

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

**Caracterización de la función de SARA durante el desarrollo neuronal y regeneración axonal en un modelo *in vitro* de neuronas sensoriales**

**Tesinista:** Juan Manuel Bourbotte Asensio

Firma:.....

**Directora:** Dra. Cecilia Conde

Firma: .....

**Co-directora:** Dra. Victoria Rozés - Salvador

Firma: .....

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

Tesina de Grado para optar por el título de Biólogo

**Caracterización de la función de SARA durante el  
desarrollo neuronal y regeneración axonal en un modelo  
*in vitro* de neuronas sensoriales**

**Tribunal Examinador**

Dr. Nicolás Unsain

Firma: .....

Dra. Andrea Cragolini

Firma: .....

Dra. Laura Vivas

Firma: .....

**Calificación: .....**

**Fecha: .....**

## ***Agradecimientos***

A la Universidad Nacional de Córdoba que moldeó mi formación académica y me dio la posibilidad de tener un título universitario.

A mis directoras, Ceci y Vicky, que me enseñaron, guiaron y apoyaron día a día en los inicios de mi camino científico.

A mis compas de laboratorio por su calidez y predisposición a ayudarme.

A mi amigos/as de la facu por compartir y enriquecer la pasión por la biología, y sacarme una sonrisa cuando lo necesitaba.

A mi familia por su apoyo y sostén incondicional desde siempre.

## ÍNDICE

- <b>Abreviaturas</b>	<b>5</b>
- <b>Resumen</b>	<b>6</b>
- <b>Abstract</b>	<b>7</b>
- <b>Introducción</b>	<b>8</b>
Rol biológico de SARA en distintos modelos celulares	<b>9</b>
Vía de señalización de TGF $\beta$ y regulación por SARA	<b>11</b>
Rol de TGF $\beta$ y SARA en el desarrollo del sistema nervioso central	<b>12</b>
Diferenciación y crecimiento de neuronas sensoriales del SNP	<b>13</b>
Antecedentes del laboratorio en neuronas del SNP – DRGs	<b>14</b>
Capacidad regenerativa del sistema nervioso periférico	<b>15</b>
- <b>Hipótesis y objetivos</b>	<b>17</b>
- <b>Materiales y métodos</b>	
Cultivos disociados de neuronas DRGs embrionarias	<b>18</b>
Electroporación de DRGs	<b>19</b>
Tratamiento con TGF $\beta$ y SB431542	<b>20</b>
Cultivo de neuronas hipocampales embrionarias	<b>20</b>
Cultivos disociados de neuronas de DRGs posnatales	<b>21</b>
Inmunocitoquímica	<b>22</b>
Adquisición y procesamiento de imágenes	<b>22</b>
Análisis estadístico	<b>24</b>
- <b>Resultados</b>	<b>24</b>
- <b>Discusión y conclusiones</b>	<b>40</b>
- <b>Referencias</b>	<b>45</b>

## **ABREVIATURAS**

DRG: siglas en ingles Dorsal Root Ganglion (Ganglio de Raíz Dorsal).

EEs: endosomas de reciclaje

GADD34: siglas en ingles, Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein

NGF: siglas en ingles Nerve Growth Factor

PI3P: fosfatidilinositol 3-fosfato

PPIC: proteína fosfatasa 1 C

REs: endosomas de reciclaje

R-Smad: Smads asociados a receptores T $\beta$ RI/II

SARA: siglas en ingles, Smad anchor for receptor activation

SN: Sistema Nervioso

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Periferico

TGF $\beta$ : Transforming Growth Factor  $\beta$

T $\beta$ RI: receptor de TGF $\beta$  tipo I

T $\beta$ RII: receptor de TGF $\beta$  tipo II

## RESUMEN

El desarrollo de las neuronas requiere la coordinación entre procesos intrínsecos y señales microambientales, finamente regulados, para producir la especificación y crecimiento axonal. En ese sentido, la vía de señalización de TGF $\beta$  actúa en el sistema nervioso modulando distintos procesos durante la diferenciación neuronal, tales como establecimiento de la polaridad y extensión de las neuritas. A su vez, se ha evidenciado que TGF $\beta$  influye en la regeneración axonal de manera contexto-dependiente, aunque a la fecha su participación en dicho proceso ha sido poco caracterizado en el sistema nervioso periférico (SNP). SARA es una proteína involucrada en tráfico y señalización, que facilita la interacción entre Smad 2/3 y el receptor de TGF $\beta$ , y se ha reportado que contribuye a la neurogénesis del sistema nervioso central (corteza e hipocampo), modulando la actividad de la vía de TGF $\beta$ . Sin embargo, no se ha descrito si SARA participa en el desarrollo del SNP. En ese contexto, la hipótesis de este trabajo es que SARA participa en el desarrollo y regeneración axonal de neuronas sensoriales de DRG regulando la señalización de TGF $\beta$ . En un modelo *in vitro* de DRG embrionarias demostramos que la supresión de SARA promueve el crecimiento axonal, y el mismo fenotipo se adquiere al estimular exógenamente la vía de TGF $\beta$ . Asociado a esto, determinamos que la expresión endógena de SARA incrementa de manera dependiente a la activación de la señalización, y la inhibición del receptor T $\beta$ RI (con SB431542) produce efectos diferenciales entre neuronas DRG e hipocampales. Por otro lado, en un modelo de DRG postnatales demostramos que TGF $\beta$  estimula la regeneración de las neuritas y modifica la morfología de los conos de crecimiento. Además, el agregado de TGF $\beta$  incrementa la expresión de SARA, y aumenta el número y distribución de los endosomas SARA a nivel del soma y axones. Paralelamente, el inhibidor del T $\beta$ RI produce una alteración en los niveles endógenos y distribución de los endosomas SARA. En síntesis, nuestros resultados sientan las bases, y aportan evidencia por primera vez, sobre la participación de SARA y su implicancia en la vía de señalización de TGF $\beta$  en el crecimiento y regeneración axonal del SNP.

**Palabras Clave:** neuronas sensoriales, desarrollo neuronal, SARA, TGF $\beta$ , regeneración axonal.

## ABSTRACT

The development of neurons requires the finely coordination between intrinsic processes and microenvironmental signals to produce axonal specification and growth. In this sense, the TGF $\beta$  signaling pathway acts in the nervous system modulating different processes during neuronal differentiation, such as polarity establishment and neurite extension. Furthermore, it has been shown that TGF $\beta$  influences axonal regeneration in a context-dependent manner, although to date its participation in this process has been poorly characterized in the peripheral nervous system (PNS). SARA is a protein involved in trafficking and signaling, which facilitates the interaction between Smad 2/3 and TGF $\beta$  receptor, and has been reported to contribute to the central nervous system (cortex and hippocampus) neurogenesis by modulating TGF $\beta$  pathway activity. However, whether SARA participates in PNS development has not been described. In this context, the hypothesis of this work is that SARA participates in the development and axonal regeneration of DRG sensory neurons by regulating TGF $\beta$  signaling. In an *in vitro* model of embryonic DRGs, we demonstrate that SARA suppression promotes axonal growth, and the same phenotype is acquired upon exogenous stimulation of the TGF $\beta$  pathway. Associated with this, we determined that the endogenous SARA expression increases in a signaling activation-dependent manner, and inhibition of the T $\beta$ RI receptor (with SB431542) produces differential effects between DRG and hippocampal neurons. On the other hand, in a postnatal DRG model, we demonstrated that TGF $\beta$  stimulates neurite outgrowth and modifies growth cone morphology. Moreover, the addition of TGF $\beta$  increases SARA expression, and increases the number and distribution of SARA endosomes at the level of the soma and axons. In parallel, the T $\beta$ RI inhibitor produces an alteration in the endogenous levels and distribution of SARA endosomes. In summary, our results, lay the groundwork and provide evidence for the first time, on the participation of SARA and its involvement in the TGF $\beta$  signaling pathway in PNS axonal growth and regeneration.

**Keywords:** sensory neurons, neuronal development, SARA, TGF $\beta$ , axonal regeneration.

## INTRODUCCIÓN

Las neuronas somatosensoriales primarias traducen y transmiten información sobre el entorno externo o interno del cuerpo, al sistema nervioso central (SNC). En la neurogénesis de estos tipos neuronales, subyacen diversos mecanismos intrínsecos y extrínsecos finamente regulados espacio-temporalmente, para el establecimiento de la diversificación que caracteriza a los subtipos de neuronas somatosensoriales (Nascimento et al., 2018; Lallemand et al., 2012). Uno de los principales procesos del desarrollo somatosensorial es la especificación axonal o polaridad neuronal, que genera una asimetría morfológica y funcional, permitiendo la transmisión de información a lo largo del sistema nervioso (Cáceres et al., 2012). Durante y luego de la especificación axonal se produce además, la elongación del axón hacia la sinapsis central o periférica. Ambos eventos implican una coordinación dinámica del transporte selectivo de membranas (Sann et al., 2009; Takano et al., 2015 y 2019), segregación local de proteínas en las neuritas (Arimura et al., 2007) y reorganización dinámica del citoesqueleto de actina/tubulina (Conde y Cáceres, 2009). A su vez, el microambiente contribuye regulando la polarización, ya que se traducen señales extracelulares que modulan estos cambios intracelulares, para por ejemplo, promover o retrasar la formación y crecimiento del axón (Namba et al., 2015; Yogev et al., 2017).

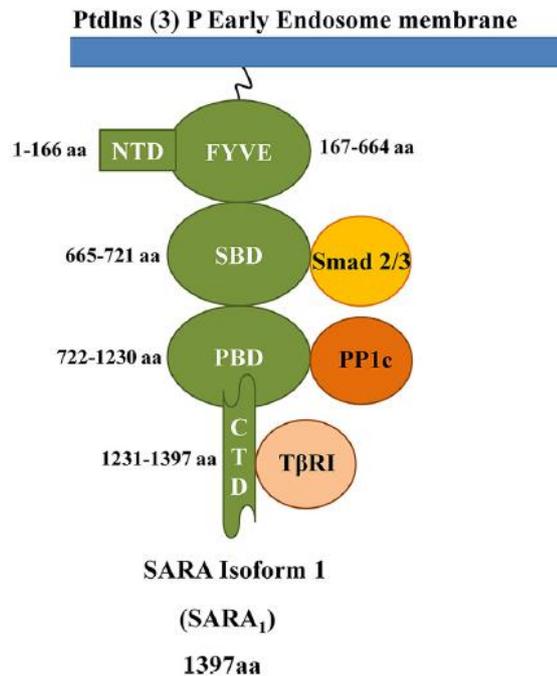
Múltiples proteínas regulan el desarrollo neurítico modulando diferentes vías de señalización neurotróficas, tales como NGF (Nerve Growth Factor), BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) y TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor) (Tucker et al., 2008; Cheng et al., 2010; Yi et al., 2010). Entre ellas destacan los miembros de la familia Ras GTPasas, proteínas de andamiaje (*scaffold*) y Rab GTPasas (Kawauchi et al., 2010; Villaroel-Campos et al., 2014). Estas últimas regulan el tráfico de vesículas a lo largo de vías secretoras, endocítica y reciclaje de endosomas, por lo que son claves para mediar la señalización o respuestas efectoras. En ese sentido, el sistema endosomal constituye un regulador multifactorial en diferentes modelos de desarrollo del SN, incluyendo la médula espinal y órganos sensoriales (Bonifacino et al., 2017; Horton et al., 2003). Mediante la adición y eliminación de componentes de membrana en sitios subcelulares diferenciales (por ejemplo, extremo axonal), el tráfico continuo de vesículas modula la morfología neurítica (expansión y/o retracción), y diferenciación de las neuronas (Mestres et al., 2016; Yap y Winckler, 2012). Además, el sistema endosomal actúa como puente de interacción entre proteínas reguladoras de señalización y transcripción (activando o bloqueando la

señalización de las mismas). Esto ocurre a partir de la internalización de receptores de membrana, y/o al clasificar (*sorting*) o destinar proteínas de manera diferencial, controlando señales microambientales (Winckler et al., 2011; Sann et al., 2009). Existe un número considerable de moléculas que participan en estos procesos, una de ellas es SARA (Smad Anchor for Receptor Activation). SARA, ha sido identificada en distintos modelos celulares participando en el tráfico endocítico y en la regulación de vías de señalización, incluyendo diferentes eventos del desarrollo y homeostasis celular (revisado en Rozés-Salvador et al., 2018). **En este trabajo nos enfocamos en analizar el papel biológico de SARA tanto en la regulación y desarrollo, como así también durante procesos de regeneración de neuronas sensoriales.**

### **Rol biológico de SARA en distintos modelos celulares**

SARA es una proteína *scaffold* que se expresa de forma ubicua tanto en el desarrollo embrionario como en la edad adulta de varios organismos, incluyendo a *D. melanogaster*, zebrafish, ratón, rata y humano (Tsukasaki et al., 1998; Kressmann et al., 2015; Chuang et al., 2007; Coumailleau et al., 2009). En humanos, SARA se ha detectado principalmente en corazón, SN, pulmón, hígado, músculo, con funciones que dependen del contexto celular y fisiológico (Chang et al., 2014).

Estructuralmente, SARA pertenece a la familia de proteínas FYVE (conteniendo dominios de proteínas Fab1, YOTB, Vac1, y EEA1), dominio que le confiere la capacidad de interactuar con fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) (**Figura 1**). Éste es un fosfolípido altamente enriquecido en endosomas tempranos (EEs, por su siglas en inglés -early endosome-) y que participa directamente en el reclutamiento de proteínas (Itoh et al., 2002). Inicialmente, SARA fue identificada como un intermediario en la vía de TGF $\beta$ , con una función crucial en el reclutamiento y localización de los factores de transcripción Smad2/3 al receptor TGF $\beta$  activado (Tsukasaki et al., 1998). Para esto, SARA presenta un dominio SBD (Smad Binding Domain) de unión a Smads, y en su región C-terminal el sitio de interacción con el receptor transmembrana de TGF $\beta$ -tipo I (T $\beta$ RI). Por otro lado, posee un motivo PBD (PP1 Binding Domain) para el reclutamiento de la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1 (PP1c), implicada en la modulación inhibitoria de la señal de TGF $\beta$  (Wu et al., 2006).



**Figura 1.** Esquema representativo de SARA mostrando los dominios y sitios de interacción con diferentes proteínas (Smad2/3, PP1c, PI3P y TBRI). Tomado de Rozés - Salvador et al., (2018).

Por otro lado, se ha demostrado que SARA participa en el transporte endocítico de complejos ligando-receptor, tales como del receptor de transferrina (TfR) y del receptor 2-adrenérgico (2AR) (Arias et al., 2015; Tsukasaki et al 1998). Dicha función se relaciona a la regulación de la distribución y el destino de las moléculas endocitadas al interactuar con diferentes Rabs (Hu et al., 2002). Específicamente, SARA se asocia a los EEs interactuando parcialmente con

Rab5 y EEA1, los cuales reciben el cargo antes que sea destinado a reciclaje o degradación dependiente del lisosoma (Hu et al., 2002). En SNC, la sobreexpresión de SARA provoca un incremento en el tamaño de los EEs (fusión homotípica de endosomas) y retrasa significativamente el reciclaje de componentes de superficie, como el TfR (Arias et al., 2015) o la molécula de adhesión neuronal L1 en neuronas hipocampales (Mestres et al., 2016). Por otro lado, SARA también se asocia con endosomas de reciclado (RE, por sus siglas en inglés -recycling endosome-) que contienen Rab4 en su membrana (vía de reciclado rápido a la membrana) y RE-Rab11 positivos (que participan de la vía de reciclado lento a la membrana). En base a esto, se ha propuesto que SARA actuaría como reguladora de las vías que conectan los EEs con REs (Arias et al., 2015).

Además de las funciones asociadas a tráfico antes mencionadas, SARA también actúa como intermediaria en vías de señalización muy conservadas, que regulan procesos críticos del desarrollo temprano y adulto. En la vía Notch/Delta, implicada en el desarrollo de órganos sensoriales de *D. melanogaster*, los endosomas SARA se segregan asimétricamente durante la división celular, y estos endosomas tienen un rol crucial en el destino de las células hijas, donde SARA permite la polarización de endosomas, y posteriormente la entrega selectiva de éstos a sitios específicos (Loubery et al., 2014). En líneas celulares, SARA participa en la degradación del receptor de Epidermal Growth Factor (EGFR), una de las vías más importantes que regula proliferación y diferenciación

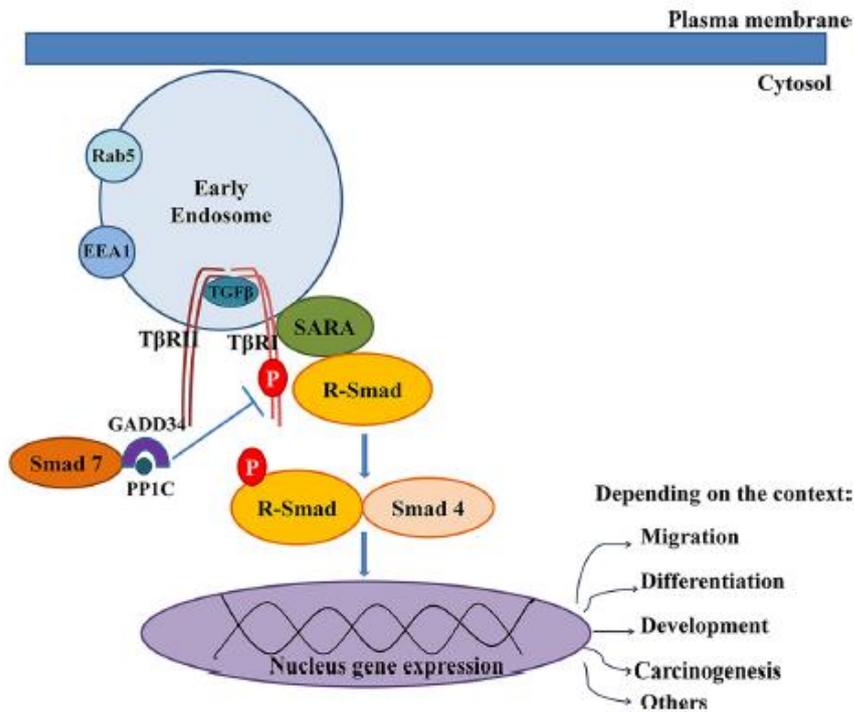
celular en mamíferos (Kostaras et al., 2014). Otra de las vías fundamentales que participa activamente en estos procesos, es la vía de señalización de TGF $\beta$ . SARA es fundamental para la regulación de esta vía en SNC (Tsukasaki et al., 1998; Itoh et al., 2002; Rozés-Salvador et al., 2020), modulando la transmisión entre el complejo receptor-ligando y los reguladores transcripcionales.

