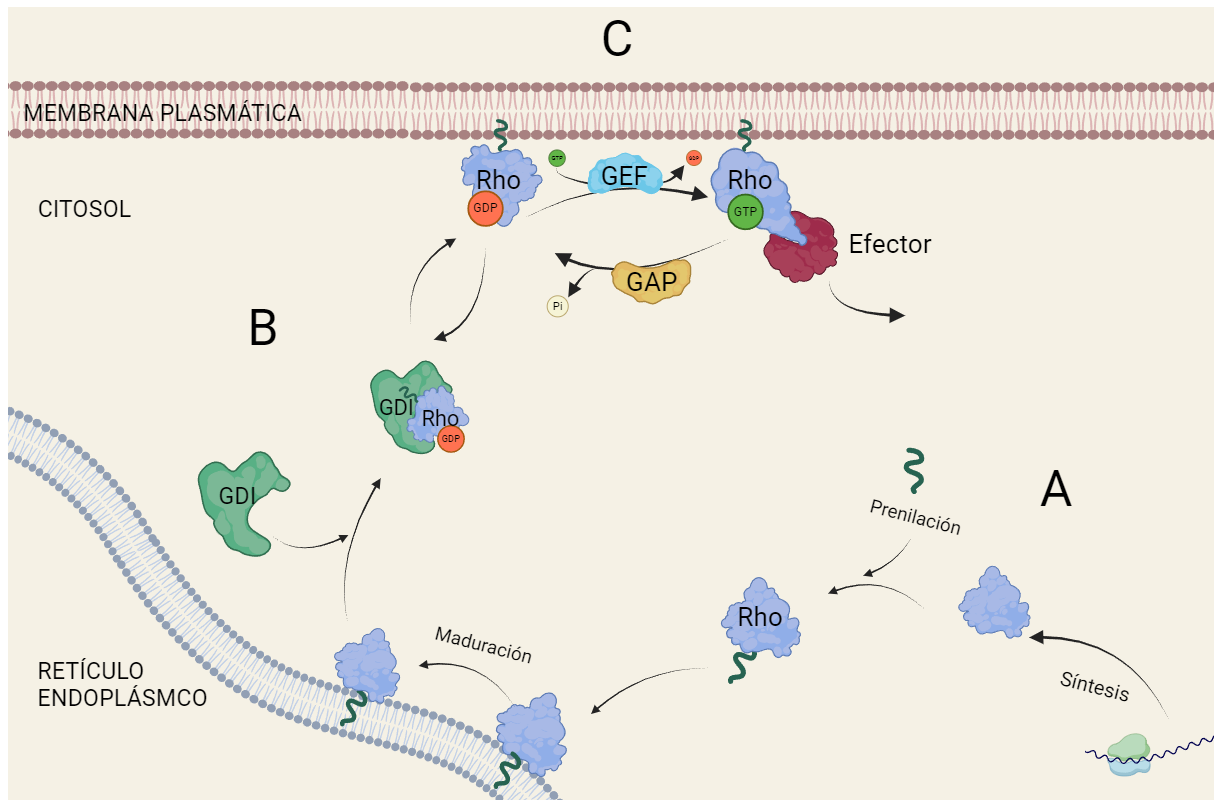


Figura 2: **Síntesis y regulación de las Rho GTPasas.** **A;** Las Rho GTPasas son sintetizadas en el citosol y luego son preniladas por una geranilo farnesil transferasa, luego se insertan a la membrana del retículo donde sufrirán diferentes modificaciones postraduccionales para su maduración. **B;** Luego se asocian a Rho GDIs en el citosol a nivel del citoplasma y así evitan su degradación. **C;** Insertas en la membrana interna de la membrana plasmática pueden interactuar tanto con GAPs o GEFs para alternar entre los estados inactivados o activados e interactuar con sus efectores. Esquema diseñado con BioRender.com

### 1.2.2 Mecanismos de regulación

Como ya se mencionó, la unión e hidrólisis de GTP les brinda a estas Rho GTPasas la capacidad de funcionar de diferente manera, según si ocurre el cambio conformacional en los bucles Switch1 y Switch 2, dependiendo de la unión a GTP o GDP. Cuando tienen unido una molécula de GTP (Rho-GTP) se encuentran activas; por el contrario, cuando hidrolizan el GTP, la proteína retoma a su estado Rho-GDP para completar el ciclo y finalizar la transducción de la señal (Kjøller & Hall, 1999).

El ciclado entre estos dos estados funcionales está altamente regulado por dos juegos de proteínas: 1) Factores de Intercambio de Nucleótidos (GEFs, por sus siglas en inglés) que promueven el intercambio de GDP por GTP y, por lo tanto, activan a las Rho GTPasas; y 2) Proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAPs, por sus siglas en inglés) que estimulan la actividad GTPasa intrínseca de las Rho GTPasas (Figura 2C) (Kjøller & Hall, 1999).

### 1.2.3 Relevancia biológica

Las funciones de estas proteínas son muy variadas, e incluyen la transducción de señales al núcleo para la expresión/represión génica, la regulación del metabolismo lipídico, la progresión del ciclo celular. Además se ha observado que una de las principales funciones es regular el ensamblado y la organización del citoesqueleto, en particular el citoesqueleto de actina (Hall, 1998).

Estas proteínas se ven implicadas en una gran cantidad de procesos celulares como la fagocitosis, la migración celular y la morfogénesis, entre otros. En cada uno de estos contextos celulares, interactúan con diferentes subpoblaciones moleculares de reguladores y/o efectores de manera precisa, funcionando como verdaderos módulos de señalización en estas complejas redes de interacción molecular (Figura 3) (Bishop & Hall, 2000; Pertz, 2010).

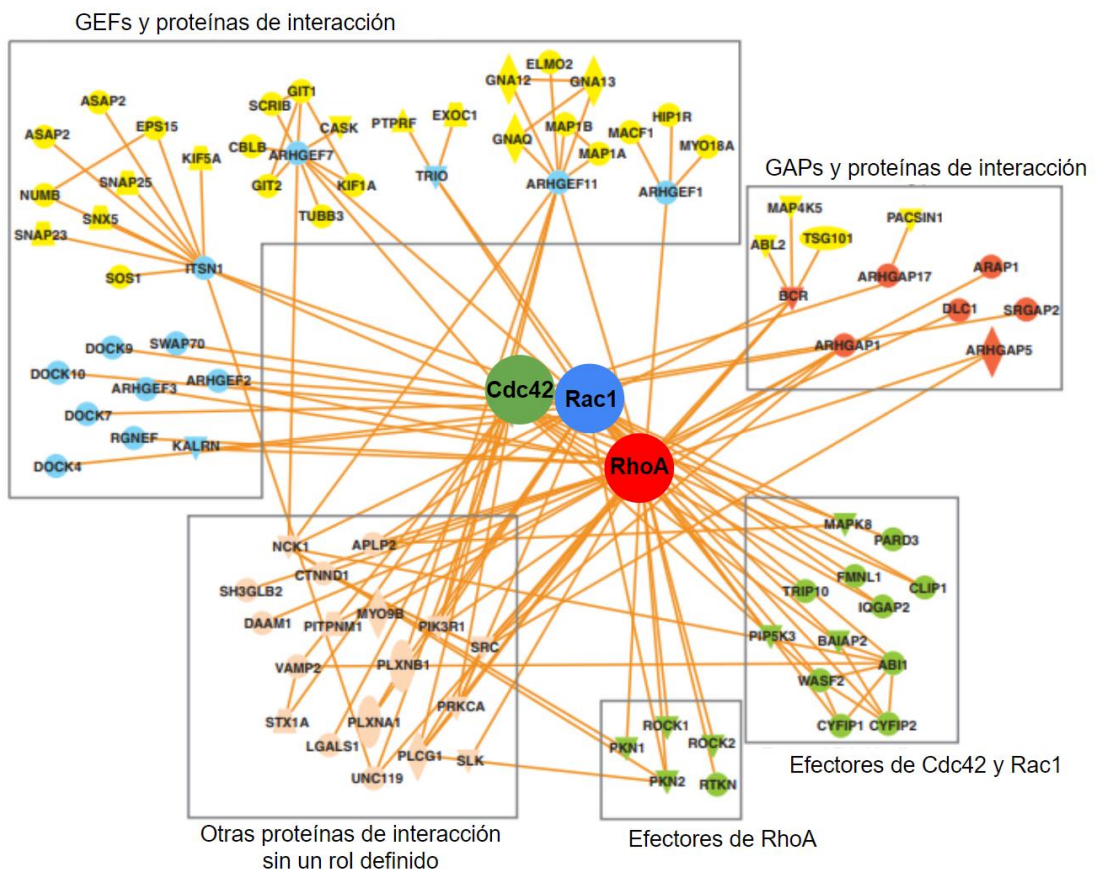


Figura 3: **Red de interacción entre Rho GTPasas durante el crecimiento neurítico.** Representación esquemática de la red de interacción de RhoA, Cdc42 y Rac1 en neuritas en crecimiento de una célula de una línea derivada de neuroblastoma. Cada línea representa la interacción proteína-proteína documentada en

literatura, en los recuadros se destacan efectores, GAPs y GEFs con funciones conocidas como desconocidas. Tomado y modificado de Pertz, 2010.

### 1.2.4 Memoria y espinas dendríticas

Las neuronas y sus conexiones, son la base para las complejas redes neurológicas que dan lugar a diferentes tipos de pensamientos, conductas, emociones y recuerdos. La comunicación en estas redes neuronales está mediada, en su mayoría, por sinapsis químicas que transmiten información desde la terminal axonal presináptica de una neurona a regiones dendríticas postsinápticas de otra. La mayoría de las sinapsis excitatorias descansan sobre pequeñas protuberancias de la superficie dendrítica de neuronas maduras, conocidas como espinas dendríticas (Figura 4A) (Chidambaram et al., 2019).

Generalmente, las espinas se clasifican morfológicamente en; Espinas delgadas o “Thin”, espinas cortas sin cuello o “Stubby” y espinas con cabeza ancha denominadas espinas hongo o “Mushrooms” (Figura 4B) (Bourne & Harris, 2008; Rochefort & Konnerth, 2012; Soria Fregozo & Pérez Vega, 2012).

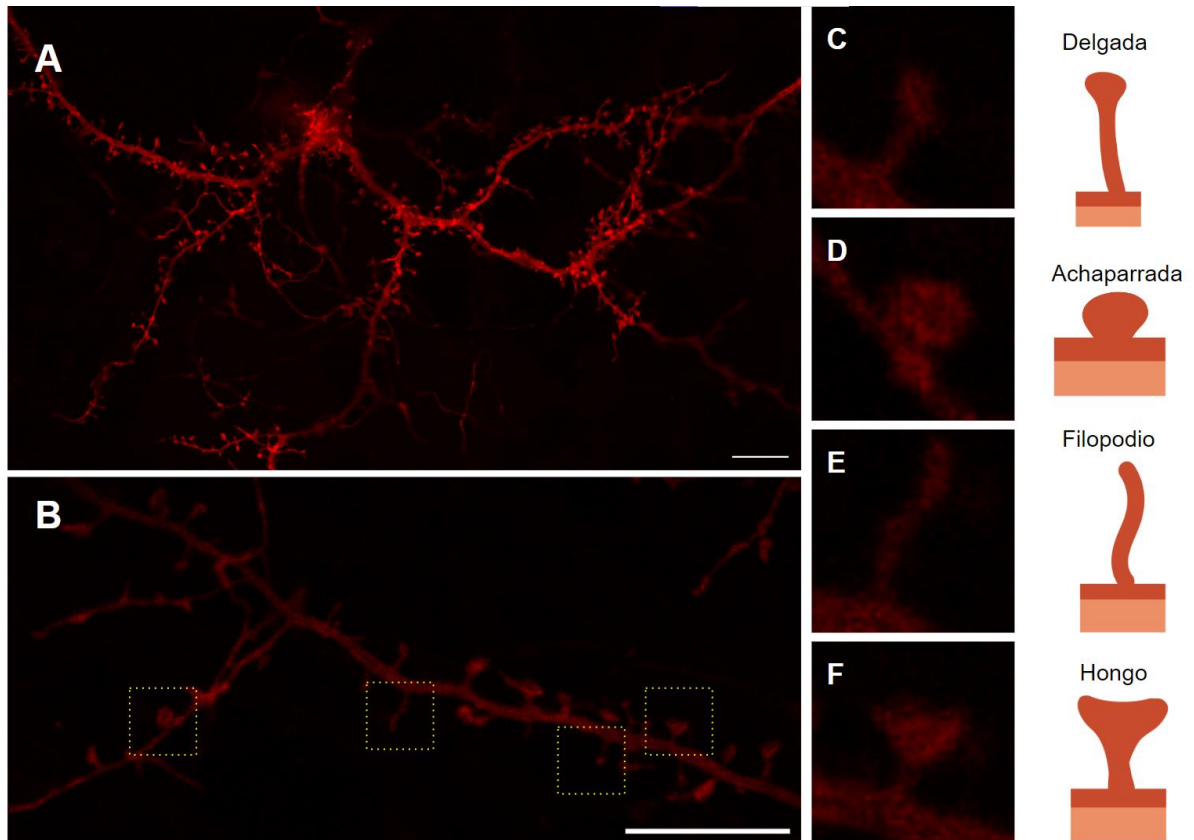


Figura 4: **Morfología de una neurona hipocampal madura típica:** A; Microfotografía de neurona madura

expresando la proteína roja fluorescente (mCherry), B; Ampliación de una dendrita con espinas dendríticas de diferentes formas. C; amplificación de una espina “delgada” y su esquema representativo, D; amplificación de una espina “achaparrada” y su esquema representativo, E; amplificación de un filopodio y su esquema representativo, F; amplificación de una espina en forma de “hongo” y su esquema representativo. Escala=10  $\mu$ m. Fotografías propias, ilustraciones diseñadas con BioRender.com.

