

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

**Rol de la Glicoproteína Asociada a Mielina (MAG)
en la Modulación de la Muerte Celular
Programada de Motoneuronas**

por

Lic. en Cs. Biol. Anabela Palandri

Director de Tesis: Dr. Pablo H. H. Lopez

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



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

Córdoba, Argentina
2015

COMISIÓN ASESORA:

Dr. German Roth. Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba, CIQUIBIC-CONICET. Universidad Nacional de Córdoba.

Dr. Victor Molina. Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba, IFEC-CONICET. Universidad Nacional de Córdoba.

Dr. Pablo Iribarren. Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología, CIBICI-CONICET. Universidad Nacional de Córdoba.

Defensa oral y pública.

Lugar y Fecha:

Calificación:

Tribunal

Firma:..... Aclaración:.....

Firma:..... Aclaración:.....

Firma:..... Aclaración:.....

AGRADECIMIENTOS.

Listado de publicaciones derivadas de esta tesis.

Palandri A, Salvador VR, Wojnacki J, Vivinetto AL, Schnaar RL, Lopez PH. (2015).
Myelin-associated glycoprotein modulates apoptosis of motoneurons during early postnatal development via NgR/p75(NTR) receptor-mediated activation of RhoA signaling pathways.
Cell Death Dis. 6:e1876.

ÍNDICE

COMISIÓN ASESORA	2
DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
LISTADO DE PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS	5
ÍNDICE	6
LISTA DE ABREVIATURAS (POR ORDEN ALFABÉTICO)	10
RESUMEN	13
SUMMARY	15
INTRODUCCIÓN	16
1.1. GLICOPROTEÍNA ASOCIADA A MIELINA (MAG).	16
1.1.1. Generalidades.	16
1.1.2. Estructura y expresión de MAG.	16
1.1.3. Mielinización en ausencia de MAG.	19
1.2. ROL DE MAG EN LA INTERACCIÓN AXÓN-MIELINA Y ESTABILIDAD AXONAL.	21
1.2.1. MAG como un inhibidor de la regeneración axonal.	21
1.2.2. Receptores axonales reconocidos por MAG.	22
1.2.3. Propiedades protectoras de MAG en las neuronas.	25
1.3. MOTONEURONAS DE LA MÉDULA ESPINAL.	27
1.3.1. Tipos y distribución de motoneuronas.	28
1.3.2. Muerte celular programada de motoneuronas.	30
1.4. MECANISMOS DE APOPTOSIS.	33
1.4.1. Señalización extrínseca de apoptosis. Vía clásica.	34
1.4.2. Señalización intrínseca de apoptosis. Vía alternativa.	35
1.5. RECEPTOR DE BAJA AFINIDAD PARA NEUROTROFINAS, p75 ^{NTR} .	38
1.5.1. Estructura del receptor p75 ^{NTR} .	38
1.5.2. Apoptosis de motoneuronas dependiente de p75 ^{NTR} luego de una lesión.	42
1.6. RHO GTPASAS.	44

1.6.1. <i>Antagonistas de la vía Rho/ROCK.</i>	46
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	47
2.1. OBJETIVO GENERAL.	47
2.2. HIPÓTESIS.	48
2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	48
MATERIALES Y MÉTODOS	50
3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.	50
3.1.1. <i>Cría y mantenimiento.</i>	50
3.1.2. <i>Ratones transgénicos.</i>	50
3.2. MATERIALES.	51
3.3. HISTOLOGÍA DE LA MÉDULA ESPINAL Y CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE MOTONEURONAS.	52
3.3.1. <i>Detección in situ de la fragmentación de ADN mediante el ensayo de TUNEL.</i>	53
3.4. CULTIVOS DE MOTONEURONAS.	54
3.4.1. <i>Cultivo organotípico de médula espinal de ratón.</i>	54
3.4.2. <i>Cultivo primario de motoneuronas embrionarias.</i>	55
3.4.3. <i>Cultivo de la línea celular derivada de motoneuronas, MN1.</i>	56
3.4.4. <i>Inducción de apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR}.</i>	56
3.4.5. <i>Inmunofluorescencia.</i>	56
3.5. MODELO DE LESIÓN DE NERVIOS CIÁTICOS.	57
3.6. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE LOS NIVELES DE LOS RECEPTORES NGRs.	58
3.7. PRODUCCIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES E INFECCIÓN DE LAS CÉLULAS MN1.	60
3.8. EXPRESIÓN DE PLÁSMIDOS Y TRANSFECCIONES.	61
3.9. TRASFERENCIA DE ENERGÍA DE RESONANCIA FLUORESCENTE, FRET.	62
3.9.1. <i>Análisis Radiométrico de FRET.</i>	63
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	64
RESULTADOS	65
4.1. CARACTERIZACIÓN DEL NÚMERO DE MOTONEURONAS DE LA MÉDULA ESPINAL DEL RATÓN MAG-NUL.	65

4.1.1. Los ratones Mag-null exhiben un número reducido de motoneuronas en la médula espinal lumbar.	65
4.1.2. Los ratones Mag-null presentan mayor número de motoneuronas apoptóticas en la primera semana de vida.	67
4.2. ROL ESTABILIZADOR DE MAG EN UN MODELO <i>IN VIVO</i> DE CONTUSIÓN DE NERVI CIÁTICO.	69
4.2.1. Los ratones Mag-null presentan una susceptibilidad incrementada a la apoptosis de MNs dependiente del receptor p75 ^{NTR} en un modelo <i>in vivo</i> .	70
4.2.2. El tratamiento con MAG-Fc rescata MNs en un modelo <i>in vivo</i> de apoptosis dependiente del receptor p75 ^{NTR} .	72
4.3. MAG-Fc PROTEGE MNs EN MODELOS <i>IN VITRO</i> DE APOPTOSIS DEPENDIENTE DEL RECEPTOR p75 ^{NTR} .	74
4.3.1. Cultivo organotípico de médula espinal lumbar.	74
4.3.2. Cultivo primario de MNs embrionarias.	76
4.3.3. Cultivo de línea celular derivada de MNs, MN1.	77
4.4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y BIOQUÍMICA DE LOS RECEPTORES AXONALES DE MAG.	78
4.4.1. Modulación de la expresión de los receptores NgRs a través del uso de partículas lentivirales.	79
4.4.2. Rol de los receptores NgRs en un modelo animal.	81
4.5. CARACTERIZACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ASOCIADAS AL AFECTO ANTI-APOPTÓTICO DE MAG.	83
4.5.1. Rol de la vía de señalización RhoA/ROCK en el efecto protector de MAG.	84
4.5.1.1. Dinámica espacial y temporal de la actividad de RhoA en MNs.	84
4.5.1.2. Inhibición farmacológica de la señalización de RhoA por C3 transferasa.	86
4.5.1.3. Participación de la señalización de RhoA en el efecto protector de MAG en un modelo <i>in vitro</i> de apoptosis dependiente del receptor p75 ^{NTR} .	87
4.5.2. Participación de Rho quinasa como efector de RhoA en el efecto protector de MAG.	88
4.5.2.1. El tratamiento con Y-27632 bloquea el efecto protector de MAG-Fc en un modelo <i>in vitro</i> de apoptosis dependiente del receptor p75 ^{NTR} .	89

4.5.2.2. El tratamiento con Y-27632 bloquea el efecto protector de MAG-Fc en un modelo in vivo de apoptosis dependiente del receptor p75 ^{NTR} .	90
4.5.3. <i>El efecto protector de MAG contra la apoptosis de MNs involucra la activación de la vía de señalización RhoA/ROCK en forma dependiente del receptor p75^{NTR}.</i>	92
4.5.3.1. MAG protege MNs de la apoptosis por activación de la vía de señalización RhoA/ROCK a través del receptor p75 ^{NTR} .	92
4.5.3.2. MAG-Fc protege MNs de la apoptosis por activación de la vía de señalización RhoA/ROCK en una manera dependiente de p75 ^{NTR} .	94
DISCUSIÓN	96
CONCLUSIONES	111
APÉNDICE	113
A.1. INTRODUCCIÓN.	113
A.1.1. <i>Generalidades.</i>	113
A.1.2. <i>Neuroanatomía del cerebelo.</i>	114
A.2. MATERIALES Y MÉTODOS	117
A.2.1. <i>Histología del cerebelo y cuantificación del número de neuronas.</i>	117
A.2.2. <i>Inmunofluorescencia.</i>	118
A.2.4. <i>Inmunocitoquímica para BrdU.</i>	118
A.3. RESULTADOS	119
A.3.1. <i>CARACTERIZACIÓN DEL CEREBELO DEL RATÓN Mag-null.</i>	119
A.3.1.1. Los ratones Mag-null exhiben un número incrementado de células granulares y células de Purkinje del cerebelo.	119
A.3.1.2. El tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-MAG (clon 513) bloqueante de función, induce el fenotipo del ratón <i>Mag-null</i> en el cerebelo.	1233
A.4. DISCUSIÓN	126
BIBLIOGRAFÍA	130

Lista de abreviaturas (por orden alfabético).

ADN: Ácido desoxirribunucleico.

ALS: Esclerosis lateral amiotrófica.

AIF: Factor inductor de la apoptosis.

BDNF: Factor de crecimiento derivado del cerebro.

CFP: Proteína fluorescente cian.

CL: Contralateral.

CGs: Células granulares del cerebelo.

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

DRG: Neuronas del ganglio dorsal.

dUTP: desoxinucleótido trifosfato.

E: Embriónico.

ECD: Dominio extracelular.

EGL: Capa granular externa.

FRET: Tránsito de energía de resonancia fluorescente.

GAP: Proteína que activa GTPasas.

GB: Glía de Bergman.

GCPs: Precursores de células granulares.

GEF: Factor de intercambio de nucleótidos de guanina.

GFP: Proteína verde fluorescente.

HBS: Solución salina balanceada de Hank's.

HI-HS: Suero de caballo inactivado por calor.

ICD: Dominio intracelular de muerte.

IGL: Capa granular interna.

IL: Ipsilateral.

IP: intraperitoneal.

LMC: Columna lateral motora.

MAG: Glicoproteína asociada a mielina.

Mag-null: *Mag* knock-out.

mAb: anticuerpo monoclonal.

MAG-Fc: Forma soluble quimérica humana de MAG.

MBP: Proteína básica de mielina.

MCP: Muerte celular programada.

MEM: Medio esencial mínimo.

MNs: Motoneuronas.

NGF: Factor de crecimiento nervioso.

NOC-18: Generador de óxido nítrico.

NgRs: Receptores Nogo.

OMgp: Glicoproteína asociada a oligodendrocitos.

P: Postnatal.

PBS: Buffer Fosfato Salino.

PLP: Proteína proteolipídica.

PKC: Proteína quinasa C.

p75^{NTR}: Receptor de baja afinidad para neurotrofinas.

RBD: Dominio de unión a Rho.

Rho-GDI α : Inhibidor de disociación Rho-GDP alfa.

RIP: Protéolisis intramembrana regulada.

ROCK: Quinasa asociada a Rho.

SCOC: Cultivo organotípico de médula espinal.

SDS: Dodecilsulfato sódico.

SFB: Suero fetal bovino.

shRNA: Ácido ribonucleico de cadena corta.

siRNA: Ácido ribonucleico de interferencia corto.

SNC: Sistema nervioso central.

SNE: Suero normal equino.

SNP: Sistema nervioso periférico.

TBS: Buffer tris salino.

TdT: Terminal deoxinucleotidil transferasa.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

Wt: Wild type.

YFP: Proteína amarilla fluorescente.

RESUMEN

La glicoproteína asociada a mielina (MAG) es un constituyente minoritario de la mielina del sistema nervioso, la cual se encuentra selectivamente expresada en la membrana periaxonal de mielina en íntimo contacto con los axones. A través de la interacción con múltiples receptores axonales, incluidos los receptores Nogo (NgRs), MAG tiene un efecto protector/estabilizador sobre los axones que envuelve. Se ha demostrado que la activación farmacológica de los receptores NgRs tiene un rol modulador en la apoptosis postnatal de motoneuronas (MNs) dependiente del receptor p75^{NTR}. Sin embargo, no está claro si esto refleja un rol fisiológico de los receptores NgRs en el desarrollo de MNs. NgRs son parte de un complejo receptor multimérico, el cual incluye a p75^{NTR}, LINGO-1 y gangliósidos. Luego de la unión del ligando, este complejo multimérico activa la vía de señalización RhoA/ROCK dependiente del receptor p75^{NTR}. El objetivo de este trabajo fue analizar el posible rol modulador de MAG en la apoptosis de MNs durante el desarrollo postnatal de MNs.

Un estudio en función del tiempo demostró que los ratones *Mag*-null presentan una reducción en el número de MNs durante la primera semana postnatal. Además, estos ratones exhiben un incremento de la susceptibilidad en un modelo animal de apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR} inducido por una lesión de contusión en el nervio ciático, el cual fue prevenido por el tratamiento con la forma quimérica soluble de MAG (MAG-Fc). El rol protector de MAG fue confirmado en modelos *in vitro* de apoptosis dependiente de p75^{NTR} usando cultivos primarios de MNs y una línea celular de MNs, MN1. Cuando se silenció la expresión de los receptores NgRs en estas células a través de partículas lentivirales que portan secuencias shRNA, MAG no pudo contrarrestar la apoptosis de MNs dependiente de p75^{NTR}. Un análisis de la actividad de RhoA usando un biosensor de RhoA basado en la técnica de FRET mostró que MAG-Fc activa a RhoA. Sumado a esto, la inhibición farmacológica de las vías p75^{NTR}/RhoA/ROCK, o la sobreexpresión de una mutante del p75^{NTR} incapaz de activar a RhoA, bloqueó completamente la protección de MAG-Fc contra la apoptosis. El rol de la vía de señalización RhoA/ROCK fue confirmado en el

modelo de lesión del nervio ciático, donde el pre-tratamiento con el inhibidor de ROCK, Y-27632, bloqueó el efecto pro-sobrevida de MAG-Fc.

Los resultados de esta tesis permiten identificar un nuevo rol protector de MAG como modulador de la apoptosis de MNs durante el desarrollo postnatal por un mecanismo que involucra la vía de señalización $p75^{\text{NTR}}$ /RhoA/ROCK. Además, nuestros resultados ponen de manifiesto la relevancia del efecto estabilizador que la mielina ejerce sobre las neuronas.

SUMMARY

Myelin-associated glycoprotein (MAG) is a minor constituent of nervous system myelin, selectively expressed on the periaxonal myelin wrap. By engaging multiple axonal receptors, including Nogo-receptors (NgRs), MAG exerts a nurturing and protective effect on the axons it ensheaths. Pharmacological activation of NgRs has a modulatory role on p75^{NTR}-dependent postnatal apoptosis of motoneurons (MNs). However, it is not clear whether this reflects a physiological role of NgRs in the MN development. NgRs are part of a multimeric receptor complex, which includes p75^{NTR}, LINGO-1 and gangliosides. Upon ligand binding, this multimeric complex activates RhoA/ROCK signaling in a p75^{NTR}-dependent manner. The aim of this study was to analyze a possible modulatory role of MAG on MN apoptosis during postnatal development.

A time course study showed that *Mag*-null mice suffer a loss of MNs during the first postnatal week. Also, these mice exhibited increased susceptibility in an animal model of p75^{NTR}-dependent MN apoptosis induced by nerve-crush injury, which was prevented by treatment with a soluble form of MAG (MAG-Fc). The protective role of MAG was confirmed in in vitro models of p75^{NTR}-dependent MN apoptosis using the MN1 cell line and primary cultures. Lentiviral expression of shRNA sequences targeting NgRs on these cells abolished protection by MAG-Fc. Analysis of RhoA activity using a FRET-based RhoA biosensor showed that MAG-Fc activates RhoA. Pharmacological inhibition of p75^{NTR}/RhoA/ROCK pathway, or overexpression of a p75^{NTR} mutant unable to activate RhoA, completely blocked MAG-Fc protection against apoptosis. The role of RhoA/ROCK signaling was further confirmed in the nerve-crush model, where pretreatment with ROCK inhibitor Y-27632 blocked the pro-survival effect of MAG-Fc.

These findings identify a new protective role of MAG as a modulator of apoptosis of MNs during postnatal development by a mechanism involving the p75^{NTR}/RhoA/ROCK signaling pathway. Also, our results highlight the relevance of the nurture/protective effects of myelin on neurons.

Introducción

1.1. Glicoproteína asociada a mielina (MAG).

1.1.1. Generalidades.

El proceso de mielinización favorece una rápida conducción nerviosa esencial para la función del sistema nervioso de vertebrados. Además, la mielina posee un rol estabilizador sobre los axones que envuelve, regula el citoesqueleto axonal y contribuye a la organización de los Nodos de Ranvier; asimismo se ha demostrado que tiene un efecto opuesto, ya que puede inhibir la regeneración axonal después de una lesión (Schnaar y Lopez, 2009). Todas estas funciones sugieren una intensa comunicación molecular entre la membrana axonal y la capa de mielina más interna. Existe abundante evidencia de que esta comunicación involucra la interacción de diversos complejos ligando-receptor, capaces de generar una cascada de señalización intracelular que se traduce en cambios de la fisiología neuronal (Schnaar y Lopez, 2009).

Una de las moléculas derivadas de mielina que participa en las interacciones entre los axones y la mielina es la “Glicoproteína asociada a mielina” (MAG, por sus siglas en inglés), identificada por primera vez en el año 1973 por Richard Quarles, quien la aisló como la principal glicoproteína de extractos de mielina, la cual se expresa tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en el sistema nervioso periférico (SNP) (Everly y col., 1973).

1.1.2. Estructura y expresión de MAG.

MAG, también conocida como Siglec-4, es una glicoproteína integral de Tipo I de 100 KDa, perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF), y miembro de la familia de proteínas de superficie celular denominada Siglecs, un subgrupo de

IgSF que comparten características funcionales y estructurales, entre ellas la capacidad de unión a ácido siálico. La estructura de MAG consiste en un dominio extracelular, el cual media la unión a los axones y contiene cinco dominios de tipo inmunoglobulinas (dominios Ig); un segmento transmembrana y un dominio citoplasmático (Quarles, 2007). En el sistema nervioso, MAG existe predominantemente como dos isoformas que surgen de un empalme alternativo que produce dos proteínas con dominios extracelulares y transmembrana idénticos, pero se diferencian en la longitud de los dominios citoplasmáticos que le confieren diferentes capacidades de señalización. Estas dos isoformas se denominan S-MAG y L-MAG, presentando un dominio citoplasmático corto y largo, respectivamente, y migran conjuntamente como como una amplia banda de 100 kDa como resultado de su glicosilación extensiva (Figura 1). La expresión de MAG está regulada temporal y espacialmente en el sistema nervioso. L-MAG predomina durante el desarrollo del SNC y es la isoforma más abundante durante el proceso de mielinización, mientras que S-MAG se acumula en las etapas posteriores. En el SNP, S-MAG es la forma predominante durante el desarrollo mientras L-MAG permanece con una baja expresión (Inuzuka y col., 1991; Lai y col., 1987; Pedraza y col., 1990; Tropak y col., 1988).

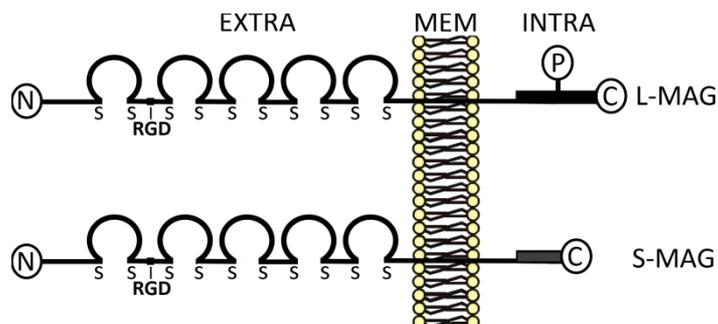


Figura 1: Estructura de MAG. Modelos de 72 kDa y 62 kDa de polipéptidos correspondientes a las isoformas de MAG: L-MAG (isoforma larga) y S-MAG (isoforma corta). Estos polipéptidos son generados mediante el corte y empalme alternativo de un único gen y tienen idénticos dominios extracelulares (EXTRA) y transmembrana (MEM), pero difieren en la región C-terminal del dominio citoplasmático (INTRA). Modificado de Trapp, 1990.

MAG es producida solo por las células gliales mielinizantes: oligodendrocitos en el SNC y células de Schwann en el SNP. MAG es una glicoproteína minoritaria del SNC (1%) y del SNP (0,1%) y su expresión aparece asociada al inicio del proceso de mielinización durante el desarrollo postnatal (Quarles, 2007). Durante la mielinización, MAG se expresa en los cuerpos y procesos celulares, en las capas de mielina de axones mielinizando, y luego de completarse el primer bucle de mielina su expresión se limita a la capa de mielina más interna, en íntimo contacto con la membrana axonal (Lopez, 2014) (Figura 2). En el SNP, MAG se encuentra expresada en otras estructuras como los bucles paranodales, incisuras de Schmidt-Lanterman (hebras de citoplasma dentro de la vaina de mielina no compactada) como así también en la superficie externa de células de Schwann mielinizando (Trapp y col., 1989). Asimismo, se conoce que los bucles paranodales de los axones del SNC también expresan MAG en cierta medida. Adicionalmente, MAG se encuentra en las células de Schwann no mielinizantes perisinápticas que cubren las terminales nerviosas motoras en las uniones neuromusculares. Debido a su exclusiva localización periaxonal MAG fue originalmente asociada con las funciones en la interacción axón-glía tanto del SNC como el SNP (Lopez, 2014).

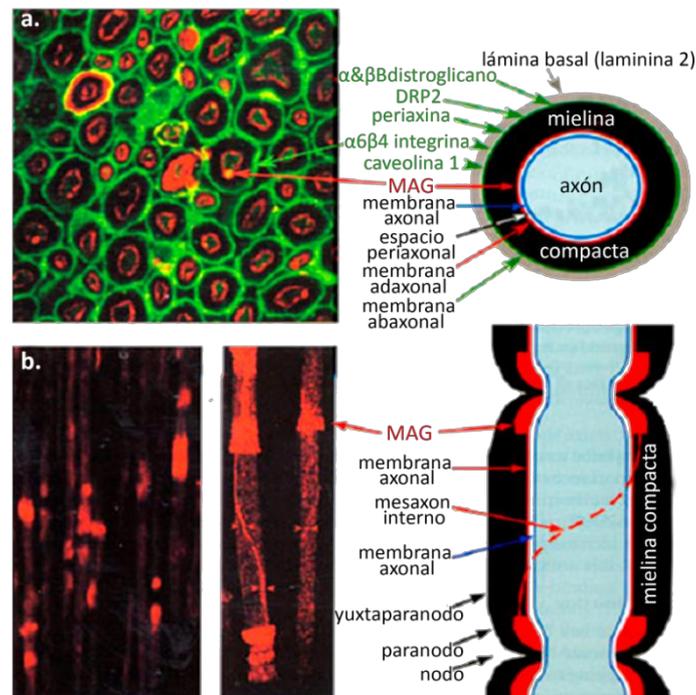


Figura 2: Localización de MAG. a. Fotomicrografías de una sección transversal de axones en el SNP mostrando una inmunofluorescencia que permite visualizar la localización de MAG restringida a la

membrana periaxonal. **b.** Fotomicrografía de una sección longitudinal de un axón, que muestra una inmunofluorescencia para MAG, permitiendo visualizar su localización periaxonal, concentrada en la región de los Nodos de Ranvier e incisuras de Schmidt-Lanterman. Modificado de Myelin Biology and Disorders por Robert Lazzarini, 2004.

1.1.3. Mielinización en ausencia de MAG.

La implicancia funcional de MAG en la formación de mielina está dada por su exclusiva localización periaxonal y por la activación de la señalización que involucra la proteína quinasa Fyn, funcionando como un integrador y mediador central en la comunicación axón-glía. Ha sido sugerido que la señalización de Fyn aguas abajo de MAG juega un rol crítico durante las primeras etapas del proceso de mielinización *in vivo*; sumado a esto, los ratones deficientes de Fyn tienen afectada la mielinización (Krämer-Albers and White, 2011; Umemori y col., 1994). Sin embargo, se ha observado que los ratones deficientes de MAG expresan abundante mielina con un grado de mielinización y compactación normales, en contraste a lo que sucede en ratones mutantes que tienen afectadas otras proteínas de mielina, tales como la proteína P0, la proteína básica de mielina (MBP, por sus siglas en inglés) y la proteína proteolipídica (PLP, por sus siglas en inglés), los cuales presentan severos impedimentos en la mielinización.

Asimismo, los ratones *Mag*-null presentan alteraciones estructurales tales como la formación de una mielina compacta redundante con disrupción en la lamela, incremento del espacio periaxonal, algunos axones con mielina supernumeraria, y un aumento de axones amielínicos en el SNC (Bartsch y col., 1997). Además, estos ratones muestran una disminución del calibre axonal, alteraciones en la distribución de canales y moléculas de reconocimiento de los nodos de Ranvier y se caracterizan por una degeneración axonal de aparición tardía, que permanece activa y constante a lo largo de la vida adulta del ratón (Bartsch y col., 1997; Li y col., 1994; Montag y col., 1994; Nguyen y col., 2009; Trapp y col., 1989) (Figura 3).

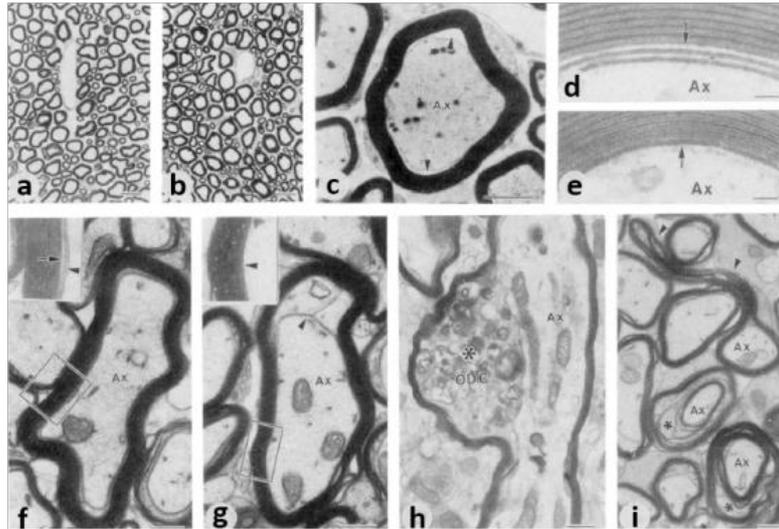


Figura 3: Ratones deficientes de MAG presentan mínimas alteraciones en la morfología de mielina en el SNP (panel superior) y SNC (panel inferior). (a-b) Fotomicrografías de secciones de 1 μm de raíces espinales que muestran una mielinización normal en ratones Wt (a) y *Mag*-null (b) a los 3 meses de edad. (c) Micrografía electrónica de un axón mielinizado (Ax) de la raíz espinal de ratones *Mag*-null, mostrando un incremento en el espacio periaxonal (puntas de flechas). (d-e) Micrografías electrónicas mostrando el espacio periaxonal normal (12 a 14 nm) (asterisco) y el collar citoplasmático de las células de Schwann (flecha) de la raíz espinal de ratones Wt (d), característica no preservada en los ratones *Mag*-null (e, flecha) (f-g) Micrografías electrónicas de fibras de nervio óptico de ratones Wt (f) mostrando un espacio periaxonal normal (punta de flecha) y collar citoplasmático (flecha) y fibras de nervio óptico de ratones *Mag*-null (g) con una disminución del espacio periaxonal (punta de flecha) y ausencia de collares citoplasmáticos en oligodendrocitos (a excepción de la región del mesaxón, donde el collar citoplasmático está presente, punta de flecha). (h) Sección longitudinal de fibras de nervio óptico de ratones *Mag*-null con una desorganización focal del collar citoplásmico periaxonal (asterisco). (i) Sección transversal de fibras de nervio óptico de ratones *Mag*-null que muestra una disrupción de la vaina de mielina compacta (asterisco) y una mielina compacta redundante (punta de flecha). Edad: 3 meses. Abreviaturas: Ax: axón; ODC: oligodendrocito. Barra de escala: (a,b) 10 μm ; (c,f,g,h) 0,5 μm ; (d,e) 0,05 μm . Modificado de Li y col., 1994.

Por lo tanto, los estudios en los ratones *Mag*-null revelan que MAG no es esencial para la formación de la mielina compacta; sin embargo, permiten resaltar un número de funciones relevantes para el mantenimiento de axones mielinizados (Li y col., 1994; Nguyen y col., 2009; Pan y col., 2005; Yin y col., 1998). Sumado a esto, los ratones deficientes de MAG mostraron patrones motores y de postura normales en la prueba de campo abierto, sin embargo se observaron diferencias mínimas en las habilidades de coordinación motora fina respecto a los ratones Wt durante la prueba

de barra cruzada. Los ratones *Mag*-null presentaron además una disminución en la actividad locomotora, ya que fueron más lentos en atravesar la barra estrecha, y presentaron una menor frecuencia en el olfateo exploratorio y acicalamiento (Li y col., 1994).

1.2. Rol de MAG en la interacción axón-mielina y estabilidad axonal.

La mayor parte del conocimiento derivado del estudio de los ratones deficientes de MAG, permitió establecer un rol funcional de MAG en el inicio del proceso de mielinización (Li y col. 1994, Montag y col. 1994), y estas evidencias permitieron enfatizar la importancia de MAG en el mantenimiento de una interacción estable entre el axón y la mielina. MAG participa en una gran cantidad de procesos celulares necesarios para el normal desarrollo y funcionamiento de las neuronas; tales como la estabilidad neuronal, donde participa en la protección de los axones, y además está involucrada en la conducción nerviosa saltatoria, regulación del citoesqueleto axonal, así como también en procesos de inhibición de la regeneración axonal.

1.2.1. MAG como un inhibidor de la regeneración axonal.

El interés en el estudio de MAG se intensificó cuando fue descrito como el primer inhibidor de la regeneración axonal derivado de mielina. Inicialmente se estudió por fraccionamiento que proteínas de mielina inhibían el crecimiento neuronal *in vitro* en células de neuroblastoma, y MAG fue identificado como el principal inhibidor del crecimiento (McKerracher y col., 1994). Al mismo tiempo otros estudios demostraron que MAG era capaz de inhibir el crecimiento neuronal de células granulares del cerebelo (CGs, por sus siglas en inglés) y neuronas adultas del ganglio dorsal (DRG, por sus siglas en inglés) (Mukhopadhyay y col., 1994). Sumado a esto, estudios *in vivo* demostraron un modesto pero significativo incremento en la regeneración axonal en los ratones *Mag*-null luego de una lesión en la región torácica del tracto corticoespinal (Li y col., 1996).

A pesar de la gran evidencia *in vitro* (McKerracher y col., 1994; Mukhopadhyay y col., 1994), el rol inhibitorio de MAG en la regeneración axonal sigue siendo controversial (Bartsch y col., 1995; David y col., 1995). Los primeros estudios *in vivo* en ratones *Mag*-null se desarrollaron utilizando el modelo de lesión de contusión del nervio óptico y tracto corticoespinal, donde no se observó una mejora de la regeneración axonal en ratones deficientes de MAG (Bartsch y col., 1995). En contraste con estos estudios, los animales producto del cruzamiento de los ratones *Mag*-null con mutantes C57BL/WldS, los cuales presentan un retraso en la degeneración de mielina y regeneración axonal inducido por una lesión, mostraron una mejoría en la regeneración axonal del SNP (Schäfer y col., 1996). De esta manera, se propuso que la pérdida de la actividad inhibitoria de MAG es compensada por la expresión de otras proteínas inhibitorias provenientes de mielina que pueden estar enmascarando el rol *in vivo* de MAG en la regeneración axonal (Cafferty y col., 2010; Lee y col., 2010). Al presente han sido identificados numerosos inhibidores de la regeneración axonal derivados de mielina tales como NogoA, OMgp (glicoproteína asociada a oligodendrocitos) (Domeniconi y col., 2002; Lauren y col., 2007; Liu y col., 2002), ephrinB3 (Benson y col., 2005), semaforinas (Moreau-Fauvarque y col., 2003), netrinas (Löw y col., 2008) así como también proteoglicanos presentes en la cicatriz glial.

1.2.2. Receptores axonales reconocidos por MAG.

Luego de la identificación de MAG como el primer inhibidor de la regeneración axonal derivado de mielina, la atención se dirigió al estudio de los receptores axonales, co-receptores y vías de señalización asociadas a este efecto (Schnaar y Lopez, 2009). Simultáneamente a los descubrimientos de MAG como inhibidor de la regeneración axonal (McKerracher y col., 1994; Mukhopadhyay y col., 1994), se describió que MAG tenía la capacidad de unirse a sialoglicanos basado en su secuencia similar a la familia de proteínas de unión a ácido siálico denominadas Siglecs (Kelm y col., 1994). Estos estudios demostraron la alta especificidad de MAG por los terminales de oligosacáridos NeuAc α 2-3 Gal β 1-3 GalNAc (Yang y col., 1996), los cuales son abundantes en dos sialoglicanos predominantes en el cerebro, los

gangliósidos GD1a y GT1b; lo que permitió identificarlos como los primeros receptores reconocidos por MAG (Pan y col., 2005; Vyas y col., 2002).

En el momento en el que los gangliósidos estaban siendo evaluados como posibles receptores funcionales de MAG, se describió un nuevo receptor axonal perteneciente a la familia de los receptores NgRs, el cual posee tres miembros de alta homología estructural denominados NgR1, NgR2 y NgR3 (Schnaar y Lopez, 2009) que se caracterizan por estar anclados a la membrana plasmática a través de un residuo glicofosfatidil-inositol (GPI, por sus siglas en inglés). Asimismo se ha descrito que NgR1 puede actuar como receptor de otros dos inhibidores de la regeneración axonal derivados de mielina, NogoA y OMgp (Domeniconi y col., 2002; Lauren y col., 2007; Liu y col., 2002). MAG también se une con alta afinidad al receptor NgR2, pero en este caso la interacción es dependiente de ácido siálico; del mismo modo se ha descrito que MAG es incapaz de unirse al receptor NgR3 (Lauren y col., 2007; Venkatesh y col., 2007). La interacción de MAG con los axones involucra al menos dos sitios de reconocimiento: uno alrededor de la arginina 118 (R118) en el dominio 1 Ig y un segundo sitio en los dominios 4 y 5 Ig. Mientras que los dominios 4 y 5 Ig son importantes para la señalización de MAG a través de los receptores NgRs, el sitio de unión R118 está involucrado en la interacción con gangliósidos y β -1 integrina (Cao y col., 2007; Goh y col., 2008; Kelm y col., 1994; Tang y col., 1997).

Algunos receptores requieren de proteínas transmembranas para transducir su señal inhibitoria al interior de la neurona; en relación a esto se ha demostrado que NgR1 forma un complejo con el receptor de baja afinidad para neurotrofinas, p75^{NTR}; alternativamente éste puede ser sustituido por un receptor huérfano denominado TAJ/TROY, perteneciente a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés), el cual está ampliamente expresado en neuronas postnatales y adultas (Park y col., 2005; Shao y col., 2005). El complejo de señalización se completa con la presencia de LINGO-1, un componente transmembrana específico del sistema nervioso que conecta NgR1 y p75^{NTR} (Mi y col., 2004), esta molécula contiene 12 dominios repetidos ricos en leucina, un dominio de inmunoglobulina (Ig), un dominio transmembrana y una cola citoplasmática corta, y se encuentra ampliamente expresado en el cerebro y en la médula espinal (Mi y col., 2004) (Figura 4).

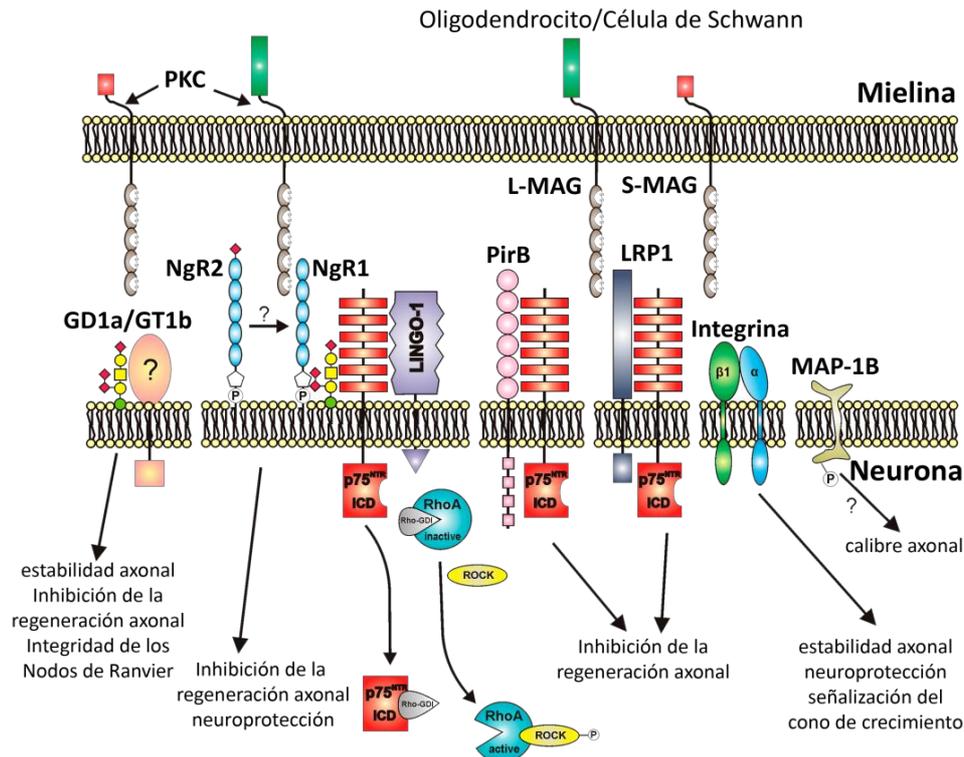


Figura 4: Receptores axonales, co-receptores y vías de señalización asociadas con MAG. La figura resume el conocimiento que se tiene actualmente acerca de los receptores y mecanismos de señalización asociados con MAG. Al presente han sido descritos cinco receptores funcionales de MAG que incluyen los gangliósidos complejos (GD1a y GT1b), los receptores Nogo 1 y 2 (NgR1 y NgR2), el receptor de inmunoglobulinas del tipo B (PirB), el receptor β-1 integrina y la proteína 1 relacionada con la lipoproteína LDL (LRP1). Todos estos receptores están asociados con la señal inhibitoria del crecimiento neuronal mediada por MAG. NgR1 y gangliósidos son parte de un complejo de señalización multimérico en la membrana axonal, que incluye al receptor de neurotrofinas p75^{NTR} y LINGO-1. La señal inhibitoria del crecimiento neuronal mediada por MAG se traduce a través de p75^{NTR}, el cual se une al inhibidor de disociación de Rho-GDP (Rho-GDI) e induce la subsecuente activación de la GTPasa pequeña RhoA y su efector, ROCK. Modificado de Lopez, 2014.

Luego de la unión del ligando, NgR1 interactúa con el complejo p75^{NTR}/LINGO-1 produciendo la inhibición del crecimiento axonal a través de la activación de la GTPasa pequeña RhoA. Esto es posible ya que el receptor p75^{NTR} sufre un clivaje proteolítico secuencial que permite la liberación del dominio citoplasmático, el cual interactúa con el inhibidor de disociación de Rho-GDP (Rho-GDI, por sus siglas en inglés) resultando en la activación de RhoA (Domeniconi y col., 2005). Asociaciones físicas directas han sido reportadas entre MAG con el gangliósido GT1b y ambos

receptores, p75^{NTR} y NgR1, proporcionando una vía de señalización común que converge en la activación de RhoA. Sin embargo, los gangliósidos pueden señalar a través de vías independientes del receptor p75^{NTR}, mediante el uso de otra molécula transductora que hasta el momento no ha sido identificada (Schnaar y Lopez, 2009).

Por otro lado, se han descrito otros receptores funcionales de MAG, tales como PirB, perteneciente a la familia de inmonoglobulinas de tipo B; LRP1, proteína 1 relacionada con la lipoproteína LDL; β -1 integrina y el receptor MAP1B, proteína 1B asociada a microtúbulos, los cuales hasta el momento no han sido extensamente estudiados (Atwal y col., 2008; Franzen y col., 2001; Goh y col., 2008; Stiles y col., 2013) (Figura 4).

1.2.3. Propiedades protectoras de MAG en las neuronas.

Como se mencionó anteriormente, el rol de MAG como proteína estabilizadora de axones fue descrito gracias a la generación de ratones carentes del gen *mag* (*Mag-null*) (Li y col., 1994; Montag y col., 1994). Estos ratones producen abundante mielina con mínimas alteraciones estructurales, con una degeneración axonal progresiva de aparición tardía y una reducción del calibre axonal (Montag y col., 1994; Pan y col., 2005; Yin y col., 1998); siendo estas observaciones las que sugirieron que MAG podría tener funciones en la estabilidad de los axones. Sumado a esto, se demostró que los ratones que carecen del complejo de gangliósidos GD1a y GT1b muestran un patrón similar de degeneración axonal que los ratones *Mag-null*, y nuevos estudios comparando neuropatologías y déficits conductuales en ratones deficientes de gangliósidos, permitieron apoyar la noción de que el complejo gangliósidos y MAG es capaz de mediar la estabilidad axonal en el sistema nervioso (Pan y col., 2005; Sheikh y col., 1999). Sin embargo, no fue hasta el año 2009 donde la acción estabilizadora de MAG fue confirmada en diversos modelos. Los estudios de Nguyen y colaboradores demostraron por primera vez un rol estabilizador de MAG sobre el citoesqueleto de tubulina, incrementando los niveles de microtúbulos detirosinados (estables) y disminuyendo el nivel de los microtúbulos tirosinados (dinámicos). Finalmente demostraron el rol estabilizador de MAG en diferentes

modelos de toxicidad axonal inducida por la administración de acrilamida, una neurotoxina industrial; así como también vincristina, un agente despolimerizante de microtúbulos usado para el tratamiento de cáncer, y otros mediadores inflamatorios (Nguyen y col., 2009). Estos datos permitieron confirmar el rol de MAG como una de las moléculas de mielina responsable de los efectos en la estabilización y protección de axones.

Más tarde, nuevos estudios confirmaron que MAG era capaz de proteger axones frente a un insulto tóxico agudo en DRGs cultivadas en un sustrato que contiene mielina, las cuales mostraron resistencia a la degeneración axonal inducida por vincristina; y se demostró que los gangliósidos eran los receptores encargados de mediar el efecto protector de MAG sobre axones, involucrando la activación de la quinasa asociada a Rho, ROCK y a una proteína de unión a microtúbulos, CRMP-4 (Mehta y col., 2010; Nagai y col., 2012; Nguyen y col., 2009) .

