

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas

Efectos del polimorfismo Val66Met en el gen de BDNF en el desarrollo y estructura de neuronas hipocampales

Tesinista: Nahir Guadalupe Gazal

Firma:.....

Director: Dr. Agustín Anastasía

Firma:.....

Instituto Ferreyra (INIMEC – CONICET – UNC). Friuli 2434,
Barrio Parque Vélez Sarsfield (5016), Córdoba



“Efectos del polimorfismo Val66Met en el gen de BDNF en el desarrollo y estructura neuronal”

Tribunal Examinador

Dra. Andrea Cragolini

Firma:

Dra. Angélica Rivarola

Firma:

Dra. Laura Vivas

Firma:

Calificación:

Fecha:

Índice

Resumen	4
Abstract	5
Introducción	6
Objetivo general	14
Objetivos específicos	14
Materiales y Métodos	15
Resultados	24
Discusión	32
Agradecimientos	36
Bibliografía	37

Resumen

Existe un polimorfismo de nucleótido único (SNP) en el gen de BDNF (rs6265) que está asociado a una mayor susceptibilidad a desarrollar desórdenes neuropsiquiátricos en los humanos portadores. Este SNP está presente en ~25% de la población mundial e induce una sustitución de una valina por una metionina en el prodominio de BDNF (pBDNF), un péptido abundante en el sistema nervioso central. Se ha demostrado que la variante Met de pBDNF provoca algunas alteraciones agudas (30-60 minutos) en la morfología neuronal. Sin embargo, se desconocen los efectos del pBDNF Val y Met por tiempos más prolongados y en distintos estadios del desarrollo neuronal. Por lo tanto, se estudiaron los efectos de ambas variantes polimórficas en neuronas hipocampales en cultivo de distintos tiempos de madurez, en distintos parámetros del establecimiento de la polaridad, en el desarrollo de dendritas y axones, y en la densidad de contactos sinápticos. En neuronas inmaduras, ninguna de las dos variantes de pBDNF fue capaz de afectar significativamente la polaridad o la estructura de los procesos. Sin embargo, en neuronas maduras, se observó que ambas variantes son capaces de disminuir la densidad de contactos sinápticos. Este es el primer trabajo en el que se detecta un efecto de pBDNF Val (presente en 75% de la población mundial) en la estructura neuronal utilizando dosis fisiológicamente relevantes. Este estudio sugiere que pBDNF es un modulador de la densidad de contactos sinápticos que, junto con las acciones de mBDNF, regularían la precisa maduración de circuitos.

Palabras Clave: BDNF, pBDNF, POLIMORFISMO VAL66MET, HIPOCAMPO, ENFERMEDADES NEUROPSIQUIATRICAS, ESTRUCTURA NEURONAL.

Abstract

There is a single nucleotide polymorphism (SNP) in the BDNF gene (rs6265) which is associated with increased susceptibility to develop neuropsychiatric disorders in human carriers. This SNP is present in ~25% of the world population, and induces a substitution of a valine for a methionine in the BDNF prodomain (pBDNF), an abundant peptide in the central nervous system. pBDNF Met can trigger acute changes (30-60 minutes) in neuronal structure. However, it remains yet unknown the effects of pBDNF Val and Met for longer administrations periods, and in different stages of the neuronal development. Thus, we studied the effects of both polymorphic variants of pBDNF on hippocampal neurons in culture at different stages of differentiation. We measured different parameters in the establishment of polarity, in the development of dendrites and axons, and in the density of synaptic contacts in the presence of these peptides. In immature neurons, we did not detect alterations in the establishment of polarity nor in the development of dendrites and axons induced by either pBDNFs. However, in mature neurons, pBDNF Val and Met were able to significantly reduce the density of synaptic contacts. This is the first study to describe an effect of the Val variant of pBDNF (present in 75% of human population) on neuronal structure using a physiologically relevant dose. These results suggest that pBDNF is a modulator of synaptic contact density and that, together with mBDNF actions, might act as regulators of precise circuit maturation.

Keywords: BDNF, VAL66MET POLYMORPHISM, HIPPOCAMPUS, NEUROPSYCHIATRIC DISEASES, NEURONAL STRUCTURE.

Introducción

El hipocampo es una estructura cerebral responsable principalmente de la codificación y almacenamiento de la memoria (Purves *et al.*, 2004). Se localiza en el interior de la parte medial del lóbulo temporal, debajo de la superficie cortical. Forma parte del sistema límbico donde se comunica con la amígdala, la corteza entorrinal y prefrontal, el tálamo y el hipotálamo, entre otras regiones cerebrales. El sistema límbico regula las respuestas comportamentales para diversos estímulos que se manifiestan como emociones, motivación e instintos. Es una estructura plástica y vulnerable que se puede dañar por una variedad de estímulos. A su vez, el hipocampo es de las pocas regiones del cerebro donde ocurre neurogénesis en la vida adulta (van Praag *et al.*, 2002), aunque estudios recientes ponen en dudas estos descubrimientos en el cerebro humano (Sorrells *et al.*, 2018). Debido a las funciones en las que el hipocampo se encuentra involucrado, alteraciones en las neuronas hipocampales y/o en los circuitos en donde esta región participa, pueden influir en la aparición y progresión de trastornos neuropsiquiátricos (Bassett y Bullmore, 2009; Dwivedi, 2012; Price y Drevets, 2010).