Además, es común encontrar emergiendo del eje dendrítico unas estructuras más finas denominadas “filopodios dendríticos”, que se ha propuesto que funcionan como precursores de las espinas dendríticas durante el desarrollo neuronal. Estas estructuras establecen el contacto sináptico inicial, para luego dar lugar a la formación de una espina dendrítica propiamente dicha (Sekino et al., 2007).

Una de las características más interesantes de las espinas dendríticas es que no son estáticas, los cambios morfo-funcionales de estas estructuras guardan relación con el aumento o la disminución en la eficacia sináptica. Estos procesos regulatorios de la sinapsis son muy importantes para ciertos procesos cognitivos, como el establecimiento de la memoria. Cualquier alteración en la dinámica estructural de las espinas que afecte su funcionalidad, puede desencadenar graves trastornos neurológicos (Bourne & Harris, 2008; Kasai et al., 2010).

Todas estas modificaciones morfológicas en las espinas se dan, en mayor medida, por el reordenamiento del citoesqueleto de actina. Por ejemplo, un aumento de la polimerización se observa durante la potenciación a largo plazo (LTP), que resulta en un aumento de volumen, especialmente en la cabeza de la espina. Lo contrario ocurre en procesos de depresión a largo plazo (LTD) (Cingolani & Goda, 2008; Hlushchenko et al., 2016; Korobova & Svitkina, 2010).

Como consenso general, la activación de RhoA se relaciona con la despolimerización de actina, y se ha reportado que puede inhibir o contraer las espinas hasta eliminarlas. Por otro lado, se observó que la activación de Cdc42 induce el crecimiento de la cabeza de espinas dendríticas y la elongación de los filopodios. Uno de los mecanismos propuestos para estos cambios morfológicos asociados a la activación de Cdc42 son: la activación del complejo Arp2/3, el cual actúa como sitio de nucleación para comenzar la polimerización de actina, y la activación de cofilina, una proteína importante para la estabilización de las redes de actina (Soria Fregozo & Pérez Vega, 2012).

### 1.2.5 Cambio de perspectiva de Rho GTPasas

Con el desarrollo de técnicas más sofisticadas, como la microscopía de fluorescencia de vida media de dos fotones (2pFLIM) junto con el mejoramiento y uso de biosensores, se ha podido determinar los perfiles de activación en espinas dendríticas individuales. Se demostró que existe una mayor complejidad de lo que se pensaba en cuanto a sus patrones de activación durante el proceso de LTP y los cambios morfofuncionales asociados. Estos estudios han revelado que tanto Cdc42 como RhoA y Rac1 se activan simultáneamente durante los cambios plásticos de las espinas, y que estas activaciones son necesarias para inducir LTP. Además, estos estudios han demostrado que los patrones de activación de cada una tienen perfiles de actividad diferentes y específicos. Cdc42 muestra una actividad restringida localmente en la espina estimulada, mientras que Rac1 y RhoA muestran patrones de actividad que difunden fuera de la espina sobre el eje dendrítico. Esta actividad extendida espacialmente se cree que influye sobre espinas dendríticas adyacentes, preparándolas para una futura potenciación a largo plazo tras un estímulo adecuado (Hedrick et al., 2016).

Estos hallazgos sugieren que las proteínas Rho GTPasas tienen diferentes roles y efectos en la regulación de la plasticidad sináptica, y que su activación precisa y coordinada es esencial para mantener una función sináptica balanceada (Hedrick et al., 2016; Murakoshi et al., 2011).

Actualmente se han identificado más de 80 GEFs y 70 GAPs en humanos, la mayoría de los cuales se expresan en el cerebro con un patrón de expresión espacial y temporal particular (Ba & Nadif Kasri, 2017). Además, muchos de estos efectores son específicos para determinadas Rho GTPasas y muchos otros tienen la capacidad de interactuar con más de una de ellas (Dahmene et al 2020; Hodge & Ridley 2016).

Adicionalmente, otros modos de regulación incluyen modificaciones postraduccionales, bucles de retroalimentación positiva, antagonismo mutuo de vías opuestas, entre otros, convirtiendo a estas moléculas en actores claves capaces de orquestar múltiples señales en circuitos altamente complejos (Hodge & Ridley, .2016; Moon & Zheng, 2003)

Es así como la mala regulación de las Rho-GTPasas puede desempeñar un papel fundamental en las respuestas a lesiones neuronales, deficiencias del desarrollo neurológico y trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (Duman et al., 2022).

### 1.2.6. Potencialidad como blancos terapéuticos en EA

Como se introdujo, la pérdida sináptica, los cambios en la plasticidad neuronal y las modificaciones en las espinas dendríticas contribuyen de manera importante a los déficits cognitivos observados desde las primeras etapas de la EA. No es extraño que se hayan estudiado las Rho GTPasas debido a la íntima relación que guardan con estos procesos, sumado a que se han observado diversas desregulaciones en otros tipos de trastornos neurológicos como enfermedad de Huntington, Parkinson, Esclerosis Lateral Amiotrófica entre otros (Aguilar et al., 2017).

Resulta evidente la necesidad de conocer el papel que juegan estas GTPasas en la EA para avanzar en la búsqueda de tratamientos farmacológicos alternativos que intenten detener el progreso de esta enfermedad. El hecho de que las Rho GTPasas presenten múltiples mecanismos de regulación amplía la posibilidad de desarrollar farmacología especializada, tal es el caso de muchos estudios de tratamientos de diversos tipos de cáncer, donde se intenta corregir las disfuncionalidades de estas GTPasas pequeñas con drogas específicas. Por ejemplo, en el síndrome de Angelman, la pérdida de función de la ligasa E3 conduce a un aumento de la actividad de RhoA y a la poda anormal de las espinas dendríticas. Para atenuar los síntomas de la enfermedad, actualmente, se intenta contrarrestar farmacológicamente esta actividad exacerbada RhoA (Lefort, 2015; Lin & Zheng, 2015).

### 1.2.7 Resultados contradictorios en EA

A pesar interés reflejado en el gran número de investigaciones realizadas hasta la fecha de esta tesina, no hay un consenso claro sobre su desregulación, al menos en sus patrones de activación/desactivación, existiendo grandes contradicciones entre los diferentes autores que han intentado dilucidar el papel de estas proteínas en la EA (Aguilar et al., 2017).

Tanto para RhoA como Cdc42 y Rac1 existen algunas discordancias en estudios que abordan ya sea su expresión y/o activación en relación con la proteína patógena  $\beta$ -Amiloide. Las explicaciones de los autores son tan diversas como los distintos modelos y métodos de abordaje de estas proteínas en cada una de las investigaciones. A menudo, las discrepancias entre efectos opuestos en la administración exógena de oligómeros o fibras de  $\beta$ -Amiloide se atribuyen a los diferentes protocolos de preparación, ya que no existe un consenso claro en cuanto a la metodología de obtención de cada estado conformacional *in vitro*. El grado

de toxicidad y los niveles fisiológicamente relevantes de cada especie particular de esta proteína patógena también son aspectos que no están del todo claro y que complican aún más el análisis.

Además, estas contradicciones observadas en la activación de las Rho GTPasas se pueden atribuir a la complejidad de sus patrones espaciales y temporales de activación, que no pueden ser abordados por técnicas de análisis global como ensayos de extracción bioquímica o la utilización de proteínas mutantes constitutivamente activas o dominantes negativas (Bolognin et al., 2014).

#### 1.2.8 Medidas globales vs complejidad local

Si bien estas poderosas técnicas experimentales guiaron inicialmente el camino del conocimiento actual, se requieren técnicas novedosas capaces de sortear las limitaciones temporales y espaciales de las herramientas clásicas para estudiar estas proteínas con mayor precisión (Pertz, 2010). Este cambio de perspectiva, considerando la capacidad de estas GTPasas para variar de manera espacial a escalas micrométricas y temporalmente hasta en unos pocos milisegundos, es necesario para detectar cambios sutiles en los patrones de actividad local en dominios subcelulares particulares, como lo son las espinas dendríticas.

#### 1.2.9 Biosensores FRET

En las últimas décadas se han desarrollado y perfeccionado una gran cantidad de biosensores basados en la técnica de Transferencia de Energía por Resonancia de Förster (FRET).

Uno de los mayores problemas al determinar la actividad de las Rho GTPasas es su bajo rango dinámico de activación. Esto se da porque en cualquier momento solo una pequeña fracción de ellas está activa. Incluso un potente estímulo que genere un cambio fenotípico notable, puede llevar a que solo un 5% del total de las Rho GTPasas se encuentre activa en un momento dado, sumado a que gran parte de estas Rho GTPasas se encuentran en el citosol (unidas a las GDI), con lo cual su mera distribución subcelular no puede ser evidenciada como un patrón espacial de actividad (Pertz, 2010; Quassollo et al., 2015). El desarrollo de biosensores de actividad basados FRET soluciona este problema ya que,



utilizados correctamente, evidencian la población de Rho GTPasas activas sobre las inactivas.

Existe un subtipo de biosensores de FRET que se conoce como “biosensores unimoleculares”. En estos biosensores, el fluoróforo donador y el fluoróforo aceptor se encuentran en la misma molécula y la transferencia de energía mediante FRET entre ambos fluoróforos es intramolecular. Así, la distancia entre el donador y el aceptor, como así también la orientación relativa entre estos fluoróforos, son dos factores muy importantes que determinan la eficacia FRET. En el estado inactivo, la estructura tridimensional de los biosensores mantiene una distancia y/u orientación entre ambos fluoróforos que determinan una baja eficacia FRET, mientras que al activarse, se produce un cambio estructural que acerca el donador al aceptor y/o cambia su orientación, haciendo que la eficiencia de FRET aumente (Figura 5).

Los biosensores de segunda generación de las GTPasas RhoA, Rac1 o Cdc42 poseen en el extremo libre de su estructura el fluoróforo donador (mTFP1: Proteína fluorescente cian) unido por un péptido al Dominio de Unión a Rho (RBD por sus siglas en inglés), al cual estas GTPasas se unen tras su activación. A continuación, poseen otro péptido de enlace al fluoróforo aceptor (Venus: Proteína fluorescente amarilla), el cual se encuentra unido a la Rho GTPasa; RhoA, Rac1 o Cdc42 (Figura 5).

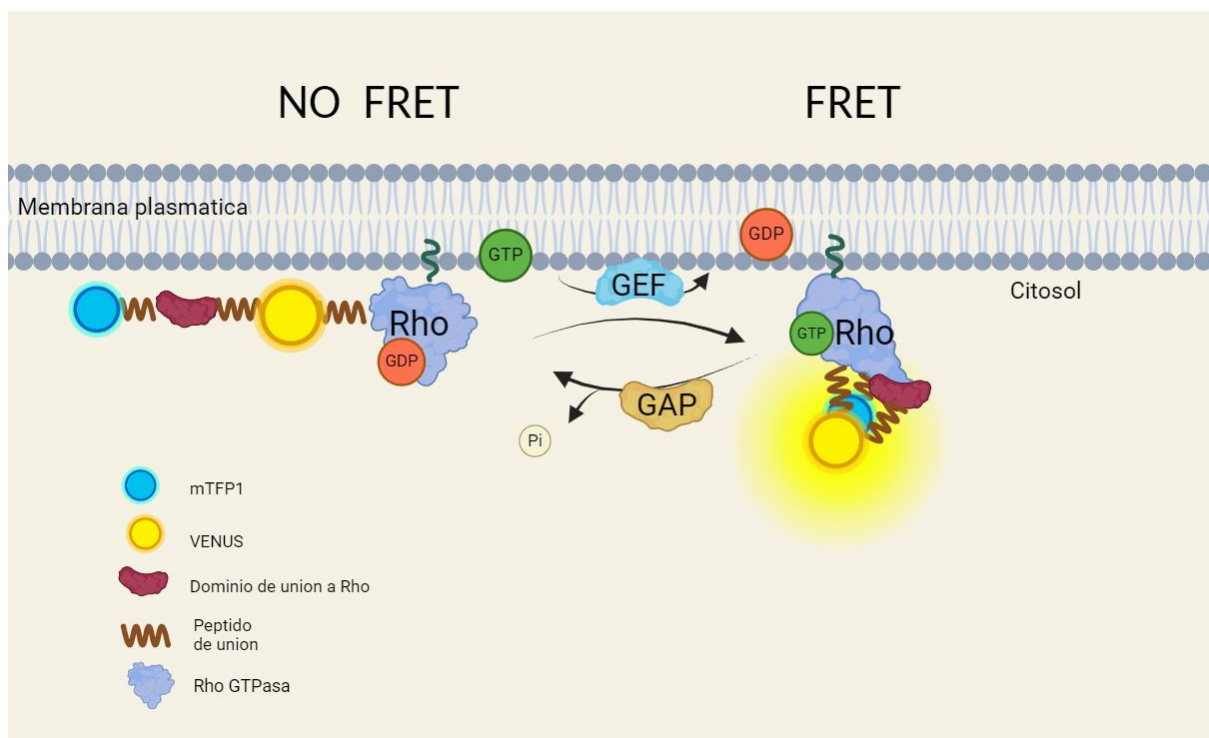


Figura 5: **Representación esquemática del funcionamiento de un Biosensor FRET unimolecular.** IZQUIERDA: Cuando la Rho GTPasa se encuentra unida a GDP la estructura se encuentra relajada de tal manera que la distancia y/o la orientación de los fluoróforos no permite la transferencia de energía por

resonancia. DERECHA; La unión de GTP induce un cambio conformacional que acerca y/o reorienta los fluoróforos de tal forma que permite la transferencia de energía por resonancia. Esquema diseñado con BioRender.com.

Una ventaja de este diseño es que no es necesaria la adición de un dominio polibásico CAAX en el extremo C terminal para que pueda insertarse en la membrana plasmática (como ocurre con los Biosensores Raichu), lo que permite que el extremo C terminal de la Rho GTPasa quede libre de ser prenilado por la enzima geranyl transferasa intracelular y, por lo tanto, pueda interactuar normalmente con las GDIs (Fritz et al., 2013).

