



CONICET



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



Departamento de  
**QUÍMICA BIOLÓGICA**  
**Ranwel Caputto**

Facultad de Ciencias Químicas (UNC)

C I Q U I B I C

Tesis de Doctorado en Neurociencias

**Mecanismos moleculares asociados con el efecto inhibitorio  
de los anticuerpos anti-gangliósidos sobre la regeneración  
axonal en el sistema nervioso periférico**

Tesista: Bárbara Beatriz Báez

- Córdoba, Argentina -

2022

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba. CIQUIBIC-CONICET  
Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto  
Facultad de Ciencias Químicas  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA



## **Director:**

Dr. Pablo H. H. Lopez. Investigador Independiente. Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba, CIQUIBIC-CONICET. Departamento de Química Biológica.

## **Co-director:**

Dr. Mariano Bisbal. Investigador Adjunto. Instituto de Investigaciones Medicas Mercedes y Martin Ferreyra. INIMEC-CONICET-UNC, Córdoba.

## **Comisión Asesora:**

- Dra. Patricia Kunda. Investigadora Adjunto. Centro de Investigación en Medicina Traslacional Severo R. Amuchastegui - CIMETSA - IUCBC- INIMEC – CONICET.
- Dr. Ricardo Lardone. Investigador Adjunto. Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba, CIQUIBIC-CONICET. Departamento de Química Biológica. Ranwel Caputto, Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba.
- Dr. Ramiro Quinta. Investigador Adjunto. CONICET-Hospital Alemán, Buenos Aires.

### **Defensa oral y pública.**

Lugar y Fecha:

Calificación:

Firma:..... Aclaración:.....

Firma:..... Aclaración:.....

Firma:.....Aclaración:.....



# Agradecimientos:

Quiero agradecer en primer lugar a la Universidad Nacional de Córdoba y al CONICET por brindarme el apoyo y el lugar para poder hacer mis estudios.

Al Instituto de Investigaciones Médicas, Mercedes y Martín Ferreyra donde comencé los primeros pasos en la investigación y luego al CIQUIBIC, que nos acogió para la etapa final del doctorado.

A Pablo, por ser un gran mentor en todos los aspectos, acompañar mi desarrollo académico e incentivarme a creer en mí misma.

A mi comisión de tesis, por sus sugerencias y compartir su sabiduría, para mejorar en mi formación profesional y generar buen criterio científico.

A Mariano por guiarme con técnicas y consejos para mejorar este trabajo de tesis doctoral. A Victoria por enseñarme las técnicas del laboratorio para continuar con su línea de investigación.

A Ron Schnaar, Mario Bianchet, Mohamed Farah de la Universidad de John Hopkins, por recibirme y mostrarme que en la ciencia todos compartimos y tiramos para el mismo lado.

A los bioterios del Ferreyra, CIBICI y CIQUIBIC y todas las excelentes personas que trabajan arduamente para brindarnos recursos para investigar.

A mis queridos amigos de laboratorio. Los de antes y los de ahora, todos hicieron su marca en mi día a día, compartiendo mates y risas, frustraciones y dudas. Gracias: Flor, Clari, Glen, Sam, Naty, Cris, Manu, Ana Lis, Anita y Mara.

A toda la gente del Ferrey y del Ciqui, por compartir charlas en los pasillos y abrir sus puertas para sacar dudas. A todos ellos que ponen su granito de arena para hacer buena ciencia desde el lugar que les toca: becarios, secretarías, chicas de limpieza, CPAs e investigadores.

A mi mamá. Ella, la que me eligió, la que me dio todo desinteresadamente. Aprendí tu fortaleza, tu tenacidad, tu disciplina, tus valores, tu amor y paciencia para ayudar a otros. Traté de poner todo junto en lo que soy hoy.

A mi padre y abuela, que me malcriaron para que nunca me falte nada y hoy lo único que me falta son ustedes.

A Gus, gracias por encontrarme nuevamente, para que escribamos juntos la historia de amor mas bonita.

A mi familia, mentores para ser una buena persona, quienes me acogieron como una más. A mi madrina desde bebé y ahora en la ciencia. A mis tíos y primos que tanto me escuchan hablar de estas cosas raras, pero me hacen el aguante en cada etapa. A Silvia y Coco, que me hacen parte también de su familia.

Amigos del Manuel Belgrano, tantos años pasan y seguimos firmes para vernos crecer y crear aún más recuerdos juntos.

A mis amigos de la facu, que nos juntó la locura por la Biología y nos quedamos por la cordura que encontramos al juntarnos. Gracias Jesi, Eleo, Sole, Gon por el aguante siempre.

A los amigos que me trajo el viento, la vida... Majo, gracias por tu luz y sabiduría.

A todos,

Millón de gracias

# Índice:

Abreviaturas:.....	4
Resumen: .....	6
Abstract: .....	8
Antecedentes .....	10
I. Gangliósidos .....	11
II. Síndrome de Guillain-Barré.....	16
III. Regeneración axonal.....	22
IV. Pequeñas GTPasas .....	27
V. Proteínas G.....	32
VI. Estrategias de estudio de moléculas con posible interacción con gangliósidos .....	33
VII. Hipótesis y objetivos.....	35
Resultados.....	37
1. Los anticuerpos anti-gangliósidos tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de neuritas. ...	38
2. Búsqueda de moléculas transductoras de la señal inhibitoria de los anticuerpos anti-gangliósidos sobre la regeneración axonal mediante ensayos de proteómica cuantitativa. ....	39
2.1 Búsqueda bibliográfica, análisis informático y silenciamiento de posibles candidatos. ....	40
2.2 Disminución de la expresión de TNFR1a empleando un plásmido conteniendo la secuencia shARN específica. ....	46
2.3 El TNFR1a actúa como molécula transductora del efecto inhibitorio de los anticuerpos $\alpha$ GD1a específicos sobre el crecimiento neurítico.....	46
2.4 La ausencia de expresión de TNFR1a previene los efectos inhibitorios mediados por los anticuerpos $\alpha$ GD1a crossreactivos y específicos.....	48
2.5 La expresión de TNFR1a es necesaria para la acción inhibitoria de los anticuerpos $\alpha$ GD1a específicos.....	49
2.6 Animales TNFR1a <sup>-/-</sup> son menos susceptibles al efecto inhibitorio de los anticuerpos $\alpha$ GD1a/GT1b en un modelo de regeneración axonal.....	51
2.7 TNFR1a participa en la activación de RhoA mediada por anticuerpos anti-gangliósidos.....	53
2.8 El dominio intracelular de TNFR1a no activaría RhoA mediante el desplazamiento RhoGDI/RhoA por anticuerpos $\alpha$ GD1a. ....	55
2.9 Análisis in-silico de la estructura del TNFR1a y generación de mutantes puntuales. ....	57

2.10 Los anticuerpos $\alpha$ GD1a activan RhoA de forma independiente del desplazamiento del complejo RhoGDI-RhoA. ....	59
2.11 Las mutaciones puntuales en la región del tallo del TNFR1a no alteran la función pro-apoptótica del receptor. ....	61
3. La proteína G alfa inhibitoria tipo 2 podría estar involucrada en la vía de señalización por anticuerpos anti-gangliósidos .....	64
3.1 $G_{\alpha i}$ está involucrada en el efecto inhibitorio de los anticuerpos $\alpha$ GD1a sobre el crecimiento de neuritas.....	64
3.2 PTx no es capaz de revertir el efecto inhibitorio de $\alpha$ GD1a sobre crecimiento neurítico en células que sobreexpresan la proteína $G_{\alpha i 2}$ mutante insensible a PTx. ....	66
3.3 $G_{\alpha i}$ está involucrada en el colapso de lamela mediado por el anticuerpo $\alpha$ GD1a/GT1b.....	67
3.4 El anticuerpo $\alpha$ GD1a específico no provoca colapso de lamela.....	69
3.5 La sobreexpresión del péptido secuestrador del complejo $G\beta\gamma$ , $\beta$ ARKct , previene el efecto inhibitorio de $\alpha$ GD1a/GT1b. ....	70
3.6 $G_{\alpha i}$ está involucrada en la activación de RhoA mediada por los anticuerpos $\alpha$ GD1a.....	72
3.7 $G_{\alpha i}$ está involucrada en el descenso de actividad de Rac1 mediado por los anticuerpos anti-gangliósidos. ....	74
Discusión.....	77
Materiales y métodos.....	88
Animales de experimentación .....	89
Constructos genéticos .....	89
Cultivos celulares.....	93
Protocolo de electroporación celular .....	95
Tratamientos.....	96
Marcación celular por inmunofluorescencia .....	96
Tabla 5: Anticuerpos empleados en diferentes experimentos de esta tesis doctoral. ....	97
Transferencia de energía de resonancia Förster (FRET). ....	97
Análisis de la morfología del cono de crecimiento. ....	98
Ensayo de crecimiento de neuritas. ....	99
Análisis de muerte celular .....	99
Modelo de aplastamiento, contusión o lesión del nervio ciático. ....	100
Análisis estadístico .....	101

Instrumental, equipos, medios de cultivo y drogas farmacológicas: ..... 101  
Referencias ..... 104

# Abreviaturas:

- $\alpha$ GD1a: Anticuerpo monoclonal anti-gangliósido GD1a
- $\alpha$ GD1a/GT1b: Anticuerpo monoclonal crosreactivo anti-gangliósidos GD1a y GT1b
- $\alpha$ GT1b: Anticuerpo monoclonal anti-gangliósido GT1b
- Acs: Anticuerpos
- AIDP: Polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda
- AMAN: Neuropatía axonal motora aguda
- AMPc: Adenosin monofosfato cíclico
- AMSAN: Neuropatía axonal motora y sensorial aguda
- Col.: Colaboradores
- DD: Dominio de muerte celular
- DRGn: Neuronas del ganglio de la raíz dorsal
- EEM: Error estándar medio
- Fig.: Figura
- FRET: Transferencia de energía de resonancia de Förster
- $G\alpha i2$ : subunidad alfa inhibitoria tipo 2 de la proteína G heterotrimérica
- Gal: Galactosa
- GalNAc: N-Acetilgalactosamina
- GAPs: Proteínas de la activación GTPasa
- GDIs: Inhibidores de disociación de nucleótidos guanina
- GDP: Guanosina difosfato
- GEFs: Factores de intercambio de nucleótidos guanina
- GFP: Proteína verde fluorescente
- Glc: Glucosa
- GPCRs: Receptores acoplados a proteínas G
- GRKs: Proteínas quinasas asociadas a receptores acoplados a proteínas G
- GTP: Guanosina trifosfato
- MAC: Complejo de ataque a la membrana
- MAG: Glicoproteína asociada a mielina

- MT: Microtúbulos
- NGF: Factor de crecimiento nervioso
- NgR1: Receptor de Nogo 1
- NT: Neurotrofinas
- p75<sup>NTR</sup>: Receptor de baja afinidad para neurotrofinas p75
- PKA: Proteína quinasa A
- Ptx: Toxina pertúsica
- Rho GTPasa: Miembro de la familia de GTPasas homologas a Ras
- ROCK: Quinasa serina/treonina asociada a Rho
- SFB: Suero fetal bovino
- SFTNFR: Super familia de receptores del factor de necrosis tumoral
- SGB: Síndrome de Guillain-Barré
- SMF: Síndrome de Miller Fisher
- SNC: Sistema nervioso central
- SNP: Sistema nervioso periférico
- Taj/Troy: Receptor de la super familia de receptores del factor de necrosis tumoral
- TNFR1a: Receptor del factor de necrosis tumoral tipo 1a
- TNFR1a<sup>-/-</sup>: Cepa de animales carentes de expresión del receptor TNFR1a

# Resumen:

El síndrome de Guillain Barré (SGB) es una polineuropatía aguda caracterizada por la presencia de parálisis muscular ascendente y arreflexia. Al presente los mecanismos patogénicos no han sido dilucidados en su totalidad, pero se asume que la parálisis en pacientes con SGB donde se ven afectados los axones estaría relacionada al desarrollo de una respuesta autoinmune humoral contra gangliósidos. Se ha descrito que la presencia de altos títulos de anticuerpos anti-gangliósidos se asocia con una recuperación clínica más lenta y una mala prognosis. Resultados previos de nuestro grupo de trabajo han demostrado en modelos *in vitro* usando neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRGn) que los anticuerpos anti-gangliósidos inhiben la extensión de neuritas y provocan colapso del cono de crecimiento a través de la activación de vías tanto dependientes de la GTPasa RhoA y su quinasa asociada ROCK (mediante la alteración de la dinámica de microtúbulos y reducción de la extensión de filopodias) como independientes de RhoA (colapso de la lamela de actina). Así los anticuerpos anti-gangliósidos ejercen un rol inhibitorio sobre la regeneración axonal mediante la activación de una cascada de señalización que involucra la interacción de gangliósidos con moléculas transductoras específicas, lo que se traduce en la activación de vías dependientes e independientes de RhoA, que modulan en forma negativa el citoesqueleto de actina y tubulina de los conos de crecimiento de las neuronas estudiadas. Los objetivos del presente trabajo fueron determinar la/las posibles moléculas compañeras de los gangliósidos en la membrana, capaces de transducir el efecto inhibitorio de los anticuerpos anti-gangliósidos sobre el crecimiento neurítico en modelos *in vitro* e *in vivo*; y estudiar las vías de señalización que conducen a la activación de la GTPasa pequeña RhoA y a la inhibición de la regeneración axonal.

Comenzamos con una búsqueda bibliográfica e informática de las proteínas que se encontraron en un estudio de proteómica para determinar posibles interacciones con gangliósidos. Luego empleando diferentes técnicas experimentales pudimos encontrar que los efectos inhibitorios de los anticuerpos específicos contra el gangliósido GD1a ( $\alpha$ GD1a) sobre el crecimiento neurítico de DRGn son dependientes del receptor del factor de necrosis tumoral alfa 1a (TNFR1a) y que éste actúa como molécula transductora y compañero molecular del gangliósido GD1a en forma específica. Complementariamente se realizó un análisis *in silico* de la estructura 3D de la región del tallo del TNFR1a con la finalidad de identificar posibles sitios de interacción con el gangliósido GD1a. Esto derivó en la identificación de una mutante del TNFR1a caracterizada por la sustitución de ácido aspártico por alanina en la posición 165 la cual fue capaz de prevenir la transducción de la señal de los anticuerpos  $\alpha$ GD1a específicos.

Determinamos que los anticuerpos  $\alpha$ GD1a (ya sean específicos o crosreactivos) activan a RhoA a través de TNFR1a por una vía alternativa al desplazamiento RhoGDI/RhoA por el dominio intracelular de éste receptor. Esto nos llevó a estudiar otra vía de señalización alternativa relacionada con la activación de RhoA. Otro candidato encontrado en la proteómica y confirmado experimentalmente por participar en la vía de señalización inhibitoria de los anticuerpos anti-gangliósidos fue la subunidad alfa de tipo inhibitoria 2 de la proteína G heterotrimérica ( $G\alpha i2$ ). Esta proteína se relaciona con la disminución de los niveles de AMP cíclico intracelular y en consecuencia no se activa la proteína quinasa A que ejerce un efecto modulador negativo sobre RhoA. Confirmamos que  $G\alpha i2$  en DRGn está involucrada en la inhibición del crecimiento axonal, en el colapso rápido de la lamela de actina y en la activación de RhoA mediada por los anticuerpos  $\alpha$ GD1a específicos y crosreactivos. Por otra parte, identificamos a la GTPasa Rac1 como otro candidato encontrado en el estudio de proteómica y ya había sido relacionado con las alteraciones del citoesqueleto del cono de crecimiento. Determinamos que la  $G\alpha i2$  está involucrada en el rápido descenso en la actividad de Rac1, mediado por el anticuerpo  $\alpha$ GD1a/GT1b y esto se asocia al colapso de la lamela de actina (proceso RhoA independiente).

En conclusión, nuestros resultados identifican un nuevo mecanismo molecular de señalización intracelular relacionado con el efecto inhibitorio de anticuerpos  $\alpha$ GD1a específicos sobre el crecimiento neurítico y la reparación nerviosa, lo que abre la posibilidad al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas tendientes a mitigar el daño degenerativo que caracteriza a un porcentaje importante de pacientes con SGB.

# Abstract:

Guillain-Barré Syndrome (GBS) is an acute polyneuropathy characterized by the presence of ascending muscle paralysis and areflexia. The pathogenic mechanisms have not been fully elucidated, but it is assumed that the paralysis in patients with axonal forms of GBS is related to the development of a humoral autoimmune response against gangliosides. It has been described that the presence of high titers of anti-ganglioside antibodies is associated with a slower clinical recovery and poor prognosis. Previous results from our research group in *in vitro* paradigms of neurite outgrowth of dorsal root ganglion neurons (DRGn) have shown that anti-gangliosides antibodies inhibit neurite outgrowth and cause growth cone collapse through the activation of both dependent (alteration of microtubule dynamics and reduction of filopodia extension) and independent (collapse of lamella) RhoA pathways. Thus, anti-ganglioside antibodies exert an inhibitory role on axonal regeneration by activating a signalling cascade that involves the interaction of gangliosides with specific transducing molecules. This results in the negative modulation of actin and tubulin cytoskeleton on growth cones from the neurons in both RhoA dependent and independent manner.

The goals of the present work were to determine the potential partner molecules of the gangliosides in the membrane, capable of transducing the inhibitory effect of the anti-gangliosides antibodies on neurite outgrowth and to study the signaling pathways that lead to the activation of the small GTPase RhoA resulting in inhibition of axonal regeneration.

We first performed a bibliographic and bioinformatic search among proteins from a proteomic study to determine possible molecular partners for gangliosides. Then, using different experimental techniques, we were able to find that the inhibitory effects of anti-ganglioside GD1a (antibodies  $\alpha$ GD1a) on neurite outgrowth of DRGn are dependent on the expression of Tumor Necrosis Factor alpha receptor 1a (TNFR1a), which acts as a specific transducing molecule partner for GD1a ganglioside. In addition, we performed an *in silico* analysis of the 3D structure of the TNFR1a stalk region in order to identify potential interaction sites with GD1a ganglioside. This led to the identification of a TNFR1a mutant characterized by an aspartic acid substitution for alanine at position 165 which was able to prevent the signal transduction of specific  $\alpha$ GD1a antibodies. We also identified that  $\alpha$ GD1a antibodies (either specific or cross-reactive) activate RhoA through TNFR1a by an alternative mechanism to RhoGDI/RhoA displacement via the intracellular domain of this receptor. This led us to study another alternative signalling pathway related to RhoA activation. Another candidate found in the proteomic study and experimentally confirmed to participate in the inhibitory signalling pathway of anti-ganglioside antibodies,

was the inhibitory type 2 alpha subunit of the heterotrimeric G protein ( $G\alpha i2$ ). This protein's role is to decrease intracellular cyclic AMP levels and consequently, protein kinase A, which exerts a negative modulatory effect on RhoA. We confirmed in DRGn that  $G\alpha i2$  is involved in the inhibition of axonal outgrowth, the rapid collapse of the actin lamella and RhoA activation triggered by specific and cross-reactive  $\alpha$ GD1a antibodies. On the other hand, we identified that  $G\alpha i$  is involved in the early decrease of GTPase Rac1 activity mediated by the  $\alpha$ GD1a/GT1b antibody, which precedes the collapse of the actin lamella (RhoA-independent process).

In conclusion, our results identify a new molecular mechanism of intracellular signalling related to the inhibitory effect of specific anti-GD1a antibodies on neurite outgrowth and nerve repair, which opens the possibility of developing new therapeutic strategies aimed to mitigate the degenerative damage present in a significant percentage of GBS patients.

# Antecedentes

## I. Gangliósidos

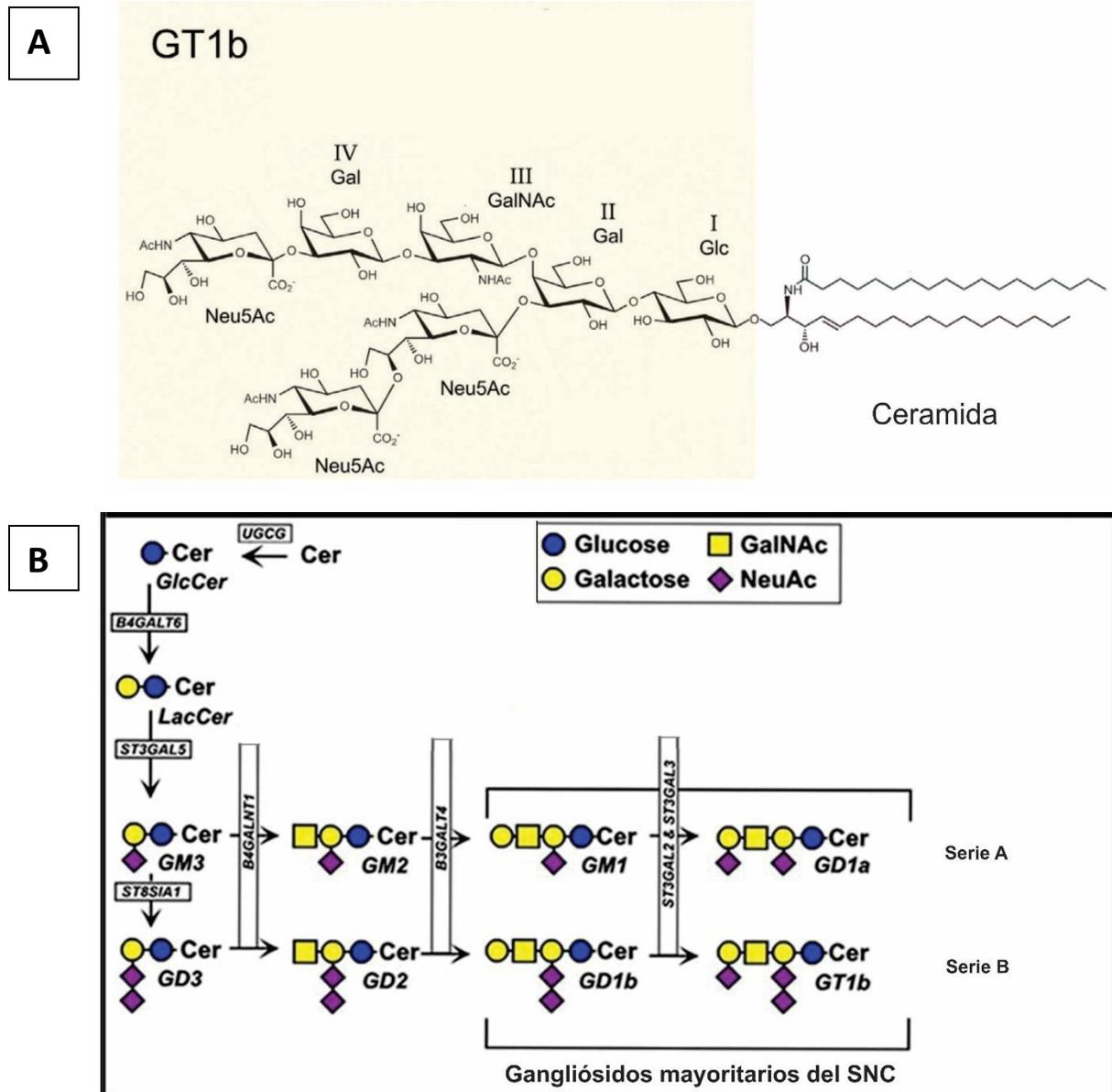
### Generalidades y estructura:

Los gangliósidos pertenecen a la familia de glicoesfingolípidos, están distribuidos de manera ubicua en diversos tejidos de los vertebrados y son particularmente abundantes en el sistema nervioso <sup>1</sup>. Estas moléculas están compuestas por una porción lipídica, la ceramida, la cual está conformada por un ácido graso de largo variable unido a una esfingosina. Según el largo de la cadena hidrocarbonada y el grado de insaturación de estos elementos se pueden distinguir diversas ceramidas; sin embargo, para simplificar, en ésta tesis consideraremos como si fuera una sola. La ceramida está unida a una cadena oligosacárida de composición variable dando lugar a las diferentes series en las que se pueden clasificar los glicoesfingolípidos. Para el presente trabajo, resulta de interés detallar la serie *ganglio*, pues componen la mayoría de gangliósidos en el sistema nervioso de los mamíferos y su abundancia los hace accesibles para estudios experimentales <sup>2</sup>. Un gangliósido es todo aquel glicoesfingolípido que contiene ácido siálico y particularmente, la serie ganglio incluye aquellos que tienen una estructura central formada por cuatro azúcares neutros con la disposición: Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ -Cer <sup>3</sup>.

Por lo general, en los gangliósidos el ácido siálico se une por enlace glucosídico  $\alpha$ 2-3 a un residuo de galactosa, o por un enlace  $\alpha$ 2-8 o  $\alpha$ 2-6 a otro ácido siálico; y el resto de los azúcares se unen por enlace  $\beta$ -glicosídico. El ácido siálico más abundante en humanos es el ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) y otros mamíferos poseen además ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) <sup>3</sup>.

La heterogeneidad de gangliósidos que existen, se es debido a la variedad en la composición de oligosacáridos que contienen (la estructura central puede estar completa o truncada) y según el tipo, cantidad o posición que ocupen los ácidos siálicos en la cadena oligosacárida. Así, la nomenclatura más comúnmente usada para referirse a los diferentes gangliósidos es una en particular que creó el investigador Lars Svennerholm <sup>4</sup> y dista de la versión más moderna generada por la IUPAC. En el caso de gangliósidos de la serie ganglio, se designan con la letra "G" y luego se describe la cantidad total de ácidos siálicos con las letras M=mono, D=di, T=tri, respectivamente. El siguiente número indica el largo de la cadena oligosacárida y se determina por la fórmula: 5 menos el número de azúcares neutros que posee la estructura central. Y, por último, se utiliza una letra minúscula para designar la cantidad de los ácidos siálicos en la galactosa interna, la cual se suele omitir cuando los gangliósidos solo tienen un ácido siálico en la galactosa interna. Este es el caso de GM3, que es el gangliósido más simple y también el más abundante en tejidos no neurales. En la Figura 1 se describen esquemáticamente las estructuras, los pasos

biosintéticos y las enzimas requeridas para la formación de los gangliósidos mayoritarios del sistema nervioso: GM1, GD1a, GT1b y GD1b.



**Figura 1. A) Representación del gangliósido GT1b.** Se observan los cuatro azúcares neutros de la estructura principal, los ácidos siálicos(Neu5Ac) y la porción lipídica (ceramida) que se inserta en la membrana. **B) Estructura y biosíntesis de los gangliósidos mayoritarios del Sistema Nervioso Central (SNC).** Se describen solo algunos de los glicoesfingolípidos de la serie ganglio y su biosíntesis mediante las enzimas glicosiltransferasas Ucgc, St3gal5, B4galnt1, St8sia1, St3gal2 y St3gal3. Modificada de Lopez & Báez, 2018.

### Localización y Funciones:

Los gangliósidos representan una parte importante en las membranas, especialmente en el sistema nervioso, donde alcanzan el 12% del contenido lipídico de las membranas neuronales, además, están presentes en estructuras sub-celulares como organelas y vesículas<sup>6</sup>. Se ha descrito que ciertos gangliósidos se expresan de manera diferencial en el tejido nervioso, siendo abundantes GM1 y GD1a en axones motores, GD1b en nervios sensoriales y GQ1b predominante en nervios craneales<sup>7,8</sup>.

Éstos glicos esfingolípidos son moléculas anfipáticas que tienen anclada su porción lipídica en la hemicapa externa de la membrana plasmática de las células y su porción oligosacárida expuesta en la región extracelular. Esta conformación convierte al gangliósido en un importante determinante de superficie y le permite establecer interacciones con otras moléculas. Así, puede interactuar de manera lateral (en *cis*) con componentes de la misma célula como otros lípidos, canales iónicos, diversas proteínas y receptores. Un ejemplo de éstos receptores son los de tipo tirosina quinasa, los cuales son modulados por gangliósidos, convirtiéndose así en reguladores de cambios morfológicos de la célula. Los gangliósidos pueden encontrarse dentro de “balsas” lipídicas en la membrana, agrupados con otros esfingolípidos y colesterol<sup>9-11</sup>. Al hallarse en estas balsas que tienen una composición dinámica de moléculas, los gangliósidos pueden interactuar con múltiples moléculas y dar inicio a diversas cascadas de señalización<sup>12</sup>. A su vez, la porción extracelular puede ser reconocida por toxinas o patógenos que hubieran ingresado al organismo, por anticuerpos (Acs) y por moléculas de membranas vecinas de células del mismo individuo, conformando así interacciones moleculares de tipo *trans*<sup>3</sup>. Esto convierte a los gangliósidos en “receptores funcionales”, por ejemplo para el reconocimiento célula-célula y transducción de señales<sup>13</sup>.

Diversos estudios han demostrado que los gangliósidos participan además en un gran número de mecanismos, procesos biológicos y principalmente como moduladores de la actividad de receptores de factores de crecimiento en la superficie celular<sup>8,14</sup>. Algunos de estos son el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), el receptor del factor derivado de plaquetas (PDGFR), el receptor del factor de crecimiento nervioso (TrkA), el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), así también como el receptor de insulina que se caracteriza por una actividad tirosina quinasa<sup>2,15,16</sup>. Además, los gangliósidos son capaces de regular el calibre axonal, organizar los canales iónicos a nivel de los nodos de Ranvier (los cuales están implicados en la rápida conducción nerviosa de fibras mielinizadas) y actuar como receptores de adhesión celular para macrófagos en procesos inflamatorios. Debido a que son reconocidos por lectinas localizadas en la mielina, también participan en la interacción axón-glia y además

actúan como receptores funcionales en la transducción de señales que resultan en inhibición de la regeneración axonal<sup>1,17</sup>, rol que destacaremos en el desarrollo de esta tesis doctoral.

Entre otras funciones asociadas a gangliósidos se describió que participan en adhesión celular, movilidad, diferenciación y crecimiento a través de dominios glico-sinápticos y también promueven la reparación de los nervios mediante el incremento de ramificaciones colaterales de las neuronas<sup>1,5,17-21</sup>).

#### Rol en procesos patológicos:

La disregulación tanto de la síntesis como del catabolismo de los gangliósidos puede llevar a enfermedades de tipo metabólicas, caracterizadas por la deficiencia de enzimas involucradas en estos procesos. Por ejemplo, en la gangliosidosis, hay acumulación de gangliósidos por déficits en su catabolismo, lo que genera graves consecuencias para el desarrollo y función normal del sistema nervioso<sup>22</sup>. También se ha encontrado que, en diversos tipos de cáncer, los gangliósidos se encuentran con un patrón de expresión alterado, sirviendo como marcadores para el diagnóstico y pronóstico, pudiendo usárselos además como blanco terapéutico<sup>23,24</sup>.

Cómo se describió anteriormente, los gangliósidos pueden servir como receptores funcionales para distintas moléculas, por ejemplo, para toxinas de diversas bacterias y éste es el caso del gangliósido GM1 que es específicamente reconocido por la subunidad  $\beta$  de la toxina colérica (CT-B), producida por la bacteria *Vibrio cholerae*. Dicha unión permite que la subunidad  $\alpha$  de la toxina ingrese al citosol y por consiguiente se active la enzima adenilato ciclasa (AC) incrementando los niveles de adenosin monofosfato cíclico (AMPC) intracelular lo que provoca serias alteraciones fisiológicas para el organismo (deshidratación, diarrea)<sup>25,26</sup>. Otras toxinas biológicas como la botulínica y tetánica, producidas por las bacterias *Clostridium botulinum* y *Clostridium tetani* respectivamente, también se unen selectivamente a los gangliósidos GD1a, GT1b y GQ1b ocasionando graves afecciones al sistema nervioso central (SNC) y periférico de los hospedadores<sup>27-30</sup>.

Paralelamente, estos glicoesfingolípidos pueden ser detectados por moléculas del mismo organismo y provocar, por ejemplo, dificultades en la regeneración axonal, por lo que serán consideradas como enfermedades autoinmunes. En este sentido, una de las interacciones más estudiadas que tienen los gangliósidos es con algunos componentes de la mielina, la cual es producida por células de Schwann en sistema nervioso periférico (SNP) y por oligodendrocitos en el SNC. Cuando la mielina es destruida, estos detritos generan un ambiente no-permisivo para la regeneración axonal en neuronas maduras del SNC<sup>31</sup>. La Glicoproteína asociada a mielina (MAG), es un componente minoritario, pero selectivamente expresado en la envoltura miélica más cercana al axón. Es una proteína transmembrana compuesta por

5 dominios tipo inmunoglobulina en su porción extracelular que pueden reconocer múltiples moléculas en el axón, entre los que se destacan los receptores NOGO (NgRs). Además, MAG es capaz de unirse a ácidos siálicos de gangliósidos complejos que expresan el terminal Neu5Aca2-3Gal (presente en los gangliósidos GT1b y GD1a). A través de su unión y posterior activación de estos receptores, MAG puede ejercer un rol protector y estabilizador del axón que envuelve, protegiéndolo de sustancias o agentes tóxicos e incrementando los niveles de microtúbulos estables<sup>32-35</sup>.

Sin embargo, MAG también fue descrita entre las primeras moléculas capaces de inhibir la regeneración axonal cuando ocurre una lesión en los nervios<sup>3,36-38</sup> y este efecto se debe al menos en parte, a la unión con gangliósidos<sup>39</sup>. Se ha descrito que MAG señala a través de un complejo multi-molecular de receptores para transducir la señal inhibitoria sobre la regeneración axonal. MAG reconoce al gangliósido GT1b el cual interacciona con NgR1, proteína inserta en la membrana plasmática a través de su anclaje vía glicosilfosfatidilinositol que carece de porción intracelular por lo que interactúa con el receptor de baja afinidad para neurotrofinas p75<sup>NTR</sup>, el cual posee una porción citoplasmática que al clivarse puede comenzar la cascada de señalización intracelular para la inhibición del crecimiento neurítico mecanismo que se describirá detalladamente más adelante<sup>40-42</sup>. Aquí es importante destacar que el rol inhibitorio de MAG sobre la regeneración axonal se ha confirmado en modelos *in vitro*, donde se ha descrito que actúa inhibiendo el crecimiento neurítico a través del uso de diferentes moléculas en la superficie celular dependiendo del fenotipo celular. El trabajo de Mehta y col.<sup>39</sup>, describió que para neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRGn) el efecto inhibitorio es debido al receptor NgR y en menor medida dependiente de GT1b. Lo opuesto ocurre en cultivos de células granulares del cerebelo donde la inhibición es mediada por gangliósidos e independiente de NgR o p75<sup>NTR</sup>. Por lo que se interpreta que **existen distintos mecanismos y repertorios de receptores**, que participan en la inhibición del crecimiento neurítico mediado por MAG en diferentes tipos celulares<sup>43</sup>. Por lo tanto pueden estar participando, junto a los gangliósidos, otras moléculas que no han sido identificadas o descritas hasta el momento, capaces de iniciar los eventos de señalización<sup>39,44</sup>.

Es importante destacar que independientemente del complejo molecular involucrado, dichas cascadas de señalización convergen en la activación de la GTPasa pequeña RhoA, la cual es capaz de inhibir la regeneración axonal en sitios de lesión, conceptos que se describirán más adelante<sup>17,45,46</sup>.

Se ha estudiado que distintas enfermedades autoinmunes tienen a éstos glicosfingolípidos como puntos de reconocimiento para anticuerpos, los cuales pueden desencadenar inhibición de la regeneración axonal<sup>47</sup>. Este es el caso de las neuropatías periféricas como el síndrome de Guillain-Barré que se explicará a continuación.

## II. Síndrome de Guillain-Barré

El síndrome de Guillain-Barré (SGB) fue descrito por primera vez a comienzos del siglo XX por los médicos neurólogos Georges Guillain, Jean-Alexandre Barré y Andre Strohl (1916), quienes observaron en pacientes de la primera guerra mundial una sintomatología común que los llevaba a una grave pérdida de reflejos, de sensibilidad y de movilidad o entumecimiento de los miembros. En la actualidad se describe al SGB como un conjunto de polineuropatías agudas severas, que comprometen principalmente a los nervios del SNP y no así del SNC<sup>48-50</sup>. Se pueden clasificar las variantes del SGB según la fibra nerviosa que se vea afectada y el tipo de daño que ocurra, degeneración axonal o desmielinizante.

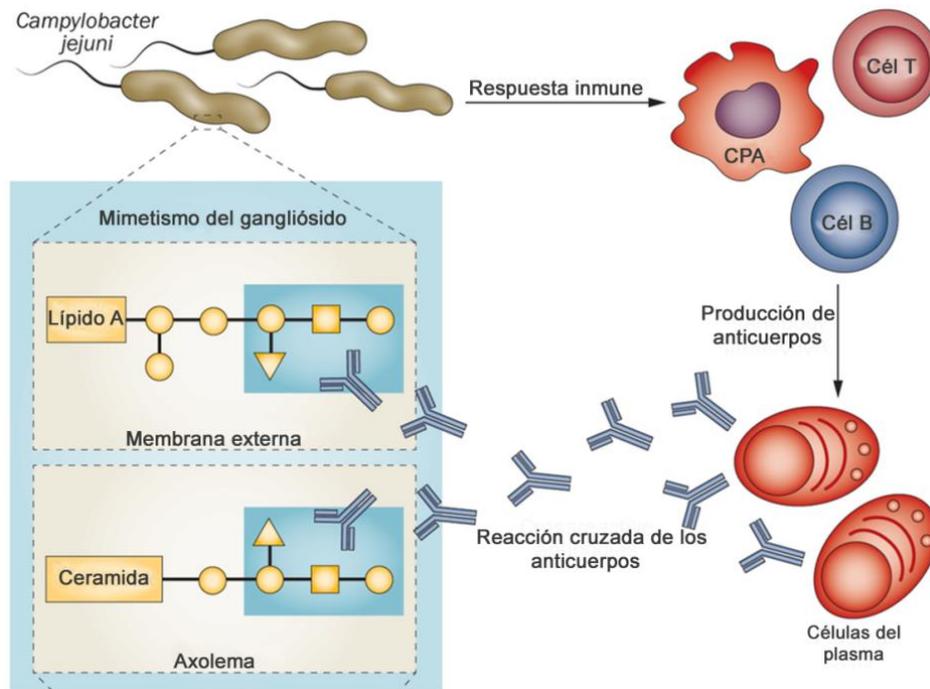
La enfermedad se presenta con una repentina debilidad muscular que suele ser de manera simétrica y ascendente en los miembros inferiores y superiores provocando una falta de movilidad y coordinación, a lo cual pueden sumarse síntomas de carácter sensitivo. El SGB es considerado la causa principal de parálisis neuromuscular a nivel mundial en adultos<sup>51,52</sup>. El SGB tiene una incidencia aproximada de 1-2 cada 100.000 personas y el promedio de la edad de los que la padecen es de 51 años, con una prevalencia de 1,5 veces más en hombres que en mujeres<sup>53,54</sup>. En Argentina la incidencia es una de las más altas para América Latina llegando a 2.06 cada cien mil habitantes, reportándose incluso un 37% de casos en niños menores a 14 años<sup>55</sup>. Se ha observado que hay cierta diferencia en la distribución geográfica de las variantes descritas; en países asiáticos como China y Japón prevalece la variante axonal, mientras que en Europa y América del Norte se ha reportado un 90% de casos desmielinizantes<sup>56</sup>.

En general la patología tiene un curso clínico monofásico, donde el máximo de síntomas y debilidad se presentan dentro de las primeras 4 semanas. Los casos más graves deben ser hospitalizados para prevenir fallas severas del sistema nervioso autónomo, que pueden ocasionar un paro cardio-respiratorio que pone en riesgo la vida (aproximadamente 5% de mortalidad)<sup>49,57</sup>. Los pacientes pueden recibir en el hospital alguna de las terapias específicas para el SGB (se describirán más adelante), pero en general la patología se resuelve de manera espontánea en la mayoría de los casos. Sin embargo, se ha reportado que alrededor de un 30% de pacientes presentan una recuperación clínica lenta y/o incompleta, varios de ellos quedando con secuelas neurológicas por mucho tiempo después del alta clínica. En la mayoría de los casos, las secuelas se atribuyen al sitio y a la extensión del daño axonal que hayan sufrido durante el curso del SGB<sup>50,58,59</sup>.

Hasta la fecha, no han sido completamente dilucidados los mecanismos celulares y moleculares que dan inicio a los síntomas que se engloban en esta patología, pero existen muchos grupos de investigación trabajando en determinar las causas y posibles mejoras a las estrategias terapéuticas existentes. En

relación a las causas, se ha demostrado que aproximadamente dos tercios de los pacientes con SGB sufren infecciones de tipo gastrointestinal o de las vías respiratorias previo a la aparición de los síntomas clínicos. Se ha descrito el síndrome en asociación con diversos patógenos, entre ellos: *Campylobacter jejuni*, *Cytomegalovirus*, *Haemophilus influenza*, *Mycoplasma pneumoniae*, virus de Epstein-Barr, Hepatitis, virus del Zika y recientemente el coronavirus SARS-cov-2<sup>54,60-62</sup>. Alrededor del 30% de las infecciones se atribuyen a la bacteria *C. jejuni*, por lo que se lo reconoce como el principal agente infeccioso relacionado con el inicio de la enfermedad<sup>63</sup>.