### **Vía de señalización de TGF $\beta$ y su regulación por SARA.**

TGF $\beta$  es una citoquina pleiotrópica que modula una amplia variedad de procesos celulares, como crecimiento, apoptosis, diferenciación, polaridad, movimiento y adhesión (Meyers et al., 2017). Durante el desarrollo del SN, este factor es secretado de manera autócrina o parácrina por el entorno celular, e induce cambios morfogenéticos en los precursores neurales, durante los procesos de polaridad neuronal y crecimiento axonal (Bottner et al., 2000; Yi et al., 2010).

La vía canónica de señalización comienza con la unión de TGF $\beta$  soluble a su receptor de membrana tirosina kinasa T $\beta$ R tipo II (T $\beta$ RII), lo que conduce a la formación de un heterodímero donde T $\beta$ RII fosforila a T $\beta$ RI. Luego, los T $\beta$ Rs activados son internalizados por endocitosis y las vesículas se fusionan a EEs (Yakymovych et al., 2018). Posteriormente, el T $\beta$ RI fosforila a las Smad reguladoras 2 y 3 (R-Smads), lo que resulta en su activación y disociación del complejo receptor. En este punto, SARA actúa reclutando y facilitando la interacción entre las R-Smad y T $\beta$ RI activado, cumpliendo así una función clave en la regulación y distribución subcelular de las Smad 2/3, y su presentación al complejo receptor en los EEs (**Figura 2**) (Itoh et al., 2002). Por último, las Smad 2/3 fosforiladas se asocian con Smad 4 (co-Smad) para formar un complejo trimétrico, que transloca al núcleo y modula la expresión de genes diana (Massagué et al., 2000), claves en procesos como migración, diferenciación, carcinogénesis entre otros (revisado en Rozés-Salvador et al., 2018)

Por otro lado, la señalización de TGF $\beta$  puede ser desactivada por el ensamble de un complejo inhibitorio constituido por la GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein) y Smad7 (Smad inhibitoria) (Shi et al., 2014), a nivel de los EE-T $\beta$ Rs. A este complejo también se asocia SARA, que recluta PP1c al sitio donde se encuentra T $\beta$ RI para desfosforilarlo, y de esta forma inactivar la vía (**Figura 2**). Esto se ha evidenciado en *D. melanogaster* (Bennett et al., 2002) y neuronas hipocámpales (Rozés-Salvador et al., 2020).



**Figura 2.** Esquema representativo de la participación de SARA en la vía de señalización de TGFβ. SARA se une a TβRI (receptor) y recluta a Smad2/3 para su fosforilación a nivel de los EEs. Por otra parte, el complejo Smad7-GADD34-PP1c regula negativamente la señal, desfosforilando a TβRI.

### Rol de TGFβ y SARA en el desarrollo del sistema nervioso central

La señal extracelular de TGFβ se ha identificado en diversos eventos del desarrollo del SNC. Se ha demostrado que TGFβ-1 y -2 promueven la formación y elongación de las neuritas hipocampales *in vitro* (Ishihara et al., 1994), y de neuronas corticales embrionarias (Siegenthaler et al., 2004). A su vez, se ha reportado que la estimulación exógena con TGFβ produce una rápida elongación y diferenciación del axón, y el aumento de la expresión de TβRI fosforilado produce un fenotipo neuronal con axones supernumerarios (Yi et al., 2010).

Es importante aclarar que a pesar de la amplia variedad de funciones que cumple TGFβ en el desarrollo y homeostasis neuronal, las moléculas encargadas de regular dicha vía de señalización aún son materia de estudio. En este sentido, nuestro grupo demostró que en neuronas de hipocampo y corteza en desarrollo, SARA modula la vía de TGFβ regulando procesos de polaridad y migración neuronal. Mediante Acceptor Photobleaching-Förster Resonance Energy Transfer (AP-FRET), técnica de microscopía para estudiar interacción de proteínas, se verificó que la interacción entre SARA y TβRI se produce localmente en EEs. Además, en experimentos de pérdida de función, con la expresión de la mutante SARA-F728A, que desactiva el control inhibitorio de SARA, las neuronas adquieren un fenotipo con axones más largos y/o multiaxónicos. Este cambio morfológico se incrementa más aún al añadir TGFβ exógeno a neuronas que expresan SARA-F728A (Rozés-Salvador et al., 2020). Esto coincide con lo descrito por Yi et al. (2010), donde observaron una

alteración en el crecimiento y polaridad en neuronas corticales al sobreestimar la vía de TGF $\beta$ . Por el contrario, mediante la expresión ectópica de SARA (SARA-*wild type*), se disminuye la translocación nuclear de Smad2/3, y como consecuencia fenotípica las neuronas presentan menor extensión/longitud axonal, similar al efecto producido al inhibir farmacológicamente al T $\beta$ RI con SB431542 (Rozés-Salvador et al., 2020).

En este modelo, la expresión de SARA es ubicua a lo largo de los compartimentos somato-dendrítico y axonal, llegando incluso a los conos de crecimiento de neuronas hipocámpales (Arias et al., 2015). Por otro lado, SARA cumple también funciones a nivel del tráfico subcelular. De hecho, se ha evidenciado que la pérdida de función de SARA produce una alteración de los endosomas de reciclaje, alterando la entrega de componentes somato-dendríticos, como el TfR y la proteína axonal L1 (Arias et al., 2015; Mestres et al., 2016). Bajo esta condición, las neuronas muestran mayores niveles de L1 en las membranas axonal y del cono de crecimiento, favoreciendo el crecimiento y elongación de estos dominios. En conjunto, el laboratorio ha demostrado en los últimos años, que SARA es clave en el tráfico endosomal, participando en el desarrollo axonal y dendrítico, y modulando la entrega de moléculas específicas, en SNC.

### **Diferenciación y crecimiento de neuronas sensoriales de DRG**

Los ganglios de la raíz dorsal (DRGs) se localizan adyacentes a la médula espinal y comprenden poblaciones funcionalmente heterogéneas de neuronas sensoriales y otros tipos no neuronales asociados. Durante el desarrollo embrionario, las neuronas sensoriales derivan de progenitores celulares que migran desde la cresta neural (tubo neural dorsal) a lo largo de una vía ventral, para posicionarse y coalescer como ganglios adyacentes al tubo neural (Lallemend et al., 2012). Luego, a partir de los días 14-16 embrionarios, comienzan a diferenciarse y diversificarse en los subtipos sensoriales (Nascimento et al., 2018). El proceso de diferenciación comienza con la aparición de una morfología pseudounipolar, caracterizada por la bifurcación de un único proceso en dos ramas: una axonal periférica que inerva los tejidos diana, y otra central, arborizada dentro del cuerno dorsal de la médula espinal. (Haberberger et al., 2019). Cabe aclarar que *in vitro* las neuronas de DRGs, difícilmente desarrollan un morfotipo pseudounipolar, ya que el número y la longitud axonal puede variar según las condiciones de cultivo y el subtipo neuronal (Malin et al., 2017).

La diferenciación está regulada por la interacción entre señales extrínsecas (ambientales) e intrínsecas que se presentan en los progenitores neurales de DRGs. Entre las primeras, se

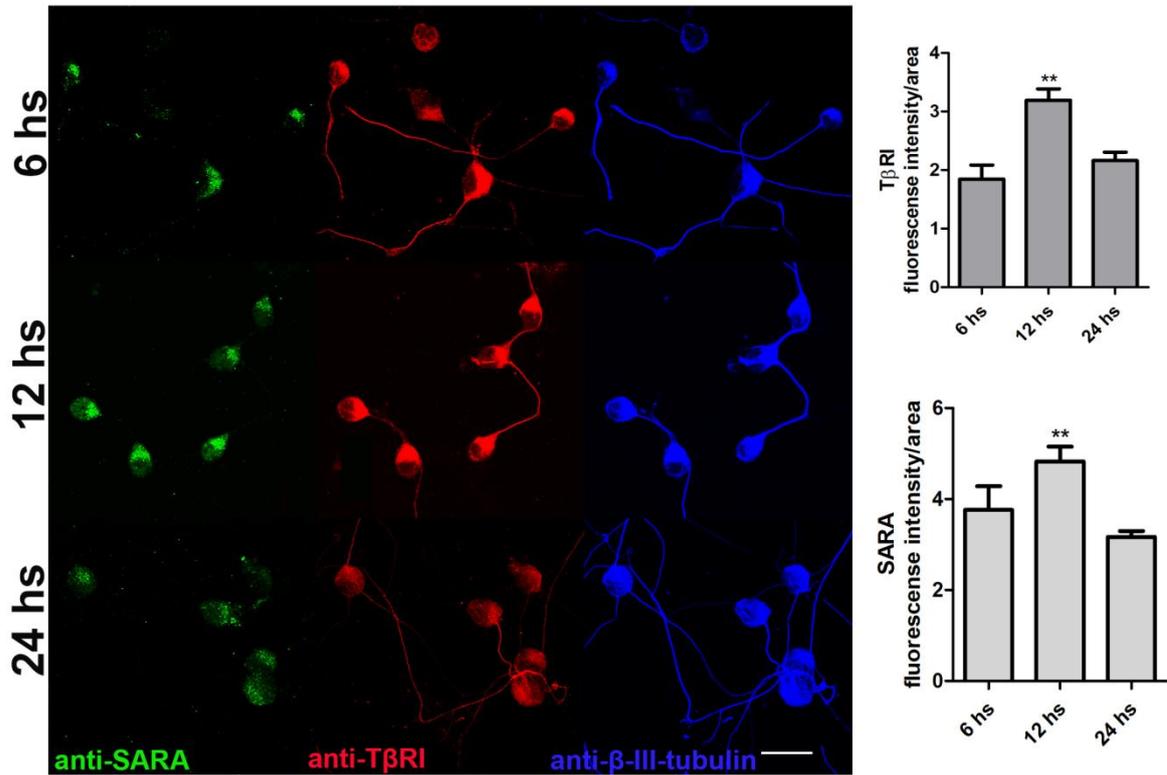
ha descrito la importancia de: i) componentes de la matriz extracelular (ej. N – Cadherina y Laminina), en procesos de elongación y guía axonal (Tucker et al., 2008); (ii) de factores neurotróficos, como NGFβ necesario para la extensión de los procesos axonales en la fase temprana de la polaridad (Patel et al., 2000). En este sentido, se ha demostrado que la secreción parácrina de TGFβ juega un rol fundamental en la neurogénesis sensorial del SNP (Bottner et al., 2000; Campmany et al., 2017). Durante el desarrollo embrionario de ratón, la expresión de TGFβ no es detectable en la médula espinal y neuronas ganglionares periféricas hasta E15 (Flanders et al., 1991), momento en que comienza a participar en procesos de diferenciación neural. **No obstante, los componentes que regulan la señalización morfogénica de TGFβ durante el desarrollo del SNP aún son materia de estudio.**

#### **Antecedentes del laboratorio en neuronas DRGs.**

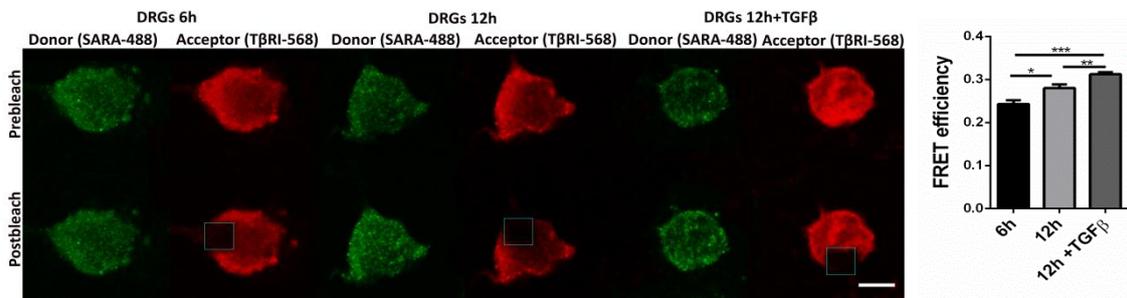
Nuestro grupo de investigación ha iniciado estudios en SNP, observando que SARA y TβRI se expresan en estadios tempranos del desarrollo de neuronas DRG embrionarias (**Figura 3**). Cuantificando la intensidad de fluorescencia para SARA y TβRI en neuronas fijadas a las 6, 12 y 24 hs post-plaqueo, se pudo determinar un aumento significativo en la expresión de ambas proteínas a las 12 hs de cultivo, coincidente con el inicio del desarrollo y crecimiento axonal de estas neuronas in vitro. Adicionalmente, medimos el grado de colocalización entre SARA y el receptor TβRI, y si este efecto se veía aumentado frente al agregado de TGFβ. Encontramos que, en neuronas sensoriales cultivadas por 12 hs SARA y TGFβ colocalizan, ya que el coeficiente de Pearson entre estas dos proteínas fue de 0.85, y se incrementó a 0.90 frente al agregado de TGFβ.

Posteriormente, analizamos si la colocalización observada, respondía a una interacción física entre SARA y TβRI mediante la técnica de AP-FRET. Observamos una interacción directa entre ambas proteínas al cuantificar la eficiencia de FRET, y que ésta se ve aumentada ante el agregado del ligando TGFβ (**Figura 4**).

Estos datos evidencian que existe una relación entre los niveles de expresión de SARA y TβRI, y una interacción directa entre ambas proteínas, durante la diferenciación temprana de las neuronas sensoriales. **A raíz de este hallazgo, nos propusimos investigar en este trabajo, las consecuencias morfológicas y participación de SARA en el neurodesarrollo sensorial.**



**Figura 3. Expresión endógena de la proteína SARA y TβRI en neuronas sensoriales embrionarias.** Neuronas DRGs fijadas a las 6, 12 y 24hs. Inmunofluorescencia con anti-TβRI (verde), anti-SARA (rojo) y anti-β-III-Tubulina (azul). Cuantificación de la intensidad de fluorescencia/área de TβRI y SARA en los distintos tiempos. \*\* p<0.01 n:43 células. Escala: 20μm.



**Figura 4. Interacción física entre SARA y TβRI por AP-FRET.** Imágenes representativas de cultivo de DRGs embrionarias fijadas a 6 y 12 hs, e inmunomarcadas contra SARA (donor-488) y TβRI (aceptor-568). Como control positivo, se trataron las células 1 hora post-sembrado con TGFβ (2ng/ml), y se las fijó a las 12 hs del tratamiento. Las regiones postbleaching son indicadas en recuadros. Para la cuantificación de la eficiencia de FRET se realizaron máscaras binarias de las imágenes y se utilizó la fórmula: 1- Pre Donor/Post. Escala = 20μm.

### Capacidad regenerativa del sistema nervioso periférico

Las neuronas sensoriales postnatales y adultas, cuyas conexiones sinápticas ya están establecidas, tienen gran capacidad de regeneración luego de una injuria axonal o axotomía. Particularmente, la rama axonal de las neuronas DRG presenta la capacidad de crecimiento axonal regenerativo, en tanto que los axones centrales lesionados de DRGs presentan morfologías degenerativas fragmentadas o retracción (Tucker et al., 2008). Esa

competitividad diferencial en el axón periférico, emerge de un programa intrínseco pro-regenerativo que incluye respuestas de reorganización del citoesqueleto, de tráfico, y transcripcionales, en combinación con factores microambientales (He et al., 2016; Hausso et al., 2016).

El crecimiento regenerativo de los axones posiblemente recapitule procesos similares a la formación y elongación axonal que sucede durante el desarrollo embrionario (Jausoro et al., 2020). Es así, que el desarrollo exige un suministro acelerado y constante de elementos constitutivos hacia el cono de crecimiento, requiriendo una coordinación entre reorganización del citoesqueleto y tráfico de membrana para sostener la re-elongación axonal hacia el target sináptico (Mar et al., 2014; Tedeschi et al., 2017). Estas respuestas están bajo el control de numerosas proteínas reguladoras actuando en sintonía. Por ejemplo, en neuronas DRG, GTPasas involucradas en tráfico vesicular y transporte como Rho y Rabs participan en la adición de nueva membrana hacia el cono durante la regeneración del axón (Bradke et al., 2012) y en el reciclaje de receptores neurotróficos, como NGF y citoquinas, hacia el extremo axonal (*tip*) (Hausso et al., 2016). Considerando que a nivel del SNC, SARA regula el tráfico endocítico en interacción con Rabs, es posible que también esté implicada en el *sorting* y reciclaje de componentes de membrana durante la regeneración periférica. Sin embargo, a la fecha no hay datos sobre un posible rol de SARA en dicho proceso.

TGF $\beta$  regula el comportamiento de las neuronas y las células gliales en el proceso de regeneración (Li et al., 2017; Vidal et al., 2013). Algunos estudios mostraron que TGF $\beta$  tiene un papel negativo al aumentar la formación de cicatrices gliales alrededor de la lesión axonal, lo que en general se considera un factor inhibitorio de la regeneración nerviosa (Dobolyi et al., 2012). Sin embargo, otros estudios indican que TGF $\beta$  desempeña un papel positivo al suprimir la respuesta pro-inflamatoria, modular la actividad de señales neurotróficas (ej. NGF y EGF) y promover la acción neuroprotectora de las células de Schwann (Vidal et al., 2013; Sulaiman et al., 2016). Adicionalmente, el efecto de TGF $\beta$  sobre la regeneración de las neuritas depende del target celular y el microambiente axonal. A nivel central, se ha demostrado que TGF $\beta$ 1 aumenta la extensión de neuritas en células dopaminérgicas, sin embargo, produce el efecto inverso en neuronas corticales y cerebelosas (Li et al., 2017). Sin embargo, en el SNP no se ha caracterizado, hasta el momento, el efecto que tiene TGF $\beta$  en la regeneración axonal de neuronas sensoriales de DRG. **En base a esto, nos propusimos analizar si SARA tiene un rol potencial en la regeneración axonal en un contexto dependiente de TGF $\beta$ , utilizando un modelo *in***

***in vitro* de neuronas DRG postnatales.** Este modelo celular se utiliza para los ensayos de regeneración *in vitro* (Rozés-Salvador et al., 2016) y para evaluar el papel de factores internos o ambientales en el crecimiento axonal (Saijilafu et al., 2012; de Luca et al., 2015). Al utilizar neuronas disociadas de organismos perinatales, que alcanzaron la completa conexión sináptica en la etapa neonatal, se posibilita el estudio de las vías de señalización y tráfico vesicular durante la regeneración *in vitro* (Lee et al., 2021).