Múltiples estudios han demostrado como, con la utilización de estos sensores, se ha podido dilucidar la complejidad de los patrones de actividad que tienen estas Rho GTPasas en ciertos eventos biológicos particulares (como el establecimiento de la polaridad neuronal) o en dominios subcelulares particulares (como el aparato de Golgi o el cono de crecimiento axonal) (Bisbal et al., 2018; Fritz et al., 2013; Pertz et al., 2006; Quassollo et al., 2015; Wojnacki, 2023). Por lo tanto, pueden resultar óptimos para establecer con claridad las alteraciones en la actividad de las Rho GTPasas en los eventos patógenos que dan lugar a la pérdida de espinas dendríticas en enfermedades neurodegenerativas, y en particular en la enfermedad de Alzheimer.

# 2

## OBJETIVOS

### Hipótesis

Los resultados contradictorios con respecto a la desregulación en la activación de las Rho GTPasas, observado en múltiples estudios que abordan a estas proteínas en desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, podría deberse a la complejidad que subyace a su dinámica de activación y en la red de interacción de estas proteínas, las cuales presentan un patrón espacial y temporal complejo a nivel celular y subcelular. Nuestra hipótesis es que los oligómeros de  $\beta$ -Amiloide desencadenan un patrón de activación espacio temporal específico, que involucra tanto ciclos de activación como inactivación para cada una de las Rho GTPasas, tanto en el eje como en las espinas dendríticas de neuronas hipocampales en cultivo.

### Objetivo general

Dada la importancia de estudiar las modificaciones en los patrones de activación de las Rho GTPasas en el contexto de la enfermedad de Alzheimer, su estudio y esclarecimiento representará un aporte esencial al entendimiento de la patogenia de la enfermedad y al futuro desarrollo de fármacos para tratar de manera temprana la enfermedad. Por lo tanto, nuestro objetivo principal es aportar al conocimiento de esta área, dilucidando las alteraciones en los patrones de activación de RhoA, Cdc42 y Rac1 en el eje y las espinas dendríticas de neuronas hipocampales, tras la exposición aguda a la proteína patógena  $\beta$ -Amiloide. Para esto, utilizaremos biosensores basados en FRET, una técnica que nos permitirá analizar la actividad de estas proteínas de manera espacial y temporal precisa.

### Objetivos específicos

1. Estudiar el patrón temporal de activación de las Rho GTPasas canónicas: RhoA, Rac1 y Cdc42 en líneas celulares derivadas de neuroblastoma durante la exposición temprana y tardía a oligómeros de  $A\beta_{1-42}$ .
2. En base a los resultados obtenidos con líneas celulares, y tomando la ventana de tiempo más relevante, evaluaremos la dinámica de activación temporal en los procesos dendríticos de neuronas hipocampales maduras en cultivos *in vitro*.
3. Luego se realizará un análisis en alta resolución del patrón espacial de activación de las Rho GTPasas en las dendritas de neuronas hipocampales en cultivo, prestando especial atención al comportamiento de estas GTPasas en las espinas dendríticas, en particular las espinas en forma de hongo.

# 3

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Cultivo de Neuronas Hipocampales

#### 3.1.1 Extracción y siembra

Los cultivos se prepararon siguiendo el protocolo de Kaech & Banker (2007) con algunas modificaciones. Los cultivos primarios de neuronas piramidales de hipocampo se realizaron utilizando hipocampos de embriones de *Rattus norvegicus* (Wistar) de 19 días de gestación (E19). Las ratas madres fueron sacrificadas en una cámara de CO<sub>2</sub> y posterior dislocación cervical. Los embriones fueron removidos de la cavidad abdominal, colocados en una cápsula de petri esteril y decapitados. Las cabezas de los embriones fueron colocadas en otra cápsula de petri esteril en solución HBSS (Solución Salina Balanceada Hank's) frío. Bajo lupa y mediante el empleo de instrumental quirúrgico para microdissección se procedió a la disección de los hipocampos. Los hipocampos obtenidos fueron colectados en un tubo esteril e incubados durante 15 minutos en una solución de tripsina 0,25 % (Gibco 15090-046) en HBSS a 37°C en un baño termostatzado. El tejido nervioso se precipitó mediante centrifugación leve y luego fue suspendido en medio “de siembra”. El tejido tripsinizado fue disociado mecánicamente con el uso de una pipeta automática. Finalmente, las neuronas fueron sembradas a una densidad aproximada de 25000 neuronas por cm<sup>2</sup> en vidrios de 12 milímetros de diámetro previamente tratados con poli-D-Lisina. El medio de siembra fue; MEM10, suplementado con 1% glucosa, 10% Suero de Caballo (Thermo) y 0,5 mM de glutamina (Thermo) y 1% de antibiótico/antimicótico.

Es importante destacar, que tanto los protocolos de cultivo de neuronas de rata (Res 001-2021 A) como el actual proyecto marco de investigación (Res. 02-2023) en el cual se incluye esta tesina, han sido evaluados y aprobados por el Comité institucional para el

cuidado y uso de animales (CICUAL-INIMEC), [www.institutoferreyra.org/cicual/](http://www.institutoferreyra.org/cicual/)) del instituto de investigaciones médicas Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC-CONICET), espacio donde se realizaron todos los experimentos.

### 3.1.2 Mantenimiento

Durante las 2 primeras horas posteriores a la siembra, los cultivos fueron mantenidos en medio de siembra para permitir la adhesión de las neuronas al sustrato. Posteriormente se realizó el cambio de medio por medio de mantenimiento (Neurobasal<sup>TM</sup>/B27). Desde la siembra hasta el momento de fijación los cultivos fueron mantenidos en un incubador húmedo a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %.

### 3.1.3 Vidrios de cultivo

Los vidrios de cultivo se incubaron unos 5 minutos en alcohol 70%, se pasaron por alcohol a 96% otros 5 minutos y luego fueron flameados y estufados a 180° durante 2 horas. Luego en una mesa de flujo laminar, los vidrios fueron tratados con poli-L-lisina (1 mg/ml, disuelta en solución tampón borato 0.1M pH 8.5) durante 24 horas a temperatura ambiente. Luego del tratamiento con poli-L-lisina se lavaron los vidrios con agua bidestilada esteril en 4 ciclos de 20 minutos. Finalmente se agregó medio de siembra 3-5 días antes de realizar la siembra de las neuronas.

## 3.2 Cultivo de líneas celulares

### 3.2.1 Descongelado

Nuestro shock de células se mantuvo a -80°C hasta el momento de su uso. Para el descongelado de cada criovial conteniendo las células, inicialmente se descongelaron en baño húmedo a 37°C, posteriormente se pasaron a un tubo de 15mL esteril y se le agregó 4 mL de DMEM-10 a 37 °C. Posteriormente mediante centrifugación suave se procedió a precipitar las células. Finalmente las células se suspendieron en medio DMEM-10 a 37 °C y se sembraron en cápsulas de petri.

### 3.2.2 Mantenimiento

Las células de la línea Neuro2A (ATCC CCL-131) fueron mantenidas en medio DMEM-10 en cápsulas de petri en un incubador húmedo a 37 °C y CO<sub>2</sub> 5 %.

### 3.2.3 Repique

Cada repique celular se realizó de la siguiente manera; inicialmente se procedió a eliminación del medio de mantenimiento y posterior lavado con HBSS a 37 °C. Para levantar las células de la cápsula de petri, se procedió al tratamiento con una solución de tripsina 0,25 % en HBSS a 37 °C durante 5 minutos. Pasando los 5 minutos detuvo la reacción enzimática duplicando el volumen con medio DMEM-10 nuevo a 37 °C. Con la ayuda de una pipeta automática se procedió a disgregar mecánicamente cualquier agregado que pudiera formarse. Posteriormente se pasaron a un tubo esteril de 15 mL para precipitar las células mediante centrifugación suave. Finalmente las células se suspendieron en medio DMEM-10 a 37 °C y se sembraron en cápsulas de petri para mantener la línea celular o en vidrios de microscopía para realizar los experimentos correspondientes. La densidad de siembra en vidrios, fue de aproximadamente de 10.000 a 15.000 células/cm<sup>2</sup>..

### 3.2.4 Vidrios de cultivo

Los vidrios de cultivo se incubaron unos 5 minutos en alcohol 70%, se pasaron por alcohol a 96% otros 5 minutos y luego fueron flameados y estufados a 180° durante 2 horas.

## 3.3 Transfecciones

### 3.3.1 Neuronas hipocampales

Inicialmente se preparó una solución con 125  $\mu$ L Neurobasal<sup>TM</sup>/B27 con 4  $\mu$ L de Lipofectamina 2000 (Invitrogen 11668-019) y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. En paralelo se preparó una solución con 125  $\mu$ L Neurobasal<sup>TM</sup>/B27 y de 4  $\mu$ g de ADN plasmídico. Al cabo de 5 minutos se mezclaron las soluciones y se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego, se agregó la solución lipofectamina/ADN a la cápsula (p35 con 2 mL de su medio condicionado) con las neuronas

a los 8-9 días *in vitro* (DIV) y se mantuvo hasta el momento de la fijación de 17 a 21 DIV en un incubador húmedo a 37 °C y CO<sub>2</sub> 5 %.

### 3.3,2 Líneas celulares

Inicialmente se preparó una solución con 125 µL de NaCl 150 mM más 3 µL PEI y 3 µg de ADN plasmídico, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se agregó a cada una de las placas (p35 con 2 mL de medio DMEM-10) durante 24 horas en incubador húmedo a 37 °C y CO<sub>2</sub> 5 %.

## 3.4 Diferenciación líneas celulares Neuro2A

Para inducir la diferenciación de las líneas celulares, se procedió a quitar el medio de mantenimiento (DMEM-10 suplementado con 10% de suero fetal bovino) por un medio de diferenciación (DMEM-10 suplementado con 2% de suero fetal bovino y ácido Retinoico (RA) 20 µM). Este medio se reemplazó cada 48 horas durante 7 días, durante este período de tiempo las células se mantuvieron en un incubador húmedo a 37 °C y CO<sub>2</sub> 5 %.

### 3.4.1 Evaluación de la diferenciación por morfometría

Todas las cuantificaciones de longitud de procesos e intensidad de fluorescencia y tratamiento de las imágenes fue realizado con el programa ImageJ/Fiji. Las imágenes de los experimentos de diferenciación de la línea Neuro2A, fueron adquiridas en un microscopio de fluorescencia convencional (Nikon T200). Posteriormente las imágenes se escalaron con el programa ImageJ/Fiji, mediante una imagen de una regla milimétrica adquirida en el mismo microscopio y con el mismo objetivo.

### 3.4.2 Evaluación de la diferenciación por inmunocitoquímica

Las imágenes donde se cuantificó la intensidad de fluorescencia fueron adquiridas en un microscopio de fluorescencia convencional (Nikon T200). Una vez que se configuró el microscopio en la primera imagen adquirida, se mantuvo la misma configuración para la adquisición de todas las imágenes siguientes.



*Los anticuerpos primarios fueron: Anti Tubulina Tirosinada [1/1000] (Sigma Aldrich), anti Map2 [1/1000] (Sigma Aldrich),*

*Los anticuerpos primarios fueron: Anti IgG de Ratón. Alexa Fluor 568 [1/100] (Molecular Probes) y Anti Gallina. Alexa Fluor 647 [1/100] (Molecular Probes).*

### 3.5 Fijación

Al momento de fijar los cultivos primarios o las líneas celulares, se les retiró el medio y se agregó el fijador Paraformaldehído 4 % (p/v) / sacarosa 4 % (p/v) en PBS 1X (pH 7,2; 0,1 M) a 37°C durante 20 minutos. Finalmente, se descartó el fijador, se realizó un lavado con PBS 1X y se mantuvieron las células en PBS 1X hasta que fueran montadas o realizada la inmunomarcación correspondiente.

### 3.6 Inmunofluorescencia

Inmediatamente luego de la fijación de las células, se realizó la permeabilización con una solución con detergente no iónico Tritón-X100 0,2 % v/v en PBS 1X durante 5 minutos. Posteriormente se lavaron las células con PBS 1X 3 veces durante 5 minutos cada uno. Para bloquear la inmunomarcación inespecífica, se trataron los vidrios con una solución de Tween-20 al 0,2 % v/v en PBS 1X durante 5 minutos repitiendo 2-3 veces la incubación. Luego se retiró la solución y se agregó una nueva solución de Tween-20 al 0,2 % v/v en PBS 1X con los anticuerpos primarios correspondientes, incubando durante 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación de la incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con Tween-20 al 0,2 % v/v en PBS 1X y se agregó una solución de Tween-20 al 0,2 % v/v en PBS 1X con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 60 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con Tween-20 al 0,2 % v/v en PBS 1X y un último lavado con PBS 1X. Los vidrios se montaron en un portaobjetos, usando como medio de montaje 10 µl de Fluorsave (Calbiochem) por vidrio.

### 3.7 Biosensores de actividad Rho GTPasas (RhoA, Cdc42 y Rac1)

El biosensor de RhoA tipo salvaje (WT) y sus mutantes constitutivo activo (Q63L) y dominante negativo (T19N) fueron cedidos amablemente por Matsuda (Kurokawa & Matsuda, 2005). Los biosensores de segunda generación; RhoA-2G, Cdc42-2G y Rac1-2G fueron diseñados y cedidos amablemente por Dr. Pertz (Martín et. al. 2016) con quien mantenemos una activa colaboración.