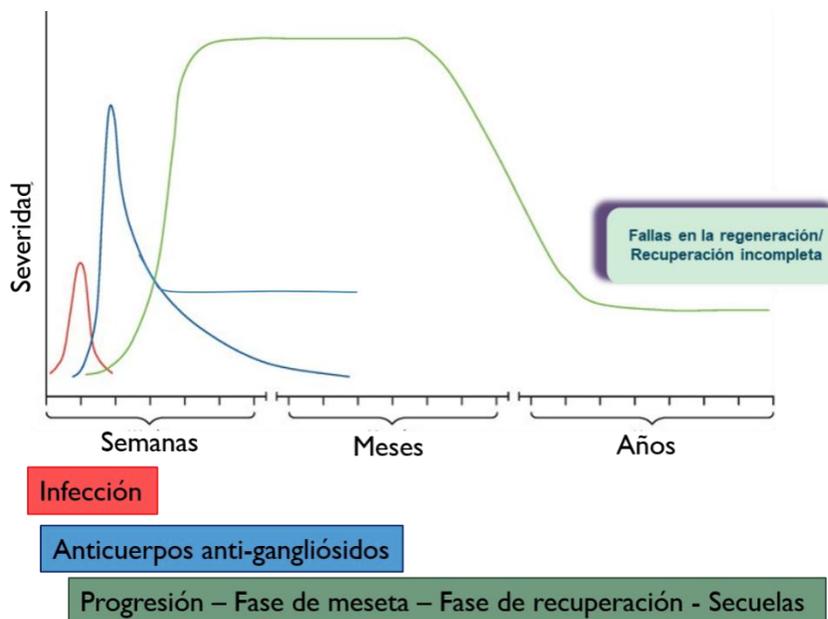
El estudio de los mecanismos moleculares que emplean los patógenos al ingresar al organismo y provocar las infecciones, ha permitido esclarecer en parte las causas de los síntomas en los pacientes. Yuki y col.<sup>64</sup>, demostraron que las paredes bacterianas del agente infeccioso *C. jejuni* contenían lipopolisacáridos que presentaban homología estructural con los gangliósidos del propio hospedador. Este mimetismo molecular es capaz de provocar una reacción cruzada del sistema inmune (como se esquematiza en la figura 2), es decir, que los anticuerpos producidos para combatir la infección reconocen y se unen a una estructura oligosacárida compartida por los agentes patógenos y los gangliósidos presentes en las membranas de los nervios periféricos<sup>56</sup>.



**Figura 2.** Esquema del mimetismo molecular entre la estructura oligosacárida de los gangliósidos y los lipopolisacáridos del agente patógeno. Los anticuerpos de la respuesta inmune detectan determinantes antigénicos de los lipopolisacáridos presentes en agentes infecciosos, los cuales presentan homología estructural con

carbohidratos de los gangliósidos presentes en membranas celulares del hospedador. Imagen modificada de Van Den Berg et al., 2014.

Durante las primeras semanas post-infección, los pacientes pueden presentar altos títulos de anticuerpos anti-gangliósidos que luego comienzan a disminuir paulatinamente en la mayoría de ellos, sin embargo se ha reportado demoras e incluso fallas en la recuperación clínica en aquellos pacientes donde persisten valores elevados de anticuerpos por mayores períodos de tiempo (Figura 3) <sup>19,65</sup>. Por ejemplo, los pacientes con infecciones gastrointestinales por *C. jejuni* suelen presentar debilidad muscular más severa, con una recuperación clínica lenta y en dichos casos hay presencia de anticuerpos principalmente del isotipo IgG1 que tienen una vida media larga de 21 días aproximadamente <sup>57</sup>. Por otro lado las infecciones previas de tipo respiratorias se caracterizan por una recuperación clínica más acelerada, asociado a que los anticuerpos anti-gangliósidos encontrados son mayoritariamente de tipo IgG3 con una vida media corta de una semana <sup>57</sup>.



**Figura 3: Representación gráfica del curso clínico del SGB.** La línea azul indica la infección que presentan algunos pacientes previo a la aparición de los síntomas. En verde se representa la debilidad muscular del paciente que se corresponde con el aumento de títulos de anticuerpos anti-gangliósidos (en rojo). En la mayoría de los casos, estos niveles bajan de manera espontánea y paulatina, mientras que en un sub-grupo de pacientes la permanencia de altos títulos de éstos anticuerpos implicará demoras o fallas en la regeneración y recuperación clínica incompleta.

Los anticuerpos generados durante la respuesta inmune pueden reconocer epítopes de los nervios periféricos, presentes tanto en la vaina de mielina como en el axón (en sitios donde éste último queda

expuesto: nodos de Ranvier y en las uniones neuro-musculares) <sup>49,66-68</sup>. Por lo que, determinar el sitio blanco de los anticuerpos y donde se genera el daño, sirve para definir la variable del SGB que presenta el paciente.

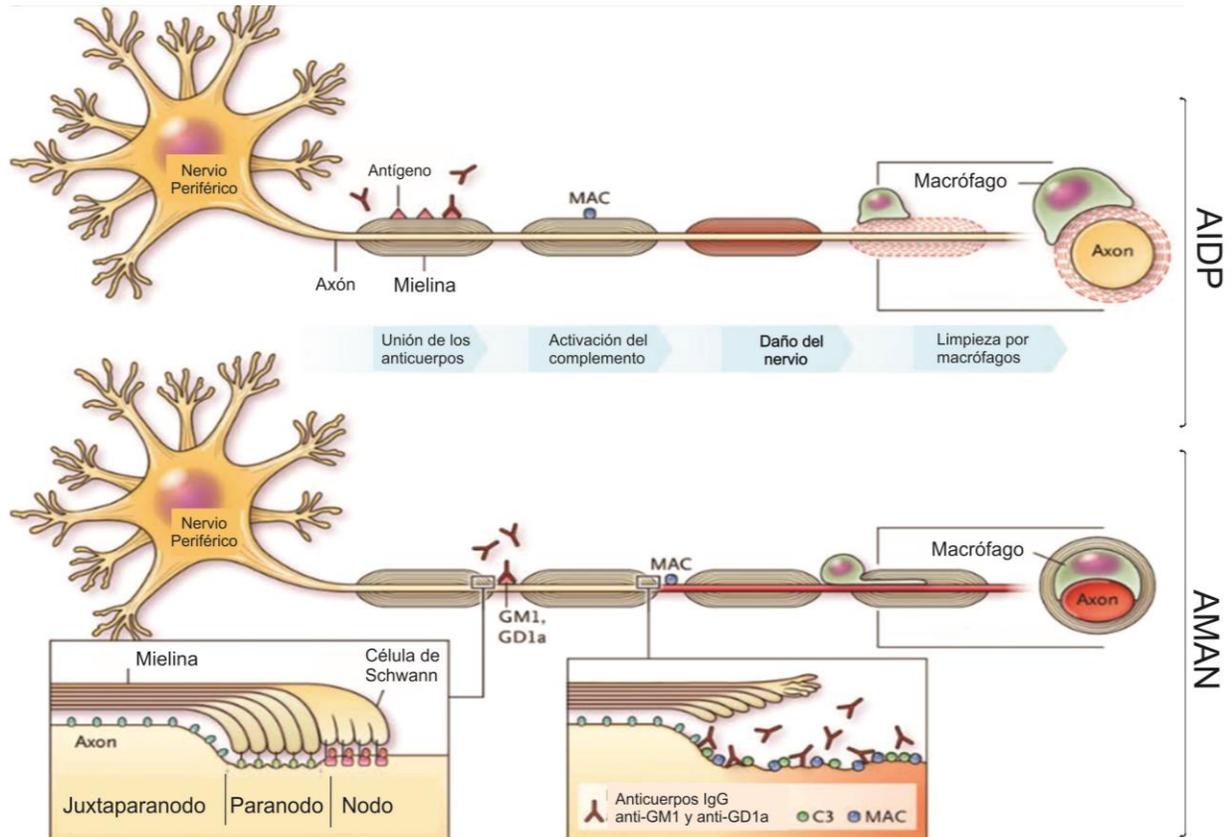
### Variantes clínicas

La polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda, conocida como **AIDP**, es la forma clínica más común del SGB y se caracteriza porque los anticuerpos se unen a epítopes en la cara externa de las células de Schwann, productoras de la vaina de mielina que recubren a los axones (Figura 4) <sup>52,69</sup>. La unión de los anticuerpos provoca la activación del sistema de complemento y la consecuente formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) que provocará la destrucción de la mielina y la quimiotaxis de macrófagos al sitio para fagocitar los detritos de mielina, causando en conjunto un retardo en la conducción nerviosa saltatoria <sup>70,71</sup>.

La neuropatía axonal motora aguda (**AMAN**, por sus siglas en inglés), es el subtipo de SGB donde se ven afectados los axones de nervios motores, debido a que los gangliósidos presentes en la membrana del axón serán el blanco de los anticuerpos. Al unirse los Acs (anticuerpos) pueden activar el sistema del complemento y formación de MAC durante la primer etapa de la respuesta inmune, que conlleva a una destrucción de los axones y el reclutamiento de macrófagos, que se infiltrarán dentro de la envoltura de mielina para fagocitar los detritos (ver Figura 4), en conjunto estos eventos provocarán un bloqueo de la conducción nerviosa que se traduce en la debilidad muscular que presentan los pacientes <sup>72,73</sup>. Varios estudios demostraron que altos títulos de anticuerpos circulantes contra gangliósidos que se depositan en las fibras nerviosas, provocan daños severos en axones motores de los pacientes y se asocian con una recuperación clínica lenta y/o demorada, lo cual se asocia a fallas en la reparación nerviosa <sup>74-78</sup>. En particular los anticuerpos dirigidos exclusivamente contra el gangliósido GD1a (de ahora en más  $\alpha$ GD1a) y Acs anti-GM1 están asociados al repertorio de patologías agudas AMAN, con prognosis clínica desfavorable, debido a la lenta recuperación y posibles secuelas neurológicas que pueden tener los pacientes en el futuro <sup>63,70,79,80</sup>.

Los factores que definen la severidad y extensión del daño axonal no se deben sólo a la concentración de anticuerpos, sino que también dependerán de la integridad de la barrera hemato-neural que atraviesen los anticuerpos y la especificidad de éstos al tejido blanco <sup>52,81,82</sup>. La siguiente variante denominada **AMSAN**, neuropatía axonal aguda motora y sensorial, deriva del AMAN y se la conoce por ser más severa en cuanto a los síntomas clínicos del paciente, ya que el daño no solo se produce en axones de neuronas

motoras, sino que también afecta a fibras de tipo sensitivas. Estas variantes del SGB se caracterizan por la ausencia de desmielinización en los nervios <sup>83</sup>.



**Figura 4. Inmunopatología del SGB en el SNP.** En la variante desmielinizante (AIDP), los anticuerpos se localizan en la vaina de mielina y comienzan su degradación. En la variante axonal (AMAN) los anticuerpos específicos anti-GM1 y  $\alpha$ GD1a se unen a antígenos en el axón, ingresando por los nodos de Ranvier o uniones neuro-musculares, donde se acumulan, activan el sistema de complemento y se forma el MAC que provoca un bloqueo de los canales de sodio y la conducción nerviosa. Modificado de Yuki & Hartung, 2012.

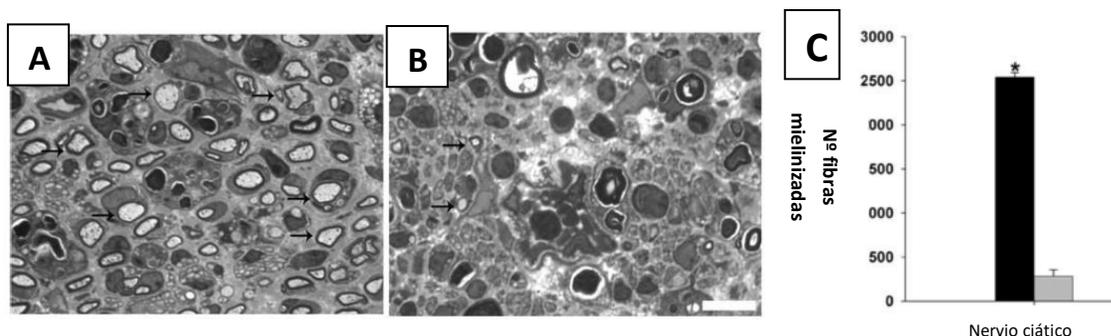
Con estos estudios fue posible ir esclareciendo la especificidad de los tipos de anticuerpos presentes en los pacientes y la correlación con la variante que presentaban. Por ejemplo en el caso de la variante cérico-braquial, donde predomina la debilidad orofaríngea, facial, de nervios del cuello y hombro, hay presencia de anticuerpos mayormente contra los gangliósidos GD1a, anti-GQ1b y GT1a <sup>84</sup>.

Por último, la variante denominada Síndrome de Miller-Fisher (SMF, por sus siglas en inglés), posee alta incidencia y tiene como particularidad, afectar a los nervios ópticos, bulbares y craneales además de los periféricos, ya que poseen alta densidad de gangliósidos GQ1b y GT1a particularmente. El SMF es considerada de tipo desmielinizante y se asocia a la presencia de Acs anti-GQ1b específicos, ya que el 90% de los pacientes los presentan, no apareciendo en las otras variantes <sup>48,53,80,84</sup>.

Diferentes modelos experimentales ayudaron a esclarecer la relación causal entre la presencia de Acs anti-gangliósidos y la recuperación clínica incompleta. Por ejemplo, se emplearon conejos inmunizados con *C. jejuni* o con gangliósidos de cerebro bovino, los cuales generaban altos títulos de Acs anti-GM1 y presentaban parálisis muscular aguda en los miembros simulando el SGB<sup>69,85,86</sup>. Los análisis morfológicos de los nervios periféricos de éstos animales, mostraron una degeneración axonal distal, pero con poca infiltración de linfocitos o desmielinización<sup>58</sup>. Otros estudios observaron mediante la inmunización de conejos con Acs de pacientes con SGB o con Acs monoclonales específicos contra GM1 y GD1b, que se logró reproducir la sintomatología clínica y mecanismo molecular de especificidad al tejido neuronal<sup>87-89</sup>. En un modelo animal de regeneración axonal, donde se provoca una injuria para abrir la barrera hemato-neural y permitir el paso de los anticuerpos, se comprobó que la transferencia pasiva con un anticuerpo monoclonal dirigido contra los gangliósidos GD1a y GT1b ( $\alpha$ GD1a/GT1b) es capaz de bloquear la regeneración nerviosa y provocar la disminución del número de fibras en regeneración<sup>59,69,75</sup>. El daño inicial se debe a la deposición y acumulación de anticuerpo en las puntas de los axones que provocan una morfología distrófica que impide el correcto crecimiento (Figura 5), y luego en la etapa de recuperación la inhibición de la regeneración se produce por la activación de una señalización específica de los anticuerpos.

Otros estudios, como el de Rozés y col.<sup>90</sup> también describieron el colapso del cono de crecimiento del axón en modelos *in vitro*, empleando neuronas del SNP tratadas con el mismo anticuerpo monoclonal  $\alpha$ GD1a/GT1b reconociendo el epítipo terminal sialil-Gal [NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal-NAc presente tanto en GD1a como en GT1b.<sup>91</sup>

**Estos resultados y hallazgos denotan la importancia que tienen los anticuerpos anti-gangliósidos como responsables de la inhibición de la regeneración axonal.**



**Figura 5: Acs anti-gangliósidos inhiben la regeneración axonal de nervios periféricos.** Cortes semifinos de nervio ciático (SN) de ratones luego de la cirugía de aplastamiento y posterior inmunización pasiva con anticuerpos  $\alpha$ GD1a/GT1b. A) Se observan muchos axones mielinizados regenerando en un animal control (sin anticuerpo); B) Se

identifican pocas fibras nerviosas regenerando en animal inmunizado con  $\alpha$ GD1a/GT1b. C) Disminución en el número total de fibras regenerando en nervio ciático de animales tratados con  $\alpha$ GD1a/GT1b (barra gris) comparados al control sin tratar (barra negra). Modificado de Lehmann y Lopez, 2007.

### Tratamientos

En resumidas palabras, en las últimas décadas los tratamientos para pacientes con SGB no han tenido avances significativos, ya que se siguen empleando la inmunoterapia, tratamiento en el que se aplica inmunoglobulina intravenosa para mitigar la acción de los anticuerpos. Alternativamente se utiliza la plasmaféresis, intercambio de plasma sanguíneo para disminuir la carga de anticuerpos presentes, sobre todo las IgG que, como vimos antes, serían causantes mayoritarias de la patogénesis del SGB<sup>80</sup>; en dichas terapias no se encontró una potenciación por el uso combinado.

Recientemente se han empezado a usar con cierto éxito el fármaco Eculizumab, que inhibe la activación de complemento y previene la formación de MAC, para mitigar los efectos adversos de los anticuerpos durante la fase aguda inflamatoria<sup>92-94</sup>.

Aunque son estudios alentadores, también se ha corroborado que los anticuerpos anti-gangliósidos utilizan mecanismos independientes de la activación de complemento. Empleando animales deficientes para la proteína C5 del complemento, Lehmann y Lopez<sup>95</sup> hallaron que seguía habiendo inhibición de la regeneración axonal luego de la inmunización pasiva con  $\alpha$ GD1a/GT1b, debido a la deposición de estos anticuerpos y posterior señalización sobre el cono de crecimiento de las fibras nerviosas.

Pese al uso de estas terapias, hasta un 30% de los pacientes no logran una recuperación clínica completa y esto se asume que es debido, en parte, a la presencia de los anticuerpos anti-gangliósidos. Por lo tanto, para comprender con mayor claridad estos efectos, se debe ahondar en esclarecer los mecanismos moleculares y cambios celulares que ocurren durante la interacción anticuerpo-antígeno, para mejorar o generar nuevas estrategias terapéuticas.

### **III. Regeneración axonal**

Llamamos regeneración axonal al proceso por el cual un axón que sufrió un daño y degeneró procede a elongarse nuevamente para inervar su órgano blanco. Esto ocurre casi exclusivamente en el SNP, no así en el SNC debido a que existen factores que inhiben esta reparación, siendo los daños en su mayoría irreversibles. Es por ello que se destaca la importancia de los estudios en enfermedades

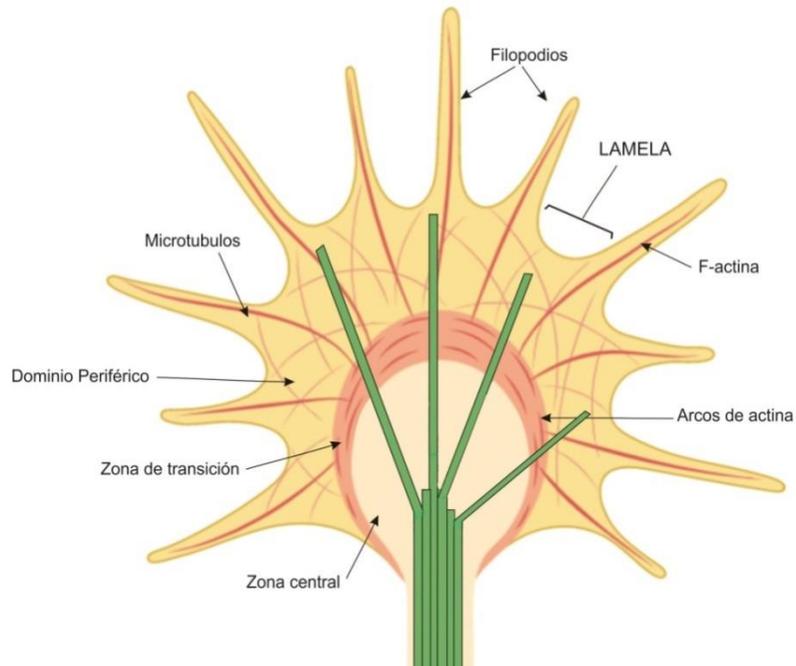
neurodegenerativas para prevenir y/o mitigar estos deterioros<sup>96</sup>. Cuando ocurre una lesión en los nervios periféricos, se ven afectados el axón y la vaina de mielina que lo recubre, por lo que deberá haber una reparación posterior de dichas estructuras para que se restablezca la conducción nerviosa. Posterior a una injuria, algunas células de Schwann mueren y otras pasan a un estado indiferenciado permaneciendo unidos a su lámina basal. Las células de Schwann secretan citoquinas y quimiotractantes para atraer a macrófagos al sitio de la lesión, los cuales se encargarán de fagocitar las células dañadas y los axones<sup>89</sup>. Los macrófagos activados además liberan diversas interleuquinas (IL 1 y 6) y citoquinas como factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), este último se ha visto involucrado en esta patología ya que aumenta la permeabilidad tisular, atrayendo y facilitando la infiltración de más células fagocíticas, productoras de elementos del complemento como respuesta pro-inflamatoria<sup>97,98</sup>. Durante la fase aguda de la patología se encuentran concentraciones altas de citoquinas en el plasma de los pacientes, pero poseen una vida media corta de tan solo pocas horas por lo que dificulta su estudio en relación a la enfermedad a largo plazo<sup>64,80,99</sup>.

En la mielina fragmentada quedarán expuestas ciertas moléculas (como MAG) que actúan como señales inhibitorias del crecimiento neurítico, por lo tanto, para que se proceda con la regeneración axonal primero debe haber una correcta limpieza de los detritos neuronales y de mielina<sup>100</sup>. Una vez concluido el proceso de saneamiento, las células de Schwann vuelven a diferenciarse y proliferar formando las bandas de Büngner, las cuales se componen de filas de células adheridas a la lámina basal orientadas en forma longitudinal que sirven de “tubos” orientadores para la elongación del axón<sup>101</sup>. En los mamíferos el promedio de regeneración axonal es de 1-2 mm por día, bajo condiciones óptimas del medio circundante, y aun así puede demorar meses o incluso años debido a la distancia de su target. Por lo tanto, fallas/demoras en el crecimiento del axón y en la reinervación de los órganos o tejidos pueden provocar atrofia muscular irreversible o pérdida de sensibilidad dependiendo si el proceso se lleva a cabo ágilmente, de manera completa o incompleta en el SNP<sup>102-104</sup>.

Durante el desarrollo de éste trabajo el término “regeneración axonal” se empleará para describir la reparación nerviosa que se observe en paradigmas de estudio *in vivo*, mientras que “crecimiento neurítico” será la expresión para referirnos a la misma en modelos *in vitro*.

Diversos estudios empleando cultivos neuronales han permitido reconocer la estructura primaria que se forma en la punta de cada neurita/axón (proyecciones del soma de la neurona) y que comienza el proceso de elongación: el cono de crecimiento (representado a continuación en la figura 6). Estos conos le permiten a la célula sentir el medio ambiente, captar señales extracelulares y comenzar/direccionar su elongación con movimientos mecánicos ameboides de avance y retracción<sup>105,106</sup>. El cono es una

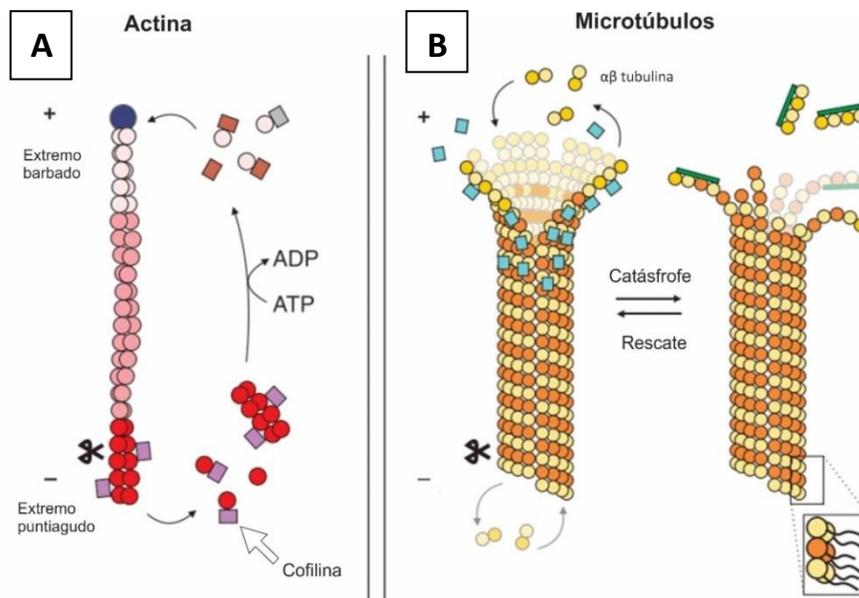
estructura altamente dinámica que está formada principalmente por componentes del citoesqueleto, que darán forma, permitirán el crecimiento y prolongación del futuro axón <sup>107</sup>. Entre los elementos que componen este citoesqueleto se destacan los microtúbulos (MT) que se encuentran en el área central con algunas proyecciones hacia el dominio periférico, encargados de aportar anclaje y tracción para el crecimiento; también se encuentran los filamentos de actina que se ubican en la periferia del cono, formando la lamela y los filopodios para el sensado del medio circundante <sup>108</sup>.



**Figura 6: Representación del cono de crecimiento de una neurona.** En el extremo se desarrolla la lamela o lamelipodia y filopodios formados de actina y en el área central (rojo) se observan los microtúbulos (verde).

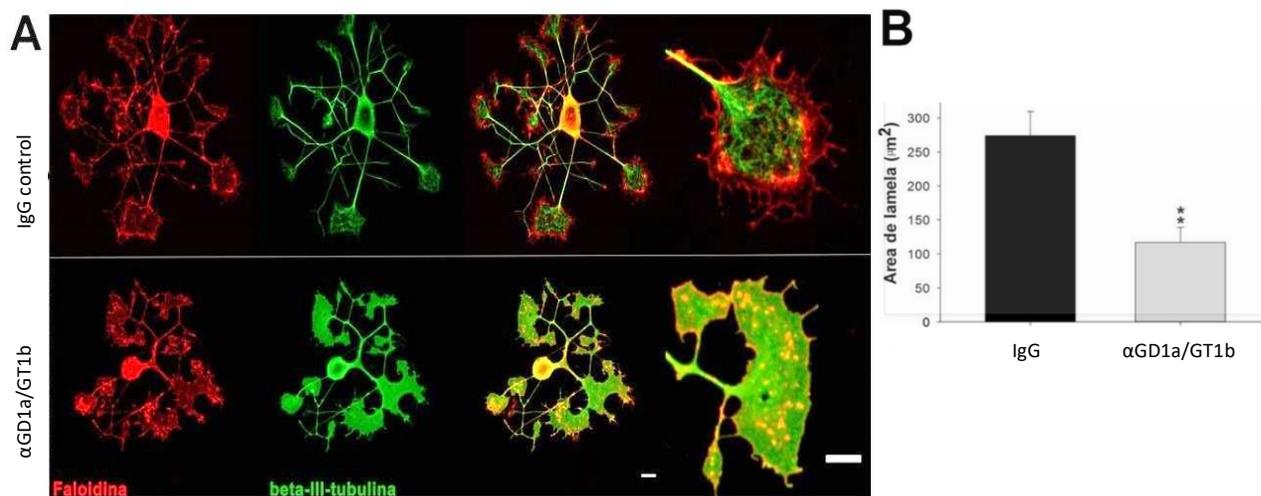
La actina es una proteína muy abundante en la mayoría de las células eucariotas, participando en diversas funciones biológicas como la movilidad, mantención de la forma celular, transporte vesicular y contracción muscular<sup>109</sup>. Los monómeros de actina (G-actina) pueden alinearse formando filamentos delgados (F-actina) y hay varios mecanismos que controlan su formación y estabilidad; mediante la hidrólisis de nucleótidos ATP y proteínas de unión a actina. El estado de G-actina unido a ATP es más estable y permite que se adhieran más monómeros en la punta en crecimiento (ver figura 7), lo que permite la protrusión de la lamela y la formación de filopodios. Los filopodios que son proyecciones citoplasmáticas delgadas formadas de F-actina, permiten el sensado del medio y forman adhesiones locales con el sustrato, que permiten extender la neurita<sup>110</sup>.

Por otro lado, el extremo del filamento de actina donde hay más ADP, llamado extremo negativo, permitirá una disociación más rápida de dichos monómeros, por la acción de diversas proteínas, como el factor de despolimerización de actina (ADF)/cofilina<sup>111</sup>. ADF/cofilina es a su vez, fosforilado/inactivado por quinasas LIM (LIMK 1 y 2), estabilizando los filamentos de actina en el cono de crecimiento y evitando la elongación del mismo. La familia de proteínas fosfatasas Slingshot pueden defosforilar a cofilina, por ende, activarla y también pueden inactivar a LIMK directamente<sup>112-114</sup>. Esto muestra que existe una compleja red de moléculas y vías que regulan la dinámica de actina y que pueden ser moduladas a su vez por pequeñas GTPasas, de las cuales se hablará más adelante, ya que se han visto implicadas en procesos de acople de señales y reordenamiento de los componentes del citoesqueleto.



**Figura 7:** representación de (A) la formación de filamentos de actina, con algunas enzimas necesarias para el proceso y (B) los eventos de rescate y catástrofe de microtúbulos. Imagen modificada de Coles & Bradke, 2015 <sup>111</sup>.

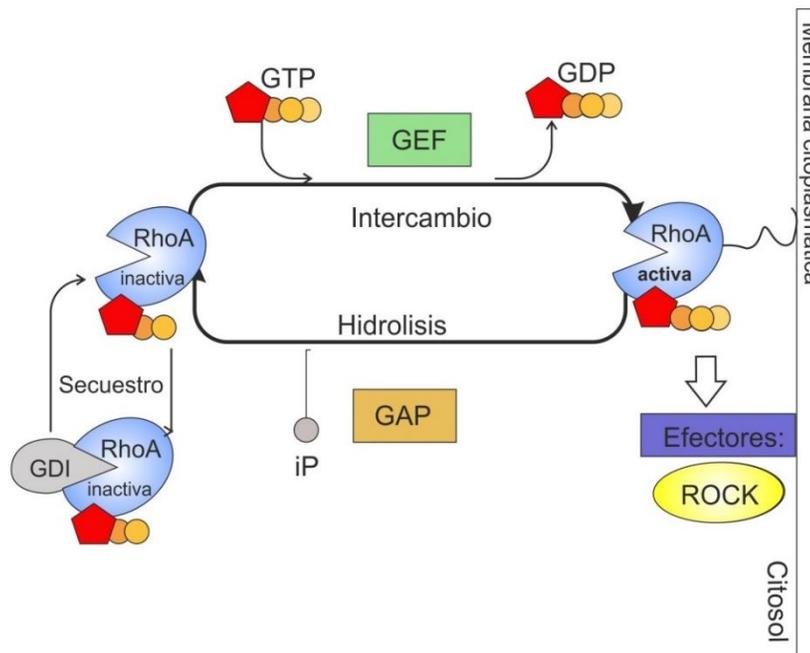
Los microtúbulos (MT) también participan en múltiples procesos biológicos, entre los que se destacan la división celular, andamiaje para transporte vesicular, anclaje y tracción para la movilidad celular <sup>111</sup>. Los MT están compuestos por moléculas de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina, que se disponen en dímeros que polimerizan formando filamentos y al agregarse forman una estructura cilíndrica, como un tubo hueco. La forma en que se disponen le otorga polaridad al microtúbulo, con un extremo + orientado hacia el cono de crecimiento, donde se darán los eventos de rescate (polimerización y elongación del MT) y eventos de catástrofe donde ocurre despolimerización del MT <sup>115</sup>. Existen varias moléculas encargadas del control de esta formación y dinámica de MT, como MAPs estructurales, proteínas asociadas a MT que estabilizan la forma polimerizada; proteínas que median la respuesta al colapso (CRMP) y otras que participarán en el crecimiento y guía de axones en regeneración luego de una injuria. En este sentido, un trabajo previo de nuestro laboratorio identificó el mecanismo molecular por el cual los anticuerpos anti-gangliósidos modulan negativamente el citoesqueleto de conos de crecimiento de neuronas DRG (modelo *in vitro* de extensión neurítica)<sup>90</sup>. En la figura 8 se puede observar que el tratamiento de cultivos primarios de DRGn con el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ GD1a/GT1b, provoca a cortos períodos de tiempo, un colapso de la lamela de actina del cono de crecimiento, acortamiento de los filopodios y despolimerización de los MT.



**Figura 8: Cultivos disociados de DRG tratados con el anticuerpo anti-GD1a/GT1b presentan alteraciones en el citoesqueleto de los conos de crecimiento.** A: Microfotografías inmunomarcadas con tubulina (verde) y actina (marcado como Faloidina en rojo). B: Cuantificación del área de lamela. Barras: 20um. Modificada de Rozés et al., 2016.

#### IV. Pequeñas GTPasas

Las pequeñas GTPasas son una superfamilia de proteínas que, por su capacidad enzimática de hidrolizar la molécula de guanosina trifosfato (GTP), pueden desarrollar diversas tareas y respuestas celulares. Las GTPasas suelen estar involucradas en el tráfico de vesículas, en la reorganización del citoesqueleto, en la polaridad y migración celular, entre las más importantes <sup>116,117</sup>. Cuando son activadas por factores extracelulares (moléculas solubles, interacciones con receptores o estrés mecánico), las GTPasas sufren un cambio conformacional que les permite unirse a sus efectores o moléculas blanco, comenzando así diversas cascadas de señalización <sup>118</sup>. La subfamilia de Rho GTPasas ciclan entre una forma activa cuando están unidas a GTP y una forma inactiva cuando hubo hidrólisis de un grupo fosfato quedando unida a GDP. A su vez, también existen otras moléculas que regulan este ciclo de activación/inactivación, como son los GEF (factor intercambiador de nucleótidos guanina) que facilita y regula el intercambio de GDP por GTP; las proteínas activadoras GAP (aumentan la actividad GTPasa facilitando la hidrólisis de GTP a GDP) y las GDI (inhibidor de la disociación de GDP) que las mantiene en estado inactivo. Dicha regulación esta resumida en el esquema de la figura 9 <sup>119</sup>.



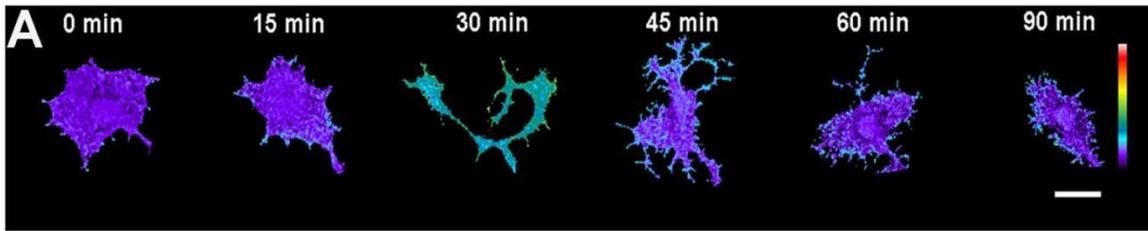
**Figura 9: Representación esquemática del ciclo de activación de RhoA.** Proteínas accesorias: GEF, factor intercambiador de GTP, GAP, proteína activadora de la hidrólisis de ATP y GDI, inhibidora de la disociación de GDP.

Durante el desarrollo de esta tesis nos interesó investigar algunos miembros de la subfamilia de Rho GTPasas, cuyos representantes más importantes son Rac1, RhoA y Cdc42, donde cada uno cumple diversas funciones regulatorias sobre el citoesqueleto de las células <sup>120</sup>. Estamos interesados en la función de Rac1 y Rho A que se detallan a continuación:

Rac1 está presente en los conos de crecimiento y controla en gran medida la formación de la lamela de actina <sup>105</sup>. Esta GTPasa se encuentra libre en citoplasma mientras está en su forma inactiva, pero luego trasloca a la membrana plasmática cuando se une a GTP. Rac1 puede ser activada por receptores de factores de crecimiento, mediante la quinasa de inositol trifosfato de manera directa o a través de GEFs como Tiam1 <sup>121</sup>. Entre las múltiples señales intracelulares que Rac1 es capaz de iniciar, destacaremos la activación de PAK y de la quinasa LIMK, que llevan a la fosforilación/inactivación de cofilina, lo que resulta en la estabilización de los filamentos de actina <sup>114,122</sup>. En concordancia, Rac1 también puede regular negativamente a slingshot, fosfatasa que se encarga de activar a cofilina, por lo que su accionar se verá afectado también por esta vía <sup>114,123</sup>. De esta manera la regulación de Rac1 es muy importante en los conos de crecimiento, ya que permitirá el crecimiento o retracción de la lamela <sup>121,124</sup>.

RhoA regula negativamente el crecimiento axonal. En su forma inactiva está en el citosol y al ser activada sufre un cambio conformacional que la lleva a traslocar a la membrana plasmática donde activará a su quinasa asociada (ROCK), que puede a su vez, promover la actividad de otras proteínas aguas abajo en la cascada de señalización. ROCK puede activar a LIMK (para estabilizar F-actina) y fosforilar a CRMP2 (promueve colapso de los MT) <sup>90,125-127</sup>. De esta manera, RhoA cumple un rol muy importante controlando al citoesqueleto, tanto de actina como tubulina y por ello es la molécula en donde convergen múltiples vías de señalización inhibitorias de la regeneración axonal, por ejemplo señales como el ácido lisofosfatídico (LPA), NOGO, OMgP, MAG, CSPG (proteoglicanos) y anticuerpos anti-gangliósidos, que pueden desencadenar esta cascada y así provocar el colapso del cono de crecimiento <sup>90,123,128,129</sup>.

Particularmente, en un trabajo previo de nuestro laboratorio se demostró que el anticuerpo monoclonal crosreactivo  $\alpha$ GD1a/GT1b provocaba la activación de RhoA en cultivos primarios de DRGn. A continuación se activa ROCK, la cual fosforila/inactiva a CRMP2 en la Treonina 555, lo que conlleva a una despolimerización de los microtúbulos que se traduce en un cono de crecimiento distrófico y por ende en la inhibición del crecimiento neurítico <sup>90</sup>. En dicho trabajo, también se describió mediante el uso de biosensores específicos para RhoA, que la activación de ésta GTPasa ocurre en forma aguda en un corto período de tiempo luego del tratamiento con los anticuerpos anti-gangliósidos (Figura 10). Se observó también que el tratamiento con  $\alpha$ GD1a/GT1b provoca el colapso de la lamela de actina de manera muy rápida, pero que ocurre de manera independiente de la vía de RhoA/ROCK.



**Figura 10:** La imagen muestra la activación de RhoA en conos de crecimiento expuestos a  $\alpha$ GD1a/GT1b. microfotografías de conos de crecimiento donde se hace foco de estudio. A las imágenes se les otorgó un pseudo-color para determinar activación de la GTPasa RhoA manifestado por colores cálidos. Imagen modificada de Rozés et al., 2016.

Una molécula muy estudiada por ejercer un control negativo sobre la actividad de RhoA ha sido la proteína quinasa A (PKA), que comienza su accionar cuando se incrementan los niveles de AMPc intracelular<sup>31</sup>. Se han descrito dos posibles modos en que ésta vía puede regular a la GTPasa RhoA: una forma directa propone que PKA es capaz de fosforilar a RhoA en la serina 188, de esta manera inducir un complejo estable [RhoA-GDP-RhoGDI] que se quedara en el citosol. La otra vía propone que se fosforila la serina-174 del RhoGDI, de esta manera no se produce la separación con éste y por ende RhoA queda en su estado inactivo<sup>125,130</sup>.

MAG, por ejemplo, ha sido estudiada por activar a las proteínas G inhibitorias que aumentan el calcio intracelular y disminuyen AMPc, de esta manera no se puede activar PKA lo que deriva en la inhibición de la regeneración axonal. En cambio, si los cultivos son previamente expuestos con neurotrofinas, se favorece el aumento de AMPc que previene los efectos adversos en la extensión de neuritas provocado por MAG<sup>31,37,131</sup>.

Como se mencionó anteriormente, los gangliósido GD1a y GT1b actúan *in vitro* como receptores funcionales de MAG y particularmente GT1b como parte del complejo multi-molecular junto con Lingo1, p75<sup>NTR</sup> y NgR1 que inician la transducción de señales<sup>12,132</sup>. p75<sup>NTR</sup> posee un dominio interno denominado de muerte celular (DD), porción que es clivada al activarse el receptor. El DD puede interactuar con el complejo RhoGDI-RhoA a través de alguno de los residuos que fueron mutados en las posiciones 350/353 y 410/413, así RhoGDI se une al DD lo que genera su disociación de RhoA, la cual podrá ser activada por GEFs<sup>17,45,46,133,134</sup>. Se demostró que la sobreexpresión del receptor p75<sup>NTR</sup> endógeno es suficiente para que se active RhoA en células neuronales<sup>40,135,136</sup>. En las vías de activación tradicionales descritas para este receptor, con sus neurotrofinas ligando se reconoce que es necesaria la trimerización de las proteínas para iniciar la señalización, pero como parte del complejo multi-molecular, se determinó que p75<sup>NTR</sup> en su forma monomérica, ya es capaz de activar a RhoA<sup>137</sup>.

La cascada de señalización iniciada por MAG no se puede extrapolar directamente a los efectos inhibitorios mediados por los anticuerpos anti-gangliósidos, porque si bien en ambos modelos RhoA es activada, se ha estudiado que la administración de anticuerpos  $\alpha$ GD1a/GT1b en animales deficientes para el receptor p75<sup>NTR</sup>, aún provoca una fuerte inhibición de la regeneración axonal<sup>138</sup>. Otros trabajos proponen a Taj/Troy como reemplazo en el complejo multimérico en neuronas que carecen de la expresión de p75<sup>NTR</sup>, sin embargo, no se tienen evidencias de su interacción con gangliósidos<sup>139</sup>. Por lo tanto se deduce que **pueden existir vías de señalización celular relacionadas a la inhibición de la regeneración axonal mediada por anticuerpos anti-gangliósidos independientes de este receptor p75<sup>NTR</sup>**, que involucren la participación de moléculas transductoras alternativas pudiendo quizás incluir un **re-arreglo de receptores particular** para cada tipo celular<sup>39,44</sup>.

Se deduce entonces, que existe un complejo sistema de GTPasas y receptores que participan e interaccionan para regular la dinámica del citoesqueleto tanto de actina como de tubulina de las neuronas luego de una injuria. Con todo lo expuesto anteriormente se puede decir que **existen vías de señalización intracelular dependientes e independientes de RhoA responsables de la inhibición de la regeneración axonal mediada por anticuerpos anti-gangliósidos. Y también que los gangliósidos pueden señalizar como parte de complejos moleculares, algunos ya han sido descritos, o por vías con mecanismos indefinidos aún, que actuarían como transductores de la señal a nivel intracelular para modular a RhoA**<sup>5</sup>. Las posibles vías y mecanismos descritos hasta al presente por los cuales los anticuerpos anti-gangliósidos provocan inhibición de la regeneración axonal, se han esquematizado en la figura 11.