Las neuronas hipocampales se caracterizan por ser polarizadas con un dominio axonal y uno dendrítico, donde ambos tipos de procesos nacen desde el soma neuronal. En una primera etapa del desarrollo neuronal aparecen las primeras neuritas que son indistinguibles morfológicamente entre sí. En el establecimiento de la polaridad, una neurita inicia una fase de rápido crecimiento para convertirse en el axón adquiriendo características moleculares que la comprometen con su identidad. Los otros procesos se diferenciarán luego en dendritas. Finalmente, axones y dendritas elongan y se ramifican adquiriendo una arquitectura particular. Este establecimiento de la polaridad y maduración de las neuronas hipocampales se puede clasificar en estadios diferenciados cuando estas células se encuentran en cultivo: en el estadio 1 el soma neuronal se encuentra redondeado, sin procesos y con lamelipodios circundantes; el estadio 2 se caracteriza por la aparición de las neuritas que son cortas y de similar longitud; el estadio 3 donde se produce la elongación axonal; el estadio 4 donde se produce la elongación y complejización del árbol dendrítico en paralelo a la elongación axonal que continúa; y el estadio 5 en donde la red neuronal madura y se establecen sinapsis activas (Cáceres, Ye y Dotti,

2012). El paso del estadio 2 al 3 es crítico ya que entre estos dos estadios se activan vías de señalización que resultan en cambios en el citoesqueleto y en la organización de la membrana en el cono de crecimiento del futuro axón, que conllevan al establecimiento de la polaridad. Al igual que ocurre en el cerebro, las neuronas hipocampales en cultivo extienden un solo axón indicando la existencia de señales de polaridad responsables de la acumulación y/o activación, en un solo cono de crecimiento, de componentes críticos de la maquinaria de crecimiento de las células. En particular, hay acumulación y/o activación selectiva de receptores de factores de crecimiento como el receptor de IGF-1 (insulin-like growth factor-1) y de TGF β (transforming growth factor beta), de PI3K (phosphatidylinositol-3 kinasa), del complejo de polaridad Par, de AMP cíclico y protein kinasa A (PKA), y de ciertos módulos de señalización de la familia de las Rho GTPasas. También se ha demostrado que la acumulación transiente de p75NTR (p75 neurotrophin receptor) en una sola neurita representa una marca espaciotemporal que anticipa la especificación axonal (Zuccaro *et al.*, 2014). Los efectores aguas abajo de estas proteínas incluyen importantes reguladores de la dinámica del citoesqueleto y la adición de membrana que resultan en una reorganización de los mismos (Cáceres, Ye y Dotti, 2012); como por ejemplo, el desensamblado de la red subcortical de actina en el cono de crecimiento promueve el ingreso de microtúbulos en esta región y especifica el futuro axón (Bradke y Dotti, 1999). Otro aspecto importante en el establecimiento de la polaridad entre los estadios 2 y 3 es que existen señales que limitan el crecimiento de las otras neuritas que no se encuentran comprometidas con la formación del axón (Cáceres, Ye y Dotti, 2012). Por ejemplo, la GTPasa pequeña RhoA produce un tono inhibitorio que previene el crecimiento rápido de neuritas menores y por lo tanto inhibe la formación de múltiples axones (Da Silva *et al.*, 2003).

Una vez diferenciadas las dendritas de los axones éstas pueden ser identificadas morfológicamente ya que los axones son más finos y largos, mientras que las dendritas son procesos más cortos y de mayor calibre. Sin embargo, es más preciso para su reconocimiento estudiar la expresión de proteínas específicas que fueron transportadas diferencialmente a cada compartimento neuronal. Por ejemplo, la proteína asociada a microtúbulos MAP2 (microtubules-associated protein 2) se expresa exclusivamente en neuronas y se encuentra asociadas a microtúbulos de las dendritas (Cáceres, Banker y Binder, 1986). Por otro lado, la proteína asociada a