De manera interesante, el rol neuroprotector de MAG no está restringido a los axones que envuelve, sino por el contrario puede disparar eventos de señalización que promueven la supervivencia neuronal. Esto fue demostrado en estudios donde se utilizaron diferentes modelos de excitotoxicidad y se describió que la unión de MAG a sus receptores axonales tiene un gran impacto en la supervivencia neuronal (Lopez y col., 2011). En estos estudios, se realizó la caracterización farmacológica de los receptores responsables de la protección ejercida por MAG sobre neuronas hipocámpales cultivadas *in vitro*, contra excitotoxicidad inducida por ácido kaínico; indicando que el rol neuroprotector de MAG es mediado por los receptores NgRs y β 1-integrina, involucrando la activación de ROCK. De manera interesante, se conoce que MAG inhibe el crecimiento de estas neuronas principalmente vía gangliósidos, por lo que estos resultados permitieron demostrar el rol dual de esta glicoproteína (neuroprotección e inhibición del crecimiento neuronal) a través de diferentes receptores axonales en la misma célula.

Estos estudios, además mostraron que los ratones deficientes de MAG son susceptibles a excitotoxicidad en dos modelos *in vivo* de las enfermedades humanas Stroke y Epilepsia. Más aún, la administración de MAG-Fc, una forma quimérica soluble de MAG, fue capaz de revertir dicha susceptibilidad en el modelo de Stroke (Lopez y col., 2011).

Es importante mencionar que los insultos agudos pueden inducir una disminución en la expresión de MAG y una disrupción en la integridad de la comunicación axón-glía, lo cual pone en evidencia la dinámica natural de esta interacción (Lopez, 2014). Todos estos resultados, permiten enfatizar la contribución de MAG en el rol protector de mielina sobre axones a través de la unión a diferentes receptores axonales, bajo diversas condiciones patológicas siendo MAG un componente clave en la comunicación bidireccional entre la mielina y el axón.

1.3. Motoneuronas de la médula espinal.

Durante el desarrollo del sistema nervioso de los vertebrados se generan diferentes tipos de células neuronales a través de un precursor pluripotente, con diversas características funcionales tales como su posición de origen, las proyecciones axonales y las conexiones sinápticas. Las MNs están localizadas en el SNC, y las hay de dos tipos principales; (i) las MNs superiores, que se originan a partir de la corteza cerebral y (ii) las MNs inferiores, que se encuentran en el tronco cerebral y la médula espinal. Las MNs de la médula espinal se localizan en el asta ventral de la médula y controlan los músculos efectores en la periferia. Forman el último e insustituible componente de los circuitos neuronales, ya que no hay otra ruta alternativa para transmitir las señales, desde los centros de procesamiento ubicados en el SNC a los músculos efectores en la periferia. Las MNs de la médula espinal lumbar, emergen de la zona proliferativa ventricular del tubo neural aproximadamente a las 4 semanas en humanos y al día embrionario 13 en roedores (Clowry y col., 2005). La distribución de estas MNs de la médula espinal sigue un gradiente temporal a lo largo de los ejes ventro-dorsal y rostro-caudal (Nornes y Carry, 1978). Un estudio más detallado del tiempo de generación de las MNs en rata fue realizado por Altman y Bayer (1984), quienes encontraron que las neuronas motoras somáticas de la región cervical dejan el ciclo mitótico ligeramente antes, en comparación con los niveles lumbo-sacral. Las MNs de la médula espinal se organizan en distintas columnas anatómicas que se extienden a lo largo del eje rostro-caudal y son llamadas columnas motoras (Stifani, 2014). Las MNs de la columna motora lateral (LMC, por sus siglas en inglés) se

encuentran en la parte ventral más lateral de la médula espinal, se conectan a los músculos de los apéndices y, por tanto están presentes sólo en los niveles de las extremidades, también denominados niveles braquiales (C5 a T1) y niveles lumbares (L1-L5) (Figura 5) (Hollyday y Hamburger, 1977; Hollyday y Jacobson, 1990). Las MNs desarrollan un axón y dendritas; el axón sale a la superficie ventral de la médula, formando colectivamente las raíces ventrales con los axones de otras MNs, mientras que la dendrita se ramifica en el asta ventral y la materia gris intermedia.

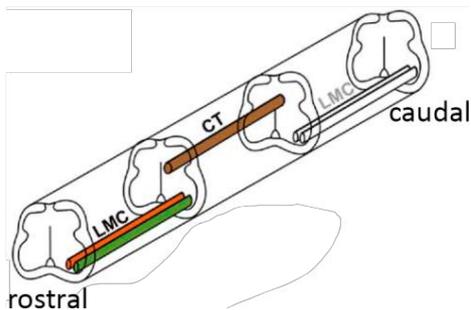


Figura 5: Organización de la médula espinal. Los cuerpos celulares que envían sus axones a las extremidades están contenidas en la columna motora lateral (LMC por sus siglas en inglés) en los niveles braquial y lumbar de la médula espinal. Otras MNs, especialmente las neuronas preganglionares, ocupan la columna de Terni (CT, por sus siglas en inglés) en los niveles torácicos. Las regiones rostral y caudal son señaladas. Modificado de Dasen y col., 2005.

1.3.1. Tipos y distribución de motoneuronas.

Las MNs de la médula espinal pueden dividirse en tres grupos funcionales, de acuerdo al órgano blanco que inervan, MNs branquiales, viscerales y somáticas. Las MNs branquiales están situadas en el tronco cerebral y junto con las neuronas sensoriales el núcleo craneal, inervan los músculos del arco branquial de la cara y cuello (Chandrasekhar, 2004). Las MNs viscerales pertenecen al sistema nervioso autónomo y son responsables del control de los músculos lisos (corazón y arterias) y glándulas; y finalmente, las MNs somáticas que inervan el músculo esquelético responsable del movimiento (Rexed, 1954).

Las MNs viscerales o autonómicas están situadas en el asta intermedia de la médula espinal entre las regiones ventral y dorsal. Estas MNs se subdividen en dos grupos funcionales, simpático y parasimpático. Las MNs preganglionares simpáticas se encuentran en la columna torácica y partes lumbares superiores de la médula espinal; y proporcionan una inervación del músculo liso en los vasos sanguíneos. Las MNs

preganglionares parasimpáticas se encuentran dentro de la médula espinal sacra, y proporcionan inervación parasimpática a las vísceras pélvicas.

Las MNs somáticas están situadas en la región ventral de la sustancia gris de la médula espinal, e inervan los músculos estriados del esqueleto axial (cuello y tronco) y los músculos de los miembros superiores e inferiores. Estas MNs se pueden dividir en tres grupos; alfa, beta y gamma, de acuerdo con el tipo de fibra muscular que inervan dentro de un músculo blanco específico (Figura 6). Las MNs del tipo alfa son las predominantes, e inervan las fibras musculares extrafusales dentro del músculo esquelético, y son claves para la contracción muscular. Una proporción menor de las MNs somáticas son del tipo gamma, e inervan las fibras musculares intrafusales y extrafusales del músculo (Bessou y col., 1965). La tercer clase de MNs somáticas son las del tipo gamma, las cuales envían axones dentro de las fibras musculares intrafusales, y controlan exclusivamente la sensibilidad de los husos musculares (Christopher y Dana Reeve, 2009) (Figura 6).

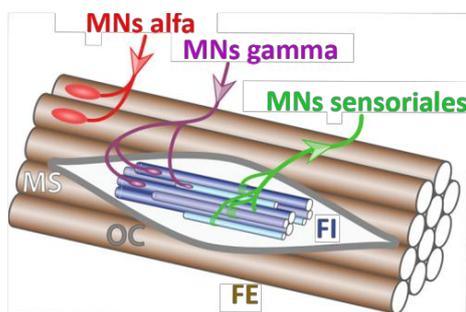


Figura 6: Inervación muscular de las MNs somáticas.

Esquema de una sección longitudinal de fibras musculares. Las MNs alfa (rojo) inervan las fibras musculares extrafusales (FE, marrón), mientras que las MNs gamma (púrpura) se conectan a las fibras intrafusales (FI, azul) dentro del huso muscular (MS por sus siglas en inglés, color gris claro). Las neuronas sensoriales (verde) llevan la información de las fibras musculares intrafusales en el SNC (flecha saliente). Modificado de Stifani, 2014.

Como se mencionó anteriormente, dentro de la región ventral de la médula espinal se reconoce una población de neuronas de gran tamaño que son las MNs alfa. Estas neuronas son multipolares y se identifican como una de las más grandes en el sistema nervioso. En secciones de la médula espinal, analizadas con un microscopio óptico, las alfa MNs se caracterizan por presentar cuerpos de Nissl grandes y prominentes y sus axones salen a las raíces ventrales. Dispersas entre estas neuronas más grandes se encuentran las poblaciones de neuronas pequeñas e intermedias. La mayoría de estas neuronas más pequeñas son las interneuronas, pero una proporción

de ellas son gamma MNs y un porcentaje aún más pequeño corresponde a las MNs del tipo beta (Christopher y Dana Reeve, 2009).

1.3.2. Muerte celular programada de motoneuronas.

El descubrimiento del factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés) en el año 1947, por los investigadores Levi-Montalcini y Cohen, permitió apoyar el concepto originado por Hamburger (1934, 1958) de que moléculas producidas por el órgano blanco de una neurona en desarrollo son requeridas para la supervivencia de las neuronas frente a la muerte celular programada (MCP); este proceso se destaca particularmente durante el desarrollo de las MNs (Ibáñez y Simi, 2012; Vilar y col., 2009). El proceso de MCP de MNs ocurre durante el periodo embrionario en el cual aproximadamente la mitad de las neuronas en desarrollo postmitótico, mueren por un proceso morfológico de apoptosis (Gould y Oppenheim, 2011). Esta hipótesis del factor neurotrófico, acuñada por Purves en 1988, afirma que las células blanco de las neuronas en desarrollo, producen una cantidad limitada de factores neurotróficos esenciales que son captados por las terminales nerviosas (Figura 7).

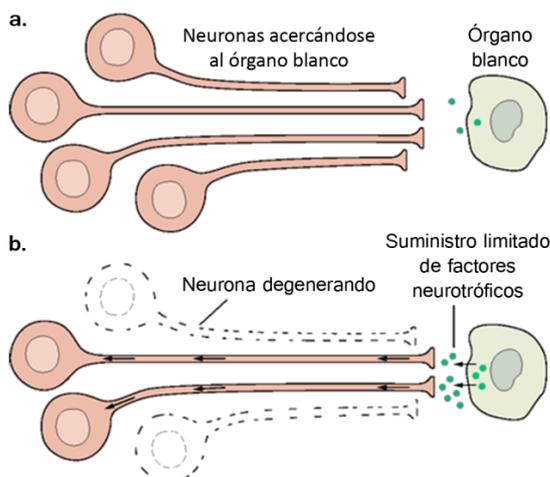


Figura 7: Teoría del factor neurotrófico. a. Las neuronas extienden sus axones en las inmediaciones del órgano blanco. b. Las células blanco secretan cantidades limitadas de factores neurotróficos, éstos se unen a receptores específicos en la superficie celular. Las neuronas que no reciben cantidades adecuadas de factores neurotróficos mueren por apoptosis. Modificado de Reichardt y Fariñas, 1998.

Las MNs de la médula espinal mueren durante el desarrollo embrionario en una manera temporal y espacialmente específica (Gould y Oppenheim, 2011). El periodo de muerte de MNs de la médula espinal torácica y lumbar en ratones se

extiende entre los días embrionarios 13 y 18, resultando en un 60-67% de muerte de MNs (Yamamoto y Henderson, 1999). En ratones se han descrito dos eventos de MCP en la médula espinal a los días embrionarios 12,5 y 14,5, siendo las MNs del extremo cervical final de la médula espinal las primeras que mueren, definiendo una progresión retro-caudal de la MCP (Yamamoto y Henderson, 1999).

Aunque los órganos blanco pueden ser la fuente de las señales pro y anti-apoptóticas durante el período de MCP, con la edad las MNs pierden la dependencia de su órgano blanco, lo que sugiere que con el tiempo, la susceptibilidad a estos factores pro y anti-apoptóticos puede ser alterada por los cambios dependientes del contexto, la expresión, activación y utilización de los receptores del factor trófico localizados en la superficie celular (Escandón y col., 1994; Funakoshi y col., 1995; Griesbeck y col., 1995). Estudios durante el desarrollo de las MNs de la médula espinal mostraron que la eliminación de una extremidad en el desarrollo de un embrión de pollo aumenta enormemente la muerte de MNs, mientras que el trasplante de una extremidad adicional reduce el número de MNs que mueren (Figura 8). Por lo tanto, el organismo puede reaccionar a determinadas desviaciones genéticas de los programas de desarrollo, siendo este tipo de plasticidad la que contribuye a la generación de un sistema nervioso altamente complejo en los vertebrados superiores durante la evolución.

La idea de que el músculo esquelético juega un papel importante en regulación de la supervivencia de MNs durante el desarrollo ha sido cuestionada recientemente por la observación de que los ratones deficientes para *erb-B3*, el receptor del factor de crecimiento glial, muestran un déficit severo de desarrollo de las células Schwann, y como consecuencia una reducción significativa (79%) en las MNs (Riethmacher y col. 1997). Estos datos indican que las células de Schwann en desarrollo son al menos tan importantes para las MNs como el músculo esquelético. Sin embargo, estos datos podrían indicar que las MNs primero son dependientes del factor neurotrófico derivado del músculo, y luego de los factores derivados de las células de Schwann (Sendtner y col., 2000).

El nivel de actividad de una célula blanco o de la propia neurona podría influir en su supervivencia de varias maneras. Por un lado, la actividad de la célula blanco podría inhibir la producción de factores neurotróficos; debido a que este suministro es

limitado cualquier disminución de estos factores podría dar lugar a un aumento en la muerte neuronal. Por otro lado, la actividad eléctrica de las propias neuronas también parece ser necesario para las respuestas adecuadas a los factores neurotróficos. Por lo tanto, esta actividad puede regular tanto la producción como la respuesta de los factores neurotróficos, modelando de este modo cómo una población neuronal los utiliza para dar forma a su número final. Un ejemplo de esto lo confiere el receptor para de baja afinidad para neurotrofinas $p75^{NTR}$, el cual está altamente expresado durante el desarrollo de las MNs y durante todo el período de MCP, pero posee baja expresión luego del nacimiento y hasta la edad adulta (Ernfors y col., 1989; Johnson y col., 1989).

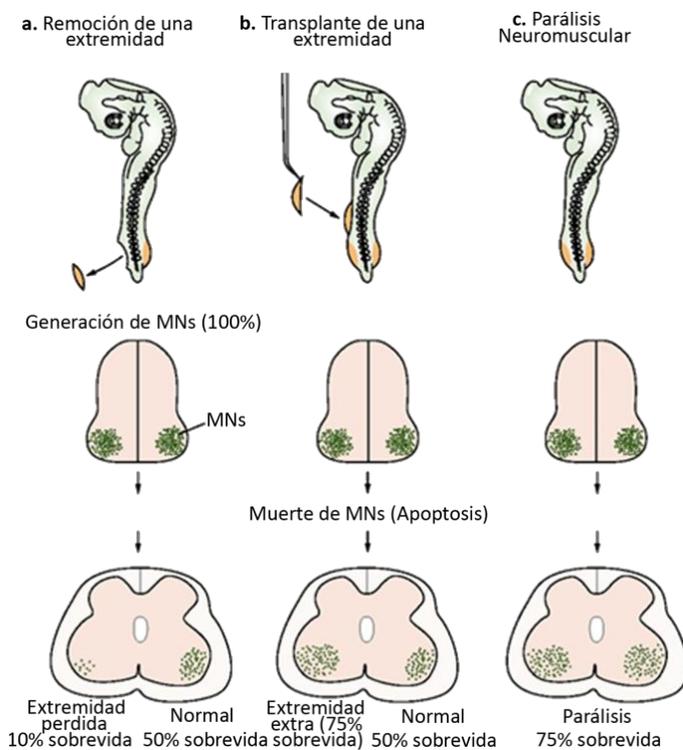


Figura 8: El cambio en el tamaño o actividad del músculo blanco controla la sobrevida de MNs.

(a) La remoción de una extremidad en el desarrollo de un embrión de pollo a los 2.5 días, produce una disminución del número de MNs. Aunque las MNs son generadas en un número normal, más tarde en el desarrollo pocas neuronas motoras permanecen en el lado de la médula espinal donde falta la extremidad. El número de MNs en la región contralateral de la médula espinal es alrededor del 50% del número generado originalmente. **(b)** El incremento del tamaño del órgano blanco reduce la muerte neuronal natural durante el desarrollo. El trasplante de una extremidad adicional antes del período normal de muerte celular en un embrión de pollo resulta en un aumento del número de MNs en el lado con el órgano blanco adicional. **(c)** El bloqueo de la actividad muscular previene el desarrollo de la muerte de MNs. La transmisión neuromuscular es bloqueada tempranamente en el desarrollo por la aplicación de curare, una droga que bloquea la activación de los receptores de acetil colina. Este bloqueo reduce la extensión de la muerte de MNs en la médula espinal lumbar. Modificado de Purves, 1988.

El rol del receptor p75^{NTR} durante estas etapas del desarrollo no está claro, debido en gran parte a la diversidad de ligandos activadores. En varios contextos, p75^{NTR} ha sido implicado en la supervivencia neuronal, la muerte y la regeneración, a través de su asociación con los receptores LINGO-1 y NgRs. Estudios en cultivos de MNs embrionarias las cuales expresan p75^{NTR} *in vitro*, demostraron que la activación farmacológica de NgRs, uno de los receptores funcionales de MAG, fue capaz de modular la MCP de MNs dependiente del receptor p75^{NTR} (Dupuis y col., 2008).

1.4. Mecanismos de apoptosis.

Los mecanismos de apoptosis son muy complejos, e implican una cascada de eventos moleculares dependientes de energía. En mamíferos, las cascadas de señalización que culminan en la muerte celular por apoptosis pueden ser divididas en dos grandes categorías: la extrínseca (o la vía mediada por el receptor de muerte) y la vía intrínseca (o mitocondrial). Hay evidencias que indican que las dos vías están relacionadas y que las moléculas que influyen en una vía, también pueden hacerlo en la otra (Elmore, 2007). Estas cascadas convergen en la misma vía de ejecución; la cual es iniciada por el clivaje de la caspasa-3 y resulta en la fragmentación del ADN, degradación del citoesqueleto y proteínas nucleares, el entrecruzamiento de proteínas, la formación de cuerpos apoptóticos, la expresión de ligandos para receptores de las células fagocíticas y finalmente, la captación por las células fagocíticas.

Aunque muchas de las proteínas apoptóticas claves que se activan o inactivan en la vía de apoptosis han sido identificadas, los mecanismos moleculares de activación de estas proteínas requieren de mayor estudio, y constituyen un foco continuo de investigación. La importancia de la comprensión de la maquinaria molecular de la apoptosis es vital ya que la MCP es un componente importante durante el desarrollo iniciado por varios estímulos fisiológicos y patológicos.

1.4.1. Señalización extrínseca de apoptosis. Vía clásica.

La vía extrínseca de apoptosis involucra la presencia de factores neurotróficos, y es desencadenada por interacciones mediadas por un receptor transmembrana. Éstas involucran a receptores de muerte que son miembros de la superfamilia de genes del receptor TNF (Locksley y col., 2001). Los miembros de la familia del receptor del TNF comparten dominios extracelulares similares ricos en cisteína y presentan un dominio citoplásmico de aproximadamente 80 aminoácidos llamado "dominio de muerte" (DD, por sus siglas en inglés) (Ashkenazi y Dixit, 1998). Este dominio de muerte desempeña un papel fundamental en la transmisión de la señal de muerte de la superficie celular a las vías de señalización intracelular. Al presente, los ligandos mejor caracterizados y sus correspondientes receptores de muerte incluyen FasL / FasR, TNF- α / TNFR1, Apo3L / DR3, Apo2L / DR4, Apo2L / DR5, NGF/p75^{NTR} (Locksley y col., 2001).

La secuencia de eventos que definen la fase extrínseca de la apoptosis están mejor caracterizados con los modelos del FasL/FasR y TNFR1/TNF- α . En estos modelos, hay agrupamiento de los receptores y unión con los ligandos triméricos homólogos. Tras la unión del ligando, las proteínas adaptadoras citoplasmáticas son reclutadas, y exhiben correspondencia con los dominios de muerte que se unen a los receptores. La unión del ligando Fas al receptor Fas resulta en la unión de la proteína adaptadora FADD, mientras que la unión del ligando TNF al receptor TNF da como resultado la unión de la proteína adaptadora TRADD con el reclutamiento de FADD y RIP (Grimm y col., 1996; Hsu y col., 1995; Wajant, 2002). Luego, FADD se asocia con la procaspasa-8 a través de la dimerización del dominio efector de muerte. En este punto, se produce la formación del complejo de señalización que induce la muerte (DISC, por sus siglas en inglés), resultando en la activación autocatalítica de la procaspasa-8 y por lo tanto, la fase de ejecución de la apoptosis (Kischkel y col., 1995). La apoptosis mediada por receptores de muerte puede ser inhibida por una proteína llamada c-FLIP que se une a FADD y la caspasa-8, inactivándolos (Kataoka y col., 1998; Scaffidi y col., 1999). Otro punto potencial de la regulación de la apoptosis implica una proteína llamada Toso, que bloquea la apoptosis inducida por Fas en las células T mediante la inhibición del procesamiento de la caspasa-8 (Hitoshi y col., 1998) (Figura 9).

1.4.2. Señalización intrínseca de apoptosis. Vía alternativa.

En la vía intrínseca de apoptosis, varias señales pro-apoptóticas inducen la liberación de proteínas mitocondriales, tales como el citocromo c (Cit c), a través de algunas proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, las cuales pueden formar un poro y/o incrementar la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial.

Los estímulos que inician la vía intrínseca de apoptosis producen señales intracelulares que pueden actuar de manera positiva o negativa. Señales negativas implican la ausencia de ciertos factores de crecimiento, hormonas y citoquinas que pueden conducir al fracaso en la supresión de programas de muerte, provocando de ese modo la apoptosis. Otros estímulos que actúan de una manera positiva incluyen entre otros, la radiación, toxinas, hipoxia, hipertermia, infecciones virales, y radicales libres. Todos estos estímulos provocan cambios en la membrana interna de la mitocondria que resultan en una apertura de la transición de permeabilidad mitocondrial (MPT, por sus siglas en inglés) de los poros, la pérdida del potencial transmembrana mitocondrial y la liberación de dos grupos principales que son, normalmente secuestrados por proteínas pro-apoptóticas del espacio intermembrana en el citosol (Saelens y col., 2004). El primer grupo consiste en el Cit c, Smac/DIABLO, y la serina proteasa HtrA2/Omi (Cai y col., 1998; Du y col., 2000; van Loo y col., 2002). Estas proteínas activan la vía mitocondrial dependiente de caspasa. El Cit c en el citosol se une al factor de activación de la proteasa de apoptosis (Apaf-1), el cual facilita la unión y activación de la procaspasa-9 en un complejo terciario llamado "apoptosoma" (Chinnaiyan, 1999; Hill y col., 2004) (Figura 9). De esta manera, la agrupación de la procaspasa-9 conduce a la activación de la caspasa-9. Smac/DIABLO y HtrA2/Omi promueven la apoptosis mediante la inhibición de la actividad de IAP (inhibidores de proteínas de apoptosis) (van Loo y col., 2002; Schimmer, 2004). El segundo grupo de proteínas pro-apoptóticas, AIF, endonucleasa G y CAD, son liberados de las mitocondrias durante la apoptosis, pero éste es un evento tardío que se produce después de que la célula ya está comprometida a morir. AIF se transloca al núcleo, causa la fragmentación del ADN y la condensación de la cromatina nuclear periférica (Joza y col., 2001). Esta forma temprana de condensación nuclear se conoce como

"etapa I" (Susin y col., 2000). La endonucleasa G también se transloca al núcleo donde se escinde la cromatina nuclear para producir fragmentos de ADN oligonucleosomal (Li y col., 2001). La función de IAF y la endonucleasa G es independiente de caspasas. Posteriormente, CAD es liberado a partir de las mitocondrias y se transloca al núcleo, donde después de la escisión por la caspasa-3, conduce a la fragmentación del ADN oligonucleosomal y una avanzada condensación de la cromatina (Enari y col., 1998); ésta es conocida como la "etapa II" de condensación (Susin y col., 2000).

El control y la regulación de estos eventos de apoptosis mitocondrial se producen a través de miembros de proteínas de la familia Bcl-2 (Cory y Adams, 2002). La proteína supresora de tumores p53 tiene un papel crítico en la regulación de las proteínas de la familia Bcl-2; sin embargo los mecanismos puntuales aún no han sido completamente dilucidados (Schuler y Green, 2001). La familia de proteínas Bcl-2 gobierna la permeabilidad de la membrana mitocondrial y puede desencadenar una vía pro-apoptótica o anti-apoptótica. Algunas de las proteínas anti-apoptóticas incluyen Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BOLSA, y algunos de las proteínas pro-apoptóticas incluyen Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, y Blk. Estas proteínas determinan si la célula se compromete a la apoptosis o aborta dicho proceso. Se cree que el principal mecanismo de acción de la familia de proteínas Bcl-2 es la regulación de la liberación del Cit c de la mitocondria a través de la alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial.

Las proteínas que controlan directamente las cascadas extrínseca e intrínseca de apoptosis y otras vías de activación de caspasas, a menudo existen como familias que pueden ser reconocidas basados en su secuencia de aminoácidos y/o similitud estructural. Por otra parte, las interacciones entre estas proteínas son comúnmente mediadas por los dominios que se asocian íntimamente con la regulación de la apoptosis, incluyendo los dominios de reclutamiento asociados con caspasas (CARDs, por sus siglas en inglés), dominios de las proteínas de la familia Bcl-2, DDs, entre otros.

Los DDs son un módulo de interacción de proteínas que consisten en un haz compacto de seis hélices. Varios de los miembros de la superfamilia de receptores del TNF contienen DDs en sus regiones citosólicas, incluyendo TNFR1, Fas (Apo1), DR3 (Apo2), DR4 (TrailR1), DR5 (TRAILR2), entre otros. El receptor de baja afinidad para

neurotrofinas p75^{NTR} contiene también un DD, capaz de inducir la apoptosis bajo determinadas circunstancias (Liepinsh y col., 1997).

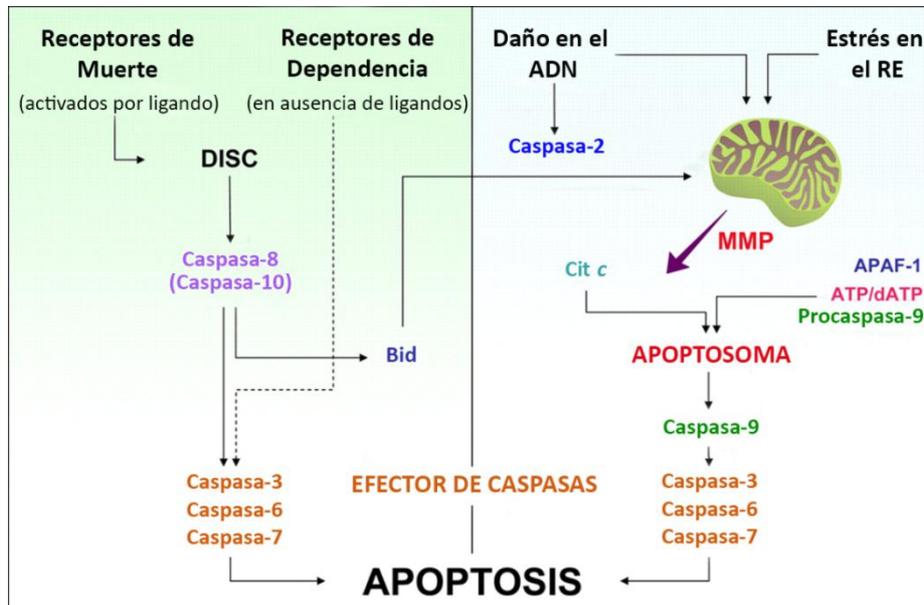


Figura 9: Cascadas de activación de caspasas extrínseca vs intrínseca. A la izquierda: vía extrínseca. La activación de los receptores de muerte por la unión de un ligando, induce la formación del complejo de señalización de muerte (DISC) en el lado citoplasmático de la membrana celular. Éste promueve la activación de la caspasa-8 (y posiblemente de la caspasa-10), la cual es capaz de clivar las caspasas efectoras 3, 6 y 7. La caspasa-8 puede también activar proteolíticamente a Bid, el cual promueve la permeabilización de la membrana mitocondrial (MMP, por sus siglas en inglés) y representar el principal vínculo entre las cascadas de apoptosis extrínseca e intrínseca. La vía extrínseca incluye también a los receptores de dependencia, que disparan una señal de muerte en ausencia de sus ligandos, a través de mediadores aún no identificados. **A la derecha: vía intrínseca.** Varias señales intracelulares que incluyen el daño del ADN y el estrés en el retículo endoplásmico (RE) convergen en la mitocondria para inducir MMP, lo que provoca la liberación de factores proapoptóticos del espacio intermembrana. Entre éstos se encuentra el citocromo c (Cit c), el factor activador de la proteasa de apoptosis 1 (APAF-1, por sus siglas en inglés) y ATP/dATP para la formación del apoptosoma, una plataforma molecular que promueve la maduración proteolítica de la caspasa-9. La caspasa-9 activa, a su vez, produce el clivaje y activación de las caspasas efectoras las cuales conducen finalmente al fenotipo de apoptosis. El daño en el ADN puede ser una señal también de activación de la caspasa-2, la cual actúa aguas arriba de la mitocondria para favorecer la MMP. Modificado de Kroemer y col., 2007.

1.5. Receptor de baja afinidad para neurotrofinas, p75^{NTR}.

Las neurotrofinas presentes en mamíferos, tales como el NGF, el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés), la neurotrofina 3 (NT-3) y las neurotrofinas 4 y 5 (NT-4/5), son requeridas para la supervivencia y diferenciación de poblaciones neuronales específicas durante la ontogenia. En primer lugar se demostró que un miembro prototípico de esta familia, NGF, se unía con alta y baja afinidad a sitios en las neuronas. Más tarde el receptor responsable de esta unión fue clonado e inicialmente nombrado como receptor de baja afinidad para NGF y más tarde, fue denominado p75^{NTR}, cuando se puso de manifiesto que podía unir a otras neurotrofinas (Carter y Lewin, 1997). Las formas maduras de neurotrofinas interactúan con dos tipos de receptores: Trk, de la familia de los receptores tirosina quinasa, y p75^{NTR}, miembro de la superfamilia de los receptores TNF.

1.5.1. Estructura del receptor p75^{NTR}.

El receptor p75^{NTR} consiste en un dominio extracelular rico en cisteína, que permite la unión del ligando; y una región intracelular que contiene un segmento juxtamembrana flexible, un dominio de muerte globular unido a través de un segmento corto (Liepinsh y col., 1997; Underwood y Coulson, 2008) (Figura 10). Por las observaciones de Vilar y colaboradores, se conoce que las neurotrofinas activan al p75^{NTR} homodimérico por un mecanismo que involucra un reacomodamiento del dominio intracelular, en el cual el residuo Cys²⁵⁷ localizado en el dominio transmembrana actúa como punto de apoyo, mediando la propagación de cambios conformacionales (Modelo de Snail-Tong) (Qu y col., 2013).

La dimerización mediada por un ligando ha emergido como un mecanismo universal de activación de un receptor de factor de crecimiento. Las neurotrofinas interactúan con el receptor p75^{NTR} en su forma homodimérica. Se conoce que los dímeros unidos por puentes disulfuro se forman a través del residuo altamente conservado Cys²⁵⁷ en el dominio transmembrana del receptor (Vilar y col., 2009); y se considera el requerimiento de este residuo de cisteína para el reclutamiento de

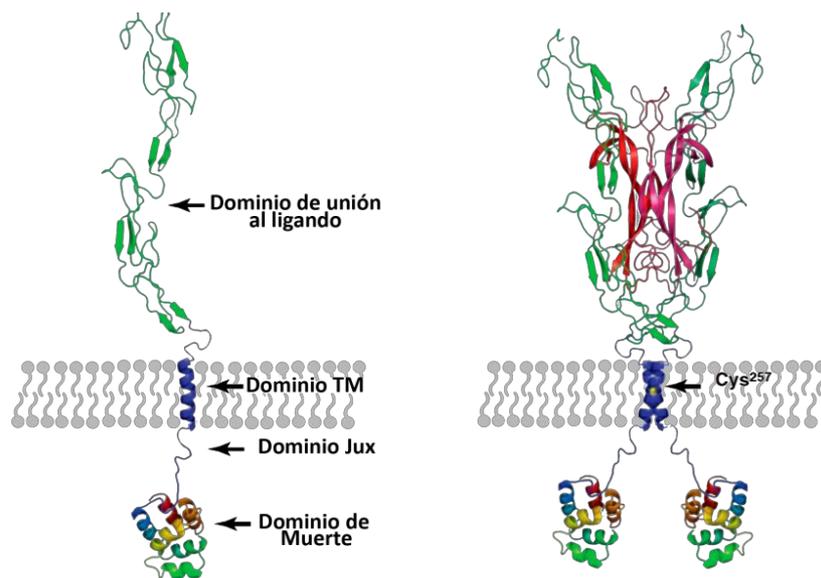


Figura 10: Estructura y mecanismo de activación del receptor p75^{NTR}. Esquema de la estructura del p75^{NTR} en la membrana, con el dominio extracelular (de unión al ligando) y el dominio intracelular, antes y después de la unión de neurotrofinas. Se indica la posición aproximada del residuo Cys²⁵⁷. Las flechas indican el movimiento postulado de “snail-tong” de las subunidades del p75^{NTR} iniciado por la unión del ligando: cerrando el dímero en el exterior, y abriéndose en el interior. TM: transmembrana, Jux: juxtamembrana (un dominio flexible que une el dominio TM y el dominio de muerte). Modificado de Ibáñez y Simi, 2012.

efectores intracelulares y la señalización en respuesta a neurotrofinas, pero no en respuesta a otros ligandos. Una mutación en este residuo anula la activación del receptor dependiente de neurotrofinas pero no afecta la señalización del complejo p75^{NTR}/NgR/LINGO-1 en respuesta a MAG, indicando la existencia de diferentes mecanismos de activación del p75^{NTR} específicos del ligando (Vilar y col., 2009).

En la membrana celular, se postula que el receptor p75^{NTR} está en equilibrio entre diferentes patrones de oligomerización tales como monómeros, dímeros asimétricos y dímeros simétricos, los cuales confieren diferentes niveles de regulación de la vía de señalización del receptor; sumado a esto, recientemente ha sido sugerido que el p75^{NTR} podría ensamblarse como un trímero al igual que los otros miembros de la familia de receptores TNF (Anastasia y col., 2015). Por un lado, el p75^{NTR} tiene actividad quinasa intrínseca donde los diferentes dímeros simétricos y asimétricos corresponden a diferentes estados funcionales. Asimismo, otro nivel de regulación puede ser conferido por el estrés oxidativo. Los residuos de cisteína son capaces de

mediar respuestas celulares por cambios en las condiciones de óxido-reducción, traducidas en alteraciones conformacionales en estructura y función de la proteína. Un mecanismo que se desencadena por detección de estados redox a través de cisteínas es la formación de puentes disulfuro, que determina un equilibrio óxido-reducción entre el dímero simétrico covalente (unido por puentes disulfuro Cys³⁷⁹-Cys³⁷⁹) y el dímero simétrico no covalente (Qu y col., 2013) (Figura 11).

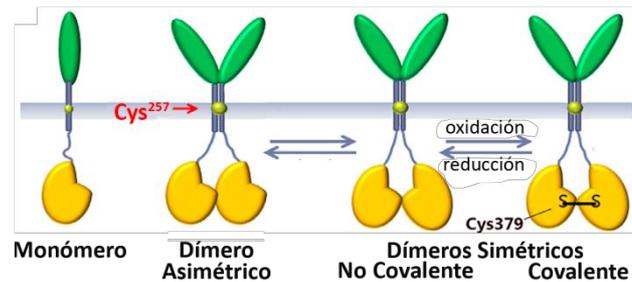


Figura 11: Modelo propuesto de activación del receptor p75^{NTR}. El p75^{NTR} presenta diferentes patrones de oligomerización tales como monómeros, dímeros asimétricos y dímeros simétricos, que pueden existir simultáneamente en la superficie celular (basado en la posición relativa de los dominios intracelulares). Esta regulación puede resultar de la alternancia entre los dímeros asimétricos y dímeros simétricos. Un equilibrio de óxido-reducción puede existir entre el dímero simétrico covalente (con puentes disulfuro Cys³⁷⁹-Cys³⁷⁹) y el dímero simétrico no covalente, que podría conferir otro nivel de regulación a través del estrés oxidativo. Modificado de Qu y col., 2013.

La transducción de señales por el receptor p75^{NTR} se realiza a través de una vía de reclutamiento dependiente del ligando y la liberación de efectores citoplasmáticos hacia y desde el receptor. Más de 20 moléculas intracelulares diferentes que interaccionan con el p75^{NTR} han sido identificadas, pero esta riqueza no se ha traducido en una comprensión comparable en la función del receptor (Vilar y col., 2009). Algunas de los principales eventos de señalización aguas abajo desencadenados por el receptor p75^{NTR}, en respuesta a neurotrofinas, incluye la activación del complejo NF-κβ (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) (Carter y col., 1996), las JNKs (quinasas c-Jun N-terminal) (Friedman, 2000; Yoon y col., 1998) y caspasas (Troy y col., 2002). Asimismo, el receptor p75^{NTR} también puede activar la GTPasa pequeña RhoA (Yamashita y col., 1999), pero esta activación requiere la unión de diferentes ligandos derivados de mielina, tales como MAG (Wang

y col., 2002; Wong y col., 2002), y dos co-receptores: NgR y LINGO-1 (Fournier y col., 2001; Mi y col., 2004).

A todo esto, podemos agregar que el receptor $p75^{NTR}$ de 75 kDa se somete a un clivaje secuencial regulado por la proteólisis intramembrana (RIP, por sus siglas en inglés), que requiere la activación de la proteína quinasa C (PKC, por sus siglas en inglés). $p75^{NTR}$ es clivado secuencialmente por la actividad de metaloproteasas unidas a membrana, similares a las proteasas de la familia ADAMS, denominadas α y γ secretasas. En primer lugar, se produce la proteólisis del dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés) de 50 kDa, a través de la acción de la α secretasa. Segundo a esto, se inicia un segundo clivaje que ocurre en el dominio transmembrana del $p75^{NTR}$ por una γ secretasa, liberándose el dominio intracelular o dominio de muerte DD (ICD, por sus siglas en inglés) de 25 kDa (Domeniconi y col., 2005) (Figura 12). La liberación de este dominio se piensa que es necesaria para la activación de algunos eventos de señalización, como la muerte mediada por NRIF en neuronas simpáticas (Kenchappa y col., 2006).

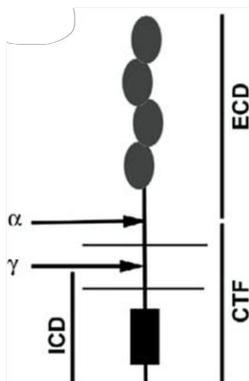


Figura 12: MAG induce el clivaje proteolítico del receptor $p75^{NTR}$ dependiente de la proteína quinasa C (PKC). El ectodominio del $p75^{NTR}$ es inicialmente clivado por metaloproteasas (α secretasa). El resultado de este clivaje es la formación de un fragmento carboxilo terminal (CTF, por sus siglas en inglés), el cual es subsecuentemente clivado por una γ secretasa que permite la liberación del dominio intracelular (ICD por sus siglas en inglés) Modificado de Domeniconi y col., 2005.

El receptor $p75^{NTR}$ puede modular la actividad de RhoA. La forma Wt de RhoA (forma unida a GDP) interacciona con $p75^{NTR}$, mientras que la forma constitutivamente activa de RhoA no lo hace. Esto sugiere que la activación de RhoA depende de la interacción directa de RhoA y $p75^{NTR}$ (Yamashita y Tohyama, 2003). En ausencia de ligando, $p75$ existe en un complejo con Rho en la forma unida a GDP y Rho-GDI (inhibidor de la disociación Rho-GDP), donde Rho-GDI estabiliza al Rho inactivo. Luego de la unión del ligando, el complejo MAG: $p75^{NTR}$: Rho: Rho-GDI mantienen a Rho en su estado inactivo. Luego de la proteólisis del receptor, el dominio ICD del $p75^{NTR}$

desplaza a Rho-GDI de Rho y se induce su activación (Domeniconi y col., 2005; Yamashita y col., 2002). El epítotope Rho-GDI muestra una buena correspondencia con una de las dos regiones blanco para el inhibidor de p75^{NTR}, denominado Tat-Pep5, un pequeño péptido aislado cuya habilidad es unirse al dominio ICD del p75^{NTR}. Tat-Pep5 inhibe la interacción de p75^{NTR} con Rho-GDI y bloquea su capacidad para activar a RhoA (Mehta y col., 2007). Estas observaciones son consistentes con la idea de que Rho-GDI y Tat-Pep5 se unen al mismo epítotope en el dominio de muerte del p75^{NTR} (Charalampopoulos y col., 2012).

En la búsqueda de otros miembros de la familia de los receptores TNF, que tienen el potencial de reemplazar funcionalmente al receptor p75^{NTR}, se ha descrito a un nuevo receptor huérfano denominado TAJ o TROY (Lu y col., 2013; Park y col., 2005; Shao y col., 2005). Se ha observado que este receptor es capaz de sustituir a p75^{NTR}, e interactuar con NgR y LINGO-1 y mediar la activación de RhoA en respuesta a inhibidores derivados de mielina, induciendo la inhibición de la regeneración axonal (Lu y col., 2013). Por lo tanto, la identificación de TROY como un receptor homólogo funcional de p75^{NTR} explica la paradoja de que neuronas que no expresan p75^{NTR} son inhibidas por mielina.

1.5.2. Apoptosis de motoneuronas dependiente de p75^{NTR} luego de una lesión.

Aunque la MCP de MNs finaliza antes del nacimiento en roedores, la supervivencia de MNs continúa siendo dependiente de los factores tróficos liberados por los órganos blanco durante la primera semana postnatal. Más específicamente, las MNs de la médula espinal de ratones permanecen susceptibles a la apoptosis durante la primera semana postnatal. Se ha determinado que una lesión en el nervio ciático en ratones durante la primera semana postnatal induce la apoptosis de MNs dependiente del receptor p75^{NTR}, mientras que una lesión similar en animales luego de la primera semana de vida, resulta en la regeneración del nervio (Li y col., 1994).

El receptor p75^{NTR} se encuentra ampliamente expresado en neuronas simpáticas y sensoriales, en MNs de la médula espinal y bulbo raquídeo, neuronas de

corteza cerebral, cerebelo e hipocampo (Ernfors y col., 1989; Yamashita y col., 1999). En la mayoría de las células la expresión del p75^{NTR} se apaga en los estadios adultos, sin embargo unas pocas áreas conservan la expresión del p75^{NTR} en niveles menores, tal es el caso de las MNs de la médula espinal (Ernfors y col., 1989). Asimismo, el receptor p75^{NTR} puede re-expresarse después de una injuria o estrés celular en las neuronas sensoriales y MNs de la médula espinal. Cuando los axones de las MNs son afectados luego de una injuria en los nervios periféricos, la expresión del receptor p75^{NTR} se incrementa en los cuerpos celulares y axones así como también en las células de Schwann, desencadenando una degeneración Walleriana en la región distal del nervio lesionado (Ferri y col., 1998). La sobrevivencia de MNs en ratones carentes de p75^{NTR} o de los receptores TNF1 y 2 no está afectada durante la MCP, pero está incrementada luego de una lesión en el nervio ciático (Ferri y col., 1998; Raivich, 2002).