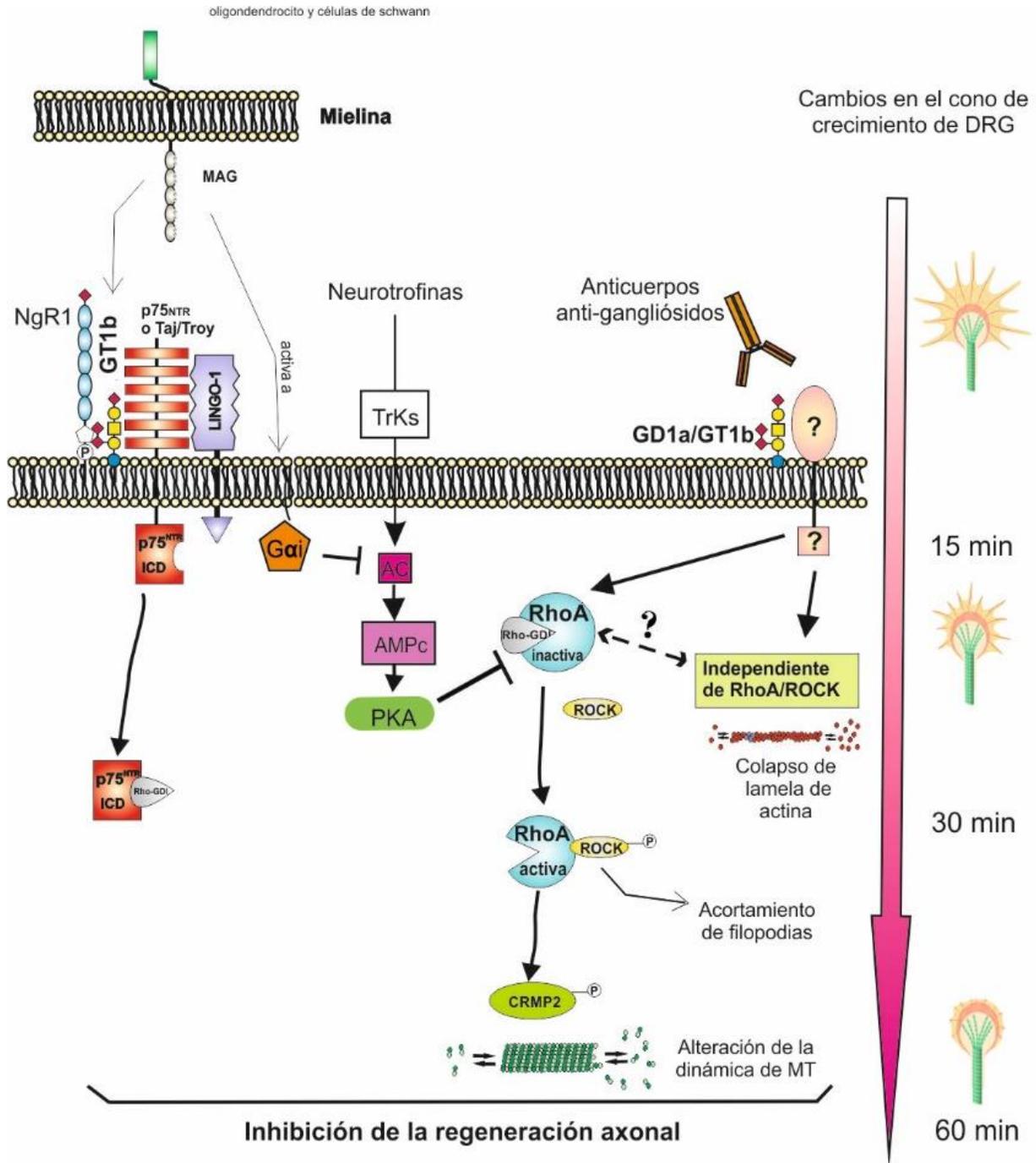


Figura 11: Posibles mecanismos moleculares de inhibición de la regeneración axonal mediada por anticuerpos anti-gangliósidos.

## V. Proteínas G

Otro grupo de moléculas que han sido frecuentemente descritas como moduladoras de señales intracelulares y que participan en el control de la dinámica del citoesqueleto son las proteínas G, quienes generalmente se encuentran formando un heterotrímero con subunidades: alfa ( $\alpha$ ) las cuales tendrán la capacidad GTPasa; las beta ( $\beta$ ) y las subunidades gama ( $\gamma$ )<sup>140-142</sup>.

Los grupos o familias más importantes de Proteínas G $\alpha$  de interés para este proyecto son los siguientes: G $\alpha_s$ : de tipo estimuladora, capaz de activar la adenilato ciclasa incrementando los niveles de AMP cíclico, que activa PKA e inhibe a RhoA. Las neurotrofinas suelen activar estas proteínas G para promover el crecimiento de las neuritas.

G $\alpha_{i1-2-3}$ : inhibitorias, como su nombre lo dice, regula negativamente la adenilato ciclasa, disminuyendo la cantidad del segundo mensajero AMPc. Este tipo de G $\alpha$  puede ser bloqueada o inhibida por toxina pertúsica (acrónimo Ptx). La ADP-ribosilación por toxina pertúsica cataliza la transferencia de ADP-ribosa a la cisteína cerca del C-terminal de la subunidad alfa; lo que evita el cambio de GDP por GTP (impidiendo la activación de la proteína G, a pesar de que el receptor reciba la señal)<sup>125</sup>.

En la vía tradicional o canónica descrita para las proteínas G heterotriméricas, la activación comienza cuando los ligandos se unen a “receptores acoplados a proteínas G” (GPCRs por sus siglas en inglés), que comprenden una gran familia de receptores de membrana caracterizados por tener 7 dominios transmembrana, un terminal amino extracelular y un terminal carboxilo intracelular que interactúa con G $\alpha$ . Los GPCRs actúan como GEFs para activar las proteínas G y en presencia de Mg<sup>+</sup>, facilitan la unión de GTP a la subunidad alfa que se activa, se disocia de las subunidades  $\beta\gamma$  y libre en el citoplasma puede iniciar diversas cascadas de señalización<sup>140</sup>.

Las subunidades  $\beta\gamma$  son dos polipéptidos que funcionan como un monómero (no se disocian), sirven de anclaje a la membrana plasmática interna para todo el complejo y son capaces de activar sus propias vías una vez que se separan de G $\alpha$ , como regular canales iónicos, a la quinasa fosoinositol 3 (PI3K), entre otros efectores<sup>143</sup>.

La señal de muchos GPCR termina cuando se fosforila y activan las proteínas quinasas asociadas a éstos (GRKs por sus siglas en inglés) y la subsiguiente unión a proteínas arrestinas quienes compiten por la misma cavidad helicoidal del receptor que las proteínas G. Los GRKs pueden también fosforilar otros sustratos que no sean GPCRs, por ejemplo, receptores de muerte, factores de transcripción y proteínas del citoesqueleto<sup>144</sup>. Las arrestinas también pueden señalar moléculas independientemente de los

receptores acoplados a proteína G y se han descrito activaciones no-canónicas de proteínas G mediada por receptores por ejemplo del tipo tirosina quinasa <sup>142,145</sup>

Es interesante notar que varios componentes de estas cascadas: las proteínas G, la adenilato ciclasa, el AMPc y PKA, han sido localizados de manera diferencial y se ha descrito su interacción en microdominios de balsas lipídicas o regiones sin ordenamientos de la membrana celular, sitio donde podrían estar interaccionando con los gangliósidos de la membrana <sup>31,37,131,146</sup>.

## VI. Estrategias de estudio de moléculas con posible interacción con gangliósidos

El estudio de interacciones entre gangliósidos y proteínas de membrana siempre ha sido complicado de abordar, ya que generalmente las metodologías convencionales de aislamiento de complejos moleculares, como la co-inmunoprecipitación, incluyen el uso de detergentes a los cuales los lípidos no son resistentes, hecho que resulta en una limitación técnica difícil de subsanar <sup>147</sup>. Hoy en día se buscan metodologías para sobreponerse a éstos problemas, una de ellas es la proteómica. Esta técnica puede describirse como el análisis de proteínas para identificarlas, cuantificarlas y de manera más exhaustiva puede implicar la determinación de sus localizaciones, modificaciones, interacciones, actividades y funciones <sup>148,149</sup>.

La proteómica basada en la espectrometría de masas (EM) fue el método empleado con éxito en el estudio de Prendergast y col. <sup>150</sup>, quienes tuvieron como objetivo determinar posibles compañeros moleculares que interaccionan con ciertos gangliósidos (GM1 y GT1b) en la membrana. En este estudio, cultivos primarios de neuronas granulares del cerebelo, a las cuales luego de 12 días de cultivo se homogeneizaron y se biotinilaron las proteínas de membrana para purificarlas posteriormente. Previamente a correr la EM, los homogenatos se incubaron por 16 horas con esferas de agarosa magnéticas que tenían unido covalentemente gangliósidos GM1 o GT1b, lo que hizo factible el uso de detergente para los pasos de purificación y limpieza. Ésta estrategia de estudio les permitió obtener resultados en los que se detallan más de 500 proteínas que podrían estar interactuando con los gangliósidos GM1 y/o GT1b bajo sus condiciones de trabajo. Sin embargo, resta investigar qué tipo de interacción pueden tener los gangliósidos con las proteínas observadas en la proteómica.

Existen diversas formas en que los gangliósidos pueden estar participando en cascadas de señalización: actuando como co-receptores o moduladores de receptores y mediante unión directa, por ejemplo anticuerpos que interactúen o reconozcan ciertas porciones de los gangliósidos como epítopes <sup>151-154</sup>.

Trabajos donde se describen las estructuras cristalinas de proteínas en complejo con gangliósidos detallan sitios y cargas eléctricas de los aminoácidos que serán críticos para generar las interacciones, por ejemplo con la carga negativa del carboxilo, el grupo N-acetil galactosamina y el N-acetilo del ácido siálico de los gangliósidos <sup>5,155</sup>. Las toxinas botulínica y tetánica poseen en la secuencia de aminoácidos una organización tridimensional especial para la unión con gangliósidos y se asocia específicamente a la estructura central hidrocarbonada de éstos, preferencialmente al enlace GalNAc3-Gal4 de los gangliósidos complejos <sup>29</sup>.

Ha sido propuesto que alguna de estas diversas señales (toxinas, anticuerpos y otras) provocarían la agregación de gangliósidos en las balsas lipídicas de la membrana, allí reclutarían y/o interaccionarían con moléculas transductoras, quienes a su vez activarían diversas vías de señalización intracelular; entre las más importantes a destacar para el estudio de esta tesis es la activación de la pequeña GTPasa RhoA, que culmina con la inhibición de la regeneración axonal <sup>11,12,17</sup>.

Es importante recalcar la representación de miembros de la super familia de receptores del factor de necrosis tumoral (SFTNFR), que han sido descritos en participar, junto con los gangliosidos, de señales inhibitorias del crecimiento neurítico: estos miembros son el p75<sup>NTR</sup> (también conocido como TNFR 16) y Taj/Troy ( TNFR 19 respectivamente) <sup>12,139</sup>.

Para finalizar, las moléculas involucradas en el control de procesos celulares, y específicamente en la dinámica del citoesqueleto, serán de suma importancia para lograr un correcto y completo crecimiento neurítico. Debemos recordar que aún no se han esclarecido todos los mecanismos moleculares (receptores, proteínas accesorias, cascadas de señalización, etc.) que subyacen y están implicados en la inhibición de la regeneración axonal mediada por anticuerpos anti-gangliósidos y eso constituye parte de los objetivos a estudiar en este trabajo de tesis.

## VII. Hipótesis y objetivos

En base a todos los antecedentes previamente expuestos, en este trabajo de tesis nos planteamos la siguiente hipótesis y objetivos específicos

### Hipótesis:

Los anticuerpos anti-gangliósidos ejercen un rol inhibitorio sobre la regeneración axonal mediante la activación de una cascada de señalización que involucra la interacción de gangliósidos con moléculas transductoras específicas, lo que se traduce en la activación de vías dependientes e independientes de RhoA, que modulan en forma negativa el citoesqueleto de actina y tubulina de los conos de crecimiento de las neuronas estudiadas.

### Objetivos Específicos:

- Determinar e identificar la/las posibles moléculas transductoras en la membrana, capaces de mediar el efecto inhibitorio de los anticuerpos anti-gangliósidos sobre el crecimiento neurítico en modelos *in vitro* e *in vivo*.
- Estudiar las vías de señalización que conducen a la activación de la GTPasa pequeña RhoA, un efector común en el cual convergen diferentes inhibidores de la regeneración axonal.

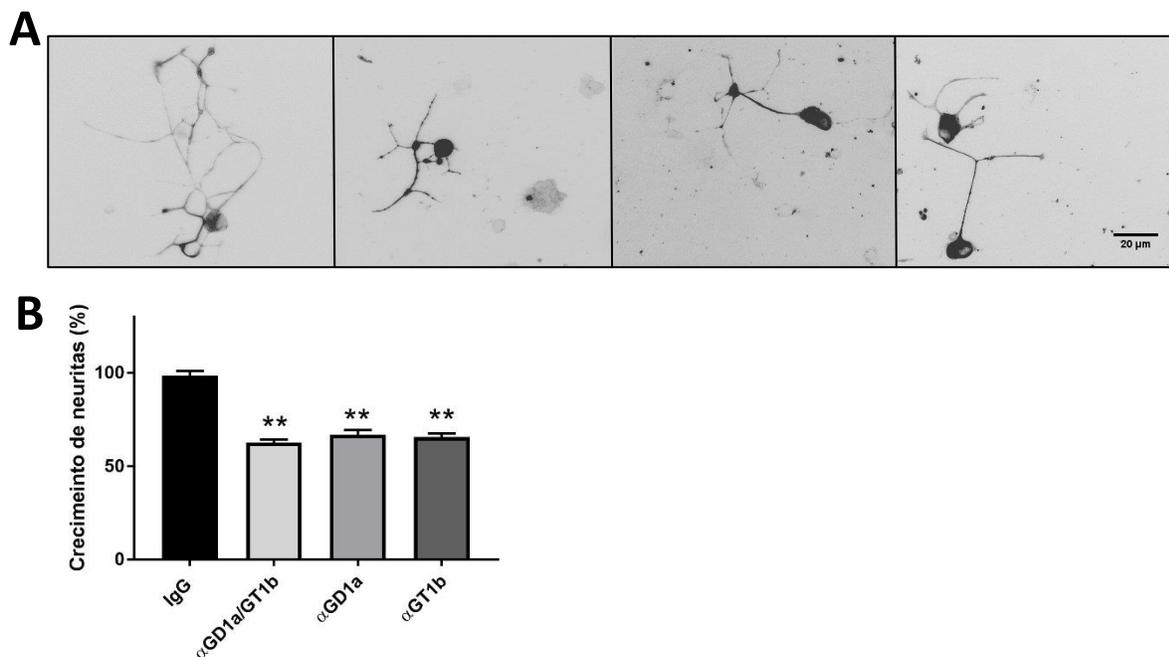


# Resultados

### 1. Los anticuerpos anti-gangliósidos tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de neuritas.

Primero se decidió examinar los efectos de los diferentes anticuerpos anti-gangliósidos sobre el crecimiento de neuritas en cultivos primarios disociados de DRGn de crías de ratón y de rata de cepas salvajes. Los cultivos se trataron durante 18 horas con dos concentraciones de anticuerpos monoclonales específicos contra los gangliósidos GD1a o GT1b, con anticuerpo crosreactivo  $\alpha$ GD1a/GT1b o con IgG control, respectivamente. Luego de éste tratamiento las células fueron fijadas con PFA 4% y posteriormente inmunomarcadas utilizando anti- $\beta$ -III-tubulina, marcador neuronal específico y el anticuerpo secundario correspondiente para su visualización. Las imágenes obtenidas en el microscopio de epifluorescencia se analizaron para determinar el posible efecto inhibitorio de los anticuerpos anti-gangliósidos sobre la elongación de neuritas (Fig.12).

Para ambas especies se obtuvieron los mismos patrones de resultados, donde se demostró claramente que los tres tratamientos con anticuerpos anti-gangliósidos tuvieron efectos equivalentes y provocaron una reducción significativa en el crecimiento de las neuritas en comparación con los cultivos control tratados con IgG (Fig. 12). Los anticuerpos monoclonales anti GD1a (abreviado  $\alpha$ GD1a) y anti-GT1b ( $\alpha$ GT1b) indujeron una reducción del crecimiento de neuritas de aproximadamente 35% ( $\alpha$ GD1a:  $66.85 \pm 2.52$  y  $\alpha$ GT1b:  $65.74 \pm 1.89$ ). Y el anticuerpo crosreactivo  $\alpha$ GD1a/GT1b causó casi 40% de inhibición ( $62.53 \pm 1.88$ ).



**Figura 12. Anticuerpos anti-gangliósidos provocan inhibición del crecimiento neurítico en cultivos primarios de DRGn. A.** Microfotografías de DRGn de ratón cepa salvaje tratadas con IgG control [50 $\mu$ g/ml],  $\alpha$ GD1a/GT1b

[50µg/ml], αGD1a[100µg/ml] y αGT1b[100µg/ml] por 18horas e inmunomarcadas con anti-β-III-tubulina. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa Image J, barra indica 20µm. **B.** Cuantificación de la extensión de neuritas, n: 4 experimentos independientes. Empleando el programa estadístico GraphPad Prism7 se realizó análisis de Kruskal-Wallis, \*\*p<0.01 comparado con el control, indican error estándar medio (EEM).

## **2. Búsqueda de moléculas transductoras de la señal inhibitoria de los anticuerpos anti-gangliósidos sobre la regeneración axonal mediante ensayos de proteómica cuantitativa.**

Para el siguiente conjunto de experimentos, trabajamos en colaboración con el equipo de investigación del Dr. Ronald Schnaar, del departamento de Farmacología de la Universidad Johns Hopkins, en EEUU, y accedimos al listado completo de un estudio de proteómica que realizaron. En dicho ensayo, determinaron ciertas proteínas de membrana que interactuaban con los gangliósidos GM1 y GT1b<sup>150</sup>. Empleando homogenatos de cultivos primarios de células granulares de cerebelo de rata y uniendo las proteínas biotiniladas de membrana con gangliósidos unidos covalentemente a esferas magnéticas, lograron identificar un gran número de proteínas asociadas a éstos glicosfingolípidos mediante análisis de espectrometría de masas cuantitativo basado en iTRAQ (Etiqueta isobárica para cuantificación relativa y absoluta). Los gangliósidos pueden interactuar con una gran variedad de proteínas de membrana, formando un mapa de interacciones moleculares que llamaremos interactoma. La metodología empleada previo al análisis proteómico involucra condiciones de disociación leves durante los pasos de captura de proteínas con los gangliósidos, es por ello que muchas proteínas grandes y receptores de membrana que tienden a agregarse no pudieron ser resueltos en el estudio. En cambio, proteínas más pequeñas, que cumplen roles adaptadores, efectoras o segundos mensajeros si fueron retenidas por los gangliósidos embebidos en las esferas magnéticas y pudieron ser identificadas en la proteómica. Dichas proteínas nos sirvieron de indicios para investigar cuáles receptores podrían estar interactuando con los gangliósidos.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en la proteómica, analizamos el listado donde se detallan más de 400 proteínas que se identificaron por valores de enriquecimiento y podrían estar interactuando con los gangliósidos GM1 o GT1b respectivamente. Buscamos moléculas candidatas que pudieran interactuar con los gangliósidos de membrana y transducir la señal inhibitoria de los anticuerpos anti-gangliósidos sobre el crecimiento de neuritas. Por motivos de convenio de confidencialidad en la colaboración no se muestra la lista completa de moléculas encontradas en la proteómica.

### **2.1 Búsqueda bibliográfica, análisis informático y silenciamiento de posibles candidatos.**

Para comenzar el estudio del interactoma de gangliósidos a nivel de membrana, se realizó una exploración bibliográfica e informática con el fin de analizar las interacciones descritas hasta el presente entre las proteínas identificadas por el estudio de proteómica con gangliósidos unidos a esferas magnéticas. Se emplearon motores de búsqueda en línea que aprovechan una gran base de datos biológicos para determinar interacciones conocidas o predichas para diferentes proteínas. STRING, Uniprot y Gene Ontology fueron las principales páginas web; mientras Mision Sigma, Blast y otros recursos informáticos fueron utilizados para encontrar las secuencias correctas y así determinar funciones y estudiar la participación de esas proteínas en diferentes procesos biológicos. Particularmente se tuvo como criterio de búsqueda aquellas moléculas involucradas en cascadas de señalización de la regeneración axonal.

La búsqueda arrojó varias proteínas que llamaron nuestra atención. Primero se realizó una caracterización y clasificación de dichas moléculas analizando el ranking en el que habían aparecido en la proteómica. Este ranking se definía por los niveles de enriquecimiento de los homogenatos cuando eran incubados con gangliósido GM1 (proteína 1 mas enriquecida en las muestras expuestas a las esferas enbebidas con GM1) o con GT1b (ultima proteína detallada en la lista 446, muy enriquecida en los homogenatos incubados con GT1b). Con toda esta información recolectada conformamos la siguiente tabla 1, listando las proteínas de interés para analizar. El orden en que se presentan las proteínas candidatos responde a los valores de enriquecimiento en cada muestra, según si se asociaron en mayor proporción al gangliósido GM1 o al GT1b cuando se incubaron los homogenatos de membrana con las esferas magnéticas conteniendo los gangliósidos covalentemente unidos.

Enriquecimiento GM1/GT1b	Proteína candidato	Relación funcional o metabólica:
4	Fosfolipasa A 2 (PLA2)	Enzima involucrada en el metabolismo de lípidos. Necesaria para la disociación de proteínas G. Es estimulada por IL-1 y TNF $\alpha$ , participa en procesos inflamatorios <sup>156-158</sup> .
13	Receptor relacionado a Insulina (IRR)	Es un miembro huérfano de la familia de receptores de Insulina tipo tirosina quinasa está relacionado con GM3 <sup>18,159,160</sup> .
24	proteína G inhibitoria subunidad alfa-2 (G $\alpha$ i2)	Proteína intracelular efectora con capacidad de inhibir a la adenilato ciclasa, provoca disminución de AMPc intracelular y la consecuente caída de la actividad del efector PKA <sup>161</sup> .
165	Esfingosina-fosfato liasa 1 (Sgpl1)	Es intermediaria en el metabolismo de los esfingolípidos, regula la proliferación, la diferenciación y la migración celular. Activa fosfolipasa c. Se acopla a miembros de proteínas G inhibitorias y media la activación de Rac1 <sup>162</sup> .
228	sustrato 1 de la toxina botulínica C3 relacionada con ras (Rac1)	GTPasa relacionada al control del citoesqueleto de actina. También relacionada con el metabolismo de lípidos. Modulada por subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G. Regulación de la adhesión a la matriz y adhesión, migración celular <sup>122,163,164</sup> .
440	proteína asociada al receptor 1 de TNF $\alpha$ (trap1)	Parte de la familia de chaperonas encargadas de la transducción de señales, protección del ADN frente a daños y estrés. Control del plegado y degradación de proteínas <sup>165,166</sup> .

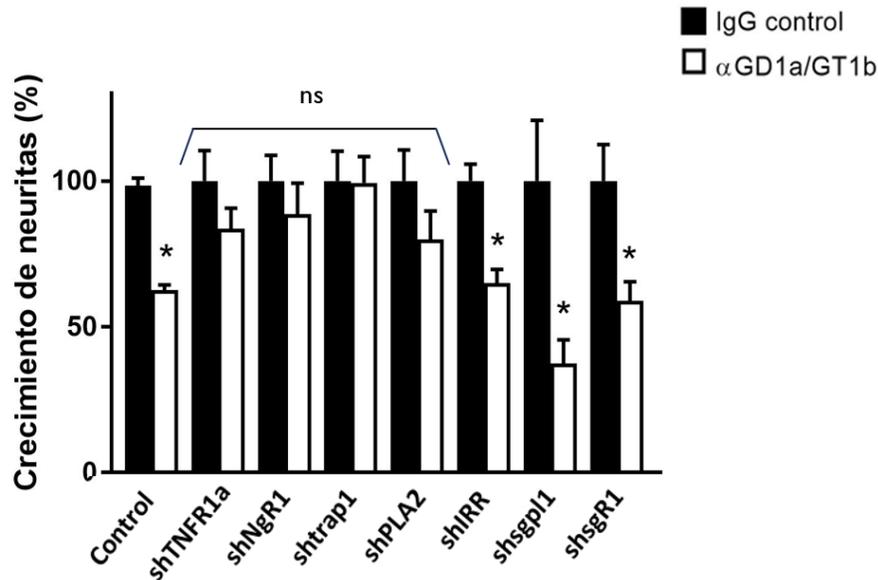
446	Reticulon 4 (NOGO)	Inhibidor del crecimiento neurítico través del complejo multimérico con su receptor NgR1, p75 <sup>NTR</sup> , Lingo-1 y GT1b (Fournier, Gould, Liu, & Strittmatter, 2002; Niederöst, et. al, 2002; Wang, Kim, Sivasankaran, Segal, & He, 2002).
NC	Receptor de NOGO (NgR1)	Evidencias de su participación en el complejo con p75 <sup>NTR</sup> , Gt1b y Lingo-1. Pertenece a la super familia de receptores del factor de necrosis tumoral (SFTNF). <sup>168,170,171</sup>
NC	Receptor del factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNFR1a)	Relacionado en procesos pro-inflamatorios y apoptosis. Pertenece a la super familia de receptores del factor de necrosis tumoral (SFTNF). <sup>172,173</sup>
NC	Receptor de la esfingosina fosfato liasa 1 (sgplR)	Es un receptor acoplado a proteína G tipo inhibitorias (GPCR), capaz de unirse a NOGO en un sitio diferente a sgpl1 y mediar la señal inhibitoria del crecimiento neurítico activando a RhoA. <sup>174,175</sup>

**Tabla 1: Proteínas candidato a ser compañeros moleculares de los gangliósidos en la membrana para la transducción de señales.** NC= no corresponde, porque son moléculas que no fueron resueltas en el análisis proteómico.

A continuación, para determinar la posible participación de alguno de estos candidatos en la vía de señalización de los anticuerpos anti-gangliósidos, nos basamos en el paradigma clásico que consiste en mostrar mediante la disminución de la expresión, que dicha molécula es necesaria para desencadenar los efectos inhibitorios de los anticuerpos anti-gangliósidos en el crecimiento neurítico. Por ello empleamos la técnica de silenciamiento por pequeño ARN de interferencia (shARN), diseñando las secuencias de shARN para todos los candidatos utilizando secuencias previamente descritas y validadas por Mission Sigma. Dichas secuencias fueron insertadas con técnicas de ingeniería genética, en un plásmido comercial PLKO3.G que contenía a su vez la secuencia para la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) para permitir la posterior visualización de las células que incorporaron y expresan el vector.

El siguiente paso consistió en electroporar los plásmidos conteniendo esas secuencias shARN en neuronas DRG de rata y esperar por 24 horas la correcta expresión de los mismos. Luego las células se replaquearon mecánicamente (para evitar degradación del receptor de membrana) y se trataron por 18 horas con IgG control o el anticuerpo crosreactivo  $\alpha$ GD1a/GT1b. Se empleó este anticuerpo crosreactivo ya que antecedentes del laboratorio demostraron su alta afinidad y eficacia para inhibir el crecimiento neurítico *in vitro* (ver nuevamente figura 12) y la regeneración axonal *in vivo*, lo cual nos permitió conocer fácilmente si la proteína silenciada estaba implicada en la cascada de señalización.

Dentro de los resultados obtenidos de este primer chequeo en búsqueda de proteínas transductoras, pudimos observar que la ausencia de expresión de algunas de estas moléculas candidato revirtió la susceptibilidad de los cultivos neuronales a los efectos inhibitorios de los anticuerpos anti-gangliósidos, ver figura 13. Los cultivos que se mostraron insensibles al efecto del anticuerpo  $\alpha$ GD1a/GT1b, los cuales poseen valores normales de crecimiento neurítico (relativos a su control), fueron aquellos expresando los shARN de las siguientes proteínas: Trap1 ( $99.43 \pm 8.95$ ); TNFR1a ( $83.72 \pm 6.96$ ); NgR1 ( $88.71 \pm 10.5$ ) y PLA2 ( $80.05 \pm 9.71$ ).



**Figura 13. El silenciamiento de la expresión de algunas proteínas candidato en DRGn identificadas por estudio de proteómica previene la inhibición del crecimiento neurítico mediado por  $\alpha$ GD1a/GT1b.** Cuantificación del efecto inhibitorio del tratamiento con anticuerpo  $\alpha$ GD1a/GT1b [50 $\mu$ g/ml] por 18 horas sobre la extensión de neuritas en cultivos primarios de DRGn de rata, electroporadas con plásmidos conteniendo secuencias shARN para diversas proteínas: TNFR1a, NgR1, trap1, PLA2, IRR, sgp1 y sgR1. Se grafica el promedio de cada tratamiento de 3 experimentos independientes. Empleando el programa estadístico GraphPad Prism7 se realizó ANOVA y el test post Hoc Tukey \* $p < 0.05$  comparado con cada control, las barras indican EEM.

Estos resultados nos permitieron arribar a las siguientes deducciones analíticas:

En primer lugar, encontramos que silenciar la expresión de NgR1 en cultivos de DRGn por nucleofección de secuencias específicas de su shARN bloqueó el efecto inhibitorio de  $\alpha$ GD1a/GT1b sobre el crecimiento de neuritas (35%) (Figura 13). NgR1 es receptor protéico unido a la membrana plasmática a través de un residuo glicosilfosfatidilinositol y no tiene dominio intracelular, por lo que no puede traducir la señal al interior celular por sí solo. Se conoce que NgR1 participa del complejo multimérico [ NgR1, p75<sup>NTR</sup>, Lingo-1 y GT1b] que es capaz de activar RhoA y transducir el efecto inhibitorio sobre crecimiento neurítico mediado por anticuerpos anti-GT1b, por MAG, OMgp o NOGO (ver figura 9 de la introducción)<sup>45,176</sup>. Sin embargo, se determinó que en animales carentes de expresión de p75<sup>NTR</sup>, el anticuerpo  $\alpha$ GD1a/GT1b mantiene su efecto inhibitorio sobre la regeneración axonal<sup>138</sup>, por lo que ya está descrito una vía para el accionar de este anticuerpo relacionado a GT1b, pero aún queda por dilucidar como se traduce la señal a través de GD1a, por lo que decidimos continuar la búsqueda de otra molécula transductora alternativa.

La fosfolipasa 2 A (PLA2) es una enzima que al activarse hidroliza enlaces éster presentes en fosfolípidos, se ha visto que este hecho puede causar el desglose de la interacción mielina/axón y estimular la fagocitosis por macrófagos durante la degeneración Walleriana<sup>177</sup>. Observamos que el silenciamiento de la enzima previno de manera moderada la inhibición del crecimiento neurítico mediado por los anticuerpos anti-gangliósidos. Consideramos que es un candidato con una relación o influencia ya definida y se podrían desarrollar estrategias de estudio para determinar cómo participaría en ésta cascada de señalización<sup>156,158,177</sup>.

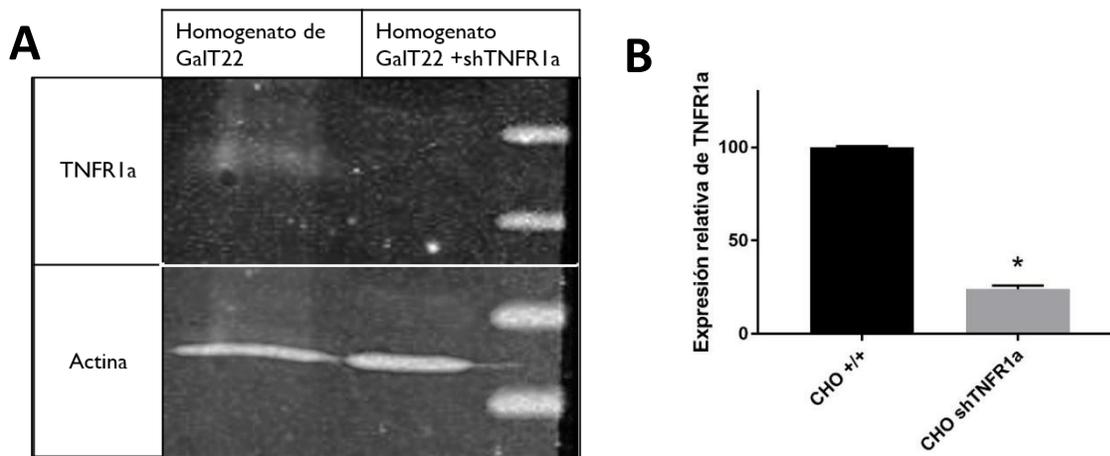
Como se mencionó anteriormente, una de las limitaciones de los estudios de proteómica es la identificación de proteínas de membrana, debido a la capacidad de agregación de las mismas durante el proceso de aislamiento, es por ello que aparecen en el listado ciertas proteínas efectoras de señales, que nos dan indicio de cuál puede ser el receptor a estudiar. Es el caso de la proteína trap1, es un efector del receptor del factor de necrosis tumoral 1, reconocida como chaperona que cumple rol protector contra estrés oxidativo y está involucrada en transducción de señales. Según nuestros resultados, el silenciamiento de esta proteína previno el efecto inhibitorio sobre crecimiento neurítico mediado por anticuerpos anti-gangliósidos, por lo que sería necesaria en la cascada de señalización. Sin embargo, al expresarse en membranas intracelulares, como en el retículo endoplasmático y principalmente en la mitocondria, actúa como efectora pero no sería un compañero molecular de los gangliósidos a nivel de membrana. Esto nos permitió deducir y estudiar a continuación al receptor TNFR1a, al cual trap1 está asociada en la membrana. El TNFR1a es una proteína transmembrana que posee una porción extracelular capaz de interactuar con ligandos y una porción intracelular a la cual se acoplan múltiples proteínas intermediarias que agilizaran diversas cascadas de señalización una vez se activa el receptor. El TNFR1a pertenece a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, SFTNFR, a la cual pertenecen p75<sup>NTR</sup> y Taj/Troy, miembros que ya han sido asociados a la transducción de señales inhibitorias de la regeneración axonal.

Nuestros resultados mostraron que el silenciamiento del receptor TNFR1a fue capaz de prevenir la inhibición del crecimiento neurítico mediado por los anticuerpos anti-gangliósidos, por lo cual especulamos que estaría participando en la vía. Es por estas razones que decidimos continuar profundizando en el análisis de la participación de la proteína TNFR1a como posible molécula transductora del efecto inhibitorio de los anticuerpos anti-gangliósidos.

## 2.2 Disminución de la expresión de TNFR1a empleando un plásmido conteniendo la secuencia shARN específica.

Para este experimento de corroboración se empleó una línea celular derivada de ovario de hámster, denominada CHO-GALT22, cepa específica que sobre-expresa gangliósido GD1a. A la cual se la electroporó con un plásmido descrito anteriormente conteniendo un shARN específico para silenciar la expresión de la proteína TNFR1a.

Como podemos observar en la figura 14, hay una disminución significativa de la expresión de TNFR1a en el homogenato obtenido de las células CHO-K1 electroporadas con el shARN específico (control:  $100 \pm 0.57$  y shTNFR1a:  $24 \pm 1.96$ ). Debido a que la eficiencia de transfección es aproximadamente del 50% (estimación cualitativa por visualización), no fue posible silenciar completamente la expresión de TNFR1a por lo que en el homogenato de células electroporadas aun vemos marca del receptor.



**Figura 14.** El silenciamiento de TNFR1a en línea celular CHO que sobre-expresan GD1aA. Western Blot del homogenato de las células CHO-K1 cepa salvaje en carril izquierdo y CHO-K1 electroporadas con un plásmido conteniendo la secuencia shARN de TNFR1a (carril derecho). Revelado con anticuerpo anti-TNFR1a y Actina de control de carga a través de ECL. **B.** Cuantificación de la intensidad de marca obtenida en condición CHO-K1 cepa salvaje o CHO-K1 expresando plásmido shTNFR1a. Empleando el programa estadístico GraphPad Prism7 se realizó ANOVA y test post Hoc Tukey \* $p < 0.05$  comparado con el control, las barras indican EEM.

## 2.3 El TNFR1a actúa como molécula transductora del efecto inhibitorio de los anticuerpos $\alpha$ GD1a específicos sobre el crecimiento neurítico.

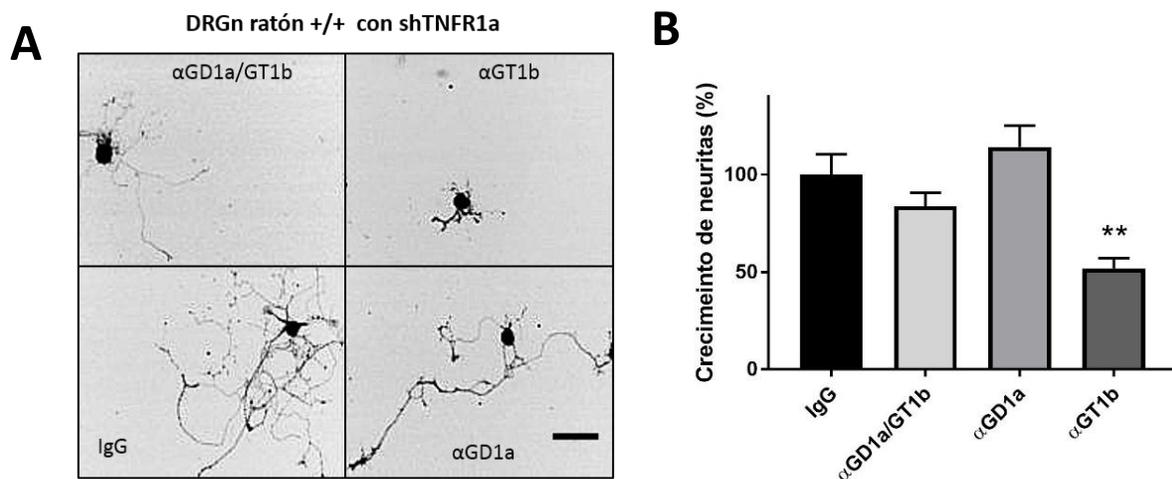
Debido a que el anticuerpo crosreactivo  $\alpha$ GD1a/GT1b no era capaz de inhibir el crecimiento neurítico en aquellas células con expresión disminuida del receptor TNFR1a, decidimos estudiar el efecto que tendrían los anticuerpos específicos  $\alpha$ GD1a y  $\alpha$ GT1b en dichas neuronas con expresión reducida de TNFR1a.

Se electroporaron DRGn de ratón cepa salvaje con el plásmido conteniendo la secuencia shARN para TNFR1a y que también contiene una secuencia de expresión GFP para el seguimiento de las células que incorporan el vector. Luego de 24 horas se replaquearon las células y se las trató con IgG o anticuerpos anti-gangliósidos por 18 horas antes de la fijación con PFA 4%.

Se pudo determinar que las neuronas con la expresión de TNFR1a silenciada expuestas al anticuerpo  $\alpha$ GD1a/GT1b presentaron una sensibilidad reducida al tratamiento, como se había observado previamente, dando solo un 17% de inhibición del crecimiento neurítico en el promedio de neuronas tratadas. Estos valores no son significativamente diferente al promedio encontrado para la extensión de neuritas de las neuronas con tratamiento IgG control (IgG:  $100 \pm 10.49$  y  $\alpha$ GD1a/GT1b  $83.72 \pm 6.96$ ) (Figura 15).

En cuanto a las neuronas expuestas al anticuerpo  $\alpha$ GD1a específico, observamos que presentan una marcada elongación de neuritas, previniéndose completamente la inhibición del crecimiento ( $114.3 \pm 10.78$ ). Por el contrario, el tratamiento con anticuerpo  $\alpha$ GT1b específico causó una marcada inhibición del crecimiento neurítico, elevándose a un 50% comparado al control ( $51.82 \pm 5.34$ ).

En conclusión, la ausencia de expresión de TNFR1a previene la inhibición de crecimiento de neuritas mediado por los anticuerpos  $\alpha$ GD1a específicos y  $\alpha$ GD1a/GT1b crosreactivo, pero no así  $\alpha$ GT1b específicos, lo que sugiere una especificidad de interacción del receptor que está mediando la señal por el gangliósido GD1a.



**Figura 15. El silenciamiento de TNFR1a previene la inhibición del crecimiento neurítico mediado por  $\alpha$ GD1a/GT1b y  $\alpha$ GD1a.** A. Microfotografías de DRGn de ratón electroporadas con un plásmido expresando shTNFR1a y el marcador de expresión GFP para la visualización del árbol neurítico. Se trataron con IgG control [50 $\mu$ g/ml],  $\alpha$ GD1a/GT1b [50 $\mu$ g/ml],  $\alpha$ GD1a[100 $\mu$ g/ml] o  $\alpha$ GT1b[100 $\mu$ g/ml] por 18 horas. Las imágenes fueron analizadas

utilizando el programa Image J, barra indica 20 $\mu$ m. **B.** Cuantificación de la extensión de neuritas promedio de cada tratamiento, n: 3 experimentos independientes. Empleando el programa estadístico GraphPad Prism7 se realizó ANOVA y Kruskal-Wallis \*\* $p < 0.01$  comparado con el control, las barras indican EEM.