#### 3.7.1 FRET Radiométrico

Las imágenes que se tomaron para el análisis de FRET radiométrico se realizaron en un microscopio confocal Zeiss LSM 980 o un microscopio Olympus IX81 equipado con unidad de disco giratorio (DSU), equipados con un láser de argón multilínea, ambos ubicados en Centro de Micro y Nanoscopia de Córdoba (CEMINCO). Debido a los problemas que puede causar la sobreexpresión de Rho GTPasas con respecto a los niveles endógenos de las mismas es que en todos los casos se adquirieron imágenes de células con los niveles de expresión relativamente intermedios. Para realizar los mapas FRET radiométricos se adquirió una imagen del canal del donador (excitación del donador y adquisición de la emisión del donador: 480 - 495 nm) y otra del canal de FRET (excitación del donador y adquisición en el canal del aceptor: 535 - 565 nm) en simultáneo y excitando solo con un láser de 458 nm (donador). Todo el tratamiento de las imágenes y la cuantificación se realizó con el software libre ImageJ/Fiji. Al estar el donador y el aceptor en la misma proteína, ambos están idénticamente distribuidos en las células que los expresan, lo que genera que las contribuciones del sangrado inespecífico del donador y la posible excitación inespecífica del aceptor sea la mismas en cualquier lugar de la célula analizada, por lo tanto no es necesaria tal corrección y el cálculo del mapa de FRET se puede realizar con la siguiente relación matemática:

$$\text{Mapa FRET} = \text{Intensidad del canal FRET} / \text{Intensidad del canal del donador}$$

A cada imagen primero se le sustrajo la señal de fondo y se le corrigió la iluminación desigual en las imágenes mediante la aplicación de la función "Background Subtraction" y un filtro "Smooth". Además se corrigió cualquier desalineación entre las dos imágenes con el plugin "MultiStackReg", posteriormente se estableció un umbral en cada una de las imágenes y se aplicó NaN (Not a number) para eliminar del análisis cualquier región de la

imagen que no fuera la célula de interés. Finalmente se le aplicó la escala de pseudo colores “16 colours” a los mapas de FRET para evidenciar la actividad espacial de los biosensores.

Las cuantificaciones de la eficiencia de FRET radiométrico se realizaron seleccionando células completas o áreas de interés como procesos dendríticos y/o espinas dendríticas de diferentes tipos.

### 3.7.2 Macro

Utilizando el lenguaje de programación de ImageJ, se diseñó código MACRO para realizar un procesamiento semiautomático de las imágenes obtenidas en cada microscopio. La misma se encuentra disponible para su uso libre en ANEXO.

## 3.8 Preparación de Oligómeros y fibras de $\beta$ -Amiloide

Los péptidos de A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Secuencia Humana) se obtuvieron de Biopeptide (San Diego, CA.) producidos mediante síntesis química con una pureza del 95% verificada mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa. Tanto para la solubilización como para la preparación de las diferentes estructuras conformacionales se siguió el protocolo de Stine y col. (2002), brevemente; previo a la resuspensión a cada vial se lo dejó equilibrar con la temperatura ambiente luego trabajando en campana de flujo vertical, se disolvieron los péptidos en 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) y rápidamente se alicuotó en tubos de microcentrífuga conteniendo 45  $\mu$ g/tubo. El HFIP fue removido mediante evaporación con trazas eliminadas al vacío, resultando en películas peptídicas que se almacenaron a -20° C. Luego con cada alícuota se permitió que alcanzara la temperatura ambiente, antes de disolver hasta 5mM en Dimetilsulfóxido anhidro (DMSO) adicionalmente, para disolver la totalidad de la película peptídica se procedió a sonicar durante 10 min la muestra, posteriormente se añadió medio F12 sin rojo fenol, enfriado en hielo, para obtener una solución 100  $\mu$ M. Inmediatamente la solución se mezcló en vortex durante 10 s y se incubó a 4° C durante 24 horas. Luego de la incubación se centrifugó a 14.000 g durante 10 minutos a 4° C para precipitar protofibrillas y agregados más grandes que pudieran formarse en el proceso. El sobrenadante conteniendo los oligómeros A $\beta$ <sub>1-42</sub> se traspasó a otro tubo esteril para su posterior uso. Para la preparación de fibras se procedió igual hasta la suspensión en DMSO y luego se llevó a 100  $\mu$ M con HCl 10 mM, se mezcló con vortex y se incubó a 37 °C por 24 horas, en este caso, posterior a la incubación no se

realizó la centrifugación. Las distintas estructuras conformacionales se caracterizaron con microscopía de fuerza atómica (AFM).

### 3.8.1 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Las diferentes estructuras conformacionales se caracterizaron utilizando un microscopio de sonda de barrido (SPM - Scanning Probe Microscope) Agilent Technologies 5500 el que se encuentra ubicado en el Instituto de Investigaciones en Físico-Química de Córdoba (INFIQC). Todas las imágenes fueron obtenidas utilizando el modo de contacto intermitente (The acoustic AC model) con sondas de AFM de silicio marca Budget Sensors (radio de punta <10nm) operando a una frecuencia de resonancia de 169 kHz y constante de fuerza de 5 Newton/metro. Velocidades de barrido utilizada: 0.3-0.6 línea/s. Resolución de las imágenes 512 px. Se colocaron entre 10 y 50 µl de solución de muestra sobre una hoja de mica recién cortada y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, se enjuagaron con agua pura desionizada filtrada (filtro de 0,02 µm) y se secaron con Nitrógeno gaseoso. Las imágenes se procesaron con el software gratuito y de código abierto Gwyddion 2.62.

## 3.9 Tratamiento de neuronas hipocampales y líneas celulares

Tanto para la línea celular Neuro2A como para las neuronas hipocampales de 17-21 DIV optamos por la exposición aguda a oligómeros de β-Amiloide a una concentración de 1 µM, por ser una concentración fisiológicamente relevante para estudios *in vitro* de EA (Mendoza-Naranjo et al., 2007).

Todos los tratamientos contaron con sus respectivos controles, que en cada caso consistió en la incubación con el vehículo de la preparación de los oligómeros de β-Amiloide, el cual correspondía a una solución de 2% de DMSO en medio F12 sin la proteína patógena β-Amiloide. Para finalizar la exposición en cada experimento, se extrajo el medio de incubación y se fijó inmediatamente según lo descrito anteriormente.

# 4

## RESULTADOS

### 4.1 Caracterización de las estructuras conformacionales de A $\beta$ <sub>1-42</sub>

Previo a todos los experimentos que se realizaron para evaluar la respuesta de las Rho GTPasas a la toxicidad de la proteína patógena  $\beta$ -Amiloide, corroboramos la correcta formación de las diferentes estructuras conformacionales obtenidas con nuestro stock de péptidos  $\beta$ -Amiloide utilizando el protocolo descrito por Stine y col., (2003).

Para ello, utilizamos Microscopía de Fuerza Atómica. Siguiendo el protocolo de formación de oligómeros, obtuvimos una solución homogénea compuesta de oligómeros de diferentes tamaños, sin la presencia clara de protofibrillas, fibras u otras estructuras más grandes (Figura 6B). Aplicando el protocolo de preparación de fibras, encontramos que además de la presencia de fibras, se encontraban en solución partículas oligoméricas (Figura 6C).

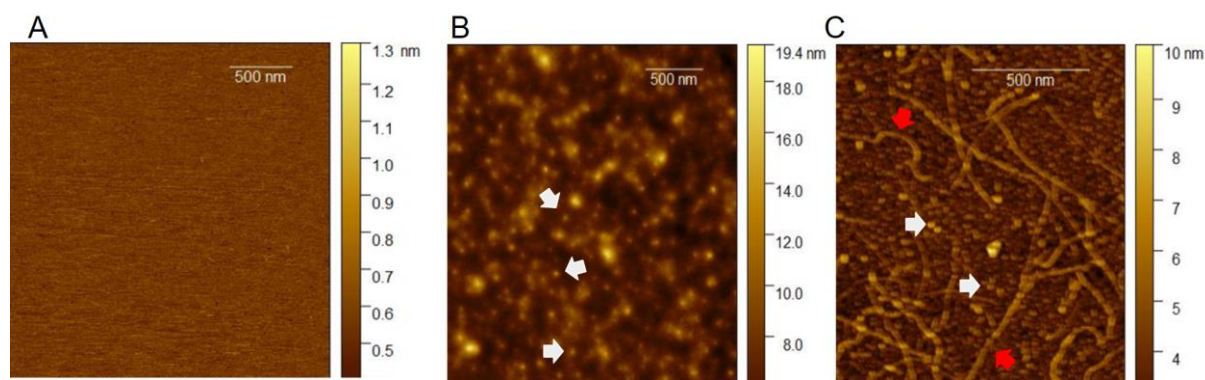


Figura 6: **Fotomicrografías de Microscopía de Fuerza Atómica:** A; preparación control sin péptido, B: Preparación de oligómeros de  $\beta$ -Amiloide, C: Preparación de fibras de  $\beta$ -Amiloide. Las flechas blancas señalan estructuras globulares de diferentes tamaños los cuales se corresponden a los oligómeros de A $\beta$ <sub>1-42</sub>, las flechas rojas indican las fibras de A $\beta$ <sub>1-42</sub>.

## 4.2 Controles de los biosensores de FRET

Con el objeto de determinar nuestra capacidad de medir diferencias en la eficiencia de FRET en relación a actividad de las Rho GTPasas, transfectamos células de la línea Neuro2A con los biosensores de RhoA: dominante negativo (T19N), salvaje (Wt) y constitutivamente activo (Q63L). Se optó por esta línea por el hecho de que presentan una serie de características óptimas para nuestro trabajo, como su rápida reproducibilidad, manejo y facilidad para la incorporación de los plásmidos de interés, etc.

Luego de la adquisición de las imágenes y el análisis de los mapas de FRET radiométrico de las mismas en la totalidad celular, observamos que el nivel de actividad estaba dentro del nivel teórico esperado (entre 0.1 y 1) (Figura 7A). Nuestro “n” fue relativamente bajo para la variabilidad encontrada en las células de esta línea celular, sin embargo fue suficiente observar las tendencias generales y los puntos máximos y mínimos para cada biosensor (T19N, WT, Q63L) y similares a los publicados previamente para estos sensores (Wojnacki et. al. 2023 ;Yoshizaki et. al.,2003)

Así, observamos que en nuestras condiciones experimentales fuimos capaces de observar diferencias en cuanto a la eficiencia de FRET de los biosensores, siendo relativamente bajos como esperábamos para el mutante dominante negativo, intermedios para el tipo salvaje y mayores para el mutante constitutivamente activo. Por otro lado, al observar los mapas FRET de los mutantes, notamos una mayor homogeneidad en cuanto a su patrón espacial en la totalidad de la célula (Fig. 7B-C), mientras que en el tipo salvaje, observamos que existen regiones que exhiben mayor o menor actividad que otras (Fig 7D). Esto se corresponde con el hecho de que los mutantes suelen tener impedimentos para responder a sus reguladores (GAPs y GEFs), mientras que el biosensor del tipo salvaje, responde a las diferentes proteínas reguladoras, las cuales suelen ejercer su influencia en diferentes puntos celulares, como por ejemplo lo que se observa en el borde celular y en particular en la zona periférica sin filopodios.

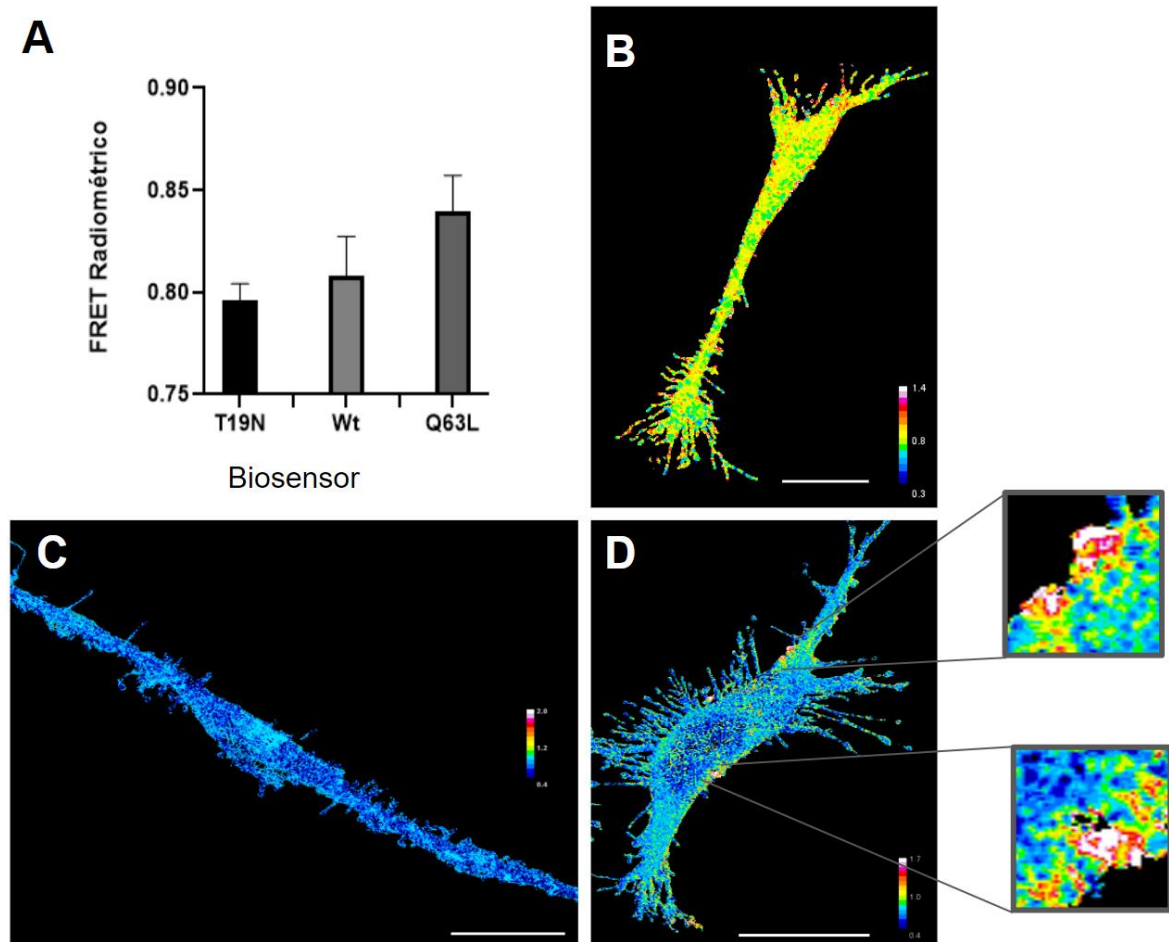


Figura 7: Control de FRET Biosensores de RhoA del tipo salvaje (WT), mutante dominante negativo (T19N), mutante constitutivo activo (Q63L). A; Cuantificación de FRET Radiométrico en la totalidad celular para cada biosensor de RhoA, las barras representan el promedio con su desviación estándar. B; Mapa FRET representativo de las células transfectadas con el biosensor constitutivo activo (Q63L), C: Mapa FRET representativo de las células transfectadas con el biosensor dominante negativo (T19N), D; Mapa FRET representativo de las células transfectadas con el biosensor Raichu tipo salvaje (WT). La escala de color representa mayor activación de RhoA para colores cálidos y su inactivación para colores fríos. Las magnificaciones remarcan zonas con mayor variabilidad de la actividad de RhoA. Las escalas corresponden a 20  $\mu\text{m}$ .