Una lesión de contusión en el nervio ciático induce un aumento de la expresión del p75^{NTR} en MNs espinales y faciales que persiste durante 2 a 3 semanas luego de la lesión (Ernfors y col., 1989; Koliatsos y col., 1991; Lowry y col., 2001). De manera interesante, la re-expresión del p75^{NTR} puede ser parte de un programa de plasticidad inducida por una lesión que permitiría recapitular mecanismos de desarrollo. Dos décadas atrás, se había propuesto un rol protector del p75^{NTR} durante una injuria neuronal (Song y col., 2006; Tomita y col., 2007). Sin embargo, los estudios subsiguientes estuvieron enfocados en el rol del p75^{NTR} en la muerte celular. Bartlett y colaboradores mostraron que la reducción de los niveles de este receptor puede prevenir la pérdida de DRGs luego de una injuria (Cheema y col., 1996). Sumado a esto otros estudios demostraron un aumento en la sobrevivencia y regeneración de MNs axotomizadas en ratones mutantes deficientes del receptor p75^{NTR} (p75^{NTR}-null) (Ferri y col., 1998; Wiese y col., 1999).

Los estudios de Park y colaboradores indican que la mielina produce la inhibición del crecimiento axonal a través de un mecanismo dependiente de p75^{NTR}/Rho-GDI/Rho/caspasa-6. Por otra parte estos estudios muestran que en ausencia de p75^{NTR}, los axones colinérgicos septales adultos crecen de manera aberrante en el tracto mielinizado y el cuerpo calloso del cerebro adulto. En conjunto estos datos apoyan un modelo en el que la unión del receptor p75^{NTR} a neurotrofinas cumple un rol fisiológico al mantener la especificidad de la conectividad neuronal, y

proporcionar una explicación fisiológica para la inhibición de la mielina después de la lesión neuronal (Park y col., 2010).

1.6. Rho GTPasas.

Las GTPasas pequeñas son proteínas de señalización intracelular que, junto con sus reguladores y efectores asociados, están involucrados en la modulación de diversos procesos celulares tales como metabolismo lipídico, crecimiento celular, tráfico de membrana, regulación transcripcional, regulación de la citoarquitectura y apoptosis (Aznar y Lacal, 2001; Kaibuchi y col., 1999). La gran mayoría de las GTPasas pequeñas pertenecen a la superfamilia Ras. En base al análisis de homología de secuencias, diez miembros de la subfamilia de las proteínas Rho son conocidos en mamíferos: RhoA-E, RhoG, Rac-1 y Rac-2, Cdc42 y TC10 (Amano y col., 1998). Las proteínas RhoA, B y C tienen secuencias similares de aminoácidos en sus dominios efectores. Al completar su maduración, las Rho GTPasas se asocian a un grupo de proteínas que se denominan Factores Inhibitorios de Disociación de Rho GTPasas (Rho-GDIs, por sus siglas en inglés) que las mantienen en el citosol hasta tanto sean activadas y evitar así, su degradación por proteosomas. La forma inactiva unida a GDP y la forma activa unida a GTP son interconvertibles por el cambio GDP/GTP a través de reacciones mediadas por GTPasas. El ciclado entre estos dos estados funcionales está altamente regulado por dos 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 13).

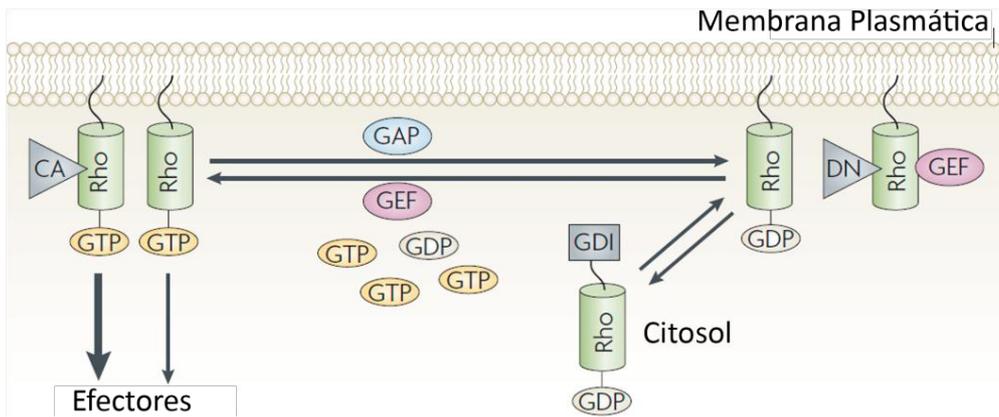


Figura 13: Regulación de la actividad de Rho GTPasas. Las Rho GTPasas inactivas (Rho-GDP) son removidas de la membrana plasmática por Rho-GDIs mediante un mecanismo poco conocido. En el citosol los RhoGDIs evitan la degradación de las Rho GTPasas por los proteosomas. La liberación de GDP es un proceso espontáneo pero lento. Los GEFs aceleran el intercambio de nucleótidos sin una preferencia por un nucleótido particular, ahora bien, ya que la concentración de GTP es mucho mayor que la de GDP, los GEFs promueven la activación de las Rho GTPasas. Los GAPs promueven la actividad GTPasa intrínseca de las Rho GTPasas inactivándolas. Modificado de Heasman y Anne J. Ridley, 2008.

Como se mencionó con anterioridad, el mecanismo general que controla la sobrevivencia o la muerte de las MNs durante el desarrollo depende de los factores tróficos derivados del órgano blanco (Oppenheim, 1991). En particular una variedad de factores neurotróficos desencadenan la sobrevivencia neuronal a través de determinadas vías de señalización, sin embargo ha sido sugerida la presencia de otros mecanismos independientes del soporte trófico. En relación a esto, se ha demostrado que la GTPasa pequeña RhoA, y la quinasa asociada a Rho, ROCK, juegan un rol fundamental en la sobrevivencia de MNs de la médula espinal durante la embriogénesis de mamíferos (Kobayashi, 2004). Más interesantemente, a través de estudios *in vivo* se observó que la expresión condicional de una dominante negativa de RhoA o Rho quinasa reducen el número de MNs, con un incremento de muerte celular apoptótica en la región ventral de la médula espinal, resaltando el rol de la vía de señalización Rho/ROCK en el desarrollo de las MNs de la médula espinal.

1.6.1. Antagonistas de la vía Rho/ROCK.

La vía de señalización RhoA/ROCK es un punto de convergencia de múltiples señales, entre ellas la inhibición de la regeneración axonal luego de una lesión en el sistema nervioso. Por lo tanto, se ha generado mucho interés en la identificación de los componentes capaces de antagonizar dicha vía. En relación a esto, se ha identificado la enzima C3 transferasa, derivada de *Clostridium botulinium*, la cual es capaz de inhibir selectivamente a RhoA sin afectar a otras GTPasas (Forgione y Fehlings, 2014). La primera evidencia que indicó la habilidad de esta enzima para promover la regeneración axonal *in vivo* se realizó en un modelo de injuria del nervio óptico (Lehmann y col., 1999). Otros trabajos en modelos de lesión de la médula espinal en roedores, revelaron que C3 promueve la recuperación luego de la lesión, revirtiendo la activación de Rho, y previniendo la muerte dependiente del receptor p75^{NTR} (Dubreuil y col., 2003).

Por otro lado, la familia de quinasas asociadas a Rho, ROCK1 y ROCK2, son efectores de RhoA, e importantes reguladores del crecimiento neuronal relacionadas a otros numerosos procesos fisiológicos. En este sentido se ha descrito la eficacia *in vivo* de un inhibidor de ROCKs, Y-27632 ((+)-(R)-trans-4-(1-aminoetil)-N-(4 piridil)ciclohexanocarboxamida). Este compuesto inhibe ROCKs por competición de su sitio de unión a ATP (Darenfed y col., 2007). Si bien los estudios de inhibición farmacológica han contribuido en gran medida a la comprensión de la biología de ROCK y han permitido considerar a Y-27632 como un potencial agente terapéutico, el mecanismo molecular de acción aún no ha sido completamente definido.

Objetivos e Hipótesis

2.1. Objetivo general.

Las evidencias científicas obtenidas durante estos últimos años en relación a las funciones de la Glicoproteína asociada a mielina (MAG), convergen en señalar un rol estabilizador/protector de MAG sobre los axones que envuelve; siendo una cuestión importante a resolver si MAG podría ejercer este efecto protector con impacto directo en el cuerpo neuronal, a pesar de que interacciona directamente con el axón.

Gran cantidad de evidencias describen a distintos tipos de receptores en el axón como componentes claves en la señalización de MAG. En relación a esto, se ha demostrado un rol crítico para los receptores NgRs como moduladores de la muerte celular programada dependiente del receptor p75^{NTR}, que sufren las motoneuronas (MNs) durante el desarrollo. Además, los ratones deficientes de MAG (*Mag*-null) presentaron una disminución en el número de MNs de la médula espinal respecto a los ratones de la cepa salvaje (Wt). Estas observaciones nos llevaron a pensar que la reducción del número de MNs en el ratón *Mag*-null estaría relacionada con la ausencia de un posible rol modulador de MAG sobre la apoptosis de MNs, ejercido a través de su asociación con los componentes del complejo receptor NgRs/p75^{NTR}.

Si bien se conoce el rol del proceso de mielinización sobre la estabilidad de las neuronas en estadios postnatales tempranos, consideramos que es fundamental indagar acerca del posible rol protector de MAG contra la apoptosis de MNs, poniendo especial énfasis en los eventos de señalización que subyacen a la función estabilizadora de MAG durante el desarrollo de MNs. Estos estudios, además de clarificar la importancia de la interacción axón-mielina en la supervivencia de neuronas, pretenden desenmascarar nuevos mecanismos fisiológicos de protección neuronal que a futuro puedan contribuir al desarrollo de nuevas terapias neuroprotectoras.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el objetivo general de esta tesis fue aportar evidencias sobre la contribución de MAG en el rol estabilizador contra la apoptosis de MNs, mediante el estudio de la relevancia fisiológica de la interacción de MAG con sus receptores axonales y vías de señalización involucradas en la supervivencia neuronal.

2.2. Hipótesis.

La hipótesis general de este trabajo es que el proceso de mielinización posee un rol protector/estabilizador sobre el desarrollo postnatal de MNs. En particular proponemos que MAG ejercería un efecto modulador sobre el proceso de apoptosis que sufren las MNs durante el desarrollo postnatal temprano, período en el cual permanecen susceptibles a la deficiencia de factores neurotróficos.

2.3. Objetivos específicos.

- (1) Analizar el número de MNs presentes en la médula espinal de ratones tipo salvaje (Wt, controles) y *Mag*-null a diferentes edades postnatales.
- (2) Estudiar en un modelo *in vivo* de apoptosis dependiente de la activación del receptor p75^{NTR} inducida por una lesión de contusión de nervio ciático, la susceptibilidad de las MNs en ratones Wt y *Mag*-null.
- (3) Valorar los efectos de la administración intraperitoneal de una forma quimérica soluble de MAG (MAG-Fc) en un modelo *in vivo* de apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR}.
- (4) Determinar en un modelo *in vitro* de apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR} inducido por el tratamiento con bajas concentraciones de NGF y NOC-18, el efecto de MAG-Fc sobre cultivos organotípicos y primarios de MNs y en una línea celular derivada de MNs (MN1).
- (5) Estudiar el efecto del silenciamiento de la expresión de los receptores axonales de MAG, utilizando vectores lentivirales que transportan secuencias shRNA específicas en un modelo *in vitro* de apoptosis de MNs.

- (6) Aportar evidencias del rol de la vía de señalización de la GTPasa pequeña RhoA en el efecto protector de MAG sobre MNs, a través del estudio de los patrones espacial y temporal de su actividad mediante el uso de un biosensor de RhoA.
- (7) Analizar el efecto de la inhibición farmacológica de la vía de señalización de RhoA/ROCK en el rol protector de MAG en un modelo *in vivo* de apoptosis de MNs.
- (8) Analizar la contribución del receptor p75^{NTR} como molécula transductora del efecto protector de MAG sobre MNs en un modelo *in vitro* de apoptosis, mediante el uso de un inhibidor farmacológico y mutantes del receptor p75^{NTR}.

Materiales y Métodos

3.1. Animales de experimentación.

3.1.1. Cría y mantenimiento.

La cría y el mantenimiento de los animales de experimentación se realizaron en el Bioterio del Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra. Los ratones fueron mantenidos con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, con el encendido de las luces a las 8 horas y el apagado a las 20 horas, con temperatura constante de 22°C y acceso libre a comida y agua. Los animales se alojaron en cajas de plástico o plexiglás las cuales se cambiaron dos veces a la semana por cajas limpias y viruta fresca. Los animales se mantuvieron con ambos progenitores hasta el destete, el día 21 postnatal.

3.1.2. Ratones transgénicos.

En esta tesis se utilizó una cepa de ratón genéticamente modificado que carece (Knock-out/null) de la proteína MAG (*Mag*-null). Esta mutación consiste en la inserción entre el sitio Xho (X) del exón V de un "cassette" que le confiere resistencia al antibiótico neomicina (Figura 14). Esta disrupción produce un transcripto trunco, carente de función y rápidamente degradable, que funcionalmente resulta en la pérdida de la proteína MAG (Li y col., 1994).

Los ratones *Mag*-null fueron provistos por el Dr. Bruce Trapp, The Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH, USA. Estos ratones mutantes fueron generados en un fondo o "background" genético híbrido 129/Sv-C57BL/6 y después fueron retrocruzados hasta obtener el background puro de la cepa C57BL/6 (Pan y col., 2005).

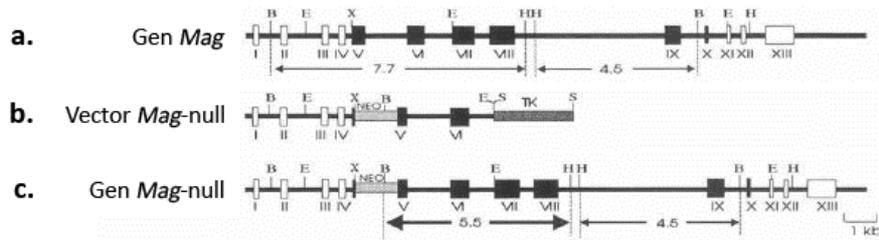


Figura 14: Esquema de disrupción del gen *mag*. a. Los alelos Wt cortan con BamHI (B) y HindIII (H) generando dos bandas de 7,7 y 4,5 kb. b. Vector conteniendo el “casette” de neomicina (neo) en el sitio Xho (X) del exón V y el gen timidina quinasa (TK) en el sitio EcoRI del exón VII. c. Gen mutado donde la inserción del “casette” neo generó un nuevo sitio BamHI y un fragmento de 5,5 kb. Modificado de Li y col., 1994.

Como animales control se utilizaron ratones del tipo salvaje (Wt). Tanto los ratones *Mag*-null como Wt utilizados en esta tesis, provienen de la cepa C57BL/6J, conteniendo un 99,5% del “background” genético de dicha cepa.

En esta tesis además se utilizaron los ratones triple NgR-null que fueron creados como se describe en Pan y col., 2005; y fueron suministrados amablemente por el Dr. Andrew Wood, Compañía de Investigación Wyeth.

El protocolo para la realización de los experimentos comprendidos en las secciones 1, 2, 3 y 4 fue aprobado por el Comité de Cuidado y Uso Animal de la Universidad de Johns Hopkins (Número de Protocolo MO11M83). Todos los procedimientos fueron consistentes con la Ley Federal de los Estados Unidos y por las regulaciones del Instituto Nacional de la Salud (NIH). Asimismo, los protocolos experimentales que fueron desarrollados en el Instituto Mercedes y Martín Ferreyra INIMEC-CONICET-Universidad Nacional de Córdoba fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso Animal de nuestro Instituto, conforme las directrices para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto Nacional de la Salud.

3.2. Materiales.

Y-27632 (Inhibidor de la quinasa Rho) fue obtenido de Calbiochem, Darmstadt, Alemania. TAT-Pep5 (Inhibidor del receptor p75^{NTR}) fue obtenido de EMD

Biociencias, La Jolla, CA, USA (Yamashita y Tohyama, 2003). La forma soluble quimérica humana de MAG (MAG-Fc) o la forma mutante que carece de los dominios extracelulares 4 y 5 (MAG (1,3)-Fc) fueron obtenidas de Sistemas R&D, Minneapolis, MN, USA; las mismas fueron sobreexpresadas en células de mamíferos Flp-In-CHO transfectadas con un vector estable (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), y luego purificadas del sobrenadante de cultivo a través de cromatografía de Proteína-G y dializadas con Buffer Fosfato Salino Dulbecco (PBS) (Collins y col., 2000). Su actividad biológica fue confirmada a través del chequeo de su unión al gangliósido GT1b por ELISA (Lopez y Schnaar, 2006). Solución Salina Balanceada de Hank's (HBSS), Medio esencial mínimo (MEM), Solución de Penicilina/ Estreptomicina, Medio L15 Leibowitz's, Medio esencial mínimo Dulbecco con alta concentración de glucosa (DMEM), Lipofectamina 2000, Medio de transfección OptiMEM y Suero fetal bovino (SFB) fueron obtenidos de Invitrogen, Grand Island, Nueva York, US. Suplemento B27, Suero de caballo inactivado por calor (HI-HS) y el Medio Neurobasal fueron obtenidos de Gibco. NOC-18 (generador de óxido nítrico), Solución de Optiprep, Medio de Montaje Mowiol, poli-D-lisina, todos los suplementos de los medios de cultivos, sales y detergentes fueron obtenidos de Sigma, Saint Louis, MO, US. El anticuerpo monoclonal 12G10 (anti- α -tubulina) generado por los investigadores Frankel y Nelsen, fue obtenido del Banco de Híbrido desarrollado bajo el auspicio del NICHD y mantenido por la Universidad de Iowa, Departamento de Biología, Iowa, IA 52242.

3.3. Histología de la médula espinal y cuantificación del número de motoneuronas.

Ratones *Mag*-null y Wt fueron anestesiados con una sobredosis de hidrato de cloral (0,1 ml/100 grs) y luego de comprobarse que estos se encontraban profundamente anestesiados mediante la ausencia de reflejos flexores, fueron perfundidos transcardíacamente con el fin de fijar la médula espinal. Para esto, en primer lugar, los animales fueron perfundidos con una solución de buffer fosfato salino (PBS, 145 mM NaCl, 90 mM Na₂HPO₄ y 13 mM NaH₂PO₄) con el fin de remover toda la sangre del sistema, seguido de una solución fijadora de 4% de paraformaldehído

(Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich Lab GmbH, Seelze, Alemania) en PBS (0,1M, pH 7,4). La médula espinal fijada permaneció dentro de las vértebras durante 24 horas a 4°C en solución de paraformaldehído al 4% y luego fueron removidas y colocadas en una solución de sacarosa al 30% durante 72 horas. A continuación, la región lumbar de la médula espinal (L1-L5) fue separada y embebida en medio de montaje para congelación (Biopack). Secciones seriadas de médula espinal lumbar de 10 μm de espesor fueron obtenidas usando un criostato (Reicher-Jung Hn40, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), obteniendo un total de 52 secciones seriadas (520 μm de longitud total). Las mismas fueron procesadas para inmunohistoquímica. Las secciones fueron lavadas tres veces en buffer KPBS (137mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl y 2mM KH₂PO₄) para remover los restos de fijador, y luego fueron teñidas con violeta de cresilo. A continuación, las secciones fueron deshidratadas en una solución de xileno y se montaron mediante el medio de montaje DPX (Fluka, Biochemika, Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Alemania). Las imágenes fueron adquiridas usando un microscopio óptico (Zeiss, Alemania) equipado con una video cámara Leica LC200, objetivo de aire 20x m 1,42 NA. En cada quinta sección se examinó la presencia de MNs en la materia gris anterior de la médula espinal (izquierda o derecha). Se utilizaron dos criterios de clasificación de MNs, la presencia de un único nucléolo situado dentro del núcleo y un área de soma celular $\geq 100 \mu\text{m}^2$. Las gamma MNs presentan un tamaño de soma celular que varía entre 100 y 250 μm^2 , y las alfa MNs presentan un soma cuyo rango de tamaño varía entre 250-1100 μm^2 (Drachman y col., 2002). La cuantificación del número de células y el análisis morfométrico se realizó utilizando el programa Fiji.

3.3.1. Detección *in situ* de la fragmentación de ADN mediante el ensayo de TUNEL.

El ensayo de TUNEL fue realizado en secciones de tejido de 30 μm y se utilizó el kit de detección de apoptosis *in situ* TMR red (Roche, Cat #12156792910). La activación de endonucleasas durante la apoptosis genera fragmentos de ADN con terminaciones 3'-OH. Este método emplea a la enzima TdT (Terminal Deoxynucleotidyl

Transferasa) para adosar deoxinucleótidos tri-fosfatos (dUTP) unidos a digoxigenina a los fragmentos de ADN con terminales 3'-OH (Reacción de Tunel). Las secciones de tejido de ratones Wt y *Mag*-null fueron incubadas por 2 min a 4°C con la solución de bloqueo que contiene 0,1% Tritón X-100, 0,1% de Citrato de sodio en PBS 1X. Luego, la mezcla de la Reacción de Tunel fue adicionada a las secciones de tejido durante 1 h a 37°C en una atmósfera humificada en la oscuridad. Seguido de esto, los tejidos fueron lavados 3 veces con PBS 1X por 5 min. Un control negativo fue realizado por omisión de TdT. Además se utilizaron secciones de tejido de cerebro de ratones Wt que recibieron una inyección intraestriatal de glutamato, como control positivo del ensayo. Los tejidos fueron montados con Mowiol.

3.4. Cultivos de motoneuronas.

3.4.1. Cultivo organotípico de médula espinal de ratón.

La médula espinal lumbar de ratones Wt de 5 días fue removida y colocada en medio de disección que consiste en HBSS, bicarbonato de sodio (4,3 mM), Hepes (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazine-1-ethanesulfonic, 10 mM), D-glucosa (33,3 mM), sulfato de magnesio (5,8 mM), 0,03% albúmina sérica bovina y penicilina/estreptomina a 4°C. Luego, las raíces ventrales y dorsales fueron disectadas y las meninges removidas de la médula espinal. Luego, la médula es cortada en secciones de 250 µm de espesor usando un cortador de tejido. A continuación las secciones (5 por pocillo en una placa de 6 pocillos) fueron transferidas a insertos de cultivo celular (Millipore, Darmstadt, Alemania) y cultivados en medio de cultivo que consiste en 50% de MEM suplementado con 25% de HBSS, 25% de HI-HS, Hepes (25 mM), D-glucosa (35 mM), glutamina (2 mM) y penicilina/estreptomina (1x). Los cultivos fueron mantenidos a 37°C en un incubador al 5% de dióxido de carbono durante una semana y fueron fijados durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de paraformaldehído al 4%.

3.4.2. Cultivo primario de motoneuronas embrionarias.

Los cultivos primarios de MNs fueron realizados utilizando la médula espinal de embriones de ratas Wistar de 15 días de gestación (E15) (Leach y col., 2011). Las ratas madres fueron sacrificadas en una cámara de CO₂ con posterior dislocación cervical. Los embriones fueron removidos de la cavidad abdominal y colocados en una capsula de Petri estéril. La médula espinal de los embriones fue separada y colocada en HBSS a 4°C. Las meninges fueron removidas y el tejido fue cortado en secciones de 2-3 mm, las mismas fueron colectadas en un tubo cónico con medio L-15 Leibowitz's y se realizó una centrifugación a 121 *g* durante 2-3 min. A continuación, se descartó el sobrenadante, y se agregaron 3 ml de tripsina al 0,05%. El tejido fue incubado por 20 min a 37°C en un baño de agua. Luego se agregaron 3 ml de SFB inactivado por calor y se realizó una centrifugación a 121 x *g* durante 2-3 min. Luego, se descartó el sobrenadante, se adicionaron 2 ml de L-15 y se realizó la trituración del tejido con una pipeta Pasteur, hasta observar una solución homogénea. Las células en suspensión fueron luego separadas por gradiente en una solución al 9% de Optiprep en medio L-15, y posteriormente, centrifugadas a 483 x *g* durante 15 min. Las MNs fueron colectadas cuidadosamente de la capa superior y lavadas en medio L15 por centrifugación a 121 x *g* durante 5 min. Luego, las MNs fueron resuspendidas en una pequeña cantidad de medio de crecimiento (250-500 µl) que consiste en Neurobasal con albúmina sérica bovina (2,5 mg/ml), catalasa (2,5 µg/ml), superóxido dismutasa (2,5 µg/ml), transferrina (0,01 mg/ml), D-galactosa (15 µg/ml), progesterona (6,3 ng/ml), putrescina (16 µg/ml), selenito (4 ng/ml), β-estradiol (3 ng/ml), hidrocortisona (4 ng/ml), biotina (2 ng/ml), penicilina/estreptomicina (1x), glutamina (2 µM) y B27 (50x). Se utilizaron vidrios en placas de 24 pocillos, previamente tratados con 0,1 mg/ml de poli-D-lisina. Las células disociadas fueron sembradas en gota a una baja densidad (25-30 células/mm²) con una pequeña cantidad de medio de cultivo. Luego de una hora, las MNs una vez adheridas al sustrato, fueron suplementadas con un volumen final de medio de cultivo de 300 µl. Las células fueron fijadas durante 30 min a temperatura ambiente con una solución de paraformaldehído al 4% y 0,12 M de sacarosa.

3.4.3. Cultivo de la línea celular derivada de motoneuronas, MN1.

Esta línea celular híbrida deriva de MNs embrionarias de ratón cuyo genotipo una vez diferenciadas posee un 99% de homología con MNs adultas de ratón. Las mismas fueron una donación del Dr. Ahmet Hoke, Universidad de Johns Hopkins, Estados Unidos. Las células MN1 fueron cultivadas en un medio de crecimiento compuesto de DMEM, 10% SFB y 2 mM de glutamina a 37°C en una atmósfera humificada al 5% CO₂ (Salazar-Grueso y col., 1991). Las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos o sobre vidrios tratados previamente con 0,1 mg/ml de poli-D-lisina. La diferenciación de las MNs fue inducida por una reducción en la concentración de SFB al 3% durante 3-4 días. Las células fueron fijadas durante 30 minutos a temperatura ambiente con una solución de paraformaldehído al 4% y 0,12 M de sacarosa.

3.4.4. Inducción de apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR}.

Para la inducción de apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR}, los cultivos organotípicos de médula espinal y la línea celular MN1 fueron tratados con bajas concentraciones de NGF (100 ng/ml) (Alomone, Jerusalem, Israel) y NOC-18 (50 nM) durante 24 horas (Dupuis y col., 2008). En cultivos primarios de MNs, la apoptosis fue inducida por el tratamiento con 100 ng/ml de NGF and 50 nM de NOC-18 durante 2 horas. En ensayos de protección, MAG-Fc (20 µg/ml) fue adicionado al medio de cultivo una hora antes a la inducción de apoptosis.

3.4.5. Inmunofluorescencia.

Los cultivos organotípicos fueron fijados durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de paraformaldehído al 4% y lavados tres veces con PBS para remover los restos de fijador. Luego, los cortes se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en un buffer de bloqueo conteniendo 5% de suero normal equino (SNE), 0,5% Triton X-100 en buffer PBS. Seguido de esto, las secciones fueron

transferidas directamente a una solución conteniendo un anticuerpo contra neurofilamentos no fosforilados SMI-32 (Abcam, Cambridge, MA, US) diluido 1:1000 y el anticuerpo anti-Caspasa-3 (Sigma) diluido 1:750 en 1% de SNE, 0,3% Triton X-100 en PBS durante 24 h a 4°C, en agitación suave. A continuación, las secciones se lavaron 3 veces con PBS y se colocaron 2 horas en una solución de 1% SNE en PBS, conteniendo 1:500 y 1:1000 de los anticuerpos Cy2-goat anti-rabbit (Jackson, West Grove, PA, US) y un anticuerpo biotinilado anti-ratón seguido de un anticuerpo estreptavidina Cy3 (Jackson), respectivamente.

La línea celular MN1 fue fijada durante 30 min a temperatura ambiente con una solución de paraformaldehído al 4% y 0,12 M de sacarosa. Seguido de esto, las células fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente en un buffer de bloqueo conteniendo 5% SNE, 0,1% Triton X-100 en buffer PBS. El anticuerpo SMI-32 diluido 1:1000 fue adicionado en una solución que contiene 1% SNE, 0,05% Triton X-100 en PBS durante 24 horas a 4°C, en agitación suave. Todos los tejidos se montaron usando el medio de montaje Krystalon (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Los cultivos primarios de MNs fueron fijados durante 30 min a temperatura ambiente con una solución de paraformaldehído al 4% y 0,12 M de sacarosa. Luego, las MNs fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas durante 30 min a temperatura ambiente en un buffer de bloqueo conteniendo 1,25% de albúmina sérica bovina, 0,05% Tritón X-100 y 2% de SNE en buffer PBS. Los anticuerpos primarios SMI-32 diluido 1:1000 y anti-Caspasa-3 clivada diluido 1:500 (Cell Signaling, US) fueron incubados en una solución que contiene 1,25% albúmina sérica bovina, 0,05% Triton X-100 y 10% de SNE en buffer PBS durante 24 horas a 4°C, en agitación suave. Los cultivos fueron montados con Mowiol.

3.5. Modelo de lesión de nervio ciático.

Un modelo estandarizado de lesión de contusión de nervio ciático fue utilizado (Dupuis y col., 2008). Ratones Wt de 5 días fueron anestesiados hipotérmicamente. El nervio ciático izquierdo fue expuesto mediante una incisión a

nivel medio del muslo. El nervio fue luego lesionado presionando el mismo por 30 segundos utilizando una pinza fina. La separación del contenido endoneurial proximal y distal confirmó una contusión completa del nervio. Posteriormente, la incisión se cerró por sutura, y a los animales se les permitió recuperarse. Los tratamientos consistieron en la inyección intraperitoneal (i.p.) con 50 μ l de MAG-Fc o IgG control (un anticuerpo dirigido contra un epítotope no relacionado con el sistema nervioso conteniendo el mismo isotipo en su porción Fc) (1 mg/ml) tres días previos a la lesión de contusión. Otro grupo de animales fueron administrados con la inyección i.p. de MAG-Fc (igual dosis) e Y-27632 (1 μ l, 10 mg/ml), un inhibidor de la proteína quinasa asociada a Rho, en el sitio de lesión inmediatamente después de la lesión de contusión de nervio sciático. Cinco días posteriores a la lesión, los animales fueron perfundidos y la región lumbar de la médula espinal lumbar fue removida y posteriormente procesada para la cuantificación del número de MNs, de acuerdo a lo descrito previamente.

3.6. Análisis por western blot de los niveles de los receptores NgRs.

Cultivos de células MN1 fueron se homogenizaron en buffer RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,2, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% dodecilsulfato sódico (SDS) y 1% de deoxicolato sódico), conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Sigma, P8340). Los homogenatos fueron sonicados durante 20 segundos.

Las muestras homogenizadas se centrifugaron a 4°C durante 10 min a 14.000 x g y se recuperó el sobrenadante. A partir de éste, se determinó la concentración de proteínas totales utilizando un ensayo de ácido bicinónico (BCA, Pierce, Rockford, IL, US) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. A continuación, las muestras fueron diluidas en buffer Laemmli 4x (8% SDS, 40% glicerol, 20% 2-mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol) equivalente a 0,25 volúmenes de muestra y estas se incubaron durante 5 min a 100°C.

A continuación, 40 μ g de proteína total por muestra fueron separados mediante electroforesis en geles de 12% de acrilamida/bisacrilamida conteniendo 12% de SDS. La electroforesis se realizó en un buffer conteniendo 25 mM Tris, 192 mM

glicina y 1 % SDS, y el gel fue corrido electroforéticamente a un voltaje constante de 100V, durante aproximadamente 90 min, hasta que el frente de corrida del mismo desapareciera. Una vez finalizada la electroforesis, las muestras fueron transferidas desde el gel a membranas de nitrocelulosa (Bio Rad) en un buffer igual al usado en el paso anterior, pero conteniendo 20% de metanol. La transferencia se llevó a cabo durante 90 min a un amperaje constante de 250 mA. Una vez transferidas las proteínas, las membranas fueron teñidas con una solución de 0.1% Ponceau S (Sigma) en 5% de ácido acético con el fin de visualizar la correcta transferencia, y fueron luego lavadas con buffer tris salino (TBS, 20 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl) hasta que las marcas desaparecieran completamente.

Una vez concluida la etapa anterior, las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche en polvo descremada en TBS con 0,05% de Tween 20 (TBS/Tween) durante 1 hora, y luego fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos policlonales IgG anti-NgR1 y anti-NgR2 de ratón diluidos 1:2000 (gentilmente donados por el Dr. Roman Giger, Universidad de Michigan, US). Los anticuerpos fueron diluidos en TBS/Tween con 1% de leche descremada. Luego de la incubación, el anticuerpo fue removido y las membranas recibieron 3 lavados de 10 min con TBS/Tween.

A continuación, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa anti-IgG de conejo (anti-conejo IgG-HRP, Bio-Rad, Hercules, CA, US) en una dilución 1:3000, con 1% de leche descremada en TBS/Tween durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se lavaron nuevamente 3 veces con TBS/Tween. Con el fin de comprobar si se sembraron iguales cantidades de proteína, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo policlonal anti-alfa-tubulina (NS-1) diluido 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) y reveladas con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa anti-IgG de ratón (anti-ratón IgG-HRP de cabra, Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grove, PA, USA) en una dilución 1:5000. Finalmente, las membranas fueron reveladas mediante quimioluminiscencia utilizando un kit comercial (ECL, Amersham Life Science). La presencia de las bandas se detectó mediante autoradiografía utilizando placas radiográficas de uso médico (Agfa X-ray film, Buenos Aires, Argentina).

Las autoradiografías fueron luego digitalizadas por medio de un scanner y el análisis densitométrico de las bandas se realizó mediante el uso del software Scion Image for Windows (Scion Corporation Frederick, MD, US). Los valores densitométricos de NgRs se normalizaron con respecto a los del anticuerpo anti-alfa-tubulina y dichos valores fueron utilizados para el posterior análisis estadístico.

3.7. Producción de vectores lentivirales e infección de las células MN1.

Con el fin de identificar los receptores NgRs en la línea celular MN1, se procedió a silenciar individualmente la expresión de los receptores mediante el uso de partículas lentivirales que portan secuencias shRNA (siglas en inglés de short hairpin RNA) específicos para el receptor NgR1 y NgR2. Las secuencias de shRNA para silenciar a NgR1 y NgR2 fueron obtenidas de Sigma-Aldrich (Mission shRNA). Dichas secuencias fueron ligadas al vector de lentivirus pLKO.3G que expresa la proteína verde fluorescente (eGFP) (Addgene, Cambridge, MA, US) vía los sitios EcoRI y PacI. Como control se usaron secuencias de shRNA “scrambled” diseñadas utilizando el programa siRNA Wizard (InvivoGen, San Diego, CA, US). Las secuencias de oligonucleótidos shRNA fueron las siguientes: NgR1: 5'-AATTCTCTACCTACAAGACAACAAT-3', NgR2: 5'-AATTGGTCAGCCTACAGTACCTCTA-3', scrambled: 5'-CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCG-3'.

Para la producción de los vectores lentivirales, 7×10^5 células de riñón embrionario humano, HEK293T, fueron cultivadas en 5ml de medio en una placa de cultivo de 6 cm en DMEM conteniendo 10% SFB. Al momento de la transfección, las células presentaban entre un 50 y 80% de confluencia en un medio sin antibióticos. Las células fueron co-transfectadas con el vector pLKO.3G portando las secuencias transgénicas, un plásmido que porta proteínas de empaquetamiento (psPax2, Addgene, Cambridge, MA, US) y otro con las proteínas de envoltura (pMD2.G, Addgene, Cambridge, MA, US).

Por un lado, en tubos de microcentrífuga de polipropileno, se preparó la siguiente mezcla de transfección: 1 μ g pLKO.3G portando las secuencias shRNA, 750 ng psPAX2, 250 ng pMD2.G en 20 μ l de Opti-MEM. Por otro lado, se incubó la

Lipofectamina 2000 con Opti-MEM durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, ambas mezclas se juntaron y se las incubó durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla final se agregó a las células gota a gota. Las mismas fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂ durante 12-15 horas.

Al día siguiente, se reemplazó el medio de transfección por 5 ml DMEM fresco con 10% de SFB y penicilina-estreptomicina. Luego, se colectó el medio de cultivo que contiene las partículas lentivirales a las 24 y 48 horas y se lo almacenó a 4°C. Luego, las partículas lentivirales se concentraron por ultracentrifugación y se determinó el título viral mediante la infección de células HEK293T.

A continuación, las células MN1 diferenciadas fueron infectadas por adición de las partículas lentivirales que portan las secuencias para los receptores NgR1 y NgR2 (en el orden de 1×10^4 pfu/ μ l) durante 4 días. Las neuronas que fueron exitosamente infectadas con el virus fueron identificadas por la expresión de la eGFP. Los niveles de expresión de los receptores fueron monitoreados por ensayos de western blot con anticuerpos específicos para cada receptor, como se describió previamente.

3.8. Expresión de plásmidos y transfecciones.

Los plásmidos p75^{NTR} Wt y las formas mutantes K350A/N353A (abreviaturas 350/353) fueron expresados a partir de una cadena principal del vector pcDNA3 (Invitrogen) y fueron generosamente proporcionados por el Dr. Carlos F. Ibáñez (Karolinska Institute, Suecia). Se realizaron transfecciones en las células MN1 crecidas en placas de cultivo de 96 pocillos. Las células fueron transfectadas con 1,2 μ g/ μ l de plásmido usando Lipofectamina 2000 (0,4 μ l/well) en Opti-MEM. La mezcla fue adicionada a las células 72 horas posteriores al sembrado de las MN1. Los cultivos fueron fijados 18 horas luego de la transfección con una solución de 4% de paraformaldeído en 0,12M de sacarosa contenidos en PBS.

3.9. Transferencia de energía de resonancia fluorescente, FRET.

La actividad de RhoA fue medida por transferencia de energía por resonancia (FRET); para ello, se utilizó el biosensor de RhoA (Wt) que fue adquirido de Addgene (Número de catálogo: 12150). Éste es considerado un “biosensor unimolecular”, ya que en la misma cadena proteica se encuentra el donador y el aceptor, y la transferencia de energía mediante FRET del donador hacia el aceptor es intramolecular. En el estado inactivo, la estructura tridimensional del biosensor mantiene una orientación y/o distancia entre el donador y el aceptor de manera que la eficiencia de FRET es baja; al activarse, se produce un cambio estructural que acerca el donador al aceptor y/o cambia su orientación relativa de manera que la eficiencia de FRET aumenta (Figura 14).

La GTPasa RhoA y el dominio de unión a Rho (RBD, “Rho Binding Domain”) al cual RhoA se une tras su activación, se encuentran en los extremos del sensor (Figura 15). Este diseño permite que el extremo C terminal de RhoA quede libre de ser geranilado por la enzima geranil transferasa intracelular y que, por lo tanto, pueda interactuar normalmente con las proteínas reguladoras GDIs (Pertz y col., 2006).

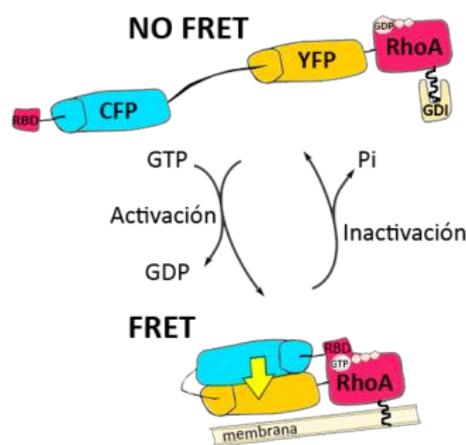


Figura 15: Dibujo esquemático del biosensor del biosensor de RhoA. Modificado de Pertz y col., 2006.

La transfección de las células MN1 se realizó por la incubación de las mismas con una solución que contiene 1,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del ADN plasmídico del biosensor de RhoA y 2 μl de Lipofectamina 2000 en un volumen final de 500 μl de Opti-MEM y se mantuvieron en el incubador durante 1:30 horas (Pertz y col., 2006). La transfección en cultivo primario de MNs fue realizada en MNs de 3 días de división, y se adicionó la

mezcla de 0,8 µg/µl del biosensor de RhoA y 1,25 µl/vidrio (12mm) de Lipofectamina 2000 en Neurobasal durante 1 hora. Una vez cumplido el tiempo indicado se retiró el medio Opti-MEM-Neurobasal/ADN/Lipofectamina de las MNs, se restituyó el medio condicionado inicial y se volvieron a colocar en el incubador a 37°C y en una atmósfera a 5% de CO₂ durante 18 horas. Los cultivos fueron fijados con 4% paraformaldehído en 0,12 M de sacarosa.

3.9.1. Análisis Radiométrico de FRET.

La adquisición de las imágenes fue realizada en un microscopio confocal de disco giratorio (DSU) con láser multilínea de Argon de 40 mw Modelo 35-IMA 040-220 de CVI MellesGriot, usando un objetivo de inmersión 60x con 1,42 de apertura numérica. En primer lugar, se adquirió un par de imágenes de manera simultánea del canal del donador (excitación del donador y adquisición en el canal del donador: 480-495 nm) y otra del canal de FRET (excitación del donador y adquisición en el canal del aceptor: 535-565 nm) excitando solo el donador con un láser de 458 nm.

El procesamiento de las imágenes y el cálculo del mapa de FRET fueron realizados usando el programa Fiji. El cálculo del mapa de FRET se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Mapa de FRET} = \frac{\text{Canal de FRET}}{\text{Canal del donador}}$$

En primer lugar, se aplicó a todas las imágenes un filtro de mediana de 1,2 píxeles de radio, se sustrajo la señal de fondo y se precedió a corregir la iluminación desigual en las imágenes mediante la aplicación de la función “Background Substraction” del programa Fiji. Seguido de esto, se corrigió cualquier posible desalineamiento entre las imágenes del canal donador y el canal de FRET mediante la función “Stakreg”. Con la imagen del canal de FRET, se generó una máscara binaria para eliminar del análisis cualquier región de la imagen que no fuera la célula de interés.

Las cuantificaciones de la actividad de RhoA se realizaron seleccionando áreas de interés (axones y soma celular) sobre imágenes en las que los píxeles fuera de las células no eran considerados cuantificables por el programa (función NaN). Estas imágenes se generaron dividiendo los mapas de FRET por las máscaras binarias. Dado que en las máscaras binarias, las regiones fuera de las células valen 0, la división fuera de las células genera píxeles que no son considerados números.