**En resumen, SARA es una proteína con funciones claves en el desarrollo del SNC (participación en tráfico y señalización a través de la vía de TGF $\beta$ , que modulan el desarrollo neuronal), pero su papel en SNP no se ha descrito.** Este trabajo de investigación se enfoca a dilucidar esta pregunta.

## **HIPÓTESIS**

SARA participa en el crecimiento axonal de neuronas sensoriales de DRG como modulador de la vía de señalización de TGF $\beta$ .

## **OBJETIVOS**

### **General**

Determinar el rol funcional de SARA durante el desarrollo y regeneración de neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal (DRG).

### **Específicos**

1. Caracterizar la participación de SARA durante el desarrollo de neuronas sensoriales embrionarias y su potencial asociación a la vía de TGF $\beta$ .
2. Caracterizar la participación de SARA durante la regeneración axonal de neuronas sensoriales postnatales y su potencial asociación a la vía TGF $\beta$ .

## **MATERIALES y MÉTODOS**

### **1. Cultivo primario embrionario de neuronas DRG**

Los protocolos utilizados en este trabajo para cultivo y electroporación, se basaron en los trabajos de Yu et al., 2015 y Sleigh et al., 2016. Los animales de experimentación fueron embriones de edad gestacional 14-15 (E14-15) de ratones cepa C57/B16. Las hembras fueron mantenidas en el bioterio del Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC), en jaulas individuales, en una habitación con ciclo de luz-oscuridad de 12:12 hs y temperatura controlada entre 20-22° C. Cada animal fue provisto de agua y dieta comercial *ad libitum*.

El manejo de animales y los protocolos experimentales cuentan con la aprobación del Comité de Ética que rige las normas de cuidado y uso de los animales de experimentación del INIMEC (CICUAL; protocolo de extracción de tejido embrionario para cultivo celular, Resolución 006/2017 A).

I. Preparación de vidrios de plaqueo: vidrios redondos de 12 mm de diámetro, se sumergieron en etanol 96%, flamearon con mechero y secaron al aire en campana de flujo. Luego se colocaron en placa de cultivo de 24 pocillos (*multiwell*), e incubaron con 50 µl de poli-L-lisina (1 mg/ml), por 4 hs a temperatura ambiente o durante una noche (*overnight*; ON) a 37°C. Posteriormente, se lavaron con agua destilada repetidas veces y cubrieron con 50 µl de laminina (10 µg/ml), y fueron incubados ON a 37°/5% CO<sub>2</sub>.

A continuación, se lavaron los vidrios tratados y los pocillos se llenaron con 500 µl de *medio de siembra*: DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, Gibco), suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB), penicilina/estreptomicina 1% (Gibco) y Glutamax 1% (Gibco). El multiwell con los vidrios tratados, se mantuvo en un incubador humidificado a 37° C/5% de CO<sub>2</sub> hasta el momento de sembrar las DRG disociadas.

### **II. Disección y aislamiento de ganglios de la raíz dorsal**

Ratonas preñadas de tiempo gestacional E14 - 15 fueron sacrificadas por asfixia (por 8 segundos con CO<sub>2</sub>) y posterior dislocación cervical. Inmediatamente, los úteros fueron extraídos cuidadosamente con material quirúrgico, y transferidos a una placa de vidrio con buffer Hank's 1X (Hank's balanced salt solution, Gibco), mantenida en hielo. Los embriones fueron extraídos y decapitados, y luego transferidos a una placa de 60 mm para facilitar la extracción de los ganglios y conteniendo Hank's 1X frío, para conservar la integridad de los tejidos.

Se continuó la disección bajo lupa, posicionando los troncos con la columna dorsal, con pinza de punta recta, con el fin de hacer cortes siguiendo la línea media lateralmente a la columna vertebral. Posteriormente, la columna se separó de los demás órganos para aislar la médula espinal. El cartílago y el canal vertebral se cortaron longitudinalmente y cuidadosamente se extrajo la médula espinal con la punta de la pinza. Los ganglios fueron retirados de la médula uno a uno por con pinza, pudiéndose aislarse hasta 18 DRG por embrión. Los DRGs aislados se transfirieron a un tubo cónico de 15 ml conteniendo 2700  $\mu$ l Hank's 1X y 300  $\mu$ l de tripsina 10X, para la digestión enzimática. Se incubaron a 37°C durante 20 min. Luego, la suspensión de DRGs fue centrifugada durante 10 min a 1500 rpm, y posteriormente se eliminó el sobrenadante conteniendo tripsina. Se realizaron 2 lavados de las células con Hank's 1X y se resuspendió en medio de siembra. La digestión mecánica se realizó absorbiendo y liberando la suspensión al menos 10 veces primero con una punta descartable de pipeta de 1000  $\mu$ l, y luego con una punta de 200  $\mu$ l, hasta lograr una disgregación completa de los ganglios. Se cuantificó la densidad celular obtenida colocando 10  $\mu$ l de la suspensión en cámara de Neubauer, considerando el factor de dilución usado para suspender las células. El rango de células para plaquear por cada well, se fijó entre 80.000 – 180.000 células dependiendo el experimento. Para determinar la expresión endógena de SARA, se sembraron 80.000 células /ml por cada well, en tanto que para los experimentos de pérdida de función y sus controles, se procedió a electroporar las neuronas DRGs previo a la siembra.

## **2. Electroporación de DRGs**

La suspensión de células DRGs disociadas fue centrifugada a 1500 rpm por 1 min. Posteriormente, las células se resuspendieron en 160  $\mu$ l de solución de electroporación 1 (125mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 12.5 mM KCl, pH:7.75) (relación de 80  $\mu$ l por vector), y se agregó 80  $\mu$ l de dicha suspensión celular a un tubo eppendorf, más los plásmidos correspondientes para cada experimento. Se agregaron 40  $\mu$ l de solución de electroporación 2 ( $\text{MgCl}_2$  55 mM) (relación 20  $\mu$ l por vector), e inmediatamente se electroporaron las DRGs utilizando el sistema de transfección AMAXA Nucleofector® kit (Lonza), utilizando el programa previamente establecido por el fabricante (G-013 específico para DRGs) y parámetros descriptos previamente (Rozés Salvador et al., 2016; Jausoro et al., 2019). Las células transfectadas fueron sembradas sobre los vidrios preparados previamente (100.000 – 180.000 células/well). Se incubaron 1 – 2 hs para permitir que se adhieran al sustrato, y luego, se reemplazó el medio de siembra, por *medio*

*de mantenimiento* conteniendo Neurobasal suplementado con B27 1X (Gibco), Glutamax 1% (Gibco), Penicilina– Estreptomicina 1% (Gibco) y factor de crecimiento nervioso (NGF) 50 ng/μl (ENVIGO), esencial para la supervivencia de neuronas sensoriales.

Para suprimir la expresión de SARA, las DRGs disociadas fueron electroporadas con pCAG-shRNA-SARA (shSARA; 4 μg/μl) y shRNA-Scramble (shScramble; 3 μg/μl; Ambion Co.) como control. Las DRGs electroporadas fueron mantenidas al menos por 24 hs para permitir la correcta expresión de los plásmidos antes de continuar con el experimento.

Los parámetros de crecimiento cuantificados en las diferentes condiciones de SARA fueron: el axón más largo, longitud axonal promedio y número de axones.

### **3. Tratamiento con TGFβ y SB431542**

Células electroporadas con shScramble fueron tratadas luego de 24 hs de plaqueo (1 DIV) con TGFβ1 (concentración fisiológica 2 ng/ml; Acris GmbH, Germany; Fogel-Petrovic et al., 2007), o con el inhibidor de TβRI, SB431542 (10 μM) (Da Costa Byfield et al., 2004). Los cultivos fueron fijados 24 hs post-inducción e inmunomarcados para βIII-Tubulina con el fin de analizar los parámetros morfológicos y crecimiento axonal, mencionados en el párrafo anterior.

Por otro lado, para analizar los niveles endógenos de SARA, cultivos de neuronas DRG o hipocampales fueron tratados con TGFβ o SB43154, y se realizó inmunofluorescencia para SARA a los tiempos respectivos a cada experimento (ver abajo).

### **4. Cultivo primario de neuronas hipocampales embrionarias**

Los cultivos se realizaron siguiendo el protocolo de Kaech y Banker (2006). Brevemente, se sacrificaron ratas Wistar preñadas (E18.5) y se extrajeron los embriones para aislar el hipocampo, seguido de digestión enzimática y mecánica. Las neuronas se sembraron en placas de pocillos múltiples que contenían cubreobjetos de vidrio previamente tratados con 1 mg/ml de poli-l-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) y utilizando el medio DMEM + SFB 10% durante 1 h a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Luego, el medio de siembra fue reemplazado por Neurobasal suplementado con B27, Glutamax, Piruvato de sodio y antibióticos (Pen/Strep) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Las células fueron mantenidas durante 2 DIV y posteriormente se las trató con TGFβ ó SB421542 durante 24h. Luego fueron fijadas con PFS 4% e inmunomarcadas contra SARA para su posterior cuantificación.

## 5. Cultivo primario de DRG postnatales

El protocolo de cultivo usado se basó en los propuestos por Rozés-Salvador et al., 2016 y Saijilafu et al, 2012. Los animales de experimentación fueron crías de edad posnatal entre P5-P7 de ratones cepa C57/Bl6. El propósito de este cultivo es utilizarlo como modelo celular para el estudio de regeneración axonal, ya que implica extraer neuronas sensoriales ya desarrolladas (con sus axones) y cultivarlas *in vitro*.

Después de aplicar la eutanasia a los ratones, los troncos fueron sujetos a una placa de disección, de modo de exponer la parte ventral hacia arriba. Luego, se realizaron cortes longitudinales para extirpar la piel, músculo, vísceras y otras partes blandas, exhibiendo así la columna vertebral. Ésta fue dividida por la mitad a lo largo del eje longitudinal mediante cortes dorso-laterales para exponer el tejido de la médula. Bajo lupa de disección y utilizando pinzas de microcirugía, se retiraron suavemente los ganglios dorsales ubicados entre los canales vertebrales. La mayoría de los ganglios extraídos pertenecen a la zona lumbar y torácica, por ser los más gruesos y fáciles de localizar. A continuación las DRGs se colocaron en una placa de 60 mm con Hank's 1X. Se limpió cada ganglio eliminando los haces de axones que se encuentran en el exterior de las DRGs. Este último paso, reduce los restos de mielina y la abundancia de células gliales.

Posteriormente, los ganglios fueron recolectados y digeridos enzimáticamente con Colagenasa (1 mg/ml) por 25 min y con Tripsina 1X por 15 min a 37°C. Se centrifugó a 100g por 5 min, se realizaron 2 lavados con PBS 1X y posteriormente, se agregó medio de siembra. La disociación mecánica fue realizada pipeteando los ganglios suavemente hacia arriba y hacia abajo al menos 6 veces con puntas descartables, como se describió anteriormente.

Como la suspensión celular obtenida contiene tanto neuronas como células no neuronales, ésta se sembró inicialmente en una placa de 60 mm por 1h y para obtener un cultivo altamente purificado en neuronas (libre de glía), se recuperó el medio de cultivo y se sembró la suspensión de células a baja densidad (3000-5000 células/pocillo), en vidrios pretratados (poli-L-Lysina y laminina). Los cultivos fueron mantenidos durante 2 hs en medio de siembra, antes de reemplazarlo por medio de mantenimiento. Posterior a 1h del cambio de medio, las neuronas fueron tratadas con TGF $\beta$  o inhibidor SB431542, y fijadas a 5 hs y 24 hs post tratamiento.

## **6. Inmunocitoquímica**

Tanto a cultivos embrionarios como postnatales, se descartó el medio y después de un lavado rápido (5 min) con Hank's 1X, se añadió Paraformaldehído-Sucrosa (PFS) al 4% (500 µl/pocillo) para fijar las células durante 20 min a temperatura ambiente (TA). A continuación, las células fijadas se lavaron con PBS 1X durante 3 veces.

Para la inmunomarcación, se permeabilizaron las células con Tritón X-100 (0,2% en PBS) por 5 min. Después de 3-4 lavados de 5 min con PBS 1X, se añadió la solución de bloqueo (5% de suero de caballo en PBS 1X) durante 60 min a TA. Luego, las células se incubaron con los anticuerpos primarios anti-SARA (mouse monoclonal - sc-133071-, 1:100 ó rabbit policlonal - sc-9135-, 1:100; Santa Cruz), anti- $\beta$ III Tubulina (mouse monoclonal, 1:1000; Elabscience), dejándolos overnight (ON) a 4°C. Para el análisis de fosforilación de Smad2/3 las neuronas fueron inmunomarcadas con anticuerpos anti-Smad2/3 total (mouse monoclonal - sc39844, 1/100; Santa Cruz) y anti-Smad2/3 fosforilado (rabbit monoclonal, 1/100; Santa Cruz).

Posteriormente, las DRGs fueron lavadas 3 veces por 5 min con PBS 1X e incubadas por 1:30 hs con los anticuerpos secundarios Alexa Fluor® 488 anti-mouse (1:500, Molecular Probes) y Alexa Fluor anti-rabbit 546 (1:500, Molecular Probes) resuspendidos en PBS 1X a TA. Para la tinción de los filamentos de actina se utilizó Falloidina 633 (1:1000, Abcam), junto con la incubación de los anticuerpos secundarios. Por último, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS 1X y luego los cubreobjetos conteniendo las células, fueron montados en portaobjetos de vidrio con la solución de montaje (Mowiol, Sigma-Aldrich).

## **7. Adquisición y procesamiento de imágenes**

Todas las muestras montadas fueron visualizadas en un microscopio confocal Zeiss LSM-800 (CEMINCO) usando láser fluorescente 488, 533 y 633 nm, para los respectivos anticuerpos secundarios mencionados.

Las imágenes para realizar análisis morfológico y crecimiento neuronal, fueron adquiridas con objetivo 20X para abarcar toda la longitud axonal en un campo de observación. En aquellas neuronas de gran tamaño, se tomaron múltiples imágenes adyacentes y se les realizó un montaje (*stitching*) utilizando Fiji-ImageJ. Es importante mencionar que las imágenes se recogieron aleatoriamente en diferentes regiones de los cubreobjetos, para minimizar los sesgos en función de la densidad celular. Tampoco se hizo discriminación entre células de distintas regiones de la columna para representar la variabilidad morfológica de la población neuronal.

El análisis de las imágenes fue realizado utilizando Fiji-ImageJ (NIH, United States). Los parámetros de crecimiento fueron la longitud axonal promedio y longitud del axón más largo, cuantificados marcando la totalidad de los axones por neurona con la herramienta *free pencil*. Además se cuantificó el número de axones por célula mediante conteo observacional.

En cultivo de DRG postnatales además se midió el área de los conos de crecimiento marcando el perímetro total del cono con la herramienta *polígono*, considerando solo la marca de  $\beta$ -III-Tub. Se realizó un análisis de Sholl para cuantificar el número de intersecciones (ramificaciones) en el crecimiento de neuritas de las células [complemento de análisis de Sholl v3.4.10 para ImageJ (Sholl, 1953)]. Para las mediciones, una línea recta fue trazada desde el centro del cuerpo celular hasta el final de los axones; se cuantificaron el número de intersecciones, definiendo cuatro círculos concéntricos separados cada 30  $\mu\text{m}$ .

Para evaluar la expresión de SARA en neuronas DRG e hipocampales, se tomaron imágenes (objetivos 40X ó 20X) de los somas, incluyendo cortes en el plano Z (profundidad 0,5 – 0,7  $\mu\text{m}$ ). La intensidad de fluorescencia de SARA se estimó como la intensidad promedio de la señal fluorescente en el soma. Previamente, se realizó la proyección Z y se les sustrajo el *background* considerando el valor promedio más 3 desvíos estándar del brillo de fondo.

Para cuantificar el número de endosomas con inmunofluorescencia anti-SARA, se procedió a generar una máscara utilizando la función *Find máxima* de ImageJ (se estableció como parámetro una prominencia mayor a 500). Se definió una región de interés (ROI) en el soma, y se lo trasladó a la máscara. Posteriormente se cuantificaron los endosomas mediante el analizador de partículas definiendo el tamaño a cuantificar entre 0.3 y 2  $\mu\text{m}$  y circularidad de 0-1. Dicho análisis también se realizó en la célula completa.

Para la cuantificación de la relación entre Smad 2/3 fosforilada / Smad 2/3 total, se procedió a generar la proyección Z de los cortes ópticos obtenidos en el confocal mediante sumatoria de los mismos, y se les sustrajo el *background* considerando el valor promedio más 3 desvíos estándar del brillo de fondo. Posteriormente se definió un ROI en el soma y se cuantificó la intensidad de fluorescencia promedio de la señal de Smad 2/3 fosforilada. Posteriormente, se utilizó el mismo ROI para cuantificar el valor de intensidad de fluorescencia promedio de la señal de Smad 2/3 total. Finalmente, el valor graficado corresponde a la relación entre ambas señales.