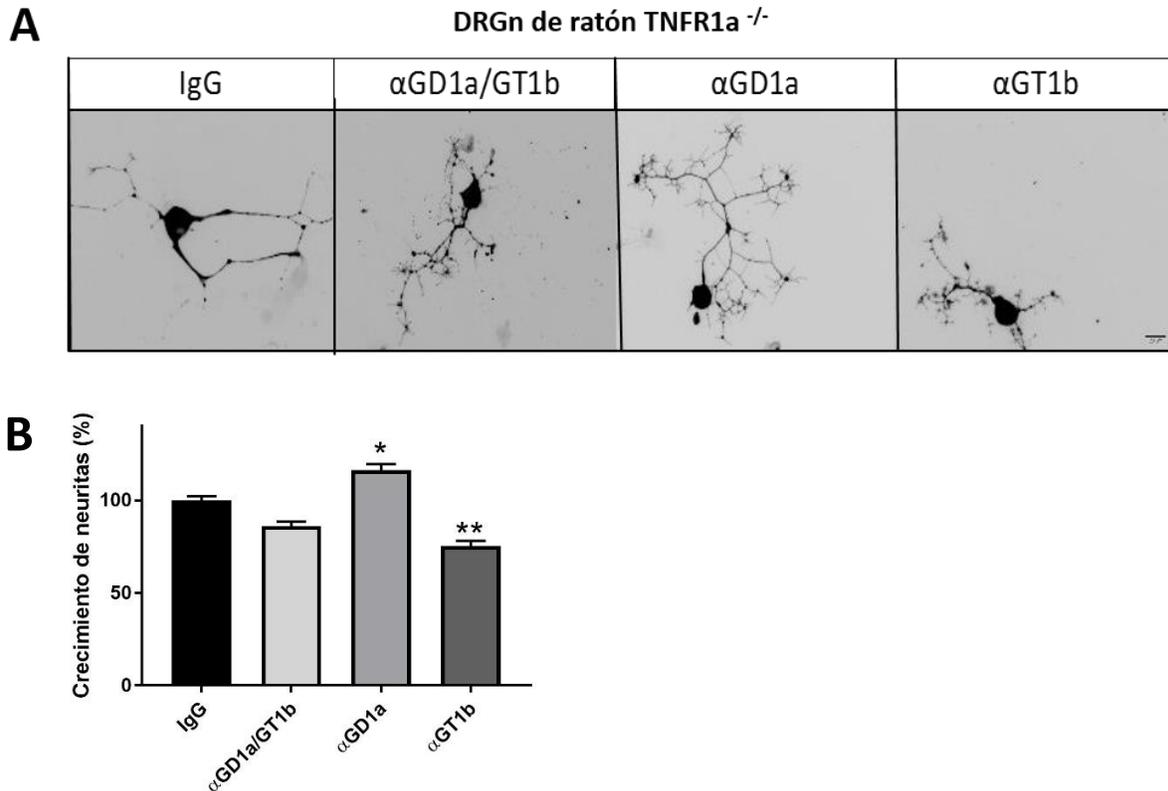
#### **2.4 La ausencia de expresión de TNFR1a previene los efectos inhibitorios mediados por los anticuerpos $\alpha$ GD1a crosreactivos y específicos.**

El papel de TNFR1a como candidato a molécula transductora se analizó adicionalmente utilizando cultivos primarios de DRGn disociadas de ratones nulos para TNFR1a (de ahora en más dicha cepa de animales se denominará TNFR1a<sup>-/-</sup>). Los cultivos fueron tratados por 18 horas con IgG o anticuerpos anti-gangliósidos, se fijaron con PFA 4% y se procedió a inmunomarcarse las neuronas con el anticuerpo anti- $\beta$ -III-tubulina y así poder determinar el crecimiento de neuritas.

En primer lugar, los resultados indicados en la figura 16 muestran que las neuronas TNFR1a<sup>-/-</sup> tratadas con  $\alpha$ GD1a/GT1b no son susceptibles al efecto inhibitorio del anticuerpo crosreactivo ( $86.2 \pm 2.24$ ) en comparación con el control de estas neuronas TNFR1a<sup>-/-</sup> ( $100 \pm 3.27$ ) y también contrastando con neuronas de ratón de cepa salvaje expuestas bajo las mismas condiciones ( $100 \pm 10.49$ ), comparar con figura 15.

En segundo lugar, el tratamiento de los cultivos de DRGn TNFR1a<sup>-/-</sup> con un anticuerpo específico  $\alpha$ GD1a no tuvo efecto negativo, sino que inesperadamente indujo un aumento significativo de la longitud de las neuritas con respecto a los cultivos de control ( $116.2 \pm 3.34$ ). Esta tendencia a incrementar el crecimiento neurítico es similar que habíamos observado en las neuronas donde se empleó el plásmido shARN de TNFR1a para silenciar la expresión del receptor.

Por último, el anticuerpo específico  $\alpha$ GT1b mantuvo inalterada su eficacia inhibitoria ( $75.44 \pm 2.72$ ) (Fig. 16), pudiéndose observar que las neuronas TNFR<sup>-/-</sup> tratadas tienen una longitud mucho menor al control. En general, los resultados presentados sugieren un rol como molécula transductora para TNFR1a en la vía de señalización desencadenada por anticuerpos que reconocen el gangliósido GD1a en forma específica.



**Figura 16. DRGn de ratón cepa nula para TNFR1a son insensibles a la inhibición del crecimiento neurítico mediado por anticuerpos αGD1a. A.** Microfotografías de DRGn de ratón cepa TNFR1a<sup>-/-</sup>, tratadas con IgG control [50μg/ml], αGD1a/GT1b [50μg/ml], αGD1a[100μg/ml] o αGT1b[100μg/ml] por 18horas. Luego de fijadas las neuronas fueron inmunomarcadas con anti-β-III-tubulina para la visualización del árbol neurítico, las imágenes fueron analizadas utilizando el programa Image J, barra indica 20μm. **B.** Cuantificación de la extensión de neuritas promedio en neuronas disociadas de TNFR1a-nulas según cada tratamiento, n: 3 experimentos independientes. Empleando el programa estadístico GraphPad Prism7 se un análisis de Kruskal-Wallis \*p<0.05 y \*\*p<0.01comparado con el control, las barras indican EEM.

### 2.5 La expresión de TNFR1a es necesaria para la acción inhibitoria de los anticuerpos αGD1a específicos.

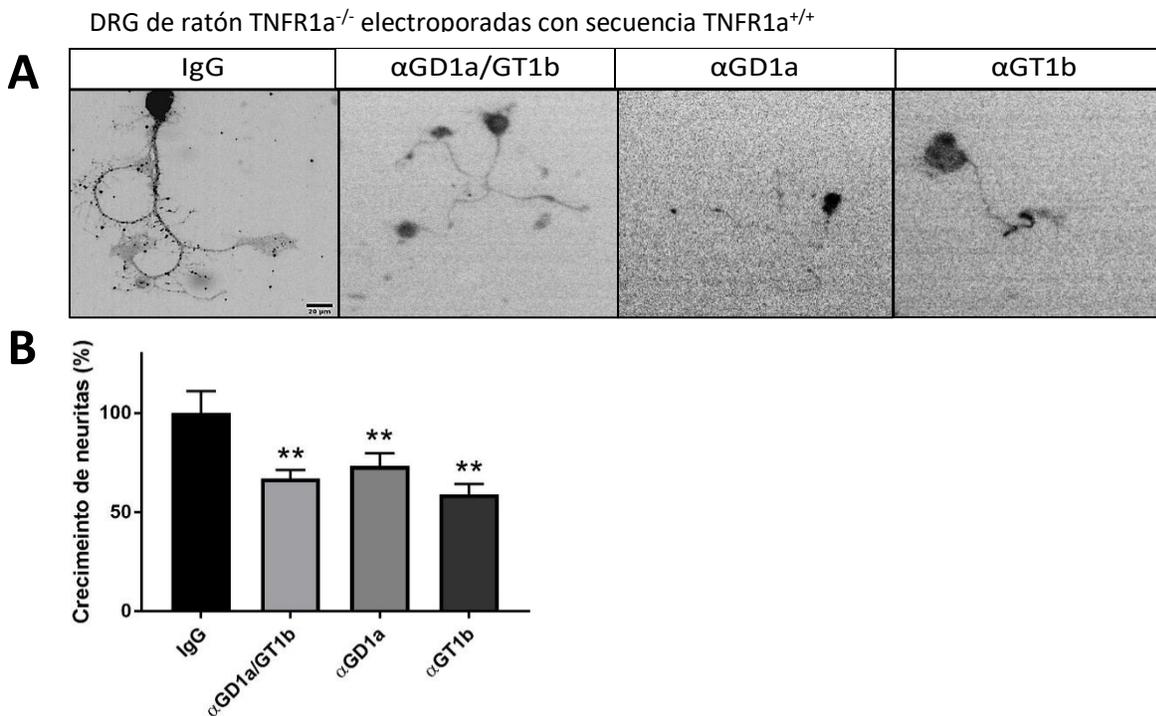
Como prueba de principio, se realizaron estudios de ganancia de función en cultivos primarios de ratones TNFR1a<sup>-/-</sup>, con el fin de confirmar el papel de éste receptor en la vía de señalización desencadenada por los anticuerpos anti-gangliósidos.

Para este propósito, se electroporaron DRGn dissociadas de animales TNFR1a<sup>-/-</sup> con un plásmido comercial que contiene la secuencia completa, de tipo salvaje de la proteína TNFR1a y también expresa GFP para su seguimiento (Sino Biologicals).

Después de la nucleofección y de los tratamientos (IgG y anticuerpos anti-gangliósidos por 18 horas), se fijaron las células y se obtuvieron imágenes para analizar la extensión de neuritas teniendo en cuenta de solo cuantificar en aquellas neuronas positivas para GFP, indicativo de la expresión del plásmido conteniendo la secuencia de TNFR1a.

Las neuronas tratadas con IgG control mostraron un desarrollo normal de procesos ( $100 \pm 6.96$ ) (Fig. 17), mientras que las DRGn tratadas con anticuerpos dirigidos al gangliósido GD1a (ya sean crosreactivos o específicos), mostraron una marcada susceptibilidad a los mismos, provocando al menos un 30% de inhibición del crecimiento neurítico ( $\alpha$ GD1a:  $73.3 \pm 6.27$  y  $\alpha$ GD1a/GT1b:  $67.05 \pm 7.18$ ). De manera consistente con resultados previos, la sobreexpresión de TNFR1a restableció la acción inhibitoria de los anticuerpos  $\alpha$ GD1a en comparación con el control ( $59.04 \pm 5.15$ )

En cuanto al tratamiento con el anticuerpo específico  $\alpha$ GT1b observamos que no hubo cambios en su perfil inhibitorio de 40% o más, en neuronas donde se restableció la expresión de TNFR1a.



**Figura 17. La expresión de TNFR1a restaura la acción inhibitoria de los anticuerpos  $\alpha$ GD1a específicos.**A. Microfotografías de DRGn de ratón cepa TNFR1a<sup>-/-</sup>, electroporadas con la secuencia salvaje de TNFR1a y tratadas

con IgG control [50µg/ml], αGD1a/GT1b [50µg/ml], αGD1a[100µg/ml] o αGT1b[100µg/ml] por 18horas. El plásmido contiene la secuencia GFP para poder visualizar las células, siendo las imágenes analizadas utilizando el programa Image J, barra indica 20µm. **B.** Cuantificación de la extensión de neuritas promedio de cada tratamiento, n: 3 experimentos independientes. Empleando el programa estadístico GraphPad Prism7 se realizó un análisis de Kruskal-Wallis \*\*p<0.01 comparado con el control, las barras indican EEM.

## **2.6 Animales TNFR1a<sup>-/-</sup> son menos susceptibles al efecto inhibitorio de los anticuerpos αGD1a/GT1b en un modelo de regeneración axonal.**

A continuación, se quiso confirmar la participación del receptor TNFR1a en la señal inhibitoria de los anticuerpos anti-gangliósidos en un modelo *in vivo* de regeneración axonal.

Empleando ratones cepa salvaje control y cepa TNFR1a<sup>-/-</sup>, se realizó un modelo experimental que involucra la lesión por aplastamiento del nervio ciático durante 30 segundos (sin separación de fascias), metodología utilizada previamente por Lopez y col. (2010), la cual provoca una degeneración walleriana de los axones, seguido por una limpieza y remoción de detritos celulares por macrófagos y la posterior regeneración de los nervios.

A las 24 de la cirugía, los animales recibieron una inyección intraperitoneal de un anticuerpo control IgG o αGD1a/GT1b [1mg] por única vez. No se hicieron ensayos con anticuerpo αGD1a específico debido a que el efecto inhibitorio observado en este modelo experimental es reducido, por la baja afinidad en comparación al anticuerpo crosreactivo.

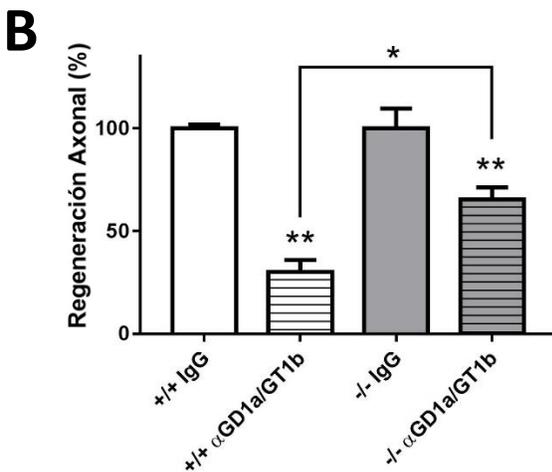
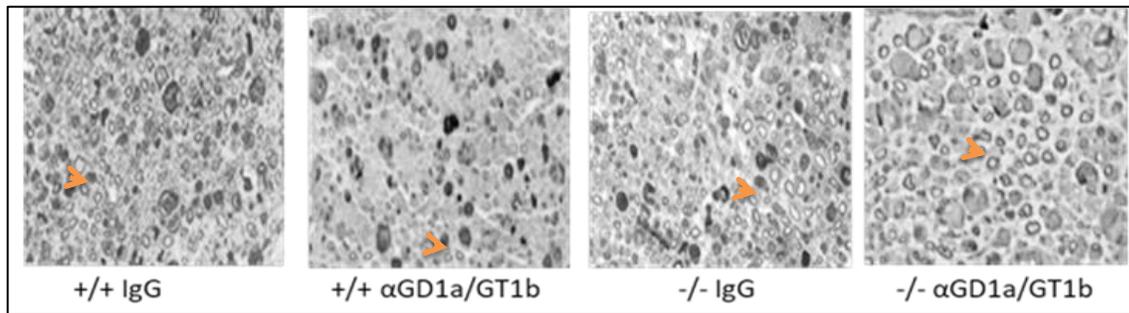
A los 15 días de la cirugía se sacrificaron los animales y los nervios ciáticos fueron colectados para su análisis morfométrico en cortes plásticos semifinos de 1 µm teñidos con azul de toluidina para visualizar fibras mielínicas (Figura 18 A). La regeneración axonal en los diferentes grupos experimentales se midió y determinó por la cantidad de estructuras con forma cilíndricas que se encontraron en las imágenes de los nervios, que representan vainas de mielina que recubren axones en activa regeneración.

Los análisis morfométricos de las imágenes obtenidas por microscopía de campo claro determinaron que, como ya se conocía, los animales de cepa salvaje presentaron una alta inhibición de la regeneración axonal debido a la administración de anticuerpo αGD1a/GT1b (30.1 ± 5.8) con respecto a animales que recibieron IgG (100 ± 0.05).

En relación a los animales TNFR1a<sup>-/-</sup> tratados con αGD1a/GT1b, se encontró un mayor número de fibras en regeneración, indicando sólo un 35% de inhibición comparados con los nervios control del animal de la misma cepa (-/- IgG: 100 ± 3.76 y -/- αGD1a/GT1b 65.38 ± 5.84). Además, la diferencia entre los animales tratados con αGD1a/GT1b es significativa comparando cepa salvaje y TNFR1a<sup>-/-</sup>. Por lo tanto, se deduce

que en aquellos animales que carecen de la expresión del receptor TNFR1a, hay una menor sensibilidad al anticuerpo crosreactivo (Fig. 18 B). La inhibición remanente que se observa, puede deberse a que el anticuerpo empleado reconoce tanto al gangliósido GD1a como GT1b o que existe otro receptor que estaría mediando los efectos además del TNFR1a.

### A Cortes de nervio ciático posterior al aplastamiento y al tratamiento con $\alpha$ GD1a/GT1b



**Figura 18. Nervios en regeneración de animales TNFR1a<sup>-/-</sup> son menos susceptibles al efecto inhibitorio de los anticuerpos  $\alpha$ GD1a/GT1b.** **A.** Microfotografías de nervio ciático de ratón cepa salvaje (+/+) y ratón cepa TNFR1a<sup>-/-</sup> (-/-), tratados con IgG control o  $\alpha$ GD1a/GT1b [1mg]. Las imágenes obtenidas a 20X fueron analizadas utilizando el programa Image J. Cabezas de flechas naranja muestran fibras en activa regeneración, las cuales sirvieron para la cuantificación y determinación del porcentaje de regeneración axonal en cada grupo experimental. **B.** Cuantificación del número de axones regenerando promedio de cada tratamiento, n: 3 experimentos independientes. Empleando el programa estadístico GraphPad Prism7 se realizó ANOVA y análisis de Kruskal-Wallis. \*p<0.05 y \*\*p<0.01 comparado con el control, las barras indican EEM.

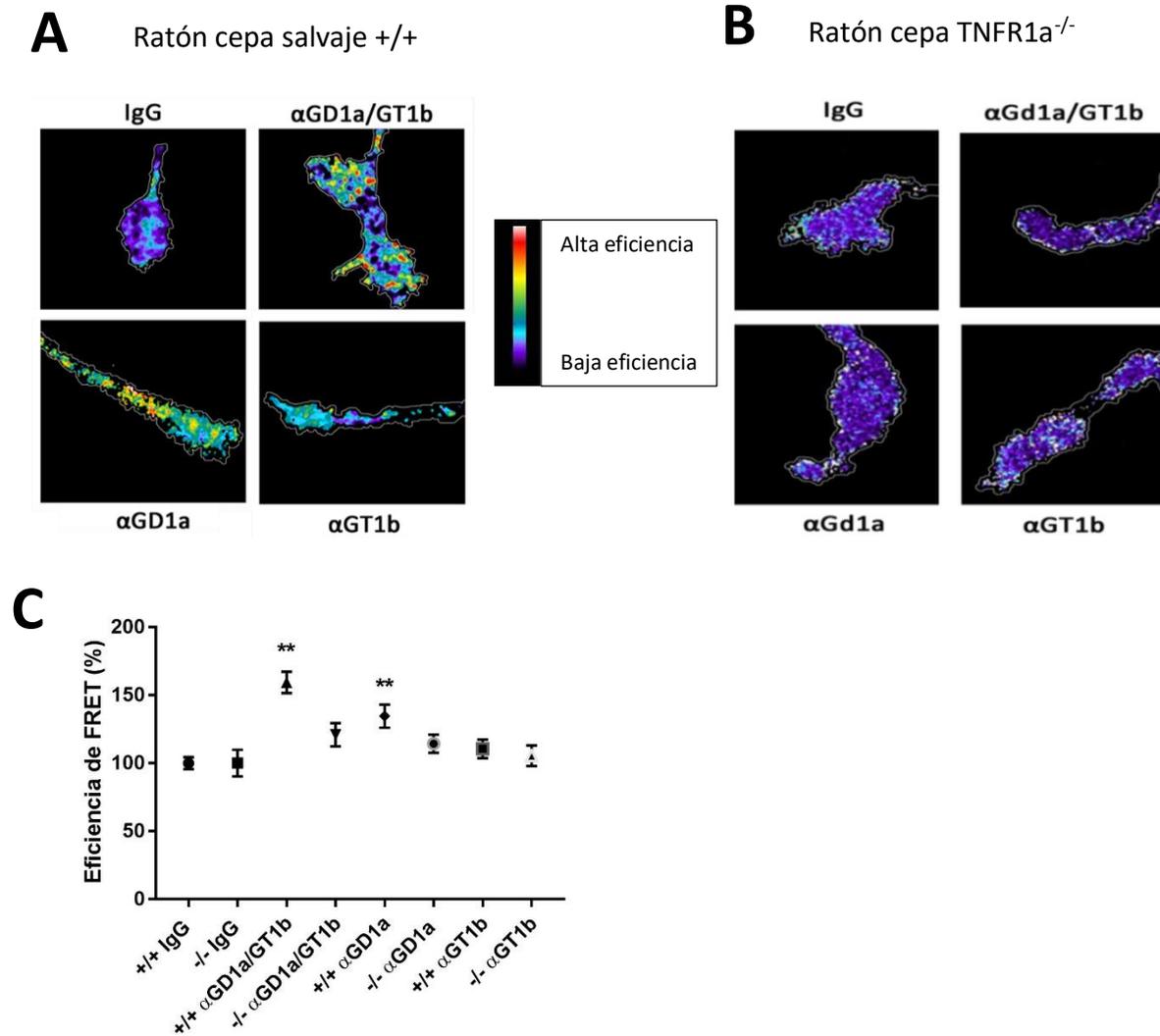
### 2.7 TNFR1a participa en la activación de RhoA mediada por anticuerpos anti-gangliósidos.

A continuación, quisimos determinar si el TNFR1A estaba involucrado en la vía de activación de RhoA mediado por los anticuerpos anti-gangliósidos. Para probar esto, empleamos un biosensor de RhoA basado en FRET para medir su eficiencia frente a los diferentes tratamientos. Se electroporaron cultivos de DRGn de ratones cepa salvaje y cepa TNFR1a<sup>-/-</sup> con el biosensor y luego de 24 horas (tiempo necesario para lograr la correcta expresión del biosensor) se replaquearon mecánicamente para permitir que las neuronas vuelvan a extender neuritas con conos de crecimiento, sitio donde se evaluará la activación de RhoA. Anteriormente estudios de nuestro laboratorio determinaron que hay una marcada activación de RhoA a los 30 minutos posteriores al tratamiento con  $\alpha$ GD1a/GT1b, por lo que también quisimos evaluar el efecto de los anticuerpos específicos  $\alpha$ GD1a y  $\alpha$ GT1b a este tiempo.

En primer lugar, las microfotografías de los cultivos proveniente de ratón cepa salvaje (Fig. 19 A) nos indican que los anticuerpos  $\alpha$ GD1a ( $120.9 \pm 8.47$ ) y  $\alpha$ GD1a/GT1b ( $114.2 \pm 6.64$ ) provocan cambios en la eficiencia de FRET que se traducen en activación de RhoA (colores cálidos, mapa termal de pseudocolor). En cambio, el tratamiento con  $\alpha$ GT1b ( $105.4 \pm 7.71$ ) no induce cambios en eficiencia de FRET significativamente diferentes a lo hallado en neuronas IgG control ( $100 \pm 9.8$ ).

Por otra parte, en neuronas deficientes de expresión del TNFR1a los tratamientos con los diferentes anticuerpos anti-gangliósidos no provocaron aumento de la actividad de la GTPasa RhoA luego de los 30 minutos (Fig. 19 B y C).

Previamente se había determinado que el  $\alpha$ GT1b específico no había sido capaz de activar RhoA en neuronas de cepa salvaje, sin embargo, se decidió examinarlo aquí para determinar si en ausencia de expresión del receptor TNFR1a, éste anticuerpo pudiera estar señalizando por otra vía de moléculas transductoras la activación de RhoA. Sin embargo, no hallamos que el tratamiento con  $\alpha$ GT1b modificara los niveles de eficiencia de FRET, es decir que no logró activar RhoA en las condiciones experimentales dadas. Con estos resultados inferimos que es necesaria la presencia de TNFR1a, en la vía de activación de la RhoA mediada por los anticuerpos  $\alpha$ GD1a (específicos y crosreactivos).

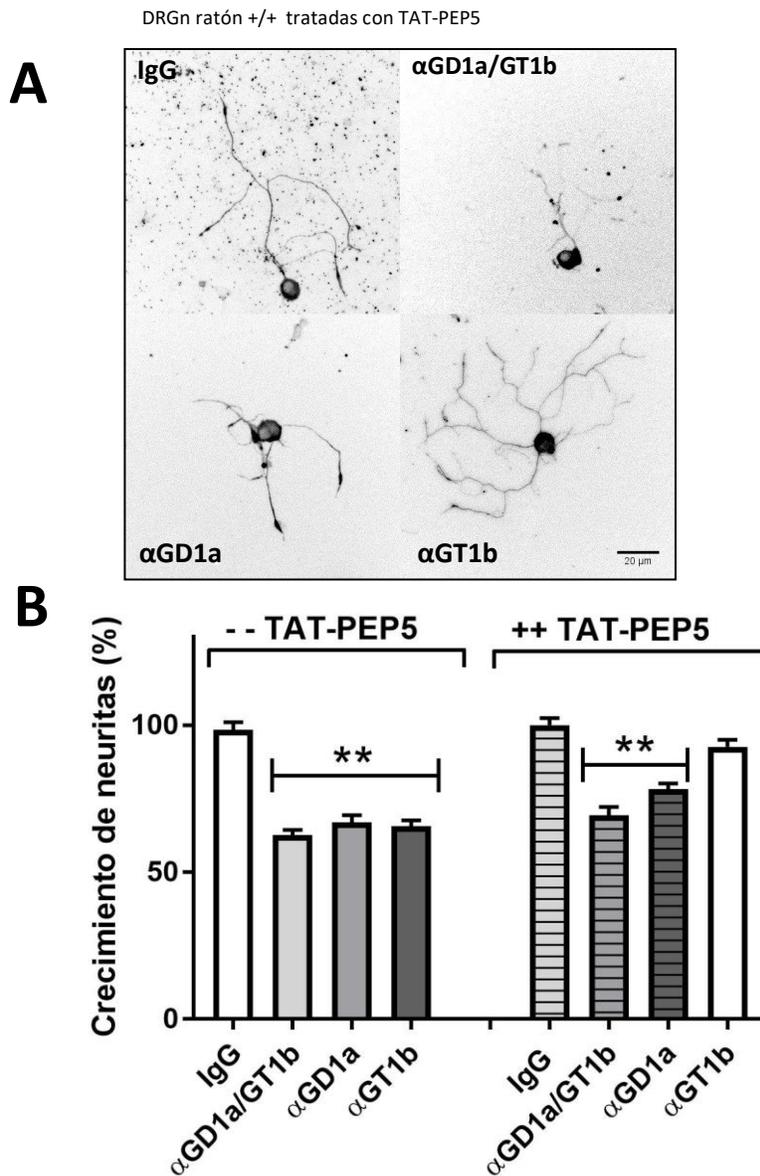


**Figura 19. DRGn de animales TNFR1A<sup>-/-</sup> no muestran activación de RhoA mediada por los anticuerpos αGD1a específicos y crosreactivos. A y B.** Microfotografías de conos de crecimiento de DRGn de ratón de cepa salvaje (+/+) y cepa TNFR1a<sup>-/-</sup> (-/-) respectivamente, electroporadas con un biosensor de RhoA basado FRET. Luego de plaqueadas las células fueron tratadas con IgG control [50μg/ml], αGD1a/GT1b [50μg/ml], αGd1a[100μg/ml], αGT1b[100μg/ml] por 30 minutos y posteriormente fijadas con PFA al 4%. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa Image J, se delimitaron los bordes de los conos de crecimiento con una línea de contorno blanca para facilitar su visualización y se anexó un mapa termal de pseudocolor indicando la actividad de RhoA (colores cálidos indican alta eficiencia de FRET, colores fríos baja eficiencia). **C.** Cuantificación de la eficiencia de FRET promedio en las diferentes neuronas (cepa salvaje o TNFR<sup>-/-</sup> electroporadas con el biosensor de RhoA y comparación entre tratamientos: 3 experimentos independientes. Valores ponderados en relación al promedio del control IgG (%). Empleando el programa estadístico GraphPad Prism7 se realizó un análisis de Kruskal-Wallis \*\*p<0.01 comparado con el control IgG +/+, las barras indican EEM.



imágenes de neuronas sin tratar se pueden ver en la figura 12. Los resultados demuestran que el pre-tratamiento con TAT-Pep5 no fue capaz de prevenir la inhibición del crecimiento neurítico mediado por los anticuerpos  $\alpha$ GD1a (específicos y crosreactivos), sugiriendo que se emplea un mecanismo de activación de RhoA independiente del desplazamiento del complejo RhoGDI-RhoA (IgG:  $100 \pm 2.46$ ;  $\alpha$ GD1a/GT1b:  $69.27 \pm 2.93$  y  $\alpha$ GD1a  $78.21 \pm 2.01$ ).

Por otro lado, el pre-tratamiento con TAT-Pep5 si fue capaz de bloquear la inhibición dependiente del anticuerpo  $\alpha$ GT1b ( $92.71 \pm 2.35$ ), comprobando nuevamente que el gangliósido GT1b es parte del complejo con P75<sup>NTR</sup>/NgR/Lingo-1.



**Figura 20. TAT-Pep5 previene la inhibición de la regeneración mediada por  $\alpha$ GT1a.** **A.** Microfotografías de DRGn disociadas de ratón cepa salvaje, tratadas con TAT-Pep5 (200nM) por 2 horas antes del tratamiento con anticuerpos: IgG control [50 $\mu$ g/ml],  $\alpha$ GD1a/GT1b [50 $\mu$ g/ml],  $\alpha$ Gd1a[100 $\mu$ g/ml] o  $\alpha$ GT1b[100 $\mu$ g/ml] por 18horas. Las células se inmuno marcaron con anti- $\beta$ -III-tubulina y las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando el programa Image J, barra indica 20 $\mu$ m. **B.** Cuantificación de la extensión de neuritas promedio de cada tratamiento, n: 3 experimentos independientes. Empleando el programa estadístico GraphPad Prism7 se realizó un análisis Kruskal-Wallis. \*\*p<0.01 comparado con el control, las barras indican EEM.

### 2.9 Análisis in-sílico de la estructura del TNFR1a y generación de mutantes puntuales.

Nuestros datos anteriores nos ayudan a sostener la teoría de que TNFR1a actúa como molécula transductora para los efectos de los anticuerpos  $\alpha$ GD1a (no así con los anticuerpos  $\alpha$ GT1b). Aún queda abierta la pregunta si este efecto depende/implica una interacción directa entre el gangliósido GD1a y el receptor o si requiere la participación de otras moléculas que los relacionen.

Si bien algunos estudios han descrito las características y estructura tridimensional del receptor TNFR1a, mayormente han estado enfocados en su porción extracelular formada por 4 dominios ricos en cisteína, donde interactúa con el ligando natural TNF $\alpha$  en forma soluble. Aún no se ha reportado hasta el momento la estructura cristalina para la región del tallo del receptor. Esta región adyacente a la membrana celular es una porción lineal y pequeña ya que sólo comprende 15 aminoácidos y por coherencia espacial, teniendo en cuenta el tamaño de los gangliósidos, postulamos/inferimos que sería la porción que podría tener interacción con éstos glicoesfingolípidos.

Empleando las bases web de datos biológicos y programas para comparar secuencias de proteínas (Blast), analizamos y encontramos cierta similitud en los aminoácidos que conforman las regiones del tallo del TNFR1a de las especies rata, ratón y humano, que se muestran a continuación (línea representa igual aminoácido, puntos indica similar carga y # indica diferencia):

Humano	PQIENVKGTEDSGTT	15
	::: :::#: :: ::#	
Ratón	PPLANVTNPQDSGTA	15
	:	
Rata	PPVANVTNPQDSGTA	15

Similaridad Humano/Ratón: 13/15 (86,67 %) y Ratón/Rata 15/15 (100%)

Observando el hecho de que existen en la secuencia estudiada de TNFR1 ciertos aminoácidos polares o con carga, hipotetizamos que éstos podrían interactuar con los gangliósidos adyacentes al receptor en la

membrana. Habría 3 posibles puntos de interacción electrostática de relevancia según las cargas electrostáticas de los gangliósidos: la carga negativa del carboxilo, el grupo N-acetil galactosamina y el N-acetilo del ácido siálico.

Para responder la pregunta de si existe algún tipo de interacción directa entre los gangliósidos y la región del tallo de TNFR1a, realizamos una colaboración con el Dr. Mario Bianchet, quien aportó sus conocimientos en biofísica de moléculas y realizando un análisis *in silico* de la estructura 3D de la región “tallo” del TNFR1a comparada con la secuencia conocida de otras proteínas de la familia de receptores.

Profundizamos el análisis de la región del tallo de TNFR1a comparando dicha secuencia con la de otras proteínas de la SFTNFR, como son el receptor p75<sup>NTR</sup> (TNFR16) y Taj-Troy (TNFR19). Encontramos cierta limitación debido a que no se han descritos ninguna estructura cristalina con homología a esta región tallo del TNFR1a de los otros receptores miembros de la familia, lo que limita el análisis *in silico* de el/los sitios de posible acoplamiento con el gangliósido GD1a. La comparación permitió **determinar que habría aminoácidos conservados en la secuencia de la región del tallo en los miembros de ésta familia de receptores y esos aminoácidos cargados estarían en posiciones críticas para interactuar con gangliósidos**. Por ejemplo, **el aminoácido con carga negativa: ácido aspártico (D)** que se puede ver a continuación (línea representa igual aminoácido, puntos indica similar carga y # indica diferencia):

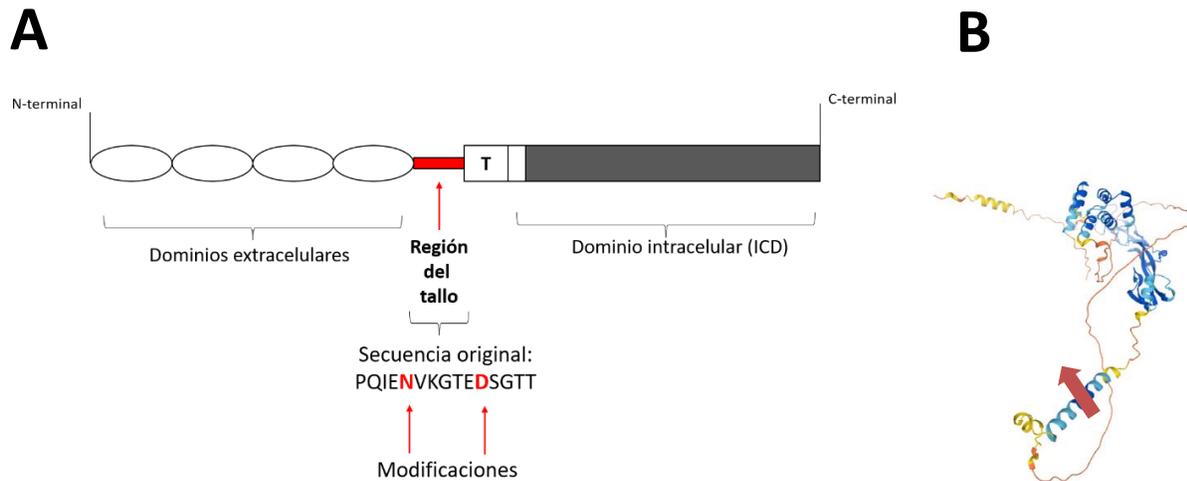
Alineamientos de miembros de la familia TNFRSF especie ratón:

```
TNFR1a      -----PPLANVTNP-QDSGTA--- 15
            #####:~::~:##|#::~:|~###
P75NTR      TVADTVTTVMGSSQPVVTRGTADNL 25
            ###:~|::~|#::~|~###:~|::~:##
Taj/TROY    --TSKVNVLVKISSTVSSPRDTAL-- 21
```

Similaridad TNFR1a/P75<sup>NTR</sup>: 13/15 (86,67 %); P75<sup>NTR</sup>/Taj/TROY: 17/21 (80,95 %) y TNFR1a/Taj/TROY: 13/15 (86,67 %)

En base a estas evidencias, el Dr. Bianchet nos orientó en las posibles sustituciones para algunos aminoácidos de la secuencia del tallo del receptor, que modificaran el tipo de carga eléctrica que quedaba expuesta para la posible interacción con los gangliósidos. Decidimos emplear una estrategia experimental de mutación puntual, para variar un único aminoácido cargado o polar en la secuencia de la porción del tallo del receptor a la vez y determinar su participación. Realizamos las mutaciones específicas en las regiones conservadas de la secuencia TNFR1a de ratón, empleando el kit de mutagénesis dirigida en un vector comercial con la secuencia salvaje de TNFR1a (pCMV3-GFP-spark de Sino Biologicals). Así generamos el plásmido “N159H” donde se mutó únicamente el aminoácido asparragina (N) por una

Histidina en posición 159 y el plásmido que denominamos “D165L” con el cambio del aminoácido aspártico (D) por una leucina (L) en posición 165. El número hace referencia a la posición de ese aminoácido en la secuencia completa del receptor. En la figura 21 vemos una representación del receptor TNFR1a y los sitios mutados.



**Figura 21:** **A)** Esquema de los dominios que componen al TNFR1a, región del tallo resaltada en rojo y flechas indicando las mutaciones que se realizaron. Imagen modificada de Richter 2012. **B)** Representación de la estructura tridimensional del TNFR1a, flecha roja indica la región del tallo que muestra una estructura desordenada. Imagen obtenida de AlphaFold.

### 2.10 Los anticuerpos $\alpha$ GD1a activan RhoA de forma independiente del desplazamiento del complejo RhoGDI-RhoA.

A continuación, se decidió evaluar si estos aminoácidos de la región del tallo de TNFR1a son necesarios para la interacción con los gangliósidos de la membrana y si la mutación puntual de alguno de ellos puede evitar el efecto inhibitorio sobre el crecimiento neurítico mediado por anticuerpos  $\alpha$ GD1a.

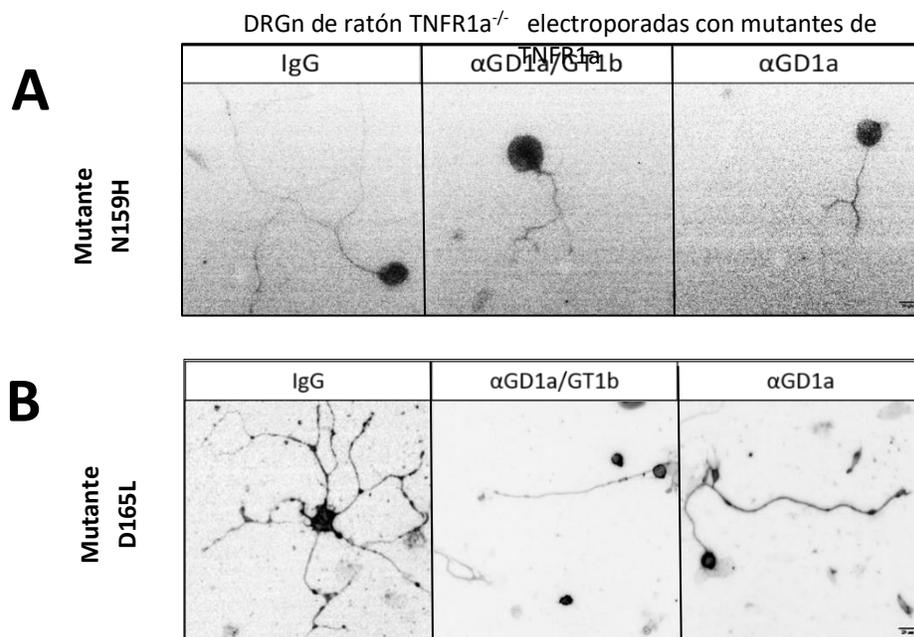
Se electroporaron cultivos de DRGn de animales TNFR1a<sup>-/-</sup> con los plásmidos conteniendo las secuencias del TNFR1A con las mutaciones puntuales realizados previamente. Luego de 24 horas de expresión, las células se replaquearon mecánicamente y se trataron los cultivos por 18 horas más con IgG control,  $\alpha$ GD1a/GT1b y  $\alpha$ GD1a específico (se emplearon sólo estos anticuerpos ya que nuestros resultados previos indican que el anticuerpo  $\alpha$ GT1b no utilizaría la señalización mediada por TNFR1a). Pasado este tiempo se fijaron las células y se procedió a tomar imágenes con un microscopio de epifluorescencia para realizar

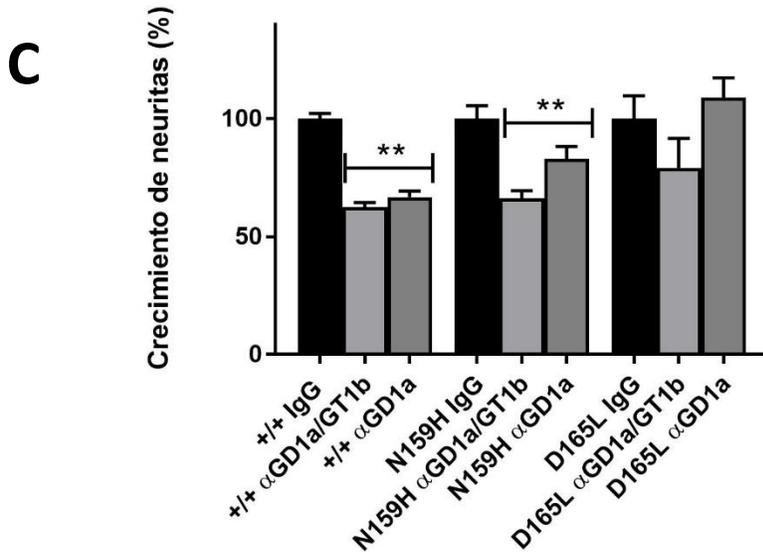
la cuantificación del crecimiento neurítico solo de aquellas neuronas que expresaban el plásmido indicado por la expresión de la proteína GFP.

Los resultados obtenidos se compararon con controles internos de cada mutante tratada con IgG control, así como también se lo comparo con neuronas salvaje donde se electroporo la secuencia salvaje del receptor a lo que llamaremos +/+ (+/+ IgG:  $100 \pm 2.23$ ; +/+  $\alpha$ GD1a/GT1b:  $62.53 \pm 1.88$  y +/+  $\alpha$ GD1a:  $66.85 \pm 2.52$ ).