3.10. Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos utilizados fueron realizados mediante el software InfoStat (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Los test estadísticos realizados se describen conjuntamente con los resultados. En todos los casos se utilizaron análisis de la varianza (ANOVA) y el número de vías de estos dependió del número de factores y del diseño de cada experimento. El test *a posteriori* de Tukey fue utilizado como prueba *post hoc*. Valores $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Todos los resultados se expresaron como la media de las mediciones \pm error estándar de la media (SEM).

Resultados

4.1. CARACTERIZACIÓN DEL NÚMERO DE MOTONEURONAS DE LA MÉDULA ESPINAL DEL RATÓN *Mag*-null.

4.1.1. Los ratones *Mag*-null exhiben un número reducido de motoneuronas en la médula espinal lumbar.

Se realizó un estudio en función del tiempo del número de motoneuronas (MNs) de la región lumbar de la médula espinal de ratones *Mag*-null y Wt, de entre 0 y 31 días postnatales. La cuantificación de las MNs se efectuó utilizando la técnica histoquímica de violeta de cresilo, la cual tiñe selectivamente neuronas, en secciones de médula espinal de acuerdo a lo descrito en M&M. El análisis del número de MNs se realizó mediante un ANOVA de dos vías (genotipo y edad) utilizando 3 ratones *Mag*-null y 3 Wt para cada una de las edades analizadas. Este ANOVA reveló un efecto principal del genotipo ($F(1,20)=24,12$ $p<0,001$), de la edad ($F(4,20)=103,56$, $p<0,001$) y de la interacción entre ambos factores ($F(4,20)=2,92$ $p<0,04$). El uso del test *a posteriori* de Tukey indicó que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de MNs de ratones *Mag*-null y Wt a los 0 días postnatales (Figura 16a). Sin embargo, este test demostró una disminución estadísticamente significativa en el número de MNs de los ratones *Mag*-null a los 7 días postnatales respecto a los animales Wt (~43%) ($p<0,001$). Además, se observó un menor número de MNs en los ratones *Mag*-null a los 14, 21 y 31 días postnatales, respecto a los animales Wt de la misma edad ($p<0,001$) (Figura 16a).

Con el fin de dilucidar la identidad de las MNs presentes en la región ventral de la médula espinal lumbar, se evaluó el tamaño del soma celular de las mismas en las diferentes edades analizadas en los ratones *Mag*-null y Wt. Para esto, se procedió a cuantificar el diámetro del soma de las MNs en μm^2 , ordenados en los siguientes

rangos: 100-150 μm^2 , 150-200 μm^2 , 200-300 μm^2 , 300-400 μm^2 y 400-700 μm^2 (Figura 16b). Las diferencias entre el tamaño del soma de las MNs se determinaron mediante un ANOVA de una vía entre ambos genotipos.

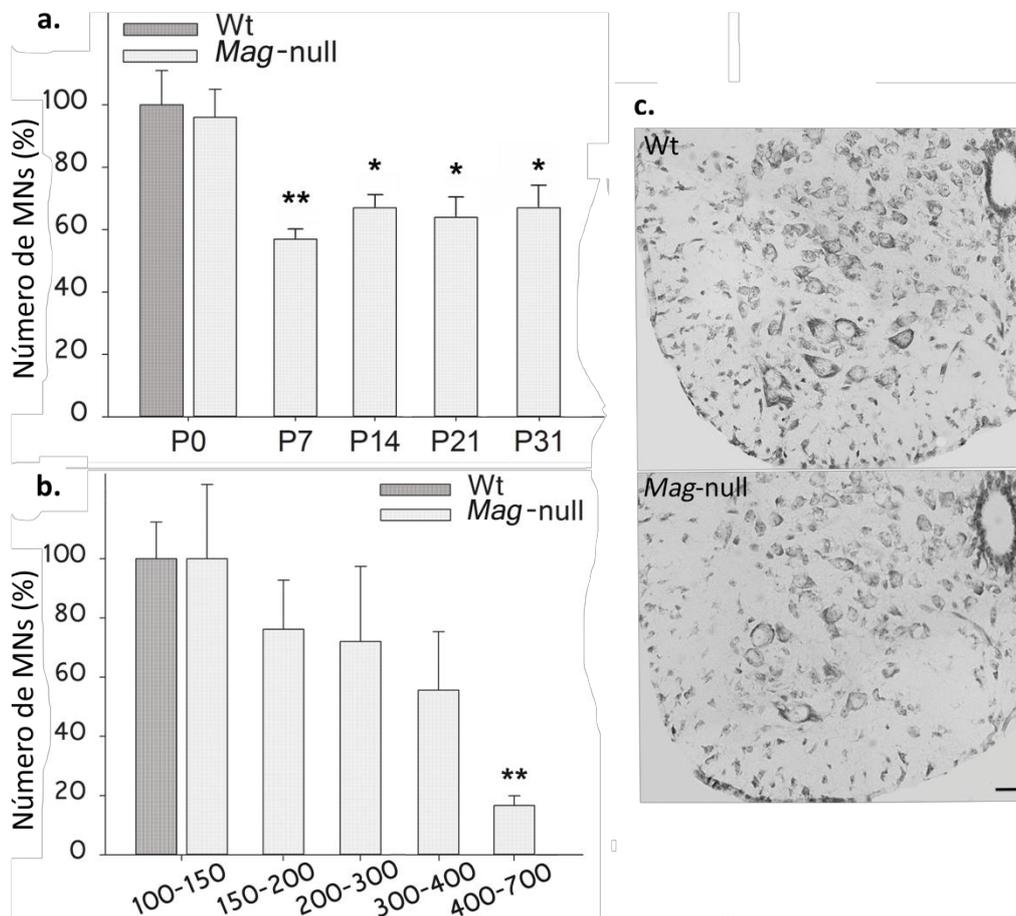


Figura 16: Los ratones *Mag*-null presentan un número reducido de MNs de la médula espinal lumbar.

a. Cuantificación del número de MNs de la médula espinal lumbar de ratones *Mag*-null a los 0, 7, 14, 21 y 31 días postnatales. Las barras representan el porcentaje de MNs presentes en la región ventral de la médula espinal lumbar en los ratones *Mag*-null respecto a los Wt para cada edad. Las MNs con un área $\geq 100 \mu\text{m}^2$ fueron cuantificadas usando el programa Fiji. Un ANOVA de dos vías genotipo: (F(1,20)=24,12 $p < 0,001$); edad (F(4,20)=103,56, $p < 0,001$); interacción (F(4,20)=2,92 $p < 0,04$), seguido por el test *a posteriori* de Tukey indicó diferencias significativas entre ratones *Mag*-null y Wt a los 7 días postnatales ($p < 0,001$), 14, 21 y 31 días postnatales ($p < 0,05$). **b.** Cuantificación del número de MNs en ratones *Mag*-null y Wt a los 31 días postnatales categorizadas por tamaño del soma celular. Cada barra representa el porcentaje del número de MNs en un rango de tamaño de los ratones *Mag*-null respecto a los Wt. El análisis estadístico indica diferencias significativas a partir del tamaño de soma mayor a $400 \mu\text{m}^2$ en los ratones *Mag*-null respecto a los Wt (ANOVA de una vía en este rango de calibre, $F > 25$, $p < 0,007$). $n = 3$ para cada grupo. Las barras de error representan el error estándar de la media * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. **c.**

Fotomicrografías representativas de secciones de médula espinal lumbar ventral de ratones Wt y *Mag*-null a los 7 días postnatales teñidas con violeta de cresilo. Barra de escala: 25 μm .

La comparación entre la distribución del tamaño del soma de las MNs entre los ratones *Mag*-null y Wt a los 0 días postnatales no arrojó diferencias significativas. Sin embargo, se observó una reducción del 80% de las MNs de gran calibre con un soma celular $\geq 400 \mu\text{m}^2$, indicativo de la pérdida de MNs alfa en los ratones *Mag*-null con respecto a los animales Wt a los 31 días postnatales ($p < 0,007$) (Figura 16b). Resultados similares fueron encontrados al analizar el tamaño del soma celular en ratones *Mag*-null a los 7, 14 y 21 días postnatales comparado a los animales Wt de la misma edad.

4.1.2. Los ratones *Mag*-null presentan mayor número de motoneuronas apoptóticas en la primera semana de vida.

Con el fin de corroborar la reducción en el número de MNs con la muerte de las mismas, se utilizó la tinción de Fluoro Jade C (FJC), un marcador de degeneración neuronal en secciones transversales de médula espinal lumbar de ratones *Mag*-null y Wt a los 7 días postnatales. Se observó un incremento de neuronas marcadas con FJC en el ratón *Mag*-null respecto a la cepa Wt, las cuales colocalizan con un marcador selectivo de MNs de gran calibre (alfa MNs) denominado SMI-32 (anticuerpo contra neurofilamentos no fosforilados). En conjunto, estos resultados demuestran un mayor número de MNs en degeneración en la médula espinal de ratones *Mag*-null al día 7 postnatal, las cuales corresponden al fenotipo de α MNs de acuerdo a su análisis morfológico (Figura 17).

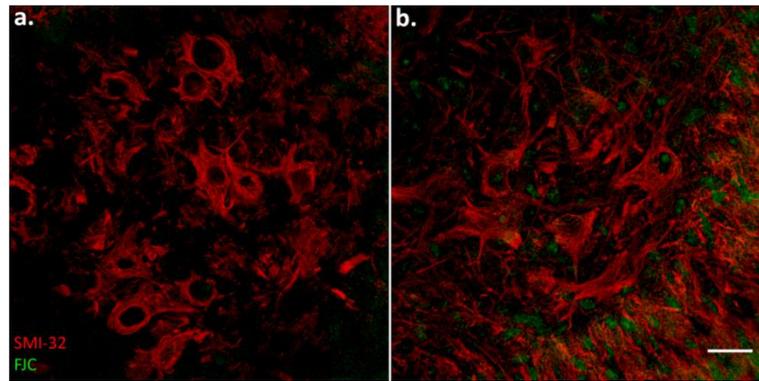


Figura 17: Presencia de activa degeneración de MNs de la médula espinal de ratones *Mag*-null. Fotomicrografías representativas de secciones de médula espinal lumbar de ratones *Mag*-null y Wt a los 7 días postnatales, mostrando una tinción con un marcador de degeneración neuronal, Fluoro Jade C (FJC) (verde) y un anticuerpo contra neurofilamentos no fosforilados, SMI-32 (rojo). **a.** Ratón Wt. **b.** Ratón *Mag*-null. Se observa un mayor número de MNs marcadas con FJC en los ratones *Mag*-null. Barra de escala, 50 μ m.

A continuación se utilizó la técnica de Tunel para analizar la presencia de apoptosis *in situ* de MNs. La activación de endonucleasas durante la apoptosis genera fragmentos de ADN con terminaciones 3'-OH. Este método emplea a la enzima TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) para adosar deoxinucleótidos tri-fosfatos (dUTP, por sus siglas en inglés) unidos a digoxigenina a los fragmentos de ADN con terminales 3'-OH. Se realizaron preparaciones inmunohistoquímicas de cortes transversales de médula espinal lumbar de ratones *Mag*-null a los 3-4 días postnatales, con Tunel fluorescente y una tinción para el marcador selectivo de alfa MNs, observándose una correlación en la reducción de MNs de los ratones *Mag*-null con un incremento de la apoptosis en dicha población neuronal (Figura 18).

Estos datos demuestran que durante la primera semana postnatal, los ratones *Mag*-null presentan un incremento significativo en la apoptosis de MNs de gran calibre presentes en la médula espinal lumbar con respecto a los ratones Wt.

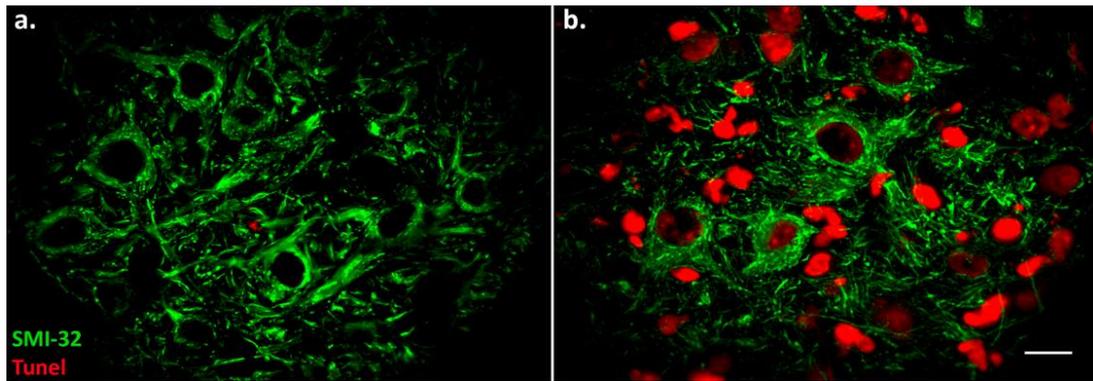


Figura 18: Presencia de MNs apoptóticas en ratones *Mag*-null. Fotomicrografías representativas de secciones de médula espinal lumbar ventral de ratones *Mag*-null y *Wt* a los 3-4 días postnatales, mostrando la tinción con TUNEL (rojo) y un anticuerpo contra neurofilamentos no fosforilados, SMI-32 (verde). **a.** Ratón *Wt*. **b.** Ratón *Mag*-null. Se observa un mayor número de MNs marcadas con TUNEL en los ratones *Mag*-null. Barra de escala, 10 μ m.

4.2. ROL ESTABILIZADOR DE MAG EN UN MODELO *IN VIVO* DE CONTUSIÓN DE NERVIIO CIÁTICO.

Durante el período postnatal temprano (primera semana postnatal), la lesión por contusión del nervio ciático induce un dramático incremento en la expresión del receptor de baja afinidad para neurotrofinas p75^{NTR} en los cuerpos celulares y axones de las MNs como así también en células de Schwann sometidas a degeneración Walleriana en el segmento distal del nervio lesionado (Ferri y col., 1998; Koliatsos y col., 1991; Saika y col., 1991).

De manera interesante, una lesión en el nervio ciático en ratones luego del día 10 postnatal induce la regeneración del nervio; mientras que una lesión similar durante la primera semana postnatal resulta en la apoptosis de MNs dependiente del receptor p75^{NTR} (Li y col., 1994c). Es por ello que decidimos utilizar esta ventana temporal para analizar el rol de MAG en el modelo *in vivo* de apoptosis de MNs, a través del estudio de la actividad de factores que modulan la muerte dependiente del receptor p75^{NTR}.

4.2.1. Los ratones *Mag*-null presentan una susceptibilidad incrementada a la apoptosis de MNs dependiente del receptor p75^{NTR} en un modelo *in vivo*.

En primer lugar, decidimos evaluar *in vivo* la susceptibilidad de las MNs en ratones *Mag*-null y Wt de la médula espinal a la apoptosis. Para ello, los ratones de ambos genotipos (5 en cada grupo) recibieron una lesión de contusión del nervio ciático al día 5 postnatal. Luego las MNs fueron cuantificadas en secciones de médula espinal lumbar de 10 μ m de grosor teñidas con violeta de cresilo al día 10 postnatal. La región contralateral (no lesionada) de la médula espinal fue utilizada como control.

El análisis del número de MNs luego de la contusión del nervio ciático en los ratones *Mag*-null y Wt se realizó mediante un ANOVA de dos vías (genotipo y lado). Este ANOVA reveló un efecto principal del genotipo ($F(1,12)=388,15$ ($p<0,001$), del lado ($F(1,12)=666,46$ ($p<0,001$) y de la interacción de ambos factores ($F(1,12)=7,38$ ($p<0,01$). El uso del test *a posteriori* de Tukey indicó una reducción significativa en el número de MNs de la región contralateral respecto a la ipsilateral (lesionada) tanto en los ratones *Mag*-null como Wt, mostrando el efecto de la lesión. Además, este test permitió demostrar una disminución significativa en el número de MNs en los ratones *Mag*-null respecto a los Wt, cuando se comparó la región contralateral de la médula espinal lumbar ($p<0,001$), como se había demostrado previamente en la sección anterior. Asimismo, el análisis estadístico de los resultados permitió demostrar una disminución significativa del número de MNs en la región ipsilateral de la médula espinal en los ratones *Mag*-null respecto a los Wt ($p<0,001$) (Figura 19a). Estos resultados demuestran que los ratones *Mag*-null presentan una mayor susceptibilidad a la apoptosis de MNs dependiente del receptor p75^{NTR} luego de la lesión de contusión en el nervio ciático con respecto a los animales Wt.

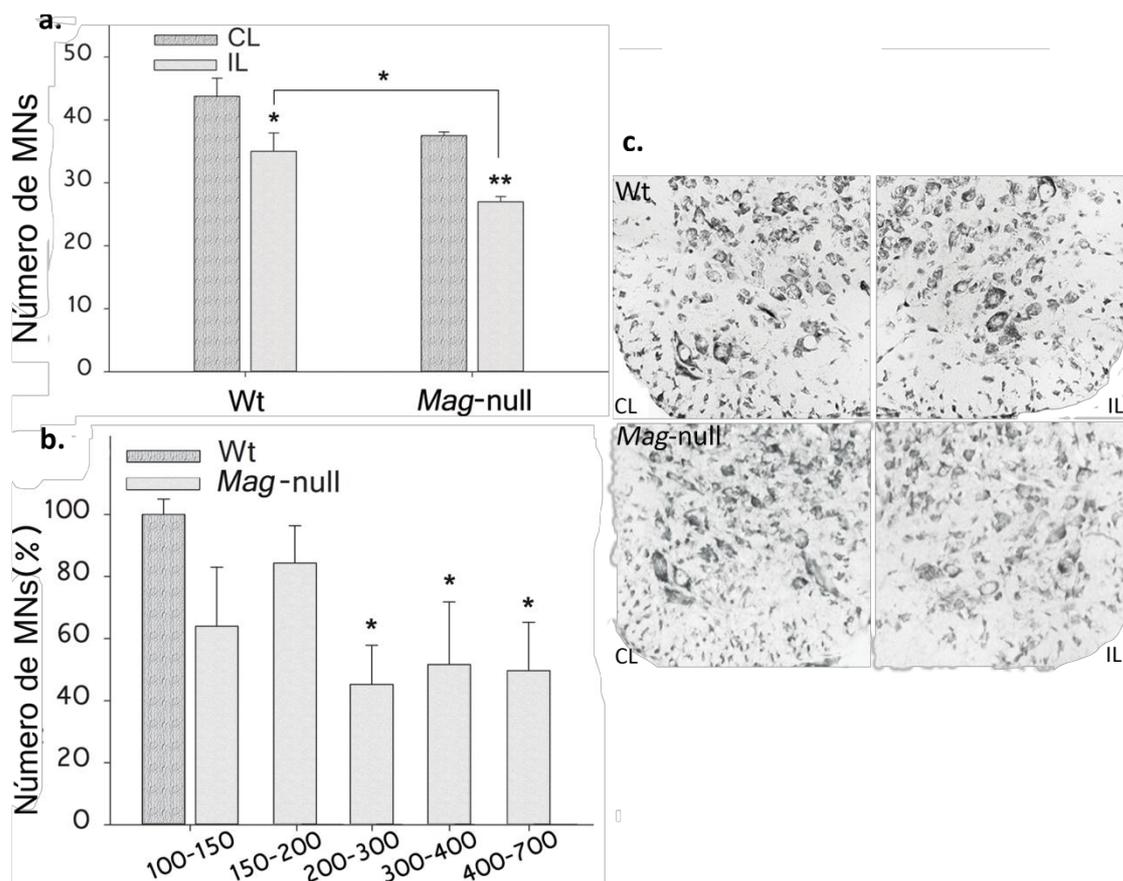


Figura 19: Los ratones *Mag-null* presentan una mayor susceptibilidad a la apoptosis de MNs dependiente del receptor p75^{NTR} inducida por una lesión de contusión de nervio ciático. Los ratones *Mag-null* y Wt recibieron una lesión de contusión a nivel medio del muslo en el nervio ciático izquierdo al día 5 postnatal, los mismos fueron fijados al día 10 postnatal. **a.** Cuantificación del número de MNs de la médula espinal lumbar de ratones *Mag-null* y Wt. Las barras representan el número de MNs presentes en la región ipsilateral (lesionada) respecto la región contralateral (control) de la médula espinal ventral de ratones Wt y *Mag-null*. Las MNs con un área de soma celular $\geq 100 \mu\text{m}^2$ fueron cuantificadas usando el programa Fiji. Un ANOVA de dos vías genotipo: ($F(1,12)=388,15$ $p<0,001$); lado ($F(1,12)=666,46$, $p<0,001$); interacción ($F(1,12)=7,38$ $p<0,01$), seguido por el test *a posteriori* de Tukey indicaron diferencias significativas entre ratones *Mag-null* y Wt ($p<0,0001$) y entre los lados (Contralateral -CL-, Ipsilateral -IL-) ($p<0,0001$). **b.** Cuantificación del número de MNs en ratones *Mag-null* y Wt categorizadas por área del soma celular. Cada barra representa la distribución (en porcentaje) del número de MNs de un rango de tamaño de soma en los ratones *Mag-null* respecto a los Wt. El análisis estadístico indica diferencias significativas en los tamaños de soma $200-300 \mu\text{m}^2$, $300-400 \mu\text{m}^2$ y $400-700 \mu\text{m}^2$ en los ratones *Mag-null* respecto a los Wt (ANOVAS de una vía individuales en cada rango de calibre, todos los $F>7,64$ y todos los $p<0,01$), Wt: $n=4$, *Mag-null* $n=4$, para cada edad. Las barras de error representan el error estándar de la media; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. **c.** Fotomicrografías representativas de secciones de médula espinal lumbar de ratones *Mag-null* y Wt con una tinción para violeta de cresilo. Barra de escala, $50 \mu\text{m}$.

Por otro lado, se realizó un análisis adicional que incluyó la distribución por tamaño del soma celular de las MNs presentes en la médula espinal lumbar que resistieron a la lesión de contusión. Las diferencias entre el tamaño del soma de las MNs se determinaron mediante un ANOVA de una vía entre ambos genotipos. En los ratones *Mag*-null, se observó que la lesión de contusión induce una reducción significativa en el número de MNs de gran calibre, respecto a los ratones Wt (desde el rango de área del soma celular $\geq 200\text{-}300\ \mu\text{m}^2$) (Figura 19b).

4.2.2. El tratamiento con MAG-Fc rescata MNs en un modelo *in vivo* de apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR}.

En segundo lugar, decidimos confirmar el efecto de MAG sobre la apoptosis de MNs dependiente de la activación del receptor p75^{NTR}, inducida por la lesión de contusión del nervio ciático. Para esto, se evaluó la capacidad de rescate de la forma quimérica soluble de MAG que contiene el dominio extracelular de MAG fusionado a un dominio Fc (MAG-Fc), sobre el número de MNs de la médula espinal lumbar luego de la lesión en ratones *Mag*-null y Wt. Para ello, los ratones de ambos genotipos (n=10 en cada grupo) fueron administrados al día 3 postnatal con una dosis intraperitoneal (i.p.) de 50 μg de MAG-Fc o IgG humana (IVIg^{NTR}) como control, al día 3 postnatal.

En primer lugar, se realizó un ANOVA de tres vías (genotipo, tratamiento y lado). Éste confirmó los efectos del genotipo ($F(1,24)=92,65\ p<0,0001$), del tratamiento ($F(1,24)=18,56\ p<0,0002$) y del lado ($F(1,24)=63,61\ p<0,0001$), además de la interacción entre los tres factores ($F(1,24)=5,25\ p<0,0310$). En primer lugar, al comparar la sobrevivencia de MNs en los ratones *Mag*-null y Wt que recibieron el tratamiento con MAG-Fc, no se observaron diferencias en la sobrevivencia de las MNs luego de la lesión de contusión del nervio ciático.

Por otro lado, tanto en los animales *Mag*-null como Wt, la administración i.p. de MAG-Fc produjo un aumento estadísticamente significativo del número de MNs en la región lesionada de la médula espinal, con respecto a los que recibieron el tratamiento con IgG control.

En la figura 20a y como se desprende del análisis *a posteriori* de Tukey, se observa que en los ratones *Mag*-null el tratamiento con MAG-Fc produce un aumento

significativo de la sobrevida de MNs en la región ipsilateral respecto a la contralateral ($p < 0,0001$), mientras que el tratamiento con IgG control no posee efecto en la sobrevida de MNs luego de la lesión del nervio ciático ($p < 0,0001$).

Por otra parte, en relación al efecto de la inyección i.p. de MAG-Fc sobre los ratones Wt en comparación a los tratados con IgG, el análisis *a posteriori* señaló diferencias estadísticamente significativas entre las regiones ipsilateral y contralateral luego de la lesión ($p < 0,0001$).

A continuación, se realizaron estudios de doble inmunofluorescencia en secciones de nervio ciático de animales tratados con MAG-Fc e IgG control para identificar un posible blanco de acción de MAG-Fc en el efecto de sobrevida de MNs. Los nervios tratados con MAG-Fc e IgG control que recibieron la lesión de contusión fueron marcados con un anticuerpo específico contra la cadena y humana Fc contenida en la quimera MAG-Fc y un anticuerpo específico contra neurofilamentos (clon 2H3).

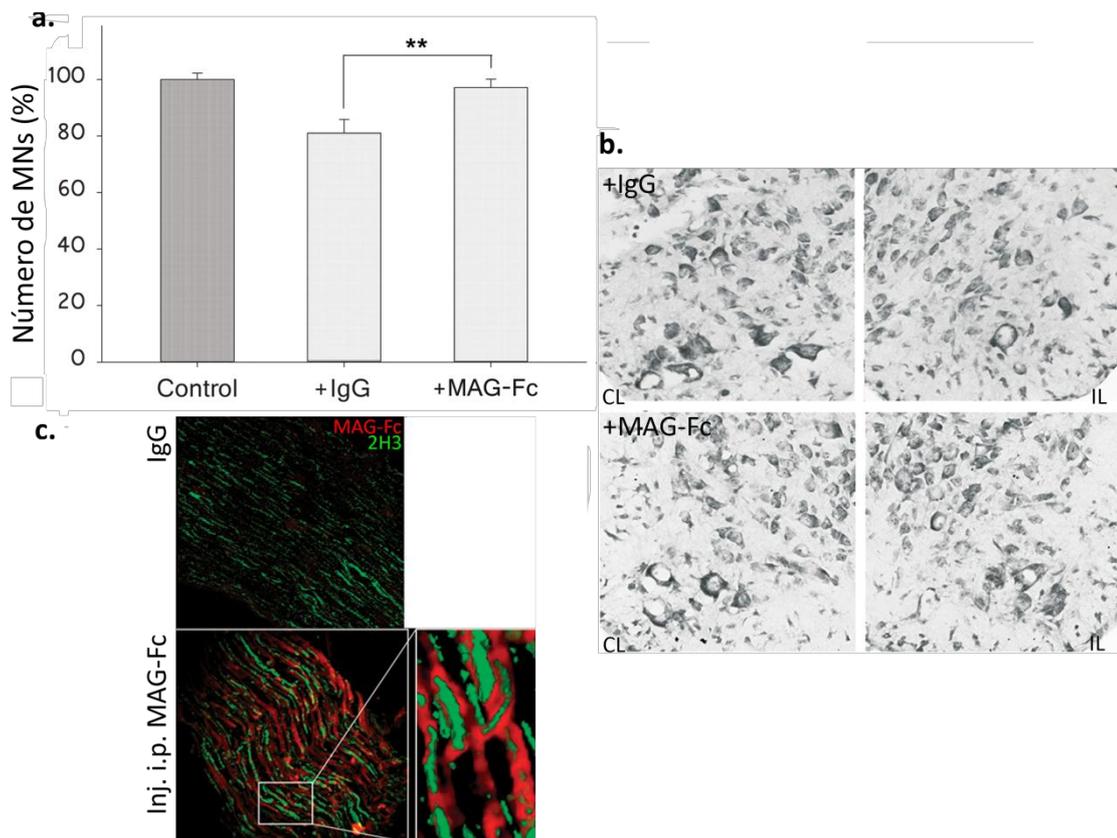


Figura 20: El tratamiento con MAG-Fc rescata MNs de la apoptosis dependiente del receptor $p75^{NTR}$ inducido por una lesión de contusión del nervio ciático en ratones Wt. Los ratones Wt fueron administrados con una inyección i.p. de MAG-Fc o IgG control al día 3 postnatal. Seguido de esto, al día 5 postnatal recibieron una lesión de contusión a nivel medio del muslo en el nervio ciático izquierdo.

Luego, las MNs fueron cuantificadas en la región ventral de la médula espinal lumbar al día 10 postnatal.

a. Cuantificación del número de MNs de la médula espinal lumbar de ratones Wt. Las barras representan el porcentaje de MNs presentes en la región contralateral respecto a la región ipsilateral de la médula espinal lumbar del ratón Wt. Las MNs con un área $\geq 100 \mu\text{m}^2$ fueron cuantificadas usando el programa Fiji. Se realizó un ANOVA de dos vías: tratamiento ($F(1,24)=18,56$ $p<0,0002$) y lado ($F(1,24)=63,61$ $p<0,0001$). Las barras de error representan el error estándar de la media $**p<0,01$, $n=3$ ratones por grupo.

b. Fotomicrografías representativas de secciones de médula espinal lumbar de ratones Wt tratados con la inyección i.p. de MAG-Fc o IgG con una tinción para violeta de cresilo. Barra de escala, $50 \mu\text{m}$.

c. Fotomicrografías representativas de secciones de nervio ciático de $10 \mu\text{m}$ tratados con la inyección i.p. de MAG-Fc e IgG control, luego de la contusión del nervio. La imagen es una reconstrucción en el eje Z que muestra una doble tinción con un anticuerpo específico contra la cadena γ humana Fc contenida en la quimera MAG-Fc (rojo) y un anticuerpo específico contra neurofilamentos (clon 2H3) (verde). Barra de escala: $60 \mu\text{m}$.

La figura 20c muestra la presencia de colocalización en la inmunomarcación de nervios de animales tratados con MAG-Fc, mientras que no fue detectada la señal de Fc humana en nervios de animales tratados con IgG control. En conjunto, estos datos demuestran que el tratamiento in vivo con MAG-Fc puede rescatar MNs de la apoptosis dependiente de la activación del receptor $p75^{\text{NTR}}$, posiblemente a través de la unión de MAG a los receptores axonales de las MNs en el sitio de lesión.

4.3. MAG-Fc PROTEGE MNs EN MODELOS *IN VITRO* DE APOPTOSIS DEPENDIENTE DEL RECEPTOR $p75^{\text{NTR}}$.

4.3.1. Cultivo organotípico de médula espinal lumbar.

Cultivos primarios de MNs expresan el receptor de baja afinidad para neurotrofinas $p75^{\text{NTR}}$ y experimentan el proceso de apoptosis cuando son co-cultivadas con astrocitos reactivos que secretan el factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés), o cuando son estimuladas con NGF recombinante en presencia de bajas concentraciones de óxido nítrico. La actividad apoptótica depende estrictamente del receptor $p75^{\text{NTR}}$, ya que los cultivos de MNs de ratones transgénicos carentes de este receptor no responden a NGF (Dupuis y col., 2008).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, decidimos analizar el posible rol protector de MAG sobre MNs en un modelo *in vitro* de apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR}. Para ello, se realizaron cultivos organotípicos de médula espinal lumbar de ratones *Mag*-null y *Wt*, al día 5 postnatal. Esta técnica es muy valiosa como herramienta para el estudio de las propiedades farmacológicas y/o fisiológicas de los circuitos neuronales, ya que mantiene la citoarquitectura del tejido de origen (Gähwiler y col., 1997). En este modelo, la muerte de MNs es inducida por la activación de la vía extrínseca e intrínseca pro-apoptótica, desencadenadas por el tratamiento de los cultivos con bajas concentraciones de NGF y un generador de óxido nítrico (NOC-18), respectivamente. Los cultivos fueron tratados con 100 nM de NGF y 50 nM de NOC-18 durante 24 hrs. En algunos casos, el tratamiento de los cultivos con MAG-Fc (20 µg/ml) o la combinación con NGF/NOC-18 fueron llevados a cabo con el objetivo de testear la eficacia de MAG contra la apoptosis.

Tanto en los cultivos organotípicos de animales *Mag*-null como *Wt*, la administración conjunta de NGF y NOC-18 produjo una disminución significativa del número de MNs; sumado a esto, el pre-tratamiento con MAG-Fc previno completamente la apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR} ($F(1,40)=20,42$ $p<0,0001$) (Figura 21a). Por otro lado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de MNs de cultivos tratados solo con MAG-Fc respecto a los cultivos controles (Figura 21a).

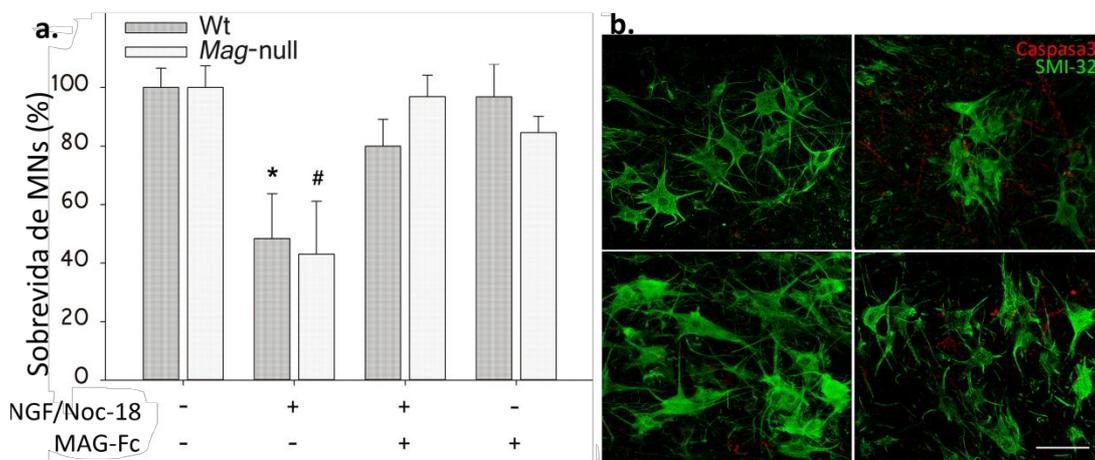


Figura 21: MAG-Fc protege MNs de la apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR} en un modelo *in vitro* de cultivo organotípico de médula espinal. Se realizaron cultivos organotípicos de médula espinal

lumbar de ratones *Mag*-null y *Wt* al día 5 postnatal. Las rebanadas de médula fueron cultivadas durante 7 días; posteriormente, se indujo apoptosis por el tratamiento de los tejidos con 100 nM de NGF y 50 nM de NOC-18 durante 24 hrs. Algunos cultivos fueron pre-tratados con 20 µg/ml de MAG-Fc antes de la inducción de apoptosis. **a.** Cuantificación del número de MNs de cultivos organotípicos de la médula espinal lumbar de ratones *Mag*-null y *Wt*. Las barras representan el porcentaje de MNs ± error estándar de la media de 5 experimentos independientes. * Indica comparaciones entre los ratones *Wt* tratados con NGF/NOC-18 respecto a los tratados con MAG-Fc. # Indica diferencias entre los ratones *Mag*-null entre los tratamientos con NGF/NOC-18 y su combinación con MAG-Fc. * # $p < 0,01$. **b.** Fotomicrografías confocales representativas de la sobrevivencia de MNs de cultivos organotípicos de médula espinal lumbar de ratones *Mag*-null y *Wt*; las MNs fueron visualizadas con el anticuerpo SMI-32 (verde) y las células apoptóticas fueron identificadas con un anticuerpo contra Caspasa-3 clivada (rojo). Barra de escala, 50 µm.

4.3.2. Cultivo primario de MNs embrionarias.

Con el objetivo de corroborar el rol modulador de MAG en la apoptosis de MNs y realizar luego un análisis más detallado de los receptores y vías de señalización involucradas, los estudios fueron extendidos a cultivos primarios de MNs, utilizando el modelo de apoptosis dependiente de la activación del receptor p75^{NTR}. La muerte de MNs fue inducida por el tratamiento de los cultivos con bajas concentraciones de NGF (100 nM) y NOC-18 (50 nM) durante 2 hrs para evaluar la actividad del anticuerpo caspasa 3 clivada, un marcador temprano de apoptosis; mientras que las MNs fueron visualizadas con el anticuerpo SMI-32 a través de microscopía de fluorescencia. En los experimentos de protección, las MNs fueron tratadas con 20 µg/ml de MAG-Fc 4 hrs previas a la inducción de apoptosis.

El tratamiento de los cultivos con NGF y NOC-18 produjo una disminución en el número de MNs (Figura 21a), lo cual se correlacionó con un incremento en la inmunoreactividad en MNs para el anticuerpo caspasa 3 clivada (Figura 21b).

A través de un ANOVA de una vía se detectó un efecto del tratamiento ($F(5,30)=17,03$, $p < 0,0001$) y como se desprende del análisis *a posteriori* de Tukey, se observa que la administración de MAG-Fc produce un aumento estadísticamente significativo en el número de MNs (y un menor número de MNs positivas para caspasa 3 clivada) en cultivos tratados con NGF y NOC-18; mientras que en los cultivos tratados

solo con MAG-Fc no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles (Figura 21a y b).

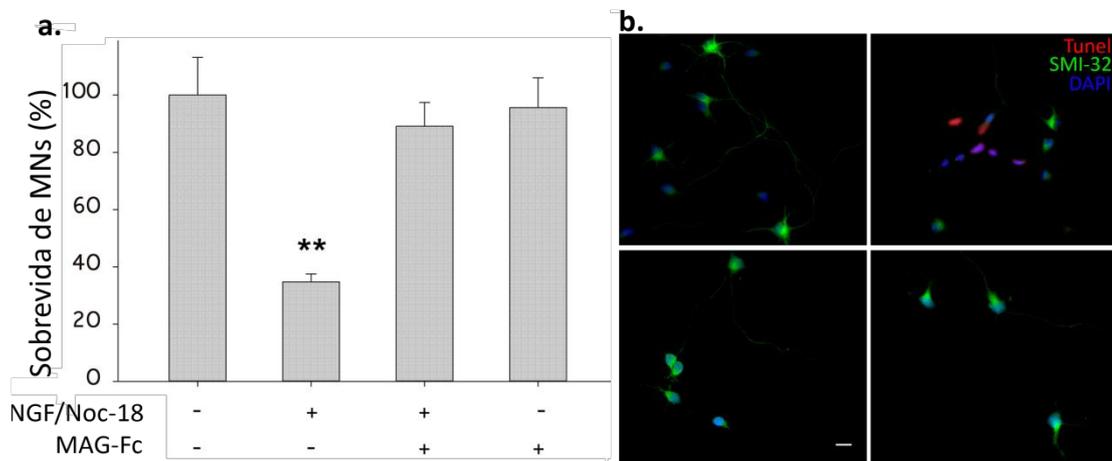


Figura 21: MAG-Fc protege MNs de la apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR} en un modelo *in vitro* de cultivo primario de MNs. Se realizaron cultivos primarios de MNs de embriones E15 que fueron crecidos durante 3 días. Posteriormente, se indujo apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR} por el tratamiento de las MNs con 100 nM de NGF y 50 nM de NOC-18 durante 2 hrs. En los experimentos de protección, algunas células fueron tratadas con MAG-Fc (20 μg/ml) 4 hrs antes de la inducción de apoptosis. **a.** Cuantificación del número de MNs de cultivos primarios. Las barras representan el porcentaje de MNs ± error estándar de la media de 3 experimentos independientes, **p<0,01. **b.** Fotomicrografías representativas de la supervivencia de MNs; las cuales fueron visualizadas con el anticuerpo SMI-32 (verde), Caspasa-3 clivada (rojo) y DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindole) (azul). Barra de escala, 25 μm.

4.3.3. Cultivo de línea celular derivada de MNs, MN1.

Los estudios del efecto de protector de MAG en la apoptosis de MNs dependiente del receptor p75^{NTR} fueron además extendidos a una línea celular híbrida (MN1) que deriva de MNs embrionarias de ratón, cuyo genotipo una vez diferenciadas posee un 99% de homología con MNs adultas de ratón (Salazar-Gruoso y col., 1991). Las células MN1 fueron diferenciadas por la reducción del SFB al 3% durante 4 días, y posteriormente la apoptosis fue inducida de la misma forma que se describió previamente para los cultivos organotípicos de médula espinal lumbar.

El análisis estadístico (ANOVA de una vía) señaló la presencia de un efecto del tratamiento (F(1,7)=50,93, p<0,001). Como se observa en la figura 22a, el tratamiento

con NGF y NOC-18 produjo una reducción del $49,4 \pm 6,9\%$ en la sobrevivida de MNs, la cual fue completamente prevenida por el tratamiento de las células MN1 con MAG-Fc (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 4 hrs antes de la inducción de apoptosis (Tukey, $p < 0,001$) (Figura 22a).

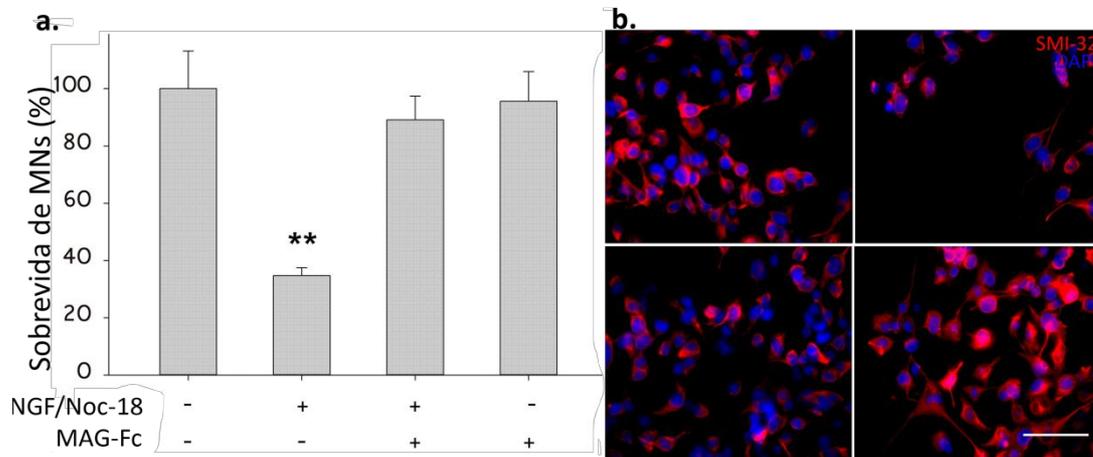


Figura 22: MAG-Fc protege células MN1 en un modelo *in vitro* de la apoptosis dependiente del receptor $p75^{\text{NTR}}$. La línea celular derivada de MNs embrionarias (MN1) fue cultivada durante 4 días en medio de diferenciación al 3% de SFB. Posteriormente, se indujo apoptosis dependiente del receptor $p75^{\text{NTR}}$ por el tratamiento de las células con 100 nM de NGF y 50 nM de NOC-18 durante 24 hrs. En los experimentos de protección, algunas células fueron tratadas con MAG-Fc (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 4 hrs antes de la inducción de apoptosis. **a.** Cuantificación del número de células MN1. Las barras representan el porcentaje de MNs \pm error estándar de la media de 3 experimentos independientes, ** $p < 0,01$. **b.** Fotomicrografías representativas de la sobrevivida de células MN1; las cuales fueron visualizadas con el anticuerpo SMI-32 (rojo) y DAPI (azul). Barra de escala, 20 μm .