## 8. Análisis estadístico

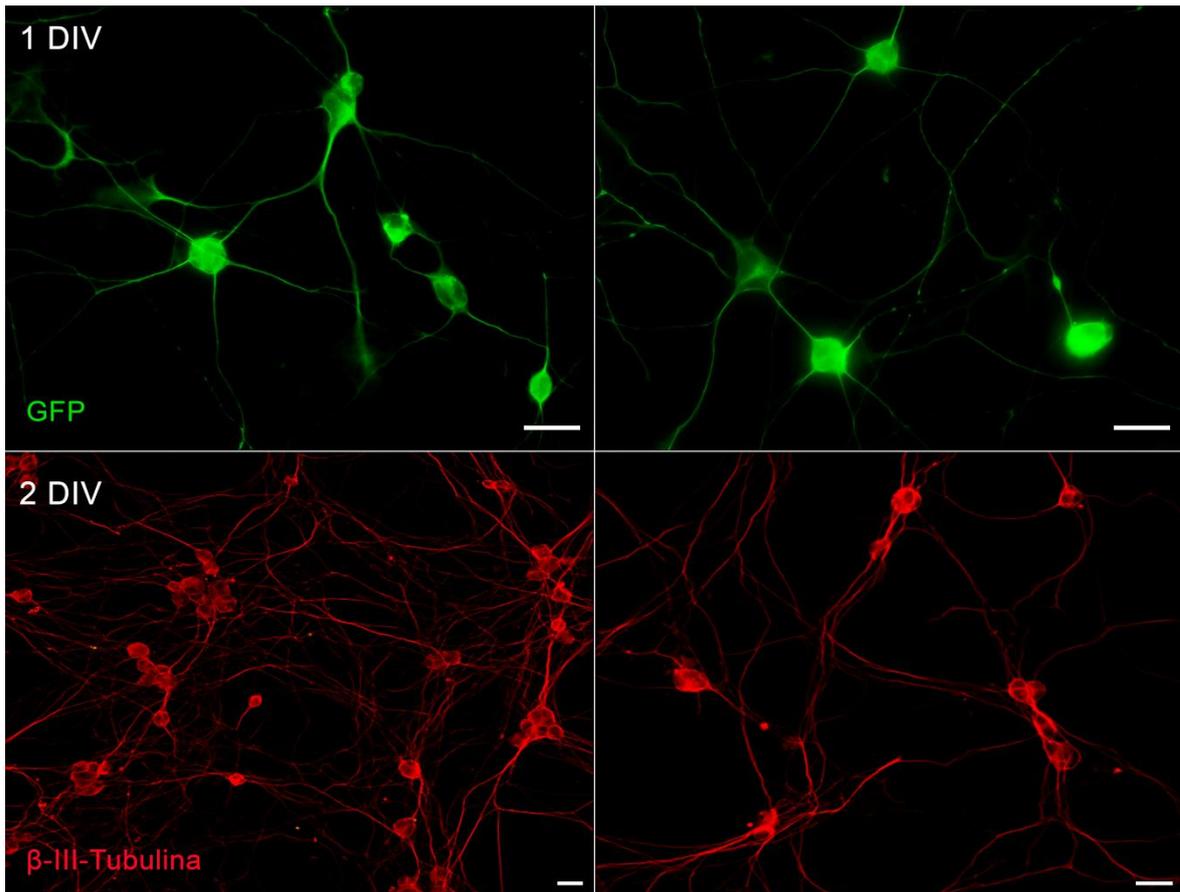
Las comparaciones entre 2 grupos se realizaron utilizando un Prueba *t* de Student no apareada. Se llevó a cabo un análisis de grupos múltiples por ANOVA de una vía. Como prueba posterior, se utilizó la prueba de comparación múltiple de Bonferroni, y la prueba Shapiro-Wilk para evaluar la distribución normal de los conjuntos de datos.

Se realizó un análisis estadístico utilizando el software GraphPad Prism 5.0 (Software GraphPad, San Diego, CA, Estados Unidos). Se consideraron las diferencias significativas a  $p < 0,05$ . Los resultados se representan como la media SEM de al menos 3 cultivos independientes ( $n = 3$ ). El número de neuronas analizadas en cada experimento se indica en las leyendas de las figuras.

## RESULTADOS

### 1. Generación del cultivo primario de neuronas DRG embrionarias

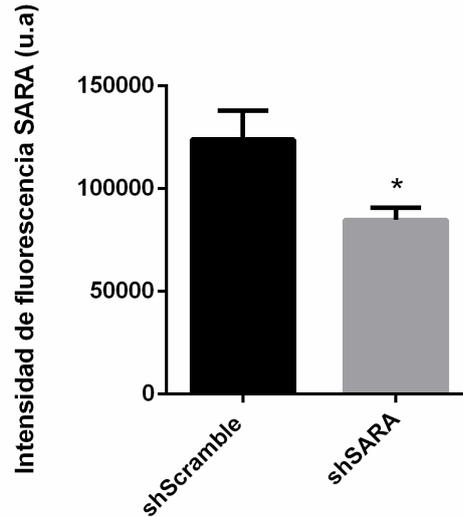
Las neuronas de DRG embrionarias fueron mantenidas en medio de cultivo suplementado con factor neurotrófico NGF $\beta$  y observadas durante un periodo de 2 DIV, para determinar adhesión, viabilidad celular y expresión de cDNAs/shRNAs transfectados. En estas condiciones, las neuronas DRGs suelen empezar a desarrollar procesos neuríticos 6 - 12 hs después del plaqueo, alcanzando un crecimiento y ramificación considerable 48 hs después. En general, en los diferentes cultivos realizados, se pudo determinar un desarrollo normal de entre 2 - 5 axones por neurona con 2 $^{\circ}$ -3 $^{\circ}$  orden de ramificación (**Figura 5**). Pudimos obtener cultivos con una importante densidad de neuronas (pocas células gliales), con óptimas condiciones de adhesión y viabilidad. Para poner a punto las condiciones de electroporación, utilizamos el vector pCAG-GFP vacío, que sólo expresa la proteína verde fluorescente (GFP). Realizamos una curva de 1 a 3 $\mu$ g de DNA para analizar la eficiencia de electroporación y viabilidad. Encontramos que en todas las concentraciones utilizadas el vector se expresaba, sin afectar la viabilidad y morfología celular normal (**Figura 5**). A partir de este análisis y con las condiciones óptimas establecidas para el cultivo de DRG embrionarias, pudimos avanzar con los experimentos propuestos para este trabajo de investigación.



**Figura 5. Cultivo primario de neuronas sensoriales embrionarias.** Imágenes representativas de neuronas DRG electroporadas con pCAG – GFP (verde) e inmunomarcadas para  $\beta$ -III-Tubulina (rojo). Las neuronas fueron cultivadas hasta 2 DIV. Escala: 20 $\mu$ m.

## 2. Rol de SARA en el crecimiento axonal

Para analizar la participación de SARA en la morfogénesis de neuronas DRG embrionarias, se suprimió la expresión de la proteína mediante electroporación con un ARN de interferencia para SARA (shSARA) y como control se utilizó un shScramble (que no alteró la expresión de SARA), ambos vectores fusionados a GFP para facilitar su visualización. Las células fueron mantenidas durante 24 o 48 hs post-plaqueo. Para corroborar la eficiencia del shSARA, se evaluó la intensidad de fluorescencia para la proteína. Coincidiendo con la eficiencia obtenida en neuronas hipocámpales y corticales (Arias et al., 2015; Mestres et al., 2016) se obtuvo un promedio de 30% de *knockdown* para SARA en DRGs electroporadas con shSARA, comparando con el valor obtenido en neuronas control (**Figura 6**).

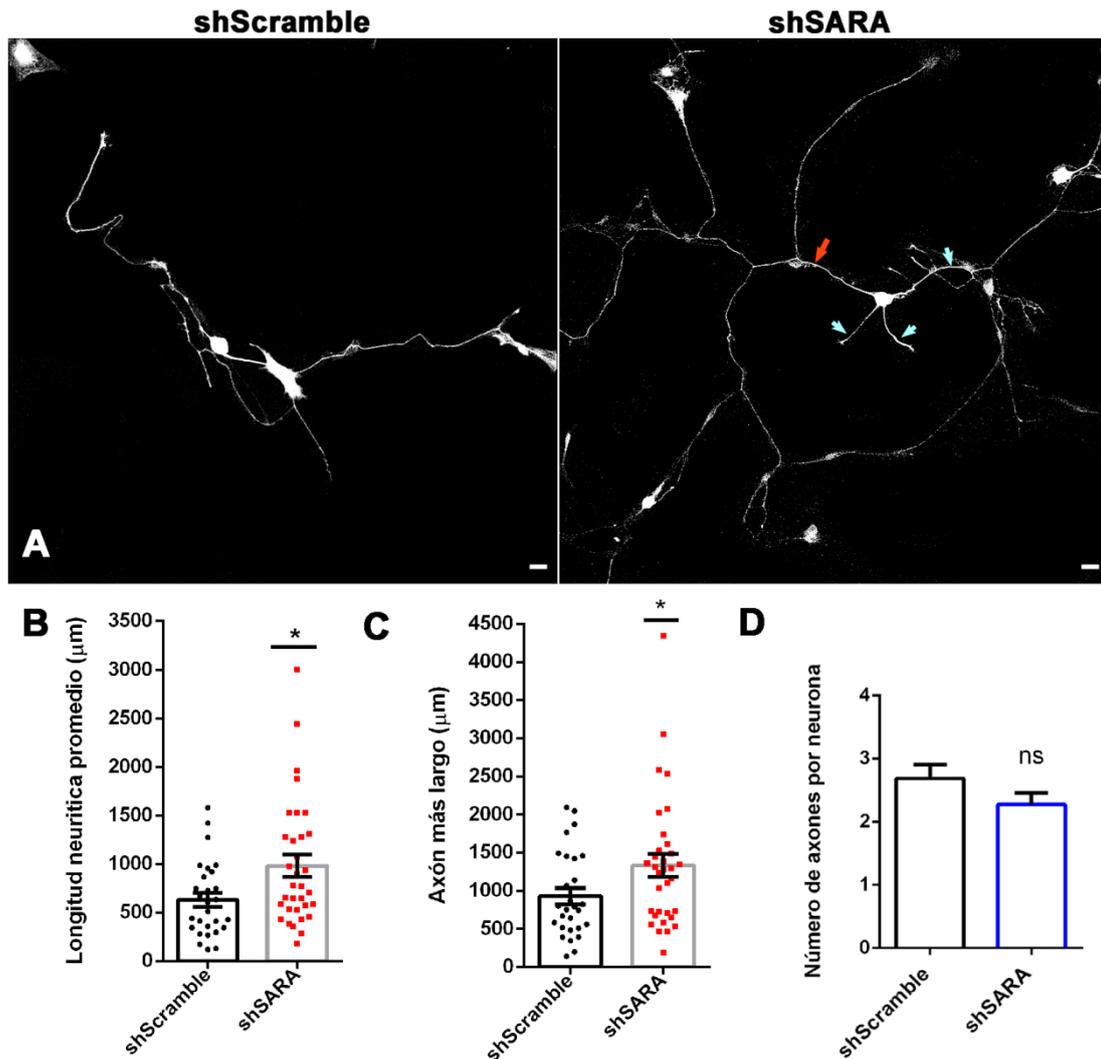


**Figura 6. Eficiencia de *knockdown* de SARA en neuronas sensoriales embrionarias.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de SARA en neuronas DRG electroporadas con shScramble o shSARA. Para cada condición, las neuronas fueron inmunomarcadas con anticuerpo primario anti-SARA (mouse monoclonal) y secundario (Alexa fluor 488). *t* – Student diferencia entre medias \**p* < 0,05. Un total de 30 neuronas fueron analizadas por condición.

Paralelamente, se analizó la morfología axonal teniendo en cuenta el número, orden de ramificación y longitud axonal en las condiciones mencionadas. Para ello, neuronas shScramble-GFP y shSARA-GFP fueron inmunomarcadas con el anticuerpo anti- $\beta$ III-Tub para identificar los axones. A 48 hs, la mayoría de las neuronas silenciadas para SARA mostraron axones mucho más largos que las control (**Figura 7 A**).

Las mediciones cuantitativas confirmaron estas observaciones y revelaron que la supresión de SARA produce un aumento significativo en la longitud axonal promedio con respecto al control, siendo de  $950 \pm 110 \mu\text{m}$  en neuronas shSARA y  $640 \pm 73 \mu\text{m}$  en shScramble (**Figura 7 B**), resultando un incremento relativo de 35 % en la longitud promedio. A su vez, el axón más largo por neurona, también fue significativamente mayor (shScramble  $910 \pm 101 \mu\text{m}$  y shSARA  $1290 \pm 143 \mu\text{m}$ ; **Figura 7 C**). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en el número axonal por célula al suprimir SARA (**Figura 7 D**).

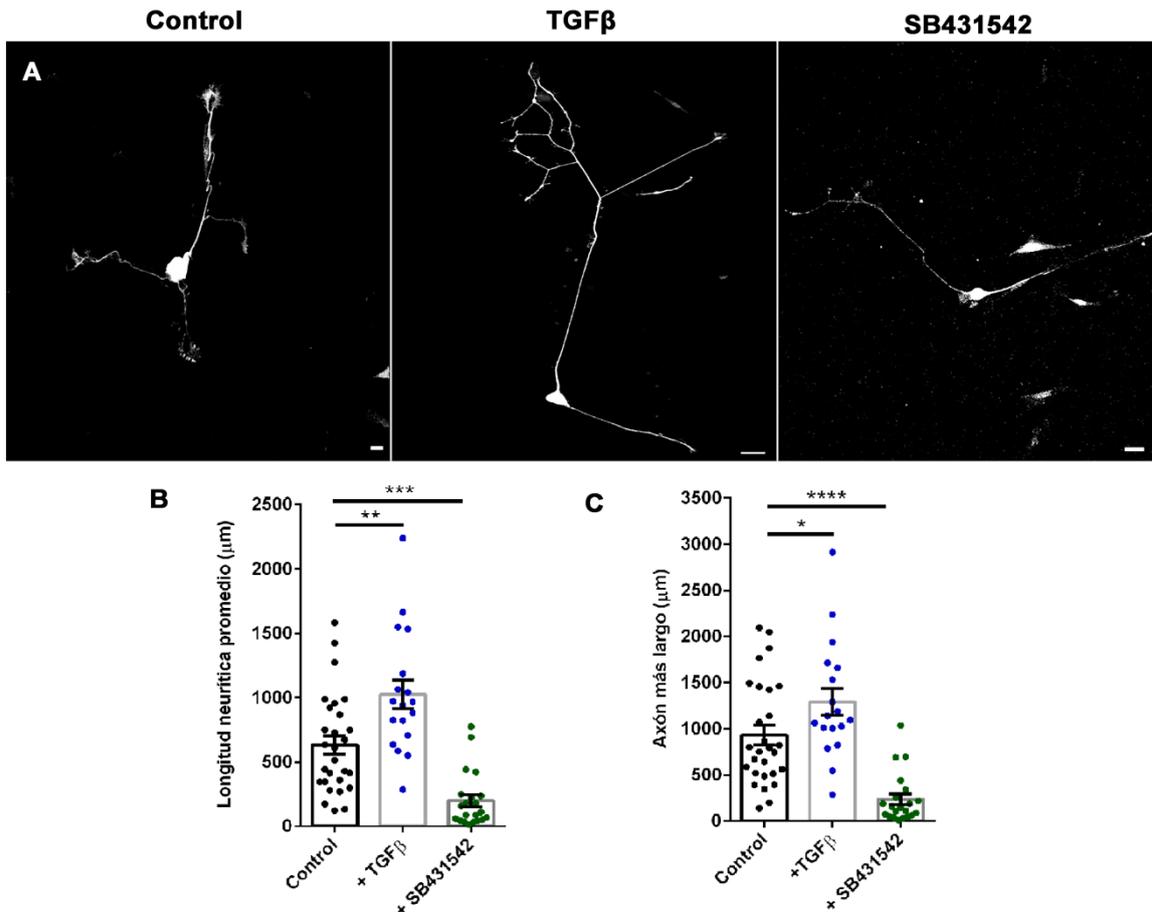
En conjunto estos resultados sugieren que el silenciamiento de SARA promueve el crecimiento de axones en neuronas DRGs embrionarias, y constituyen el primer indicio de que SARA es un regulador de la morfología y el desarrollo neuronal en SNP.



**Figura 7. Efecto del knockdown de SARA sobre la morfología axonal en neuronas DRG embrionarias.** Imágenes representativas de neuronas DRG electroporadas con shScramble-GFP y shSARA-GFP. Las neuronas fueron mantenidas por 2 DIV e inmunomarcadas con anticuerpos anti-SARA y anti- $\beta$ III-Tub (A). Cuantificación de la longitud axonal promedio (B), longitud del axón más largo (C), y número de axones por neurona (D). Los resultados representan la media de cuatro cultivos independientes ( $n = 4$ ). Las flechas cian indican los procesos neuronales en los cuales se cuantificó el crecimiento axonal; la flecha roja indica el axón más largo. \*  $p < 0,05$ . Escala:  $20\mu\text{m}$ .

### 3. Participación de la vía de TGF $\beta$ en el crecimiento axonal de DRG embrionarias

A continuación exploramos los efectos de la estimulación o inhibición de la señalización por TGF $\beta$  en el crecimiento axonal de neuronas DRG embrionarias. Para esto, neuronas sensoriales electroporadas con shScramble de 1 DIV, fueron tratadas por 24 hs adicionales con TGF $\beta$  exógeno (en la figura mencionado como +TGF $\beta$ ) o con el inhibidor selectivo del T $\beta$ RI, SB431542 (**Figura 8 A**), por lo tanto los análisis morfológicos se realizaron sobre DRGs de 2 DIV.