Como podemos observar en la figura 22, los cultivos neuronales nucleofectados con la mutante N159H del TNFR1a siguen siendo susceptibles a la inhibición del crecimiento neurítico inducido por el tratamiento con los anticuerpos  $\alpha$ GD1a crosreactivos o específicos (N159H IgG:  $100 \pm 5.5$ ; N159H  $\alpha$ GD1a/GT1b:  $66.18 \pm 3.3$  y N159H  $\alpha$ GD1a:  $83.03 \pm 5.24$ ).

Por el contrario, aquellas neuronas electroporadas con la mutante D165L del receptor TNFR1a no presentaron inhibición del crecimiento neurítico mediado por los anticuerpos  $\alpha$ GD1a (D165L IgG:  $100 \pm 9.76$ ; D165L  $\alpha$ GD1a/GT1b:  $79.13 \pm 12.47$  y D165L  $\alpha$ GD1a:  $109 \pm 8.45$ ). Estos resultados sugieren que el ácido aspártico mutado es necesario para la interacción del TNFR1a con el gangliósido a nivel de membrana necesaria para transducir la señal inhibitoria los anticuerpos  $\alpha$ GD1a.





**Figura 22. La secuencia mutante D165L de la región del tallo del receptor TNFR1a es capaz de prevenir la inhibición del crecimiento neurítico mediada por anticuerpos  $\alpha$ GD1a.** Microfotografías de DRGn de ratón cepa TNFR1a<sup>-/-</sup> que fueron electroporadas con las secuencias mutadas en la región del tallo de TNFR1a y luego tratadas con IgG control [50 $\mu$ g/ml],  $\alpha$ GD1a/GT1b [50 $\mu$ g/ml] o  $\alpha$ Gd1a[100 $\mu$ g/ml] por 18 horas. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa Image J, barra indica 10 $\mu$ m. **A)** DRGn electroporadas con el plásmido N159H y **B)** DRGn electroporadas con la secuencia mutante D165L del TNFR1a. **C.** Cuantificación de la extensión de neuritas promedio de cada tratamiento y comparadas con DRGn de cepa salvaje (+/+) bajo los mismos tratamientos, n: 3 experimentos independientes. Se realizó un análisis de Kruskal-Wallis en el programa GraphPad Prism. \* $p < 0.01$  comparado con el control IgG, las barras indican EEM.

### 2.11 Las mutaciones puntuales en la región del tallo del TNFR1a no alteran la función pro-apoptótica del receptor.

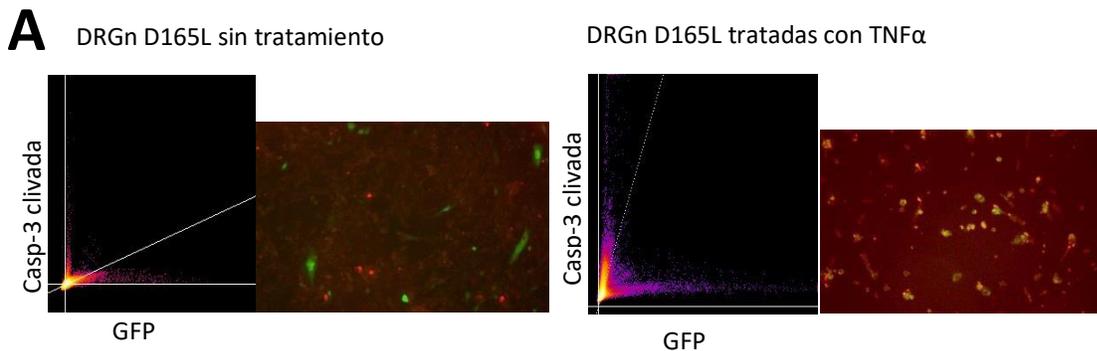
Para determinar si la estructura y función del receptor TNFR1a seguía viable luego de realizar las mutaciones puntuales en la región del tallo, empleamos el paradigma de inducción de muerte celular desencadenada por ligando natural de éste receptor, el TNF $\alpha$ . Se sabe que, a una dosis moderada de esta citoquina, las células comienzan la programación de apoptosis, por lo cual nos apoyamos de éste modelo para saber si el receptor mutado aún mantiene la integridad para cumplir dicha función.

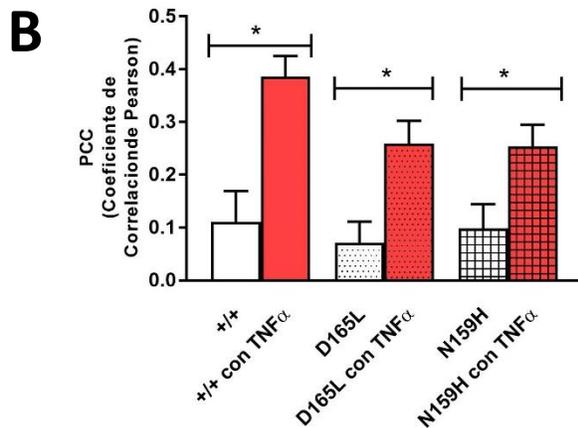
Debido a los desafíos que implica electroporar cultivos primarios de DRGn de animales cepa salvaje o cepa TNFR1a<sup>-/-</sup> (necesidad de emplear un número elevado de animales para cada experimento, alta proporción de muerte debido a la transfección y baja eficiencia de electroporación en neuronas), decidimos

desarrollar los ensayos en la línea celular de ovario de hámster (CHO-K1). Para esto electroporamos células CHO-K1 con los plásmidos: TNFR1a secuencia salvaje, mutante TNFR1A D165L y mutante TNFR1a N159H, luego de 24 horas para permitir la correcta expresión de los plásmidos, se trataron los cultivos con TNF $\alpha$  por 3 horas. Se fijaron las células y se inmunomarcaron empleando un anticuerpo anti-caspasa 3 clivada como indicador de células pro-apoptóticas.

Los datos indican que al cabo de este tiempo de exposición a TNF $\alpha$  todas las células tratadas tienen un mayor porcentaje de muerte, medido como la correlación entre la marca GFP de los plásmidos (TNFR1a salvaje, N159 o D165L) y la marca de caspasa 3 clivada (coeficiente de correlación de Pearson).

En la figura 23 A podemos observar que las células electroporadas con el plásmido conteniendo la secuencia salvaje de TNFR1a (+/+) aún sin tratamiento, ya presentan cierto valor de muerte celular y esto es debido probablemente a la sobreexpresión del receptor que ocasiona una auto-activación <sup>179</sup>. En cambio, células expresando el mismo plásmido, pero que fueron expuestas al tratamiento con TNF $\alpha$  observamos que presentan mayor porcentaje de muerte celular (+/+ sin tratar  $100 \pm 53.38$  y IgG tratado con TNF $\alpha$ :  $349.4 \pm 35.62$ ). Se obtuvieron resultados similares para los cultivos expresando las secuencias mutantes del TNFR1a, donde los valores de correlación entre la marca GFP y la marca de caspasa, es decir muerte celular, son mayores en las células tratadas con TNF $\alpha$  comparados a los sin tratar (D165L sin tratar  $67.15 \pm 37.55$ ; D165L tratado con TNF $\alpha$ :  $244.1 \pm 39.47$ ; N159H sin tratar  $89.19 \pm 41.52$ ; N159H tratado con TNF $\alpha$ :  $229.8 \pm 37.26$ ).





**Figura 23. La función pro-apoptótica del receptor se mantiene intacta en las secuencias mutantes del TNFR1a.A.** Microfotografías de cultivos de línea CHO-K1 electroporadas con la secuencia mutantes del TNFR1a: D165L (expresión GFP verde). Luego de 24 horas, los cultivos fueron tratados con TNF $\alpha$  [10ng/ml] por 3 horas. Las células fueron inmunomarcadas con anticuerpo anti-caspasa 3 clivada y su secundario en rojo. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa Image J. Gráfico de dispersión mostrando la correlación entre la señal del plásmido y la señal de caspasa 3 clivada. **B.** Cuantificación de los coeficientes de correlación de Pearson para cada grupo experimental, n: 3 experimentos independientes. Empleando el programa estadístico GraphPad Prism7 se realizó ANOVA y análisis de Kruskal-Wallis, \*p<0.01 comparado con el control de cada tratamiento, las barras indican EEM.

### **3. La proteína G alfa inhibitoria tipo 2 podría estar involucrada en la vía de señalización por anticuerpos anti-gangliósidos**

Debido a que determinamos que el dominio intracelular de TNFR1a no induce la disociación de RhoGDI-RhoA, sospechamos de una vía de activación de RhoA alternativa mediada por los anticuerpos anti-gangliósidos. Por lo tanto, retomamos los candidatos de la lista de proteómica, para determinar si había alguna proteína efectora o mensajera que pudiera estar participando en la vía de señalización. Nos interesó la subunidad alfa inhibitoria 2 de las proteínas G heterotriméricas ( $G\alpha_2$ ), cuya función más conocida es la de inhibir la enzima adenilato ciclasa provocando que disminuyan los valores de AMP cíclico intracelular (AMPc), lo que evita la activación a la proteína quinasa A (PKA) la cual es capaz de modular negativamente a RhoA.

#### **3.1 $G\alpha_2$ está involucrada en el efecto inhibitorio de los anticuerpos $\alpha$ GD1a sobre el crecimiento de neuritas**

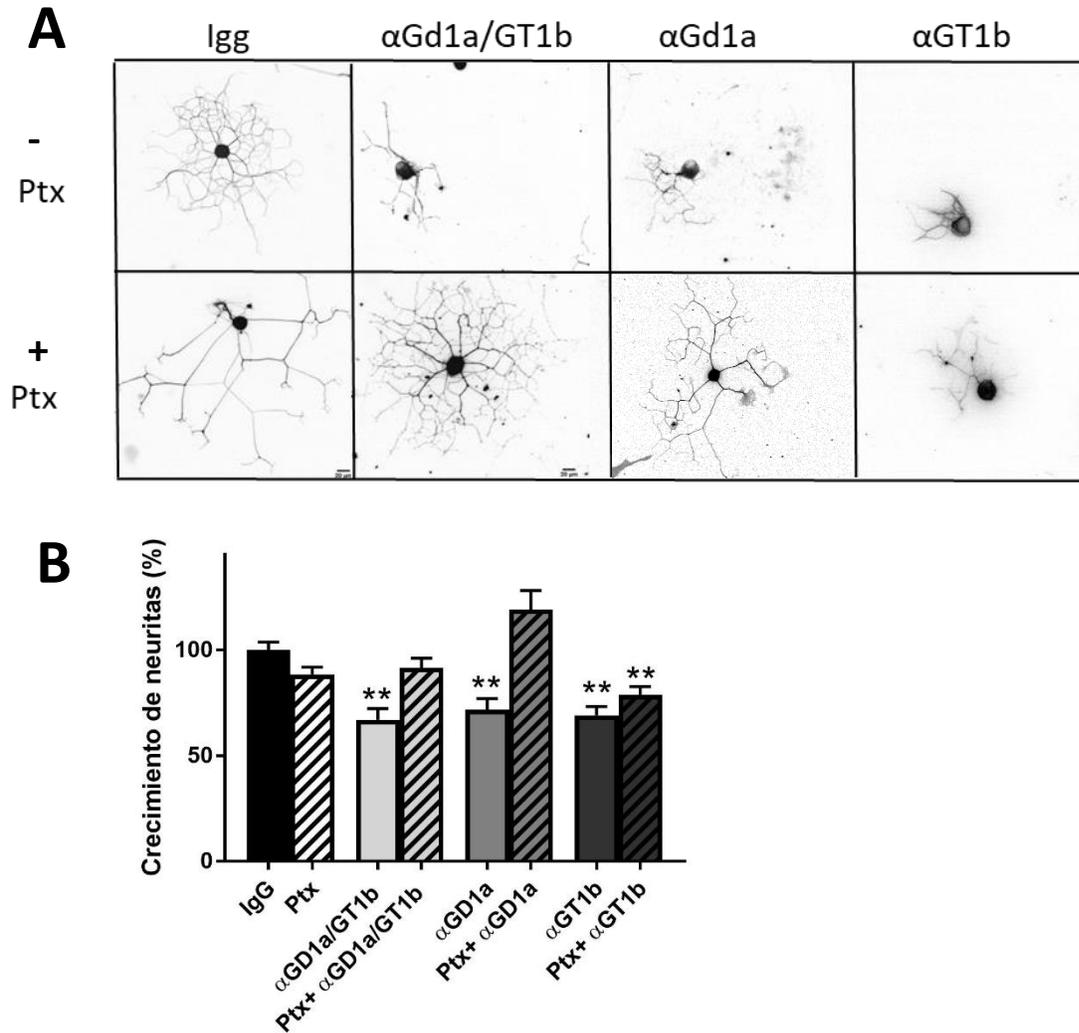
Con el fin de analizar la participación del nivel de AMPc intracelular como mediador de la activación de RhoA y vías de inhibición del crecimiento neurítico iniciadas por los anticuerpos anti-gangliósidos, decidimos evaluar que ocurría si la actividad de la proteína  $G\alpha_2$  era bloqueada.

Para ello nos basamos en la propiedad de las  $G\alpha_i$  de ser sensibles a la ADP ribosilacion por la toxina pertúsica (Ptx), característica que aprovechamos para inhibir su actividad en los siguientes experimentos y probar/determinar su participación en la vía sin necesidad de generar un shARN.

Primero se realizaron ensayos de dosis-respuesta en DRGn de rata Wistar para identificar una concentración de Ptx que no afectara la elongación normal de las neuritas, la cual se determinó en una concentración en 200 ng/ml por el período de una hora.

A continuación, se procedió a evaluar que implicancias tendría el bloqueo de las proteínas  $G\alpha_2$  con Ptx en el efecto inhibitorio de los anticuerpos anti-gangliósidos sobre el crecimiento neurítico. Los cultivos se incubaron con Ptx una hora antes de los tratamientos con IgG,  $\alpha$ GD1a/GT1b,  $\alpha$ GD1a y  $\alpha$ GT1b. Pasadas 18 horas se fijaron los cultivos e inmunomarcaron con anti- $\beta$ -III-tubulina para visualizar y medir el crecimiento de la neurita más larga de cada neurona. Como se puede observar en la figura 24, lo más notorio que encontramos fue que en aquellas neuronas donde la actividad de  $G\alpha_2$  estaba bloqueada por Ptx, se prevenía el efecto inhibitorio de los tratamientos con los anticuerpos específicos para el gangliósido GD1a, ya que el tratamiento con  $\alpha$ GT1b mantuvo la inhibición del crecimiento neurítico aún en presencia de Ptx

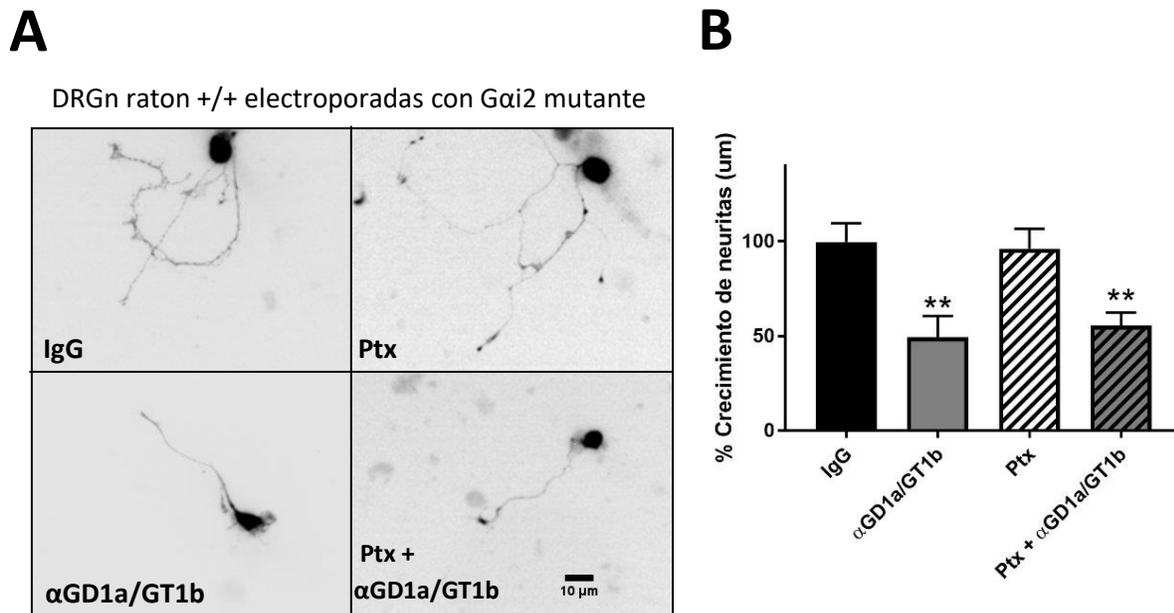
(IgG:  $100 \pm 3.58$ ; Ptx:  $88.38 \pm 3.39$ ;  $\alpha$ GD1a/GT1b  $66.93 \pm 5.21$ ; Ptx +  $\alpha$ GD1a/GT1b:  $91.43 \pm 4.6$ ;  $\alpha$ GD1a:  $71.65 \pm 5.23$ ; Ptx +  $\alpha$ GD1a:  $119 \pm 8.94$ ;  $\alpha$ GT1b:  $69.09 \pm 4.06$  y Ptx +  $\alpha$ GT1b:  $78.67 \pm 3.88$ ).



**Figura 24. Ptx previene la inhibición del crecimiento neurítico mediada por  $\alpha$ GD1a/GT1b y  $\alpha$ GD1a. A.** Microfotografías de DRGn de ratón cepa salvaje, tratadas con Ptx (200ng/ml) 1 hora antes de los anticuerpos: IgG control [50 $\mu$ g/ml],  $\alpha$ GD1a/GT1b [50 $\mu$ g/ml],  $\alpha$ Gd1a[100 $\mu$ g/ml],  $\alpha$ GT1b[100 $\mu$ g/ml] por 18horas. Las células se inmunomarcaron con anti- $\beta$ -III-tubulina para la visualización del árbol neurítico. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa Image J, barra indica 20 $\mu$ m. **B.** Cuantificación de la extensión de neuritas promedio de cada tratamiento, n: 3 experimentos independientes. Empleando el programa estadístico GraphPad Prism7 se realizó un análisis de Kruskal-Wallis, \*p<0.01 comparado con el control, las barras indican EEM.

### 3.2 PTx no es capaz de revertir el efecto inhibitorio de $\alpha$ GD1a sobre crecimiento neurítico en células que sobreexpresan la proteína Gai2 mutante insensible a PTx.

Con el objeto de validar el empleo de la Ptx como inhibidor farmacológico de la disociación y posterior actividad de la proteína Gai2 en la cascada de señalización de éstos anticuerpos, se decidió co-electroporar DRGn de rata con un plásmido que expresa una proteína Gai2 mutante, incapaz de ADP ribosilarse por la acción de Ptx<sup>180</sup>, junto con un plásmido comercial que expresa GFP (vector Pmax) para facilitar la visualización de las neuronas electroporadas. Pasadas 24 horas para permitir la correcta expresión de los plásmidos, los cultivos fueron replaqueados e incubados por una hora con Ptx y luego tratados con IgG o  $\alpha$ GD1a/GT1b en la dosis mencionada anteriormente. Los resultados obtenidos con el tratamiento con Ptx sobre estas células co-electroporadas fueron consistentes con lo encontrado previamente. Pudimos observar que las neuronas que expresaban la versión mutante de la proteína Gai2, aun siendo expuestas al tratamiento previo con la Ptx, eran incapaces de prevenir el efecto inhibitorio mediado por el anticuerpo  $\alpha$ GD1a/GT1b (Fig. 25) (IgG:  $100 \pm 9.84$ ;  $\alpha$ GD1a/GT1b:  $49.51 \pm 11.09$ ; Ptx:  $96.18 \pm 10.5$  y Ptx +  $\alpha$ GD1a/GT1b:  $55.6 \pm 6.93$ ). Cabe aclarar que se empleó solo éste anticuerpo crosreactivo como método confirmatorio, basándonos en su alta afinidad a los gangliósidos de membrana comparado con los otros anticuerpos específicos.



**Figura 25. DRGn electroporadas con la proteína Gai2 mutante insensible a Ptx son sensibles al efecto inhibitorio del crecimiento neurítico mediado por el anticuerpo  $\alpha$ GD1a/GT1b.** A. Microfotografías de DRGn de ratón cepa salvaje, electroporadas con un plásmido conteniendo una secuencia para Gai2 que es insensible a Ptx (con secuencia GFP para su visualización). Luego de 24 horas de expresión del plásmido, las neuronas fueron tratadas con Ptx

(200ng/ml) por 1 hora antes de los anticuerpos: IgG control o  $\alpha$ GD1a/GT1b [ambos 50ug/ml] por 1:30 horas. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa Image J, la barra indica 10  $\mu$ m. **B.** Cuantificación de la extensión de neuritas promedio de cada tratamiento, n: 3 experimentos independientes. Empleando el programa estadístico GraphPad Prism7 se realizó un análisis de Kruskal-Wallis, \* $p < 0.01$  comparado con el control, las barras indican EEM.

### 3.3 Gai está involucrada en el colapso de lamela mediado por el anticuerpo $\alpha$ GD1a/GT1b.

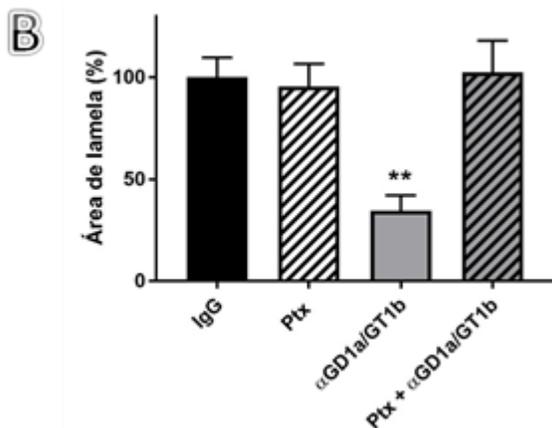
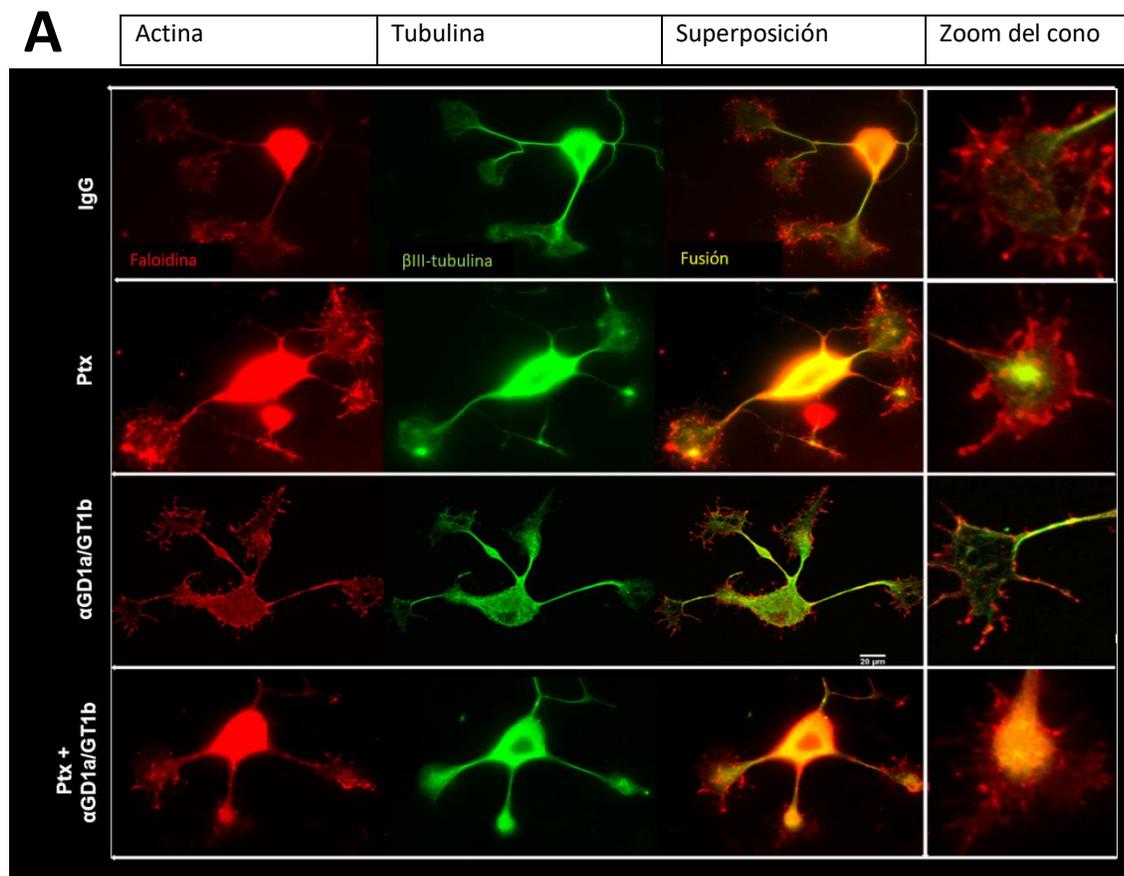
El siguiente experimento se basó en determinar el rol o participación de las proteínas Gai en los efectos de un tratamiento agudo con anticuerpos anti-gangliósidos sobre la morfología del cono de crecimiento de neuronas. Específicamente quisimos estudiar el colapso de lamela de actina basándonos en los antecedentes previamente descritos en el laboratorio.

Para llevar a cabo estos ensayos se emplean períodos cortos de tiempo de incubación de las neuronas extraídas del animal y de los tratamientos, para poder visualizar el citoesqueleto de los conos de crecimiento en expansión (los cuales poseen mayor tamaño) y analizar cambios puntuales en su morfología.

Se extrajeron DRGn de rata Wistar y se sembraron por 3 horas en medio con NGF para permitir la correcta formación de conos de crecimiento, luego se las incubo con Ptx por 1 hora previo a los tratamientos con IgG control o anticuerpo  $\alpha$ GD1a/GT1b por 90 minutos. Luego se fijaron los cultivos con PFA 4% y se procedió a marcar con anti- $\beta$ -III-tubulina para visualizar los MT y faloidina para ver actina, para así analizar la morfología del cono de crecimiento. El procedimiento empleado para la determinación del área de lamela esta explicado ampliamente en la sección de materiales y métodos.

A continuación, en la figura 26 A, se pueden observar imágenes del estado de cada componente del citoesqueleto según cada tratamiento. En las neuronas tratadas con IgG control se observa una profusa lamela de actina sobresaliendo de la región central determinada por los MT marcados en verde (área de lamela en cultivos tratados con IgG:  $100 \pm 9.73$ ). Lo mismo ocurre con los cultivos tratados únicamente con Ptx, lo cual indica que la toxina no produce efectos negativos *per se* sobre el citoesqueleto de los conos de crecimiento (Ptx:  $95.48 \pm 11.09$ ).

Por otra parte, las DRGn expuestas al anticuerpo crosreactivo  $\alpha$ GD1a/GT1b muestran un colapso de la lamela de más del 60% ( $34.52 \pm 7.53$ ). Llamativamente, observamos que el pre-tratamiento con Ptx fue eficaz para prevenir el colapso de la lamela de actina provocada por el anticuerpo  $\alpha$ GD1a/GT1b ( $102.4 \pm 15.59$ ). Esto sugiere que es necesaria la completa funcionalidad de la proteína Gai2 para que ocurran los eventos celulares de colapso del cono de crecimiento mediado por el anticuerpo  $\alpha$ GD1a/GT1b.



**Figura 26. Ptx previene el colapso de lamela mediado por  $\alpha$ GD1a/GT1b en DRGn.**A. Microfotografías de DRGn de ratón cepa salvaje, tratadas con Ptx 1 hora antes de los anticuerpos: IgG control o  $\alpha$ GD1a/GT1b [ambos 50ug/ml] por 1:30 horas. Luego de fijadas, las células fueron inmunomarcadas con Faloidina 554 (rojo) y anticuerpo anti- $\beta$ -III-tubulina con secundario en verde. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal con magnificación 60X

y analizadas utilizando el programa Image J, la barra indica 20  $\mu\text{m}$ . **B.** Cuantificación del área de lamela promedio de cada tratamiento realizado, n: 3 experimentos independientes. Empleando el programa estadístico GraphPad Prism7 se realizó ANOVA y análisis de Kruskal-Wallis. \* $p < 0,01$  comparado con el control, las barras indican EEM.

### 3.4 El anticuerpo $\alpha\text{GD1a}$ específico no provoca colapso de lamela.

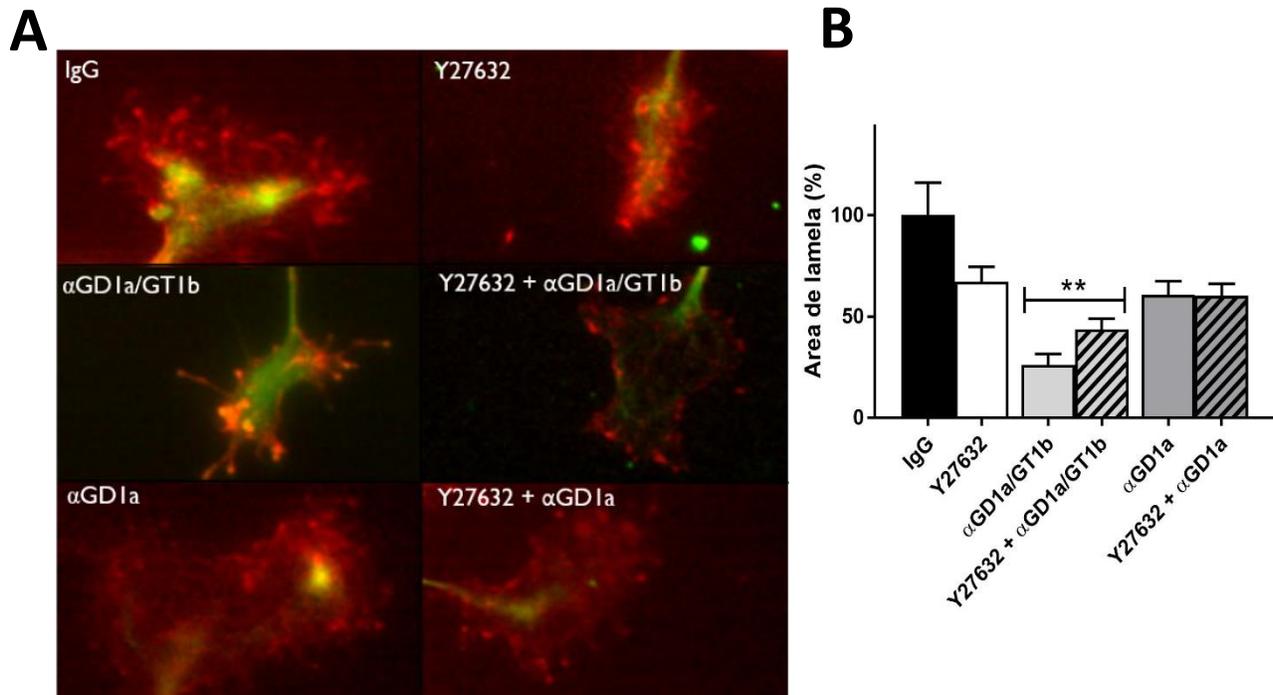
Estudios previos del laboratorio determinaron que el rápido colapso de la lamela ocurre de manera independiente a la activación de RhoA mediada por el anticuerpo  $\alpha\text{GD1a/GT1b}$ . Esto fue determinado con el uso de inhibidores específicos para la GTPasa RhoA (la exoenzima C3 transferasa) y para su quinasa efectora ROCK (el fármaco Y27632), los cuales no lograron prevenir el colapso de la lamela cuando los cultivos eran tratados con el anticuerpo crosreactivo<sup>90</sup>.

Debido a que éstos experimentos previos solo emplearon el anticuerpo crosreactivo que tiene capacidad de reconocer ambos gangliósidos GD1a o GT1b y basándonos en los resultados anteriormente hallados en ésta tesis (figura 25), decidimos estudiar la consecuencia que tendría el tratamiento con el anticuerpo  $\alpha\text{GD1a}$  sobre el cono de crecimiento y precisamente sobre la lamela de actina.

Se emplearon cultivos de neuronas de rata cepa salvaje, se dividieron en 6 grupos: IgG control,  $\alpha\text{GD1a/GT1b}$  y  $\alpha\text{GD1a}$  con tratamiento de 90 minutos; y otros 3 grupos pre-incubados por 2 horas con Y27632 antes de los tratamientos mencionados. Luego de fijar los cultivos se procedió a inmunomarcarse los elementos del citoesqueleto con anti- $\beta$ -III-tubulina para visualizar los MT y faloidina para ver actina. Se tomaron microfotografías en microscopio de epifluorescencia con magnificación de 60X, ver figura 27. En primer lugar, la incubación con el inhibidor farmacológico Y27632 muestra un efecto negativo sobre el área de lamela de actina de los conos de crecimiento, pero no llega a ser significativo respecto al control (IgG:  $100 \pm 16.08$  y Y27632:  $67.26 \pm 7.34$ ).

En segundo lugar, el tratamiento por 90 minutos con el anticuerpo  $\alpha\text{GD1a/GT1b}$  si logra colapsar la lamela de actina y este fenómeno no es prevenido completamente por el tratamiento previo con el inhibidor de ROCK ( $\alpha\text{GD1a/GT1b}$ :  $26.09 \pm 5.45$  y  $\text{Y27632} + \alpha\text{GD1a/GT1b}$ :  $49.78 \pm 6.75$ ).

En tercer lugar, se demostró que el tratamiento con el anticuerpo específico  $\alpha\text{GD1a}$  no tiene efecto negativo, el pre-tratamiento con el inhibidor Y27632 no afecta el área de lamela en los cultivos tratados con  $\alpha\text{GD1a}$  ( $\alpha\text{GD1a}$ :  $60.78 \pm 6.77$  y  $\text{Y27632} + \alpha\text{GD1a}$ :  $60.13 \pm 5.99$ ).



**Figura 27. Anticuerpo  $\alpha$ GD1a no provoca colapso de lamela.** **A.** Microfotografías de neuronas DRG disociadas de ratón WT y pre-incubadas con el inhibidor farmacológico de ROCK, Y27632 [10 $\mu$ M] por 2 horas antes del tratamiento con los anticuerpos: IgG control o  $\alpha$ GD1a/GT1b (ambos a concentración 50ug/ml) o  $\alpha$ GD1a [100ug/ml] por 1,5 horas adicionales. Citoesqueleto marcado con faloidina en rojo, anti- $\beta$ III tubulina en verde. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal con magnificación 60X y analizadas utilizando el programa Image J, la barra indica 20 $\mu$ m. **B.** Cuantificación del área de lamela. N: 3 experimentos independientes. Valores ponderados en relación al promedio del control IgG (%). Análisis de Kruskal-Wallis. \* $p$ <0.01 comparado con el control, las barras indican EEM.

### 3.5 La sobreexpresión del péptido secuestrador del complejo G $\beta\gamma$ , $\beta$ ARKct, previene el efecto inhibitorio de $\alpha$ GD1a/GT1b.

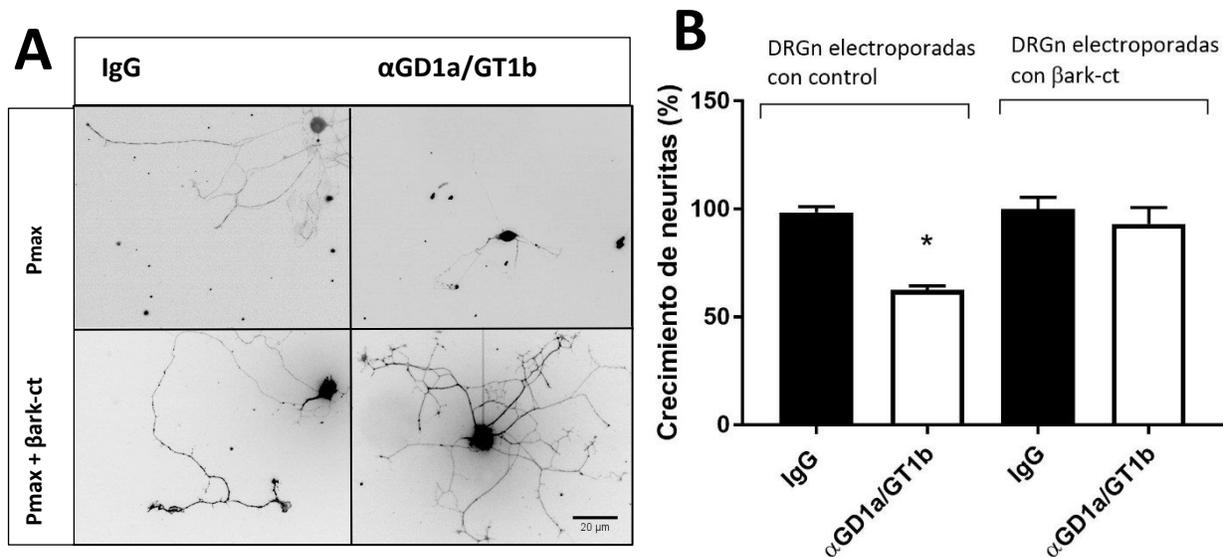
Para corroborar la participación del complejo de la proteína G heterotrimérica en la vía de señalización inhibitoria del crecimiento neurítico mediada por los anticuerpos anti-gangliósidos, se decidió emplear un péptido que evita la disociación de las subunidades  $\beta\gamma$  del complejo. El péptido  $\beta$ ARKct, derivado del dominio C-terminal de la quinasa asociada al receptor  $\beta$ -adrenérgico, es capaz de secuestrar las subunidades  $\beta\gamma$  impidiendo que se libere la subunidad alfa y se previene la señalización de las proteínas G.

Se co-electroporaron DRGn de rata Wistar con un plásmido conteniendo la secuencia de  $\beta$ ARKct y el vector Pmax para la posterior visualización. Luego se trataron los cultivos por 18 horas con  $\alpha$ GD1a/GT1b o IgG control, para medir el crecimiento neurítico.

Las imágenes obtenidas en el microscopio de epifluorescencia muestran, en cultivos controles expresando solo el plásmido Pmax, que el anticuerpo anti-gangliósidos mantiene su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las neuritas (Fig. 27A). Por el contrario, en aquellas células que fueron electroporadas con ambos plásmidos, es decir que se está expresando el péptido secuestrador  $\beta$ ARKct, el efecto inhibitorio del anticuerpo  $\alpha$ GD1a/GT1b se ve bloqueado, encontrando una gran elongación en las neuronas. Los valores de las DRG electroporadas con  $\beta$ ARKct y tratadas con IgG son:  $100 \pm 5.47$  y tratadas con  $\alpha$ GD1a/GT1b:  $93.14 \pm 7.53$ ) y están graficados en la figura 28 B.

Al emplear un péptido que secuestra las subunidades  $\beta\gamma$ , se evita la disociación con las subunidades  $G\alpha$  y no podrán cumplir sus roles. En este caso, aunque los anticuerpos anti-gangliósidos estimulen a las  $G\alpha$  inhibitorias éstas estarán bloqueadas y además, debido a que el medio de cultivo provee constantemente neurotrofinas (NGF) a las células se favorece el aumento de AMPc, activación de PKA y por ende inhibición de la cascada RhoA dependiente, dando como resultado crecimiento neurítico sin alteraciones a pesar del

**Figura 28. La sobreexpresión del péptido secuestrador del complejo  $G\beta\gamma$   $\beta$ ARK-ct, previene la inhibición sobre la**



**extensión de neuritas mediado por  $\alpha$ GD1a/GT1b.A.** Microfotografías de DRGn de rata Wistar, electroporadas con un plásmido conteniendo una secuencia secuestradora del complejo  $G\beta\gamma$  ( $\beta$ ARK-ct) y/o Pmax, un plásmido GFP control. Luego las células fueron tratadas con IgG o  $\alpha$ GD1a/GT1b [50ug/ml] por 1:30 horas. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa Image J, barra indica 20 $\mu$ m. **B.** Cuantificación de la extensión de neuritas promedio en las neuronas co-electroporadas con  $\beta$ ARK-ct y Pmax según los tratamientos. n: 3 experimentos independientes.

Empleando el programa estadístico GraphPad Prism7 se realizó un análisis T de Student, \* $p < 0.05$ , las barras indican EEM.

### 3.6 G $\alpha$ i está involucrada en la activación de RhoA mediada por los anticuerpos $\alpha$ GD1a.

Lo siguiente a determinar fue si la proteína G $\alpha$ i estaba involucrada en la vía de activación de la GTPasa RhoA, estudiada por activarse en presencia de anticuerpos anti-gangliósidos causando inhibición del crecimiento neurítico.

Para investigar su participación se emplearon conjuntamente la electroporación de un plásmido conteniendo un biosensor específico de RhoA basado en la técnica de FRET (ver Materiales y Métodos) y el tratamiento con Ptx para inhibir la actividad de la subunidad G $\alpha$ i.