4.4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y BIOQUÍMICA DE LOS RECEPTORES AXONALES DE MAG.

Teniendo en cuenta que en la literatura ha sido sugerido el rol de MAG en la función estabilizadora e inhibitoria sobre axones a través de la interacción con los receptores NgRs, decidimos iniciar los estudios de la contribución de los mismos en la señalización mediada por MAG, y analizar el posible rol de NgRs en el efecto protector de MAG contra la apoptosis de MNs. Para ello, decidimos estudiar el efecto del silenciamiento de la expresión de estos receptores mediante la infección de las células MN1 con partículas lentivirales que portan secuencias shRNA específicas para los

receptores NgR1 (shNgR1) y NgR2 (shNgR2) en el modelo *in vitro* de apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR}.

4.4.1. Modulación de la expresión de los receptores NgRs a través del uso de partículas lentivirales.

En primer lugar, se determinó la eficiencia del silenciamiento de los receptores NgRs mediante la infección de células MN1 con partículas lentivirales que portan secuencias shRNA para cada receptor (shNgR1, shNgR2). Para esto, se midieron los niveles de expresión de los receptores NgRs en la línea celular MN1 luego de la infección con las partículas lentivirales mediante el análisis por western blot utilizando anticuerpos específicos. Para llevar a cabo estos experimentos, las células MN1 fueron transfectadas con los plásmidos NgR1 y NgR2 durante 24 hrs. A continuación, las mismas fueron infectadas con las partículas lentivirales shNgR1, shNgR2 y la secuencia control (shScrambled) en un rango de 1×10^4 pfu/ μ l durante 4 días. Las células MN1 infectadas fueron identificadas por la expresión de la proteína verde fluorescente (eGFP) que porta el vector pLKO.3G. Los niveles de expresión de los receptores NgRs en las preparaciones provenientes de homogenatos de estas células, fueron monitoreados por western blot mediante el uso de anticuerpos anti-NgR1 y anti-NgR2 policlonales (Robak y col., 2009) (Figura 23a).

En las células MN1 que sobreexpresan el receptor NgR1, la infección con partículas lentivirales shNgR1 o shNgR1/2, resultó en una disminución estadísticamente significativa en la expresión del receptor NgR1 en comparación a las células infectadas con la secuencia shScram. La expresión del receptor NgR1 no mostró diferencias estadísticamente significativas en MNs infectadas con shNgR2 respecto a las células controles (Figura 23a).

Por otra parte, la expresión del receptor NgR2 fue también analizada en células que sobreexpresan este receptor. Cuando las células MN1 fueron infectadas con shNgR2 y shNgR1/2, se observó una disminución significativa de los niveles de NgR2 respecto a las células infectadas con la secuencia control. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión del receptor NgR2 cuando

las MNs se infectaron con la secuencia shNgR1 con respecto a la secuencia control. En ambos casos los niveles de expresión de NgR1 y NgR2 se redujeron aproximadamente a la mitad cuando las MNs fueron infectadas con shNgR1 y shNgR2, respectivamente, respecto a las infectadas con la secuencia scrambled (Figura 23a).

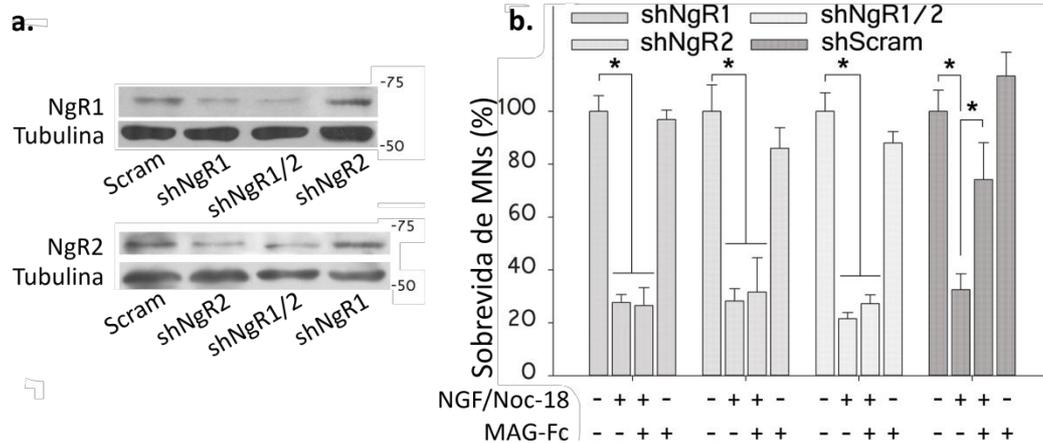


Figura 23: Niveles expresión de los receptores NgRs y su modulación mediante el uso de partículas lentivirales. **a.** Niveles de expresión de los receptores NgRs en células MN1 infectadas con partículas lentivirales conteniendo secuencias shRNA específicas (shNgR1, shNgR2 y shScram). Inmunoblot revelado con anticuerpos anti-NgR1 y anti-NgR2 y la correspondiente medición densitométrica estandarizada utilizando anticuerpos contra α -tubulina. ANOVAS de una vía indican niveles significativamente menores de NgR1 y NgR2 en células infectadas con shNgR1 y shNgR2 respectivamente, respecto a MN1 infectadas con secuencias shRNA control ($F(1,8)=7,34$, $p=0,0244$ $n=3$). **b.** Cuantificación del número de células MN1 infectadas durante 4 días con shNgR1, shNgR2, shNgR1/2 y secuencias control (shScram). Las células fueron tratadas con 100 nM de NGF y 50 nM de NOC-18 durante 24 hrs para inducir apoptosis dependiente del receptor $p75^{NTR}$. En los experimentos de protección, algunos cultivos fueron tratados con MAG-Fc (20 $\mu\text{g/ml}$) 4 hrs antes de la inducción de apoptosis. Se observa que células infectadas con shNgR1, shNgR2 y shNgR1 y 2, deja a las células MN1 insensibles al efecto protector de MAG-Fc, respecto a las células tratadas con shScram. Un ANOVA de dos vías (interacción tipo de lentivirus y tratamiento, $F(9,32)=74,91$, $p=0,0105$, $n=4$) seguido por el test *a posteriori* de Tukey señaló que el tratamiento con MAG-Fc produce solo un efecto protector contra la apoptosis en MNs infectadas con secuencias controles, respecto a los tratados con shNgR1, shNgR2 o shNgR1 y 2.

A continuación se evaluó la sobrevivencia de las células MN1 infectadas con los shRNAs específicos para cada receptor en el modelo de inducción de apoptosis dependiente del receptor $p75^{NTR}$. Para esto, se indujo apoptosis mediante el agregado

de 100 nM de NGF y 50 nM de NOC-18 durante 24 hrs, y en los experimentos de protección, las células MN1 fueron tratadas con MAG-Fc (20 µg/ml) 4 hrs antes de la inducción de apoptosis. Luego, las MNs fueron visualizadas con el anticuerpo SMI-32 y se procedió a la cuantificación de la sobrevivencia de MNs. Cuando las células fueron infectadas con la secuencia control, el tratamiento con NGF y NOC-18 desencadena la muerte del 45% de MNs, la cual fue completamente prevenida por el pre-tratamiento con MAG-Fc (Figura 23b). Los resultados además muestran que la protección ejercida por MAG-Fc no fue capaz de contrarrestar la apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR} cuando las MNs fueron infectadas tanto con secuencias shNgR1 o shNgR2. Además, no se observó un efecto aditivo significativo del silenciamiento en la protección ejercida por MAG-Fc en células MN1 que fueron infectadas con ambas partículas lentivirales, shNgR1 y shNgR2 (Figura 23b). Esto fue analizado mediante un ANOVA de dos vías, en el cual se observó un efecto del tipo de partícula lentiviral ($F(3,32)=295,67$), del tratamiento ($F(3,32)=1498,41$), y de la interacción entre ambos factores ($F(9,32)=74,91$ $p=0,01$, $n=3$). El análisis *a posteriori* de Tukey indicó la presencia de diferencias estadísticamente significativas en las células MN1 infectadas con shNgR1, shNgR2 o shNgR1 y 2 que recibieron el tratamiento con NGF y NOC-18 ($p<0,001$) o NGF/NOC-18/MAG-Fc ($p<0,001$), con respecto a las células que fueron infectadas con la secuencia control.

Estos resultados sugieren un rol funcional *in vitro* de los receptores NgRs en los eventos de señalización desencadenados por MAG sobre la modulación de la apoptosis de MNs dependiente del receptor p75^{NTR}.

4.4.2. Rol de los receptores NgRs en un modelo animal.

El rol de los receptores NgRs en la sobrevivencia de MNs fue testeado en ratones transgénicos que portan una delección para el gen que codifica para las proteínas NgR1, NgR2 y NgR3 (triple NgR-null). Se procedió a cuantificar el número de MNs en secciones de médula espinal lumbar ventral de teñidas con violeta de cresilo en ratones Wt y triple NgR-null de 3 meses de edad ($n=3$ para cada grupo). El análisis estadístico mediante un ANOVA de una vía señaló que los animales triple NgR-null presentan una reducción estadísticamente significativa ($34,6\pm 8,3\%$) en el número de

MNs de la médula espinal lumbar respecto a los animales Wt ((F(1,4)=22,23, p=0,0092) (Figura 24b).

Asimismo, se analizó la distribución del tamaño del soma de las MNs entre los ratones triple NgR-null y Wt (Figura 24c). Los ratones deficientes en los receptores NgRs presentaron una reducción preferencial de las MNs de gran calibre (con un área de soma celular mayor a 300 μm^2) con respecto a los animales Wt (34,6 \pm 8,3%).

Seguido a esto, el rol *in vivo* de los receptores NgRs fue confirmado en el modelo de apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR} inducido por la lesión de contusión del nervio ciático. Para esto, se evaluó el efecto del tratamiento con la forma quimérica soluble MAG(1-3)-Fc, la cual expresa solo los dominios extracelulares 1, 2 y 3 que no son los responsables de la interacción con los receptores NgRs pero no señalizan el efecto de MAG (Domeniconi y col., 2002). Para ello, al día 3 postnatal los ratones Wt fueron tratados con una dosis i.p. de 50 μg de MAG(1-3)-Fc e IgG humana (IVIg) como control. En este experimento se utilizaron 3 ratones por grupo.

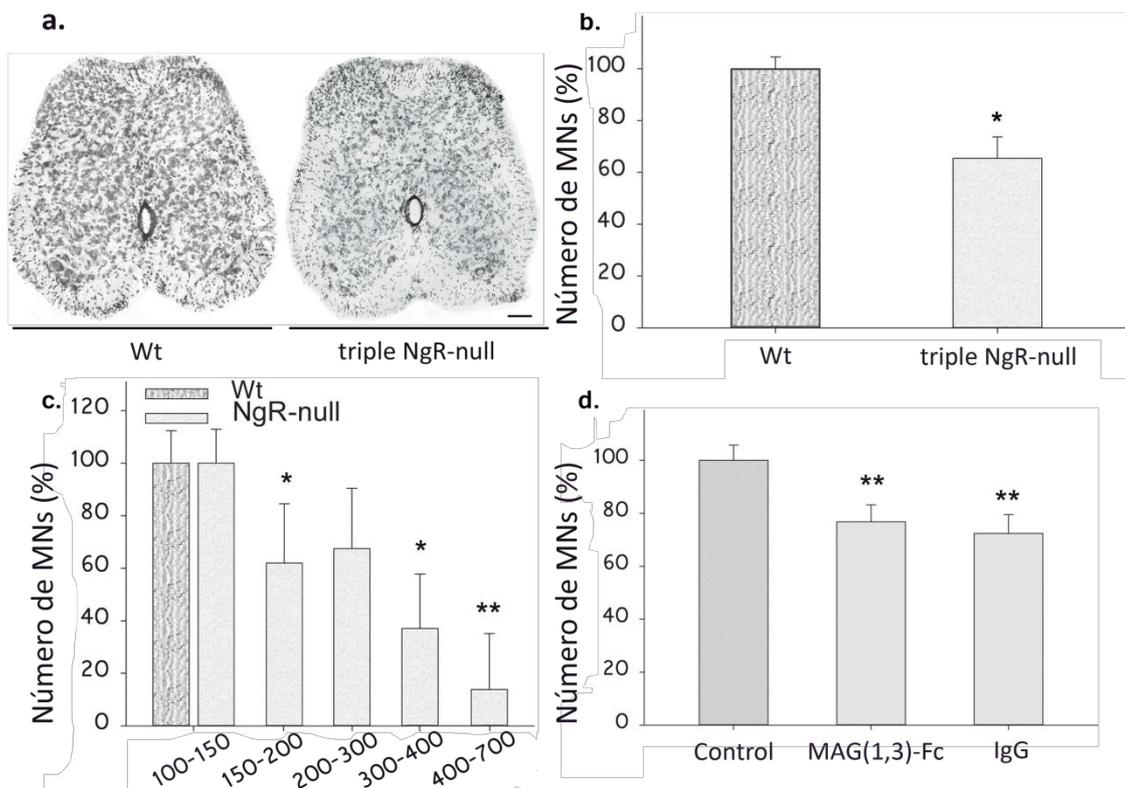


Figura 24: Rol de los receptores NgRs en la sobrevivencia de MNs en un modelo *in vivo*. **a.** Tinción histoquímica de cortes transversales de médula espinal lumbar con cresil violeta en ratones triple NgR-null y Wt. Se observa un menor número de MNs en ratones triple NgR-null. **b.** Cuantificación del número

de MNs de la médula espinal lumbar de ratones triple NgR-null y Wt a los 3 meses de edad. Las barras representan el porcentaje de MNs presentes en la región ventral de la médula espinal lumbar de ratones triple NgR-null respecto a los Wt. Las MNs con un área $\geq 100 \mu\text{m}^2$ fueron cuantificadas usando el programa Fiji. Se observa que ratones triple NgR-null presentan un menor número de MNs que los ratones Wt ($F(1,4)=22,23$, $p=0,0092$, triple; $n=3$ para cada grupo). **c.** Cuantificación del número de MNs en ratones triple NgR-null y Wt a los 3 meses de edad categorizadas por tamaño del soma celular. Cada barra representa el porcentaje del número de MNs en un rango de tamaño de los ratones triple NgR-null respecto a los Wt. El análisis estadístico indica diferencias significativas en los tamaños de soma a partir de las $300 \mu\text{m}^2$ en los ratones triple NgR-null respecto a los Wt (ANOVAS de una vía individuales en cada rango de calibre, todos los $F>6,12$ y todos los $p<0,05$; $n=3$ ratones por grupo). Las barras de error representan el error estándar de la media * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. **d.** Los ratones Wt fueron administrados con una inyección i.p. de $50 \mu\text{g/ml}$ de MAG(1-3)-Fc o IgG control al día 3 postnatal. Posteriormente, recibieron una lesión de contusión en el nervio ciático izquierdo, al día 5 postnatal. Las MNs fueron cuantificadas de la región ventral de la médula espinal lumbar al día 10 postnatal. El gráfico muestra la cuantificación del número de MNs de la médula espinal lumbar de ratones a los 10 días postnatales tratados con MAG(1-3)-Fc e IgG control. Las barras representan el porcentaje de MNs presentes en la región contralateral respecto a la región ipsilateral de la médula espinal. Las MNs con un área $\geq 100 \mu\text{m}^2$ fueron cuantificadas usando el programa Fiji. Se realizó un ANOVA de dos vías: lado ($F(1,62)=18,22$ $p<0,0001$) y el tratamiento ($F(1,62)=0,51$ $p<0,4762$), además de la interacción entre los dos factores ($F(1,62)=0,01$ $p<0,9436$). Las barras de error representan el error estándar de la media, ** $p < 0,01$, $n=3$ ratones por grupo.

Se observó que el tratamiento con MAG(1-3)-Fc no fue capaz de prevenir la muerte de MNs inducida por una lesión de contusión del nervio ciático. El análisis estadístico a través de un ANOVA de dos vías (tratamiento y lado) confirmó los efectos del lado ($F(1,62)=18,22$ $p<0,0001$), pero no así del tratamiento ($F(1,62)=0,51$ $p<0,4762$) ni tampoco de la interacción entre ambos factores ($F(1,62)=0,01$ $p<0,9436$).

En la figura 24d y como se desprende del análisis *a posteriori* de Tukey, se observa que el tratamiento con MAG(1-3)-Fc no fue capaz de proteger MNs luego de la lesión ($p<0,0001$).

4.5. CARACTERIZACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ASOCIADAS AL AFECTO ANTI-APOPTÓTICO DE MAG.

4.5.1. Rol de la vía de señalización RhoA/ROCK en el efecto protector de MAG.

La GTPasa pequeña Rho es una proteína de señalización intracelular que traduce señales extracelulares al citoesqueleto y el núcleo, y existe como una subfamilia que comprende las isoformas RhoA, RhoB y RhoC. La señalización a través de la GTPasa Rho está involucrada en la regulación coordinada de diversos procesos celulares, incluyendo la morfología, adhesión celular, la motilidad celular y la apoptosis durante el desarrollo del sistema nervioso (Kobayashi, 2004; Sanno y col., 2010). La serina treonina quinasa asociada a Rho (ROCK) es una de las proteínas efectoras de Rho y existe como dos isoformas ROCKI y ROCKII. Diversos estudios han descrito un rol importante de la vía de señalización RhoA/ROCK durante el neurodesarrollo. Sumado a esto, ha sido demostrado que MAG activa a RhoA e inhibe el crecimiento axonal de neuronas sensoriales y cerebelares a edades postnatales (Yamashita y col., 2002), formando un complejo con los receptores NgRs/p75^{NTR} (Fournier y col., 2001; Wang y col., 2002; Wong y col., 2002). Es por ello, que la descripción de las proteínas involucradas en esta vía de señalización y su dinámica espacio-temporal son necesarios para abordar este estudio.

4.5.1.1. Dinámica espacial y temporal de la actividad de RhoA en MNs.

Con el fin de dilucidar si la vía de señalización de RhoA está asociada al efecto protector de MAG contra la apoptosis de MNs, decidimos evaluar en primer lugar la dinámica espacio-temporal de la actividad de RhoA en MNs luego del tratamiento con MAG-Fc. Para esto, utilizamos un biosensor específico que responde a la activación de RhoA basado en el uso de la técnica de Transferencia de Energía de Resonancia (FRET), con un aumento en la transferencia no radiactiva desde el fluoróforo donador: proteína fluorescente cyan (CFP, por sus siglas en inglés) hacia el fluoróforo aceptor: proteína fluorescente amarilla (YFP, por sus siglas en inglés). El biosensor fluorescente preserva las interacciones de membrana, y permite visualizar la dinámica espacio-temporal de la actividad de RhoA.

La actividad de RhoA fue analizada en células MN1 y cultivos primarios de MNs, los cuales fueron transfectados con el biosensor durante 18 hrs y luego tratados

con Mag-Fc (20 µg/ml) a diferentes tiempos (30, 60 y 120 min). La actividad de RhoA fue calculada por la técnica de FRET radiométrico utilizando el programa Fiji (Pertz y col., 2006).

La figura 25a muestra un mapa termal de pseudocolor de la actividad de RhoA en células MN1 tratadas con MAG-Fc a diferentes tiempos hasta los 120 min. Los colores cálidos reflejan una alta actividad de RhoA (alta actividad de FRET), mientras que los colores fríos indican una baja actividad de RhoA (baja actividad de FRET). Los resultados muestran que el tratamiento con MAG-Fc induce un incremento robusto de la actividad de RhoA que comienza a los 30 min alcanzando un máximo de actividad a los 60 min luego de iniciado el tratamiento. Un ANOVA de una vía realizado en cada tiempo, señaló que a los 60 min la actividad de RhoA es significativamente mayor respecto a los demás tiempos analizados ($F(3,64)=2,77$, $p=0,0487$, $n=16$) (Figura 25b). El análisis espacial mostró que los axones y conos de crecimiento presentan mayor actividad de RhoA, en comparación al soma de las células MN1 (Figura 25b).

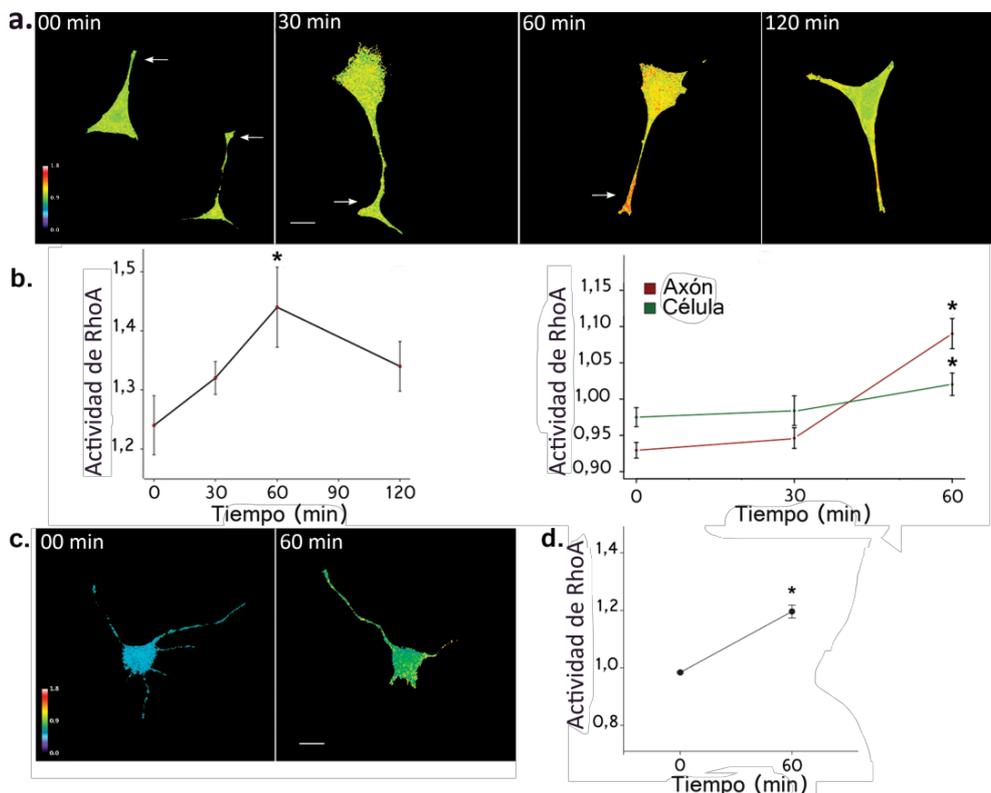


Figura 25: Efecto del tratamiento de MAG-Fc en la actividad de RhoA sobre células MN1 y cultivo primario de MNs. a. Curva temporal de la activación de RhoA en las células MN1 después del

tratamiento con MAG-Fc. Las células fueron transfectadas con el biosensor de RhoA, luego de 18 hrs las mismas fueron tratadas con 20 µg/ml de MAG-Fc a diferentes tiempos: 30, 60 y 120 min. Las imágenes ilustran un mapa termal de pseudocolor de la activación de RhoA en células MN1 con un incremento a los 60 min después del tratamiento con MAG-Fc (colores cálidos: alta actividad FRET; colores fríos: baja actividad FRET). Barra de escala, 22 µm. **b.** El gráfico de líneas muestra el análisis cuantitativo de la actividad de RhoA a diferentes tiempos luego del tratamiento con MAG-Fc; y el gráfico de la derecha muestra el análisis espacial de la actividad de RhoA en la célula completa y axones (línea verde y roja, respectivamente). **c.** Curva temporal de la activación de RhoA en cultivo primario de MNs después del tratamiento con MAG-Fc. Las células fueron transfectadas con el biosensor de RhoA, luego de 18 hrs las mismas fueron tratadas con 20 µg/ml de MAG-Fc. Las imágenes ilustran un mapa termal de pseudocolor de la activación de RhoA a los 60 min después del tratamiento con MAG-Fc. **d.** El gráfico de líneas muestra el análisis cuantitativo de la actividad de RhoA a diferentes tiempos posterior al tratamiento con MAG-Fc. **b y d.** ANOVAs de una vía individuales en cada tiempo (b) ($F(3,64)=2,77$, $p=0,0487$, $n=16$) (d) ($F(1,34)=4,46$, $p=0,0487$, $n=16$). Las barras de error representan el error estándar de la media de tres experimentos independientes ($n=15$ células por grupo) (* $p<0,05$).

Estos experimentos fueron además corroborados en cultivos primarios de MNs. Los mismos fueron crecidos durante 3 días, y luego las MNs fueron transfectadas con el biosensor de RhoA durante 18 hrs. Las MNs recibieron un tratamiento con 20 µg/ml de MAG-Fc durante 60 min, tiempo en el cual se cuantificó la actividad de RhoA. La figura 11c muestra que MAG-Fc es capaz de inducir un aumento en la actividad de RhoA significativamente mayor respecto al tiempo control ($F(1,34)=4,46$, $p=0,0487$, $n=16$).

4.5.1.2. Inhibición farmacológica de la señalización de RhoA por C3 transferasa.

El aumento en la actividad de la GTPasa pequeña RhoA en presencia de MAG fue corroborado transfectando las células MN1 con un plásmido que contiene la forma citosólica de la C3 transferasa, un potente inhibidor de la actividad de RhoA. Esta exoenzima cataliza selectivamente la ribosilación de ADP y produce la consecuente inactivación de la familia de las proteínas Rho GTPasas (Winton, 2002). Una vez que las células MN1 fueron transfectadas conjuntamente con el biosensor que responde a la

activación de RhoA y el plásmido C3 transferasa durante 18 hrs, las mismas fueron tratadas durante 60 min con MAG-Fc (20 µg/ml) mientras que la actividad de RhoA se analizó de acuerdo a lo descrito en la sección 5.1.1.

Los resultados muestran que la transfección de las células MN1 con el plásmido C3 transferasa bloqueó el incremento en la actividad de RhoA luego del tratamiento con MAG-Fc (Figura 26a). Esto fue analizado mediante un ANOVA de una vía en el cual solo se observaron diferencias significativas en la actividad de RhoA para las células que fueron transfectadas con el biosensor de RhoA y tratadas con MAG-Fc durante 60 min ($F(3,20)=10,69$, $p=0,0003$, $n=5$).

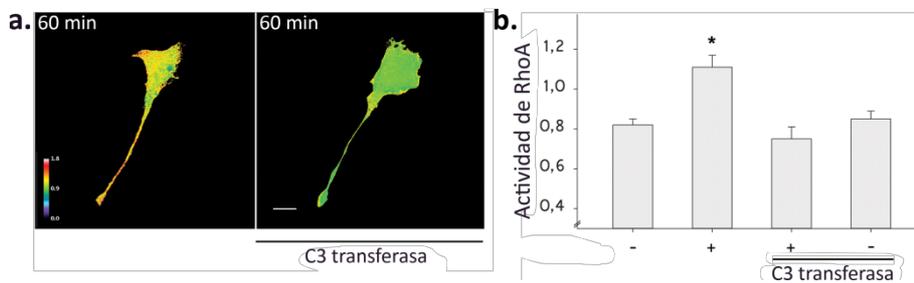


Figura 26: Efecto de la inhibición de la GTPasa pequeña RhoA en las células MN1. Las células fueron transfectadas con el biosensor de RhoA y un plásmido que contiene la forma citosólica de la C3 transferasa, luego de 18 hrs las mismas fueron tratadas con 20 µg/ml de MAG-Fc durante 60 min. **a.** Las imágenes ilustran un mapa termal de pseudocolor de la activación de RhoA en células MN1 donde se observa que la expresión de la enzima C3 inhibe la activación de RhoA luego del tratamiento con MAG-Fc durante 60 min (colores cálidos: alta actividad de RhoA, colores fríos: baja actividad de RhoA). Barra de escala, 22 µm. **b.** Análisis cuantitativo de la actividad de RhoA en células MN1. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en células transfectadas con el biosensor de RhoA y tratadas con MAG-Fc ($F(3,20)=10,69$, $p=0,0003$). Los datos representan la media \pm error estándar de la media de tres experimentos independientes ($n=15$ células por grupo) (* $p \leq 0,05$).

4.5.1.3. Participación de la señalización de RhoA en el efecto protector de MAG en un modelo *in vitro* de apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR}.

Con el fin de corroborar el rol de la vía de señalización de RhoA en la sobrevivencia de MNs, decidimos estudiar el efecto de MAG en presencia de un inhibidor de RhoA en un modelo de apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR}. Para ello, las células MN1 fueron transfectadas con el plásmido que contiene la forma citosólica de

la C3 transferasa durante 18 hrs. En este modelo, la muerte de MNs fue inducida por el tratamiento de las células con 100 nM de NGF y 50 nM de NOC-18 durante 24 hrs. El tratamiento de las mismas con MAG-Fc (20 µg/ml) o la combinación con NGF/NOC-18 fueron llevados a cabo con el objetivo de testear la eficacia contra la apoptosis.

El análisis de la sobrevivida de MNs se realizó mediante un ANOVA de una vía, el cual reveló un efecto principal del tratamiento ($F(3,55)=5,12$, $p=0,0034$, $n=3$) (Figura 27). El uso del test *a posteriori* de Tukey indicó una disminución estadísticamente significativa en la sobrevivida de MNs cuando las células fueron tratadas con NGF/NOC-18 y la combinación con MAG-Fc ($p<0,001$).

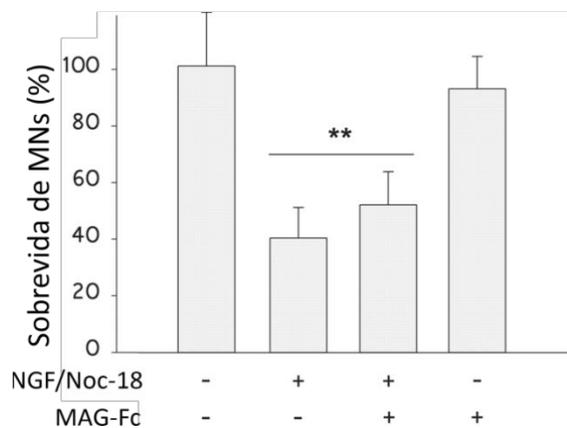


Figura 27: Rol de la vía de señalización de RhoA en el efecto protector de MAG-Fc en células MN1. Las células MN1 fueron cultivadas durante 4 días en medio de diferenciación y luego transfectadas con el plásmido que contiene la forma citosólica de C3 transferasa durante 18 hrs. Posteriormente, se indujo apoptosis dependiente del receptor $p75^{NTR}$ por el tratamiento de las células con 100 nM de NGF y 50 nM de NOC-18 durante 24 hrs. En los experimentos de protección, algunas células fueron tratadas con MAG-Fc (20µg/ml) 4 hrs antes de la inducción de apoptosis. El número de células MN1 fue cuantificado usando el programa Fiji. El análisis estadístico indica diferencias significativas en las células tratadas con NGF/NOC-18 o su combinación con MAG-Fc (ANOVA de una vía, ($F(3,55)=5,12$, $p=0,0034$)). Las barras representan el porcentaje de MNs \pm error estándar de la media de tres experimentos, $**p<0,001$.

4.5.2. Participación de Rho quinasa como efector de RhoA en el efecto protector de MAG.

Las proteínas quinasas asociadas a Rho (ROCKs) son los efectores más conocidos y descritos para la GTPasa Rho con múltiples sustratos y están involucrados

en numerosos procesos fisiológicos. Dado que en MNs el efecto protector de MAG involucra la activación de RhoA, decidimos estudiar el rol del efector ROCK en dicho proceso. Para ello, utilizamos el inhibidor farmacológico de ROCKs conocido como Y-27632.

4.5.2.1. El tratamiento con Y-27632 bloquea el efecto protector de MAG-Fc en un modelo *in vitro* de apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR}.

A continuación, decidimos estudiar el efecto del tratamiento con el inhibidor selectivo de ROCK, Y-27632, sobre el efecto protector de MAG-Fc en un modelo *in vitro* de apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR} utilizando cultivo primario de MNs. Para este fin, las MNs fueron tratadas con MAG-Fc (20 µg/ml) 4 hrs previas al tratamiento con 10 µM de Y-27632, y una hora después se indujo la apoptosis por el tratamiento con 100 µM de NGF y 50nM de NOC-18.

Los resultados muestran que el tratamiento con Y-27632 produjo una disminución estadísticamente significativa en la sobrevivencia de MNs, bloqueando el efecto protector de MAG-Fc ($F(5,30)=17,03$, $p<0,0001$) (Figura 28). Las diferencias entre los cultivos de MNs que recibieron los distintos tratamientos se detectaron a través del test *a posteriori* de Tukey. Este análisis demostró que luego de la inducción de apoptosis, los cultivos tratados con Y-27632 y MAG-Fc mostraron diferencias estadísticamente significativas en la sobrevivencia de MNs, respecto a los tratados solo con MAG-Fc.

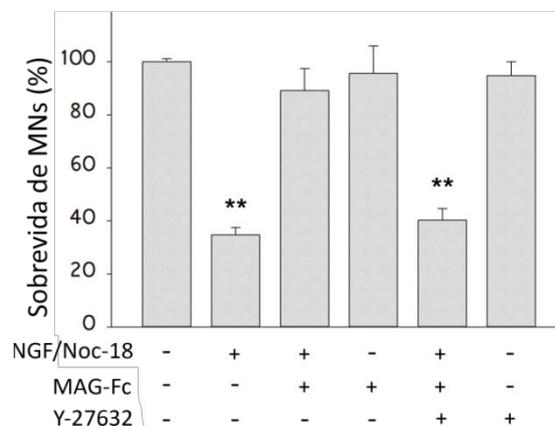


Figura 29: MAG-Fc protege MNs de la apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR} por activación de la vía de señalización RhoA/ROCK. Cultivos primarios de MNs fueron cultivados durante 3 días en medio

de crecimiento y posteriormente se indujo apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR} por el tratamiento de las MNs con 100 nM de NGF y 50 nM de NOC-18 durante 24 hrs. En los experimentos de protección, algunos cultivos fueron tratados con MAG-Fc (20µg/ml) 4 hrs antes de la inducción de apoptosis, mientras que otros recibieron el tratamiento con 10 µM de Y-27632 previa inducción de apoptosis. El número de MNs fue cuantificado usando el programa Fiji. El análisis estadístico indica diferencias significativas en las MNs tratadas con MAG-Fc y su combinación con Y-27632, respecto a los cultivos tratados con MAG-Fc, a los cuales se les indujo apoptosis (ANOVA de una vía, (F(5,30)=17,03, p<0,0001). Las barras representan el porcentaje de MNs ± error estándar de la media de tres experimentos, **p<0,001.

4.5.2.2. El tratamiento con Y-27632 bloquea el efecto protector de MAG-Fc en un modelo *in vivo* de apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR}.

La participación de la vía de señalización de RhoA/ROCK luego fue testeada en el modelo *in vivo* de lesión de contusión de nervio ciático en ratones Wt al día 5 postnatal. Se evaluó el efecto del tratamiento con MAG-Fc y el inhibidor Y-27632 en el número de MNs de la médula espinal lumbar luego de la lesión de nervio ciático. Para esto, los ratones Wt fueron tratados al día 3 postnatal con una dosis i.p. de 50 µg/ml de MAG-Fc o IgG humana (IVIg) como control. Otro grupo de animales, tratados con IgG control o MAG-Fc, fueron administrados además con Y-27632 (1µl, 10mg/ml) en la región distal del nervio lesionado cerca de la zona de contusión. En este experimento se utilizaron 3 ratones en cada uno de los cuatro grupos de tratamientos. La médula espinal lumbar de los animales al día 10 postnatal fue extraída y cortada en secciones de 10 µm. Luego, los tejidos fueron teñidos con violeta de cresilo y las MNs de la región ventral cuantificadas de acuerdo a los descrito en M&M. La región contralateral (no lesionada) de la médula espinal fue utilizada como control.

Como se observa en la figura 30a, la administración de Y-27632 bloqueó el efecto protector de MAG-Fc contra la apoptosis inducida por la lesión del nervio ciático. Esto fue analizado mediante un ANOVA de dos vías (lado y tratamiento), en el cual se observó un efecto del lado (F(1,50)=37,63, p<0,0001), del tratamiento (F(3,50)=3,08, p=0,0358), pero no de la interacción entre ambos factores (F(3,50)=1,81, p=0,1566). En la figura 30b y como se desprende del análisis *a posteriori* de Tukey, se observa que el tratamiento conjunto de Y-27632 y MAG-Fc no produjo diferencias

significativas en la sobrevida de MNs de la región ipsilateral respecto a la contralateral, mientras que el tratamiento de los ratones con MAG-Fc provocó un aumento estadísticamente significativo de la sobrevida de MNs en la región lesionada respecto a la contralateral ($p < 0,05$). Finalmente, este test no arrojó diferencias significativas en el número de MNs en el lado ipsilateral de la médula espinal de ratones tratados con Y-27632 o IgG control, descartando un posible efecto tóxico de este inhibidor sobre las MNs. Estos resultados indican que MAG-Fc protege *in vivo* MNs de la apoptosis dependiente de $p75^{\text{NTR}}$ mediante la activación de la vía de señalización RhoA/ROCK.

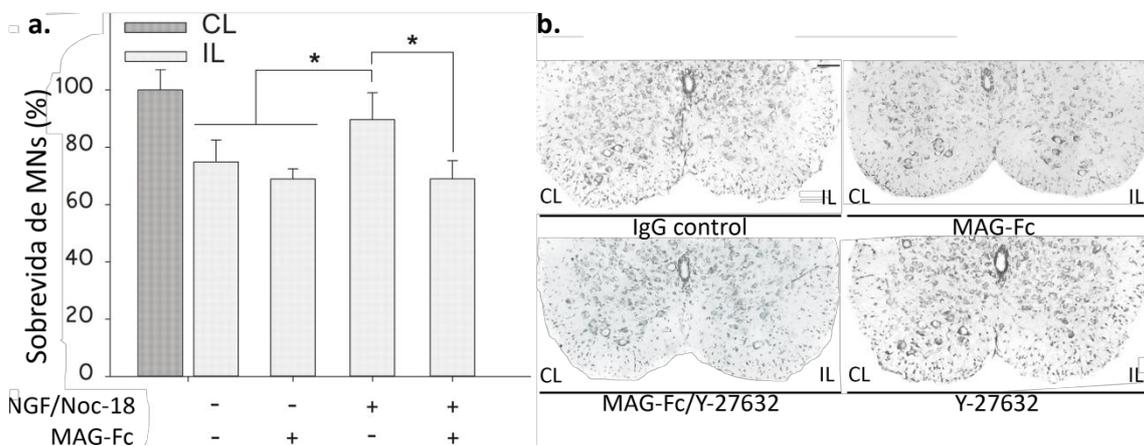


Figura 30: Y-27632 bloquea el efecto protector de MAG-Fc sobre MNs en un modelo *in vivo* de apoptosis dependiente del receptor $p75^{\text{NTR}}$. Ratones Wt recibieron la inyección i.p. de MAG-Fc o IgG control (P3); posteriormente se realizó una lesión de contusión en el nervio ciático izquierdo al día 5 postnatal. Algunos animales tratados con IgG control o MAG-Fc, recibieron el tratamiento con el inhibidor de ROCK, Y-27632 en la región distal cercana al sitio de lesión. Se cuantificó el número de MNs de la región ventral de la médula espinal lumbar al día 10 postnatal. **a.** Cuantificación del número de MNs de la médula espinal lumbar de ratones Wt tratados con IgG control y MAG-Fc (50 $\mu\text{g/ml}$) e Y-27632 (1 μl , 10mg/ml) en conjunto con MAG-Fc, e Y-27632 con IgG control. Las comparaciones fueron realizadas entre las MNs de la médula espinal lumbar de la región ipsilateral (lesionada) respecto a la contralateral. El tratamiento conjunto de Y-27632 y MAG-Fc no produjo diferencias en el número de MNs de la región lesionada respecto al control. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la sobrevida de MNs de animales que fueron tratados solo con MAG-Fc. ANOVA de dos vías: lado ($F(1,50)=37,63$, $p < 0,0001$), tratamiento ($F(3,50)=3,08$, $p=0,0358$), además de la interacción entre los dos factores ($F(3,50)=1,81$, $p=0,1566$), seguido por test *a posteriori* de Tukey. Las barras representan el porcentaje de MNs presentes en la médula espinal lumbar de la región ipsilateral respecto a la contralateral. Las barras de error representan el error estándar de la media, $*p < 0,05$. **b.**

Fotomicrografías de secciones de médula espinal lumbar teñidas con violeta de cresilo, las MNs con un área $\geq 100 \mu\text{m}^2$ fueron cuantificadas usando el programa Fiji.

4.5.3. El efecto protector de MAG contra la apoptosis de MNs involucra la activación de la vía de señalización RhoA/ROCK en forma dependiente del receptor p75^{NTR}.

Se ha demostrado que NGF y los receptores NgRs pueden señalizar a través del receptor de baja afinidad para neurotrofinas p75^{NTR}. Teniendo esto en cuenta, nosotros intentamos dilucidar si MAG podría modular la apoptosis de MNs estableciendo la activación de una vía antagónica a través del mismo receptor, que en última instancia impediría el efecto pro-apoptótico de NGF. Para tal fin, decidimos testar el efecto de TAT-Pep5, un inhibidor no competitivo de la interacción NgR-p75^{NTR}, en un modelo *in vitro* de apoptosis de MNs.

4.5.3.1. MAG protege MNs de la apoptosis por activación de la vía de señalización RhoA/ROCK a través del receptor p75^{NTR}.

Con el fin de evaluar la efectividad del tratamiento con TAT-Pep5 para inhibir la activación de RhoA, cultivos primarios de MNs fueron transfectados con el biosensor de RhoA durante 18 hrs y posteriormente tratadas con 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de MAG-Fc durante 60 min; mientras que algunos cultivos fueron pre-tratados durante 60 min con 200 nM de TAT-Pep5.

Como se observa en la figura 31b, el inhibidor TAT-Pep5 bloqueó la activación de RhoA en respuesta al tratamiento con MAG-Fc. El análisis estadístico reveló un efecto del tratamiento con MAG-Fc ($F(2,18)=9,70$, $p=0,0014$), pero no así para los cultivos que fueron administrados conjuntamente con TAT-Pep5.

Teniendo en cuenta que el tratamiento con el inhibidor TAT-Pep5 bloqueó el aumento de la actividad de RhoA luego de la administración de MAG-Fc en cultivos primarios de MNs, decidimos extender estos resultados a un modelo *in vitro* de apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR} en la línea celular de MNs (MN1). Para ello,

las células MN1 fueron pre-tratadas con 200 nM de TAT-Pep5 una hora antes de la inducción de la apoptosis por el tratamiento con 100 μ M de NGF y 50 nM de NOC-18.