### 4.3 Dinámica temporal de la actividad de Rho GTPasas en líneas celulares

Inicialmente, nos propusimos evaluar la sensibilidad de nuestros biosensores de segunda generación de Rho GTPasas, para detectar cambios en los patrones de activación de las tres Rho GTPasas, luego de un estímulo inducido por una exposición a oligómeros de  $\text{A}\beta_{1-42}$ . Para esto optamos por la utilización de la línea celular derivada de neuroblastoma denominada Neuro2A. Luego de transfectar las células con los diferentes biosensores, las expusimos a 1  $\mu\text{M}$  de oligómeros de  $\text{A}\beta_{1-42}$  durante 5 minutos o un control sin péptidos.

Observamos que a los 5 minutos de exposición, A $\beta$  desencadenó un aumento significativo en la activación de RhoA, una disminución en la de Rac1 y no afectó la activación de Cdc42 (Figura 8). Posteriormente, analizamos si los oligómeros eran capaces de alterar la actividad de estas Rho GTPasas de manera sostenida en el tiempo. Para esto tratamos las células con A $\beta$ <sub>1-42</sub> o un control sin péptido a diferentes intervalos de tiempo que comprendieron 10, 20, 30 minutos, 1, 3 y 24 horas (Figura 8).

Al analizar los resultados observamos que las distintas Rho GTPasas respondieron de manera diferencial a la exposición de oligómeros, y que para una misma Rho GTPasa, los oligómeros estimularon tanto la activación como la inactivación a diferentes intervalos de tiempo.

Particularmente para RhoA, los oligómeros indujeron un aumento significativo a los 5 minutos, pero al cabo de 30 minutos de exposición, provocaron una disminución de la actividad de RhoA. Luego de 1 y de 3 horas de exposición, la activación de RhoA volvió a aumentar. En las células expuestas por un periodo de 24 horas, la activación de RhoA continuó aumentada, aunque con una magnitud menor en relación a lo observado a las 3 horas de exposición (Figura 8).

Por otro lado, la actividad de Cdc42 disminuyó levemente a los 5 minutos de exposición, pero este efecto se revirtió y se mantuvo similar al control entre los 10 y 30 minutos de exposición. Sin embargo, después de una hora de tratamiento, la actividad de Cdc42 volvió a disminuir significativamente con respecto al control. Sorprendentemente, los niveles de activación aumentaron nuevamente hacia las 3 horas de exposición mostrando un leve incremento respecto a los valores observados en las células control. Sin embargo este efecto se invirtió en las células con exposición prolongada (24 hs) a los oligómeros.

Por último, al analizar la activación de Rac1 se observaron tanto incrementos como decrementos en su activación durante la exposición a los oligómeros, con fluctuaciones temporales que incluyeron una disminución inicial de su activación a los 5 minutos, seguidos de incrementos rápidos y transitorios a los 10 y 30 minutos de exposición. Cuando analizamos la exposición prolongada a las 24 horas se observó una leve tendencia, aunque no significativa, de disminución de la actividad de Rac1 que deberá ser corroborada bajo exposiciones más prolongadas a los oligómeros de A $\beta$ .



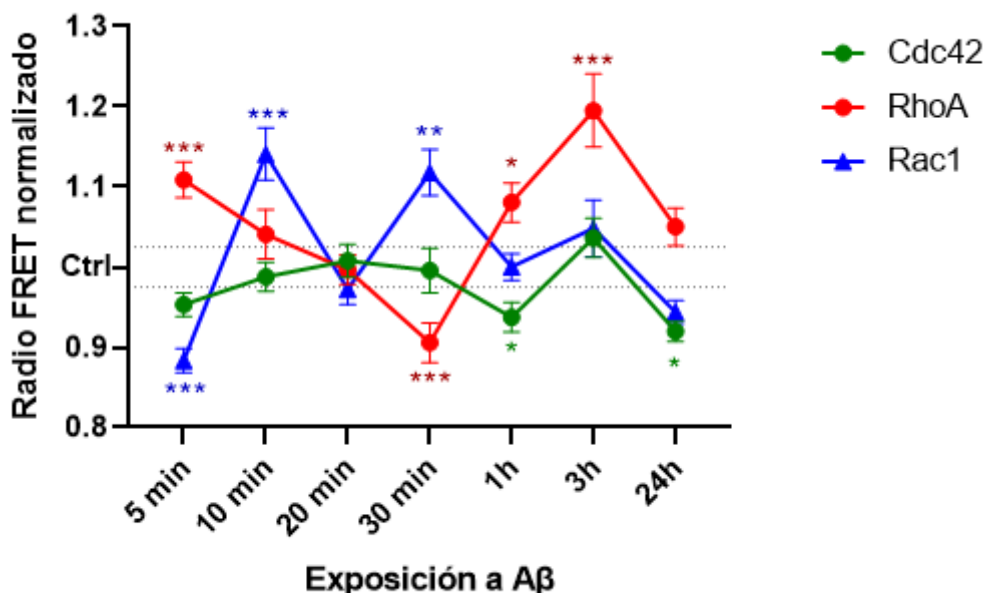


Figura 8: Actividad de las Rho GTPasas RhoA, Cdc42 y Rac1 en células de la línea Neuro2A tratadas con oligómeros de Aβ<sub>1-42</sub>. Cada línea representa la cuantificación de la activación en la totalidad celular medido como FRET radiométrico de células de la línea Neuro2A tras la exposición a oligómeros de Aβ<sub>1-42</sub>, normalizado a la activación de cada Rho GTPasa en las células control (vehículo), cada punto representa la media +/- SEM para cada tiempo analizado. Las líneas de puntos representan la SEM promedio de las células control para los tiempos analizados. Los puntos verdes representan las mediciones de la actividad total de Cdc42, los rojos RhoA y azules la activación de Rac1. Test t-Student \* p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005.

#### 4.4 Diferenciación de la Línea Neuro2A

Dadas las grandes dificultades presentadas para establecer un nivel óptimo de transfección de neuronas hipocampales, nos propusimos continuar poniendo a punto las transfecciones en cultivos primarios de neuronas y simultáneamente llevar a cabo el análisis de la activación espacial de las Rho GTPasas en células de la línea Neuro2A diferenciadas. Múltiples autores han demostrado, que células de línea Neuro2A, cuando se inducen a diferenciarse, son una buena aproximación a un modelo neuronal *in vitro* (Ba et al., 2003; Datki et al., 2003).

Para esto, se puso a punto un protocolo de diferenciación, con el que al cabo de 7 días, obtuvimos células con somas relativamente pequeños y prolongaciones citoplasmáticas o “neuritas” similares a procesos dendríticos, los cuales median 3 veces o más el largo del soma (Figura 9B). Como control, evaluamos la morfología de las células de la misma línea neuronal sin la inducción de la diferenciación, en las cuales no observamos la formación de

dichas neuritas, si no más bien un fenotipo abusado que es propio de las células indiferenciadas (Figura 9A).

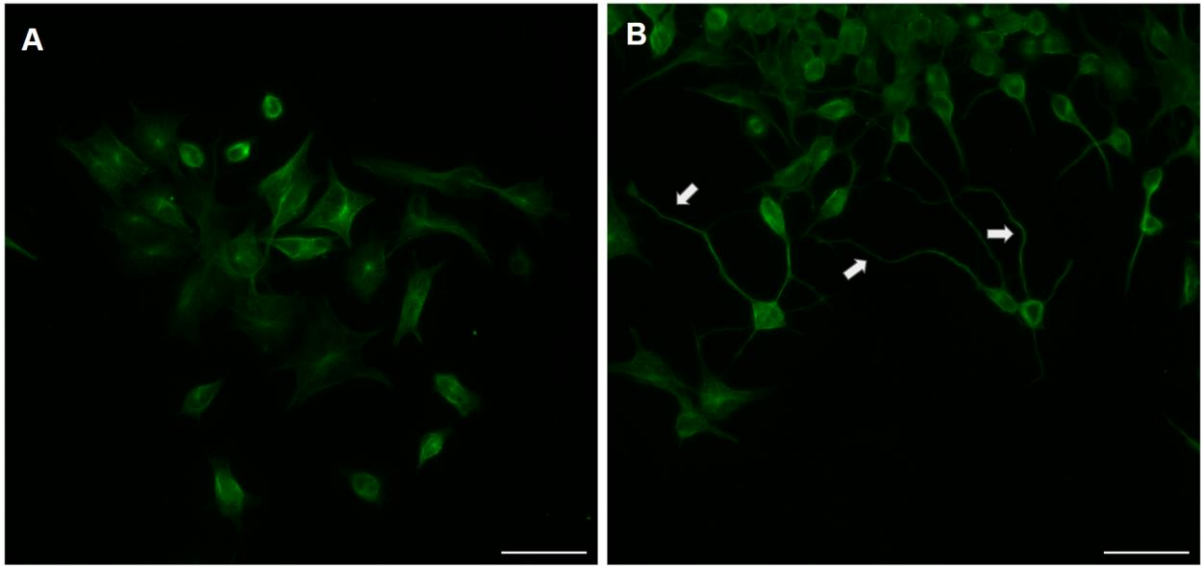


Figura 9: **Fotomicrografías de células de la línea Neuro2A:** A; Inmunotinción contra Tubulina tiosinada de células Neuro2A , en condiciones basales B: Inmunotinción contra Tubulina tiosinada de células Neuro2A diferenciadas a fenotipo neuronal inducidas con 20 $\mu$ M de RA. Las flechas indican procesos neuríticos de células con diferenciación positiva a fenotipo neuronal. Las escalas corresponden a 50  $\mu$ m.

#### 4.5 Dinámica espacial la actividad de Rho GTPasas en líneas celulares diferenciadas

A razón de que se logró optimizar la transfección de neuronas, a un nivel óptimo para realizar las mediciones de FRET en dendritas y espinas, decidimos suspender el análisis espacial de activación de RhoGTPasas en células de la línea Neuro2A (con diferenciación inducida) para enfocarnos de forma directa en los cultivos primarios de neuronas hipocampales.

#### 4.6 Dinámica espacio-temporal la actividad de Rho GTPasas en dendritas de Neuronas hipocampales.

##### 4.6.1 Actividad RhoA

Utilizando la técnica de FRET radiométrico, analizamos la modificación de la actividad de RhoA en neuronas hipocampales de 17 a 21 DIV tratadas con oligómeros de

$A\beta_{1-42}$ . Se analizó la actividad de RhoA en múltiples secciones neuríticas, especialmente en aquellas ricas en espinas maduras o en forma de hongo. Observamos que la exposición de 5 minutos a oligómeros de  $\beta$ -Amiloide ( $1\mu\text{M}$ ) provocó un aumento significativo en su actividad (Figura 10A), lo cual se corresponde con las observaciones en las células de la línea Neuro2A a los 5 minutos (Figura 8). Al analizar la activación local en espinas dendríticas, observamos que, además de un aumento generalizado en toda la dendrita, particularmente las espinas presentaban más activación cuando normalizamos la actividad respecto al eje dendrítico, (Figura 10B-C).