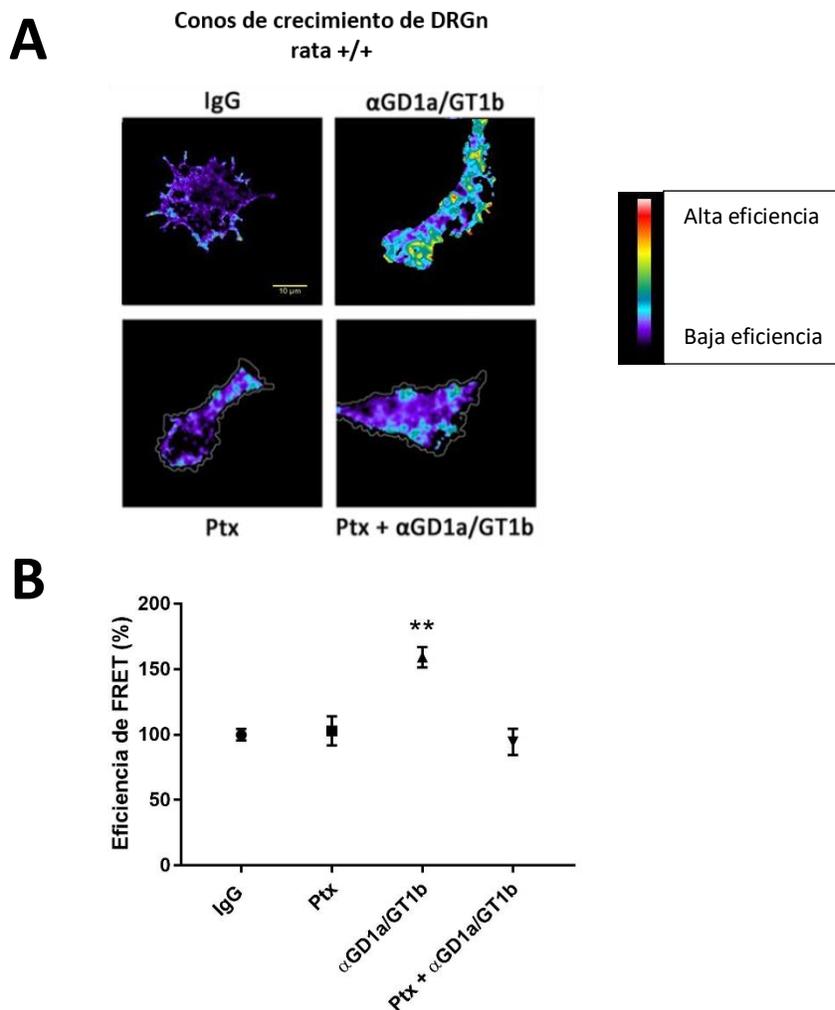
Los cultivos de DRGn se electroporaron con el biosensor y luego de 24 horas se replaquearon para permitir que las neuronas vuelvan a extender neuritas con conos de crecimiento, sitio donde se evaluó la activación de RhoA. Los tratamientos con IgG o los diferentes anticuerpos anti-gangliósidos ( $\alpha$ GD1a/GT1b,  $\alpha$ GD1a y  $\alpha$ GT1b) se realizaron por solo 30 minutos, tiempo donde ocurre el pico de activación de RhoA (descrito previamente<sup>90</sup>).

Las imágenes obtenidas fueron analizadas para determinar los valores de eficiencia de FRET y deducir la activación o no de RhoA según se describe detalladamente en la sección de Materiales y Métodos.

Los resultados presentados en la figura 29, muestran que las neuronas tratadas con anticuerpos  $\alpha$ GD1a específico o  $\alpha$ GD1a/GT1b crosreactivo son capaces de provocar un aumento en la eficiencia de FRET, indicando una activación de RhoA comparado a los niveles basales de los cultivos tratados con IgG control. El tratamiento con el anticuerpo  $\alpha$ GT1b específico no fue capaz de activar a RhoA.

Para determinar si las proteínas G $\alpha$  inhibitorias estaban involucradas en la vía de activación de RhoA mediada por los anticuerpos anti-gangliósidos se empleó otro conjunto de cultivos expresando el plásmido con el biosensor, los cuales fueron pre-tratados 1 hora con Ptx, previo al tratamiento agudo con  $\alpha$ GD1a/GT1b.

Se determinó en primer lugar, que el tratamiento de la toxina no provoca cambios en los niveles basales de activación de RhoA (IgG:  $100 \pm 4.42$  y Ptx:  $103 \pm 11.06$ ). En segundo lugar, se pudo observar que el pre-tratamiento con Ptx fue capaz de prevenir la activación de RhoA inducida por el anticuerpo de alta afinidad  $\alpha$ GD1a/GT1b ( $\alpha$ GD1a/GT1b:  $159.2 \pm 7.85$  y Ptx +  $\alpha$ GD1a/GT1b:  $94.59 \pm 9.99$ ), indicando que es necesaria la participación de la proteína G $\alpha$ i en la cascada de señalización.



**Figura 29. Ptx previene la activación de RhoA mediada el anticuerpo  $\alpha$ GD1a/GT1b en DRGn.** **A.** Microfotografías de conos de crecimiento de DRGn de rata Wistar electroporadas con un biosensor de RhoA para FRET, tratadas con Ptx (200ng/ml) por una hora y luego anticuerpos IgG control [50 $\mu$ g/ml],  $\alpha$ GD1a/GT1b [50 $\mu$ g/ml],  $\alpha$ Gd1a[100 $\mu$ g/ml] o  $\alpha$ GT1b[100 $\mu$ g/ml] por 30 min. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa Image J, se delinearon los bordes de los conos de crecimiento con una línea de contorno blanca y se anexó un mapa de pseudo-color mostrando la activación de RhoA (colores cálidos indican alta eficiencia de FRET, colores fríos baja eficiencia). **B.** Cuantificación de la eficiencia de FRET promedio en las neuronas electroporadas y comparación entre los tratamientos. n: 3 experimentos independientes. Valores ponderados en relación al promedio del control IgG (%). Empleando el programa estadístico GraphPad Prism7 se realizó un análisis de Kruskal-Wallis \*\*p<0.01 y \*p<0.05; las barras indican EEM.

### 3.7 Gαi está involucrada en el descenso de actividad de Rac1 mediado por los anticuerpos anti-gangliósidos.

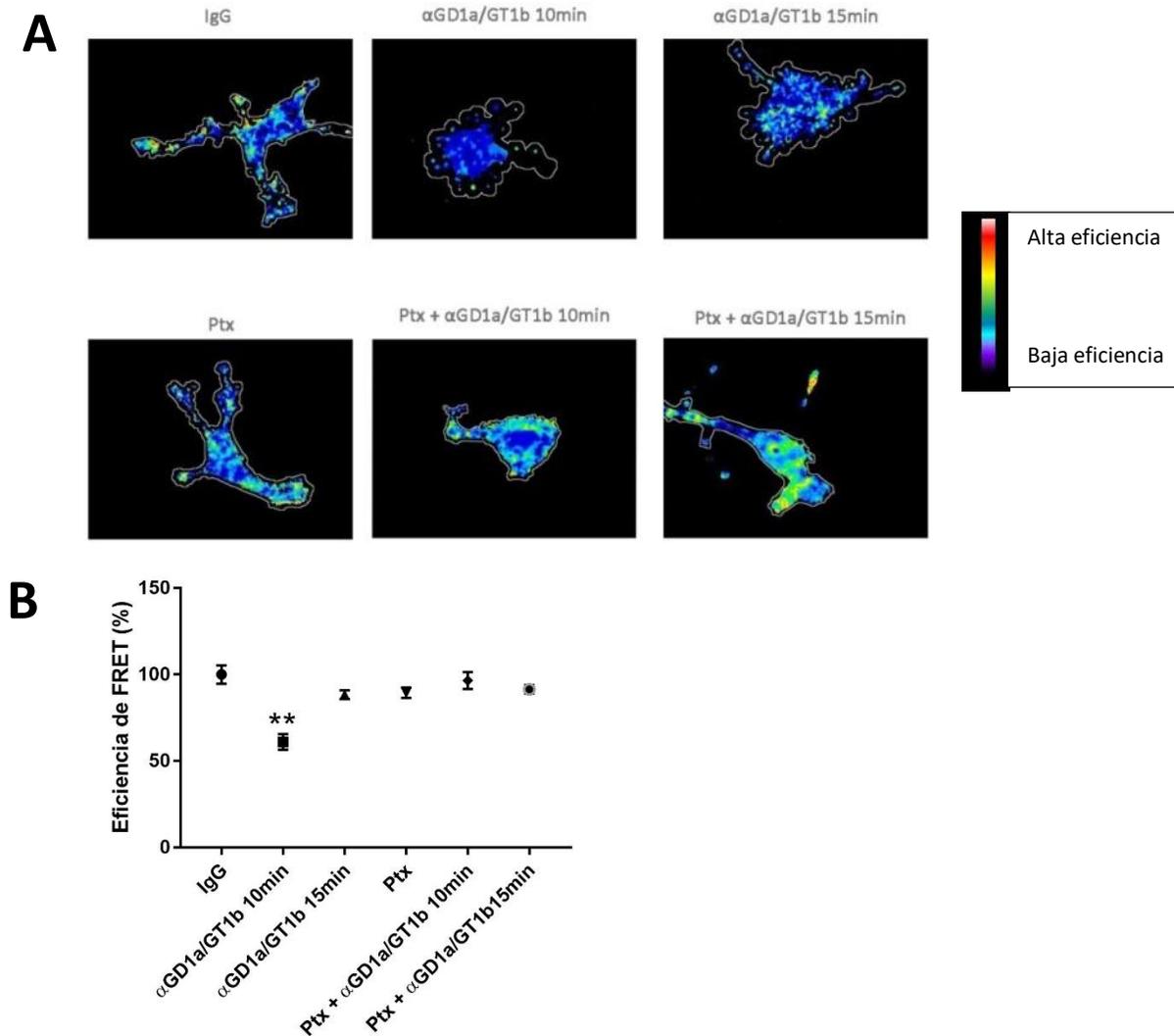
Dos razones de peso nos llevaron a investigar también la participación u actividad de la GTPasa Rac1 en los cambios que sufren los conos de crecimiento de las neuronas en presencia de anticuerpos anti-gangliósidos. En primer lugar, porque se conoce que participa en el control del citoesqueleto de actina y su inactivación está asociada al colapso de la F-actina de la lamela; en segundo lugar, porque la molécula fue identificada por la proteómica como posible compañero molecular de los gangliósidos en la membrana (relación 228).

Además, resultados previos de nuestro laboratorio demostraron una correlación entre una inactivación de Rac1 aguda (10 minutos) inducida por tratamiento con  $\alpha$ GD1a/GT1b, lo que estuvo asociado al colapso temprano de lamela que ocurre de manera independiente de RhoA<sup>90</sup>.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos determinar si en la vía de inactivación de Rac1 mediada por los anticuerpos anti-gangliósidos estaría involucrada la pequeña proteína G alfa inhibitoria. Para ello se electroporaron DRGn de rata con un biosensor diseñado para medir la actividad específica de Rac1 basado en FRET. Luego de 24 horas se replaquearon las neuronas, se las incubó una hora con Ptx y se las trató durante 10 o 15 minutos con el anticuerpo  $\alpha$ GD1a/GT1b.

Analizando la eficiencia de FRET corroboramos que tanto el tratamiento con IgG control como la incubación con Ptx sola no alteran la actividad basal de Rac1 (Fig. 30) (IgG:  $100 \pm 5.26$  y Ptx:  $82.42 \pm 3.04$ ). Luego examinamos los cultivos tratados por 10 minutos con  $\alpha$ GD1a/GT1b y hallamos una caída en la actividad de Rac1, expresada como una baja eficiencia de FRET, en cambio en las neuronas tratadas por 15 minutos con el anticuerpo no se encontraron diferencias significativas en la eficiencia de FRET comparado con el control ( $\alpha$ GD1a/GT1b 10min:  $61.08 \pm 4.51$  y  $\alpha$ GD1a/GT1b 15min:  $88.33 \pm 2.51$ ).

Interesantemente observamos que el pre-tratamiento con Ptx fue capaz de evitar el descenso en la actividad de la GTPasa observado a los diez minutos de tratamiento con  $\alpha$ GD1a/GT1b (Ptx +  $\alpha$ GD1a/GT1b 10min:  $96.55 \pm 4.88$  y Ptx +  $\alpha$ GD1a/GT1b 15min:  $91.42 \pm 2.5$ ).



**Figura 30. Ptx previene el descenso de la actividad de Rac1 mediada  $\alpha$ GD1a/GT1b.** **A.** Microfotografías de conos de crecimiento de DRGn de rata Wistar electroporadas con un biosensor de Rac1 para FRET. Las neuronas fueron tratadas con Ptx (200ng/ml) por una hora y luego con anticuerpos IgG control o  $\alpha$ GD1a/GT1b [50 $\mu$ g/ml] por 10 y 15 minutos. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa Image J, se delinearón los bordes de los conos de crecimiento con una línea de contorno blanca y se anexó un mapa de pseudo-color indicando la activación de Rac1 (colores cálidos indican alta eficiencia de FRET, colores fríos baja eficiencia). **B.** Cuantificación de la eficiencia de FRET promedio en las neuronas electroporadas. Se muestran resultados provenientes de 3 experimentos independientes. Valores ponderados en relación al promedio del control IgG (%). Empleando el programa estadístico GraphPad Prism7 se realizó un análisis de Kruskal-Wallis \* $p$ <0.01, las barras indican EEM.



## Discusión

Se ha demostrado que existe una asociación entre la recuperación clínica incompleta o demorada en los pacientes con SGB y la presencia de altos títulos de anticuerpos anti-gangliósidos<sup>58,80</sup>. Es por ello que muchos equipos de investigación han trabajado para dilucidar los mecanismos celulares y moleculares que emplean los anticuerpos y cómo la persistencia de éstos en el tiempo afecta la etapa de recuperación clínica posterior al inicio de síntomas de los pacientes. De esta manera mediante modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* se ha conseguido identificar que los anticuerpos específicos contra los gangliósidos GD1a y GT1b así como los crosreactivos contra ambos epítopes, inhiben el crecimiento neurítico de neuronas DRG del SNP<sup>138,181-183</sup>. También se ha estudiado que el efecto inhibitorio del  $\alpha$ GT1b depende de Ngr1 e imita el efecto de MAG, otro inhibidor de la regeneración axonal, que señala a través de diversos complejos moleculares dependiendo el tipo celular<sup>39,184</sup>. Se conoce que estos procesos inhibitorios tienen un efector común, la vía RhoA-ROCK que afecta negativamente el citoesqueleto de los conos de crecimiento, causando acortamiento de filopodias de actina y despolimerización de los MT que resulta en conos distróficos y por lo tanto previene el correcto crecimiento neurítico posterior a una lesión<sup>42,90,126,138,185-187</sup>. Otros mecanismos moleculares que subyacen a la inhibición del crecimiento neurítico han sido descritos que ocurren de manera independientes de RhoA, como el colapso de la lamela de actina del cono de crecimiento de neuronas DRG cuando las neuronas son tratadas con el anticuerpo  $\alpha$ GD1a/GT1b<sup>90</sup>.

Hoy en día aún se desconocen en profundidad cuales son los mecanismos moleculares que utilizan dichos anticuerpos anti-gangliósidos para señalar a nivel de la membrana y ejercer su capacidad inhibitoria sobre el crecimiento neurítico. Los antígenos de éstos anticuerpos son los gangliósidos expuestos en la superficie celular, que pueden interaccionar en *cis* con proteínas de membrana y cumplir diversos roles moduladores sobre éstas, por ejemplo: 1) modificar la localización de las proteínas dentro de los microdominios de la membrana donde pueden ser reclutadas para transducir una señal, 2) provocar la dimerización o desacople de receptores y/o 3) interaccionar con receptores como compañeros moleculares de señalización<sup>188</sup>. Tomando toda esta información en consideración, nuestro objetivo de trabajo fue identificar el/los posibles compañeros moleculares de los gangliósidos en la membrana, capaces de mediar y transducir el efecto inhibitorio de los anticuerpos anti-gangliósidos sobre el crecimiento neurítico de neuronas del SNP en modelos *in vivo* e *in vitro*.

Para comenzar a responder éste interrogante realizamos una colaboración con el laboratorio del Dr. Ronald Schnaar de la Universidad John Hopkins en Baltimore, Estados Unidos. Este equipo fue capaz de identificar exitosamente proteínas asociadas a los gangliósidos GM1 y GT1b, mediante un análisis de proteómica cuantitativa a partir de un homogenato de membrana plasmática neuronal incubados con

gangliósidos unidos covalentemente a esferas magnéticas<sup>189</sup>. Nuestro primer enfoque fue una búsqueda bibliográfica e informática de las proteínas que se encontraron en este estudio de proteómica, para determinar estructura, funciones o interacciones que los pudiera involucrar en cascadas de señalización, en modulación mediada por gangliósidos o inhibición de regeneración axonal. Con esta información conformamos una lista de candidatos con potencial para actuar como compañeros moleculares de los gangliósidos en la membrana, capaces de señalar los efectos inhibitorios del crecimiento neurítico mediado por los anticuerpos anti-gangliósidos.

Luego de la búsqueda, decidimos emplear una metodología que nos permitiera determinar, en el paradigma de crecimiento neurítico utilizando cultivos primarios de DRGn, los efectos que podía causar la ausencia de expresión de alguna de éstas proteínas identificadas en el screening sobre el efecto inhibitorio mediado por anticuerpos anti-gangliósidos. La técnica de shARN nos permitió comenzar a visualizar si éstos candidatos estaban involucrados en la cascada de señalización empleada por el anticuerpo crosreactivo que reconoce los gangliósidos GD1a y GT1b (se prefirió usar éste anticuerpo debido a su alta afinidad y marcado efecto inhibitorio sobre el crecimiento neurítico y la regeneración axonal *in vivo*). En éste estudio encontramos que el silenciamiento de la expresión de TNFR1a previene completamente la inhibición mediada por el anticuerpo crosreactivo  $\alpha$ GD1a/GT1b. Interesantemente, el receptor TNFR1a es miembro de la familia de SFTNFR entre los que se destacan, con referencia a esta tesis, el receptor para neurotrofinas p75<sup>NTR</sup> (TNFR16) y el miembro huérfano TNFR 19, también denominado TAJ/TROY<sup>40,139,190,191</sup>, los cuales ya han sido descritos que participan de la señalización asociada a la inhibición del crecimiento neurítico de otras proteínas inhibitoras de la regeneración axonal.<sup>42,138,139</sup> TNFR1a comparte cierta homología estructural y funciones con estos miembros de la SFTNFR, por lo que resultaba un candidato interesante para seguir profundizando los estudios. Es por ello que a continuación, quisimos determinar qué efecto tendría el tratamiento con anticuerpos específicos  $\alpha$ GD1a o  $\alpha$ GT1b por separado en las neuronas silenciadas para TNFR1a. Los resultados mostraron que la ausencia de expresión del receptor evitaba la inhibición del crecimiento neurítico solo en aquellos tratamientos  $\alpha$ GD1a específicos, mientras que el anticuerpo  $\alpha$ GT1b mantenía su eficiencia inhibitoria. Encontramos la misma tendencia cuando empleamos neuronas disociadas de ratones genéticamente modificados que no expresaban TNFR1a, éstas eran susceptibles al tratamiento con  $\alpha$ GT1b que causaba inhibición del crecimiento neurítico a diferencia del anticuerpo  $\alpha$ GD1a específico que incluso provocaba mayor elongación de neuritas comparado al control. Estos hallazgos nos comenzaban a sugerir que el receptor estaba involucrado y que había cierta especificidad de la señalización de los anticuerpos  $\alpha$ GD1a con TNFR1a.

Posteriormente utilizamos un modelo *in vivo* de regeneración axonal, empleando animales TNFR1a<sup>-/-</sup> y observamos que fueron menos susceptibles a la inmunización pasiva con el anticuerpo  $\alpha$ GD1a/GT1b con respecto a ratones de cepa salvaje. En este ensayo observamos que el  $\alpha$ GD1a/GT1b mantuvo cierta capacidad inhibitoria en ratones TNFR1a<sup>-/-</sup>, lo que puede atribuirse a que reconoce tanto a GD1a como GT1b y puede iniciar cascadas de señalización diferentes o específicas, inherentes a cada gangliósido. De esta manera, nuestros experimentos nos permitieron arribar al mismo resultado empleando diferentes técnicas y así deducir que **los efectos inhibitorios de los anticuerpos  $\alpha$ GD1a sobre el crecimiento neurítico de neuronas DRG son dependientes del receptor TNFR1a y que éste actuaría como molécula transductora y compañero molecular del gangliósido GD1a específicamente.**

Como sabemos, la activación de RhoA es un proceso donde convergen diversas vías que causan la inhibición del crecimiento neurítico y por ende de la regeneración axonal<sup>42,90,126,138,185,186</sup>. Trabajos previos de nuestro laboratorio determinaron que en cultivos primarios de neuronas de ratones cepa salvaje, RhoA se activa a los 30 minutos posteriores al tratamiento de los cultivos neuronales con el anticuerpo crosreactivo  $\alpha$ GD1a/GT1b<sup>90</sup>. Otro grupo de investigación reportó que la estimulación de TNFR1a por TNF $\alpha$  inhibe el crecimiento neurítico y la arborización en neuronas hipocampales a través de la activación de mecanismos RhoA-dependientes<sup>192</sup>. En base a estos antecedentes, decidimos estudiar si TNFR1a estaba participando en la cascada de activación de RhoA mediada por anticuerpos anti-gangliósidos. Para ello, electroporamos un biosensor diseñado para medir la actividad de la GTPasa en neuronas que carecían de la expresión del receptor y nuestros resultados mostraron que **la activación de RhoA mediada por los anticuerpos  $\alpha$ GD1a (ya sea específicos o crosreactivos) necesita de la expresión de TNFR1a en la cascada de señalización.** Esta función no es la tradicionalmente descrita para el receptor TNFR1a, el cual está principalmente involucrado en procesos inflamatorios, pro-apoptóticos o de sobrevida según la cascada de activación que se inicie. TNFR1a, así como p75<sup>NTR</sup>, son miembros de la SFTNFR que poseen una región intracelular conocida como dominio de muerte celular DD, a la cual se unen diversas proteínas accesorias y según el ambiente que sense la célula pueden desencadenar diferentes señales actuando de modo pleiotrópico, es decir que pueden promover la sobrevida mediante la activación del factor de transcripción NF-kB o iniciar muerte celular<sup>191,193</sup>. El receptor TNFR1a tiene como ligando principal a la citoquina TNF $\alpha$ , la cual es producida por macrófagos y células T activadas que la liberan al medio extracelular donde se agrupan en homotrímeros. Se ha estudiado que receptores de la familia han sido descritos por señalizar en forma de dímeros o trímeros, por ejemplo los TNFR1a pueden reacomodarse y pre-ensamblarse por el dominio más distal de la membrana formando complejos supramoleculares, lo que favorecería la unión con los ligandos y potenciaría la señal<sup>188,190,194,195</sup>. También se ha demostrado que existe auto-activación

de TNFR1a debido a la sobreexpresión del receptor, causando una trimerización espontánea en la membrana, aun sin la presencia del ligando específico que da comienzo al reclutamiento de proteínas accesorias y vías de señalización<sup>196,197</sup>. Sin embargo, también existen vías alternativas de la señalización de los miembros de la SFTNFR, por ejemplo MAG, otro inhibidor de la regeneración que reconoce entre otros receptores a gangliósidos, señala a través de un re-arreglo de receptores en la membrana del axón, que involucra al receptor p75<sup>NTR</sup> en forma monomérica formando parte del complejo multi-molecular con Lingo1, NgR1 y GT1b o GD1a para traducir la señal inhibitoria<sup>40,41,46,132,137</sup>. Por lo tanto, sería posible postular que, en nuestro modelo de estudio, **el anticuerpo  $\alpha$ GD1a señalaría a través del receptor TNFR1a en forma monomérica**, ante la evidencia de que los tratamientos con anticuerpos anti-gangliósidos no provocan muerte celular, sino que inhiben el crecimiento neurítico, similar a lo que observa Neumann y col.<sup>192</sup> en las neuronas hipocampales con bajas dosis de TNF $\alpha$ , por lo que se infiere que no hay trimerización de los receptores, sino que alternativamente se produce una activación muy baja del receptor que no logra desencadenar la apoptosis<sup>192</sup>.

Retomando la cascada inhibitoria de la regeneración axonal mediada por MAG, se estudió que la activación de RhoA ocurre cuando el dominio de muerte celular de p75<sup>NTR</sup> es clivado secuencialmente por enzimas secretasas, generándose así el DD que posteriormente se une a RhoGDI en el citosol, liberando a RhoA que podrá ser activada por GEFs<sup>41,46</sup>. Algunos estudios demostraron que empleando un péptido específico (TAT-Pep5) que compite por la porción DD del p75<sup>NTR</sup> derivado de la secuencia de RhoGDI, se previene la disociación RhoGDI-RhoA y en consecuencia no hay inhibición de la regeneración axonal mediada por MAG<sup>34,46</sup>. En nuestro modelo de estudio, quisimos determinar si la porción intracelular del TNFR1a también tendría el mismo funcionamiento que el DD de p75<sup>NTR</sup> en cuanto a unirse a RhoGDI y liberar a RhoA. Para ello se hizo un análisis comparativo de las secuencias y estructura del DD de los miembros de la SFTNFR para determinar si tienen los mismos sitios de interacción con RhoGDI descritos para el DD de p75<sup>NTR</sup><sup>137,178</sup>. Una vez confirmado que el TNFR1a poseía aminoácidos comunes en la región crítica para la interacción con RhoGDI, procedimos a realizar un ensayo de crecimiento neurítico en neuronas pre-tratadas con TAT-Pep5 antes de exponerlas a los distintos anticuerpos anti-gangliósidos. Los resultados nos permitieron determinar que 1) el péptido no fue capaz de prevenir la inhibición del crecimiento neurítico mediado por los anticuerpos específicos  $\alpha$ GD1a o el crosreactivo  $\alpha$ GD1a/GT1b; 2) el TAT-Pep5 si evitó la inhibición del crecimiento neurítico debido al tratamiento con anticuerpos específicos anti-GT1b. Por lo que deducimos que **existen diferentes vías de señalización y que hay especificidad en la activación de las mismas por los distintos anticuerpos anti-gangliósidos**.

Algunos grupos han determinado que el gangliósido GT1b interacciona con p75<sup>NTR</sup> para iniciar una señalización mediada por el anticuerpo  $\alpha$ GT1b y que imita los efectos de MAG<sup>182,198</sup>, otros describen que es dependiente de NgR1<sup>168,170,186</sup> para finalmente activar a RhoA quien desencadenará la inhibición del crecimiento neurítico. Sin embargo se demostró empleando animales que carecían de la expresión de p75<sup>NTR</sup>, que el anticuerpo crosreactivo  $\alpha$ GD1a/GT1b aún provoca una severa inhibición de la regeneración axonal<sup>138</sup>, por lo tanto la inhibición remanente debe estar actuando mediante otro/s receptores y el gangliósido GD1a. Nuestros resultados indican que la señalización del anticuerpo  $\alpha$ GD1a requiere de la expresión de TNFR1a como molécula transdutora de la señal para provocar la activación de RhoA e inhibir el crecimiento neurítico. A continuación, nos preguntamos cómo se desencadena la activación de ésta GTPasa, que iría por una vía independiente al desplazamiento RhoGDI/RhoA mediada por el dominio intracelular del receptor TNFR1a. Por este motivo, consideramos que quizás haya alguna molécula de tipo efectora o mensajera, capaz de mediar la señal del anticuerpo  $\alpha$ GD1a-gangliósido GD1a-TNFR1a y converger en la activación de RhoA. La molécula que estudiamos entonces fue la subunidad alfa de tipo inhibitoria 2 de la proteína G heterotrimérica, la cual se identificó en el estudio de proteómica como un posible candidato a participar en la vía de señalización. Se conoce que las proteínas G inhibitorias disminuyen los niveles de AMP cíclico intracelular porque afectan la actividad de la adenilato ciclasa, y en consecuencia no se activa la proteína PKA resultando en la pérdida del tono inhibitorio que la misma ejerce sobre RhoA vía fosforilación de la serina 188<sup>199</sup>. Por ende, la activación de las proteínas G $\alpha$ i estaría favoreciendo la inhibición de la regeneración axonal vía disminución del tono inhibitorio sobre RhoA<sup>36</sup>. Por el contrario, si moléculas como las neurotrofinas que desencadenan un aumento de AMPc, son agregadas a los cultivos previamente a la exposición de inhibidores de la regeneración axonal, éstas neurotrofinas serán capaces de bloquear la inhibición<sup>37</sup>. En base a lo anteriormente mencionado, decidimos investigar si la proteína G $\alpha$ i2 estaba involucrada en la transducción de la señal inhibitoria de los anticuerpos anti-gangliósidos en nuestro modelo de estudio, en el cual empleamos NGF para promover el crecimiento neurítico de las DRGn. Primero se estudió si bloqueando con Ptx, inhibidor específico de subunidades  $\alpha$  inhibitorias y de tipo 0, tenía efectos sobre el crecimiento neurítico de células tratadas con los diferentes anticuerpos anti-gangliósidos. Encontramos que los **anticuerpos  $\alpha$ GD1a específicos y crosreactivos no causaban inhibición si las proteínas G $\alpha$ i eran bloqueadas por Ptx**; en cambio sí había inhibición con  $\alpha$ GT1b a pesar del tratamiento con Ptx. También encontramos que las proteínas G $\alpha$ i2 estaban involucradas en el rápido colapso de la lamela de actina, ya que el pre-tratamiento de los cultivos con Ptx evitó los efectos negativos de los anticuerpos  $\alpha$ GD1a específicos y crosreactivos.

A continuación, quisimos determinar si las proteínas G $\alpha$ i eran parte de la cascada activadora de RhoA mediada por los anticuerpos anti-gangliósidos. Encontramos que el anticuerpo  $\alpha$ GT1b no fue capaz de activar a RhoA a diferencia del anticuerpo  $\alpha$ GD1a específico que si es capaz de aumentar la actividad basal de RhoA en DRG, de manera similar a lo demostrado anteriormente empleando el anticuerpo crosreactivo<sup>138</sup>. También determinamos que **este proceso de activación es dependiente de las proteínas G $\alpha$ i2** ya que el tratamiento con Ptx logro prevenir el aumento de RhoA activada. Con nuestros experimentos **corroboramos que la proteína G $\alpha$ i2 está involucrada en la inhibición del crecimiento axonal, en el colapso rápido de la lamela de actina y en la activación de RhoA mediada por los anticuerpos  $\alpha$ GD1a específicos y crosreactivos.**

Si bien muchos resultados se obtuvieron bloqueando la actividad de las G $\alpha$ i con toxina pertúsica, el empleo de un péptido inhibidor de la disociación de las subunidades  $\beta\gamma$  capaz de prevenir la inhibición del crecimiento neurítico nos indicó que no se puede descartar la participación de éstas en las vías de señalización, ya que se ha estudiado que las subunidades  $\beta\gamma$  pueden activar diversas cascadas por su cuenta. Algunos estudios han demostrado que Rac1, otra GTPasa involucrada en la modulación del citoesqueleto de los conos de crecimiento, sería modulada por las subunidades  $\beta\gamma$  cuando se activan los receptores de tipo GPCR<sup>164,200</sup>. Interesantemente Rac1 fue una de las proteínas que encontramos en el resultado de la proteómica, sin embargo, existen limitaciones técnicas para determinar si Rac1 tiene mayor participación en la vía de señalización de los anticuerpos anti-gangliósidos debido a que no existen inhibidores farmacológicos específicos para esta GTPasa y la expresión de plásmidos mutantes de actividad generan fenotipos aberrantes. No obstante, pudimos determinar que los anticuerpos  **$\alpha$ GD1a/GT1b provocan un rápido descenso en la actividad de la GTPasa Rac1, asociado al colapso de la lamela (proceso RhoA independiente) observando que ambos procesos son dependientes de la proteína G $\alpha$  inhibitoria.** Este hecho sería uno de los primeros eventos que desencadenan los anticuerpos  $\alpha$ GD1a específicos o crosreactivos que llevan a la activación de RhoA y colapso del cono de crecimiento, por lo que existiría una intercomunicación entre las GTPasas y las proteínas que las regulan<sup>201</sup>. Se puede hipotetizar que al activarse las proteínas G heterotriméricas, la subunidad G $\alpha$ i está mediando la activación de RhoA mediante la disminución del AMPc intracelular, mientras que las subunidades  $\beta\gamma$  modulan a Rac1 provocando el colapso de lamela.

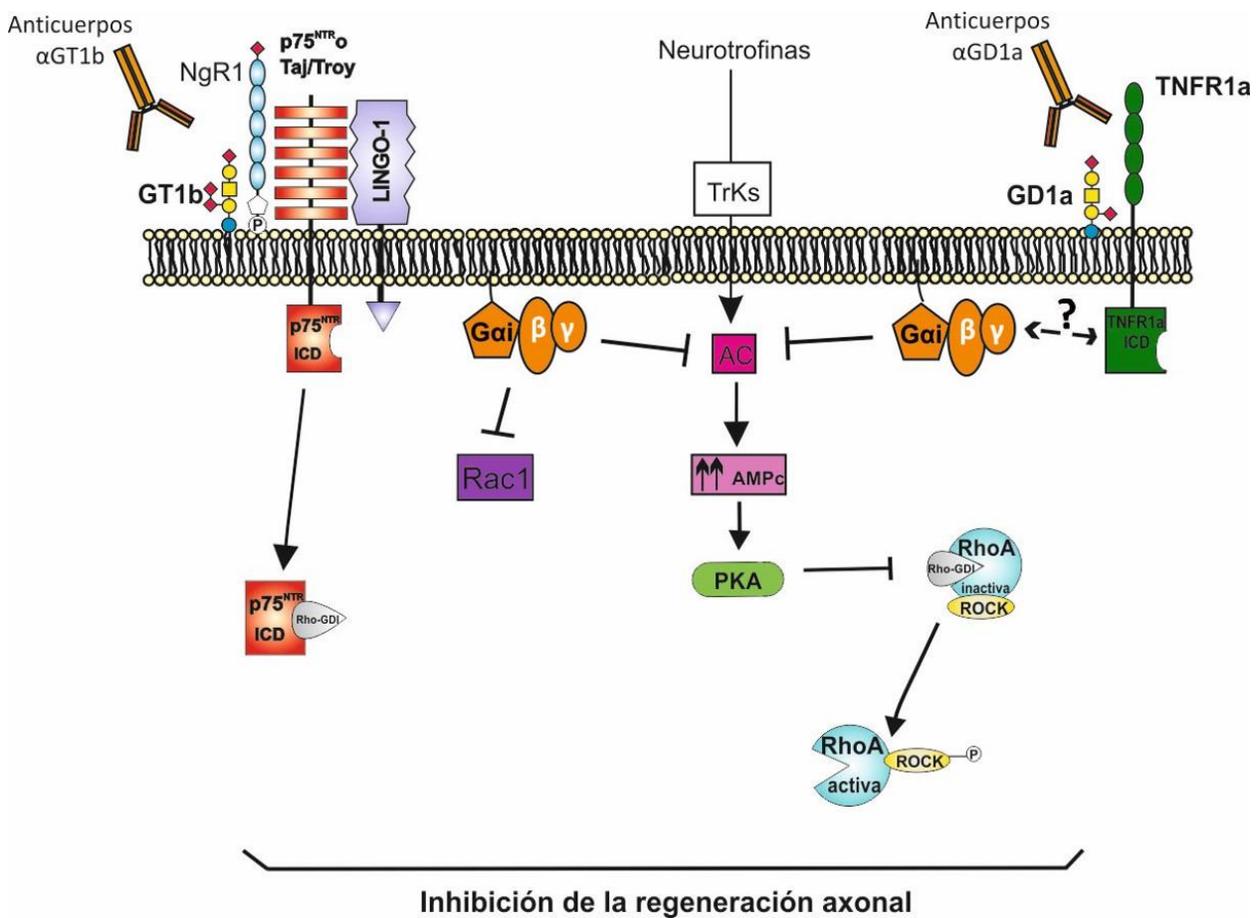
Retomando el hallazgo de que TNFR1a actúa como molécula transdutora de la señal para anticuerpos  $\alpha$ GD1a específicos, decidimos indagar en la posible interacción entre el receptor y el gangliósido en la membrana. Para ello primero se estudió la secuencia que conforma el tallo del TNFR1a, la región extracelular más cercana a la porción transmembrana ya que por coherencia espacial podría interactuar

con los glicosfingolípidos. Dicha porción aún no ha sido resuelta como estructura cristalina que pueda facilitar la investigación <sup>202</sup>, por lo que decidimos comparar el TNFR1a con p75<sup>NTR</sup> y Taj/Troy debido a que comparten cierta homología en la secuencia de aminoácidos, estructura tridimensional y han sido asociados con la inhibición de la regeneración axonal. Los gangliósidos interactúan con receptores a través de interacciones electrostáticas <sup>203</sup>, algunos autores recalcan que éstas cargas sirven para la interacción con moléculas adyacentes en la membrana plasmática y se ha visto que si las secuencias son modificadas, se altera la localización o funcionalidad de los receptores <sup>188,202</sup>. Las interacciones más determinantes serían: la carga negativa del carboxilo, el grupo N-acetil galactosamina y el N-acetilo del ácido siálico. **El análisis comparativo de TNFR1a con p75<sup>NTR</sup> y Taj/Troy reveló la presencia de ciertos aminoácidos cargados en posiciones críticas que podrían ser accesibles para interactuar con gangliósidos, los cuales estaban conservados también en algunos otros miembros de la SFTNFR.** Por ello, decidimos realizar mutantes puntuales del receptor en la región del tallo para determinar si, cambiando exclusivamente alguno de esos aminoácidos cargados, tenían un efecto sobre el crecimiento neurítico cuando los cultivos eran tratados con anticuerpos anti-GD1a. Nuestros resultados empleando estas mutantes nos permitieron determinar que **el aminoácido ácido aspártico (D) en la posición 165 de la secuencia del TNFR1a es necesario para que se produzca la transducción de la señal de los anticuerpos  $\alpha$ GD1a específicos.** En la comparación se encontró que este aminoácido estaba altamente conservado para este receptor en diferentes especies (humano, ratón y rata) y también estaba presente en varias regiones del tallo de receptores de la misma superfamilia (p75 y Taj/Troy), sugiriendo que su presencia es necesaria para la interacción con otras moléculas.

Otro aspecto importante a tener en cuenta para la transducción de señales y posible interacción entre los gangliósidos con el receptor, es la localización del TNFR1a en la membrana. Así es como diversos equipos de investigación demuestran que existe un emplazamiento común para el TNFR1 dentro de las balsas lipídicas en la membrana plasmática, microdominios que están enriquecidos en colesterol y glicosfingolípidos<sup>204,205</sup>. Dicho emplazamiento facilitaría la interacción con moléculas del entorno para la transducción de señales postulando que en la región transmembrana habría una corta secuencia con un motivo o conformación que serviría como potencial unión a lípidos <sup>206,207</sup>. Además se sabe que los gangliósidos pueden promover la formación de complejos macromoleculares necesarios para la integración de cascadas de señalización celular <sup>188,195</sup>. Grupos como el de Hunter y col. <sup>207</sup> han indicado que TNF $\alpha$  es capaz de activar a la GTPasa RhoA y para que esto suceda, es esencial la compartimentalización espacial del TNFR1 en las balsas lipídicas. Reportaron que si sacaban el colesterol de la membrana se perdía la localización de TNFR en estos microdominios, difundía en la membrana y ya

no era capaz de activar RhoA mediado por TNF $\alpha$ . Se conoce también que en las balsas lipídicas también se encuentran asociados diversos GEFs, GAPs y otras moléculas que podrían modular a RhoA y otras GTPasas <sup>208</sup>.

Todo lo expuesto anteriormente **nos estaría indicando que la presencia de anticuerpos anti-gangliósidos pueden provocar un re-arreglo de diversas moléculas y receptores en las membranas, que pueden señalizar por vías independientes (Fig. 31). Y nuestros resultados en particular demuestran que el gangliósido GD1a tiene como compañero molecular al receptor TNFR1a para transducir la señal inhibitoria del crecimiento neurítico mediada por los anticuerpos  $\alpha$ GD1a específicos y crosreactivos.**



**Figura 31: Esquema de las vías de señalización de los anticuerpos anti-gangliósidos que provocan inhibición de la regeneración axonal.**

Estos resultados sugieren que durante la etapa de recuperación clínica el efecto nocivo de los anticuerpos anti-gangliósidos sobre la reparación nerviosa involucra un evento de señalización celular específico diferente al mecanismo dependiente del sistema de complemento que predomina sobre la etapa del inicio

de los síntomas. Conociendo la asociación clínica entre la presencia de altos títulos de anticuerpos anti-gangliósidos durante las fases posteriores al pico de severidad y una recuperación incompleta o demorada en los pacientes con SGB y debido a que hasta el momento se desconocían los posibles compañeros moleculares de los gangliósidos en la membrana para iniciar la cascada de señalización inhibitoria de la regeneración axonal mediada por los anticuerpos anti-gangliósidos, confiamos en que nuestros resultados pueden tener una importante trascendencia en el contexto del SGB. Debido a que determinamos que TNFR1a actúa como molécula transductora de la señal inhibitoria de los anticuerpos  $\alpha$ GD1a específicos y que parte de la señal es mediada por proteínas G $\alpha$  de tipo inhibitorias, éstos hallazgos pueden servir para desarrollar futuras estrategias terapéuticas. Los procedimientos clínicos empleados en la actualidad para tratar los síntomas están orientados en disminuir los niveles de anticuerpos o a contrarrestar los efectos del sistema de complemento durante la etapa aguda de la patología <sup>92,93</sup>, por lo tanto conocer nuevas moléculas involucradas en la vía de señalización serviría para modular temporal y específicamente estas proteínas para mitigar los efectos negativos causados por los anticuerpos, de forma tal de promover una eficiente regeneración axonal en la etapa de recuperación de los pacientes.



# **Materiales y métodos**

### **Animales de experimentación**

Para el desarrollo de esta tesis se emplearon animales (de sexo indistinto) de las siguientes especies:

- Ratas Wistar de cepa salvaje
- Ratones C57BL/6 cepa salvaje
- Ratones C57BL/6 cepa mutante que carece de expresión de TNFRSF1a

Los bioterios que mantuvieron las colonias y proveyeron los animales fueron: el Instituto Mercedes y Martin Ferreyra (INIMEC-CONICET-UNC, Córdoba, Argentina), el Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC-CONICET-UNC, Córdoba, Argentina) y el bioterio del Bloomberg Research Building, de la Universidad Johns Hopkins (Baltimore, Maryland, EEUU).