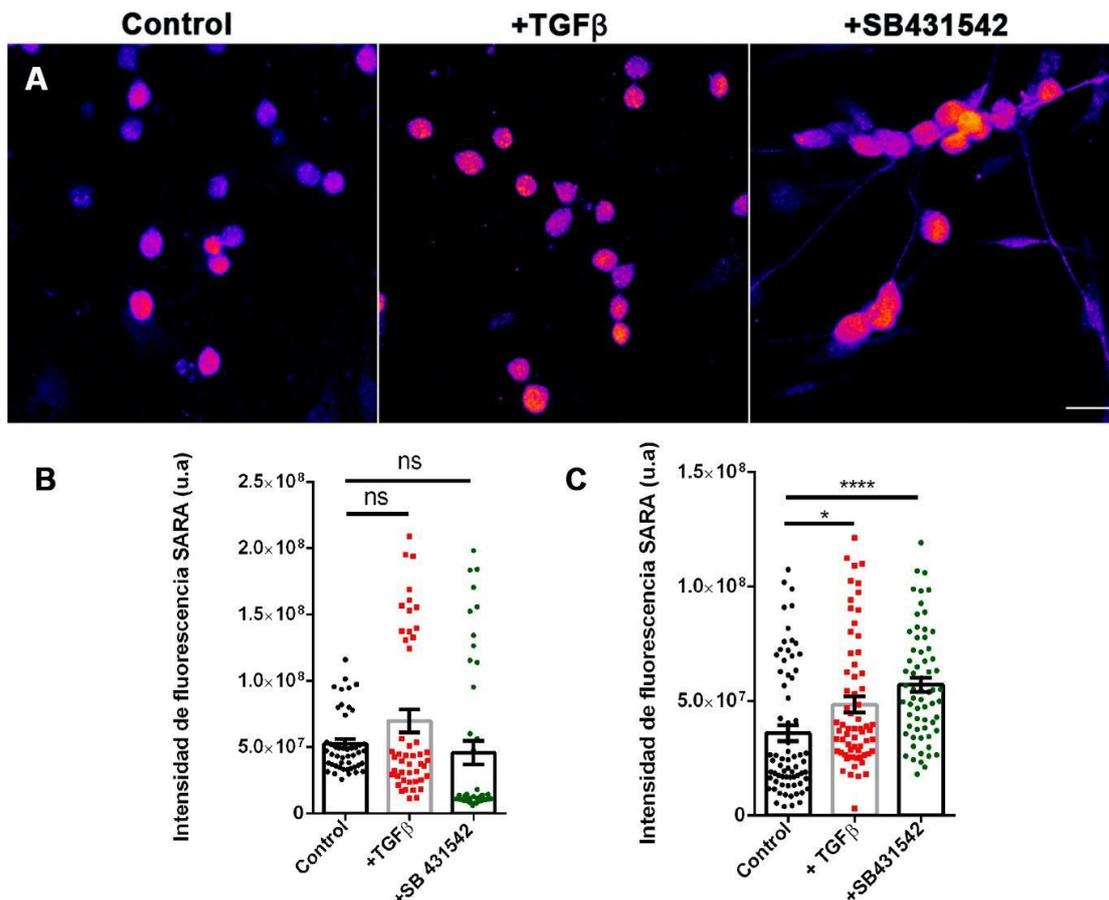
**Figura 8. Contribución de la vía de señalización de TGFβ en la elongación axonal en neuronas DRG embrionarias.** Imágenes representativas de neuronas DRG embrionarias tratadas con TGFβ o SB431542. Las células fueron inmunomarcadas para βIII-Tub para cuantificar el crecimiento axonal (A). Cuantificación de la longitud axonal promedio (B) y axón más largo (C) en neuronas para cada condición. \* $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*\* $p < 0,001$  respecto al control. Los resultados representan la media de  $n = 3$  cultivos independientes. Escala =  $2\mu\text{m}$ .

Como se esperaba, el tratamiento con TGFβ incrementó el crecimiento axonal promedio ( $1020 \pm 470 \mu\text{m}$ ) en comparación con el control ( $630 \pm 380$ ). El efecto contrario se observó al bloquear la señalización de TGFβ con SB431542, resultando una menor extensión neurítica ( $200 \pm 214 \mu\text{m}$ ) con respecto al control (**Figura 8 B**). Similares resultados se obtuvieron al cuantificar la longitud del axón más largo, la cual aumentó en promedio un 35% al agregar TGFβ ( $1290 \pm 628 \mu\text{m}$ ) en relación a neuronas control ( $930 \pm 560 \mu\text{m}$ ), mientras que la longitud se redujo considerablemente al tratar con SB431542 ( $230 \pm 270 \mu\text{m}$ ) (**Figura 8 C**). Estos resultados indican que TGFβ es capaz de impulsar la diferenciación y el crecimiento axonal, considerando que, tanto la inducción exógena o inhibición de la vía con SB431542 afectan la elongación axonal.

#### 4. Relación funcional entre SARA y la vía de TGF $\beta$ durante el desarrollo de neuronas DRG embrionarias

Teniendo en cuenta los resultados preliminares del laboratorio, respecto de la colocalización e interacción de SARA con T $\beta$ RI, y la contribución de ambos en el crecimiento neurítico, se estudió luego la dependencia de los niveles citoplasmáticos de SARA con la actividad de la vía TGF $\beta$  a tiempos cortos de desarrollo. Para esto, neuronas DRG embrionarias con 24 hs post-plaqueo fueron tratados con TGF $\beta$  (2 ng/ml) o SB431542 (10  $\mu$ M) y fijadas a 1 h y 24 hs post-tratamiento. Los niveles de expresión de SARA en ambos tiempos se estimaron mediante la cuantificación de la intensidad de fluorescencia en el soma (**Figura 9 A**).

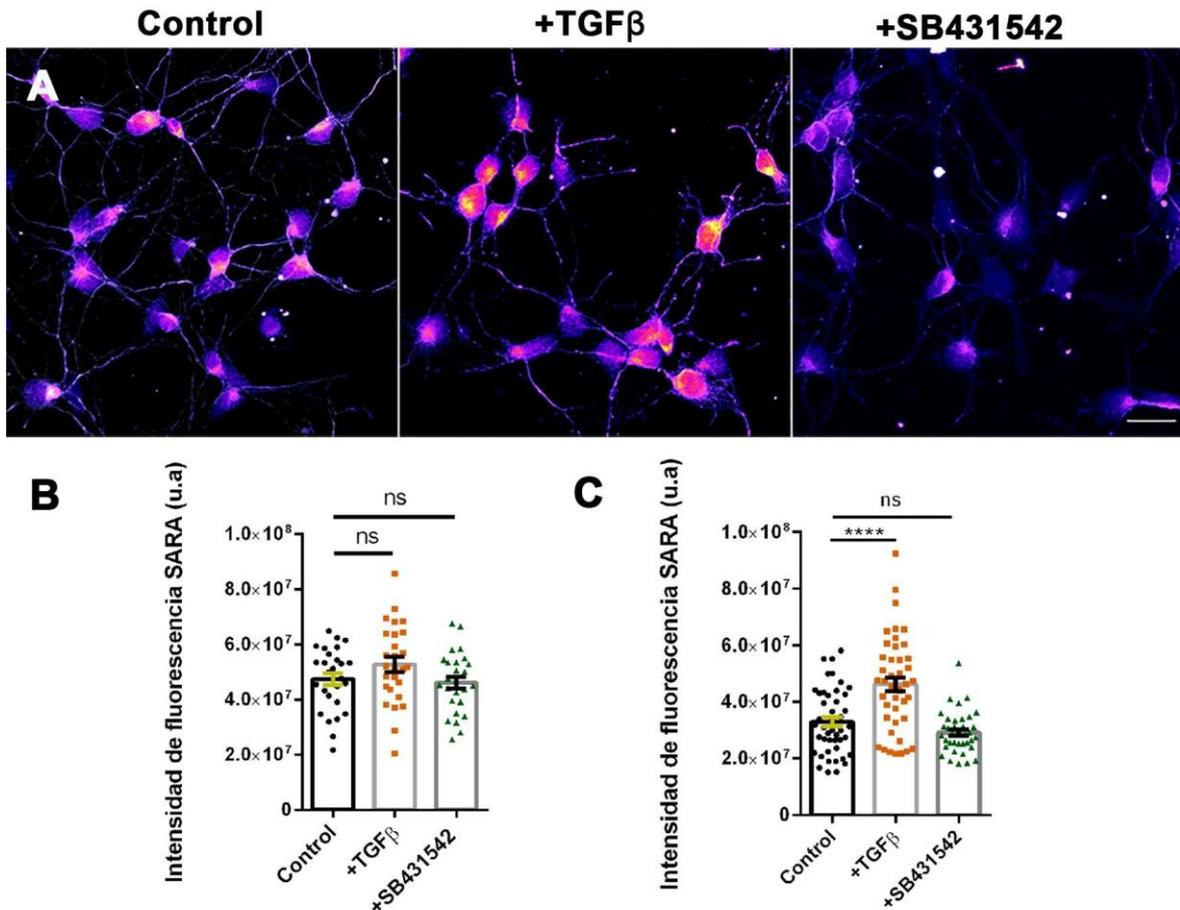
Como se muestra en la **Figura 9 C**, el tratamiento con TGF $\beta$  durante 24 hs produjo un aumento significativo de la intensidad de fluorescencia de SARA con respecto a neuronas no tratadas. Curiosamente, la inhibición de la señalización con SB431542, también produjo este incremento en los niveles de SARA. Cabe mencionar que a tiempos cortos de tratamiento (1 h) no se encontraron cambios significativos en la expresión de SARA, entre las neuronas control y las tratadas con TGF $\beta$  o SB431542 (**Figura 9 B**).



**Figura 9. Expresión endógena de SARA en neuronas DRG embrionarias tratadas con TGF $\beta$  o SB431542.** Se muestra en Fire – LUT para facilitar la visualización de los niveles de inmunofluorescencia de SARA en los somas neuronales (A). Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en neuronas DRG tratadas con TGF $\beta$  o SB431542 por 1h (B) y 24 hs (C). Se analizaron un total de 47 neuronas en (B) y 65 neuronas en (C). \*p < 0,05;\*\*\*p < 0,001 con respecto al control. Escala: 20 $\mu$ m.

Considerando que se predecía que el inhibidor SB431542 iba a generar una reducción en la expresión endógena de SARA al inactivar la señalización de TGF $\beta$ , se decidió luego realizar el mismo experimento con neuronas hipocampales embrionarias. En este modelo, nuestro grupo demostró la participación de SARA como regulador negativo de la vía de TGF $\beta$  utilizando diversas herramientas (Rozés-Salvador et al., 2020). Sin embargo, la expresión endógena basal de SARA frente a la estimulación o inhibición farmacológica de TGF $\beta$  no había sido analizada. Este experimento permitiría hacer una comparación entre los dos modelos para entender cómo el inhibidor SB431542 estaba actuando. Para esto, neuronas hipocampales de 1 DIV fueron tratadas con TGF $\beta$  o SB431542 y luego inmunomarcadas para cuantificar la intensidad de fluorescencia de SARA a nivel del soma (**Figura 10 A**). Nuevamente, a 1h post-adición de TGF $\beta$  no se encontró un cambio diferencial, aunque a 24 hs de tratamiento se observó un incremento significativo en la expresión de SARA con respecto al control, similar a lo obtenido en DRGs embrionarias. Frente al tratamiento con el inhibidor, y a diferencia de lo encontrado en neuronas DRG, hubo una disminución leve y no significativa en la expresión de SARA, entre SB431542 y control, en ambos tiempos (**Figura 10 C**).

Estos resultados sugieren que la expresión de SARA está asociada y modulada a la señalización activa del TGF $\beta$ , ya que la inducción exógena con el ligando produjo un aumento de la expresión endógena de SARA en ambos modelos neuronales. No obstante, existen discrepancias en el efecto que produce la inhibición de la vía, especialmente en neuronas DRG donde se obtuvo lo opuesto a lo esperado frente al tratamiento con SB431542. Este resultado será analizado y discutido más adelante.

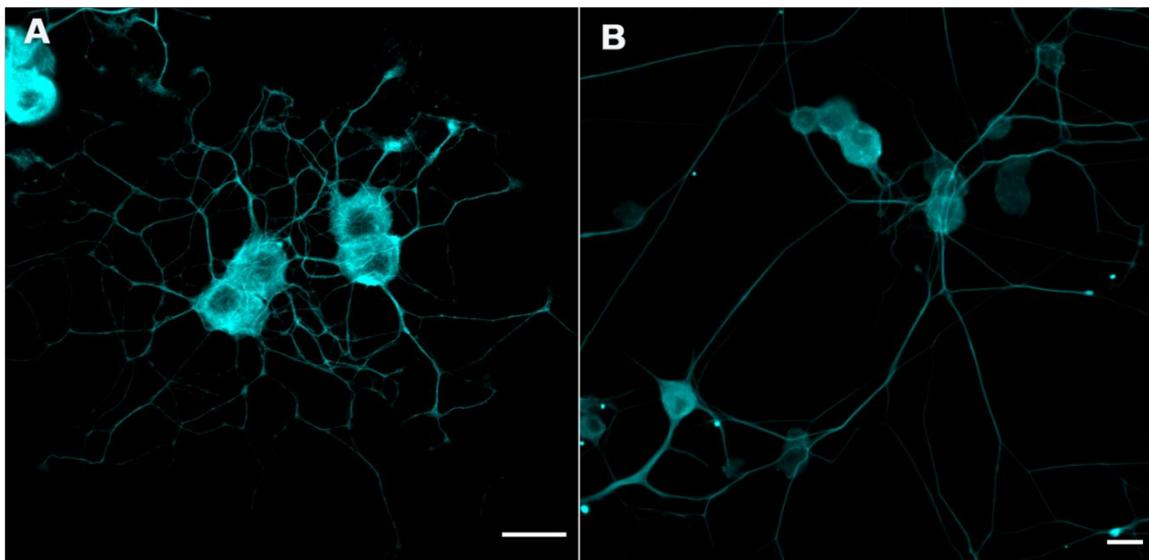


**Figura 10. Expresión endógena de SARA en neuronas hipocámpales frente a la modulación de la vía de TGFβ.** (A). Imágenes representativas de la expresión endógena de SARA en neuronas hipocámpales tratadas con TGFβ o SB431542. Se muestra en Fire – LUT para facilitar la visualización de los niveles de inmunofluorescencia de SARA en los somas. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de SARA en el soma de neuronas tratadas por 1h (B) y 24 hs (C). Se analizaron un total de 50 neuronas por cada condición para un n = 1 cultivo. \*\*\*\*p < 0,001; ns = no significativo con respecto al control. Escala: 20um.

### 5. Contribución de la vía de TGFβ en neuronas DRG postnatales

Como se mencionó en la introducción, el cultivo de neuronas DRG postnatales, constituye un modelo utilizado para los ensayos de regeneración *in vitro* (Lee et al.,2021). Con este fin comenzamos a trabajar con este modelo. Para caracterizar el cultivo, y teniendo en cuenta el fenotipo de dichas neuronas a tiempos cortos de cultivo (Rozés-Salvador et al., 2016), analizamos neuronas a 5 hs y 24 hs post-plaqueo. Cabe destacar que una característica que tiene estas neuronas a tiempos cortos, es la presencia de conos de crecimientos grandes y bien definidos. El cono de crecimiento es una estructura que se forma en el extremo distal del axón que le permite crecer y elongarse (Dent et al., 2011). Dentro del mismo se pueden diferenciar tres zonas o dominios basadas en la organización del citoesqueleto: i) el dominio C o central, formado fundamentalmente por microtúbulos (MTs) estables, ii) la zona T o de transición, ocupada por microtúbulos dinámicos, y por

último iii) el dominio P o periférico, donde se encuentran la red de filamentos de F-actina que forman la lamela y desde allí se extienden los filopodios, cuya función es sensor y explorar hacia dónde se dirigirá el axón. La dinámica de estos componentes del citoesqueleto determina el crecimiento en forma de cono (Lowery et al., 2009). Luego de 5 hs de plaqueo, las neuronas sensoriales presentaron numerosos axones, algunos ramificados y con grandes conos de crecimiento (**Figura 11 y Figura 12 A**). Por otro lado, a las 24 hs post-plaqueo (1 DIV) las neuronas desarrollaron una extensa red de axones (**Figura 11**). En base a estas condiciones de cultivo establecidas, con las cuales obtuvimos una óptima densidad y adherencia celular, se continuó con los experimentos propuestos para este proyecto.



**Figura 11. Cultivo primario de neuronas sensoriales postnatales.** Imágenes representativas de neuronas DRG disociadas y cultivadas por 5 hs (A) y 24 hs (B). Las neuronas fueron inmunomarcadas para  $\beta$ -III-Tubulina (color cyan). Escala = 20 $\mu$ m.

## **6. La modulación farmacológica de la vía de TGF $\beta$ reduce el tamaño de los conos de crecimiento y aumenta la complejidad morfológica.**

Siguiendo la misma línea de los experimentos realizados en DRGs embrionarias, nos propusimos analizar la contribución de la vía de TGF $\beta$  sobre el re-crecimiento axonal. Para esto, realizamos un análisis morfométrico en DRG posnatales a tiempos cortos de cultivo (5 hs *in vitro*).

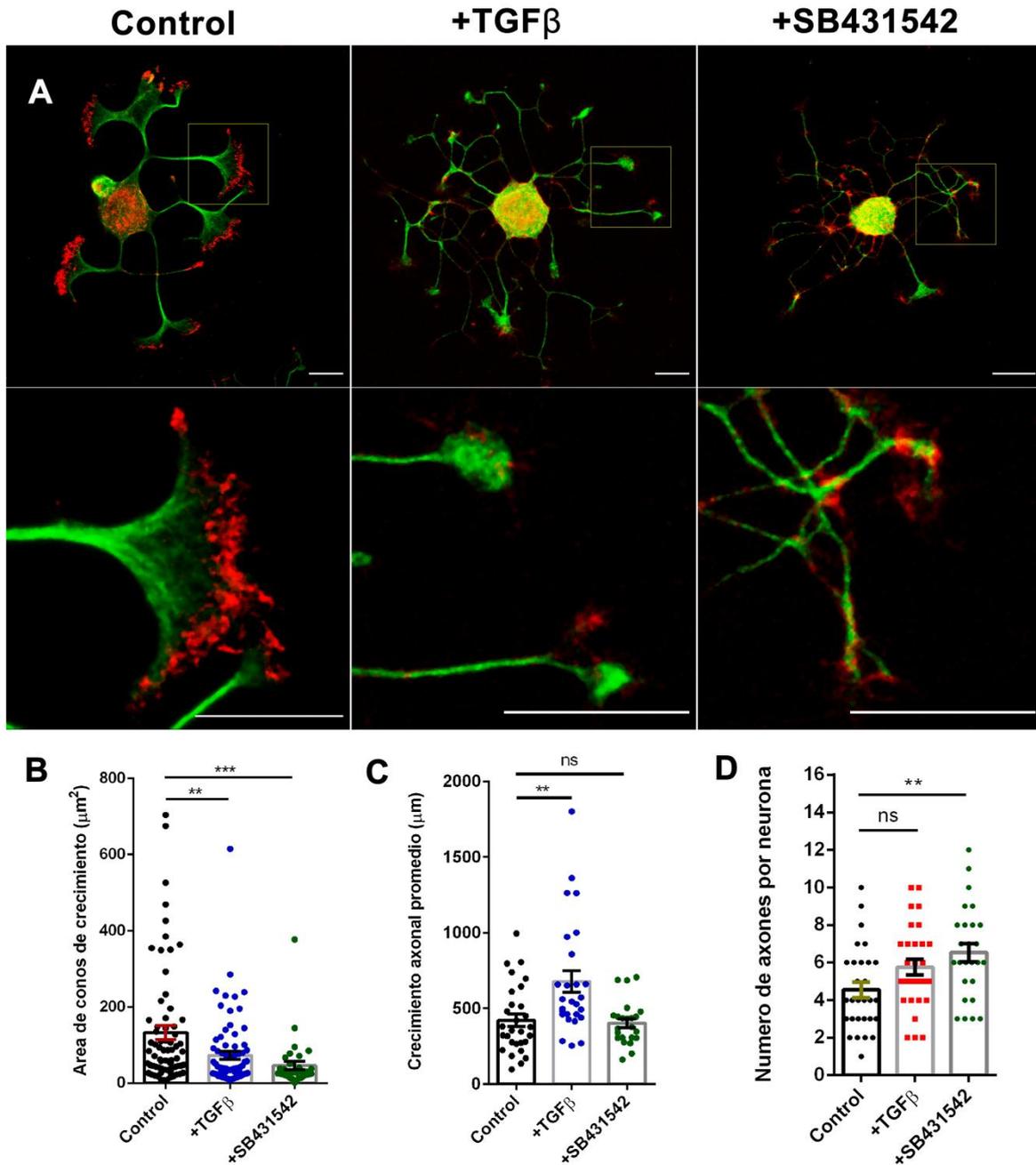
En primer lugar, examinamos el efecto de TGF $\beta$  sobre la morfología de los conos de crecimiento, como indicador del potencial de regeneración inicial de las neuritas. Las neuronas control presentaron en su mayoría axones con conos de crecimiento bien definidos, con dominios C y T claros ocupados por microtúbulos, seguidos de filamentos de actina formando el dominio P compuesto por lamela y filopodios (**Figura 12 A -**

**Control-**). Este patrón cambió al tratar las DRGs con TGF $\beta$  o SB431542, ya que mostraron mayor proporción de conos en los que no se podía definir la zona de lamela como tal, sino sólo algunos filopodios y de menor tamaño que las DRGs control (**Figura 12 A - TGF $\beta$  - SB431542**). Esto último se corroboró al estimar el área ocupada por el citoesqueleto de microtúbulos, en los conos de crecimiento por cada condición. La cuantificación indicó que las neuronas tratadas con TGF $\beta$  exhiben, en promedio, axones con conos de crecimiento de menor tamaño ( $73 \pm 10,2 \mu\text{m}^2$ ) con respecto al control ( $133 \pm 18,4 \mu\text{m}^2$ ) (**Figura 12 B**). A su vez, al bloquear la señalización de TGF $\beta$  (+SB431542), la reducción promedio del área de los conos de crecimiento fue aún más drástica ( $46,6 \pm 11,2 \mu\text{m}^2$ ) en comparación con neuronas control (**Figura 12 B**).