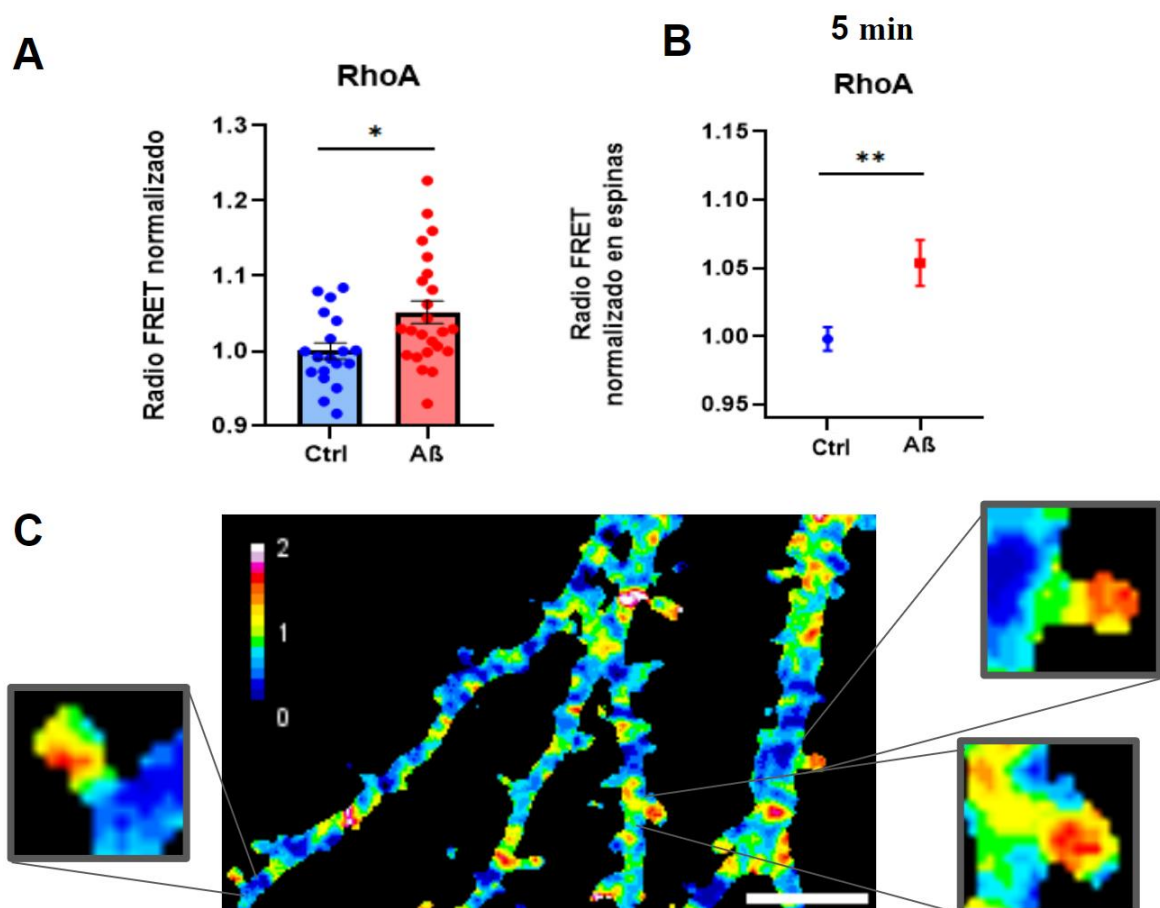


Figura 10: **Actividad RhoA en neuronas hipocámpales de 17-21 DIV tratadas con  $1\mu\text{M}$  de oligómeros de  $\beta$ -Amiloide  $_{1-42}$ .** **A;** Cuantificación de FRET radiométrico del biosensor RhoA (normalizado al control) en procesos dendríticos a 5 minutos de tratamiento con  $A\beta$   $1\mu\text{M}$  o un control sin péptidos, las barras representan la media  $\pm$  SEM. Las cuantificaciones se realizaron sobre 2-4 secciones dendríticas de 50-70 micras de largo en cada neurona **B;** Gráfico de la eficiencia de FRET radiométrico en las espinas en forma de hongo normalizadas a la eficiencia de FRET en su eje dendrítico correspondiente. **C;** Imágenes representativas de los mapas de FRET radiométrico para la exposici, los recuadros representan una magnificación de espinas

dendríticas. La escala de colores refleja la actividad del biosensor, mayor activación de RhoA para colores cálidos y su inactivación para colores fríos. Test t-Student \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , Escala=10 $\mu$ m .

Continuando con el análisis de la activación de RhoA, observamos que los oligómeros de  $\beta$ -Amiloide provocaron una disminución estadísticamente significativa de la actividad a los 30 minutos de exposición; sin embargo, este efecto se anuló a la hora de exposición y continuó sin diferencias significativas con respecto al control a las 3 horas de exposición (Figura 11A). También estudiamos el comportamiento de esta Rho GTPasas de manera local en las espinas a las 3 horas de exposición, para descartar una activación remanente en las espinas que estuviera “diluido” al analizar la totalidad de la dendrita y corroboramos que no existió una variación de su activación en este tiempo de exposición a los oligómeros de  $A\beta_{1-42}$  (Figura 11B).

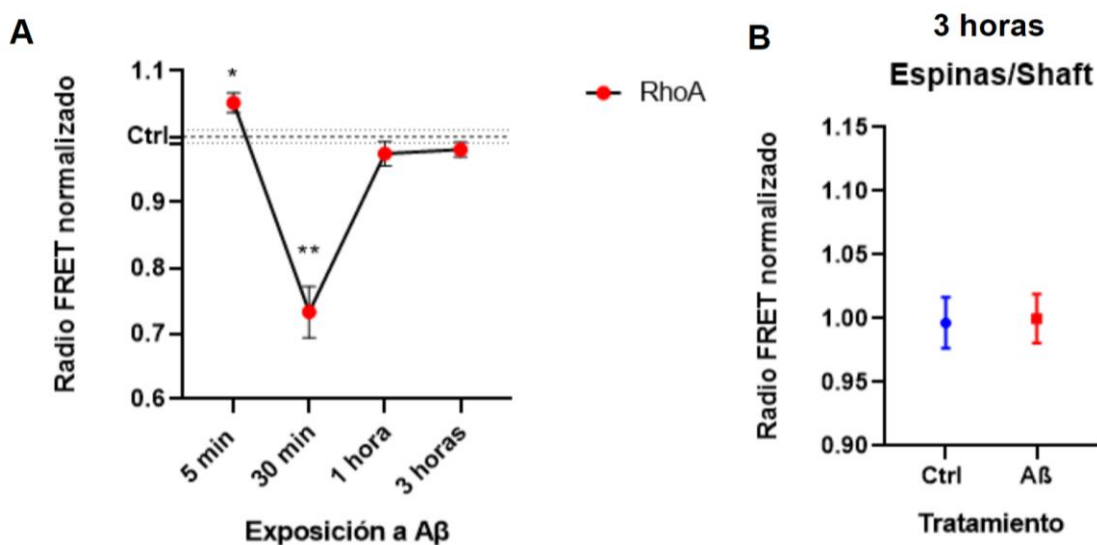


Figura 11: **Actividad RhoA en neuronas hipocámpales durante la exposición temprana a  $A\beta$ .** **A**: Cuantificación de FRET radiométrico del biosensor de RhoA-2G (normalizado al control) en procesos dendríticos de neuronas hipocámpales en cultivo a 5, 30 minutos, 1 y 3 horas de tratamiento con  $A\beta$  1  $\mu$ M o un control sin péptidos (vehículo) las barras representan la media  $\pm$  SEM. Las líneas de puntos representan la SEM promedio de las células control para los tiempos analizados **B**: Cuantificación de la eficiencia de FRET radiométrico de las espinas dendríticas relativizado al FRET radiométrico del eje dendrítico correspondiente a las 3 horas de exposición a los oligómeros  $A\beta_{1-42}$ . Los puntos representan la media  $\pm$  SEM. Test t-Student \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.6.2 Actividad Cdc42

En cuanto a la actividad de Cdc42, al analizar las dendritas de neuronas hipocampales en cultivo, no observamos diferencias estadísticas con respecto a las células control tras la exposición temprana de 5 minutos de oligómeros  $\beta$ -Amiloide (Figura 12A). Sin embargo, al analizar la actividad del biosensor en las espinas dendríticas normalizado a la eficiencia de FRET en el eje dendrítico, se observó un aumento significativo de la actividad en las mismas en comparación de las espinas de las neuronas control. (Figura 12B).

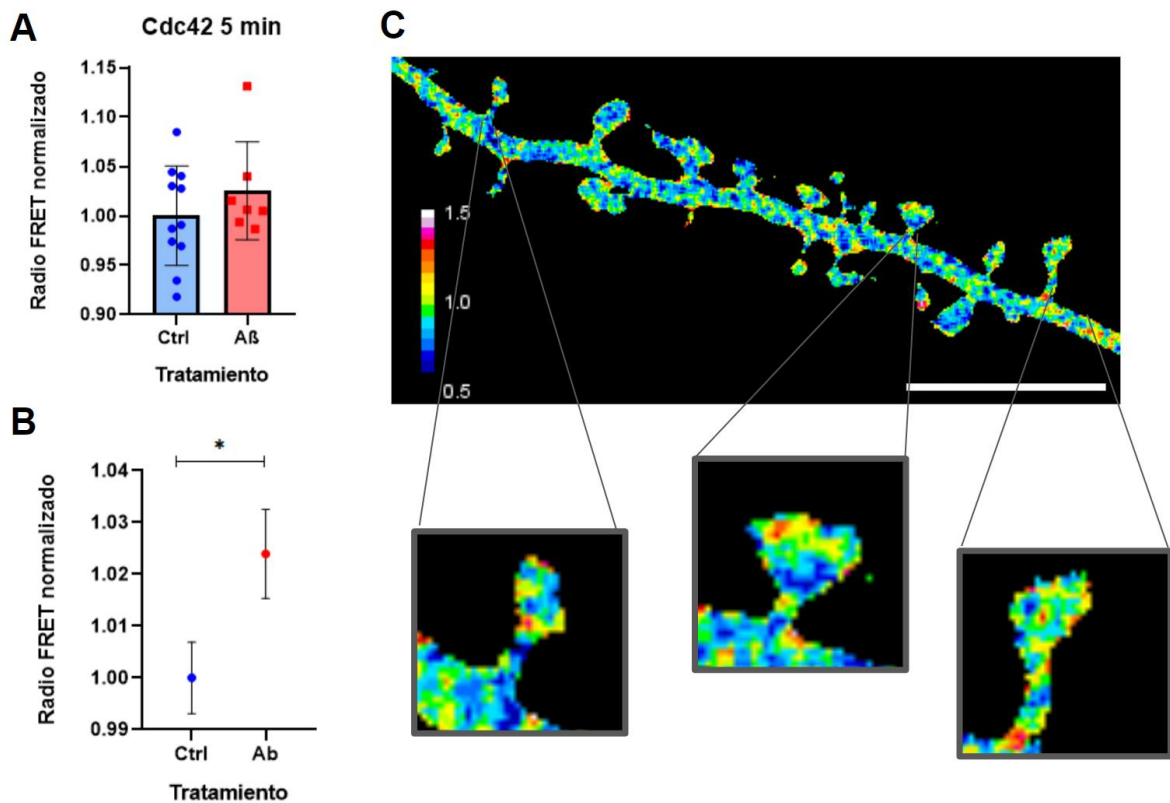


Figura 12: Activación de Cdc42 en neuronas hipocampales durante la exposición temprana a A $\beta$ , **A**: Cuantificación del FRET radiométrico del biosensor de Cdc42 (normalizado al control), en procesos dendríticos de neuronas hipocampales en cultivo a 5 minutos de tratamiento con A $\beta$ <sub>1-42</sub> 1  $\mu$ M o un control sin péptidos (vehículo). Las barras representan la media  $\pm$  SEM. Test t-Student \*p<0.05, \*\*p<0.01. Las cuantificaciones se realizaron sobre 2-4 secciones dendríticas de 50-70 micras de largo en cada neurona. **B**: cuantificación de la eficiencia de FRET entre las espinas tratadas con oligómeros y las control (Ctrl). **C**: ARRIBA: mapa FRET representativo, DEBAJO: Magnificación espinas dendríticas donde puede observarse el aumento de actividad de Cdc42. Escala= 10  $\mu$ m

Al analizar la incubación más prolongada con los péptidos  $\beta$ -Amiloide observamos un aumento significativo en la actividad de Cdc42 en las dendritas comparadas con las neuronas control a los 30 minutos de tratamiento. Sin embargo, tras una hora de exposición

a los oligómeros, no observamos diferencias significativas en la activación de esta Rho GTPasa con respecto a las neuronas control (Figura 13).

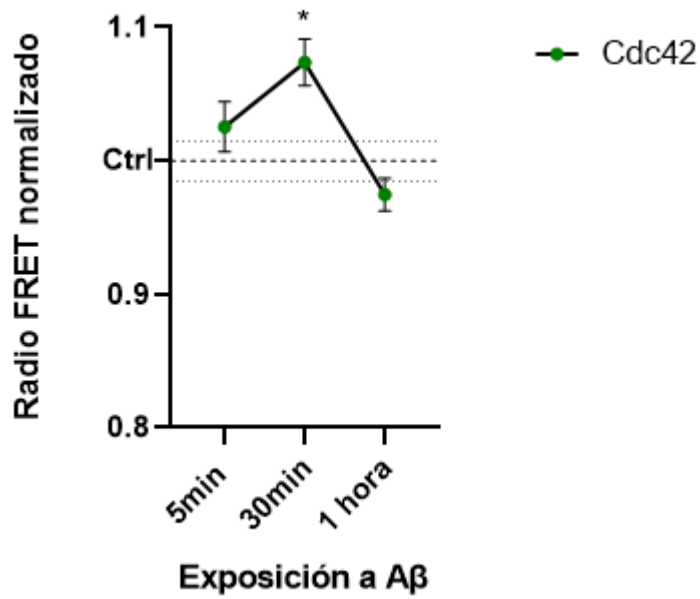


Figura 13: **Actividad Cdc42 en neuronas hipocampales durante la exposición temprana a Aβ.** ; Cuantificación de la eficiencia de FRET del biosensor de Cdc42 (normalizado al control) en procesos dendríticos de neuronas hipocampales en cultivo a 5, 30 minutos y una hora de tratamiento con oligómeros Aβ<sup>1-42</sup> 1 μM o un control sin péptidos (vehículo), las barras representan la media +/- SEM. Las líneas de puntos representan el promedio de las células control para los tiempos analizados. Las líneas de punto más finas representan la SEM promedio de los controles de cada punto temporal. Test t-Student \*p<0.05, \*\*p<0.01.

# 5

## DISCUSIÓN

En muchos estudios que analizaron la activación de las Rho GTPasas en el contexto de la enfermedad de Alzheimer, se ha reportado de manera independiente, tanto la activación como la inactivación de estas proteínas (Bolognin et al., 2014). En general, estas observaciones se han realizado utilizando técnicas bioquímicas clásicas. En este trabajo de tesina, con la utilización de biosensores basados en FRET, no solo confirmamos algunas de estas observaciones, sino que también aportamos nuevas evidencias sobre la complejidad del patrón de activación de estas GTPasas en neuronas hipocampales, en la patogenicidad desencadenada por los oligómeros de  $\beta$ -Amiloide.

### 5.1 La activación de Rho GTPasas, provocada por oligómeros de $A\beta$ difiere entre líneas celulares y las neuronas piramidales del hipocampo.