En todos ellos, los animales fueron mantenidos en condiciones macroambientales controladas de temperatura a 23 °C y un ciclo periódico de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los animales recibieron agua y alimento *ad libitum*, en racks ventilados o jaulas a cielo abierto donde se realizaron las cruzas con el fin de obtener hembras preñadas para los experimentos.

Todos los procedimientos experimentales que involucraron el uso de animales en la presente tesis fueron aprobados y controlados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación de cada institución, siguiendo las normativas nacionales e internacionales.

Los experimentos para determinar la participación de las proteínas Gai2 en la vía de señalización inhibitoria de los anticuerpos anti-gangliosidos fueron realizados en cultivos primarios de rata Wistar cepa salvaje. En cambio los experimentos para determinar participación de TNFR1a como compañero molecular del gangliósido GD1a en la inhibición del crecimiento neurítico mediado por anticuerpos  $\alpha$ GD1a específicos o reactivos necesitaron de cultivos primarios de ratón. El motivo de este cambio en el uso de especies se debe a que el animal disponible con la mutación para no expresar el receptor TNFR1a estaba realizado en ratón, por lo que se requería trabajar en el mismo sistema para hacer nuestros resultados científicamente comparables.

### **Constructos genéticos**

#### ARN de interferencia.

Se empleó la metodología de shARN (del inglés “short hairping ARN”), ya que permite silenciar únicamente la expresión de la proteína de interés durante un prolongado periodo de tiempo, mediante la interferencia de un ARN de horquilla que lleva a la degradación del ARN mensajero con el cual hidroliza, por lo que la proteína no se llega a sintetizar y expresar.

Basándonos en secuencias previamente descritas y validadas por Mission Sigma, diseñamos secuencias cortas de shARN para insertar en un plásmido de expresión de todas las proteínas que encontramos de interés y que podrían estar involucradas en la vía de la inhibición de la regeneración axonal mediada por anticuerpos anti-gangliósidos

Las secuencias generadas consistieron en 21 nucleótidos de largo con una estructura de bucle en el medio y una cola repetida de adeninas:

- sh TNFR1a (Receptor del factor de necrosis tumoral 1<sup>a</sup>):

5`-AATTGGTTATCTTGCTAGGTCTTTGAGGCCTCAAAGACCTAGCAAGATAACCTTTTTTTAT-3`

- sh trap1 (proteína relacionada al receptor del factor de necrosis tumoral):

5`-AATTGCTGACAAGGTTGAAGTCTATAGGCCTATAGACTTCAACCTTGTCAGCTTTTTTTAT-3`

- sh Sgpl1 (esfingosina-fosfato liasa 1 )

5`- AATTGAAGGACTTCGAGCCTTATTTAGGCCTAAATAAGGCTCGAAGTCCTTCTTTTTTTAT-3`

-sh sgpR1 (receptor de Esfingosina-fosfato liasa 1 (Sgpl1))

5`- AATTGTCTCTGACTATGGGAACTATAGGCCTATAGTCCCATAGTCAGAGACTTTTTTTAT-3`

- sh NgR1 (receptor de Nogo)

5`-AATTGCACATCAATGACTCTCCATTAGGCCTAATGGAGAGTCATTGATGTGCTTTTTTTAT-3`

-sh PLA2 (fosfolipasa 2 A)

5`- AATTGCTGTTACGGCTGACGCATTAAGGCCTTAATGCGTCAGCCGTAACAGCTTTTTTTAT-3`

-sh IRR (receptor relacionado a Insulina)

5`- AATTGTGTATGAGACAGACTATTACAGGCCTGTAATAGTCTGTCTCATACACTTTTTTTAT-3`

Luego de diseñar cada shARN para las moléculas de interés, dichos oligómeros se mandaron a sintetizar en el Genetic Resources Core facility de la Universidad Johns Hopkins y mediante técnicas de ingeniería genética (cortes con enzimas de restricción y ligaciones) se procedió a introducir las secuencias en el plásmido transportador. Como vehículo para entregar el constructo en la célula se empleó el plásmido PLK0 3.G, que posee un sitio de resistencia a la ampicilina, un promotor U6 para ser leído por la polimerasa III y una secuencia para expresar la proteína verde fluorescente (GFP, para facilitar el seguimiento bajo microscopía de fluorescencia, de las neuronas que lo incorporaran). Estos plásmidos se amplificaron y se mandaron a secuenciar para verificar el inserto. La eficiencia de disminución de expresión fue corroborada por Western Blot en línea primaria de células de ovario de hámster (CHO).

También se emplearon otras técnicas de biología molecular estándar (transformación de bacterias, kits de purificación de ADN de Qiagen y Promega) para acceder a una calidad y concentración adecuadas del plásmido, antes de realizar los experimentos.

#### Plásmidos utilizados en el desarrollo de esta tesis:

##### Plásmidos conteniendo secuencias sin mutar del TNFR1a de ratón y humano.

El plásmido conteniendo la secuencia salvaje de TNFR1a de ratón y humano se adquirió de Sino Biological, cat # MG50496-ACG y cat #HG10872-ACG respectivamente, para realizar experimentos de recuperación de la función y el desarrollo de mutantes puntuales específicas.

##### G $\alpha$ i2 salvaje y su mutante insensible a toxina pertúsica

Se utilizaron secuencias salvaje o mutante de la subunidad alfa inhibitoria 2 de la proteína G heterotrimérica contenidos en el plásmido de Expresión pcDNA (UniProtKB - P08752). La secuencia mutante de la G $\alpha$ i2 la vuelve insensible al bloqueo de su actividad por parte de la toxina pertúsica, que normalmente ADP ribosila la subunidad previniendo su activación y posterior separación del complejo que forma con las subunidades beta y gamma. Éste plásmido fue generado y donado por el laboratorio del Dr Silvio Gutkind, University of California San Diego School of Medicine.

##### $\beta$ ark-ct

Se utilizó la secuencia del péptido secuestrador del complejo  $\beta\gamma$  de las proteínas G heterotriméricas derivado de la secuencia c-terminal de la quinasa del receptor  $\beta$ adrenérgico contenida en el vector de expresión  $\beta$ ark-ct. La sobreexpresión de este péptido previene la disociación de las subunidades del complejo, por lo tanto, la proteína G queda imposibilitada de señalar o activar las vías posteriores <sup>209</sup>. Éste plásmido carece de una secuencia marcadora (tag o molécula fluorescente), por lo que fue necesario co-electroporar al mismo tiempo con el plásmido Pmax (Lonza), que contiene la secuencia para la expresión de la molécula GFP utilizada como reportera.

##### Biosensores para FRET

Los biosensores de la actividad de las pequeñas GTPasas RhoA y Rac1, basados en la técnica de transferencia de resonancia de energía de Förster (FRET) fueron adquiridos en Addgene (RhoA cat. # 12150<sup>210</sup>) y el vector biosensor para RAC1 cat # 133262<sup>211</sup>.

Ambos biosensores son unimoleculares, es decir que en la misma secuencia se encuentra inserta la cadena proteica del donador y del aceptor.

En un estado inactivo la conformación tridimensional en ambos biosensores impide que haya transferencia de energía debido a la gran distancia entre los fluoróforos por ello la eficiencia de FRET en este estado es baja. Alta eficiencia de FRET es obtenida secundaria a la activación de la GTPasa, lo cual pone en proximidad al donador y aceptor.

RhoA es una proteína que se encuentra libre en el citosol, donde ejerce sus funciones, y el biosensor se comporta de manera semejante; no siendo así el biosensor de Rac1 el cual permanece anclado a la membrana celular, le impide la translocación y tampoco admite la unión a los RhoGDI. Se debe considerar estas particularidades al momento de analizar los resultados.

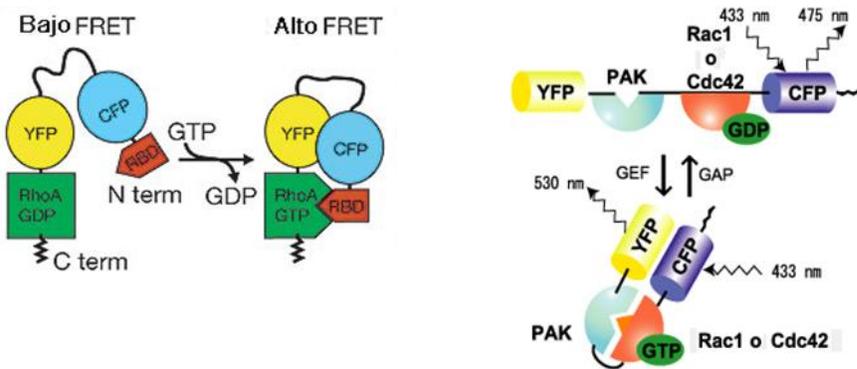


Figura 32: Esquema de los biosensores FRET RhoA y Rac1. diagramas modificados de Pertz et al., 2006 y Itoh et al., 2002.

### Desarrollo de mutantes puntuales del receptor TNFR1a

Se diseñaron secuencias con mutaciones puntuales de la región del tallo del receptor TNFR1a basados en un análisis *in silico* realizado en colaboración con el Dr. Mario Bianchet, especialista en biofísica de moléculas de la Universidad de Johns Hopkins.

Los oligómeros descritos llevan un único cambio de aminoácidos en la región del tallo de la secuencia salvaje del receptor (cerca a la membrana plasmática) y fueron sintetizados por la compañía Macrogen. Luego se procedió a realizar las mutaciones puntuales, siguiendo el protocolo del kit de mutagénesis dirigida "Quikchange" (Stratagene). La técnica de mutación puntual consiste en poner el plásmido estructural junto con los constructos de ADN simple cadena que conllevan las mutaciones y correr una PCR, cuyos ciclos permitirán crear vectores que lleven los cambios. Empleando el plásmido de Sino Biological con versión salvaje del TNFR1a como esqueleto principal, se cambiaron en la secuencia del

tallo ciertos aminoácidos que estaban conservados evolutivamente tanto en la especie humana como en ratones. Los cambios realizados fueron en el aspartato (D) de posición 165, bien cercano a la membrana; cuya carga natural es negativa y se lo cambió por una leucina (L) que es apolar. La segunda modificación puntual fue el cambio de la asparragina (N) que se encuentra en la posición 159 por histidina (H).

Los cebadores generados fueron los siguientes y sus complementos inversos.

Cambio de asparragina (N) en la posición 159 por histidina (H) – N159H:

5`CCTCCGCTTGACATGTCACAAACCCC - 3`;

Cambio de aspartato (D) en posición 165 por leucina (L) – D165L:

5`-GTCACAAACCCCAGCTCTCAGGTAGGTACTGCGGTG-3`;

Luego de la inserción de estas secuencias mutadas en un único aminoácido, se procedió mediante una digestión enzimática a eliminar las secuencias parentales quedándonos únicamente con las modificadas. Las mutaciones se confirmaron por secuenciación (Macrogen) y la funcionalidad del receptor en sus versiones mutantes se verificó mediante ensayos de muerte celular mediada por exposición a TNF $\alpha$ , que se describirá más adelante.

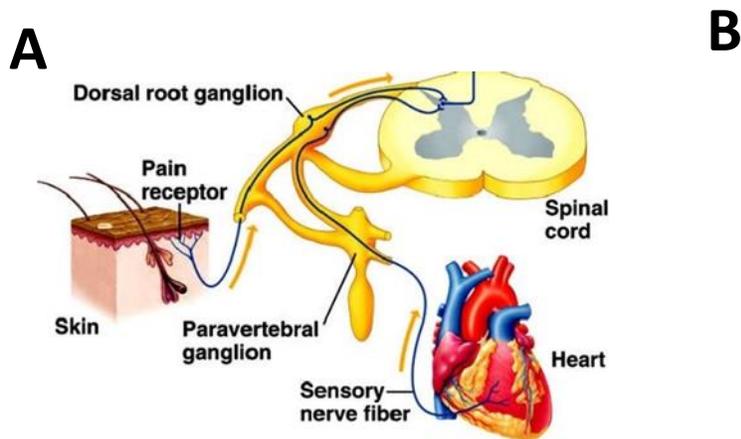
### **Cultivos celulares**

#### Cultivo primario de neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRGn)

Para el desarrollo del cultivo, las crías de entre 4 y 8 días, se sacrificaron por decapitación bajo campana de flujo laminar e inmediatamente se realizó una cirugía aséptica para aislar los ganglios de la raíz dorsal (DRG) utilizando una lupa estereoscópica (Figura 33). Los DRG se disgregaron mediante tratamiento enzimático en baño termostático a 37°C, agregando 1ml primero colagenasa tipo A (Sigma-Aldrich) al 0,2% en medio Hank`s 1X por 13 minutos y posteriormente se agregó 0,2ml tripsina (Gibco) por otros 25 minutos. A continuación, se añadió el mismo volumen de medio DMEM con SFB al 10% para bloquear las enzimas y se procedió a triturar mecánicamente el tejido mediante el pasaje de la solución conteniendo el tejido disgregado a través de puntas de pipeta de diámetros decrecientes (punta azul de 1000  $\mu$ l, luego punta amarilla de 200  $\mu$ l).

La suspensión celular se centrifugó a 100xg durante 1 minuto para sedimentar las células, que fueron luego resuspendidas en medio (DMEM 10%SFB) a 37°C las cuales fueron utilizadas para cultivo sin manipulación genética. En este punto del cultivo las células también pueden ser manipuladas genéticamente mediante la técnica de electroporación, la cual se explicará más adelante. Las células fueron pre-sembradas en una cápsula estéril de Petri de plástico de 35 mm durante 1 hora para favorecer

la adhesión de células gliales que comúnmente se aíslan durante el procedimiento, las cuales al dividirse rápidamente contaminan el cultivo primario específico de neuronas. Pasado este tiempo, se colectaron las células no adherentes mediante la rotación en ángulo de la placa, sedimentadas por centrifugación y posteriormente resuspendidas en medio de cultivo DMEM (Sigma) para luego ser sembradas a una baja densidad 25-30 células/mm<sup>2</sup> en cubre-objetos de vidrio de cultivo redondos estériles (12 mm; Marienfeld, Alemania) previamente dispuestos en el fondo de placas de cultivo de 24 pocillos descartables estériles (un vidrio/pocillo; Corning, Estados Unidos). Los vidrios fueron previamente tratados con soluciones de 1 mg/ml de poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) por 4 horas y 1 µg/ml de Laminina-1 de ratón (Sigma) por 1 hora. Luego de una hora de sembradas las células, se procedió al recambio de medio de cultivo compuesto de neurobasal suplementado con 2% B27, 1% glutaMAX, 1% de penicilina/estreptomicina para mantener el cultivo y 50 ng/ml de factor de crecimiento nervioso (NGF, 50 ng/ml, Alomone) para promover el crecimiento de neuritas. Los cultivos se mantuvieron en incubador a 37°C en una atmósfera saturada de humedad y 5% de CO<sub>2</sub> hasta su uso.



**Figura 33: Esquema de la localización de los ganglios de la raíz dorsal de un vertebrado y representación de un cultivo primario neuronal.** A) Diagrama que muestra la localización de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG), con una raíz ingresando por el asta a la médulaespinal y otra raíz inervando órganos blanco del organismo. B) Dibujo representativo de neuronas en cultivo “*in vitro*”.

#### Línea celular de ovario de Hámster chino (CHO)

Se empleó la línea CHO-K1 (una cepa salvaje y una cepa genéticamente modificada para sobre-expresar el gangliósido GD1a (estables para GalT2-clon seleccionado 2) donada gentilmente por el Dr. Daniotti. Las células fueron mantenidas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino suplementado con 1% de glutamax y 1% penicilina/estreptomicina. En el caso de realizar

ensayos de electroporación, las células fueron cosechadas mediante el tratamiento con tripsina 1X durante 60 segundos y posteriormente bloqueado el efecto de la enzima mediante el agregado de medio de crecimiento DEMEM con 10%SFB. Las células fueron sedimentadas mediante centrifugación y resuspendidas en solución de electroporación de acuerdo a lo descrito abajo.

### **Protocolo de electroporación celular**

Para realizar la electroporación de DRGn, una suspensión al menos 1 millón de células de células fueron sedimentadas por centrifugación y posteriormente resuspendidas en una solución (100µl) de electroporación comercialmente disponible Ingenio® (Mirus y el plásmido que contiene el ADN de interés, a una concentración de entre 0,3 a 2 µg (dependiendo de la eficiencia de cada constructo y siguiendo las instrucciones del fabricante). Las células fueron trasladadas a cubetas pequeñas de electroporación (tamaño. Modelo) compatibles con el equipo Nucleofector AMAXA® (kit Basic Neuron SCN Nucleofector® –Lonza). La electroporación se realizó utilizando el programa # 013 del software preinstalado en el equipo, el cual fue específicamente diseñado para neuronas DRG de rata. Rápidamente luego de la electroporación, se procedió a adicionar medio DMEM a 37° conteniendo 10% SFB y se continuó con el sembrado de las DRGn de acuerdo a los pasos descritos para un cultivo no electroporado

Dependiendo de la eficacia del plásmido empleado en cada experimento, se cultivaron las DRGn electroporadas durante 16 a 24 h para permitir la expresión apropiada del vector. Después de este tiempo, las células se levantaron mecánicamente (sin emplear tripsina) y se volvieron a sembrar (re-plaqueo) en cubreobjetos de vidrio recubiertos con poli-L –lisina y laminina de acuerdo a lo descrito anteriormente y cultivadas de acuerdo a las necesidades experimentales. El proceso de re-plaqueo es necesario para permitir que las neuronas vuelvan a extender neuritas, debido a que será en los conos de crecimiento donde se medirán los valores de FRET según los biosensores que se incorporen.

En el caso de electroporar las células de la línea celular CHO-K1, las mismas fueron procesadas de forma similar a la preparación de DRGn pero introduciendo las siguientes modificaciones: i) Se utilizaron 5 millones de células por electroporación, II) se utilizó una mezcla de soluciones no comerciales con la siguiente composición (describir), III) el equipo utilizado fue un ECM 600 de la empresa BTX, el cual fue utilizado con los siguientes parámetros, capacitancia: 950 faradios, resistencia:186 ohms y voltaje: 150 volts.

## Tratamientos

En relación a los tratamientos realizados en cultivos primarios de DRGn, las células fueron tratadas después de 3 a 5 horas posterior al sembrado para permitir una correcta adhesión de las mismas al sustrato y dar tiempo al comienzo de la elongación de neuritas. Se utilizaron tratamientos con diferentes anticuerpos anti-gangliósidos dependiendo del tipo de experimento y de la característica del anticuerpo (afinidad) a saber:

- Anti-GD1a-1 (100 µg/ml, Anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón adquirido por donación del Profesor Ronald Schnaar de la Universidad John Hopkins).
- Anti-GT1b-1 (100 µg/ml; Anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón adquirido por donación del Profesor Ronald Schnaar de la Universidad John Hopkins).
- Anti-GD1a/GT1b IgG2b, también llamado clon 1b7 (50 µg/ml). Anticuerpo monoclonal crosreactivo de ratón purificado del sobrenadante de hibridomas producidos en nuestro laboratorio. Verificado en estudios previos por su alta afinidad y capacidad de inhibir la regeneración axonal en experimentos *in vitro* e *in vivo*<sup>75,90,138</sup>.
- IgG de suero de ratón normal fue empleado como anticuerpo de control negativo (50 µg/ml, extraído y purificado en el laboratorio empleando ratones cepa salvaje).

En los experimentos donde se evaluó la participación de Gαi en la vía de señalización activada por anticuerpos anti-gangliósidos, los cultivos celulares se pre-incubaron con toxina pertúsica (Ptx) a 200 ng/ml durante 1 hora antes del tratamiento con anticuerpos anti-gangliósidos o IgG control. Dependiendo del paradigma experimental a utilizaren cada experimento, por ejemplo, medición del colapso del cono de crecimiento (CCG) o el crecimiento de neuritas, el período de exposición a los tratamientos fue diferente.

## Marcación celular por inmunofluorescencia

Después del tratamiento, los cultivos de neuronas DRG se fijaron usando paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA) y finalmente se lavaron 3 veces con PBS 1X por 5 minutos. Las células fijadas se incubaron durante 1 hora a TA con una solución de bloqueo preparada en PBS 1X, conteniendo suero normal de caballo 5% y 0,02% Tritón X-100.

Los anticuerpos primarios se agregaron en solución de bloqueo durante 1 -2 horas también a TA (ver tabla 5). Después de 3 lavados con PBS 1X a 4°C, se agregaron anticuerpos secundarios en PBS 1X solo, durante

otra hora a TA. Finalmente, los vidrios portaobjetos con células se montaron con Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich) en portaobjetos de vidrio para visualización por microscopía.

<u>Anticuerpo Primarios</u>	Especie	Compañía	Dilución
anti-TUJ1(marcador de anti- $\beta$ -III-Tubulina)	ratón	Covance	1:2000
Acti-stain Faloidina 488 (marcador F-Actina)		Cytoskeleton	1:250
Acti-stain Faloidina 555 (marcador F-Actina)		Cytoskeleton	1:250
anti-GFP	ratón	Sigma-Aldrich	1:500
anti-TNFR1a	conejo	Proteintech	1:1000
Anti-caspasa 3 clivada	conejo	Proteintech	1:1000
<u>Anticuerpos Secundarios</u>			
Alexa Fluor® 350 conjugate anti-mouse	conejo	Invitrogen	1:1000
Alexa Fluor® 488 conjugate anti-mouse	conejo	Invitrogen	1:1000
Alexa Fluor® 546 conjugate anti-mouse	conejo	Invitrogen	1:1000
Alexa Fluor® 488 conjugate anti-rabbit	cabra	Invitrogen	1:1000
Alexa Fluor® 546 conjugate anti-rabbit	cabra	Invitrogen	1:1000
Cy3- anti-mouse	cabra	JIL	1:1000

**Tabla 5: Anticuerpos empleados en diferentes experimentos de esta tesis doctoral.**

### **Transferencia de energía de resonancia Förster (FRET).**

Para poder detectar la actividad temporo-espacial de GTPasas pequeñas de la familia Rho (RhoA y Rac1) durante la exposición de las neuronas a los anticuerpos anti-gangliósidos, usamos cultivos de DRGn disociadas de rata las cuales electroporamos con los biosensores basados en FRET descritos anteriormente. Las células se cultivaron durante 16 a 24 horas para permitir la correcta expresión del plásmido y luego se levantaron y sembraron en nuevos cubreobjetos con poli-lisina/laminina de acuerdo a lo mencionado anteriormente). Se esperaron 5 horas para que las neuronas desarrollaran conos de crecimiento, previo al tratamiento con IgG control o anticuerpos anti-gangliósidos durante diferentes períodos de tiempo (según el experimento). Luego fueron fijadas con PFA al 4% y montadas con Mowiol 488 en portaobjetos de vidrio. Utilizando un objetivo de inmersión de 60 x / 1.42 NA en el microscopio Spinning Disk Olympus DSU, se visualizaron y se obtuvieron imágenes de células que expresaban correctamente el biosensor.

Para la determinación de la eficiencia de FRET se realizó adquiriendo dos imágenes simultáneas de cada célula, siendo la primera imagen excitando con una intensidad de laser de frecuencia entre 433-495nm a la molécula donador (CFP) en la primera imagen, generando la imagen “canal del donador” y la segunda imagen dada por la emisión de la molécula aceptora (YFP) que emitirá en una frecuencia entre 535-565nm. Estas imágenes se emplearon para el cálculo del mapa de eficiencia de FRET radiométrico, dividiendo el canal de FRET por el Canal del Donador. Las imágenes se analizaron posteriormente mediante el uso del software Fiji se usó para realizar éste análisis de las imágenes, sustrayendo en primer lugar el fondo que hiciera ruido con la señal. La imagen FRET, fue creada para generar una máscara binaria con un valor de cero fuera de la celda y un valor de uno dentro de la celda. Después de la multiplicación por esta máscara, la imagen YFP se dividió por la imagen CFP para producir un mapa FRET de activación del biosensor de RhoA o de Rac1 en el cono de crecimiento<sup>90</sup>.

#### **Análisis de la morfología del cono de crecimiento.**

Después de 4-5 horas posterior a ser sembradas, las DRGn disociadas comienzan a extender neuritas con conos de crecimiento como estructura principal para censar el medio ambiente. Pasado este tiempo se trata las células durante 90 minutos con anticuerpos anti-gangliósidos o IgG control. Luego de los tratamientos, las células se fijaron con PFA 4% y se procedió a marcarlas por inmunofluorescencia. Se emplearon anticuerpos específicos para marcar el citoesqueleto de actina y tubulina de los conos de crecimiento de las neuronas y empleando fluoroforos diferentes para cada componente para poder discernirlos. Se tomaron 2 imágenes por cada célula en el microscopio de epifluorescencia con magnificación de 60X, una para cada fluoroforo marcando cada componente del citoesqueleto y se procedió a analizarlas con el software Fiji.

La evaluación morfométrica consistió en medir el área de lamela de todos los conos de crecimiento que tuvieran cada una de las células a las cuales se les tomaron imágenes. El área de lamela se determinó de la siguiente manera: 1) se midió el área que comprendía el cono cuando se excitaba el fluoroforo del anticuerpo empleado para marcar los microtúbulos (beta-III-tubulina), 2) se midió el área que comprendía el cono cuando se excitaba el fluoroforo del anticuerpo empleado para marcar la actina y por último 3) se realizó la resta entre los datos obtenidos del área innumerada para actina - Área inmunomarcada de beta-III-tubulina. Este resultado nos indica exclusivamente el área que comprende la lamela de actina que protruye del centro del cono de crecimiento; estos valores serán los que compararemos en función de los tratamientos empleados. (Rozes et al, 2016; Laishram et al, 2009) (n = 40~60 conos por grupo).

### **Ensayo de crecimiento de neuritas.**

Después de 18 horas de cultivo bajo condiciones de tratamiento con anticuerpos anti-gangliósidos o control de IgG, se fijaron las DRGn y se las marcó con anticuerpo anti- $\beta$ 3-tubulina para obtener imágenes usando el microscopio de epifluorescencia con un aumento 20X.

Para empezar, se realizó una sola medición por neurona y para elegir la neurita ésta debía pasar el carácter de selección mínimo: la longitud debía exceder el diámetro del cuerpo celular. Una vez pasada esta clasificación, se eligió únicamente la neurita que tenía mayor longitud de entre todas las que tuviera cada neurona, para registrar ese dato utilizando el software Fiji, ImageJ ( $n \cong 30-50$  neuronas analizadas en cada tratamiento)

Las neuronas de animales de tipo salvaje se detectaron por técnica de inmunofluorescencia. Mientras tanto, en DRGn electroporadas aprovechamos la fluorescencia que aportaba el plásmido usado para captar las imágenes de esas neuronas y analizar el crecimiento de las neuritas.

### **Análisis de muerte celular**

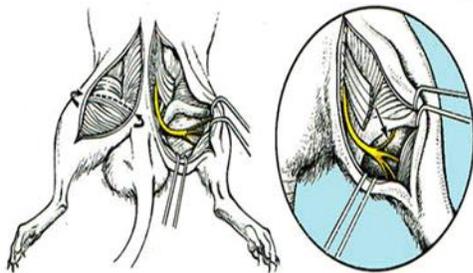
Empleando la línea celular CHO-K1, se armaron tres grupos experimentales de células electroporadas en cada réplica del experimento, las cuales llevan los plásmidos de TNFR1a cepa salvaje, TNFR1a mutante N159H y la mutante D165L. Se electroporaron 5 millones de células CHO-K1 en cada grupo, y posteriormente se sembraron las células dividiendo cada grupo en 2 cápsula de Petri de 60mm, que serían definidos como grupo control y grupo tratado con TNF $\alpha$ . A las 24 horas después de sembradas, se controló la eficiencia de electroporación mediante el seguimiento de la marca GFP que evidencia la presencia de cada plásmido (eficiencia de electroporación aproximada de 30%) y se procedió a realizar un tratamiento de 3 horas con TNF $\alpha$  [10 ng/ml]. Pasado este tiempo se fijó las células por 20 minutos con PFA 4% y se procedió a realizar una inmunomarcación con anticuerpos primarios anti-caspasa 3 clivada (proteína expresada en células en proceso de apoptosis) y con anti-GFP para incrementar la señal de expresión del plásmido.

El análisis de muerte celular inducida por TNF $\alpha$  se llevó a cabo midiendo la colocalización de la señal de caspasa 3 clivada y la marca GFP en esas células. La colocalización de dos marcadores puede definirse como una superposición en la distribución física de dichas moléculas en el volumen celular, donde pueden superponerse de manera total o parcial. Los pseudo-colores que se le otorgaron a las imágenes de microscópica de epifluorescencia obtenidas de estos cultivos se superpusieron para determinar y medir

el solapamiento de ambos en cada pixel que abarcara la célula. En este caso se marcó con rojo la caspasa y en verde se puede ver la marca del plásmido con secuencia GFP, observándose un color amarillo si hubo colocalización. Se empleó el coeficiente de correlación de Pearson para dar un valor a esa colocalización, las cuales fueron luego comparadas estadísticamente

### **Modelo de aplastamiento, contusión o lesión del nervio ciático.**

Se utilizaron ratones de 12 a 16 semanas de edad (cepa TNFR1a -/- o de cepa salvaje) en un modelo estandarizado de aplastamiento del nervio ciático del ratón<sup>74</sup>. Los animales empleados fueron comprados en “Jackson laboratory” y criados en las facilidades de la Universidad John Hopkins. El protocolo de experimentación empleado fue el N°: M0818M380. Las cirugías se llevaron a cabo en el mismo edificio donde se mantenían los animales para evitar mayor estrés por el transporte. Brevemente, se anestesió cada animal empleando una inyección intra-peritoneal de Xilacina [10 mg/kg] y Ketamina [100 mg/kg]. Se peló el área a trabajar con una máquina de afeitar eléctrica y se desinfectó con solución al 10% de iodo povidona. A continuación, se realizó una incisión sobre la pata izquierda empleando un bisturí plano, se usaron retractores para abrir la zona y visualizar las fascias musculares. Una vez separadas las mismas y localizado el nervio ciático, éste fue aplastado a 35 mm rostrales al dedo medio del pie durante 30 segundos con pinzas finas. Como se observa en la figura 34. Por último, se cerró la herida con aguja e hilo estériles, siempre manteniendo al animal bajo efectos de la anestesia<sup>75</sup>.



**Figura 34: Esquema del modelo de contusión del nervio ciático.** Diagrama modificado de XXX, donde se observa el corte realizado en la pierna del animal y la posterior exposición del nervio ciático (en amarillo), para acceder a él con pinzas y proceder a aplastarlo por 30 segundos a la altura en donde el nervio se ramifica.

La fecha de la cirugía se anotó como día 0 del experimento, donde el animal recibió analgesia (bupigacaina, []) y se lo separó en caja individual para su recuperación y apropiado control. Los animales de cada cepa

fueron separados en dos grupos; el grupo control que fue inmunizado pasivamente con IgG 2b control (n = 4) y el grupo tratamiento que fue inmunizado pasivamente con el anticuerpo anti-GD1a/GT1b (n = 4 animales). Los animales fueron inyectados intraperitonealmente con 0.5mg Acs/dosis, recibiendo una dosis a los días 1, 3 y 7 postcirugía. A los 15 días postcirugía los animales fueron sacrificados y fijados por perfusión intracardiaca con PFA 4%, procediendo luego a cosechar los nervios ciáticos, los cuales fueron montados en bloques de plástico Epon y posteriormente cortados en secciones de 1  $\mu\text{m}$  con ultramicrotomo. Los cortes teñidos con azul de toluidina para visualizar las estructuras fueron fotografiados con microscopio de campo claro (20X) para realizar estudios morfométricos. El análisis se realizó en FIJI midiendo el número en activa regeneración de terminado como el número de axones mielinizados dentro del nervio ciático.

### **Análisis estadístico**

Se realizó una comparación estadística de todos los datos en cada experimento, utilizando paquetes estadísticos estándar del programa GraphPad PRISM7. Los datos se sometieron a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks para determinar el tipo de análisis a emplear. En caso de pasar la prueba de normalidad se emplearon los siguientes análisis: prueba de t Student y el análisis de varianza de una vía o dos vías (ANOVA). En caso de no pasar la prueba de normalidad el análisis empleado fue Kruskal Wallis de tipo no-paramétrico, para determinar la significancia de nuestra hipótesis. Posteriormente se realizaron análisis post-hoc de Tukey para evaluar las diferencias entre los grupos.

Los valores se expresaron como: Media  $\pm$  EEM de un mínimo de tres experimentos independientes. Las diferencias se consideraron significativas cuando la comparación de las medias mostró un  $p < 0.05$ .

### **Instrumental, equipos, medios de cultivo y drogas farmacológicas:**

Todos los reactivos, suplementos y medios de cultivo utilizados se adquirieron estériles, en forma líquida o en polvo, a través de las compañías especificadas. Las soluciones preparadas en el laboratorio se esterilizaron por filtración utilizando filtros estériles con un diámetro de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore, Estados Unidos).

Tanto el material descartable (puntas de micropipeta, microtubos, tubos de centrifuga, etc.) como el de vidrio (cápsulas de Petri, vasos precipitados, botellas, probetas, pipetas Pasteur, etc.) fue esterilizado en

autoclave durante 1 hora a 120 °C y 1 atm de presión. Las pinzas y tijeras de cirugía se esterilizaron en etanol 70%.



# Referencias

1. Schnaar RL. Gangliosides of the Vertebrate Nervous System [Internet]. *Journal of Molecular Biology* Aug 14, 2016 p. 3325–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27261254>
2. Miljan, Erik A. and Bremer EG. Regulation of growth factor receptors by glycosphingolipids. *Glycosignals Cancer Mech Malig Phenotypes*. 2016;(November):77–93.
3. Schnaar RL, Lopez PHH. Preface and Ganglioside Nomenclature. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2018;156:xvii–xxi.
4. Svennerholm L. Designation and Schematic Structure of Gangliosides and Allied Glycosphingolipids. In: *Progress in brain research* [Internet]. 1994 [cited 2018 Feb 17]. p. xi–xiv. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8029441>
5. Lopez PHHH, Báez BB. Gangliosides in Axon Stability and Regeneration. *Prog Mol Biol Transl Sci* [Internet]. 2018 [cited 2019 Sep 20];156:383–412. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877117318300516>
6. Furukawa K, Ohmi Y, Ohkawa Y, Tajima O, Furukawa K. Glycosphingolipids in the regulation of the nervous system. *Adv Neurobiol* [Internet]. 2014 [cited 2021 Oct 31];9:307–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25151385/>
7. Ogawa-Goto K, Funamoto N, Abe T, Nagashima K. Different ceramide compositions of gangliosides between human motor and sensory nerves. *J Neurochem* [Internet]. 1990 Nov [cited 2018 Feb 24];55(5):1486–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2213006>
8. Gong Y, Tagawa Y, Lunn MPT, Laroy W, Heffer-Lauc M, Li CY, et al. Localization of major gangliosides in the PNS: implications for immune neuropathies. *Brain* [Internet]. 2002 Nov [cited 2018 Feb 17];125(Pt 11):2491–506. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12390975>
9. Higuchi H, Yamashita T, Yoshikawa H, Tohyama M. PKA phosphorylates the p75 receptor and regulates its localization to lipid rafts. *EMBO J* [Internet]. 2003 Apr 15 [cited 2018 Feb 19];22(8):1790–800. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12682012>
10. Sonnino S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A. Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology* [Internet]. 2007 Jan 1 [cited 2018 Feb 19];17(1):1R–13R. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16982663>
11. Vinson M, Rausch O, Maycox PR, Prinjha RK, Chapman D, Morrow R, et al. Lipid rafts mediate the interaction between myelin-associated glycoprotein (MAG) on myelin and MAG-receptors on neurons. *Mol Cell Neurosci* [Internet]. 2003 Mar 1 [cited 2018 Feb 19];22(3):344–52. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044743102000313>
12. Fujitani M, Kawai H, Proia RL, Kashiwagi A, Yasuda H, Yamashita T. Binding of soluble myelin-associated glycoprotein to specific gangliosides induces the association of p75NTR to lipid rafts and signal transduction. *J Neurochem*. 2005;
13. Murozuka Y, Watanabe N, Hatanaka K, Hakomori S itiroh. Lyso-GM3, its dimer, and multimer: their synthesis, and their effect on epidermal growth factor-induced receptor tyrosine kinase [Internet]. Vol.

- 1780, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. NIH Public Access; 2008 [cited 2018 Feb 24]. p. 421–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17991443>
14. Sonnino S, E C, S G, L M, S P, A P. Gangliosides in Membrane Organization. *Prog Mol Biol Transl Sci* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2021 Oct 23];156:83–120. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29747825/>
  15. Krengel U, Bousquet PA. Molecular recognition of gangliosides and their potential for cancer immunotherapies. *Front Immunol*. 2014;5(JUL):325.
  16. Kim SJ, Chung TW, Choi HJ, Jin UH, Ha KT, Lee YC, et al. Monosialic ganglioside GM3 specifically suppresses the monocyte adhesion to endothelial cells for inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2014 Jan [cited 2021 Dec 6];46(1):32–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24120649/>
  17. Schnaar RL, Lopez PHH. Myelin-associated glycoprotein and its axonal receptors. *J Neurosci Res*. 2009 Nov;87(15):3267–76.
  18. Kabayama K, Sato T, Saito K, Loberto N, Prinetti A, Sonnino S, et al. Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(34):13678–83.
  19. Yuki N. Guillain-Barré syndrome and anti-ganglioside antibodies: a clinician-scientist's journey. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* [Internet]. 2012 Jul [cited 2021 Dec 2];88(7):299–326. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22850724/>
  20. Regina Todeschini A, Hakomori S itiroh. Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2008 Mar [cited 2022 Jan 5];1780(3):421–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17991443/>
  21. Yamashita T, Wada R, Sasaki T, Deng C, Bierfreund U, Sandhoff K, et al. A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1999 Aug 3 [cited 2018 Feb 19];96(16):9142–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10430909>
  22. Schnaar RL, Lopez PHH. Gangliosides in health and disease.
  23. Daniotti JL, Vilcaes AA, Demichelis VT, Ruggiero FM, Rodriguez-Walker M. Glycosylation of glycolipids in cancer: Basis for development of novel therapeutic approaches. *Front Oncol*. 2013;3 DEC:306.
  24. Daniotti JL, Lardone RD, Vilcaes AA. Dysregulated expression of glycolipids in tumor cells: From Negative Modulator of Anti-tumor Immunity to Promising Targets for Developing Therapeutic Agents. *Front Oncol*. 2016;5(JAN):300.
  25. Carmona-Torre F, Yuste JR, Del Pozo JL. Cólera y otras infecciones del género *Vibrio*. *Medicine (Baltimore)*. 2018;12(50):2952–62.
  26. Masco D, Van de Walle M, Spiegel S. Interaction of ganglioside GM1 with the B subunit of cholera toxin modulates growth and differentiation of neuroblastoma N18 cells. *J Neurosci* [Internet]. 1991 Aug [cited 2018 Feb 20];11(8):2443–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1651376>

27. Singh AK, Harrison SH, Schoeniger JS. Gangliosides as receptors for biological toxins: Development of sensitive fluoroimmunoassays using ganglioside-bearing liposomes. *Anal Chem*. 2000;72(24):6019–24.
28. Ångström J, Teneberg S, Karlsson KA. Delineation and comparison of ganglioside-binding epitopes for the toxins of *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, and *Clostridium tetani*: Evidence for overlapping epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(25):11859–63.
29. Benson MA, Fus Z, Kims JJP, Baldwin MR. Unique ganglioside recognition strategies for clostridial neurotoxins. *J Biol Chem* [Internet]. 2011 Oct 30 [cited 2022 Jan 18];286(39):34015–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21849494/>
30. Stenmark P, Dupuy J, Imamura A, Kiso M, Stevens RC. Crystal Structure of Botulinum Neurotoxin Type A in Complex with the Cell Surface Co-Receptor GT1b—Insight into the Toxin–Neuron Interaction. *PLOS Pathog* [Internet]. 2008 Aug [cited 2022 Jan 18];4(8):e1000129. Available from: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000129>
31. Hannila SS, Siddiq MM, Filbin MT. Therapeutic Approaches to Promoting Axonal Regeneration in the Adult Mammalian Spinal Cord. *Int Rev Neurobiol*. 2007;77(6):57–105.
32. Lopez PHH. Role of myelin-associated glycoprotein (siglec-4a) in the nervous system. *Adv Neurobiol* [Internet]. 2014 [cited 2018 Feb 17];9:245–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25151382>
33. Lopez PHH, Ahmad AS, Mehta NR, Toner M, Rowland EA, Zhang J, et al. Myelin-associated glycoprotein protects neurons from excitotoxicity. *J Neurochem*. 2011 Mar;116(5):900–8.
34. Palandri A, Salvador VR, Wojnacki J, Vivinetto AL, Schnaar RL, Lopez PHH. Myelin-associated glycoprotein modulates apoptosis of motoneurons during early postnatal development via NgR/p75NTR receptor-mediated activation of RhoA signaling pathways. *Cell Death Dis* [Internet]. 2015 Sep 3 [cited 2018 Feb 17];6(9):e1876–e1876. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26335717>
35. Mehta NR, Nguyen T, Bullen JW, Griffin JW, Schnaar RL. Myelin-Associated Glycoprotein (MAG) Protects Neurons from Acute Toxicity Using a Ganglioside-Dependent Mechanism. *ACS Chem Neurosci* [Internet]. 2010 Mar 17 [cited 2018 Feb 19];1(3):215–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20436925>
36. Filbin MT. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2003 [cited 2022 Jan 8];4(9):703–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12951563/>
37. Cai D, Yingjing S, De Bellard ME, Tang S, Filbin MT. Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. *Neuron*. 1999;22(1):89–101.
38. Tang S, Shen YJ, DeBellard ME, Mukhopadhyay G, Salzer JL, Crocker PR, et al. Myelin-associated glycoprotein interacts with neurons via a sialic acid binding site at ARG118 and a distinct neurite inhibition site. *J Cell Biol* [Internet]. 1997 Sep 22 [cited 2018 Feb 19];138(6):1355–66. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9298990>
39. Mehta NR, Lopez PHH, Vyas AA, Schnaar RL. Gangliosides and Nogo receptors independently mediate myelin-associated glycoprotein inhibition of neurite outgrowth in different nerve cells. *J Biol Chem*. 2007;
  40. Schnaar RL, Lopez PHH. Myelin-associated glycoprotein and its axonal receptors. *J Neurosci Res* [Internet]. 2009 Nov 15 [cited 2020 Apr 14];87(15):3267–76. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jnr.21992>
  41. Domeniconi M, Zampieri N, Spencer T, Hilaire M, Mellado W, Chao M V., et al. MAG Induces Regulated Intramembrane Proteolysis of the p75 Neurotrophin Receptor to Inhibit Neurite Outgrowth. *Neuron* [Internet]. 2005 Jun 16 [cited 2018 Feb 19];46(6):849–55. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627305004769>
  42. Yamashita T, Higuchi H, Tohyama M. The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. *J Cell Biol*. 2002;
  43. Venkatesh K, Chivatakarn O, Lee H, Joshi PS, Kantor DB, Newman BA, et al. The Nogo-66 Receptor Homolog NgR2 Is a Sialic Acid-Dependent Receptor Selective for Myelin-Associated Glycoprotein. *J Neurosci* [Internet]. 2005 Jan 26 [cited 2018 Feb 19];25(4):808–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15673660>
  44. Venkatesh K, Chivatakarn O, Sheu S-S, Giger RJ. Molecular dissection of the myelin-associated glycoprotein receptor complex reveals cell type-specific mechanisms for neurite outgrowth inhibition. *J Cell Biol* [Internet]. 2007 May 7 [cited 2018 Feb 17];177(3):393–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17470639>
  45. Yamashita T, Tucker KL, Barde YA. Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron*. 1999;24(3):585–93.
  46. Yamashita T, Tohyama M. The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci* [Internet]. 2003 May 14 [cited 2018 Feb 17];6(5):461–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12692556>
  47. Sheikh KA. Autoantibodies activate small GTPase RhoA to modulate neurite outgrowth. *Small GTPases*. 2011;2(4):233–8.
  48. van Doorn PA, Ruts L, Jacobs BC. Clinical features, pathogenesis, and treatment of Guillain-Barré syndrome [Internet]. Vol. 7, *The Lancet Neurology*. 2008 [cited 2020 Mar 10]. p. 939–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18848313>
  49. Yuki N, Hartung H-P. Guillain-Barré Syndrome. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Jun 14 [cited 2018 Feb 17];366(24):2294–304. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22694000>
  50. Willison H, Jacobs B, van Doorn P. Guillain-Barré syndrome. *Lancet*. 2016;388(10045):717–27.
  51. Nayak R. Practical approach to the patient with acute neuromuscular weakness. *World J Vlinical Cases*. 2017;9(9):270–9.
  52. Willison HJ. The immunobiology of Guillain-Barré syndromes. In: *Journal of the Peripheral Nervous System*.