Acompañando esta disminución en el tamaño de los conos de crecimiento, las neuronas tratadas con TGF $\beta$  mostraron un crecimiento axonal promedio significativamente mayor ( $677 \pm 72 \mu\text{m}$ ), comparado al crecimiento obtenido en las neuronas no tratadas ( $421 \pm 42 \mu\text{m}$ ). En contraposición, cuando se bloqueó la vía de señalización la diferencia con las neuronas control se hizo nula ( $402 \pm 30 \mu\text{m}$ ) (**Figura 12 C**). En suma, estos resultados sugieren que TGF $\beta$  tiene un efecto promotor de la elongación neurítica similar a DRGs embrionarias.

TGF $\beta$  también produjo un aumento, aunque no significativo, en el número de axones por neurona ( $5,7 \pm 2,2$  axones/célula) versus el control ( $4,5 \pm 2$  axones/célula). Curiosamente, dicho efecto se potenció de manera significativa al bloquear la señalización con SB431542 ( $6,5 \pm 2,4$  axones/célula) (**Figura 12 D**).

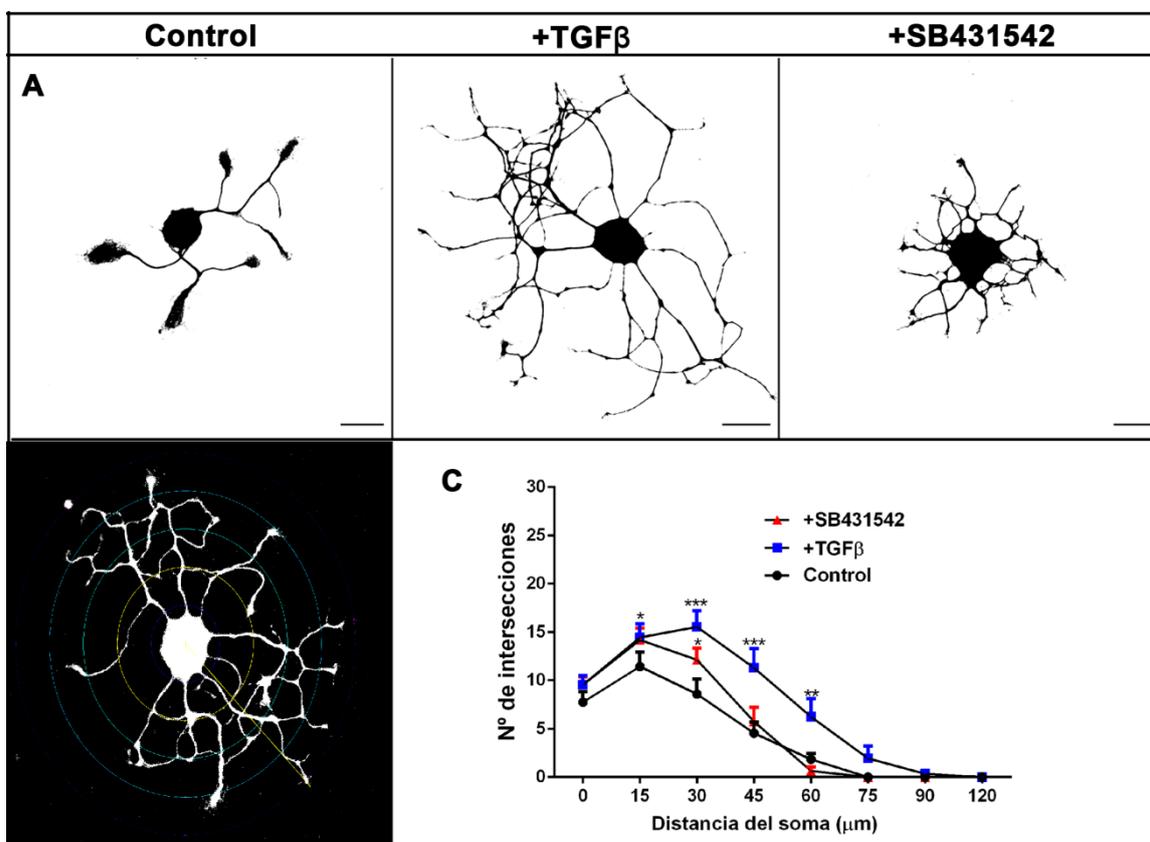
Por otra parte, también se evaluó la contribución de TGF $\beta$  a la complejidad axonal y las consecuencias de su inactivación con el inhibidor SB431542 durante la morfogénesis neuronal temprana. Realizando un análisis de Sholl se cuantificó la complejidad de la ramificación axonal en cada condición. Neuronas estimuladas con TGF $\beta$  durante 5 hs mostraron un mayor número de intersecciones (ramificación axonal) hasta un radio de 60  $\mu\text{m}$  desde el soma, en comparación con las neuronas control (**Figura 13 A -TGF $\beta$ - y C**). Esto sugiere que TGF $\beta$  induce el desarrollo de una arborización más compleja, lo que complementa los resultados de mayor número y longitud axonal después de activar la vía con dicho factor.



**Figura 12. Efecto de la modulación de la vía de TGFβ sobre la morfología y crecimiento axonal en neuronas sensoriales postnatales.** Imágenes representativas de neuronas DRG tratadas con TGFβ o SB431542 por 5 hs. Las neuronas fueron inmunomarcadas con anticuerpos contra β-III-Tubulina (verde) y actina filamentos (falloidina; rojo). Los recuadros muestran un zoom al cono de crecimiento (A). Cuantificación del área de los conos de crecimiento (B), longitud de crecimiento axonal (C), y del número de axones por neurona (D) luego de 5 hs de tratamiento con TGFβ ó SB431542. ns = no significativo; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ . Alrededor de 70 conos se analizaron por condición y 35 neuronas. Escala =  $20\mu\text{m}$ .

En cuanto a las neuronas tratadas con SB431542, también tuvieron mayor ramificación pero a distancias axonales cortas (hasta  $30\mu\text{m}$ ) con respecto al control, ya que luego la tendencia se volvió no significativa (Figura 13 A -SB431542- y C). Es decir, tanto el tratamiento con TGFβ como con SB431542 aumentan la complejidad y ramificación de los axones. Sin embargo, dicha ramificación presenta características diferentes ya que la

estimulación con TGF $\beta$  genera neuronas con axones más largos y ramificados, mientras que la inhibición con SB431542 genera neuronas con axones ramificados, pero significativamente más cortos (**Figura 13 C**).



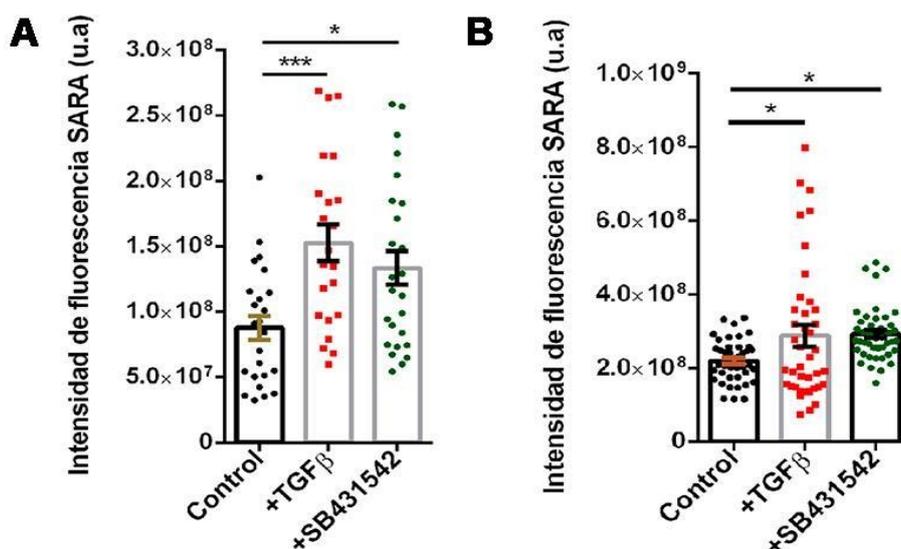
**Figura 13. Analisis de la complejidad del crecimiento axonal en neuronas DRG postnatales frente a la modulación de la vía de TGF $\beta$ .** Imágenes representativas utilizadas en el análisis de Sholl de neuronas DRG tratadas con TGF $\beta$  o SB431542 por 5 hs e inmunomarcadas con  $\beta$ -III-Tubulina (A). Imagen representativa de los radios de intersección definidos desde el soma hasta 120  $\mu\text{m}$  de neuritas para el análisis de arborización neurítica (B). Cuantificación del número de intersecciones (ramificaciones) obtenidos del análisis de Sholl en neuronas control, o tratadas con TGF $\beta$  o SB431542 (C). Se analizaron 35 neuronas por condición. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Escala = 20  $\mu\text{m}$ .

En conjunto, estos resultados sugieren que TGF $\beta$  participa en el crecimiento axonal de las neuronas postnatales, al incrementar la elongación y ramificación de los axones. Así, nuestras observaciones refuerzan la hipótesis de la participación de esta vía de señalización durante la extensión axonal y entorno regenerativo.

### 7. El efecto de TGF $\beta$ sobre el crecimiento de DRGs postnatales va acompañado de mayor expresión de SARA

A partir de los resultados obtenidos mostrando el efecto promotor de TGF $\beta$  en la elongación y ramificación axonal en neuronas posnatales, nos propusimos analizar si la expresión de SARA se modifica al activar la vía de TGF $\beta$ , como ocurrió en DRGs embrionarias. Para esto, neuronas sensoriales tratadas por 5 y 24 hs con TGF $\beta$  o SB431542

fueron inmunomarcadas para SARA. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia de SARA a nivel del soma, como indicador indirecto de los niveles endógenos de SARA al estimular o bloquear la vía de señalización (**Figura 14**). El tratamiento con TGF $\beta$  por 5 hs generó un incremento significativo en los niveles de intensidad de fluorescencia de SARA con respecto a neuronas control. Análogamente, las células tratadas con SB31542 también mostraron un aumento en la expresión de SARA con respecto al control (**Figura 14 A**), repitiendo el resultado obtenido en DRG embrionarias. Los mismos resultados fueron obtenidos cuando al medir los niveles de expresión de SARA a 24 hs (**Figura 14 B**). En conjunto, estos datos muestran un aumento en la expresión de SARA como consecuencia de la modulación de la vía de señalización de TGF $\beta$ . Sin embargo quedan planteados interrogantes sobre el efecto del inhibidor ya que nuevamente encontramos un efecto contrario a lo esperado.



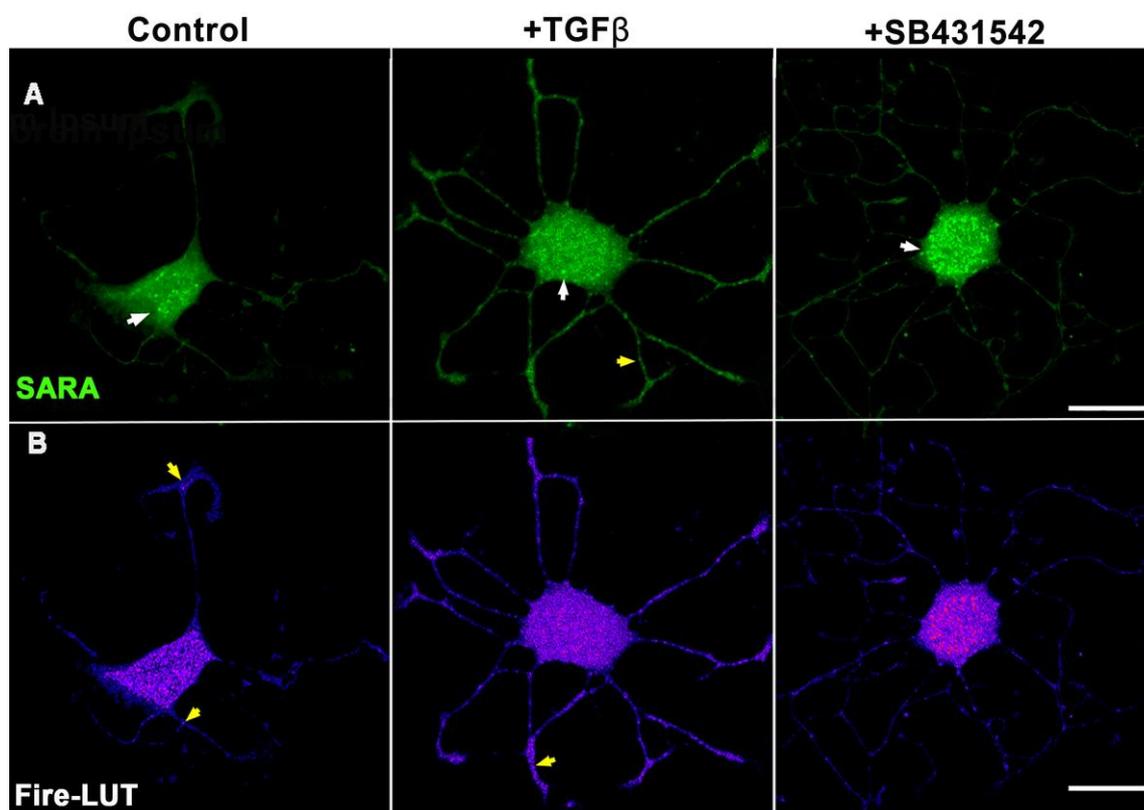
**Figura 14. Expresión endógena de SARA en neuronas sensoriales postnatales.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de SARA en neuronas tratadas con TGF $\beta$  o SB431542 por 5 hs (A) y 24 hs (B). \*p < 0,05; \*\*\* p < 0,005. Un total de 25 neuronas fueron analizadas por condición a 5 hs y 40 células a 24 hs de n = 2 cultivos independientes.

## 8. La modulación de la vía de TGF $\beta$ afecta la distribución y número de endosomas SARA.

Como se describió en la introducción, la localización subcelular de SARA es asociada a endosomas tempranos (EEs), donde cumple una función regulatoria en la distribución de componentes endocitados, incluyendo el complejo receptor activado T $\beta$ RI. En relación a esto, en células immortalizadas embrionarias de riñón humano (HEK), la inhibición de la

vía de TGF $\beta$  puede afectar la endocitosis de los receptores, y esto podría alterar la estequiometría de los endosomas en los que SARA localiza (Runyan et al., 2009).

Teniendo esto en cuenta, examinamos si el incremento en los niveles de expresión de SARA inducida por SB431542, se producía a través de una alteración en la distribución o número de endosomas. Luego de 5 hs de tratamiento con TGF $\beta$  o SB431542, las neuronas DRG postnatales fueron fijadas e inmunomarcadas para SARA y  $\beta$ -III-Tubulina (**Figura 15**). Para cuantificar la cantidad de endosomas SARA positivos, se generó una máscara binaria (**Figura 15 A**), definiendo como tamaño mínimo de vesículas a analizar, 3 nm, para luego estimar la proporción total de éstas en el soma y axones.