Con nuestros experimentos, observamos que los oligómeros de  $A\beta$  inducen la activación temprana (5 min) de RhoA en dendritas de neuronas hipocampales (Figura 10A). Sin embargo, a los 30 minutos de exposición, observamos una marcada inactivación de esta Rho GTPasa (Figura 11A). Estos resultados se corresponden con nuestras observaciones en la línea celular Neuro2A, donde los oligómeros provocaron un aumento en la actividad de RhoA a los 5 minutos y una disminución a las 30. Sin embargo, en estas células, los oligómeros provocaron nuevamente un aumento de actividad de RhoA a la hora y a las 3 horas de exposición (Figura 8), tiempos en los cuales no observamos una variación de la actividad en neuronas.

Por otro lado, nuestras observaciones sobre el aumento de la actividad de Cdc42 en las espinas dendríticas de las neuronas después de 5 minutos incubación con oligómeros  $A\beta_{1-42}$  (Figura 12B), su aumento a los 30 minutos en las dendritas y la ausencia de efecto a los 60 minutos tampoco coinciden con lo observado en la línea celular Neuro2A, donde los oligómeros no modificaron la actividad a los 5 ni 30 minutos pero sí provocaron una disminución a la hora de exposición (Figura 8).

En relación a la actividad de RhoA, el estudio realizado por Chacón y col. (2011) en células de la línea PC12, tratadas con 5  $\mu$ M de oligómeros  $A\beta_{1-42}$  por 30 minutos, reveló un aumento en su actividad, lo cual es opuesto a nuestras observaciones en la línea celular Neuro2A. Es importante considerar que la técnica abordada por Chacón y col. (2011) se encuentra dentro de las técnicas clásicas de extracción bioquímica. Estas técnicas de precipitación de proteínas involucran el lisado y una serie de pasos posteriores, que pueden hacer poco precisa la determinación exacta de la acción de los oligómeros sobre estas Rho GTPasas que, como ya se anticipó, pueden alterar con rapidez su nivel de activación. En otro estudio, se observó un aumento en la actividad de RhoA a las 24 horas de exposición de oligómeros de  $A\beta$  (1 $\mu$ M), en la línea celular humana SH-SY5Y. En este estudio se utilizó una variante más corta de esta proteína ( $A\beta_{1-40}$ ) (Petratos et al., 2008). Estas últimas observaciones tampoco son consistentes con nuestros resultados de la actividad de RhoA a las 24 horas de exposición a  $A\beta_{1-42}$  (Figura 8), donde no encontramos una alteración de su activación. Se puede mencionar también, otro estudio que analizó la activación de Cdc42, RhoA y Rac1 luego de una hora de exposición a oligómeros de  $A\beta_{1-42}$  (5  $\mu$ M), en la línea celular SN474, donde solo se observó un aumento de actividad Rac1 (Manterola et al., 2013).

Todo esto sugiere que los oligómeros de  $A\beta$  alteran la actividad de estas Rho GTPasas de manera específica, de acuerdo a las diferentes GEFs y GAPs con las que interactúan en cada contexto. Estas proteínas reguladoras, probablemente no sean las mismas o no tengan el mismo grado de expresión en cada tipo celular. Además, los protocolos de preparación de los oligómeros, las concentraciones, los tiempos de exposición, y las especies patogénicas varían entre los diferentes estudios. La mayoría de estos trabajos, abordan la activación de las proteínas Rho GTPasas, con técnicas bioquímicas, que tienen ciertas limitaciones temporales y no pueden discriminar los patrones espaciales de activación. Si no se tiene en cuenta todo esto, las observaciones realizadas de la desregulación de estas GTPasas entre diferentes modelos celulares pueden llevar a conclusiones generalizadas incorrectas.



## 5.2 Los oligómeros de beta amiloide alteran la activación de RhoA en neuronas

Existen algunos informes en cuanto a la desregulación de RhoA en cultivos primarios, ratones con inyección intracraneal de  $\beta$ -Amiloide o modelos *in vivo* de la enfermedad. Aunque estos estudios han analizado la expresión en lugar de la variación de la actividad. Fujimura y Usuki (2012) analizaron el efecto en la expresión de RhoA en cultivos de neuronas corticales expuestas a  $A\beta_{1-40}$ , sin encontrar variaciones en su expresión a pesar de que si ocurre degeneración celular y muerte apoptótica a las 24 horas de exposición. Otro estudio realizado por Xian y col. (2022) reportó que, luego de inyectar a ratones con oligómeros de  $A\beta_{1-42}$ , aumentó la expresión de RhoA y su efector ROCK2.

No obstante, los múltiples mecanismos de regulación de estas proteínas hacen que sea indispensable analizar la alteración de su actividad, además de los cambios en su síntesis o degradación. En nuestro trabajo, con la utilización de biosensores basados en FRET, observamos que en neuronas hipocampales en cultivo, los oligómeros de  $A\beta$  activaron a RhoA a los 5 minutos. Además, este aumento presentó un factor espacial, ya que las espinas tenían mayor actividad de esta Rho GTPasa. Todo esto nos permite hipotetizar que éste es el sitio en el que inicia la activación provocada por los oligómeros de  $A\beta$ . Luego, observamos una fuerte caída de la actividad a los 30 minutos, pero al analizar su activación a la hora y a las 3 horas no encontramos una alteración para esta GTPasa, tanto a nivel dendrítico como a nivel local en las espinas. Nuestras observaciones resaltan la importancia de evaluar el patrón de activación de RhoA en otros modelos, acortando la ventana temporal para abordar esta activación temprana de RhoA que, en última instancia, afecta la dinámica de las espinas dendríticas y provoca el deterioro cognitivo observado en múltiples modelos de la EA.

## 5.3 Los oligómeros de beta amiloide alteran la activación de Cdc42 en neuronas

En la bibliografía se encuentran múltiples estudios que remarcan alteraciones en la expresión y distribución de Cdc42, tanto en modelos animales como en muestras de cerebros *post mortem* de personas con la enfermedad de Alzheimer. (Akhtar et al., 2022; Zhang &

Niu, 2022) Sin embargo, son pocos los estudios que han analizado en profundidad la alteración de su actividad en el contexto de EA. Se mencionan, por ejemplo, las observaciones de Naranjo y colaboradores (2007) en neuronas hipocampales en cultivo de 4 DIV, en las cuales observaron un aumento de la actividad de Cdc42 tras la incubación con fibras de  $A\beta_{1-42}$  ( $5 \mu\text{M}$ ) a las 4 horas de exposición, lo cual podría ser congruente con nuestro resultado de una regulación positiva de esta GTPasa. Sin embargo, cabe mencionar que nuestras observaciones se realizaron con péptidos de  $A\beta_{1-42}$  en forma oligomérica y en cultivos celulares completamente diferenciados (17-21 DIV), en los cuales observamos una débil pero significativa activación temprana (5 min) de Cdc42 en espinas dendríticas, que luego se generaliza a los 30 minutos y se anula a la hora de exposición (Figura 13). Esto resalta, una vez más, la importancia de considerar la estricta y local regulación de la actividad de estas proteínas, las cuales probablemente están en íntima relación con el pool de proteínas particular con el que interactúa en cada subdominio celular. La ausencia de este contexto celular específico (por ejemplo, la falta de espinas dendríticas en neuronas de 4 DIV puede acarrear algunos problemas a la hora de extrapolar los resultados hacia otros modelos (Mendoza-Naranjo et al., 2007).

# 6

## CONCLUSIÓN

A partir de nuestras observaciones, concluimos que los oligómeros de  $\beta$ -Amiloide desencadenan un patrón de activación espacio-temporal complejo de Rho GTPasas en neuronas hipocampales. Este patrón incluye la activación temprana de RhoA en espinas dendríticas y en todo el área dendrítica (aunque en menor medida), que progresa hacia una inactivación a los 30 minutos que desaparece a la hora de exposición. En paralelo, Cdc42 se activa de forma temprana (5 min) sólo en las espinas dendríticas, y luego esta actividad se extiende en la totalidad de la dendrita a los 30 minutos, desapareciendo a la hora.

Nuestros resultados aportan evidencia a la idea general de que estas proteínas se encuentran desreguladas de una manera compleja en la EA. Las contradicciones en los estudios que abordan estas y otras GTPasas podrían deberse a la forma global en la que se analizan. Las técnicas clásicas de análisis bioquímico presentan grandes restricciones en cuanto a la precisión temporal de los análisis, además de no poder discriminar patrones espaciales de actividad dada la naturaleza de la técnica. La mayoría de los estudios que analizan estas proteínas se basan en un paradigma clásico de desregulación On/Off, el cual probablemente esté limitando el avance de la investigación en el área. Consideramos que abordar estas investigaciones con técnicas que permitan estudiar de manera detallada en el espacio y el tiempo la actividad de estas proteínas es indispensable para dilucidar el rol preciso que cumplen en la enfermedad de Alzheimer.

# Bibliografía

- AGUILAR, B. J., ZHU, Y., & LU, Q. 2017. Rho GTPases as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research and Therapy*, 9(1), 1–10.
- AKHTAR, S. N., ZHU, Y., & LU, Q. 2022. Spatial dysregulation of Rho GTPases in Alzheimer's Disease brain in human and in transgenic mouse model. *Alzheimer's & Dementia*, 18(S3), e066991.
- ANNAERT, W., & DE STROOPER, B. 2002. A cell biological perspective on Alzheimer's disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 18 (1), 25-51.
- ATWOOD, C. S., MARTINS, R. N., SMITH, M. A., & PERRY, G. 2002. Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid-peptide and associated proteins. *Peptides*, 23, 1343–1350.
- BA, F., PANG, P. K. T., & BENISHIN, C. G. 2003. The establishment of a reliable cytotoxic system with SK-N-SH neuroblastoma cell culture. *Journal of Neuroscience Methods*, 123(1), 11–22.
- BA, W., & NADIF KASRI, N. 2017. RhoGTPases at the synapse: An embarrassment of choice. *Small GTPases*, 8(2), 106–113.
- BISBAL, M., REMEDI, M., QUASSOLLO, G., CÁCERES, A., & SANCHEZ, M. 2018. Rotenone inhibits axonogenesis via an Lfc/RhoA/ROCK pathway in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry*, 146(5), 570–584.
- BISHOP, A. L., & HALL, A. 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochemical Journal*, 348(2), 241–255.
- BOLOGNIN, S., LORENZETTO, E., DIANA, G., & BUFFELLI, M. 2014. The Potential Role of Rho GTPases in Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Molecular Neurobiology*, 50(2), 406–422.
- BOURNE, J. N., & HARRIS, K. M. 2008. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annual Review of Neuroscience*, 31, 47–67.
- CAI, R. L., WANG, Y. Y., HUANG, Z. T., ZOU, Q., PU, Y. S., YU, C., & CAI, Z. 2021. Role of RhoA/ROCK signaling in Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 414.
- CASTELLANI, R. J., LEE, H.-G., ZHU, X., NUNOMURA, A., PERRY, G., & SMITH, M. A. 2006. Neuropathology of Alzheimer disease: pathognomonic but not pathogenic. *Acta Neuropathol*, 111, 503–509.
- CASTELLANI, R. J., LEE, H.-G., ZHU, X., PERRY, G., & SMITH, M. A. 2008. Alzheimer Disease Pathology As a Host Response. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 67(6), 523-531
- CHACON, P. J., GARCIA-MEJIAS, R., & RODRIGUEZ-TEBAR, A. 2011. Inhibition of RhoA GTPase and the subsequent activation of PTP1B protects cultured hippocampal neurons against amyloid  $\beta$  toxicity. *Molecular Neurodegeneration*, 6(1), 1–11.

- CHIDAMBARAM, S. B., RATHIPRIYA, A. G., BOLLA, S. R., BHAT, A., RAY, B., MAHALAKSHMI, A. M., MANIVASAGAM, T., THENMOZHI, A. J., ESSA, M. M., GUILLEMIN, G. J., CHANDRA, R., & SAKHARKAR, M. K. 2019. Dendritic spines: Revisiting the physiological role. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 92, 161–193.
- CINGOLANI, L. A., & GODA, Y. 2008. Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nature Reviews Neuroscience* 2008 9:5, 9(5), 344–356.
- COLICELLI, J. 2004. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*, 2004 (250).
- DAHME, M., QUIRION, L., & LAURIN, M. 2020. High throughput strategies aimed at closing the GAP in our knowledge of rho GTPase signaling. *Cells*, 9(6), 1430.
- DATKI, Z., JUHÁSZ, A., GÁLFI, M., SOÓS, K., PAPP, R., ZÁDORI, D., & PENKE, B. 2003. Method for measuring neurotoxicity of aggregating polypeptides with the MTT assay on differentiated neuroblastoma cells. *Brain Research Bulletin*, 62(3), 223–229.
- DETURE, M. A., & DICKSON, D. W. 2019. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. In *Molecular Neurodegeneration*. *BioMed Central Ltd*. 14.1
- DOROSTKAR, M. M., ZOU, C., BLAZQUEZ-LLORCA, L., & HERMS, J. 2015. Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: problems and opportunities. *Acta Neuropathologica*, 130(1).
- DUMAN, J. G., BLANCO, F. A., CRONKITE, C. A., RU, Q., ERIKSON, K. C., MULHERKAR, S., SAIFULLAH, A. BIN, FIROZI, K., & TOLIAS, K. F. 2022. Rac-maninoff and Rho-vel: The symphony of Rho-GTPase signaling at excitatory synapses. *Small GTPases*, 13(1), 14–47.
- EPIS, R., GARDONI, F., MARCELLO, E., GENAZZANI, A., CANONICO, P. L., & LUCA, M. DI. 2009. Searching for new animal models of Alzheimer's disease. *European journal of pharmacology*, 626(1), 57-63.
- FRITZ, R. D., LETZELTER, M., REIMANN, A., MARTIN, K., FUSCO, L., RITSMA, L., PONSIOEN, B., FLURI, E., SCHULTE-MERKER, S., VAN RHEENEN, J., & PERTZ, O. 2013. A versatile toolkit to produce sensitive FRET biosensors to visualize signaling in time and space. *Science Signaling*, 6(285).
- FU, A. K., & IP, N. Y. 2017. Regulation of postsynaptic signaling in structural synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 45, 148–155.
- FUJIMURA, M., & USUKI, F. 2012. Differing effects of toxicants (methylmercury, inorganic mercury, lead, amyloid  $\beta$ , and rotenone) on cultured rat cerebrocortical neurons: differential expression of rho proteins associated with neurotoxicity. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 126(2), 506–514.
- GARCIA-MATA, R., BOULTER, E., & BURRIDGE, K. 2011. The “invisible hand”: regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12(8), 493–504.

- GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K., QUINLAN, M., TUNG, Y.-C., ZAIDI, M. S., & WISNIEWSKI, H. M. 1986. Microtubule-associated Protein Tau a component of alzheimer paired helical filaments. *of biological chemistry*, 261(13), 6084–6089.
- HALL, A. 1998. Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science*, 279(5350), 509–514.
- HARDY, J. 2009. The amyloid hypothesis for Alzheimer’s disease: a critical reappraisal. *Journal of Neurochemistry*, 110(4), 1129–1134.
- HEDRICK, N. G., HARWARD, S. C., HALL, C. E., MURAKOSHI, H., MCNAMARA, J. O., & YASUDA, R. 2016. Rho GTPase complementation underlies BDNF-dependent homo- and heterosynaptic plasticity. *Nature*, 538(7623), 104–108.
- HLUSHCHENKO, I., KOSKINEN, M., & HOTULAINEN, P. 2016. Dendritic spine actin dynamics in neuronal maturation and synaptic plasticity. *Cytoskeleton*, 73(9), 435–441.
- HODGE, R. G., & RIDLEY, A. J. 2016. Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2016 17:8, 17(8), 496–510.
- HOTULAINEN, P., LLANO, O., SMIRNOV, S., TANHUANPÄÄ, K., FAIX, J., RIVERA, C., & LAPPALAINEN, P. 2009. Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 185(2), 323–339.
- IZZO, N. J., STANISZEWSKI, A., TO, L., FA, M., TEICH, A. F., SAEED, F., WOSTEIN, H., WALKO, T., VASWANI, A., WARDIUS, M., SYED, Z., RAVENSCROFT, J., MOZZONI, K., SILKY, C., REHAK, C., YURKO, R., FINN, P., LOOK, G., RISHTON, G., ... CATALANO, S. M. 2014. Alzheimer’s Therapeutics Targeting Amyloid Beta 1–42 Oligomers I: Abeta 42 Oligomer Binding to Specific Neuronal Receptors Is Displaced by Drug Candidates That Improve Cognitive Deficits. *Plos one*, 9(11), e111898.
- JACK, C. R., BENNETT, D. A., BLENNOW, K., CARRILLO, M. C., DUNN, B., HAEBERLEIN, S. B., HOLTZMAN, D. M., JAGUST, W., JESSEN, F., KARLAWISH, J., LIU, E., MOLINUEVO, J. L., MONTINE, T., PHELPS, C., RANKIN, K. P., ROWE, C. C., SCHELTENS, P., SIEMERS, E., SNYDER, H. M., ... SILVERBERG, N. 2018. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer’s disease. *In Alzheimer’s and Dementia*. 14(4), 535-562.
- JAHN, H. 2013. Memory loss in Alzheimer’s disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 15(4), 445–454.
- JAKOB-ROETNE, R., & JACOBSEN, H. 2009. Alzheimers Disease: From Pathology to Therapeutic Approaches. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(17), 3030-3059.
- JANEIRO, M. H., ARDANAZ, C. G., SOLA-SEVILLA, N., DONG, J., CORTÉS-ERICE, M., SOLAS, M., PUERTA, E., & RAMÍREZ, M. J. 2021. Biomarkers in Alzheimer’s disease. *In Advances in Laboratory Medicine* (Vol. 2, Issue 1, pp. 27–37). Walter de Gruyter GmbH.
- JIN, M., SHEPARDSON, N., YANG, T., CHEN, G., WALSH, D., & SELKOE, D. J. 2011. Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex

- directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(14), 5819–5824.
- KASAI, H., FUKUDA, M., WATANABE, S., HAYASHI-TAKAGI, A., & NOGUCHI, J. 2010. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends in Neurosciences*, 33(3), 121–129.
- KILIAN, J., & KITAZAWA, M. 2018. The emerging risk of exposure to air pollution on cognitive decline and Alzheimer's disease: Evidence from epidemiological and animal studies. *Biomedical journal*, 41(3), 141-162 .
- KJØLLER, L., & HALL, A. 1999. Signaling to Rho GTPases. *Experimental cell research*, 253(1), 166-179.
- KLEIN, W. L. 2002. A toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochemistry International*, 41, 345–352.
- KNOBLOCH, M., & MANSUY, I. M. 2008. Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, 37(1), 73–82.
- KOROBOVA, F., & SVITKINA, T. M. 2010. Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 21(1), 165–176.
- KUROKAWA, K., & MATSUDA, M. 2005. Localized RhoA activation as a requirement for the induction of membrane ruffling. *Molecular Biology of the Cell*, 16(9), 4294–4303.
- LEFORT, R. 2015. Reversing Synapse Loss in Alzheimer's Disease: Rho-Guanosine Triphosphatases and Insights from Other Brain Disorders. *Neurotherapeutics*, 12(1), 19–28.
- LIN, Y., & ZHENG, Y. 2015. Approaches of targeting Rho GTPases in cancer drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 10(9), 991–1010.
- LOOK, G., JERECIC, J., CHERBAVAZ, D., PRAY, T., BREACH, J.-C., CROSIER, W., IGOUDIN, L., HIRONAKA, C., LOWE, R., MCENTEE, M., RUSLIM-LITRUS, L., WU, H.-M., ZHANG, S., CATALANO, S., GOURE, W., SUMMA, D., & KRAFFT, G. 2007. Discovery of ADDL--targeting small molecule drugs for Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 4(5), 562–567.
- MANTEROLA, L., HERNANDO-RODRÍGUEZ, M., RUIZ, A., APRAIZ, A., ARRIZABALAGA, O., VELLÓN, L., ALBERDI, E., CAVALIERE, F., LACERDA, H. M., JIMENEZ, S., PARADA, L. A., MATUTE, C., & ZUGAZA, J. L. 2013. 1–42  $\beta$ -Amyloid peptide requires PDK1/nPKC/Rac 1 pathway to induce neuronal death. *Translational Psychiatry* 2013 3:1, 3(1), e219–e219.
- MATSUZAKI, M. 2007. Factors critical for the plasticity of dendritic spines and memory storage. *Neuroscience Research*, 57(1), 1–9.
- MENDOZA-NARANJO, A., GONZALEZ-BILLAULT, C., & MACCIONI, R. B. 2007. A $\beta$ 1-42 stimulates actin polymerization in hippocampal neurons through Rac1 and Cdc42 Rho GTPases. *Journal of Cell Science*, 120(2), 279–288.
- MOON, S. Y., & ZHENG, Y. 2003. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends in Cell Biology*, 13(1), 13–22.

- MURAKOSHI, H., WANG, H., & YASUDA, R. 2011. Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature* 2011 472:7341, 472(7341), 100–104.
- PERTZ, O. 2010. Spatio-temporal Rho GTPase signaling - where are we now. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 11), 1841–1850.
- PERTZ, O., HODGSON, L., KLEMKE, R. L., & HAHN, K. M. 2006. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* 2006 440:7087, 440(7087), 1069–1072.
- PETRATOS, S., LI, Q. X., GEORGE, A. J., HOU, X., KERR, M. L., UNABIA, S. E., HATZINISIRIOU, I., MAKSEL, D., AGUILAR, M. I., & SMALL, D. H. 2008. The  $\beta$ -amyloid protein of Alzheimer's disease increases neuronal CRMP-2 phosphorylation by a Rho-GTP mechanism. *Brain*, 131(1), 90–108.
- QUASSOLLO, G., WOJNACKI, J., SALAS, D. A., GASTALDI, L., MARZOLO, M. P., CONDE, C., BISBAL, M., COUVE, A., & CÁ CERES, A. 2015. A RhoA Signaling Pathway Regulates Dendritic Golgi Outpost Formation. *Current Biology : CB*, 25(8), 971–982.
- ROCHEFORT, N. L., & KONNERTH, A. 2012. Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO Reports*, 13(8), 699–708.
- ROLAND, J. R., & JACOBSEN, H. 2009. Alzheimer's disease: From pathology to therapeutic approaches. *Angewandte Chemie - International Edition*, 48(17), 3030–3059.
- SAKONO, M., & ZAKO, T. 2010. Amyloid oligomers: formation and toxicity of A $\beta$  oligomers. *The FEBS Journal*, 277(6), 1348–1358.
- SANTIAGO, J. A., & POTASHKIN, J. A. (2021). The Impact of Disease Comorbidities in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 631770.
- SCHELTENS, P., DE STROOPER, B., KIVIPELTO, M., HOLSTEGE, H., CHÉTELAT, G., TEUNISSEN, C. E., CUMMINGS, J., & VAN DER FLIER, W. M. 2021. Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, 397(10284), 1577–1590.
- SEKINO, Y., KOJIMA, N., & SHIRAO, T. 2007. Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochemistry International*, 51(2–4), 92–104.
- SIVA, N. 2021. New global initiative to tackle Alzheimer's disease.
- SORIA FREGOZO, C., & PÉREZ VEGA, M. I. 2012. Actin-binding proteins and signalling pathways associated with the formation and maintenance of dendritic spines. *Neurologia (Barcelona, Spain)*, 27(7), 421–431.
- STINE, W. B., DAHLGREN, K. N., KRAFFT, G. A., & LADU, M. J. 2003. In vitro characterization of conditions for amyloid- $\beta$  peptide oligomerization and fibrillogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 11612–11622.
- TANG, B. L. 2005. Alzheimer's disease: channeling APP to non-amyloidogenic processing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(2), 375–378. Tetlow, A. L., & Tamanoi, F. (2013). *The Ras superfamily G-proteins. The Enzymes*, 33 Pt A, 1–14.



- VERDIER, Y., ZARÁNDI, M., & PENKE, B. 2004. Amyloid  $\beta$ -peptide interactions with neuronal and glial cell plasma membrane: binding sites and implications for Alzheimer's disease. *Journal of Peptide Science*, 10(5), 229–248.
- WALSH, D. M., & SELKOE, D. J. (2004). Deciphering the Molecular Basis of Memory Failure in Alzheimer's Disease. *Neuron*, 44(1), 181–193.
- WOJNACKI J., QUASSOLLO G., BORDENAVE M. D., UNSAIN N., MARTÍNEZ G. F., SZALAI A. M. PERTZ O., GUNDERSEN G. C., BARTOLINI F., STEFANI D. F. CÁCERES A., BISBAL M. 2023. Dual spatio-temporal regulation of axon growth and microtubule dynamics by RhoA signaling pathways. *BioRxiv*
- XIANG, X. T., WANG, X., JIN, S. Y., HU, J., WU, Y. M., LI, Y. Y., & WU, X. 2022. Activation of GPR55 attenuates cognitive impairment and neurotoxicity in a mouse model of Alzheimer's disease induced by A $\beta$ 1–42 through inhibiting RhoA/ROCK2 pathway. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 112, 110423.
- YOSHIZAKI, H., OHBA, Y., KUROKAWA, K., ITOH, R. E., NAKAMURA, T., MOCHIZUKI, N., NAGASHIMA, K., & MATSUDA, M. 2003. Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *The Journal of cell biology*, 162(2), 223–232.
- ZHANG, X., LI, Y., XU, H., & ZHANG, Y. W. 2014. The  $\gamma$ -secretase complex: from structure to function. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 427.
- ZHANG, Y., & NIU, C. 2022. Relation of CDC42, Th1, Th2, and Th17 cells with cognitive function decline in Alzheimer's disease. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 9(9), 1428–1436.

# 8

## ANEXO

### MACRO: MacroFRETMelanoM.3.0

```
dirImage=getDirectory("imágenes a procesar");  
dirFinal=getDirectory("imágenes procesadas");  
Files=getFileList(dirImage);  
print("lista de imágenes a analizar");
```

```
Array.print(Files);
```

```
for (i = 0; i<Files.length; i++){
```

```
    open(Files [i]);
```

```
    name = File.nameWithoutExtension;
```

```
    rename("canal");
```

```
    run("Stack to Images");
```

```
    selectWindow("canal-0001");
```

```
    run("Subtract Background...", "rolling=50");
```

```
    selectWindow("canal-0002");
```

```
    run("Subtract Background...", "rolling=50");
```

```
    setOption("ScaleConversions", true);
```

```
    run("MultiStackReg", "stack_1=canal-0001 action_1=[Use as Reference] file_1=[]  
stack_2=canal-0002 action_2=[Align to First Stack] file_2=[] transformation=[Rigid  
Body]");
```

```
    selectWindow("canal-0001");
```

```
    run("32-bit");
```

```
    selectWindow("canal-0002");
```

```
    run("32-bit");
```

```

selectWindow("canal-0001");
run("Smooth");
selectWindow("canal-0002");
run("Smooth");

selectWindow("canal-0001");
run("Threshold...");
waitForUser ("make theThreshold -Donor");

selectWindow("canal-0002");
run("Threshold...");
waitForUser ("make theThreshold -FRET");
run("Ratio Plus", "image1=canal-0002 image2=canal-0001 background1=0
clipping_value1=0 background2=0 clipping_value2=0 multiplication=1");

//name = File.nameWithoutExtension;
//saveAs("Tiff", dirFinal + name + "Mask FRET.tif");
selectWindow("canal-0001");
close();
selectWindow("canal-0002");
close();

saveAs("Tiff", dirFinal + name + "Mask FRET.tif");
close();
}

```