2005. p. 94–112.
53. Yu RK, Usuki S, Ariga T. Ganglioside Molecular Mimicry and Its Pathological Roles in Guillain-Barré Syndrome and Related Diseases. *Infect Immun* [Internet]. 2006 [cited 2018 Feb 14];74(12):6517–27. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1698092/pdf/0967-06.pdf>
  54. Doets A., C V, B van den B, T H, DR C, HJ W, et al. Regional variation of Guillain-Barré syndrome. *Brain* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2021 Oct 1];141(10):2866–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30247567/>
  55. Capasso A, Ompad DC, Vieira DL, Wilder-Smith A, Tozan Y. Incidence of Guillain-Barré Syndrome (GBS) in Latin America and the Caribbean before and during the 2015–2016 Zika virus epidemic: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2019 [cited 2022 Feb 10];13(8):e0007622. Available from: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007622>
  56. Van Den Berg B, Walgaard C, Drenthen J, Fokke C, Jacobs BC, Van Doorn PA. Guillain-Barré syndrome: Pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. *Nature Reviews Neurology*. 2014.
  57. Willison HJ, Jacobs BC, van Doorn PA. Guillain-Barré syndrome. *Lancet* [Internet]. 2016 Aug 13 [cited 2022 Jan 25];388(10045):717–27. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673616003391/fulltext>
  58. Yuki N, Suzuki K. Guillain-Barré syndrome and anti-ganglioside antibodies: a clinician-scientist's journey. *Proc Japan Acad Ser B*. 2012 Jul 25;88(7):299–326.
  59. Lopez PH, Zhang G, Zhang J, Lehmann HC, Griffin JW, Schnaar RL, et al. Passive transfer of IgG anti-GM1 antibodies impairs peripheral nerve repair. *J Neurosci*. 2010 Jul;30(28):9533–41.
  60. Jacobs B, PH R, FG van der M, P H, PI S, MA de K, et al. The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barré syndrome: a case-control study. *Neurology* [Internet]. 1998 [cited 2021 Oct 1];51(4):1110–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9781538/>
  61. Yamana M, M K, Y F, K Y, K T, S K. Guillain-Barré syndrome and related diseases after influenza virus infection. *Neurol Neuroimmunol neuroinflammation* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2021 Oct 1];6(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31355311/>
  62. Shahrizaila N, Lehmann HC, Kuwabara S. Guillain-Barré syndrome. *Lancet*. 2021;397(10280):1214–28.
  63. Hao Y, Wang W, Jacobs BC, Qiao B, Chen M, Liu D, et al. Antecedent infections in Guillain-Barré syndrome: a single-center, prospective study. *Ann Clin Transl Neurol* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2021 Oct 1];6(12):2510. Available from: [/pmc/articles/PMC6917331/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6917331/)
  64. Yuki N, Yoshino H, Sato S, Miyatake T. Acute axonal polyneuropathy associated with anti-GM1 antibodies following *Campylobacter* enteritis. *Neurology* [Internet]. 1990 [cited 2021 Oct 1];40(12):1900–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2247243/>
  65. Uncini A. Guillain-Barré syndrome: What have we learnt during one century? A personal historical perspective. *Revue Neurologique*. 2016.

66. Griffin JW, Li CY, Ho TW, Tian M, Gao CY, Xue P, et al. Pathology of the motor-sensory axonal Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* [Internet]. 1996 Jan 1 [cited 2021 Oct 31];39(1):17–28. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ana.410390105>
67. Yuki N, Kuwabara S. Axonal Guillain-Barré syndrome: carbohydrate mimicry and pathophysiology. *J Peripher Nerv Syst* [Internet]. 2007 Dec 1 [cited 2019 Sep 19];12(4):238–49. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1529-8027.2007.00153.x>
68. Willison HJ. The immunobiology of Guillain-Barre syndromes. *J Peripher Nerv Syst* [Internet]. 2005 Jun [cited 2019 Sep 19];10(2):94–112. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15958123>
69. Susuki K, Rasband MN, Tohyama K, Koibuchi K, Okamoto S, Funakoshi K, et al. Anti-GM1 antibodies cause complement-mediated disruption of sodium channel clusters in peripheral motor nerve fibers. *J Neurosci*. 2007;27(15):3956–67.
70. Kokubun N, Shahrizaila N, Koga M, Hirata K, Yuki N. The demyelination neurophysiological criteria can be misleading in *Campylobacter jejuni*-related Guillain-Barré syndrome. *Clin Neurophysiol* [Internet]. 2013 Aug [cited 2021 Oct 1];124(8):1671–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23514735/>
71. Kuwabara S. Guillain-Barré Syndrome Epidemiology , Pathophysiology and Management. 2004;64(5):1–14.
72. Kuwabara S, Yuki N. Axonal Guillain-Barré syndrome: concepts and controversies. *Lancet Neurol* [Internet]. 2013 Dec 1 [cited 2018 Apr 4];12(12):1180–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24229616>
73. Susuki K. Node of ranvier disruption as a cause of neurological diseases. *ASN Neuro*. 2013;5(3):209–19.
74. Lopez PH, Zhang G, Zhang J, Lehmann HC, John W, Schnaar RL, et al. Passive transfer of IgG anti-GM1 antibodies impairs peripheral nerve repair. 2010;30(28):9533–41.
75. Lehmann HC, Lopez PHH, Zhang G, Ngyuen T, Zhang J, Kieseier BC, et al. Passive immunization with anti-ganglioside antibodies directly inhibits axon regeneration in an animal model. *J Neurosci*. 2007 Jan 3;27(1):27–34.
76. Kaida K, Ariga T, Yu RK. Antiganglioside antibodies and their pathophysiological effects on Guillain-Barré syndrome and related disorders - A review. *Glycobiology*. 2009;19(7):676–92.
77. Feldman EL, Hughes RAC, Willison HJ. Progress in inflammatory neuropathy- the legacy of Dr Jack Griffin. *Nature Reviews Neurology*. 2015.
78. Kaida K, Morita D, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, et al. Anti-ganglioside complex antibodies associated with severe disability in GBS. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2007 Jan [cited 2019 Sep 19];182(1–2):212–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17113161>
79. Ogawa G, Kaida K, Kuwahara M, Kimura F, Kamakura K, Kusunoki S. An antibody to the GM1/GalNAc-GD1a complex correlates with development of pure motor Guillain-Barré syndrome with reversible conduction failure. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2013 Jan 15 [cited 2021 Oct 10];254(1):141–5. Available from: <http://www.jni-journal.com/article/S0165572812002780/fulltext>

80. Willison HJ, Yuki N. Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. *Brain* [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2019 Sep 19];125(12):2591–625. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/awf272>
81. Lardone RD, Yuki N, Odaka M, Daniotti JL, Irazoqui FJ, Nores GA. Anti-GM1 IgG antibodies in Guillain-Barre syndrome: fine specificity is associated with disease severity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2010 Jun 1 [cited 2018 Apr 10];81(6):629–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19965859>
82. Lopez PHH, Zhang G, Bianchet MA, Schnaar RL, Sheikh KA. Structural requirements of anti-GD1a antibodies determine their target specificity. *Brain*. 2008;
83. Leonhard SE, Mandarakas MR, Gondim FAA, Bateman K, Ferreira MLB, Cornblath DR, et al. Diagnosis and management of Guillain-Barré syndrome in ten steps. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2019;15(11):671–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41582-019-0250-9>
84. Liu S, Dong C, Ubogu EE. Immunotherapy of Guillain-Barré syndrome. *Hum Vaccin Immunother* [Internet]. 2018 Nov 2 [cited 2020 Apr 14];14(11):2568–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29953326>
85. Funes SC, Chiari ME, Comín R, Irazoqui FJ, Nores GA. Experimental Guillain-Barre syndrome induced by immunization with gangliosides: Keyhole limpet hemocyanin is required for disease triggering. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2017 Jun [cited 2018 Apr 10];1863(6):1473–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28188832>
86. Yuki N, Yamada M, Koga M, Odaka M, Susuki K, Tagawa Y, et al. Animal model of axonal Guillain-Barré syndrome induced by sensitization with GM1 ganglioside. *Ann Neurol* [Internet]. 2001 Jun [cited 2018 Feb 19];49(6):712–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11409422>
87. Kusunoki S, Shimizu J, Chiba A, Ugawa Y, Hitoshi S, Kanazawa I. Experimental sensory neuropathy induced by sensitization with ganglioside GD1b. *Ann Neurol* [Internet]. 1996 Apr 1 [cited 2021 Dec 9];39(4):424–31. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ana.410390404>
88. Kusunoki S, Mashiko H, Mochizuki N, Chiba A, Arita M, Hitoshi S, et al. BINDING OF ANTIBODIES AGAINST GM1 AND GD1b IN HUMAN PERIPHERAL NERVE. *Muscle Nerve*. 1997;(July):840–5.
89. Susuki K, Nishimoto Y, Yamada M, Baba M, Ueda S, Hirata K, et al. Acute motor axonal neuropathy rabbit model: immune attack on nerve root axons. *Ann Neurol* [Internet]. 2003 Sep [cited 2018 Feb 19];54(3):383–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ana.33333>
90. Rozés Salvador V, Heredia F, Berardo A, Palandri A, Wojnacki J, Vivinetto AL, et al. 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. *Exp Neurol*. 2016;278:42–53.
91. Goodfellow JA, Bowes T, Sheikh K, Odaka M, Halstead SK, Humphreys PD, et al. Overexpression of GD1a Ganglioside Sensitizes Motor Nerve Terminals to Anti-GD1a Antibody-Mediated Injury in a Model of Acute

- Motor Axonal Neuropathy. *J Neurosci* [Internet]. 2005 Feb 16 [cited 2022 Jan 22];25(7):1620. Available from: [/pmc/articles/PMC6725939/](#)
92. Halstead SK, Zitman FMP, Humphreys PD, Greenshields K, Verschuuren JJ, Jacobs BC, et al. Eculizumab prevents anti-ganglioside antibody-mediated neuropathy in a murine model. *Brain* [Internet]. 2008 [cited 2021 Oct 31];131:1197-1208. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article/131/5/1197/421462>
  93. Misawa S, Kuwabara S, Sato Y, Yamaguchi N, Nagashima K, Katayama K, et al. Safety and efficacy of eculizumab in Guillain-Barré syndrome: a multicentre, double-blind, randomised phase 2 trial. *Lancet Neurol*. 2018;17(6):519-29.
  94. Davidson AI, Halstead SK, Goodfellow JA, Chavada G, Mallik A, Overell J, et al. Inhibition of complement in Guillain-Barré syndrome: the ICA-GBS study. *J Peripher Nerv Syst*. 2017;22(1):4-12.
  95. Lehmann HC, Lopez PHH, Zhang G, Ngyuen T, Zhang J, Kieseier BC, et al. Passive Immunization with Anti-Ganglioside Antibodies Directly Inhibits Axon Regeneration in an Animal Model. *J Neurosci* [Internet]. 2007 Jan 3 [cited 2018 Feb 17];27(1):27-34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17202469>
  96. Yiu G, He Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nature Reviews Neuroscience*. 2006.
  97. Deng H, Yang X, Jin T, Wu J, Hu LS, Chang M, et al. The role of IL-12 and TNF- $\alpha$  in AIDP and AMAN. *Eur J Neurol*. 2008;15(10):1100-5.
  98. Radhakrishnan V V., Sumi MG, Reuben S, Mathai A, Nair MD. Serum tumour necrosis factor- $\alpha$  and soluble tumour necrosis factor receptors levels in patients with Guillain-Barre syndrome. *Acta Neurol Scand*. 2004;109(1):71-4.
  99. Ho TW, Willison HJ, Nachamkin I, Li CY, Veitch J, Ung H, et al. Anti-GD1a antibody is associated with axonal but not demyelinating forms of Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol*. 1999;45(2):168-73.
  100. Schäfer M, Fruttiger M, Montag D, Schachner M, Martini R. Disruption of the Gene for the Myelin-Associated Glycoprotein Improves Axonal Regrowth along Myelin in C57BL/Wlds Mice. *Neuron* [Internet]. 1996 Jun 1 [cited 2018 Feb 19];16(6):1107-13. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627300801373>
  101. Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. Wallerian degeneration : Gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2011;8(1):110. Available from: <http://www.jneuroinflammation.com/content/8/1/110>
  102. Sulaiman W, Gordon T. Neurobiology of Peripheral Nerve Injury, Regeneration, and Functional Recovery: From Bench Top Research to Bedside Application. *Ochsner J* [Internet]. 2013 [cited 2021 Dec 6];13(1):100. Available from: [/pmc/articles/PMC3603172/](#)
  103. Menorca RMG, Fussell TS, Elfar JC. Peripheral Nerve Trauma: Mechanisms of Injury and Recovery. *Hand Clin* [Internet]. 2013 Aug [cited 2021 Dec 6];29(3):317. Available from: [/pmc/articles/PMC4408553/](#)
  104. Loverde JR, Tolentino RE, Pfister BJ. Axon Stretch Growth: The Mechanotransduction of Neuronal Growth.

- JoVE (Journal Vis Exp [Internet]. 2011 Aug 10 [cited 2021 Oct 31];(54):e2753. Available from: <https://www.jove.com/es/v/2753/axon-stretch-growth-the-mechanotransduction-of-neuronal-growth>
105. Lowery LA, Van Vactor D. The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10:332–43.
  106. Hur E-M, Saijilafu, Zhou F-Q. Growing the growth cone: remodeling the cytoskeleton to promote axon regeneration. *Trends Neurosci* [Internet]. 2012 Mar [cited 2018 Feb 24];35(3):164–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22154154>
  107. Schaefer AW, Kabir N, Forscher P. Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones. *J Cell Biol* [Internet]. 2002;158(1):139–52. Available from: <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.200203038JCBArticle>
  108. Geraldo S, Gordon-Weeks PR. Cytoskeletal dynamics in growth-cone steering. *J Cell Sci.* 2009;122(20):3595–604.
  109. Dominguez R, Holmes KC. Actin structure and function. *Annu Rev Biophys* [Internet]. 2011 Jun 9 [cited 2021 Apr 10];40(1):169–86. Available from: </pmc/articles/PMC3130349/>
  110. Hoffmann B, Schäfer C. Filopodial focal complexes direct adhesion and force generation towards filopodia outgrowth. *Cell Adhes Migr* [Internet]. 2010 [cited 2022 Mar 30];4(2):190–3. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cam.4.2.10899>
  111. Coles CH, Bradke F. Coordinating Neuronal Actin-Microtubule Dynamics. *Curr Biol* [Internet]. 2015;25(15):R677–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.020>
  112. Hsieh SH-K, Ferraro GB, Fournier AE. Myelin-Associated Inhibitors Regulate Cofilin Phosphorylation and Neuronal Inhibition through LIM Kinase and Slingshot Phosphatase. *J Neurosci* [Internet]. 2006 Jan 18 [cited 2018 May 15];26(3):1006–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16421320>
  113. Tang BL. Inhibitors of neuronal regeneration: mediators and signaling mechanisms. *Neurochem Int* [Internet]. 2003 Feb 1 [cited 2018 Feb 19];42(3):189–203. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018602000943>
  114. Teng B, Lukasz A, Schiffer M. The ADF/cofilin-pathway and actin dynamics in podocyte injury. *Int J Cell Biol.* 2012;(January 2012).
  115. Conde C, Cáceres A. Microtubule assembly , organization and dynamics in axons and dendrites. 2009;10(MAy).
  116. Haga RB, Ridley AJ. Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. Vol. 7, *Small GTPases*. Taylor and Francis Inc.; 2016. p. 207–21.
  117. Hall A. Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans.* 2012;40(6):1378–82.
  118. Nobes CD, Hall A. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 1995;81(1):53–62.

119. Siderovski DP, Willard FS. The GAPs , GEFs , and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. 2005;51–66.
120. Martin K, Reimann A, Fritz RD, Ryu H, Jeon NL, Pertz O. Spatio-temporal co-ordination of RhoA, Rac1 and Cdc42 activation during prototypical edge protrusion and retraction dynamics. *Sci Reports* 2016 61 [Internet]. 2016 Feb 25 [cited 2021 Oct 23];6(1):1–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep21901>
121. Kunda P, Paglini G, Quiroga S, Kosik K, Cáceres A. Evidence for the Involvement of Tiam1 in Axon Formation. *J Neurosci* [Internet]. 2001 Apr 1 [cited 2021 Oct 13];21(7):2361–72. Available from: <https://www.jneurosci.org/content/21/7/2361>
122. Bosco EE, Mulloy JC, Zheng Y. Rac1 GTPase: A “Rac” of all trades. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Feb;66(3):370–4.
123. Aizawa H, Wakatsuki S, Ishii A, Moriyama K, Sasaki Y, Ohashi K, et al. Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nat Neurosci* [Internet]. 2001 Apr 1 [cited 2018 Feb 17];4(4):367–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11276226>
124. Nusser N, Gosmanova E, Zheng Y, Tigyi G. Nerve growth factor signals through TrkA, phosphatidylinositol 3-kinase, and Rac1 to inactivate RhoA during the initiation of neuronal differentiation of PC12 cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 Sep 27 [cited 2022 Jan 31];277(39):35840–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12133829/>
125. Oishi A, Makita N, Sato J, Iiri T. Regulation of RhoA signaling by the cAMP-dependent phosphorylation of RhoGDI $\alpha$ . *J Biol Chem* [Internet]. 2012;287(46):38705–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.401547>
126. Fujita Y, Yamashita T. Axon growth inhibition by RhoA/ROCK in the central nervous system. *Front Neurosci* [Internet]. 2014 Oct 22 [cited 2018 Feb 17];8:338. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25374504>
127. McKerracher L, Ferraro GB, Fournier AE. Rho signaling and axon regeneration. *Int Rev Neurobiol* [Internet]. 2012 [cited 2018 Feb 17];105:117–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23206598>
128. Fournier AE, Takizawa BT, Strittmatter SM. Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J Neurosci* [Internet]. 2003 Feb 15 [cited 2018 May 15];23(4):1416–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12598630>
129. van Nieuw Amerongen GP, Vermeer MA, van Hinsbergh VW. Role of RhoA and Rho kinase in lysophosphatidic acid-induced endothelial barrier dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2000 Dec [cited 2019 Apr 11];20(12):E127–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11116077>
130. Qiao J, Huang F, Lum H. PKA inhibits RhoA activation: A protection mechanism against endothelial barrier dysfunction. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2003;284(6 28-6):972–80.
131. Hasegawa Y. Promotion of Axon Regeneration by Myelin-Associated Glycoprotein and Nogo through

- Divergent Signals Downstream of Gi/G. *J Neurosci* [Internet]. 2004;24(30):6826–32. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.1856-04.2004>
132. Yamashita T, Higuchi H, Tohyama M. The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. *J Cell Biol* [Internet]. 2002 May 13 [cited 2018 Feb 19];157(4):565–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12011108>
  133. Charalampopoulos I, Vicario A, Padiaditakis I, Gravanis A, Simi A, Ibáñez CF. Genetic Dissection of Neurotrophin Signaling through the p75 Neurotrophin Receptor. 2012 [cited 2020 Jul 23]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2012.11.009>
  134. Lin Z, Tann JY, Goh ETH, Kelly C, Lim KB, Gao JF, et al. Structural basis of death domain signaling in the p75 neurotrophin receptor. *Elife* [Internet]. 2015 Dec 8 [cited 2020 Jul 21];4(December2015). Available from: </pmc/articles/PMC4739766/?report=abstract>
  135. Anastasia A, Barker PA, Chao M V., Hempstead BL. Detection of p75NTR trimers: Implications for receptor stoichiometry and activation. *J Neurosci*. 2015;35(34):11911–20.
  136. Yamashita T, Lee Tucker K, Barde Y-A. Neurotrophin Binding to the p75 Receptor Modulates Rho Activity and Axonal Outgrowth Motor neurons in the spinal cord, most sympathetic and sensory neurons in the peripheral nervous system. *Neuron*. 1999;24:585–93.
  137. Ibáñez CF, Simi A. p75 neurotrophin receptor signaling in nervous system injury and degeneration: paradox and opportunity. *Trends Neurosci*. 2012;35(7):431–40.
  138. Zhang G, Lehmann HC, Manoharan S, Hashmi M, Shim S, Ming G-L, et al. Anti-ganglioside antibody-mediated activation of RhoA induces inhibition of neurite outgrowth. *J Neurosci* [Internet]. 2011 Feb 2 [cited 2018 Feb 19];31(5):1664–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21289175>
  139. Shao Z, Browning JL, Lee X, Scott ML, Shulga-Morskaya S, Allaire N, et al. TAJ/TROY, an Orphan TNF Receptor Family Member, Binds Nogo-66 Receptor 1 and Regulates Axonal Regeneration. *Neuron* [Internet]. 2005 Feb [cited 2019 Jul 4];45(3):353–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627305000115>
  140. Oldham WM, Hamm HE. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 91 [Internet]. 2008 Jan [cited 2021 Dec 22];9(1):60–71. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrm2299>
  141. Sprang SR. Structures of heterotrimeric G proteins and their complexes. *Handb Cell Signaling*, 2/e. 2010;1:119–28.
  142. Syrovatkina V, Alegre KO, Dey R, Huang XY. Regulation, Signaling and Physiological Functions of G-proteins. *J Mol Biol* [Internet]. 2016 Sep 25 [cited 2021 Dec 22];428(19):3850. Available from: </pmc/articles/PMC5023507/>
  143. Chung YK, Wong YH. Re-examining the “Dissociation Model” of G protein activation from the perspective of Gβγ signaling. *FEBS J*. 2021 Apr 1;288(8):2490–501.

144. Gurevich V V., Gurevich E V. GPCR signaling regulation: The role of GRKs and arrestins. Vol. 10, *Frontiers in Pharmacology*. 2019.
145. Marty C, Ye RD. Heterotrimeric G protein signaling outside the realm of seven transmembrane domain receptors. *Mol Pharmacol*. 2010;78(1):12–8.
146. Depry C, Allen MD, Zhang J. Visualization of PKA activity in plasma membrane microdomains. *Mol Biosyst* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2021 Dec 10];7(1):52–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20838685/>
147. Rao VS, Srinivas K, Sujini GN, Kumar GNS. Protein-Protein Interaction Detection: Methods and Analysis. *Int J Proteomics*. 2014 Feb 17;2014:1–12.
148. Rodriguez. *Proteómica de expresión diferencial* en. 2010;395.
149. Shoemaker BA, Panchenko AR. Deciphering Protein–Protein Interactions. Part I. Experimental Techniques and Databases. *PLOS Comput Biol* [Internet]. 2007 Mar [cited 2021 Dec 27];3(3):e42. Available from: <https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.0030042>
150. Prendergast J, Umanah GKE, Yoo S-W, Lagerlof O, Motari MG, Cole RN, et al. Ganglioside Regulation of AMPA Receptor Trafficking. *J Neurosci* [Internet]. 2014 Sep 24 [cited 2019 Sep 19];34(39):13246–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25253868>
151. Sonnino S, Mauri L, Ciampa MG, Prinetti A. Gangliosides as regulators of cell signaling: ganglioside-protein interactions or ganglioside-driven membrane organization? *J Neurochem* [Internet]. 2013 Feb [cited 2018 Feb 17];124(4):432–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jnc.12088>
152. Rabin SJ, Bachis A, Mocchetti I. Gangliosides activate Trk receptors by inducing the release of neurotrophins. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 Dec 20 [cited 2018 Feb 17];277(51):49466–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12388556>
153. Chiricozzi E, Di Biase E, Maggioni M, Lunghi G, Fazzari M, Pomè DY, et al. GM1 promotes TrkA-mediated neuroblastoma cell differentiation by occupying a plasma membrane domain different from TrkA. *J Neurochem*. 2019;1–11.
154. Rabin SJ, Mocchetti I. GM1 ganglioside activates the high-affinity nerve growth factor receptor trkA. *J Neurochem* [Internet]. 1995 Jul [cited 2018 Feb 19];65(1):347–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7790879>
155. Pronker MF, Lemstra S, Snijder J, Heck AJR, Thies-Weesie DME, Pasterkamp RJ, et al. Structural basis of myelin-associated glycoprotein adhesion and signalling. *Nat Commun* [Internet]. 2016 Dec 6 [cited 2018 Feb 19];7:13584. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms13584>
156. Maggio B, Bianco ID, Montich GG, Fidelio GD, Yu RK. Regulation by gangliosides and sulfatides of phospholipase A2 activity against dipalmitoyl- and dilauroylphosphatidylcholine in small unilamellar bilayer vesicles and mixed monolayers. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 1994 Feb 23;1190(1):137–48.
157. Zhang MS, Zhang KJ, Zhang J, Jiao XL, Chen D, Zhang DL. Phospholipases A-II (PLA2-II) induces acute

- pancreatitis through activation of the transcription factor NF-kappaB. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(8):1163–9.
158. Jelsema CL, Axelrod J. Stimulation of phospholipase A2 activity in bovine rod outer segments by the  $\beta\gamma$  subunits of transducin and its inhibition by the  $\alpha$  subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(11):3623–7.
159. Inokuchi JI. Physiopathological function of hematoside (GM3 ganglioside). *Proc Japan Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2011;87(4):179–98.
160. Kabayama K, Sato T, Kitamura F, Uemura S, Won Kang B, Igarashi Y, et al. TNA $\alpha$ -induced insulin resistance in adipocytes as a membrane microdomain disorder: Involvement of ganglioside GM3. *Glycobiology*. 2005;15(1):21–9.
161. Cai D, Qiu J, Cao Z, McAtee M, Bregman BS, Filbin MT. Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *J Neurosci* [Internet]. 2001 Jul 1 [cited 2018 Feb 19];21(13):4731–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11425900>
162. Sugimoto N, Takuwa N, Okamoto H, Sakurada S, Takuwa Y. Inhibitory and Stimulatory Regulation of Rac and Cell Motility by the G 12/13 -Rho and G i Pathways Integrated Downstream of a Single G Protein-Coupled Sphingosine-1-Phosphate Receptor Isoform . *Mol Cell Biol*. 2003;23(5):1534–45.
163. Ueda H, Nagae R, Kozawa M, Morishita R, Kimura S, Nagase T, et al. Heterotrimeric G Protein  $\beta\gamma$  Subunits Stimulate FLJ00018, a Guanine Nucleotide Exchange Factor for Rac1 and Cdc42 \*. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 Jan 25 [cited 2021 Aug 21];283(4):1946–53. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925820776271/fulltext>
164. Coso OA, Teramoto H, Simonds WF, Gutkind JS. Signaling from G Protein-coupled Receptors to c-Jun Kinase Involves  $\beta\gamma$  Subunits of Heterotrimeric G Proteins Acting on a Ras and Rac1-dependent Pathway (\*). *J Biol Chem* [Internet]. 1996 Feb 23 [cited 2021 Aug 21];271(8):3963–6. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925817364505/fulltext>
165. Matassa DS, Amoroso MR, Maddalena F, Landriscina M, Esposito F. New insights into TRAP1 pathway. *Am J Cancer Res* [Internet]. 2012 [cited 2022 Feb 8];2(2):235. Available from: [/pmc/articles/PMC3304566/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/235/)
166. Bellizzi D, Passarino G. TRAP1 (TNF receptor-associated protein 1). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2011;15(4):347–51.
167. Niederöst B, Oertle T, Fritsche J, McKinney RA, Bandtlow CE. Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. *J Neurosci* [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2018 Feb 19];22(23):10368–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12451136>
168. Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, Segal R, He Z. p75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* [Internet]. 2002 Nov 20 [cited 2018 Feb 19];420(6911):74–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12422217>
169. Fournier AE, Gould GC, Liu BP, Strittmatter SM. Truncated Soluble Nogo Receptor Binds Nogo-66 and

- Blocks Inhibition of Axon Growth by Myelin [Internet]. 2002 [cited 2019 Jul 1]. Available from: <http://www.jneurosci.org/content/jneuro/22/20/8876.full.pdf>
170. Wong ST, Henley JR, Kanning KC, Huang K, Bothwell M, Poo M. A p75NTR and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat Neurosci* [Internet]. 2002 Dec 11 [cited 2018 Feb 19];5(12):1302–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12426574>
  171. Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J, et al. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci* [Internet]. 2004 Mar 15 [cited 2018 Feb 19];7(3):221–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14966521>
  172. Kawamata Y, Imamura T, Babendure J, JC L, T Y, JM O. Tumor necrosis factor receptor-1 can function through a G alpha q/11-beta-arrestin-1 signaling complex. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Sep 28 [cited 2021 Oct 23];282(39):28549–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17664271/>
  173. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF Receptor Review Superfamilies: Integrating Mammalian Biology The receptors and ligands in this superfamily have unique structural attributes that couple them directly to signaling pathways for cell proliferation, survival, and differentiation. Thus, they have assumed prominent roles in the generation of tissues and transient microen. *Cell* [Internet]. 2001 [cited 2018 Jul 11];104:487–501. Available from: [https://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(01\)00237-9.pdf](https://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(01)00237-9.pdf)
  174. Kempf A, Tews B, Arzt ME, Weinmann O, Obermair FJ, Pernet V, et al. The Sphingolipid Receptor S1PR2 Is a Receptor for Nogo-A Repressing Synaptic Plasticity. *PLoS Biol*. 2014;12(1).
  175. Siehler S, Manning DR. Pathways of transduction engaged by sphingosine 1-phosphate through G protein-coupled receptors. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2002.
  176. Williams G, Wood A, Williams E-J, Gao Y, Mercado ML, Katz A, et al. Ganglioside Inhibition of Neurite Outgrowth Requires Nogo Receptor Function. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 Jun 13 [cited 2019 Sep 19];283(24):16641–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18411262>
  177. De S, Trigueros MA, Kalyvas A, David S. Phospholipase A2 plays an important role in myelin breakdown and phagocytosis during wallerian degeneration. *Mol Cell Neurosci*. 2003;24(3):753–65.
  178. Charalampopoulos I, Vicario A, Padiaditakis I, Gravanis A, Simi A, Ibáñez CF. Genetic Dissection of Neurotrophin Signaling through the p75 Neurotrophin Receptor. *Cell Rep*. 2012;2(6):1563–70.
  179. MacEwan DJ. TNF ligands and receptors - a matter of life and death. *Br J Pharmacol*. 2002;
  180. Vázquez-Prado J, Miyazaki H, Castellone MD, Teramoto H, Gutkind JS. Chimeric Galpha2/Galpha13 Proteins Reveal the Structural Requirements for the Binding and Activation of the RGS-like (RGL)-containing Rho Guanine Nucleotide Exchange Factors (GEFs) by Galpha13\*. 2004 [cited 2022 Mar 3]; Available from: [www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/)
  181. Vyas AA, Patel H V., Fromholt SE, Heffer-Laue M, Vyas KA, Dang J, et al. Gangliosides are functional nerve cell ligands for myelin-associated glycoprotein (MAG), an inhibitor of nerve regeneration. *Proc Natl Acad*

- Sci [Internet]. 2002 Jun 11 [cited 2018 Feb 17];99(12):8412–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12060784>
182. Vinson M, Stribos PJLM, Rowles A, Facci L, Moore SE, Simmons DL, et al. Myelin-associated Glycoprotein Interacts with Ganglioside GT1b: A MECHANISM FOR NEURITE OUTGROWTH INHIBITION \*. J Biol Chem [Internet]. 2001 Jan 1 [cited 2022 Jan 25];276(23):20280–5. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925819404730/fulltext>
  183. Williams G, Wood A, Williams E-J, Gao Y, Mercado ML, Katz A, et al. Ganglioside Inhibition of Neurite Outgrowth Requires Nogo Receptor Function. J Biol Chem [Internet]. 2008 Jun 13 [cited 2018 Jul 19];283(24):16641–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18411262>
  184. Venkatesh K, Chivatakarn O, Sheu S-S, Giger RJ. Molecular dissection of the myelin-associated glycoprotein receptor complex reveals cell type-specific mechanisms for neurite outgrowth inhibition. J Cell Biol [Internet]. 2007 May 7 [cited 2018 Feb 19];177(3):393–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17470639>
  185. Sheikh KA. Autoantibodies activate small GTPase RhoA to modulate neurite outgrowth. Small GTPases [Internet]. 2011 [cited 2021 Oct 8];2(4):233–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22145097/>
  186. Williams G, Wood A, Williams E-J, Gao Y, Mercado ML, Katz A, et al. Ganglioside inhibition of neurite outgrowth requires Nogo receptor function: Identification of interaction sites and development of novel antagonists. J Biol Chem [Internet]. 2008 [cited 2022 Jan 18];283:16641–52. Available from: <http://www.jbc.org>
  187. Fournier AE, Takizawa BT, Strittmatter SM, Avedissian H, Lubell W, McKerracher L, et al. Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. J Neurosci [Internet]. 2003 Feb 15 [cited 2019 Sep 19];23(4):1416–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12598630>
  188. Sipione S, Monyor J, Galleguillos D, Steinberg N, Kadam V. Gangliosides in the Brain: Physiology, Pathophysiology and Therapeutic Applications. Front Neurosci. 2020 Oct 6;14:1004.
  189. Prendergast J, Umanah GKE, Yoo S-W, Lagerlöf O, Motari MG, Cole RN, et al. Ganglioside regulation of AMPA receptor trafficking. J Neurosci [Internet]. 2014 Sep 24 [cited 2018 Feb 22];34(39):13246–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25253868>
  190. Vanamee ÉS, Faustman DL. Structural principles of tumor necrosis factor superfamily signaling. Sci Signal. 2018;11(511):1–12.
  191. Huang J, Yu S, Ji C, Li J. Structural basis of cell apoptosis and necrosis in TNFR signaling. Apoptosis. 2015;20(2):210–5.
  192. Neumann H, Schweigreiter R, Yamashita T, Rosenkranz K, Wekerle H, Barde YA. Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a Rho-dependent mechanism. J Neurosci. 2002;22(3):854–62.

193. Naudé PJW, Den Boer JA, Luiten PGM, Eisel ULM. Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *FEBS J.* 2011;278(6):888–98.
194. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell.* 2003;114(2):181–90.
195. Chan FKM. Three is better than one: Pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. *Cytokine.* 2007;37(2):101–7.
196. Gaeta M Lou, Johnson DR, Kluger MS, Pober JS. The Death Domain of Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Is Necessary but Not Sufficient for Golgi Retention of the Receptor and Mediates Receptor Desensitization. *Lab Investig* 2000 808 [Internet]. 2000 Aug 1 [cited 2021 Oct 29];80(8):1185–94. Available from: <https://www.nature.com/articles/3780126>
197. Sedger LM, Mcdermott MF. TNF and TNF-receptors : From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past , present and future. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2014;25(4):453–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.016>
198. Yamashita T, Higuchi H, Tohyama M. The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. *J Cell Biol.* 2002;157(4):565–70.
199. Jones SE, Palmer TM. Protein kinase A-mediated phosphorylation of RhoA on serine 188 triggers the rapid induction of a neuroendocrine-like phenotype in prostate cancer epithelial cells. *Cell Signal* [Internet]. 2012 Aug [cited 2020 Jul 15];24(8):1504–14. Available from: </pmc/articles/PMC3510439/?report=abstract>
200. Niu J, Profirovic J, Pan H, Vaiskunaite R, Voyno-Yasenetskaya T. G Protein betagamma subunits stimulate p114RhoGEF, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and Rac1: regulation of cell shape and reactive oxygen species production. *Circ Res* [Internet]. 2003 Oct 31 [cited 2018 Apr 18];93(9):848–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14512443>
201. Conde C, Arias C, Robin M, Li A, Saito M, Chuang J-Z, et al. Evidence for the involvement of Lfc and Tctex-1 in axon formation. *J Neurosci* [Internet]. 2010 May 12 [cited 2018 Feb 17];30(19):6793–800. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463241>
202. Richter C, Messerschmidt S, Holeiter G, Tepperink J, Osswald S, Zappe A, et al. The Tumor Necrosis Factor Receptor Stalk Regions Define Responsiveness to Soluble versus Membrane-Bound Ligand. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2012 Jul 1 [cited 2019 Sep 19];32(13):2515–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22547679>
203. Merritt EA, Sarfaty S, Akker F Van Den, L’Hoir C, Martial JA, Hol WGJ. Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide. *Protein Sci.* 1994;3(2):166–75.
204. Cottin V, Doan J, Riches D. Restricted localization of the TNF receptor CD120a to lipid rafts: a novel role for the death domain. *J Immunol* [Internet]. 2002 Apr 15 [cited 2021 Oct 23];168(8):4095–102. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11937569/>
205. Richter C, Messerschmidt S, Holeiter G, Tepperink J, Osswald S, Zappe A, et al. The Tumor Necrosis Factor

- Receptor Stalk Regions Define Responsiveness to Soluble versus Membrane-Bound Ligand. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2012 Jul 1 [cited 2021 May 25];32(13):2515–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22547679/>
206. Cottin V, Doan JES, Riches DWH. Death Domain CD120a to Lipid Rafts: A Novel Role for the Restricted Localization of the TNF Receptor. *J Immunol Ref* [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 1];168:4095–102. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/168/8/4095><http://www.jimmunol.org/content/168/8/4095.full#ref-list-1>
207. Hunter I, Nixon G. Spatial compartmentalization of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1-dependent signaling pathways in human airway smooth muscle cells. Lipid rafts are essential for TNF-alpha-mediated activation of RhoA but dispensable for the activation of the NF-kappa. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 Nov 10 [cited 2021 Oct 23];281(45):34705–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16982613/>
208. Ghosh P, Rangamani P, Kufareva I. The GAPs, GEFs, GDIs and...now, GEMs: New kids on the heterotrimeric G protein signaling block. *Cell Cycle* [Internet]. 2017;16(7):607–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2017.1282584>
209. Cannavo A, Liccardo D, Lympelopoulos A, Gambino G, Loreta D'amico M, Rengo F, et al. b Adrenergic Receptor Kinase C-Terminal Peptide Gene-Therapy Improves b 2-Adrenergic Receptor-Dependent Neoangiogenesis after Hindlimb Ischemia s. *J Pharmacol Exp Ther J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2016 [cited 2021 Oct 23];356:503–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.115.228411>
210. Pertz O, Hodgson L, Klemke RL, Hahn KM. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* [Internet]. 2006 Apr 19 [cited 2018 Feb 17];440(7087):1069–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16547516>
211. Itoh RE, Kurokawa K, Ohba Y, Yoshizaki H, Mochizuki N, Matsuda M. Activation of Rac and Cdc42 Video Imaged by Fluorescent Resonance Energy Transfer-Based Single-Molecule Probes in the Membrane of Living Cells. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2002 Sep 15 [cited 2021 Oct 5];22(18):6582. Available from: </pmc/articles/PMC135619/>