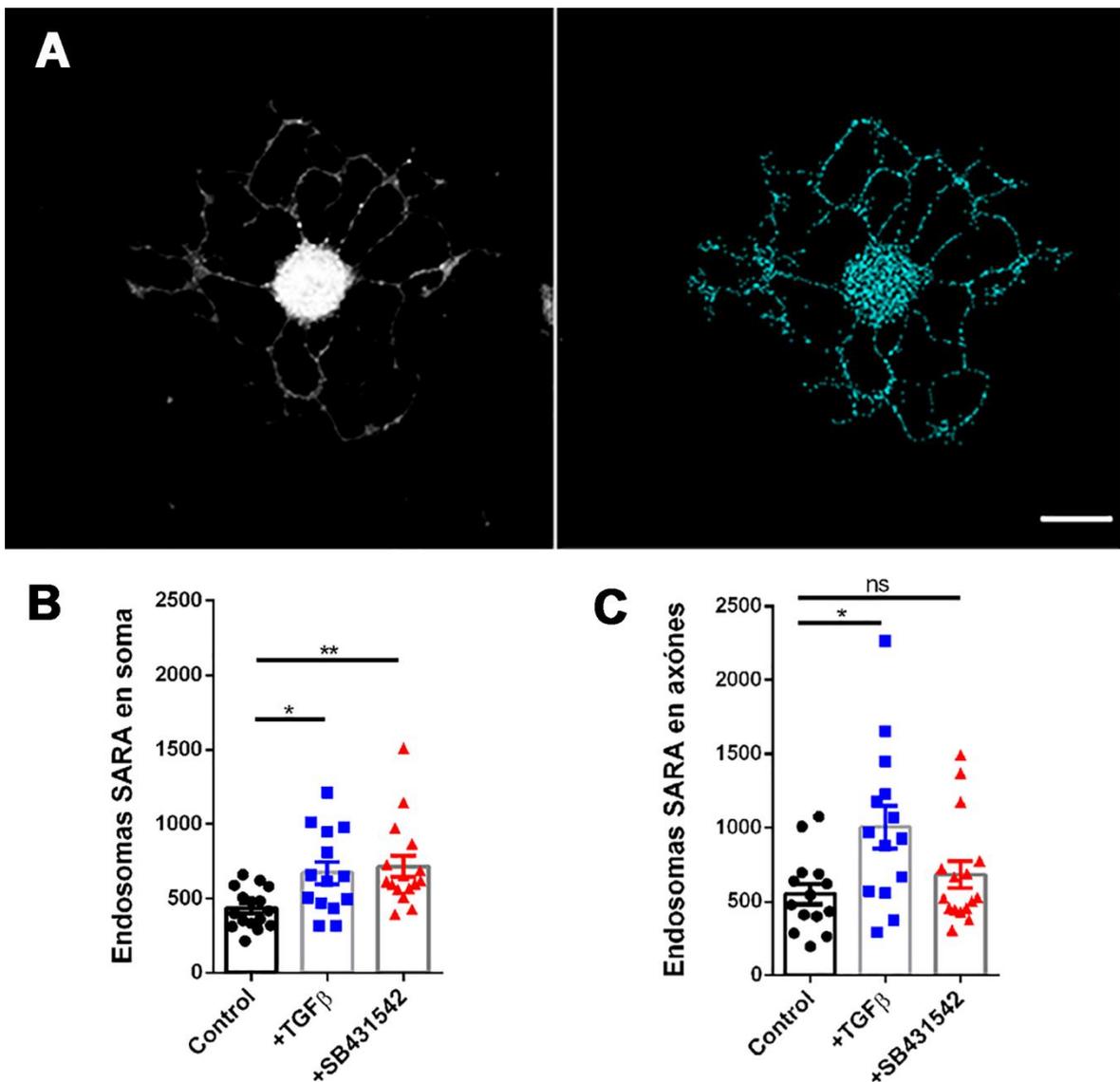


**Figura 15. Distribución de endosomas SARA en neuronas DRG postnatales frente a la modulación de la vía de TGF $\beta$ .** Imágenes representativas de neuronas DRG controles y tratadas con TGF $\beta$  o SB431542, e inmunomarcadas contra SARA (A) y en pseudo color (B; Fire LUT). Las flechas blancas indican endosomas a nivel del soma y las flechas amarillas aquellas localizadas en axones. Escala = 20  $\mu$ m.

Los resultados obtenidos mostraron que en células controles los endosomas SARA se distribuyen mayoritariamente en el soma, y si bien también se encuentran en axones, se observan enriquecidos en los conos de crecimiento (**Figura 15**; flechas amarillas). Al estimular la vía con el agregado de TGF $\beta$ , los endosomas SARA se enriquecen en el soma ( $673,3 \pm 74,5$ ) y principalmente en el dominio axonal ( $1005 \pm 131,4$ ) (**Figura 16 B y C**). Curiosamente, frente a la inhibición de la vía, encontramos mayor número de endosomas en el soma ( $715,5 \pm 71,5$ ) comparado con las neuronas control ( $432,8 \pm 33,1$ ) (**Figura 16**

**B**), sin haber diferencias significativas con los endosomas presentes en los axones ( $680,5 \pm 89,6$ ), con respecto al control ( $552 \pm 69,4$ ) (**Figura 16 C**).

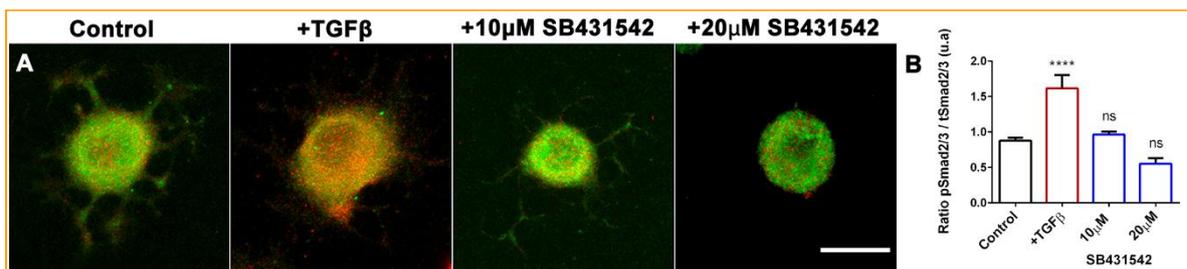
En conjunto estos resultados sugieren que, TGF $\beta$  estimula el crecimiento axonal de neuronas posnatales. Ese efecto estaría asociado a un aumento en el nivel endógeno de SARA, a un aumento en la cantidad y/o a un cambio en la distribución de endosomas en los que SARA se localiza. Por otro lado, el aumento en la expresión de SARA, encontrado en neuronas tratadas con SB431542, podría ser explicado teniendo en cuenta estos cambios observados en la distribución de endosomas SARA.



**Figura 16. Distribución de endosomas SARA en neuronas DRG postnatales frente a la modulación de la vía de TGF $\beta$ .** Imágenes representativas de la máscara realizada para la cuantificación de endosomas SARA positivos en neuronas DRG postnatal a 5 hs de cultivo (A). Cuantificación de la cantidad de endosomas SARA positivos en el soma neuronal (B) y en los procesos axonales (C). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; ns = no significativo. Se analizaron 15 neuronas por condición de  $n = 1$  cultivo. Escala = 20  $\mu\text{m}$ .

## 9. La señalización de la vía de TGFβ en DRGs posnatales se asocia con cambios en la fosforilación de Smad2/3.

Una de las hipótesis que nos planteamos era que al inhibir el TβRI con SB431542, la expresión de SARA podría disminuir con respecto a los controles dado que estamos inhibiendo toda la vía de señalización y en ese caso, SARA podría no ser necesaria. De hecho, ese fue el resultado que obtuvimos en neuronas hipocampales al medir la intensidad de fluorescencia de SARA (**Figura 10**). Sin embargo, en neuronas DRG postnatales, el SB431542 no sólo no disminuyó la expresión de SARA, sino que al contrario, se obtuvieron niveles más altos que cuando estimulamos la vía con TGFβ (**Figura 14**). Por esto, decidimos analizar la eficiencia del inhibidor en este modelo. Teniendo en cuenta que uno de los eventos claves de esta vía de señalización corresponde a la fosforilación de los factores Smad 2/3 (Massagué, J. 2012), decidimos cuantificar la relación entre los niveles de Smad 2/3 fosforilada/ Smad 2/3 total, como un indicador de activación de la vía. Como control extra, analizamos el efecto del SB431542 en 2 concentraciones: la usada a lo largo de este trabajo de tesina (10 μM) y el doble (20 μM) que si bien excede lo fisiológico, lo usamos como control extremo de eficiencia del inhibidor. Para esto, después de 1 h de plaqueadas, las neuronas DRG postnatales fueron tratadas bajo las siguientes condiciones: neuronas control; 1h de estimulación con TGFβ; o 30 min con SB431542 (10 ó 20 μM) y luego tratadas con TGFβ por 1 h, para evaluar la acción de SB431542 sobre la traducción de la señal TGFβ (**Figura 17 B**).



**Figura 17. Efecto de la modulación de la vía de TGFβ en la fosforilación de Smad 2/3 en neuronas sensoriales postnatales.** Cuantificación de la relación pSmad 2/3 / tSmad 2/3 en neuronas DRG control, tratadas con TGFβ, o con 10 μM SB431542 + TGFβ ó 20 μM SB431542 + TGFβ. Un total de 23 neuronas fueron cuantificadas por cada condición de n = 1 cultivo.

Tal como esperábamos, los niveles de fosforilación de Smad2/3 aumentaron significativamente con respecto al control en respuesta al tratamiento con TGFβ (ratio 1,62). La diferencia representó un incremento del 60% relativo al control (ratio 0,87) en pSmad 2/3 / tSmad 2/3, lo que corrobora la eficiencia en la activación río abajo de la señalización de TGFβ (**Figura 17 B**). Por otro lado, la concentración 10 μM de SB431542, utilizada en todos los experimentos con DRG embrionarias y postnatales, redujo la

fosforilación de Smad 2/3 y mostró una restauración en la relación pSmad 2/3 / tSmad 2/3 similar al control (ratio 0,96). Es decir, aún estimulando el receptor T $\beta$ RI, la presencia del inhibidor añadido previamente, evitó mayor activación de las R-Smad en las neuronas sensoriales. A su vez, con la concentración 20  $\mu$ M de SB431542, tal como esperábamos, se incrementó drásticamente el efecto observado (ratio 0,55) comparado con la concentración menor (10  $\mu$ M) y con respecto a neuronas control (**Figura 17 B**). Estos resultados sugieren que el SB431542 tuvo una acción dosis dependiente, de manera eficiente y adecuada para bloquear la vía de TGF $\beta$ .

## DISCUSIÓN

Las neuronas son células altamente especializadas con una morfología única, un gran tamaño y una longevidad sin precedentes. Estas características únicas, han dado lugar a muchas investigaciones sobre las adaptaciones moleculares y celulares que permiten la elaboración y mantenimiento de su morfología altamente polarizada (Britt et al., 2016; Yap y Winckler, 2012). Numerosos mecanismos y moléculas asociados al sistema endosomal y vías de señalización claves han sido descritos como partícipes del establecimiento neuronal (Bisbal et al., 2008; Sosa et al., 2006; Conde et al., 2010). Sin embargo, debido a la complejidad y alcance que dicho proceso significa, es constante la búsqueda de nuevos candidatos como reguladores de eventos críticos asociados al desarrollo. Es por esto que en el presente trabajo, nos focalizamos en estudiar la participación de SARA durante el desarrollo y regeneración de neuronas sensoriales.

### *SARA y TGF $\beta$ participan en el desarrollo de neuronas DRG.*

Como se describió en la introducción, nuestro grupo ha reportado que SARA es necesaria para el correcto establecimiento de la polaridad *in vitro* (Arias et al., 2015) y para el desarrollo de la corteza *in vivo* (Mestres et al., 2016). Más recientemente, hemos demostrado que la participación de SARA en estos procesos es modulando negativamente la señalización de TGF $\beta$  (Rozés-Salvador et al., 2020). A raíz de estos antecedentes, nos centramos en caracterizar la participación de SARA en el desarrollo embrionario de neuronas sensoriales, y si se encontraba asociada a la vía de señalización de TGF $\beta$ .

En primer lugar, confirmamos que SARA y el receptor T $\beta$ RI se expresan durante el desarrollo temprano de neuronas DRG. Determinamos que ambas proteínas se expresan en las primeras 24 hs de cultivo (Figura 3), y que colocalizan e interaccionan a nivel de los endosomas tempranos (EEs) (Figura 4). Esto es coincidente con lo reportado en SNC y líneas celulares (Rozés-Salvador et al., 2020; Tsukazaki et al., 1998; Itoh et al., 2002),

sugiriendo que SARA está involucrada en la vía de señalización de TGF $\beta$  a estadios tempranos de desarrollo de neuronas sensoriales.

A partir del análisis morfológico determinamos que SARA está implicada en el crecimiento axonal de neuronas DRG, ya que su silenciamiento produce mayor longitud axonal (Figura 7), en coincidencia con el efecto observado en neuronas hipocampales a partir del *knockdown* y/o *knockout* de SARA, sobre el crecimiento axonal (Arias et al., 2015). Además, en dicho trabajo se encontró que SARA es clave para mantener la polaridad neuronal *in vitro*, ya que neuronas hipocampales expresando shSARA, desarrollan axones supernumerarios, alterando el fenotipo normal de polaridad neuronal (un axón y numerosas neuritas/procesos menores; Cáceres et al., 2012; Arias et al., 2015). Un rasgo distintivo en neuronas sensoriales embrionarias, es que la supresión de SARA no alteró el número axonal; este resultado podría sugerir potenciales diferencias en el rol de SARA dependiendo del tipo neuronal.

Por otra parte, las neuronas sensoriales tratadas con dosis fisiológica de TGF $\beta$  mostraron mayor elongación axonal, y al bloquear la activación de T $\beta$ RI, las neuronas DRG desarrollaron axones de considerable menor extensión que neuronas controles (Figura 7). Esto es consistente con lo reportado por Yi et al. (2010) en SNC, donde la estimulación exógena con TGF $\beta$  produce una rápida elongación del axón.

**En suma, nuestros resultados aportan por primera vez evidencia que TGF $\beta$  es una señal clave en la estimulación del crecimiento neurítico durante el desarrollo embrionario de neuronas sensoriales.**

Previamente, en Rozés-Salvador et al., (2020) se evidencio que la expresión de una variante mutante SARA-F728A, que desactiva el reclutamiento de PP1c a T $\beta$ RI, produce axones más largos. Dicho efecto, además, es potenciado al añadir TGF $\beta$  exógeno y opuesto al agregar SB431542. Análogamente, en neuronas DRG nosotros observamos que el crecimiento axonal en neuronas tratadas con TGF $\beta$  y en las que expresaban shSARA (Figura 7), fue similar. En conjunto, esto podría indicar que el efecto de SARA sobre el desarrollo axonal podría estar asociado a la vía de TGF $\beta$ , contribuyendo así al crecimiento neurítico de neuronas sensoriales. Sin embargo, más estudios serán necesarios para determinar este vínculo funcional. De hecho, a futuro se analizará la morfología axonal frente a la sobreexpresión de SARA y la expresión de la variante mutante, con el fin de profundizar sobre la relación mecánica entre SARA y TGF $\beta$  en SNP.

A partir de los resultados mencionados en el párrafo anterior, nos propusimos examinar si existe una relación funcional entre la expresión de SARA y la señalización de TGF $\beta$  en neuronas DRG. Al medir niveles endógenos de expresión de SARA en neuronas tratadas con TGF $\beta$  o SB431542, no se alteraron los niveles de SARA en ninguna condición a tiempos cortos; sin embargo, a 24 hs de estimulación con TGF $\beta$ , se produjo un incremento en los niveles de expresión de SARA (Figura 9), observando la misma tendencia en neuronas hipocampales (Figura 10). **En conjunto, estos datos sugieren que los niveles citoplasmáticos de SARA estarían modulados por la señalización activa de TGF $\beta$ , durante el desarrollo de neuronas sensoriales.** Sin embargo, análisis mediante Western blot y/o de mRNA, serán necesarios para corroborar la expresión de SARA. En ese sentido, en el sistema nervioso no hay antecedentes que hayan analizado la expresión de SARA dependiente de TGF $\beta$ , aunque sí en líneas celulares. Runyan et al. (2009) constataron que células tratadas con 1ng/ml TGF $\beta$ , muestran una reducción en la expresión de SARA luego de 3 - 5 días de tratamiento, sin producirse dicho efecto frente al tratamiento con SB431542. Por otro lado, Bakkebo et al. (2012), probaron en líneas de  $\beta$ -linfomas que los niveles citoplasmáticos de SARA son independientes de la actividad señalizadora de TGF $\beta$ . Como se comentó en la introducción, la dinámica de SARA y TGF $\beta$  es contexto-dependiente, y lo descripto sugiere que la señalización puede diferir entre las líneas celulares y neuronas, incluso entre diferentes tipos neuronales.

La superfamilia de TGF $\beta$  señala a través de complejos receptores T $\beta$ RI/T $\beta$ RII, ambos serina/treonina quinasas. La molécula SB431542 se ha descripto como un inhibidor competitivo del sitio de unión al ATP (quinasa) de T $\beta$ RI e impide la fosforilación de Smad2 inducida por TGF $\beta$  (Inman et al., 2004). **Nuestros resultados sugieren que el bloqueo de T $\beta$ RI produce efectos diferenciales en neuronas embrionarias de DRG y neuronas hipocampales.** Tras 24 hs de tratamiento con SB431542, las neuronas sensoriales, incrementaron la expresión de SARA a pesar de la ausencia de señalización (Figura. 9). Por el contrario, en neuronas hipocampales, el efecto fue opuesto y similar a los niveles encontrados en células no tratadas (Figura 9). Estos datos plantean interrogantes sobre el inhibidor farmacológico usado, que serán abordados más adelante.

#### *Participación de SARA en un modelo de regeneración de neuronas sensoriales.*

Durante el procedimiento para aislar DRGs postnatales para cultivarlas *in vitro*, se eliminan las proyecciones nerviosas de cada ganglio, hecho que se describe como el momento en que se produce una lesión axonal en las neuronas sensoriales (Lee et al.,

2020). En este modelo celular, a la fecha no ha sido evidenciado qué rol tiene SARA y/o TGF $\beta$  en el proceso de regeneración axonal.

**Nuestros resultados sugieren que la estimulación exógena con TGF $\beta$  genera un entorno favorable al crecimiento regenerativo axonal.** A tiempos cortos (5 hs de tratamiento), encontramos que TGF $\beta$  incrementa sustancialmente el crecimiento neurítico (Figura 11), resultados coincidentes con lo hallado en neuronas dopaminérgicas (Knöferle et al., 2010). Interesantemente, este mayor re-crecimiento también estuvo asociado a una complejización en la ramificación proximal y distal del axón (Figura 12), siendo éste un patrón que no ha sido reportado en ninguno de los modelos neuronales.