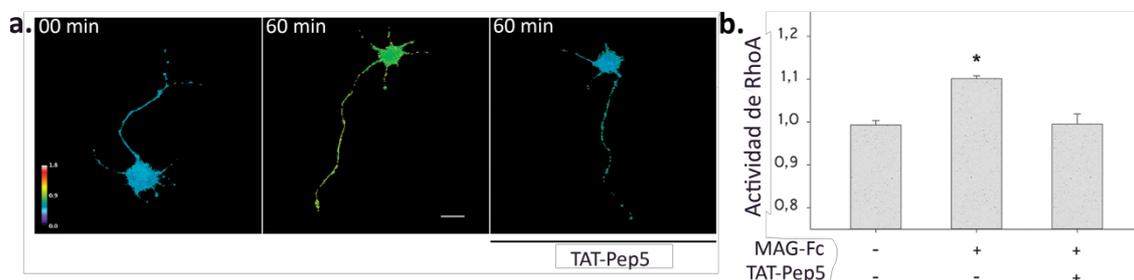


Figura 31: Efecto de la inhibición farmacológica del receptor p75^{NTR} en la activación de RhoA. Cultivos de MNs fueron transfectados con el biosensor de RhoA durante de 18 hrs, luego fueron tratados con 20 μ g/ml de MAG-Fc durante 60 min. Algunos cultivos fueron pre-tratados durante 60 min con 200 nM de TAT-Pep5, un inhibidor específico de la interacción p75^{NTR}/RhoA. **a.** Las imágenes ilustran un mapa termal de pseudocolor de la activación de RhoA en MNs donde se observa que en presencia de TAT-Pep5, no hay activación de RhoA por efecto del tratamiento con MAG-Fc a los 60 min (colores cálidos: alta actividad de RhoA, colores fríos: baja actividad de RhoA). Barra de escala, 22 μ m. **b.** Análisis cuantitativo de la actividad de RhoA en MNs. Se observaron diferencias estadísticamente significativas solo para las MNs transfectadas con el biosensor de RhoA y tratadas con MAG-Fc ($F(2,18)=9,70$, $p=0,0014$). Los datos representan la media \pm error estándar de la media de tres experimentos independientes ($n=15$ células por grupo) (* $p\leq 0,05$).

De manera interesante, la inhibición farmacológica de TAT-Pep5 en células tratadas con MAG-Fc mostró ser efectivo para bloquear la protección ejercida por MAG-Fc contra la apoptosis de MNs ($F(4,26)=4,44$, $p=0,0073$) (Figura 32). Las diferencias entre los cultivos de MNs que recibieron los distintos tratamientos se detectaron a través del test *a posteriori* de Tukey. Este análisis demostró que luego de la inducción de apoptosis, los cultivos tratados conjuntamente con TAT-Pep5 y MAG-Fc mostraron diferencias estadísticamente significativas en el número de MNs con respecto a los tratados solo con MAG-Fc; destacando que el tratamiento con TAT-Pep5 no bloquea la señalización pro-apoptótica del receptor inducida por NGF.

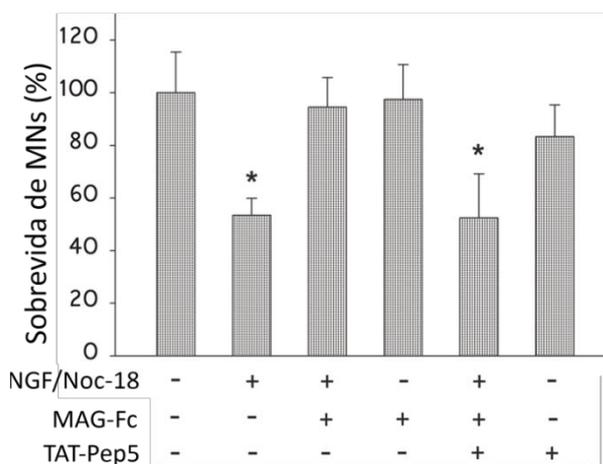


Figura 32: MAG-Fc protege células MN1 de la apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR} por activación de la vía RhoA/ROCK. Las células MN1 fueron cultivados durante 4 días en medio de diferenciación, se indujo apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR} por el tratamiento de las MNs con 100 nM de NGF y 50 nM de NOC-18 durante 24 hrs. En los experimentos de protección, algunas MNs fueron tratadas con MAG-Fc (20µg/ml) 4 hrs

antes de la inducción de apoptosis. Además, otros cultivos recibieron el pre-tratamiento con 200 nM de TAT-Pep5 una hora antes de la administración de MAG-Fc. El número de MNs fue cuantificado usando el programa Fiji. El análisis estadístico indica diferencias significativas en las MNs tratadas con MAG-Fc y su combinación con TAT-Pep5, respecto a los cultivos tratados solo con MAG-Fc (ANOVA de una vía, $F(4,26)=4,44$, $p=0,0072$). Las barras representan el porcentaje de MNs \pm error estándar de la media de tres experimentos independientes, * $p<0,05$.

4.5.3.2. MAG-Fc protege MNs de la apoptosis por activación de la vía de señalización RhoA/ROCK en una manera dependiente de p75^{NTR}.

Recientemente, los determinantes estructurales específicos de señalización del dominio ICD del receptor p75^{NTR} han sido descritos (Charalampopoulos y col., 2012). Dos regiones importantes que están involucradas en la interacción p75^{NTR}/Rho-GDI han sido estudiadas, sugiriendo que ellas están involucradas en la unión de Rho-GDI al receptor p75^{NTR}. De manera muy interesante, estas regiones se superponen con la región del dominio de muerte que es reconocida por el inhibidor TAT-Pep5. Por esta razón, el siguiente objetivo que nos propusimos fue testear si mutaciones puntuales en el dominio de muerte del p75^{NTR} localizadas en esta región, podrían modular la interacción con Rho-GDI y de esta manera bloquear el efecto protector de MAG contra la apoptosis de MNs. Estos resultados nos permitirían corroborar la presencia de un mecanismo antagónico entre la vía pro-apoptótica inducida por NGF y una vía anti-apoptótica desencadenada por MAG mediante el uso del mismo receptor.

En primer lugar, las células MN1 fueron transfectadas durante 18 hrs con una doble mutante de los sitios de interacción con Rho-GDI en el dominio ICD del receptor p75^{NTR}, denominada K350A/N353A (p75^{NTR} 350/353) (Charalampopoulos y col., 2012).

Asimismo, se utilizó un plásmido p75^{NTR} Wt para lograr un nivel de expresión adecuado en las células MN1 que permita competir con la actividad del receptor nativo. Luego, se analizó si MAG-Fc era capaz de rescatar MNs de la apoptosis inducida por el agregado de NGF y NOC-18 en presencia de la mutante p75^{NTR} 350/353.

Los resultados muestran que el tratamiento con MAG-Fc (20 µg/ml) en las células MN1 transfectadas con el plásmido p75^{NTR} Wt fue capaz de proteger las células MN1 de la apoptosis de las células, pero falló en el rescate de MNs cuando las células fueron transfectadas con la mutante del p75^{NTR} 350/353 (Figura 33).

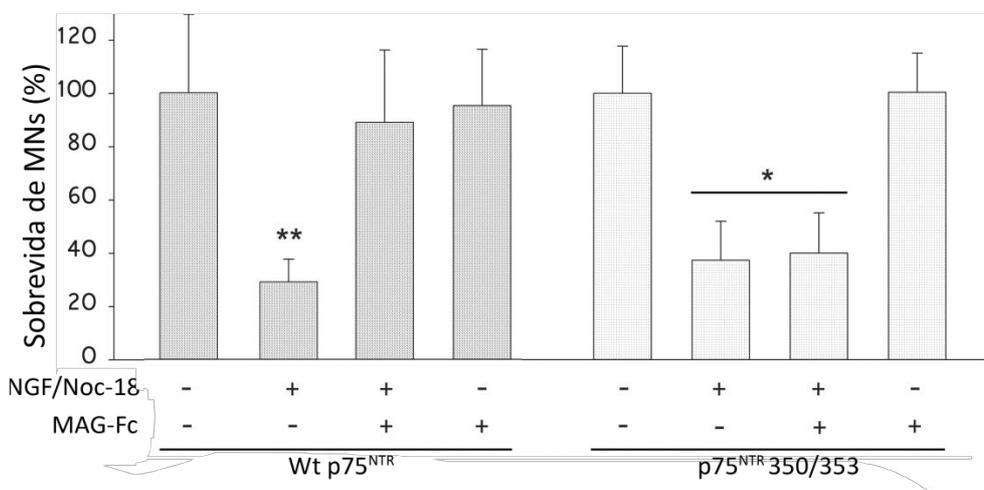


Figura 33: MAG-Fc protege células MN1 de la apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR} por activación de la vía de señalización RhoA/ROCK. Las células MN1 fueron cultivadas durante 4 días en medio de diferenciación, y transfectadas durante 18 hrs con la doble mutante p75^{NTR} 350/353 y con el plásmido p75^{NTR} Wt. Posteriormente, se indujo apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR} por el tratamiento de las MNs con 100 nM de NGF y 50 nM de NOC-18 durante 24 hrs. En los experimentos de protección, algunas MNs fueron tratadas con MAG-Fc (20 µg/ml) 4 hrs antes de la inducción de apoptosis. El número de MNs fue cuantificado usando el programa Fiji. El análisis estadístico indica diferencias significativas en el efecto protector de MAG-Fc en células que fueron transfectadas con el plásmido p75^{NTR}Wt, no así en las MNs tratadas con MAG-Fc y transfectadas con la mutante p75^{NTR} 350/353 (ANOVA de una vía, (F(4,26)=4,44, p=0,0072). Las barras representan el porcentaje de MNs ± error estándar de la media de tres experimentos, **p<0,01; *p<0,05.

Discusión

En este trabajo de tesis demostramos el rol modulador de MAG en el proceso de apoptosis de MNs durante el desarrollo postnatal temprano de ratones, poniendo en evidencia el efecto estabilizador que la mielina ejerce sobre las neuronas que envuelve. En particular hemos demostrado que MAG, actuando como un ligando funcional de los receptores NgR1 y NgR2, protege MNs contra la apoptosis durante la primera semana de vida postnatal mediante la activación de la vía de señalización RhoA/ROCK en forma dependiente del receptor de baja afinidad para neurotrofinas p75^{NTR}.

Si bien los primeros estudios en ratones *Mag*-null demostraron que éstos expresan abundante mielina con un grado de mielinización y compactación normales durante el desarrollo (Li y col., 1994; Montag y col., 1994), posteriormente se ha podido establecer el rol de MAG en diversas funciones biológicas que poseen un gran impacto sobre el axón. Pese a esto, hasta el momento no se había estudiado el impacto que el proceso de mielinización tiene sobre la supervivencia neuronal en el SNC. En este contexto, nuestro trabajo es el primero en estudiar y caracterizar la población de MNs de la médula espinal del ratón *Mag*-null durante el desarrollo postnatal.

En primer lugar, observamos que ratones deficientes de la proteína MAG presentan una marcada reducción en el número de MNs de la médula espinal lumbar durante la primera semana postnatal. En particular, son las MNs con un soma de mayor calibre las que sufren una marcada disminución en este periodo, mostrando una correlación con el incremento en el número de MNs apoptóticas en los ratones *Mag*-null en comparación con los Wt. Con respecto a esto, se conoce que los ratones *Mag*-null presentan una degeneración axonal significativa en su adultez, caracterizada por una atrofia axonal progresiva de aparición tardía con degeneración Walleriana incrementada tanto en el SNC como en el SNP (Nguyen y col., 2009). Esto indicaría que la reducción del número de MNs encontrada en el ratón *Mag*-null durante la primera

semana postnatal, está asociado a un proceso de neurodegeneración primario y no aparece en forma secundaria a la degeneración axonal. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre ambos genotipos al analizar el número de MNs al día 0 de edad, indicando que la reducción en el número de MNs hallada en los ratones *Mag*-null se encuentra restringida al desarrollo postnatal temprano.

MAG es un componente minoritario del sistema nervioso que se expresa preferencialmente en la capa periaxonal de mielina de axones mielinizados (Quarles, 2007). MAG regula el calibre axonal, controla la distribución de las moléculas en los nodos de Ranvier y promueve la estabilidad axonal bajo condiciones fisiológicas. Recientemente, se ha descrito un rol protector/estabilizador de MAG sobre axones en diferentes modelos *in vivo* e *in vitro* (Mehta y col., 2010; Nguyen y col., 2009). Más aún, se demostró que el rol protector de MAG se extiende más allá de los axones que envuelve, e involucra la supervivencia neuronal frente a un daño de excitotoxicidad (Lopez y col., 2011). En este contexto, nuestro trabajo hace extensivo el concepto del rol neuroprotector de MAG en la sobrevivencia de una población neuronal durante su desarrollo, a través de diferentes evidencias: (i) reducción del número de MNs de la médula espinal de los ratones *Mag*-null respecto a los Wt; (ii) aumento de la susceptibilidad de los ratones *Mag*-null en un modelo *in vivo* de apoptosis de MNs; (iii) la efectividad del tratamiento con MAG-Fc en un modelo *in vivo* de apoptosis de MNs; (iv) la efectividad de MAG-Fc para proteger MNs en un modelo *in vitro* de apoptosis usando diferentes cultivos de MNs.

Al presente todas las funciones biológicas asociadas a MAG sugieren una intensa comunicación molecular entre la membrana axonal y la capa de mielina más interna. Existe abundante evidencia de que esta comunicación involucra la interacción de diversos complejos ligando-receptor, capaces de generar una cascada de señalización intracelular que se traduce en cambios de la fisiología neuronal. En nuestro trabajo, además de describir un nuevo rol protector de MAG sobre MNs, se realizaron estudios para dilucidar el/los receptores axonales involucrados en este efecto. La identificación de MAG como el primer inhibidor de la regeneración axonal derivado de mielina llevó al descubrimiento de los múltiples receptores y vías de señalización asociadas (Schnaar y Lopez, 2009). Los dos receptores mejor caracterizados para MAG son: gangliósidos (GD1a y GT1b) y NgRs (NgR1 y NgR2), los

cuales requieren de moléculas transductoras para iniciar su evento de señalización intracelular. En trabajos previos, se identificó a MAG como una molécula capaz de promover en el axón la estabilidad de microtúbulos y la resistencia frente a la toxicidad aguda inducida por una variedad de agentes tales como la neurotoxina industrial acrilamida, un agente quimioterapéutico como vincristina y mediadores inflamatorios (Nguyen y col., 2009). Luego, se identificaron a los gangliósidos como receptores funcionales en la protección ejercida por MAG contra la agresión tóxica aguda sobre las neuronas del ganglio dorsal; y fueron estos resultados los que aportaron evidencias acerca de la presencia de vías de señalización independientes mediadas por MAG, con efectos biológicos duales que coexisten en las mismas células: un ejemplo de esto lo representa el efecto de MAG sobre neuronas hipocampales postnatales: mientras que su unión a gangliósidos media la inhibición del crecimiento neuronal, la unión a receptores NgRs induce un efecto protector contra excitotoxicidad (Lopez y col., 2011; Mehta y col., 2007).

El presente trabajo describe un rol para los receptores NgRs en la protección de las MNs contra la apoptosis. Se ha informado que MAG forma parte de un complejo de señalización integrado por NgR1, un miembro de la familia de NgRs, LINGO-1 (Fournier y col., 2001; Mi y col., 2004) y el receptor de baja afinidad para neurotrofinas p75^{NTR} para producir la inhibición de la regeneración axonal (Wong y col., 2002). Asimismo se conoce que el gangliósido GT1b puede interaccionar con el receptor p75^{NTR} a través de la unión directa con NgR1 (Vinson y col., 2003; Yamashita y col., 2002), sin embargo los gangliósidos también pueden señalizar por vías independientes del receptor p75^{NTR} a través de otra molécula transductora que aún no ha sido identificada (Mehta y col., 2007; Tang y col., 1997). Un trabajo previo confirmó el efecto protector de MAG contra excitotoxicidad a través de la unión a NgRs mediante el uso de inhibidores farmacológicos pero no se identificó a la molécula transductora involucrada en dicho efecto (Lopez y col., 2011). En relación a esto, tres hallazgos de nuestro trabajo demuestran el rol funcional de los receptores NgRs sobre el efecto protector contra la apoptosis. En primer lugar, MAG no pudo rescatar MNs de la apoptosis dependiente de p75^{NTR} cuando la expresión de los receptores NgRs fue silenciada utilizando shRNAs específicos para cada receptor. En segundo lugar, se observó una reducción en el número de MNs de la médula espinal lumbar en ratones

triple NgR-null, respecto a los ratones Wt. Finalmente, nuestros resultados demuestran la ausencia de un efecto protector de MAG(1-3)-Fc, una mutante quimera de MAG-Fc que carece de los dominios 4 y 5 responsables de señalar el efecto biológico de MAG, en un modelo *in vivo* de apoptosis de MNs inducido por una lesión de contusión del nervio ciático.

Estos resultados coinciden con evidencias previas que postulan un rol crítico para los receptores NgRs como moduladores de la muerte celular programada de MNs (Dupuis y col., 2008). Este trabajo describe que la activación farmacológica de los receptores NgRs, antagoniza la apoptosis de MNs dependiente del receptor p75^{NTR}. Pese a esto, no pudieron demostrar un rol funcional para Nogo-A, un ligando natural de los receptores NgRs, ya que no hallaron un incremento en la apoptosis de MNs en los ratones deficientes de Nogo-A, sugiriendo un rol importante para otros ligandos de los receptores NgRs que podrían estar compensando la deficiencia de Nogo-A. En conjunto estos resultados nos permiten enfatizar el rol de los receptores NgRs como mediadores del efecto protector ejercido por MAG en la sobrevivencia de MNs. Además, nuestras evidencias muestran que el rol modulador de MAG sobre MNs ejercido a través de la interacción con los receptores NgRs es esencial durante la primera semana postnatal, periodo en el cual las MNs continúan siendo susceptibles a la deficiencia de neurotrofinas; logrando independizarse del trofismo del órgano blanco luego de esta etapa (Li y col., 1994).

Resulta interesante que la señalización pro-sobrevivencia desencadenada por MAG a través de NgRs se basa en la activación de la vía de señalización RhoA y su efector la quinasa asociada a Rho, ROCK a través del receptor p75^{NTR}. Nuestras observaciones indican una relación directa entre el p75^{NTR} y la GTPasa pequeña RhoA en el efecto protector de MAG, lo cual resulta especialmente interesante en vista del patrón de desarrollo de expresión del receptor p75^{NTR}. Diferentes estudios indican que el receptor p75^{NTR} se expresa ampliamente en diversos tipos de células neuronales y no neuronales; y en el sistema nervioso en desarrollo su expresión ha sido asociada con la sobrevivencia, crecimiento, diferenciación y muerte neuronal (Lowry y col., 2001a). Mientras que en la mayoría de las células del sistema nervioso la expresión del p75^{NTR} desaparece en la etapa adulta, en algunas neuronas sus niveles de expresión se mantienen bajos durante periodos postnatales tempranos, aquí se incluyen las

neuronas colinérgicas del cerebro anterior basal, neuronas sensoriales y MNs de la médula espinal (Saika y col., 1991). Específicamente, p75^{NTR} se expresa abundantemente en MNs de la médula espinal durante el desarrollo embrionario comenzando entre los días 11 y 14, mientras que su expresión persiste luego del nacimiento; y desaparece alrededor de la segunda semana postnatal (Chiu y col., 1993; Ernfors y col., 1989). Sin embargo, luego de una lesión de contusión en el nervio periférico o bajo determinados insultos tóxicos, se produce una fuerte regulación positiva de la expresión del receptor p75^{NTR} en las MNs faciales y de la médula espinal, que persiste durante 2-3 semanas luego de la lesión (Ernfors y col., 1989; Saika y col., 1991). En relación a esto, una lesión en el nervio ciático en ratones durante la primera semana postnatal induce la apoptosis de MNs dependiente del receptor p75^{NTR}, mientras que una lesión similar en animales luego de la primera semana de vida, resulta en la regeneración del nervio (Li y col., 1994c). En este sentido, nuestros hallazgos muestran que los ratones *Mag*-null presentan una mayor susceptibilidad a la apoptosis inducida por una lesión de contusión en el nervio ciático; un paradigma experimental de apoptosis que se caracteriza por la muerte de MNs dependiente del receptor p75^{NTR} (Dupuis y col., 2008), siendo las MNs de mayor calibre las más afectadas luego de la lesión del nervio en los ratones *Mag*-null. Este modelo basado en la contusión del nervio ciático es muy utilizado para el estudio de la degeneración *in vivo* de MNs, y ha sido muy empleado para la identificación de agentes neuroprotectores capaces de modular la degeneración de MNs (Lowry y col., 2001b). Así, nuestros resultados muestran que la administración intraperitoneal de MAG-Fc fue capaz de prevenir la apoptosis de MNs luego de la lesión de contusión del nervio ciático. Estos datos en conjunto con los estudios de inmunofluorescencia que detectaron la colocalización de MAG-Fc con un marcador axonal, demuestran que el tratamiento con MAG-Fc puede rescatar MNs *in vivo* de la apoptosis, mediante su señalización a través de los receptores axonales de las MNs en el sitio de lesión.

El receptor p75^{NTR} es una molécula que pivotea entre señales pro y anti-apoptóticas (Ibáñez y Simi, 2012). Durante el desarrollo embrionario, la activación del receptor p75^{NTR} resulta en la apoptosis de diversas poblaciones neuronales, incluyendo MNs espinales (Ernfors y col., 1989). A su vez, los ratones p75^{NTR}-null tienen un mayor número de MNs asociado con una reducción del proceso de apoptosis (Wiese y col.,

1999). Los estudios en estos ratones muestran que el receptor p75^{NTR} exacerba la muerte de neuronas sensoriales y MNs luego de una axotomía, mientras que contribuye a su supervivencia durante el desarrollo (Ibáñez y Simi, 2012). Esta dualidad no es única del receptor p75^{NTR} sino que se puede encontrar en otros miembros de la superfamilia de los Receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNFR, por sus siglas en inglés). Por un lado, esta dualidad puede ser consecuencia de diferencias intrínsecas en el complemento de mediadores intracelulares y/o co-receptores entre neuronas en desarrollo y células adultas. Respecto a esto se encontró que NGF aumenta la supervivencia de cultivos jóvenes de células de Schwann a través de la señalización de p75^{NTR} mediante la interacción con una proteína adaptadora de este receptor (RIP2, proteína de interacción con el receptor-2), pero induce la muerte celular en cultivos de más edad, en la cual RIP2 está regulado negativamente. Por otro lado diferentes ambientes extracelulares, tales como el equilibrio entre neurotrofinas y pro-neurotrofinas, también puede contribuir a respuestas opuestas del receptor p75^{NTR} (Ibáñez y Simi, 2012). Es por ello, que la comprensión de cómo los diferentes ligandos del p75^{NTR} pueden provocar diferentes respuestas a través del mismo receptor, es un desafío clave para dilucidar en este campo.

Se ha descrito que en la membrana celular el receptor p75^{NTR} se encuentra en equilibrio entre las formas monomérica y homodimérica (Charalampopoulos y col., 2012; Qu y col., 2013; Vilar y col., 2009); sin embargo recientemente se ha informado a través de una variedad de enfoques bioquímicos, que el oligómero principal del receptor p75^{NTR} podría ensamblarse además como un trímero en ausencia del ligando al igual que los demás miembros de la familia de receptores TNRF (Anastasia y col., 2015). De manera interesante, los sitios de interacción de diversos ligandos se expresan diferencialmente en las diferentes formas que pueden adoptar los oligómeros del receptor p75^{NTR}. La forma monomérica interacciona con diversos receptores, entre ellos el complejo receptor multimérico que incluye NgR/LINGO-1 y gangliósidos, y se muestra con afinidad reducida para neurotrofinas. Por el contrario, se conoce que la dimerización induce un cambio conformacional asociado con la exposición del sitio de unión a NGF de alta afinidad y se asocia con la interacción de adaptadores intracelulares que desencadenan la señalización pro-apoptótica (Barker, 2009; Vilar y col., 2009). NGF puede unirse al receptor p75^{NTR} así como también al

receptor transmembrana TrkA, miembro de la superfamilia tirosina quinasa. Todas las neurotrofinas se unen a diferentes subtipos de receptores Trk, y mientras que el receptor $p75^{NTR}$ puede responder a las neurotrofinas maduras de manera independiente, los receptores Trk son los principales mediadores de la función trófica, siendo el receptor $p75^{NTR}$ capaz de optimizar la afinidad y especificidad de los receptores Trks por las neurotrofinas. Un número significativo de trabajos han demostrado que la proteólisis regulada intramembrana (RIP, por sus siglas en inglés) es necesaria para la señalización del $p75^{NTR}$, mostrando que el segmento carboxilo terminal (CTF, por sus siglas en inglés) y el dominio intracelular (ICD, por sus siglas en inglés) resultantes de la proteólisis del $p75^{NTR}$ son capaces de mediar la muerte neuronal tanto en células PC12 y neuronas granulares del cerebelo (CGs, por sus siglas en inglés) que expresan TrkA y TrkB, respectivamente (Skeldal y col., 2011). Sin embargo, recientemente se encontró que el procesamiento proteolítico del receptor $p75^{NTR}$ no es requerido para la activación de la muerte celular o la vía de NF- κ B en células hipocámpales y CGs luego de la estimulación con NGF (Vicario y col., 2015), poniendo en evidencia respuestas diferenciales de la activación y el procesamiento proteolítico del receptor $p75^{NTR}$ en diferentes poblaciones del sistema nervioso.

Se ha demostrado que la mielina induce degeneración de los axones colinérgicos en cultivos de neuronas del núcleo septal de animales Wt; mientras que no tiene efecto en cultivos neuronales de ratones $p75^{NTR}$ -null. Curiosamente, anticuerpos que neutralizan el efecto del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés), también fueron capaces de prevenir los efectos de mielina en la degeneración axonal; sugiriendo que ambos, mielina y neurotrofinas, requieren de la unión al receptor $p75^{NTR}$ para producir la degeneración de axones en el área septal. Al presente, no está claro si los efectos del $p75^{NTR}$ en la inhibición de la regeneración axonal y la degeneración axonal descrita anteriormente proceden de vías de señalización diferentes o similares. Otra posibilidad es que estén en juego los diferentes mecanismos de activación del receptor, determinados por la unión del ligando que puede cambiar el estado de oligomerización del receptor mediante la inducción de dímeros que conducen a la unión o liberación de efectores aguas abajo. Esta posibilidad es apoyada por los resultados recientes de Vilar y col (2009) que identifican al residuo altamente conservado Cys²⁵⁷ en el dominio transmembrana

como el locus para la formación de puentes disulfuro entre las cadenas del receptor p75^{NTR}. La introducción de una mutación en el residuo Cys²⁵⁷ bloquea la formación del dímero del p75^{NTR} unido covalentemente. Sin embargo, los dímeros de la forma Wt del p75^{NTR} y de la mutante p75^{NTRC257} se forman en la superficie celular con la misma frecuencia, indicando que existen otros mecanismos que regulan la oligomerización del receptor p75^{NTR} (Barker, 2009). En relación a esto, diversas formas oligoméricas del p75^{NTR} tales como los dímeros simétricos covalentes (unidos por puentes disulfuro Cys³⁷⁹-Cys³⁷⁹) y los dímeros simétricos no covalentes pueden simultáneamente existir en la superficie celular antes de la unión del ligando. Se postula que los residuos de cisteína pueden mediar diferentes respuestas celulares a través de la detección de estados oxidativos y su traducción a cambios conformacionales en la estructura y función de la proteína, como la formación de puentes disulfuro entre los dominios de muerte del receptor p75^{NTR}, pudiendo el residuo Cys³⁷⁹ funcionar como un sensor redox constituyendo otro nivel de regulación del receptor p75^{NTR} (Qu y col., 2013).

Recientemente, se encontró que tanto el residuo de cisteína altamente conservado en el dominio transmembrana y los cuatro dominios ricos en cisteína de la región extracelular son necesarios para la formación y estabilidad del trímero del receptor p75^{NTR}. El dominio terminal 1 rico en cisteína (CRD1, por sus siglas en inglés) presente en el dominio extracelular de los receptores TNFRs es requerido para la formación de trímeros, y por esta razón se lo denomina dominio de ensamblado en ausencia de ligando (PLAD, por sus siglas en inglés). El CRD1 del p75^{NTR} promueve la trimerización del receptor, por lo tanto funciona como un PLAD, aunque los cuatro CRDs son necesarios para la trimerización del mismo (Anastasia y col., 2015). Sin embargo, es importante mencionar que la literatura con respecto a esta temática está dividida, y por lo tanto requiere de mayor investigación.

El receptor p75^{NTR} puede activar a la GTPasa pequeña RhoA (Yamashita y col., 1999) en respuesta a la interacción de MAG con los receptores NgRs y LINGO-1 (Fournier y col., 2001; Mi y col., 2004; Wang y col., 2002b; Wong y col., 2002) para inducir la señal de inhibición sobre el crecimiento axonal. Curiosamente, se demostró que la mutante del residuo Cys²⁵⁷ del receptor p75^{NTR} es capaz de mediar los eventos de señalización inducidos por MAG, confirmando la existencia de distintos mecanismos de activación del p75^{NTR} dependientes del ligando. Estos resultados sugieren que los

mecanismos de activación del receptor $p75^{NTR}$ están relacionados con diferentes complejos de receptores, y pueden operar en respuesta a diferentes ligandos del $p75^{NTR}$, siendo éste un receptor promiscuo que colabora con diversas proteínas en la superficie celular para incidir en un gran número de funciones biológicas. Es por todo esto, que se propone un nuevo mecanismo de activación del receptor $p75^{NTR}$ que involucra un reordenamiento de las subunidades del receptor en respuesta a otros tipos de ligandos. La pregunta que surge es cómo la unión del ligando al receptor regula las interacciones con diferentes efectores intracelulares. Esto condujo al estudio de la capacidad del receptor $p75^{NTR}$ en el reclutamiento del inhibidor de disociación de Rho-GDP (Rho-GDI α) y la actividad de RhoA en respuesta a un ligando derivado de mielina, MAG (Yamashita y col., 2002). De manera interesante, células que expresan $p75^{NTR}$, NgR y LINGO-1 respondieron a la estimulación con MAG en el reclutamiento de Rho-GDI α por $p75^{NTR}$ y en el incremento de la actividad de RhoA, independientemente si recibieron la forma Wt o mutante del residuo Cys²⁵⁷ del receptor $p75^{NTR}$ (Vilar y col., 2009). En relación a esto, recientemente se han caracterizado los determinantes estructurales relacionados con la señalización del dominio ICD del receptor $p75^{NTR}$; siendo identificados epítopes que se corresponden con vías pro-apoptóticas y pro-sobrevivencia que no se superponen en este dominio (Charalampopoulos y col., 2012). Teniendo en cuenta esto, la utilización en nuestro trabajo de la forma doble mutante localizada en el dominio ICD del $p75^{NTR}$, que produce una reducción en la afinidad por Rho-GDI α (K350A/N353A) no fue capaz de traducir el efecto protector de MAG contra la apoptosis en células MN1 en comparación con la forma Wt del $p75^{NTR}$. Además, con el fin de estudiar si MAG es capaz de regular la actividad de RhoA en MNs que expresan $p75^{NTR}$ endógeno, analizamos la resolución temporal y espacial que brinda la detección de biosensores de actividad basados en FRET mediante microscopía óptica. Encontramos que la actividad de RhoA se incrementa luego del tratamiento con MAG-Fc siendo mayor en los conos de crecimiento y en los axones de las MNs. De manera más interesante, la activación de RhoA por MAG fue prevenida cuando las MNs fueron tratadas con TAT-Pep5, un inhibidor de la interacción del $p75^{NTR}$ con Rho-GDI α . En conjunto, los resultados observados nos permiten identificar a MAG como un regulador de la apoptosis postnatal de MNs, a través de un mecanismo antagónico del

receptor p75^{NTR} que involucra la activación de una vía anti-apoptótica desencadenada por MAG.

Nuestros estudios estuvieron enfocados en la participación de MAG en la regulación de la actividad de RhoA por un mecanismo dependiente del receptor p75^{NTR}. Algunas de las vías reguladas por el receptor p75^{NTR} en respuesta a las neurotrofinas incluyen: NF- κ B (Carter y col., 1996), c-Jun quinasa (JNK) (Friedman, 2000; Yoon y col., 1998) y caspasas (Troy y col., 2002). Además, se ha demostrado que las neurotrofinas pueden unirse al p75^{NTR} y promover el crecimiento axonal de neuronas, produciendo la inactivación de RhoA (Yamashita y col., 1999). La relación entre el receptor p75^{NTR} y la GTPasa pequeña RhoA parece ser funcionalmente relevante, ya que la modulación del crecimiento de neuritas mediado por neurotrofinas en neuronas que expresan p75^{NTR}, reproduce los resultados obtenidos después de la inhibición de RhoA (Yamashita y col., 1999). Como se mencionó anteriormente, el receptor p75^{NTR} también puede funcionar como un transductor de señal para MAG, provocando un efecto opuesto al mencionado, mediante la activación de la GTPasa pequeña RhoA (Yamashita y col., 2000); en este caso RhoA actúa como un efector intracelular clave de la señalización aguas abajo del complejo receptor formado por p75^{NTR}, NgR y LINGO-1, produciendo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento neurítico. Aunque MAG activa la señalización de RhoA a través de los receptores NgR1 o NgR2, hay diferencias en la molécula transductora reclutada por estos receptores. Como parte del complejo receptor NgR/LINGO-1; tanto el receptor p75^{NTR} como el receptor huérfano TAJ/TROY son capaces de mediar la activación de RhoA a través de la asociación con Rho-GDI α , induciendo la inhibición de la regeneración axonal (Lu y col., 2013). Se ha demostrado que TAJ/TROY puede unirse al receptor NgR1 y sustituir al p75^{NTR} en la vía de señalización dependiente de Nogo en neuronas que no expresan el receptor p75^{NTR} (Shao y col., 2005); sin embargo aún no está claro si TROY requiere el mismo clivaje proteolítico que el p75^{NTR}, mientras que no se conoce el receptor para NgR2.

Dado que nuestros resultados apoyan la idea de un rol funcional para los receptores NgR1 y 2 en el rol modulador de MAG contra la apoptosis a través de la interacción con p75^{NTR}, nos preguntamos si la activación de RhoA dependiente de NgR2 implica la interacción directa con el receptor p75^{NTR}. En primer lugar, nuestros

resultados sugieren que no existe un efecto aditivo sobre la activación de RhoA cuando se silencian conjuntamente los receptores NgR1 y NgR2. Sumado a esto la inhibición de la interacción Rho-GDI α /p75^{NTR}, a través de la sobreexpresión de la mutante K350A/N353A en las células MN1, no produjo un aumento significativo en la activación de RhoA dependiente de MAG; descartando de esta manera la existencia de mecanismos de activación de RhoA independientes del receptor p75^{NTR}. Por lo tanto, una posible interpretación de nuestros resultados es que la señalización de MAG esté dada a través de la interacción con el complejo multimérico que incluye tanto al receptor NgR1 como NgR2. Se requerirá de trabajos futuros para identificar las moléculas transductoras reclutadas por NgR2 después de la unión de MAG en nuestro modelo.

Sumado a esto, diversas evidencias de nuestro trabajo apoyan la idea de un rol funcional de la vía de señalización RhoA/ROCK en el efecto protector de MAG. En primer lugar, se observó que MAG no fue capaz de proteger MNs de la apoptosis dependiente de p75^{NTR}, cuando se utilizaron los inhibidores de RhoA y ROCK, C3 transferasa e Y-27632, respectivamente. Más aún, el rescate de MNs en animales tratados con MAG-Fc luego de una lesión de contusión en el nervio ciático, fue inhibido mediante el tratamiento local con Y-27632. Conjuntamente, estos datos indican que la vía de señalización de RhoA, primariamente a través de ROCK, juega un rol crucial en la sobrevivencia de MNs contra la apoptosis dependiente del receptor p75^{NTR} en el período posnatal temprano.

El efecto pro-sobrevivencia de MAG sobre las MNs mediado por la activación de la vía de señalización RhoA y su quinasa asociada ROCK, es una cuestión importante a discutir. En estudios previos se analizó el rol *in vivo* de la vía de señalización RhoA/ROCK durante el desarrollo embrionario de las MNs de la médula espinal, utilizando la expresión condicional de una forma dominante negativa de RhoA y ROCK; observándose un incremento en la apoptosis de MNs durante el desarrollo (Kobayashi, 2004). Por lo tanto, el papel de la vía RhoA/ROCK en la sobrevivencia de MNs desencadenada por MAG, podría pensarse como un programa de recapitulación durante el desarrollo postnatal de las MNs. Sin embargo, la activación de esta vía de señalización no siempre está asociada a una respuesta positiva para el desarrollo postnatal de neuronas. Curiosamente, se ha descrito que durante el desarrollo

postnatal de la corteza cerebral, la activación de RhoA/ROCK produce un incremento en la apoptosis de neuronas corticales (Sanno y col., 2010); estos resultados demuestran que el rol que desempeña la vía RhoA/ROCK durante el neurodesarrollo es muy complejo, ya que produce efectos opuestos en diversas poblaciones neuronales y etapas del desarrollo. Es decir, los diferentes roles desencadenados por RhoA/ROCK, en última instancia, reflejan la complejidad de las cascadas de señalización que regulan el desarrollo neuronal. Si bien en nuestros estudios no se profundizó acerca de las vías de señalización aguas debajo de RhoA/ROCK, es importante destacar que recientemente se informó acerca de una vía neuroprotectora inducida por Nogo-A, que implica la activación de RhoA/ROCK en una manera dependiente de NgRs (Kilic y col., 2010). Sin embargo, resta por discernir si ambas vías aguas abajo relacionadas con la activación de los receptores NgRs muestran similitudes en los efectores utilizados.

Es importante destacar que el uso de inhibidores de la vía RhoA/ROCK resultó exitoso para promover la regeneración axonal y/o la recuperación funcional en algunos ensayos preclínicos y clínicos en humanos (Forgione y Fehlings, 2014; McKerracher y col., 2012). Sin embargo, si bien en algunas células ROCK puede regular cambios morfológicos dependientes de Caspasa-3 durante la fase de ejecución de la apoptosis en estudios *in vitro* como *in vivo*, en otros casos la inhibición de ROCK resulta en la muerte de una variedad de otros tipos celulares (Julian y Olson, 2014). El escenario es aún más complejo cuando se consideran proteínas efectoras de Rho que trabajan cooperativamente con ROCK y proteínas que modulan la actividad de ROCK (Julian y Olson, 2014; Park y col., 2010). Por lo tanto, ROCK puede tener efectos pro y anti-apoptóticos dependiendo de las propiedades intrínsecas y extrínsecas de la célula. En base a nuestras evidencias y la literatura, el uso de inhibidores farmacológicos como agentes terapéuticos para promover la recuperación neuronal amerita un estudio más profundo, en particular cuando se tiene en cuenta la complejidad de las respuestas de tipo específico desencadenadas por la activación del receptor p75^{NTR}.

Una de las posibles interpretaciones de nuestros resultados nos permiten sugerir además, que la unión de MAG al complejo receptor NgR1/p75^{NTR} podría desplazar el equilibrio del receptor p75^{NTR} hacia su forma monomérica en la membrana celular; ya que la unión de neurotrofinas al p75^{NTR} converge en una menor activación de RhoA a través de la activación de Rac 1, una vía antagónica de RhoA

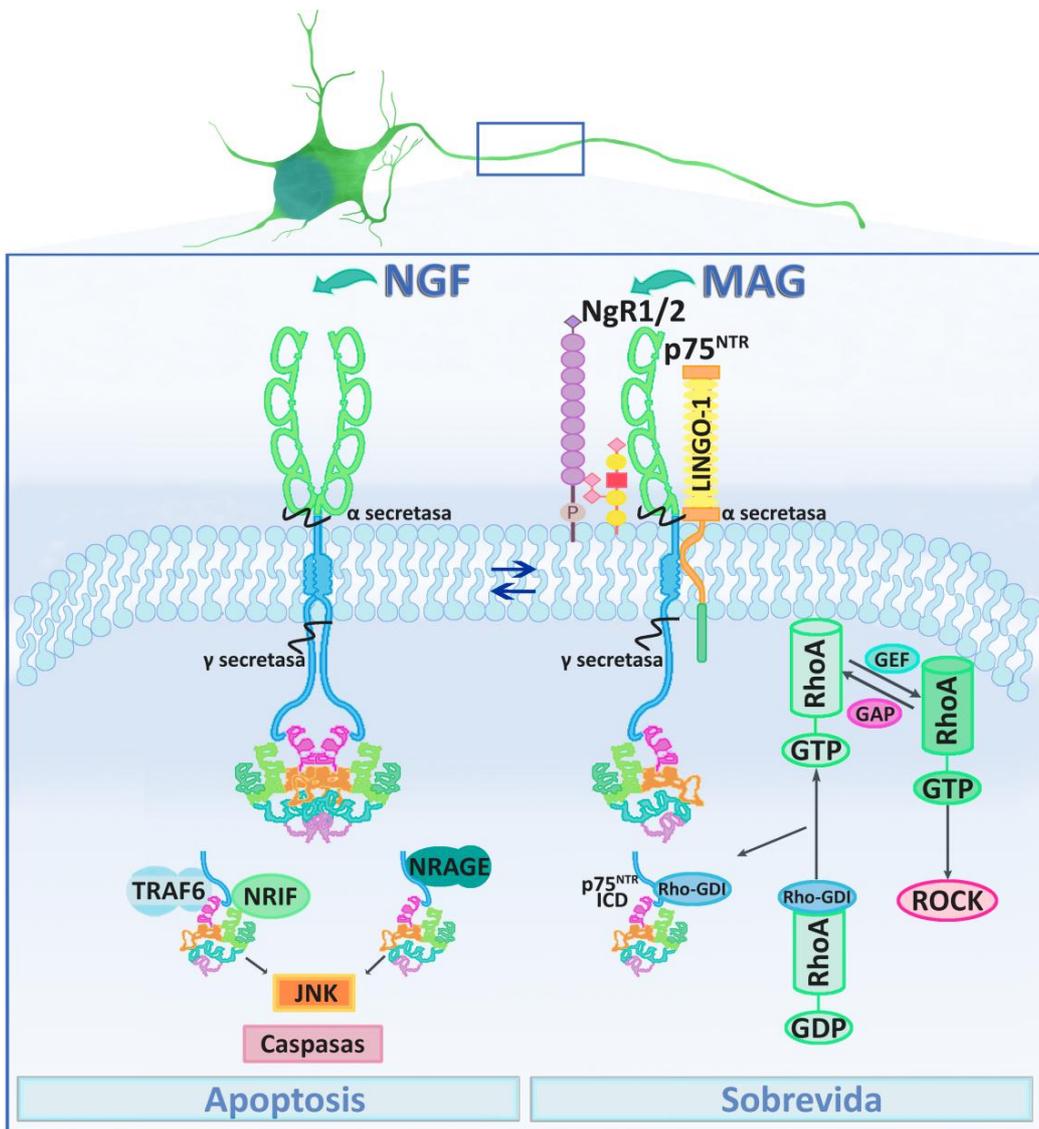
(Harrington y col., 2002; Yamashita y col., 1999). Si esto es correcto, entonces MAG podría modular la apoptosis de MNs a través de dos mecanismos independientes, interaccionando directamente con el receptor multimérico y atenuando la activación pro-apoptótica inducida por NGF a través la forma homodimérica del $p75^{NTR}$. De acuerdo a esto, dicha interpretación podría extenderse a lo observado en nuestros resultados, donde el nivel de apoptosis dependiente del receptor $p75^{NTR}$ inducido por NGF, no mostró cambios significativos entre las MNs infectadas con la secuencia control y las células infectadas con las partículas lentivirales shNgR1 y shNgR2, lo cual argumenta en contra de la existencia de un mecanismo de competencia. Aunque esta cuestión va más allá de los objetivos de esta tesis, los trabajos futuros podrían aclarar de qué manera los diferentes ligandos del receptor $p75^{NTR}$ generan diferentes respuestas de señalización.