El cono de crecimiento axonal es el extremo más distal del axón en “forma de abanico” y altamente dinámico, encargado de sensar y guiar la extensión del axón (Lowery et al., 2009). En este sentido, observamos que el agregado de TGF $\beta$  cambia la morfología y dinámica del citoesqueleto de los conos de crecimiento. La cuantificación de estas estructuras mostró que la estimulación con TGF $\beta$  produce una reducción en el área del cono, principalmente en dominio central y/o zona de transición formado por microtúbulos (Figura 12), respecto de neuronas control que presentan en general conos axonales de mayor tamaño, con mayor desarrollo en el área lamelar (Figura 12). La significancia biológica de este efecto causado por TGF $\beta$  no ha sido documentada en otros trabajos, aunque podría estar relacionada con un ritmo de crecimiento y ramificación acelerado en los axones. De hecho, se ha descrito que, tanto en SNC y SNP, el proceso de ramificación involucra la bifurcación de los conos de crecimiento en dos ramas, que continúan su crecimiento guiado hacia los *targets* específicos (Kalil et al; 2000; Lewis et al., 2013). En base a esto, una posibilidad que hipotetizamos es que TGF $\beta$ , al promover un rápido re-crecimiento y arborización de los axones, acelere todo el proceso de formación de los conos. Resultados similares muestran que el agregado de Reelina, proteína de la matriz extracelular, aumenta significativamente la longitud axonal de las neuronas DRG y la estructura de sus conos de crecimiento, favoreciendo una condición regenerativa (Jauroso & Marzolo, 2020). Cabe destacar que nuestros resultados fueron obtenidos en neuronas fijadas, y siendo los conos estructuras altamente dinámicas, serán necesarios estudios en el tiempo que permitan vincular estos cambios morfológicos y del citoesqueleto con la vía de TGF $\beta$ , y especialmente, con la actividad de SARA.

En sintonía con la importancia de la señalización de TGF $\beta$  en neuronas sensoriales, determinamos que al inhibir la vía, las neuronas presentan múltiples procesos neuríticos con alteraciones morfológicas visibles. Una extensión considerablemente menor y conos

de crecimiento alterados en tamaño y forma (Figura 12). Esto reafirma el hecho que la vía de TGF $\beta$  es necesaria para un óptimo crecimiento axonal en neuronas DRG disociadas.

A diferentes tiempos de crecimiento, **evaluamos cambios en la expresión de SARA en presencia o ausencia de estimulación con TGF $\beta$ .** De manera similar a lo observado en DRG embrionarias, frente al tratamiento con TGF $\beta$  en neuronas postnatales, observamos un aumento en los niveles de expresión de SARA, y cambio en la distribución de endosomas SARA. Éstos incrementaron su localización en el soma, y especialmente, en los procesos axonales. Esto último podría indicar que la estimulación del re-crecimiento axonal por TGF $\beta$  puede estar relacionado con una mayor demanda de tráfico para suplir las necesidades de moléculas y componentes de membrana necesarios para la elongación axonal (Pfenninger, K. 2009). Cuando inhibimos la vía, observamos una mayor concentración de endosomas SARA en el soma neuronal, pero sin alterarse la distribución de los mismos en los procesos axonales. A partir de estos resultados, hipotetizamos que la inhibición de T $\beta$ Rs en neuronas DRG, produce una disrupción en la localización del pool de endosomas SARA, y que podría dar cuenta del aumento de SARA en el soma de neuronas. Eventos similares ocurren en células PC12 al sobreexpresar Rab5 (proteína asociada a EEs), dado que mayor expresión de Rab5 genera un aumento en el pool de EEs a nivel del soma celular cuya consecuencia directa es la inhibición del crecimiento neurítico (Liu et al., 2007). Este punto plantea varios interrogantes: I) la inhibición de T $\beta$ Rs produce cambio de distribución de los endosomas SARA?, II) la inhibición de T $\beta$ Rs cambia la composición de dichos endosomas, es decir, siguen teniendo identidad de EEs?, III) el destino y función de los endosomas SARA se encuentra alterado? Futuros experimentos se avocarán a responder estas preguntas.

En conclusión, nuestros resultados aportan por primera vez evidencia de la función de SARA en el desarrollo embrionario de neuronas sensoriales. *In vitro* demostramos que tanto la supresión de SARA como la señal activa de TGF $\beta$  promueven el crecimiento axonal, complementando los hallazgos realizados en SNC por nuestro grupo. A su vez, en neuronas DRG postnatales, reportamos que TGF $\beta$  produce cambios morfológicos positivos para el desarrollo, estimulando la elongación y ramificación neurítica, y un cambio en el tamaño de los conos de crecimiento, durante la regeneración axonal. Además, encontramos que ocurren cambios en la expresión endógena y en la distribución de endosomas SARA de manera dependiente de TGF $\beta$ , sugiriendo una relación funcional entre SARA y TGF $\beta$  necesaria para el desarrollo y regeneración axonal en neuronas sensoriales.

## REFERENCIAS

- Arias, C.I., Siri, S.O. Conde, C. (2015). Involvement of SARA in Axon and Dendrite Growth. *PLoS ONE* 10(9): e0138792.
- Arimura, N., and Kaibuchi, K. (2007). Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 194–205.
- Bakkebø, M., Huse, K. et al. (2012). SARA is dispensable for functional TGF- $\beta$  signaling. *FEBS Letters* 586, 3367–3372.
- Bennett, D. and Alphey L. (2002). PP1 binds Sara and negatively regulates Dpp signaling in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet*, 31(4): p. 419-23.
- Bisbal, M., Conde, C., Flavia, D., Sesma, J. et al. (2008). Protein Kinase D Regulates Trafficking of Dendritic Membrane Proteins in Developing Neurons. *Journal of Neuroscience* 28 (37) 9297-9308.
- Bonifacino, J.S. and Neefjes, J. (2017). Moving and Positioning the Endolysosomal System. *Curr Opin Cell Biol.* 47: 1–8.
- Bottner, M., Krieglstein, K. and Unsicker, K. (2000). The Transforming Growth Factor- $\beta$ s: Structure, Signaling, and Roles in Nervous System Development and Functions. *J. Neurochem.*, Vol. 75, No. 6.
- Bradke, F., Fawcett, J. and Spira, M.E. (2012). Assembly of a new growth cone after axotomy: the precursor to axon regeneration. *Nature reviews – Neuroscience* Volume 13.
- Britt, D. J., Farías, G. G., Guardia, C. M., Bonifacino, J. S. (2016). Mechanisms of Polarized Organelle Distribution in Neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, Vol. 10.
- Cáceres, A., Ye, B., and Dotti, C.G. (2012). Neuronal polarity: Demarcation, growth and commitment. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 547–553.
- Campmany, L-G. and Marti, E. (2007). The TGF intracellular effector Smad3 regulates neuronal differentiation and cell fate specification in the developing spinal cord. *Development* 134, 65-75.
- Chang, H. M., Lin, Y. Y., Tsai, P. C., Liang, C. T., and Yan, Y. T. (2014). The FYVE domain of Smad anchor for receptor activation (SARA) is required to prevent skin carcinogenesis, but not in mouse development. *PLoS One* 9:e105299.
- Chuang, J., Zhao, Y., Sung, C-H. (2007). SARA-Regulated Vesicular Targeting Underlies Formation of the Light-Sensing Organelle in Mammalian Rods, *Cell*, Volume 130, Issue 3.
- Conde C. and Cáceres A. (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 319–332.
- Conde, C., Arias, C., Robin, M., et al. (2010). Evidence for the Involvement of Lfc and Tctex-1 in Axon Formation. *Journal of Neuroscience* 30 (19) 6793-6800.

- Coumailleau, F., Furthauer, M., Knoblich, J. A., and Gonzalez-Gaitan, M. (2009). Directional Delta and Notch trafficking in Sara endosomes during asymmetric cell division. *Nature* 458, 1051–1055.
- DaCosta Byfield, S., Major, C. Laping, N.J. and Roberts, A.B. (2004). SB-505124 Is a Selective Inhibitor of Transforming Growth Factor- $\beta$  Type I Receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Molecular Pharmacology* 65 (3) 744-752.
- de Luca, A.C., Faroni, A., Reid, A.J. (2015). Dorsal Root Ganglia Neurons and Differentiated Adipose-derived Stem Cells: An In Vitro Co-culture Model to Study Peripheral Nerve Regeneration. *J. Vis. Exp.* (96), e52543.
- Dent, E.W., Gupton, S. and Gertler, F. (2011). The Growth Cone Cytoskeleton in Axon Outgrowth and Guidance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a001800.
- Dobolyi, A., Vincze, C., Pál,G. and Lovas, G. (2012). The Neuroprotective Functions of Transforming Growth Factor Beta Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 8219-8258.
- Flanders, K. C., Ludecke, G., Engels, S. et al. (1991). Localization and actions of transforming growth factor's in the embryonic nervous system. *Development* 113: 183-191.
- Fogel-Petrovic, M., Long, J., Misso, N., et al. (2007). Physiological concentrations of transforming growth factor  $\beta$ 1 selectively inhibit human dendritic cell function, *International Immunopharmacology*, Volume 7, Issue 14.
- Haberberger, R.V., Barry, C., Dominguez, N. and Matusica, D. (2019). Human Dorsal Root Ganglia. *Front. Cell. Neurosci.* 13:271.
- Hausott, B. and Klimaschewski, L. (2016). Membrane turnover and receptor trafficking in regenerating axons. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 43, pp. 309–317.
- He, Z. and J, Y. (2016). Intrinsic Control of Axon Regeneration. *Neuron* 90, May 4.
- Horton, A.C. and Ehlers, M. (2003). Neuronal Polarity and Trafficking Review. *Neuron*, Vol. 40, 277–295.
- Hu, Y., Chuang, J., Xu, J., et al. (2002). SARA, a FYVE domain protein, affects Rab5-mediated endocytosis. *Journal of Cell Science* 115, 4755-4763.
- Inman, G. N., et al. (2002). SB-431542 Is a Potent and Specific Inhibitor of Transforming Growth Factor- Superfamily Type I Activin Receptor-Like Kinase (ALK) Receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* 62:65–74.
- Ishihara, A., Saito, H., and Abe, K. (1994). Transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 promote neurite sprouting and elongation of cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 639, 21–25.
- Itoh, F., Divecha, N., Brocks, L., Oomen, L., Janssen, H., Calafat, J., et al. (2002). The FYVE domain in Smad anchor for receptor activation (SARA) is sufficient for localization of SARA in

early endosomes and regulates TGFbeta/ Smad signalling. *Genes Cells* 7, 321–331. doi: 10.1046/j.1365-2443.2002.00519.x

Jausoro, I. and Marzolo, M.P. (2020). Reelin activates the small GTPase TC10 and VAMP7 to promote neurite outgrowth and regeneration of dorsal root ganglia (DRG) neurons. *J Neurosci Res.*00:1–15.

Kaech, S. and Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nature Protocols* Vol.1 N° 1.

Knöferle, J., Jan, R., Lars Tönges, K. Asif, A.R., Uwe, M. et al. (2010). TGF- $\beta$  1 enhances neurite outgrowth via regulation of proteasome function and EFABP. *Neurobiology of Disease*, Volume 38, Issue 3.

Kostaras, E., Pedersen, NM., Stenmark, H., Fotsis, T., Murphy, C. (2014). SARA and RNF11 at the crossroads of EGFR signaling and trafficking. *Methods Enzy mol* 535:225–247.

Kressmann, S., Campos, C., Castanon, I., Furthauer, M., Gonzalez-Gaitan, M. (2015). Directional Notch trafficking in Sara endosomes during asymmetric cell division in the spinal cord. *Nat Cell Biol* 17:333–339.

Lallemend, F. and Ernfors, P. (2012). Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons. *Trends in Neurosciences* Vol. 35, No. 6.

Lee, B., Cho, Y. (2021). Experimental Model Systems for Understanding Human Axonal Injury Responses. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 474.

Lewis Jr, T., Courchet, J. and Polleux, F. (2013). Cellular and molecular mechanisms underlying axon formation, growth, and branching. *J. Cell Biol.* Vol. 202 No. 6 837–848.

Li, S., Xiaosong, G. and Sheng, Y. (2017). The Regulatory Effects of Transforming Growth Factor on Nerve Regeneration. *Cell Transplantation*, Vol. 26, pp. 381–394.

Liu, J., Lamb, D., Chou, MM., Liu, YJ., Li, G. (2007). Nerve growth factor-mediated neurite outgrowth via regulation of Rab5. *Mol Biol Cell.* Apr;18 (4):1375-84.

Lowery, L.A. and Vactor, D.V. (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(5): 332–343.

Malin, S.A., Davis, B.M. & Molliver, C.M. (2007). Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Natura Protocols*, Vol.2.NO.1.152.

Mar, F.M., Bonni, A. and Sousa, M.M. (2014). Cell intrinsic control of axon regeneration. *EMBO Reports* 15, 254–263.

Massagué J. (2012). TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*13:616–630.

Mestres, I & Sung, C. (2016). Nervous system development relies on endosomal trafficking. *Neurogenesis*, 4:1, e1316887.

- Meyers, E. and Kessler, J.A. (2017). TGF- $\beta$  Family Signaling in Neural and Neuronal Differentiation, Development, and Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* ;9:a022244.
- Namba, T., Funahashi, Y., Nakamuta, S., Xu, C., Takano, T., Kaibuchi, K. (2015). Extracellular and Intracellular Signaling for Neuronal Polarity. *Physiol Rev* 95: 995–1024.
- Nascimento, A.I., Mar, F.M., Sousa, M.M. (2010). The intriguing nature of dorsal root ganglion neurons: linking structure with polarity and function, *Progress in Neurobiology*.
- Patel, T.D. Jackman, A. Rice, F.L., Kucera, J. and Snider, W.D. (2000). Development of Sensory Neurons in the Absence of NGF/TrkA Signaling In Vivo. *Neuron*, Vol. 25, 345–357.
- Pfenninger, K. (2009). Plasma membrane expansion: a neuron's Herculean task. *Nat Rev Neurosci* 10, 251–261.
- Rozés-Salvador, V., Heredia, F., Berardo, A., et al. (2016). Anti-glycan antibodies halt axon regeneration in a model of Guillain Barré Syndrome axonal neuropathy by inducing microtubule disorganization via RhoA–ROCK-dependent inactivation of CRMP-2. *Experimental Neurology* 278 42–53.
- Rozes-Salvador, V., Siri, S. O., Musri, M. M., and Conde, C. (2018). New player in endosomal trafficking: differential roles of smad anchor for receptor activation (SARA) protein. *Mol. Cell Biol.* 38:e00446-18.
- Rozés-Salvador, V., Wilson, C., Olmos, C., Gonzalez-Billault, C. and Conde C. (2020). Fine-Tuning the TGF $\beta$  Signaling Pathway by SARA During Neuronal Development. *Front. Cell Dev. Biol.* 8:550267.
- Runyan, C. E., Hayashida, T., Hubchak, S., Curley, J. F., and Schnaper, H. W. (2009) Role of SARA (SMAD anchor for receptor activation) in maintenance of epithelial cell phenotype. *J. Biol. Chem.* 284, 25181–25189.
- Sajjilafu, Feng-Quan Zhou (2012). Genetic Study of Axon Regeneration with Cultured Adult Dorsal Root Ganglion Neurons. *Journal of Visualized Experiments* (66).
- Sann, S., Wang, Z., Brown, H., Jin, Y. (2009). Roles of endosomal trafficking in neurite outgrowth and guidance. *Trends in Cell Biology* Vol.19 No.7.
- Shi, W., Sun, C., He, B., Xiong, W., Shi, X., Yao, D., et al. (2004). GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGF $\beta$  type I receptor. *J. Cell Biol.* 164, 291–300.
- Siegenthaler, J. A., and Miller, M. W. (2004). Transforming growth factor  $\beta$ 1 modulates cell migration in rat cortex: effects of ethanol. *Cereb. Cortex* 14,791–802.
- Sleigh, J., Weir, G.A. and Schiavo, G. (2016). A simple, step-by-step dissection protocol for the rapid isolation of mouse dorsal root ganglia. *BMC Res Notes* 9:82.
- Sulaiman, W. and Nguyen, D. H. (2016) Transforming growth factor  $\beta$  1, a cytokine with regenerative functions. *Neural Regen Res* 11(10):1549-1552.

- Sosa, L., Dupraz, S., Laurino, L. et al. (2006). IGF-1 receptor is essential for the establishment of hippocampal neuronal polarity. *Nat Neurosci* 9, 993–995.
- Takano, T. Funahashi, Y. & Kaibuchi, K. (2019). Neuronal Polarity: Positive and Negative Feedback Signals. *Front. Cell Dev. Biol.* 7:69.
- Takano, T., Xu, C., Funahashi, Y., Takashi, N. and Kaibuchi, K. (2015). Neuronal polarization. *Development* 142, 2088-2093.
- Tedeschi, A. and Bradke, F. (2017). Spatial and temporal arrangement of neuronal intrinsic and extrinsic mechanisms controlling axon regeneration. *Current Opinion in Neurobiology* 42:118–127.
- Tsukazaki, T., Chiang, T. A., Davison, A. F., Attisano, L., and Wrana, J. L. (1998) SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF receptor. *Cell* 95, 779–791
- Tucker, B.A., Mearow, K.M. (2008). Peripheral Sensory Axon Growth: From Receptor Binding to Cellular Signaling. *Can. J. Neurol. Sci.* 35: 551-566.
- Vidal, P., Lemmens, E., Dooley, D., Hendrix, S. (2013). The role of “anti-inflammatory” cytokines in axon regeneration. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 24 1–12.
- Villaroel-Campos, D., Gastaldi, L., Conde, C., Cáceres, A., Gonzalez-Billault, C. (2014). Rab-mediated trafficking role in neurite formation. *Journal of Neurochemistry* 129, 240-248.
- Winckler, B. and Yap, C.C. (2011). Endocytosis and Endosomes at the Crossroads of Regulating Trafficking of Axon Outgrowth-Modifying Receptors. *Traffic* 12: 1099–1108
- Yakymovych, I., Yakymovych, M. and Heldin, C. (2018). Intracellular trafficking of transforming growth factor  $\beta$  receptors. *Acta Biochim Biophys Sin*, 50(1), 3–11.
- Yap C. C. and Winckler B. (2012) Harnessing the power of the endosome to regulate neural development. *Neuron* 74, 440–451.
- Yi, J.J., Barnes, A., Hand, R., Polleux, F. and Ehlers, M.D. (2010). TGF- $\beta$  Signaling Specifies Axons During Brain Development. *Cell* 142(1): 144–157.
- Yogev, S and Shen, K. (2017). Establishing Neuronal Polarity with Environmental and Intrinsic Mechanisms. *Neuron* 96.
- Yu, L. Reynaud, F. Falk, J. Spencer, A. DiDing, Y. Baumlé, V. Lu, R. V. Castellani, V., Yuan, C. Rudkin, B. (2015). Highly efficient method for gene delivery into mouse dorsal root ganglia neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, Volume 8, Article 2.