Por último, se conoce que el receptor $p75^{NTR}$ puede contribuir a la degeneración de MNs durante la progresión neurodegenerativa de la enfermedad humana Esclerosis lateral amiotrófica familiar (FALS, por sus siglas en inglés) una forma hereditaria predominante de ALS. Esta enfermedad se caracteriza por la atrofia y degeneración de las MNs alfa de la médula espinal, que controlan los músculos de las extremidades, el habla, la deglución y la respiración. Mientras que el receptor $p75^{NTR}$ es regulado negativamente en MNs de la médula espinal durante el periodo perinatal, la re-expresión de este receptor fue detectada en MNs en un modelo animal de ALS como así también en muestras de médula espinal de pacientes humanos con ALS (Lowry y col., 2001b). Asimismo, la protección desencadenada por el receptor NgR contra la muerte celular programada inducida por $p75^{NTR}$ también podría jugar un rol importante en las enfermedades que involucran a las MNs. En la ALS, los astrocitos reactivos que generan NGF, producen la degeneración de MNs que expresan $p75^{NTR}$. De manera interesante, en cultivos de médula espinal de ratones transgénicos que expresan una variante mutante para el gen que codifica la enzima superóxido dismutasa SOD1, se observa un incremento en la muerte de MNs el cual puede ser prevenido por el tratamiento con NGF o con anticuerpos bloqueantes de $p75^{NTR}$ (Lowry y col., 2001a).

Por otro lado, este receptor fue implicado en la degeneración de MNs asociada a la ALS a través del estudio en animales transgénicos $p75^{NTR}$ Knock-down,

con una interrupción del exón 3 del p75^{NTR} que inhibe la unión de neurotrofinas, sin perturbar la señalización intracelular del receptor (Turner y col., 2003). Cuando los ratones SOD1^{G93A} se cruzaron con los ratones p75^{NTR} knock-down, la supervivencia prolongada fue solamente detectada en los ratones hembras, y esta mejora no se correlacionó con el aumento de la supervivencia de MNs, pero sí con una astrocitosis reducida (Küst y col., 2003). Asimismo, la mutación SOD1 representa una fracción muy pequeña de pacientes con ALS, por lo tanto, en el contexto de esta enfermedad la clarificación de los mecanismos por los cuales el receptor p75^{NTR} es regulado positivamente y activado durante estas condiciones patológicas, requieren de una mayor investigación pudiendo desencadenar una importancia terapéutica crítica.

Finalmente, los resultados obtenidos en esta tesis nos permiten identificar a MAG como un modulador de la apoptosis de MNs durante el desarrollo postnatal temprano, actuando como un ligando funcional de los receptores NgR1 y NgR2, mediante la activación de la vía de señalización RhoA/ROCK en forma dependiente del receptor de baja afinidad para neurotrofinas p75^{NTR}. Estas evidencias nos permiten proponer además un modelo caracterizado por la presencia de mecanismos antagónicos del receptor p75^{NTR} que involucra la activación de una vía pro-apoptótica inducida por NGF y una vía anti-apoptótica desencadenada por MAG en MNs.



Conclusiones

Los resultados obtenidos durante esta tesis, nos permiten identificar a MAG como un componente regulador de la apoptosis de MNs durante el desarrollo; junto con el establecimiento de los receptores y vías de señalización involucrados en dicho efecto. Al mismo tiempo, se pone en evidencia el efecto protector que la mielina ejerce en la sobrevivencia de MNs durante el desarrollo postnatal temprano, relacionado al inicio del proceso de mielinización.

Entre los aportes de este trabajo, podemos señalar el efecto pro-sobrevivencia de MAG durante el desarrollo postnatal de MNs, actuando como un ligando funcional de los receptores NgR1 y NgR2 en forma dependiente de la activación del receptor de baja afinidad para neurotrofinas p75^{NTR}.

Por otro lado, consideramos que debido a las características fenotípicas observadas en el ratón *Mag*-null, éste representa un modelo válido y sumamente interesante para el estudio del rol modulador de MAG en otras poblaciones neuronales del sistema nervioso (ver apéndice).

Nuestros hallazgos añaden una función importante al espectro de respuestas biológicas mediadas por el receptor p75^{NTR}. Hemos demostrado que en MNs la activación de los receptores NgRs antagoniza la apoptosis dependiente de p75^{NTR}, pudiendo identificar un mecanismo que involucra la activación de una vía pro-sobrevivencia del receptor p75^{NTR} inducido por MAG, poniendo de manifiesto diferentes efectos biológicos en respuesta a la activación de dicho receptor en MNs.

Por otra parte, nuestros resultados apoyan fuertemente un efecto protector inducido por MAG sobre las MNs ejercido a través de la activación de la GTPasa pequeña RhoA y la quinasa asociada a Rho, ROCK. Más interesantemente, se pone en evidencia que la actividad de RhoA está regulada por un mecanismo dependiente del receptor p75^{NTR}. Estos datos permiten resaltar que la unión de MAG al complejo

NgRs/p75^{NTR} resulta en la protección de MNs a través de la activación de la vía de señalización RhoA/ROCK.

Por último, los resultados de este trabajo permiten enfatizar la importancia de la interacción entre la membrana axonal y la capa de mielina más interna en la supervivencia de MNs durante el desarrollo postnatal, aún antes de haber culminado el proceso de mielinización. En conjunto estas evidencias contribuyen a desenmascarar nuevos mecanismos fisiológicos de protección neuronal que a futuro puedan contribuir al desarrollo de nuevas terapias neuroprotectoras para combatir la degeneración neuronal asociada a enfermedades desmielinizantes.

Apéndice

En este apartado se describirán resultados que si bien no formaron parte del objetivo general de la tesis doctoral, responden a una pregunta que se desprende de los hallazgos iniciales. Estos resultados permitieron confirmar el rol de la mielina sobre el neurodesarrollo postnatal, y la apertura de una nueva línea de trabajo experimental que necesita ser desarrollada con mayor profundidad.

A.1. INTRODUCCIÓN.

A.1.1. Generalidades.

El proceso de mielinización posee un rol estabilizador sobre los axones que envuelve; ésta y otras funciones sugieren una intensa comunicación molecular entre la membrana axonal y la capa de mielina más interna. La evidencia actual está dirigida al estudio de la interacción de diversos complejos ligando-receptor capaces de generar una cascada de señalización intracelular que se traduce en cambios en la fisiología neuronal (Schnaar y Lopez, 2009). La Glicoproteína asociada a mielina (MAG), es uno de los principales componentes de mielina que media estos efectos; el interés en su estudio se incrementó cuando esta proteína fue identificada como uno de los principales inhibidores de la regeneración axonal derivados de mielina (Schnaar y Lopez, 2009).

A continuación, un nuevo rol neuroprotector de MAG fue descrito, tanto en modelos *in vivo* como en ensayos *in vitro*; estos resultados evidenciaron que el efecto de MAG sobre neuronas no se limita al axón, con el cual interacciona directamente, sino que dicha interacción puede proteger también al cuerpo neuronal (Lopez y col., 2011; Mehta y col., 2010; Nguyen y col., 2009). MAG se une a sus receptores axonales para ejercer sus efectos sobre neuronas; se han descrito al presente diversos receptores, entre los que se encuentran los gangliósidos GD1a y GT1b, PirB, β -1 integrina y los receptores Nogo (NgRs). Con respecto a éstos últimos, se conoce que en

la membrana axonal los receptores NgRs forman parte de un complejo receptor de transducción, que incluye el receptor de neurotrofinas p75^{NTR} y LINGO-1 (Mi y col., 2004; Wang y col., 2002; Wong y col., 2002). Se conoce que la unión de MAG al complejo receptor NgRs/LINGO-1 desencadena su unión a p75^{NTR}, lo que se traduciría en la activación de la GTPasa pequeña RhoA, la cual posee la capacidad de regular diversas funciones celulares (Domeniconi y col., 2005).

Resultados de nuestro laboratorio nos permitieron identificar a MAG como uno de los ligandos naturales de los receptores NgRs capaz de modular la muerte celular programada de motoneuronas (MNs) de la médula espinal, durante el desarrollo postnatal temprano; este efecto es dependiente del receptor p75^{NTR}, y converge en la activación de la vía de señalización de RhoA/ROCK. Sobre la base estos antecedentes, decidimos preguntarnos si el rol protector de MAG estaría restringido a las MNs de la médula espinal, o podría generalizarse a otras poblaciones neuronales del cerebelo que se diferencian postnatalmente.

A.1.2. Neuroanatomía del cerebelo.

El cerebelo de los mamíferos se encuentra en la fosa craneal posterior y es crítico para la coordinación motora y funciones no motoras incluyendo procesos cognitivos y emocionales (Marzban y col., 2015). La estructura anatómica del cerebelo consta de diez lóbulos; y contiene relativamente pocos tipos de células que son agregados en la materia gris del cerebelo, incluyendo la corteza y el núcleo cerebelar (Marzban y col., 2015). La corteza cerebelar está formada por tres capas: la capa granular interna (IGL, por sus siglas en inglés) que contiene las células granulares (CGs); una monocapa de células de Purkinje y glía de Bergman (GB); y finalmente, una capa molecular que comprende las dendritas de las células de Purkinje, axones de las CGs, fibras de la GB e interneuronas inhibitorias (Mulherkar y col., 2014).

Las células de Purkinje, las cuales son GABAérgicas, son las principales neuronas de la corteza cerebelar con una elaborada arborización dendrítica; nacen en la zona ventricular (ZV) y migran radialmente en el interior del cerebelo. En contraste, los precursores de las CGs (GCPs, por sus siglas en inglés) surgen de la zona germinal en el labio rómbico (RL, por sus siglas en inglés) y migran tangencialmente para formar

la capa de células granulares externa (EGL, por sus siglas en inglés), donde ellas continúan proliferando. Las CGs son neuronas glutamatérgicas y abandonan el ciclo celular postnatalmente, migrando a lo largo de las fibras de la GB pasando por las células de Purkinje a la IGL (Mulherkar y col., 2014) (Figura A1). Es decir, durante el desarrollo postnatal temprano, los CGPs en la zona exterior de la EGL se encuentran proliferando, luego salen del ciclo celular, se diferencian y migran a través de la capa molecular (ML), pasando por las células de Purkinje a su destino final, la IGL (Borghesani y col., 2002).

Las CGs del cerebelo son las más pequeñas y más abundantes de las neuronas en el cerebro de los vertebrados, lo que representa alrededor del 80% del total de las neuronas en el cerebro humano (Marzban y col., 2015). Es importante destacar que el crecimiento y la foliación del cerebelo dependen de la producción y migración de las CGs. Estos pasos deben estar bien regulados para que el cerebelo se pliegue correctamente; sin embargo, poco se conoce acerca de las vías de señalización que regulan estos procesos.

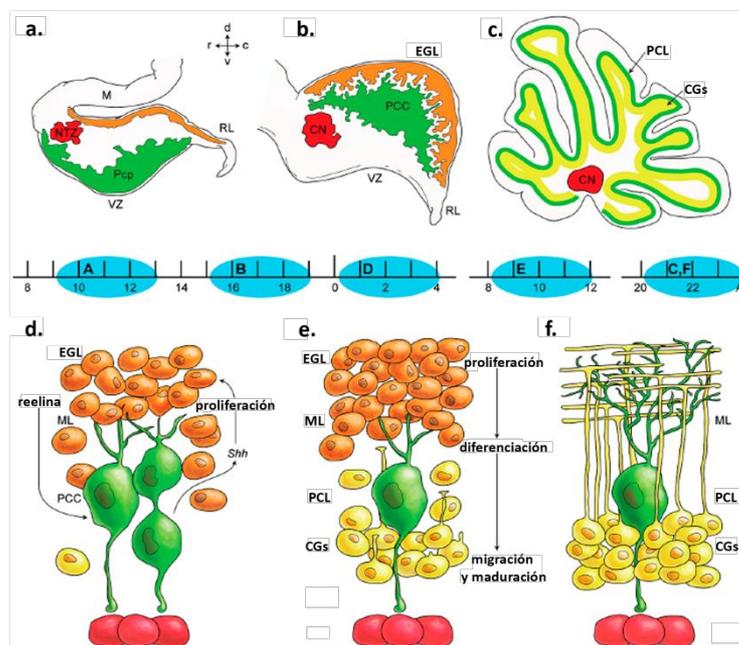


Figura A1: Capas germinales en el desarrollo del cerebelo (a-c): Esquema ilustrativo de los parámetros espacio-temporales de secciones sagitales del cerebelo durante el desarrollo temprano (día embrionario 10-13 (E10–E13) (A); E16–E17 (B); día postnatal 2 (P2) (D) y adulto (C,F). El neuroepitelio del cuarto ventrículo (zona ventricular (VZ)) está formado por todas las neuronas GABAérgicas incluyendo a las células de Purkinje (verde); el labio róbico (RL) está formado por las neuronas

glutamatergicas que incluyen las neuronas del núcleo cerebelar (rojo) y la capa granular externa (naranja; EGL). **(d-f)** Esquema ilustrativo de los parámetros espacio-temporales de la corticogénesis en la cual las células de Purkinje en clúster se dispersan en la monocapa y forman la capa granular. Se muestran además dibujos esquemáticos de la corteza cerebelar alrededor de P4 **(D)**, P10 **(E)**, y en adulto **(F)**. Las células de Purkinje (verde) expresan Shh que aumenta la actividad de las células de la EGL (precursores de las células granulares, PCG). Las células granulares diferenciadas y la migración en cruz de la capa de células de Purkinje es el destino final; la capa granular y el desarrollo de las CGs se completa con la maduración de esta capa. Abreviaturas (por sus siglas en inglés): **PCC**: clúster de células de Purkinje; **PCP**: precursores de células de Purkinje; **PCG**: precursores de células granulares; **M**: mesencéfalo; **RL**: labio rómbico; **CGs**: células granulares; **EGL**: capa granular externa; **NTZ**: zona transitoria nuclear; **A**: Adulto; **PCL**: capa de células de Purkinje; **ML**: capa molecular. Modificado de Marzban y col., 2015.

La familia de las Rho-GTPasas (RhoA, Rac1) se han descrito como componentes reguladores de la migración celular y morfogénesis, jugando un rol fundamental en el desarrollo del cerebelo. Las Rho GTPasas son activadas por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs, por sus siglas en inglés) e inactivadas por proteínas que activan GTPasas (GAPs, por sus siglas en inglés). Curiosamente, la supresión de determinados GEFs, GAPs y Rac1 en ratón, producen defectos del cerebelo. Sumado a esto, una delección de RhoA en los CGPs, produce un retraso y anomalías en la morfogénesis del cerebelo que incluyen defectos en la foliación, laminación y migración, lo que sugiere que la función de RhoA es requerida por los GCPs en el cerebelo (Mulherkar y col., 2014). Estas observaciones apoyan la idea de un importante rol de la señalización de las Rho GTPasas durante el desarrollo del cerebelo.

La corteza cerebelosa es una de las regiones más estudiadas, ya que es un modelo muy adecuado para el estudio de los factores que controlan la diferenciación neuronal y apoptosis. En particular, las células CGs, han sido ampliamente utilizadas para el estudio de los efectos neurotróficos o neurotóxicos de varios factores (Vaudry y col., 2003). El cerebelo se desarrolla esencialmente durante el período postnatal (Doretto y col., 2011), correlacionándose con el proceso de mielinización; y por lo tanto, representa un interesante modelo para abordar la posible participación de MAG en su desarrollo. Nuestras observaciones, en primer lugar, estuvieron dirigidas a la

caracterización de la estructura del cerebelo en ratones deficientes de MAG, con el fin de determinar el impacto de MAG en el desarrollo postnatal del cerebelo.

A.2. MATERIALES Y MÉTODOS

A.2.1. Histología del cerebelo y cuantificación del número de neuronas.

Ratones *Mag*-null, triple *NgR*-null y *Wt* fueron anestesiados con una sobredosis de hidrato de cloral (0,1 ml/100g) y luego de comprobarse que estos se encontraban profundamente anestesiados mediante la ausencia de reflejos flexores, fueron perfundidos transcárdicamente con el fin de fijar el cerebro. Para esto, en primer lugar, los animales fueron perfundidos con una solución de buffer fosfato salino (PBS, 145 mM NaCl, 90 mM Na₂HPO₄ y 13 mM NaH₂PO₄) con el fin de remover toda la sangre del sistema, seguido de una solución fijadora de 4% de paraformaldehído (Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich Lab GmbH, Seelze, Alemania) en buffer fosfato (0,1M, pH 7,4). El cerebro fijado permaneció durante 24 horas a 4°C en solución de paraformaldehído al 4% y luego fue colocado en una solución de sacarosa al 30% durante 72 horas. Posteriormente, el cerebro fue embebido en medio de montaje para congelación (Biopack). Secciones seriadas de cerebro de 5, 20 y 30 µm de espesor fueron obtenidas usando un criostato (Reicher-Jung Hn40, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

Las secciones fueron lavadas tres veces en buffer KPBS (137mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl y 2mM KH₂PO₄) para remover los restos de fijador, y luego fueron teñidas con violeta de cresilo. A continuación, las secciones fueron deshidratadas en una solución de xileno y se montaron mediante el medio de montaje DPX (Fluka, Biochemika, Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Alemania). Las imágenes fueron adquiridas usando un microscopio óptico (Zeiss, Alemania) equipado con una video cámara Leica LC200, objetivo de aire 20x m 1.42 NA. La cuantificación del número de células y el análisis morfométrico se realizó utilizando el programa Fiji.

A.2.2. Inmunofluorescencia.

Las secciones de cerebro ya fijadas fueron lavados tres veces con PBS. Luego, los cortes fueron incubados durante 2 horas a temperatura ambiente en un buffer de bloqueo conteniendo 5% de suero normal equino (SNE), 0.1% Triton X-100 en buffer PBS. Seguido de esto, las secciones fueron transferidas directamente a una solución conteniendo un anticuerpo contra neurofilamentos fosforilados 2H3 (Abcam, Cambridge, MA, US) diluido 1:1000 en 1% de SNE, 0.05% Triton X-100 en PBS durante 24 h a 4°C, en agitación suave. A continuación, las secciones se lavaron 3 veces con PBS y se colocaron 2 horas en una solución de 1% SNE, 0,05% Triton X-100 en PBS, conteniendo 1:500 del anticuerpo Cy3-goat anti-mouse (Jackson, West Grove, PA, US). Los tejidos se montaron usando el medio de montaje Krystalon (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

A.2.3. Cuantificación por inmunofluorescencia de la incorporación de BrdU.

Para el estudio del estado de proliferación celular, los ratones Wt fueron administrados con una inyección intraperitoneal (i.p.) con 50 µg del anticuerpo monoclonal anti-MAG (clon 513) o IgG control (1 mg/ml) a los días 3, 4, 5 y 6 postnatales. Sumado a esto, se les aplicó una dosis de 5-Bromo-2'-deoxyuridina (BrdU, 50 mg/kg de peso corporal, Sigma), diluido en solución salina al día 4 postnatal. Cinco días posteriores al tratamiento con BrdU, los animales fueron perfundidos, el cerebelo fue removido y posteriormente procesado para la cuantificación del número de células de Purkinje y granulares.

A.2.4. Inmunocitoquímica para BrdU.

Las secciones de cerebro ya fijadas fueron lavados tres veces con PBS. Luego, los cortes fueron incubados durante 20 min a 37°C con HCl 2N con el fin de desnaturalizar el ADN. Luego, las secciones fueron neutralizadas para restituir el pH con Borato de Sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) 0.1M, pH 9, durante 15 minutos a 37 °C. Seguido a esto, los cortes fueron incubados durante toda la noche en un buffer de bloqueo

conteniendo 2% de SNE en buffer PBS; y fueron transferidas directamente a una solución conteniendo un anticuerpo primario contra BrdU (Sigma) diluido 1:500 en 1% de SNE, 0.1% Triton X-100 en PBS durante 24 h a 4°C, en agitación suave. A continuación, las secciones se lavaron 3 veces con PBS y se colocaron 2 horas en una solución de 1% SNE, 0,1% Triton X-100 en PBS, conteniendo 1:000 del anticuerpo Cy2-goat anti-mouse (Jackson, West Grove, PA, US). Los tejidos se montaron usando el medio de montaje Mowiol.

A.3. RESULTADOS

A.3.1. CARACTERIZACIÓN DEL CEREBELO DEL RATÓN *Mag*-null.

A.3.1.1. Los ratones *Mag*-null exhiben un número incrementado de células granulares y células de Purkinje del cerebelo.

Se analizó el área ocupada por las células granulares y el número de células de Purkinje en el cerebelo de ratones *Mag*-null y *Wt*, a los 31 días postnatales. El análisis del área ocupada por las células granulares se realizó mediante el uso del programa Fiji; se seleccionó un área determinada en diferentes imágenes de forma aleatoria sobre cortes seriados de cerebelo teñidos con violeta de cresilo. El análisis de los resultados mediante un ANOVA de una vía ($F(1,47)=215,45$ $p<0,0001$) y el uso del test *a posteriori* de Tukey indicó un aumento estadísticamente significativo del área ocupada por las células granulares en los ratones *Mag*-null, respecto a los animales *Wt* (~40%) (Figura A2a y b). Posteriormente, se analizó el número de células de Purkinje, mediante la cuantificación de las mismas a lo largo de una longitud determinada en diferentes regiones del cerebelo. Se encontró un mayor número de células de Purkinje en los ratones *Mag*-null, respecto a los ratones *Wt* a los 31 días postnatales (~60%) ($F(1,26)=58,79$ $p<0,001$) (Figura A2a y c). En este experimento se utilizaron en total 3 ratones *Mag*-null y 3 *Wt*.

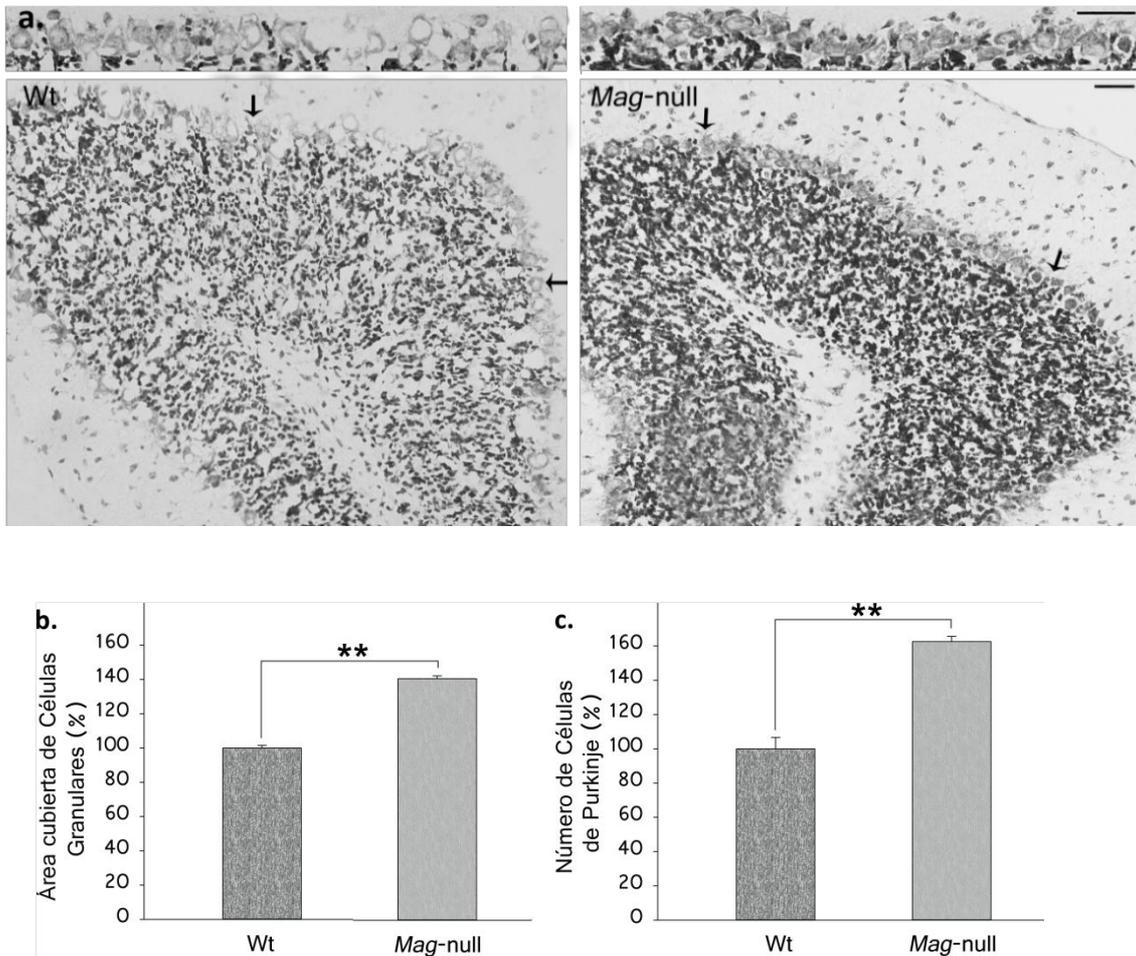


Figura A2: Los ratones *Mag-null* presentan un número incrementado de células granulares y células de Purkinje en el cerebelo. **a.** Fotomicrografías representativas de secciones de 5 µm de espesor de cerebelo de ratones Wt y *Mag-null* a los 31 días postnatales teñidas con violeta de cresilo. Las flechas indican la región aumentada que ocupan las células de Purkinje, la misma se muestra en el margen superior de cada una de las fotomicrografías. Barra de escala: 40 y 60 µm. **b.** Área cubierta de células granulares del cerebelo de ratones Wt y *Mag-null* a los 31 días postnatales. Las barras representan el porcentaje del área cubierta por las células granulares presentes en el cerebelo del ratón Wt respecto al *Mag-null* de la misma edad. Se cuantificó un área determinada usando el programa Fiji en cortes de cerebelo de 30 µm de espesor. Un ANOVA de una vía reveló un efecto del genotipo: ($F(1,47)=215,45$ $p<0,0001$), seguido por el test *a posteriori* de Tukey que indicó diferencias significativas entre ratones *Mag-null* y Wt a los 31 días postnatales ($p<0,0001$). Las barras de error representan el error estándar de la media ** $p<0,01$. Wt: $n=3$, *Mag-null*: $n=3$. **c.** Número de células de Purkinje del cerebelo de ratones Wt y *Mag-null* a los 31 días postnatales. Cada barra representa el porcentaje del número de células de Purkinje de los ratones Wt respecto a los *Mag-null*. Se cuantificó el número de células a lo largo de una longitud determinada usando el programa Fiji en cortes de cerebelo de 5 µm de espesor. El análisis estadístico indica diferencias significativas en el número de células de Purkinje en el ratón *Mag-null*

respecto al Wt (ANOVA de una vía; $F(1,26)=58,79$ y test de Tukey $p<0,0001$). Wt: $n=3$, *Mag*-null: $n=3$. Las barras de error representan el error estándar de la media; $**p<0,01$.

Sumado a esto, observamos que la ausencia de MAG, promueve un efecto en las fibras nerviosas del cerebelo, detectados por una fuerte inmunoreactividad para un anticuerpo contra neurofilamentos, 2H3 (Figura A3). El análisis de secciones de cerebelo de ratones *Mag*-null, a los 31 días postnatales, muestra la presencia de múltiples fibras en el cerebelo respecto a los ratones Wt, sugiriendo una mayor ramificación de las fibras nerviosas. De manera interesante, la pérdida de oligodendrocitos al día 1 postnatal en ratón, produce una inmediata reacción en las fibras nerviosas cerebelares, detectada por una fuerte inmunoreactividad con el mismo anticuerpo anti-neurofilamentos (Doretto y col., 2011).

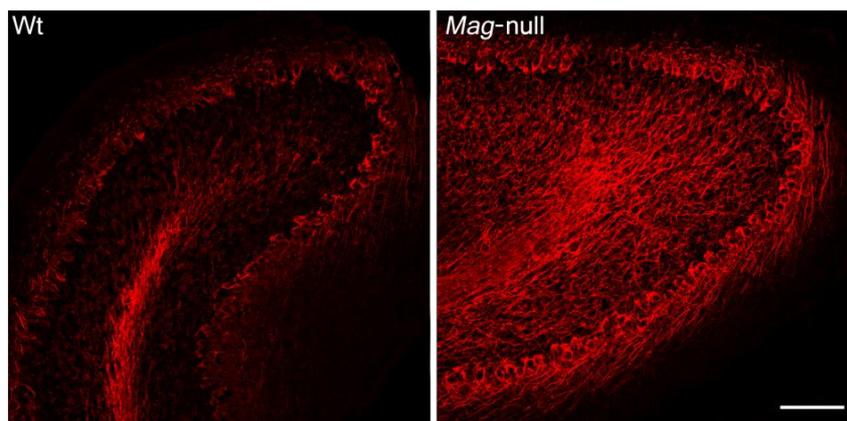


Figura A3: Los ratones *Mag*-null presentan una mayor inmunoreactividad para neurofilamentos en el cerebelo. Fotomicrografías representativas de cortes de cerebelo de ratones Wt y *Mag*-null a los 31 días postnatales; se muestra una inmunotinción con el anticuerpo contra neurofilamentos, 2H3. Se observa una mayor marcación para 2H3 en el cerebelo de ratones *Mag*-null (panel derecho) comparado con los ratones Wt (panel izquierdo). Barra de escala, 70 μ m.

Seguido a esto, con el fin de determinar si este incremento en el número de neuronas del cerebelo observado al día 31 postnatal, se correlaciona con un aumento del número de neuronas en la vía de muerte; se realizaron estudios de inmunohistoquímica para un marcador de degeneración neuronal (Fluoro Jade C, FJC) en secciones de cerebelo de ratones Wt y *Mag*-null.

El número de neuronas en degeneración en los ratones *Mag*-null, se encuentra muy incrementada durante el desarrollo postnatal (Figura A4). Sumado a esto, las células positivas para FJC se encuentran localizadas en la EGL y en la capa molecular en el cerebelo de ratones *Mag*-null a los 31 días postnatales (Figura A4).

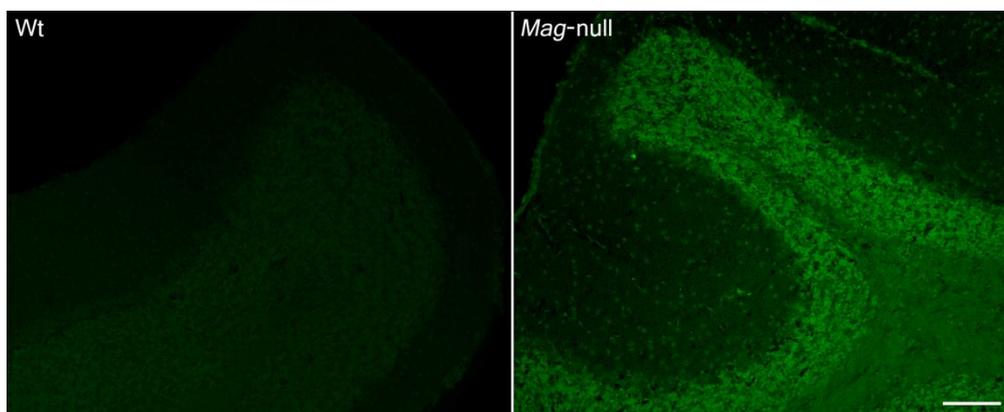


Figura A4: Los ratones *Mag*-null presentan mayor cantidad de neuronas granulares en degeneración. Fotomicrografías representativas de cortes de cerebelo de ratones Wt y *Mag*-null a los 31 días postnatales; se muestra una tinción inmunohistoquímica para Fluoro Jade C, que reconoce neuronas en degeneración. Se observa una mayor inmunoreactividad para FJC en el cerebelo de ratones *Mag*-null (panel derecho) comparado con los ratones Wt (panel izquierdo). Barra de escala, 100 μ m.

A continuación, decidimos evaluar el cerebelo de ratones que portan una delección de los receptores NgR1, NgR2 y NgR3 (triple NgR-null), con el fin de estudiar la participación de los receptores NgRs en el desarrollo del cerebelo. Las células de Purkinje presentes en cerebelo de ratones Wt y triple NgR-null de 3 meses de edad fueron cuantificadas. Como se observa en la Figura 5, las preparaciones histoquímicas de cortes transversales de cerebelo de 20 μ m de espesor teñidas con violeta de cresilo, muestran un marcado incremento en el número de células de Purkinje en los ratones triple NgR-null comparados con los ratones Wt. Estos resultados reflejan la relevancia *in vivo* del rol de los receptores NgRs en la regulación de la proliferación y/o diferenciación de la población de células de Purkinje del cerebelo.

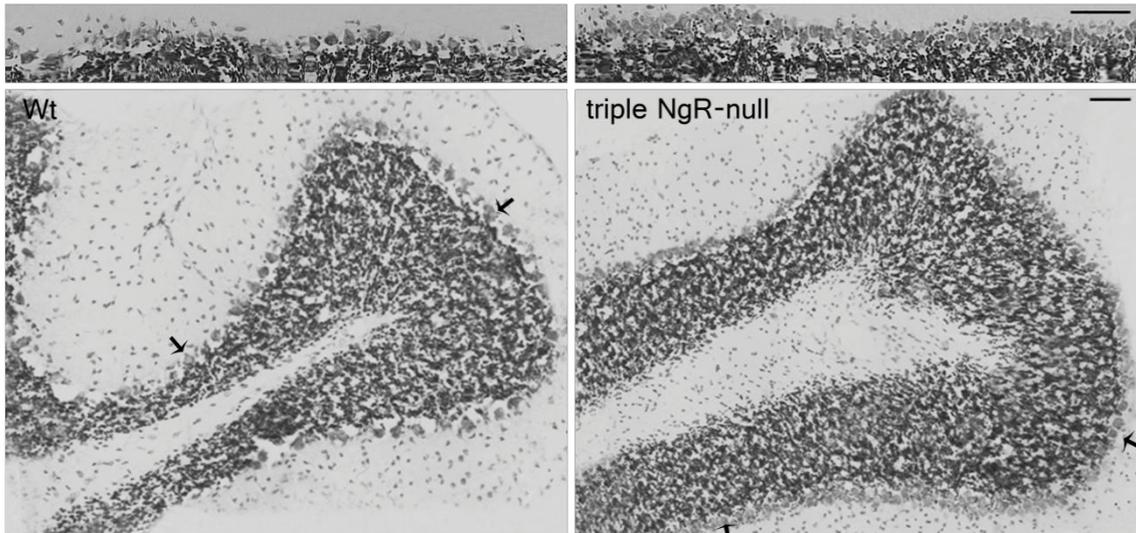


Figura A5: Los ratones triple NgR-null presentan un número aumentado de células de Purkinje en el cerebelo. Fotomicrografías representativas de secciones de 20 μm de espesor de cerebelo de ratones Wt y triple NgR-null a los 3 meses de edad teñidas con violeta de cresilo. Las flechas indican la región aumentada que ocupan las células de Purkinje, la misma se muestra en el margen superior de cada una de las fotomicrografías. Barra de escala: 40 y 60 μm .

A.3.1.2. El tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-MAG (clon 513) bloqueante de función, induce el fenotipo del ratón *Mag*-null en el cerebelo.

En primer lugar, decidimos estudiar si el tratamiento con el anticuerpo anti-MAG (clon 513) era capaz de reproducir el fenotipo del ratón *Mag*-null, en un modelo *in vivo*. Teniendo esto en cuenta, decidimos evaluar los efectos del tratamiento con el anticuerpo 513 o un anticuerpo IgG control sobre el número de neuronas del cerebelo en los ratones Wt. Para esto, tratamos a los ratones con 4 dosis i.p. con 50 μg del anticuerpo 513 e IgG humana (IVIg) como control, a los días postnatales 3, 4, 5 y 6. Los animales fueron fijados al día 11 postnatal. En este experimento se utilizaron 3 ratones para cada grupo.

Como se observa en la figura A6, en los animales Wt la administración i.p. del anticuerpo 513 produjo un aumento estadísticamente significativo del número de células granulares del cerebelo, medida como área cubierta, con respecto a los que recibieron el tratamiento con IgG control ($F(1,87)=39,41$ $p<0,0001$). La observación de las secciones de cerebelo teñidas con violeta de cresilo, permiten visualizar además, un

claro incremento en las células de Purkinje en los ratones tratados con el anticuerpo 513, respecto a los controles; pero su cuantificación requerirá de la realización de cortes seriados con un menor espesor, y la utilización de marcadores específicos para este tipo neuronal.

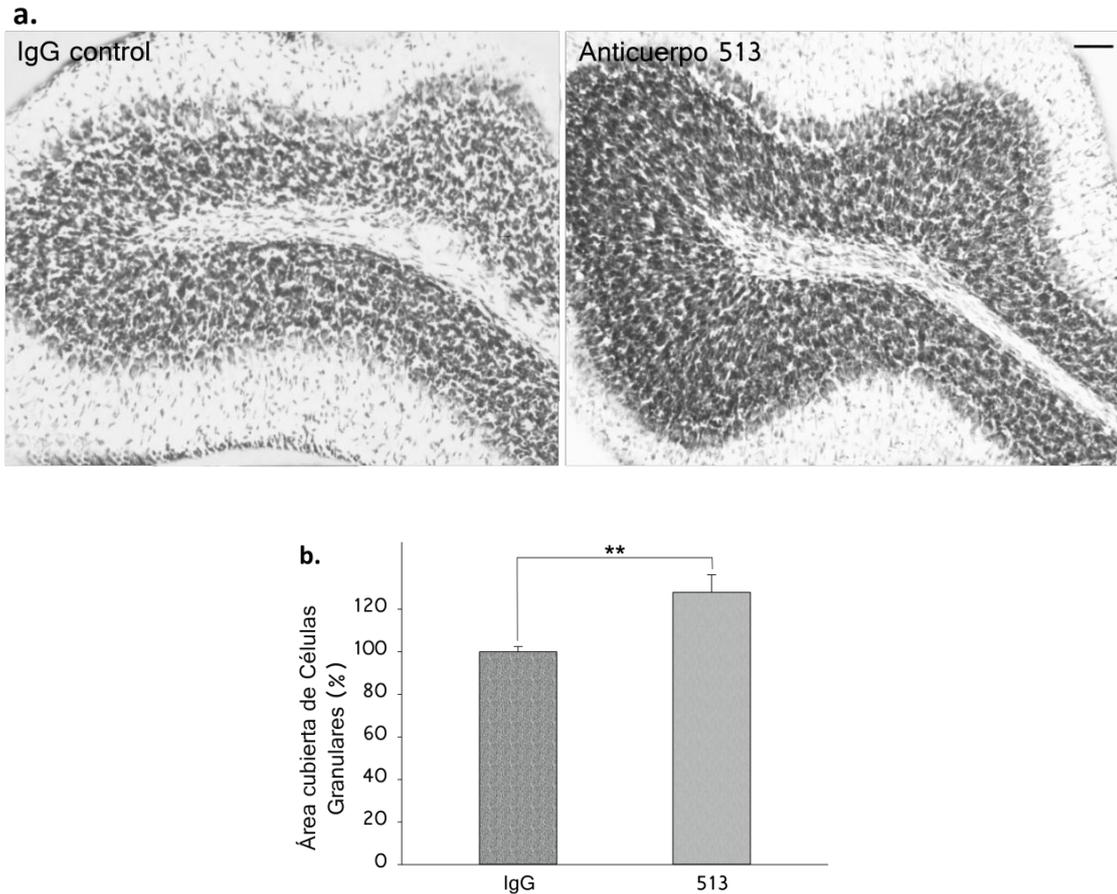


Figura A6: Efecto del tratamiento con el anticuerpo anti-MAG (clon 513) en un modelo animal sobre el número de neuronas del cerebelo. a. Fotomicrografías representativas de secciones de 30 μm de espesor de cerebelo de ratones Wt de 11 días de edad, tratados con una inyección i.p. del anticuerpo 513 o IgG control teñidas con violeta de cresilo. Barra de escala: 40 μm . **b.** Área cubierta de células granulares del cerebelo de ratones Wt tratados con el anticuerpo 513 e IgG control. Las barras representan el porcentaje del área cubierta por las células granulares presentes en el cerebelo del ratón tratado con IgG respecto al tratado con el anticuerpo 513. Se cuantificó un área determinada usando el programa Fiji en cortes de cerebelo de 30 μm de espesor. Un ANOVA de una vía reveló un efecto del genotipo: ($F(1,87)=39,41$ $p<0,0001$), seguido por el test *a posteriori* de Tukey que indicó diferencias significativas entre ratones con los diferentes tratamientos a los 11 días postnatales ($p<0,0001$). Las barras de error representan el error estándar de la media $**p<0,01$. IgG control: $n=3$, Ab. 513: $n=3$.

Aunque el tejido nervioso está fundamentalmente constituido por células postmitóticas no proliferantes, el análisis de la proliferación celular en estos tejidos es importante teniendo en cuenta principalmente que estos eventos de proliferación han sido ampliamente caracterizados, no sólo durante el desarrollo embrionario, sino también en varias áreas del cerebro postnatal y adulto.

La observación directa de las células mitóticas en secciones de tejido es insuficiente para una correcta estimación del índice de proliferación (porcentaje de células que se dividen) debido a la corta duración de la fase M del ciclo celular. El más reciente método utilizado para marcar las células en proliferación se basa en la visualización directamente *in situ* de ciertas moléculas que son expresadas durante las diferentes fases del ciclo celular una vez que la célula está en división, y por lo tanto se consideran como marcadores específicos de la proliferación celular. Se utilizan nucleótidos marcados radiactivamente o análogos de nucleótidos tales como el 5-Bromo-2'-deoxyuridina (BrdU), que es específicamente incorporado en el ADN; posteriormente, las células proliferando se visualizan por inmunofluorescencia. Este método es altamente específico y permite una identificación precisa de la proliferación celular y una correcta estimación del índice de proliferación (Merighi y Carmignoto, 2002).

Teniendo en cuenta esto, procedimos a la inyección i.p. de BrdU al día 4 postnatal en los ratones Wt, ya que se ha descrito que el pico de proliferación de células en la EGL es al día 8 postnatal (Fujita y col., 1966). Además, los animales fueron tratados con el anticuerpo anti-MAG e IgG control. Los resultados de la tinción con un anticuerpo anti-BrdU, muestran un gran número de células proliferando en secciones de cerebelo de ratones tratados con el anticuerpo 513, respecto a los tratados con IgG control (Figura 7). La zona que se encuentra con alta reactividad para el anti-BrdU, corresponde a células que se encuentran en la IGL y se distribuyen al azar en esta capa, mostrando un anormal patrón de migración. Estudios adicionales serán necesarios para mostrar la colocalización de estas células con un marcador específico de CGs del cerebelo.

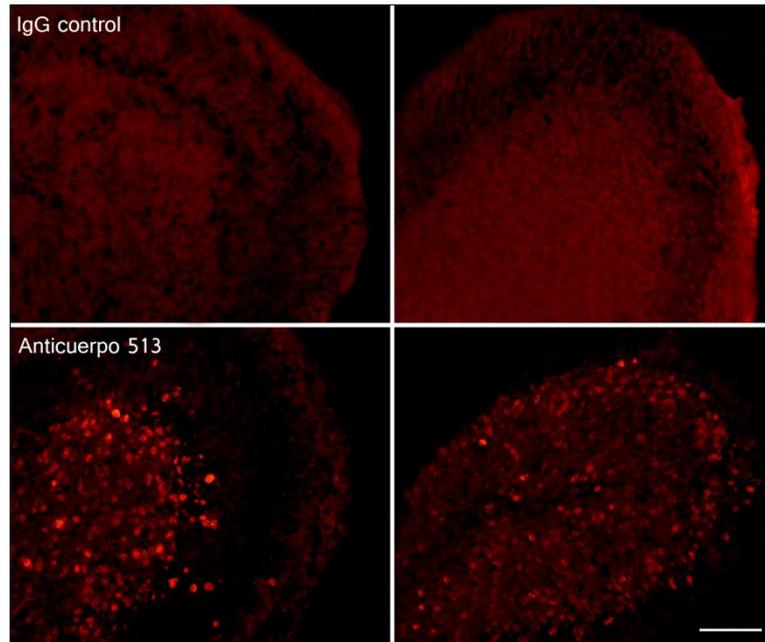


Figura A7: Efecto del tratamiento con el anticuerpo anti-MAG (clon 513) en un modelo animal sobre la proliferación celular del cerebelo. Los ratones Wt fueron administrados con una inyección i.p. del anticuerpo 513 o IgG control a los días postnatales 3, 4, 5 y 6. Además, se les aplicó una dosis de BrdU (50mg/Kg), un marcador de proliferación celular al día 4 postnatal. Las células de la región del cerebelo fueron visualizadas al día 11 postnatal. Se muestran fotomicrografías representativas de secciones de cerebelo ratones Wt inyectados con el anticuerpo 513 (panel inferior) o IgG control (panel superior), con una tinción para un anticuerpo anti-BrdU. Barra de escala, 50 μ m.

A.4. DISCUSIÓN

El desarrollo del cerebelo es un proceso exquisitamente ordenado que produce una estructura en capas y contiene, básicamente, tres tipos neuronales, las células granulares, células de Purkinje e interneuronas (Peng y col., 2010). La abundancia de una de estas principales neuronas, las células granulares, ha permitido un análisis detallado de los mecanismos moleculares que subyacen a la diferenciación neuronal y el desarrollo del SNC (Hatten y Heintz, 1995).

Recientemente, hemos descrito un nuevo rol protector de MAG durante el desarrollo postnatal de MNs de la médula espinal; sin embargo, poco se conoce acerca del papel que esta proteína puede ejercer sobre otras poblaciones neuronales del sistema nervioso, que se diferencian postnatalmente. En relación a esto, las neuronas

del cerebelo se diferencian durante el período postnatal en humanos y roedores; y esto tiene una correlación directa con el proceso de mielinización. Si bien la función e importancia fisiológica de MAG en el cerebelo no ha sido definida, aquí nosotros proporcionamos algunas evidencias que sugieren un nuevo rol de MAG durante el desarrollo del cerebelo.

En primer lugar, nuestros resultados muestran que ratones deficientes de MAG, presentan alteraciones en el número de neuronas del cerebelo. Se detectaron un número incrementado de células de Purkinje, así como también un número aumentado de células granulares que se encuentran en contacto con los haces de las fibras de Purkinje, indicando múltiples cambios en la estructura y desarrollo del cerebelo de los ratones *Mag*-null.

Por otro lado, la importancia de MAG se ve reflejada además, en las observaciones del cerebelo del ratón triple *NgR*-null. Curiosamente, la expresión neuronal de los receptores *NgR* en el cerebelo comienza hacia finales de la etapa prenatal y durante el periodo postnatal temprano (Mingorance-Le Meur y col., 2007); sumado a esto, las alteraciones en el número de células de Purkinje en el ratón triple *NgR*-null, sugieren que los receptores *NgRs* son los responsables de mediar las funciones ejercidas por MAG en el desarrollo del cerebelo.

Un delicado balance entre la proliferación celular y la apoptosis de las células es necesario para un armonioso desarrollo del cerebelo (Vaudry y col., 2003). Gran parte de su desarrollo se produce después del nacimiento en paralelo con la muerte celular masiva (Lossi y Gambino, 2008). Se describió que las células sometidas a la apoptosis en la EGL han sido en su mayoría identificadas como CGs inmaduros y/o sus precursores. La proliferación de la EGL durante las primeras semanas después del nacimiento da lugar a más de 100 millones de células granulares que migran a través de las capas molecular y de células de Purkinje, para llegar a la IGL bajo la guía de la glía radial (Rakic, 1971; Hatten, 1990). Durante los procesos de formación de la IGL, las CGs del cerebelo se someten a profundos cambios morfológicos, incluyendo la generación y extensión de neuritas, proceso que está estrechamente acoplado con la migración guiada de las CGs. La inducción del fenotipo *Mag*-null a través del tratamiento de los ratones con el anticuerpo anti-MAG; causó defectos en alguno de estos procesos.

Nuestras observaciones en ensayos *in vivo*, indican que la incorporación de BrdU aumenta después del tratamiento con el anticuerpo anti-MAG, encontrando un número incrementado de células que proliferan en la IGL, respecto a los animales controles. Estas observaciones determinan una migración alterada que contribuye a un desarrollo anormal del cerebelo. Por un lado, las células que se encuentran proliferando en la IGL, posiblemente hayan llegado indiferenciadas a esta región; o eventualmente, se han marcado proliferando en la EGL, resultando luego en un mayor número de células marcadas para BrdU en la IGL, al día 11 postnatal. Es por ello, que sería necesario realizar nuevos experimentos dirigidos a la inyección de BrdU a diferentes tiempos. Además, sería importante estudiar si estas células que expresan BrdU, colocalizan con un marcador neuronal para las CGs o CGPs.

Hasta el momento, el presente estudio sugiere que el principal defecto en ratones deficientes de MAG, es en la migración celular de las CGCs. Una adecuada regulación de la migración de los CGPs parece ser necesaria para el desarrollo de múltiples procesos del cerebelo, en el que la vía de señalización mediada por MAG es requerida.

Se conoce que la coordinación de la guía axonal y la migración neuronal, son pasos esenciales en el proceso de desarrollo del cerebelo. Además, se sabe que varias moléculas con funciones de guía convergen en la regulación del citoesqueleto (Peng y col., 2010). En relación a esto, varios estudios sugieren que la pequeña GTPasa RhoA tiene un papel importante en el desarrollo neuronal, que incluye la orientación axonal, la migración, la morfogénesis y la plasticidad neuronal (Luo, 2000; Wong y col., 2001). Sumado a esto, RhoA se encuentra extensamente expresado en la EGL del cerebelo durante el desarrollo, y en las CGs y células de Purkinje del cerebelo adulto. Estudios recientes, demostraron además un importante rol de RhoA en la migración y desarrollo del cerebelo (Mulherkar y col., 2014). Teniendo en cuenta estos antecedentes, y en base a nuestras observaciones podemos sugerir que el rol de MAG estaría mediado por la vía de señalización de RhoA.

Finalmente, sobre la base de nuestros resultados, proponemos a MAG como un componente clave en la regulación de múltiples procesos durante el desarrollo postnatal del cerebelo. En este sentido, nuestras observaciones abren nuevas líneas de investigación que permiten revelar nuevas funciones de MAG en la diferenciación y/o

proliferación de las neuronas del cerebelo, a la vez que realzan el impacto del proceso de mielinización en el desarrollo postnatal de neuronas del SNC.

Bibliografía

Altman, J., and Bayer, S.A. (1984). The development of the rat spinal cord. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* *85*, 1–164.

Amano, M., Fukata, Y., and Kaibuchi, K. (1998). Regulation of Cytoskeleton and Cell Adhesions by the Small GTPase Rho and Its Targets. *Trends Cardiovasc. Med.* *8*, 162–168.

Anastasia, A., Barker, P.A., Chao, M.V., and Hempstead, B.L. (2015). Detection of p75^{NTR} Trimers: Implications for Receptor Stoichiometry and Activation. *J. Neurosci.* *35*, 11911–11920.

Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* *281*, 1305–1308.

Atwal, J.K., Pinkston-Gosse, J., Syken, J., Stawicki, S., Wu, Y., Shatz, C., and Tessier-Lavigne, M. (2008). PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration. *Science* *322*, 967–970.

Aznar, S., and Lacal, J.C. (2001). Rho signals to cell growth and apoptosis. *Cancer Lett.* *165*, 1–10.

Barker, P.A. (2009). A p75^(NTR) pivoting paradigm propels perspicacity. *Neuron* *62*, 3–5.

Bartsch, S., Montag, D., Schachner, M., and Bartsch, U. (1997). Increased number of unmyelinated axons in optic nerves of adult mice deficient in the myelin-associated glycoprotein (MAG). *Brain Res.* *762*, 231–234.

Bartsch, U., Bandtlow, C.E., Schnell, L., Bartsch, S., Spillmann, A.A., Rubin, B.P., Hillenbrand, R., Montag, D., Schwab, M.E., and Schachner, M. (1995). Lack of evidence that myelin-associated glycoprotein is a major inhibitor of axonal regeneration in the CNS. *Neuron* *15*, 1375–1381.

Benson, M.D., Romero, M.I., Lush, M.E., Lu, Q.R., Henkemeyer, M., and Parada, L.F. (2005). Ephrin-B3 is a myelin-based inhibitor of neurite outgrowth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 10694–10699.

Bessou, P., Emonet-Dénand, F., and Laporte, Y. (1965). Motor fibres innervating extrafusal and intrafusal muscle fibres in the cat. *J. Physiol.* *180*, 649–672.

Borghesani, P.R., Peyrin, J.M., Klein, R., Rubin, J., Carter, A.R., Schwartz, P.M., Luster, A., Corfas, G., and Segal, R.A. (2002). BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 1435–1442.

Cafferty, W.B.J., Duffy, P., Huebner, E., and Strittmatter, S.M. (2010). MAG and OMgp synergize with Nogo-A to restrict axonal growth and neurological recovery after spinal cord trauma. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 6825–6837.

Cai, J., Yang, J., and Jones, D.P. (1998). Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim. Biophys.* 1366, 139–149.

Cao, Z., Qiu, J., Domeniconi, M., Hou, J., Bryson, J.B., Mellado, W., and Filbin, M.T. (2007). The Inhibition Site on Myelin-Associated Glycoprotein Is within Ig-Domain 5 and Is Distinct from the Sialic Acid Binding Site. *J. Neurosci.* 27, 9146–9154.

Carter, B.D., and Lewin, G.R. (1997). Neurotrophins Live or Let Die: Does p75NTR Decide? *Neuron* 18, 187–190.

Carter, B.D., Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Offenhäuser, N., Böhm-Matthaei, R., Baeuerle, P.A., and Barde, Y.A. (1996). Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* 272, 542–545.

Chandrasekhar, A. (2004). Turning heads: development of vertebrate branchiomotor neurons. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 229, 143–161.

Charalampopoulos, I., Vicario, A., Pediaditakis, I., Gravanis, A., Simi, A., and Ibáñez, C.F. (2012). Genetic Dissection of Neurotrophin Signaling through the p75 Neurotrophin Receptor. *Cell Rep.* 2, 1563–1570.

Cheema, S.S., Barrett, G.L., and Bartlett, P.F. (1996). Reducing p75 nerve growth factor receptor levels using antisense oligonucleotides prevents the loss of axotomized sensory neurons in the dorsal root ganglia of newborn rats. *J. Neurosci. Res.* 46, 239–245.

Chinnaiyan, A.M. (1999). The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia N. Y. N* 1, 5–15.

Chiu, A.Y., Chen, E.W., and Loera, S. (1993). A motor neuron-specific epitope and the low-affinity nerve growth factor receptor display reciprocal patterns of expression during development, axotomy, and regeneration. *J. Comp. Neurol.* 328, 351–363.

Christopher and Dana Reeve Foundation. (2009). *The spinal cord: a text and atlas* (London: Academic).

Clowry, G.J., Moss, J.A., and Clough, R.L. (2005). An immunohistochemical study of the development of sensorimotor components of the early fetal human spinal cord. *J. Anat.* 207, 313–324.

Collins, B.E., Fralich, T.J., Itonori, S., Ichikawa, Y., and Schnaar, R.L. (2000). Conversion of cellular sialic acid expression from N-acetyl- to N-glycolylneuraminic acid using a synthetic precursor, N-glycolylmannosamine pentaacetate: inhibition of myelin-associated glycoprotein binding to neural cells. *Glycobiology* 10, 11–20.

- Cory, S., and Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* 2, 647–656.
- Darenfed, H., Dayanandan, B., Zhang, T., Hsieh, S.H.-K., Fournier, A.E., and Mandato, C.A. (2007). Molecular characterization of the effects of Y-27632. *Cell Motil. Cytoskeleton* 64, 97–109.
- Dasen, J.S., Tice, B.C., Brenner-Morton, S., and Jessell, T.M. (2005). A Hox regulatory network establishes motor neuron pool identity and target-muscle connectivity. *Cell* 123, 477–491.
- David, S., Braun, P.E., Jackson, D.L., Kottis, V., and McKerracher, L. (1995). Laminin overrides the inhibitory effects of peripheral nervous system and central nervous system myelin-derived inhibitors of neurite growth. *J. Neurosci. Res.* 42, 594–602.
- Domeniconi, M., Cao, Z., Spencer, T., Sivasankaran, R., Wang, K.C., Nikulina, E., Kimura, N., Cai, H., Deng, K., Gao, Y., et al. (2002). Myelin-Associated Glycoprotein Interacts with the Nogo66 Receptor to Inhibit Neurite Outgrowth. *Neuron* 35, 283–290.
- Domeniconi, M., Zampieri, N., Spencer, T., Hilaire, M., Mellado, W., Chao, M.V., and Filbin, M.T. (2005). MAG Induces Regulated Intramembrane Proteolysis of the p75 Neurotrophin Receptor to Inhibit Neurite Outgrowth. *Neuron* 46, 849–855.
- Doretto, S., Malerba, M., Ramos, M., Ikrar, T., Kinoshita, C., De Mei, C., Tirota, E., Xu, X., and Borrelli, E. (2011). Oligodendrocytes as regulators of neuronal networks during early postnatal development. *PLoS One* 6, e19849.
- Drachman, D.B., Frank, K., Dykes-Hoberg, M., Teismann, P., Almer, G., Przedborski, S., and Rothstein, J.D. (2002). Cyclooxygenase 2 inhibition protects motor neurons and prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Ann. Neurol.* 52, 771–778.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 102, 33–42.
- Dubreuil, C.I., Winton, M.J., and McKerracher, L. (2003). Rho activation patterns after spinal cord injury and the role of activated Rho in apoptosis in the central nervous system. *J. Cell Biol.* 162, 233–243.
- Dupuis, L., Pehar, M., Cassina, P., Rene, F., Castellanos, R., Rouaux, C., Gandelman, M., Dimou, L., Schwab, M.E., Loeffler, J.-P., et al. (2008). Nogo receptor antagonizes p75NTR-dependent motor neuron death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 740–745.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43–50.

Ernfors, P., Henschen, A., Olson, L., and Persson, H. (1989). Expression of nerve growth factor receptor mRNA is developmentally regulated and increased after axotomy in rat spinal cord motoneurons. *Neuron* 2, 1605–1613.

Escandón, E., Soppet, D., Rosenthal, A., Mendoza-Ramírez, J.L., Szönyi, E., Burton, L.E., Henderson, C.E., Parada, L.F., and Nikolics, K. (1994). Regulation of neurotrophin receptor expression during embryonic and postnatal development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 14, 2054–2068.

Everly, J.L., Brady, R.O., and Quarles, R.H. (1973). Evidence that the major protein in rat sciatic nerve myelin is a glycoprotein. *J. Neurochem.* 21, 329–334.

Ferri, C.C., Moore, F.A., and Bisby, M.A. (1998). Effects of facial nerve injury on mouse motoneurons lacking the p75 low-affinity neurotrophin receptor. *J. Neurobiol.* 34, 1–9.

Forgione, N., and Fehlings, M.G. (2014). Rho-ROCK inhibition in the treatment of spinal cord injury. *World Neurosurg.* 82, e535–e539.

Fournier, A.E., GrandPre, T., and Strittmatter, S.M. (2001). Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 409, 341–346.

Franzen, R., Tanner, S.L., Dashiell, S.M., Rottkamp, C.A., Hammer, J.A., and Quarles, R.H. (2001). Microtubule-associated protein 1B: a neuronal binding partner for myelin-associated glycoprotein. *J. Cell Biol.* 155, 893–898.

Friedman, W.J. (2000). Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 6340–6346.

Fujita, S., Shimada, M., and Nakamura, T. (1966). H³-thymidine autoradiographic studies on the cell proliferation and differentiation in the external and the internal granular layers of the mouse cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 128, 191–208.

Funakoshi, H., Belluardo, N., Arenas, E., Yamamoto, Y., Casabona, A., Persson, H., and Ibáñez, C.F. (1995). Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor neurons. *Science* 268, 1495–1499.

Gähwiler, B.H., Capogna, M., Debanne, D., McKinney, R.A., and Thompson, S.M. (1997). Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci.* 20, 471–477.

Goh, E.L., Young, J., Kuwako, K., Tessier-Lavigne, M., He, Z., Griffin, J.W., and Ming, G. (2008). beta1-integrin mediates myelin-associated glycoprotein signaling in neuronal growth cones. *Mol. Brain* 1, 10.

Gould, T.W., and Oppenheim, R.W. (2011). Motor neuron trophic factors: therapeutic use in ALS? *Brain Res. Rev.* 67, 1–39.

Griesbeck, O., Parsadanian, A.S., Sendtner, M., and Thoenen, H. (1995). Expression of neurotrophins in skeletal muscle: quantitative comparison and significance for motoneuron survival and maintenance of function. *J. Neurosci. Res.* 42, 21–33.

- Grimm, S., Stanger, B.Z., and Leder, P. (1996). RIP and FADD: two “death domain”-containing proteins can induce apoptosis by convergent, but dissociable, pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 10923–10927.
- Harrington, A.W., Kim, J.Y., and Yoon, S.O. (2002). Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c-jun N-terminal kinase-mediated apoptosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 156–166.
- Hatten, M.E., and Heintz, N. (1995). Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu. Rev. Neurosci.* *18*, 385–408.
- Heasman, S.J., and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 690–701.
- Hill, M.M., Adrain, C., Duriez, P.J., Creagh, E.M., and Martin, S.J. (2004). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J.* *23*, 2134–2145.
- Hitoshi, Y., Lorens, J., Kitada, S.I., Fisher, J., LaBarge, M., Ring, H.Z., Francke, U., Reed, J.C., Kinoshita, S., and Nolan, G.P. (1998). Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity* *8*, 461–471.
- Hollyday, M., and Hamburger, V. (1977). An autoradiographic study of the formation of the lateral motor column in the chick embryo. *Brain Res.* *132*, 197–208.
- Hollyday, M., and Jacobson, R.D. (1990). Location of motor pools innervating chick wing. *J. Comp. Neurol.* *302*, 575–588.
- Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D.V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* *81*, 495–504.
- Ibáñez, C.F., and Simi, A. (2012). p75 neurotrophin receptor signaling in nervous system injury and degeneration: paradox and opportunity. *Trends Neurosci.* *35*, 431–440.
- Inuzuka, T., Fujita, N., Sato, S., Baba, H., Nakano, R., Ishiguro, H., and Miyatake, T. (1991). Expression of the large myelin-associated glycoprotein isoform during the development in the mouse peripheral nervous system. *Brain Res.* *562*, 173–175.
- Johnson, P.W., Abramow-Newerly, W., Seilheimer, B., Sadoul, R., Tropak, M.B., Arquint, M., Dunn, R.J., Schachner, M., and Roder, J.C. (1989). Recombinant myelin-associated glycoprotein confers neural adhesion and neurite outgrowth function. *Neuron* *3*, 377–385.
- Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., et al. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* *410*, 549–554.
- Julian, L., and Olson, M.F. (2014). Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions. *Small GTPases* *5*, e29846.

Kaibuchi, K., Kuroda, S., and Amano, M. (1999). Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* *68*, 459–486.

Kataoka, T., Schröter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmeler, M., Thome, M., Froelich, C.J., and Tschopp, J. (1998). FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *161*, 3936–3942.

Kelm, S., Pelz, A., Schauer, R., Filbin, M.T., Tang, S., Bellard, M.-E. de, Schnaar, R.L., Mahoney, J.A., Hartnell, A., Bradfield, P., et al. (1994). Sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein and CD22 define a new family of sialic acid-dependent adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Curr. Biol.* *4*, 965–972.

Kenchappa, R.S., Zampieri, N., Chao, M.V., Barker, P.A., Teng, H.K., Hempstead, B.L., and Carter, B.D. (2006). Ligand-dependent cleavage of the P75 neurotrophin receptor is necessary for NRIF nuclear translocation and apoptosis in sympathetic neurons. *Neuron* *50*, 219–232.

Kilic, E., ElAli, A., Kilic, U., Guo, Z., Ugur, M., Uslu, U., Bassetti, C.L., Schwab, M.E., and Hermann, D.M. (2010). Role of Nogo-A in neuronal survival in the reperfused ischemic brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *30*, 969–984.

Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* *14*, 5579–5588.

Kobayashi, K. (2004). Survival of Developing Motor Neurons Mediated by Rho GTPase Signaling Pathway through Rho-Kinase. *J. Neurosci.* *24*, 3480–3488.

Koliatsos, V.E., Crawford, T.O., and Price, D.L. (1991). Axotomy induces nerve growth factor receptor immunoreactivity in spinal motor neurons. *Brain Res.* *549*, 297–304.

Krämer-Albers, E.-M., and White, R. (2011). From axon-glia signalling to myelination: the integrating role of oligodendroglial Fyn kinase. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *68*, 2003–2012.

Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol. Rev.* *87*, 99–163.

Küst, B.M., Brouwer, N., Mantingh, I.J., Boddeke, H.W.G.M., and Copray, J.C.V.M. (2003). Reduced p75NTR expression delays disease onset only in female mice of a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Mot. Neuron Disord. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* *4*, 100–105.

Lai, C., Brow, M.A., Nave, K.A., Noronha, A.B., Quarles, R.H., Bloom, F.E., Milner, R.J., and Sutcliffe, J.G. (1987). Two forms of 1B236/myelin-associated glycoprotein, a cell

adhesion molecule for postnatal neural development, are produced by alternative splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 4337–4341.

Lauren, J., Hu, F., Chin, J., Liao, J., Airaksinen, M.S., and Strittmatter, S.M. (2007). Characterization of Myelin Ligand Complexes with Neuronal Nogo-66 Receptor Family Members. *J. Biol. Chem.* *282*, 5715–5725.

Lazzarini, R.A. (2004). *Myelin biology and disorders* (Sand Diego, Calif: Elsevier Academic Press).

Leach, M.K., Feng, Z.-Q., Gertz, C.C., Tuck, S.J., Regan, T.M., Naim, Y., Vincent, A.M., and Corey, J.M. (2011). The culture of primary motor and sensory neurons in defined media on electrospun poly-L-lactide nanofiber scaffolds. *J. Vis. Exp. JoVE*.

Lee, J.K., Geoffroy, C.G., Chan, A.F., Tolentino, K.E., Crawford, M.J., Leal, M.A., Kang, B., and Zheng, B. (2010). Assessing spinal axon regeneration and sprouting in Nogo, MAG, and OMgp-deficient mice. *Neuron* *66*, 663–670.

Lehmann, M., Fournier, A., Selles-Navarro, I., Dergham, P., Sebok, A., Leclerc, N., Tigyi, G., and McKerracher, L. (1999). Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 7537–7547.

Li, C., Tropak, M.B., Gerlai, R., Clapoff, S., Abramow-Newerly, W., Trapp, B., Peterson, A., and Roder, J. (1994). Myelination in the absence of myelin-associated glycoprotein. *Nature* *369*, 747–750.

Li, L., Oppenheim, R.W., Lei, M., and Houenou, L.J. (1994). Neurotrophic agents prevent motoneuron death following sciatic nerve section in the neonatal mouse. *J. Neurobiol.* *25*, 759–766.

Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* *412*, 95–99.

Li, M., Shibata, A., Li, C., Braun, P.E., McKerracher, L., Roder, J., Kater, S.B., and David, S. (1996). Myelin-associated glycoprotein inhibits neurite/axon growth and causes growth cone collapse. *J. Neurosci. Res.* *46*, 404–414.

Liepinsh, E., Ilag, L.L., Otting, G., and Ibáñez, C.F. (1997). NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J.* *16*, 4999–5005.

Liu, B.P., Fournier, A., GrandPré, T., and Strittmatter, S.M. (2002). Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science* *297*, 1190–1193.

Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* *104*, 487–501.

Lopez, P.H.H. (2014). Role of myelin-associated glycoprotein (siglec-4a) in the nervous system. *Adv. Neurobiol.* *9*, 245–262.

- Lopez, P.H.H., and Schnaar, R.L. (2006). Determination of glycolipid-protein interaction specificity. *Methods Enzymol.* *417*, 205–220.
- Lopez, P.H.H., Ahmad, A.S., Mehta, N.R., Toner, M., Rowland, E.A., Zhang, J., Doré, S., and Schnaar, R.L. (2011). Myelin-associated glycoprotein protects neurons from excitotoxicity: Myelin-associated glycoprotein protects neurons. *J. Neurochem.* *116*, 900–908.
- Lossi, L., and Gambino, G. (2008). Apoptosis of the cerebellar neurons. *Histol. Histopathol.* *23*, 367–380.
- Löw, K., Culbertson, M., Bradke, F., Tessier-Lavigne, M., and Tuszynski, M.H. (2008). Netrin-1 is a novel myelin-associated inhibitor to axon growth. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 1099–1108.
- Lowry, K.S., Murray, S.S., McLean, C.A., Talman, P., Mathers, S., Lopes, E.C., and Cheema, S.S. (2001a). A potential role for the p75 low-affinity neurotrophin receptor in spinal motor neuron degeneration in murine and human amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Mot. Neuron Disord. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* *2*, 127–134.
- Lowry, K.S., Murray, S.S., Coulson, E.J., Epa, R., Bartlett, P.F., Barrett, G., and Cheema, S.S. (2001b). Systemic administration of antisense p75(NTR) oligodeoxynucleotides rescues axotomised spinal motor neurons. *J. Neurosci. Res.* *64*, 11–17.
- Lu, Y., Liu, X., Zhou, J., Huang, A., Zhou, J., and He, C. (2013). TROY Interacts with Rho Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor (RhoGDI) to Mediate Nogo-induced Inhibition of Neurite Outgrowth. *J. Biol. Chem.* *288*, 34276–34286.
- Luo, L. (2000). Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* *1*, 173–180.
- Marzban, H., Del Bigio, M.R., Alizadeh, J., Ghavami, S., Zachariah, R.M., and Rastegar, M. (2015). Cellular commitment in the developing cerebellum. *Front. Cell. Neurosci.* *8*.
- McKerracher, L., David, S., Jackson, D.L., Kottis, V., Dunn, R.J., and Braun, P.E. (1994). Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* *13*, 805–811.
- McKerracher, L., Ferraro, G.B., and Fournier, A.E. (2012). Rho Signaling and Axon Regeneration. In *International Review of Neurobiology*, (Elsevier), pp. 117–140.
- Mehta, N.R., Lopez, P.H.H., Vyas, A.A., and Schnaar, R.L. (2007). Gangliosides and Nogo receptors independently mediate myelin-associated glycoprotein inhibition of neurite outgrowth in different nerve cells. *J. Biol. Chem.* *282*, 27875–27886.
- Mehta, N.R., Nguyen, T., Bullen, J.W., Griffin, J.W., and Schnaar, R.L. (2010). Myelin-associated glycoprotein (MAG) protects neurons from acute toxicity using a ganglioside-dependent mechanism. *ACS Chem. Neurosci.* *1*, 215–222.

Mi, S., Lee, X., Shao, Z., Thill, G., Ji, B., Relton, J., Levesque, M., Allaire, N., Perrin, S., Sands, B., et al. (2004). LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat. Neurosci.* 7, 221–228.

Mingorance-Le Meur, A., Zheng, B., Soriano, E., and del Río, J.A. (2007). Involvement of the myelin-associated inhibitor Nogo-A in early cortical development and neuronal maturation. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 17, 2375–2386.

Montag, D., Giese, K.P., Bartsch, U., Martini, R., Lang, Y., Blüthmann, H., Karthigasan, J., Kirschner, D.A., Wintergerst, E.S., and Nave, K.A. (1994). Mice deficient for the myelin-associated glycoprotein show subtle abnormalities in myelin. *Neuron* 13, 229–246.

Moreau-Fauvarque, C., Kumanogoh, A., Camand, E., Jaillard, C., Barbin, G., Boquet, I., Love, C., Jones, E.Y., Kikutani, H., Lubetzki, C., et al. (2003). The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 9229–9239.

Mukhopadhyay, G., Doherty, P., Walsh, F.S., Crocker, P.R., and Filbin, M.T. (1994). A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* 13, 757–767.

Mulherkar, S., Uddin, M.D., Couvillon, A.D., Sillitoe, R.V., and Tolia, K.F. (2014). The small GTPases RhoA and Rac1 regulate cerebellar development by controlling cell morphogenesis, migration and foliation. *Dev. Biol.* 394, 39–53.

Nagai J, Goshima Y, Ohshima T. (2012). CRMP4 mediates MAG-induced inhibition of axonal outgrowth and protection against Vincristine-induced axonal degeneration. *Neurosci Lett.* 519(1):56-61.

Nguyen, T., Mehta, N.R., Conant, K., Kim, K.-J., Jones, M., Calabresi, P.A., Melli, G., Hoke, A., Schnaar, R.L., Ming, G.-L., et al. (2009). Axonal protective effects of the myelin-associated glycoprotein. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 630–637.

Nornes, H.O., and Carry, M. (1978). Neurogenesis in spinal cord of mouse: an autoradiographic analysis. *Brain Res.* 159, 1–6.

Oppenheim, R.W. (1991). Cell Death During Development of the Nervous System. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 453–501.

Pan, B., Fromholt, S.E., Hess, E.J., Crawford, T.O., Griffin, J.W., Sheikh, K.A., and Schnaar, R.L. (2005). Myelin-associated glycoprotein and complementary axonal ligands, gangliosides, mediate axon stability in the CNS and PNS: neuropathology and behavioral deficits in single- and double-null mice. *Exp. Neurol.* 195, 208–217.

Park, J.B., Yiu, G., Kaneko, S., Wang, J., Chang, J., and He, Z. (2005). A TNF Receptor Family Member, TROY, Is a Coreceptor with Nogo Receptor in Mediating the Inhibitory Activity of Myelin Inhibitors. *Neuron* 45, 345–351.

Park, K.J., Grosso, C.A., Aubert, I., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2010). p75NTR-dependent, myelin-mediated axonal degeneration regulates neural connectivity in the adult brain. *Nat. Neurosci.* *13*, 559–566.

Pedraza, L., Owens, G.C., Green, L.A., and Salzer, J.L. (1990). The myelin-associated glycoproteins: membrane disposition, evidence of a novel disulfide linkage between immunoglobulin-like domains, and posttranslational palmitoylation. *J. Cell Biol.* *111*, 2651–2661.

Peng, Y.-J., He, W.-Q., Tang, J., Tao, T., Chen, C., Gao, Y.-Q., Zhang, W.-C., He, X.-Y., Dai, Y.-Y., Zhu, N.-C., et al. (2010). Trio is a key guanine nucleotide exchange factor coordinating regulation of the migration and morphogenesis of granule cells in the developing cerebellum. *J. Biol. Chem.* *285*, 24834–24844.

Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R.L., and Hahn, K.M. (2006). Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* *440*, 1069–1072.

Purves, D. (1988). *Body and brain: a trophic theory of neural connections* (Cambridge, Mass.: Harvard University Press).

Qu, Q., Chen, J., Wang, Y., Gui, W., Wang, L., Fan, Z., and Jiang, T. (2013). Structural Characterization of the Self-Association of the Death Domain of p75NTR. *PLoS ONE* *8*, e57839.

Quarles, R.H. (2007). Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond. *J. Neurochem.* *100*, 1431–1448.

Raivich, G. (2002). Cytotoxic Potential of Proinflammatory Cytokines: Combined Deletion of TNF Receptors TNFR1 and TNFR2 Prevents Motoneuron Cell Death after Facial Axotomy in Adult Mouse. *Exp. Neurol.* *178*, 186–193.

Reichardt, L.F., and Isabel, F. (1998). Neurotrophic factors and their receptors. In *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development*, W.M. Cowan, T.M. Jessell, and S.L. Zipursky, eds. (Oxford University Press), pp. 220–263.

Rexed, B. (1954). A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.* *100*, 297–379.

Robak, L.A., Venkatesh, K., Lee, H., Raiker, S.J., Duan, Y., Lee-Osbourne, J., Hofer, T., Mage, R.G., Rader, C., and Giger, R.J. (2009). Molecular basis of the interactions of the Nogo-66 receptor and its homolog NgR2 with myelin-associated glycoprotein: development of NgROMNI-Fc, a novel antagonist of CNS myelin inhibition. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 5768–5783.

Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G., and Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* *23*, 2861–2874.

- Saika, T., Senba, E., Noguchi, K., Sato, M., Yoshida, S., Kubo, T., Matsunaga, T., and Tohyama, M. (1991). Effects of nerve crush and transection on mRNA levels for nerve growth factor receptor in the rat facial motoneurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *9*, 157–160.
- Salazar-Grueso, E.F., Kim, S., and Kim, H. (1991). Embryonic mouse spinal cord motor neuron hybrid cells. *Neuroreport* *2*, 505–508.
- Sanno, H., Shen, X., Kuru, N., Bormuth, I., Bobsin, K., Gardner, H.A.R., Komljenovic, D., Tarabykin, V., Erzurumlu, R.S., and Tucker, K.L. (2010). Control of Postnatal Apoptosis in the Neocortex by RhoA-Subfamily GTPases Determines Neuronal Density. *J. Neurosci.* *30*, 4221–4231.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* *274*, 1541–1548.
- Schäfer, M., Fruttiger, M., Montag, D., Schachner, M., and Martini, R. (1996). Disruption of the gene for the myelin-associated glycoprotein improves axonal regrowth along myelin in C57BL/Wlds mice. *Neuron* *16*, 1107–1113.
- Schimmer, A.D. (2004). Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res.* *64*, 7183–7190.
- Schnaar, R.L., and Lopez, P.H.H. (2009). Myelin-associated glycoprotein and its axonal receptors. *J. Neurosci. Res.* *87*, 3267–3276.
- Schuler, M., and Green, D.R. (2001). Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* *29*, 684–688.
- Sendtner, M., Pei, G., Beck, M., Schweizer, U., and Wiese, S. (2000). Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors. *Cell Tissue Res.* *301*, 71–84.
- Shao, Z., Browning, J.L., Lee, X., Scott, M.L., Shulga-Morskaya, S., Allaire, N., Thill, G., Levesque, M., Sah, D., McCoy, J.M., et al. (2005). TAJ/TROY, an Orphan TNF Receptor Family Member, Binds Nogo-66 Receptor 1 and Regulates Axonal Regeneration. *Neuron* *45*, 353–359.
- Sheikh, K.A., Sun, J., Liu, Y., Kawai, H., Crawford, T.O., Proia, R.L., Griffin, J.W., and Schnaar, R.L. (1999). Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 7532–7537.
- Skeldal, S., Matusica, D., Nykjaer, A., and Coulson, E.J. (2011). Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor: A prerequisite for signalling?: Neuronal life, growth and death signalling are crucially regulated by intra-membrane proteolysis and trafficking of p75NTR. *BioEssays* *33*, 614–625.
- Song, X.-Y., Zhou, F.H.-H., Zhong, J.-H., Wu, L.L.Y., and Zhou, X.-F. (2006). Knockout of p75(NTR) impairs re-myelination of injured sciatic nerve in mice. *J. Neurochem.* *96*, 833–842.

Stifani, N. (2014). Motor neurons and the generation of spinal motor neuron diversity. *Front. Cell. Neurosci.* *8*.

Stiles, T.L., Dickendesher, T.L., Gaultier, A., Fernandez-Castaneda, A., Mantuano, E., Giger, R.J., and Gonias, S.L. (2013). LDL receptor-related protein-1 is a sialic-acid-independent receptor for myelin-associated glycoprotein that functions in neurite outgrowth inhibition by MAG and CNS myelin. *J. Cell Sci.* *126*, 209–220.

Susin, S.A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Prévost, M.C., et al. (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* *192*, 571–580.

Tang, S., Shen, Y.J., DeBellard, M.E., Mukhopadhyay, G., Salzer, J.L., Crocker, P.R., and Filbin, M.T. (1997). Myelin-associated glycoprotein interacts with neurons via a sialic acid binding site at ARG118 and a distinct neurite inhibition site. *J. Cell Biol.* *138*, 1355–1366.

Tomita, K., Kubo, T., Matsuda, K., Fujiwara, T., Yano, K., Winograd, J.M., Tohyama, M., and Hosokawa, K. (2007). The neurotrophin receptor p75NTR in Schwann cells is implicated in remyelination and motor recovery after peripheral nerve injury. *Glia* *55*, 1199–1208.

Trapp, B.D. (1990). Myelin-associated glycoprotein. Location and potential functions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *605*, 29–43.

Trapp, B.D., Andrews, S.B., Cootauco, C., and Quarles, R. (1989). The myelin-associated glycoprotein is enriched in multivesicular bodies and periaxonal membranes of actively myelinating oligodendrocytes. *J. Cell Biol.* *109*, 2417–2426.

Tropak, M.B., Johnson, P.W., Dunn, R.J., and Roder, J.C. (1988). Differential splicing of MAG transcripts during CNS and PNS development. *Brain Res.* *464*, 143–155.

Troy, C.M., Friedman, J.E., and Friedman, W.J. (2002). Mechanisms of p75-mediated death of hippocampal neurons. Role of caspases. *J. Biol. Chem.* *277*, 34295–34302.

Turner, B.J., Cheah, I.K., Macfarlane, K.J., Lopes, E.C., Petratos, S., Langford, S.J., and Cheema, S.S. (2003). Antisense peptide nucleic acid-mediated knockdown of the p75 neurotrophin receptor delays motor neuron disease in mutant SOD1 transgenic mice. *J. Neurochem.* *87*, 752–763.

Umemori, H., Sato, S., Yagi, T., Aizawa, S., and Yamamoto, T. (1994). Initial events of myelination involve Fyn tyrosine kinase signalling. *Nature* *367*, 572–576.

Underwood, C.K., and Coulson, E.J. (2008). The p75 neurotrophin receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *40*, 1664–1668.

Van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S.M., Rodriguez, I., Alnemri, E.S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W., and Vandenberghe, P. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts

with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ.* 9, 20–26.

Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Leuillet, S., Vaudry, H., and Gonzalez, B.J. (2003). Regulators of cerebellar granule cell development act through specific signaling pathways. *Science* 300, 1532–1534.

Venkatesh, K., Chivatakarn, O., Sheu, S.-S., and Giger, R.J. (2007). Molecular dissection of the myelin-associated glycoprotein receptor complex reveals cell type-specific mechanisms for neurite outgrowth inhibition. *J. Cell Biol.* 177, 393–399.

Vicario, A., Kisiswa, L., Tann, J.Y., Kelly, C.E., and Ibanez, C.F. (2015). Neuron-type-specific signaling by the p75NTR death receptor is regulated by differential proteolytic cleavage. *J. Cell Sci.* 128, 1507–1517.

Vilar, M., Charalampopoulos, I., Kenchappa, R.S., Simi, A., Karaca, E., Reversi, A., Choi, S., Bothwell, M., Mingarro, I., Friedman, W.J., et al. (2009). Activation of the p75 Neurotrophin Receptor through Conformational Rearrangement of Disulphide-Linked Receptor Dimers. *Neuron* 62, 72–83.

Vinson, M., Rausch, O., Maycox, P.R., Prinjha, R.K., Chapman, D., Morrow, R., Harper, A.J., Dingwall, C., Walsh, F.S., Burbidge, S.A., et al. (2003). Lipid rafts mediate the interaction between myelin-associated glycoprotein (MAG) on myelin and MAG-receptors on neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 22, 344–352.

Vyas, A.A., Patel, H.V., Fromholt, S.E., Heffer-Laue, M., Vyas, K.A., Dang, J., Schachner, M., and Schnaar, R.L. (2002). Gangliosides are functional nerve cell ligands for myelin-associated glycoprotein (MAG), an inhibitor of nerve regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 8412–8417.

Wajant, H. (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296, 1635–1636.

Wang, K.C., Kim, J.A., Sivasankaran, R., Segal, R., and He, Z. (2002a). p75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* 420, 74–78.

Wang, X., Chun, S.-J., Treloar, H., Vartanian, T., Greer, C.A., and Strittmatter, S.M. (2002b). Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 5505–5515.

Wiese, S., Metzger, F., Holtmann, B., and Sendtner, M. (1999). The role of p75NTR in modulating neurotrophin survival effects in developing motoneurons. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1668–1676.

Winton, M.J. (2002). Characterization of New Cell Permeable C3-like Proteins That Inactivate Rho and Stimulate Neurite Outgrowth on Inhibitory Substrates. *J. Biol. Chem.* 277, 32820–32829.

Wong, E.V., David, S., Jacob, M.H., and Jay, D.G. (2003). Inactivation of myelin-associated glycoprotein enhances optic nerve regeneration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 3112–3117.

Wong, K., Ren, X.R., Huang, Y.Z., Xie, Y., Liu, G., Saito, H., Tang, H., Wen, L., Brady-Kalnay, S.M., Mei, L., et al. (2001). Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell* *107*, 209–221.

Wong, S.T., Henley, J.R., Kanning, K.C., Huang, K., Bothwell, M., and Poo, M. (2002). A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat. Neurosci.* *5*, 1302–1308.

Yamamoto, Y., and Henderson, C.E. (1999). Patterns of Programmed Cell Death in Populations of Developing Spinal Motoneurons in Chicken, Mouse, and Rat. *Dev. Biol.* *214*, 60–71.

Yamashita, T., and Tohyama, M. (2003). The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat. Neurosci.*

Yamashita, T., Tucker, K.L., and Barde, Y.A. (1999). Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* *24*, 585–593.

Yamashita, T., Higuchi, H., and Tohyama, M. (2002). The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. *J. Cell Biol.* *157*, 565–570.

Yang, L.J., Zeller, C.B., Shaper, N.L., Kiso, M., Hasegawa, A., Shapiro, R.E., and Schnaar, R.L. (1996). Gangliosides are neuronal ligands for myelin-associated glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 814–818.

Yin, X., Crawford, T.O., Griffin, J.W., Tu, P. h, Lee, V.M., Li, C., Roder, J., and Trapp, B.D. (1998). Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *18*, 1953–1962.

Yoon, S.O., Casaccia-Bonofil, P., Carter, B., and Chao, M.V. (1998). Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *18*, 3273–3281.