microtúbulos Tau1 se localiza predominantemente en axones en estadios tempranos del desarrollo neuronal por lo que es ampliamente utilizada como un marcador de este compartimiento (Cáceres y Kosik, 1990; Mandell y Banker, 1996). Otra diferencia que se puede encontrar en axones y dendritas es la expresión diferencial de varias proteínas asociadas a la sinapsis: los botones terminales axonales (pre-sinapsis) contienen abundantes niveles de la proteína de vesículas sinápticas sinaptofisina (Syp); mientras que las espinas dendríticas maduras (post-sinapsis) expresan selectivamente la proteína PSD95 (post-synaptic density 95) que forma una red o andamiaje para ordenar los receptores de membrana y proteínas de anclaje post-sinápticas (Giza *et al.*, 2018). El segmento inicial del axón (AIS, axon initial segment) es un sub-compartimiento dentro de la porción proximal del axón que se cree que contribuye a esta segregación diferencial de componentes entre dendritas y axones funcionando como una barrera selectiva (Song *et al.*, 2009; Winckler, Forscher y Mellman, 1999). Curiosamente, el silenciamiento de la proteína ankirina G desmantela el AIS y hace que los axones adquieran las características moleculares de dendritas, incluida la formación de espinas y densidades post-sinápticas (Hedstrom, Ogawa y Rasband, 2008). La diferenciación y maduración neuronal finaliza con la formación de sinapsis (sinaptogénesis) que genera los circuitos activos. La sinaptogénesis implica la maduración de la pre-sinapsis (botón terminal axonal) y post-sinapsis (espinas dendríticas). Para que se forme la sinapsis, es necesario que los conos de crecimiento de la pre- y la post-sinapsis se encuentren y asocien. La pre-sinapsis se caracteriza por la acumulación de vesículas sinápticas y proteínas involucradas en la exo- y endocitosis de vesículas dependientes de despolarización, mientras que la post-sinapsis contiene clusters de receptores y canales para continuar con la transmisión del impulso nervioso (Purves *et al.*, 2004).

El desarrollo, maduración y plasticidad de las redes neuronales se basan en la correcta diferenciación de sus axones y dendritas, en la elongación, arborización y retracción de dichos procesos neuronales, y en la dinámica de sus contactos sinápticos. Condiciones genéticas y/o ambientales que afecten cualquiera de estos eventos del desarrollo de las neuronas hipocampales podrían resultar en alteraciones en la conexión de sus circuitos y en consecuentes dolencias humanas como enfermedades neuropsiquiátricas o neurodegenerativas. Por ejemplo, se ha demostrado que pacientes (post mortem) con esquizofrenia, trastornos del espectro

autista (TEA), y enfermedad de Alzheimer (Penzes, Cahill, Jones, VanLeeuwen y Woolfrey, 2011) tienen volúmenes hipocampales reducidos, una disminución en la arborización dendrítica, y una menor densidad de espinas dendríticas en el hipocampo.

Interesantemente, existe un polimorfismo de nucleótido único (SNP: single nucleotide polymorphism) llamado rs6265 (según la base de datos SNPedia, www.snpedia.com) que se encuentra asociado con una mayor incidencia y progresión de diversas patologías del sistema nervioso en los humanos portadores. Existen más de 1100 estudios genéticos sobre este polimorfismo (Tsai, 2018). Este SNP es muy frecuente ya que está presente en aproximadamente el 25% de la población mundial, con una distribución del 20% en heterocigosis y un 5% en homocigosis (dbSNP: Database of Single Nucleotide Polymorphisms; National Center for Biotechnology Information (NCBI)). Entre las patologías asociadas con el SNP, las más estudiadas han sido déficits cognitivos y de memoria dependiente del hipocampo, enfermedades neuropsiquiátricas como depresión y ansiedad, adicciones, e incluso algunas enfermedades neurodegenerativas como enfermedad de Alzheimer y Parkinson. Además, se han detectado volúmenes hipocampales reducidos en los humanos portadores de este polimorfismo (Bueller *et al.*, 2006; Egan *et al.*, 2003; Szeszko *et al.*, 2005). Este SNP implica la sustitución de una guanina por una adenina en la posición 196 en el gen del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, brain-derived neurotrophic factor) humano, resultando en el cambio de una valina (Val) por una metionina (Met) en la posición 66 (Val66Met). BDNF es el miembro más abundante y más estudiado de la familia de las neurotrofinas. Esta familia de factores tróficos está compuesta por proteínas que han sido estudiadas desde la década del '50, cuando se descubrió el Nerve Growth Factor (NGF), miembro fundador de la familia (Cohen, Levi-Montalcini y Hamburger, 1954). El segundo miembro en descubrirse fue BDNF (Barde, Edgar y Thoenen, 1982). La conservación en la secuencia de ambas proteínas permitió encontrar otros miembros de la familia que son Neurotrophin 3 (NT-3) y Neurotrophin 4 (NT-4). Su importancia radica principalmente en el rol que este grupo de proteínas tiene en el establecimiento de la estructura y función neuronal en el sistema nervioso tanto central como periférico (Park y Poo, 2013). BDNF regula casi todos los aspectos del desarrollo y mantenimiento de los circuitos neuronales incluyendo la proliferación y

diferenciación celular, crecimiento dendrítico y axonal, sinaptogénesis, y plasticidad sináptica (Park y Poo, 2013; Reichardt, 2006).

BDNF es una proteína de secreción que es sintetizada como un precursor inmaduro llamado pre-proBDNF, en donde el dominio “pre” corresponde al péptido señal que guía a la pro-proteína hacia la ruta secretoria. Este péptido señal es rápidamente eliminado y el posterior procesamiento del proBDNF requiere enzimas específicas intracelulares como proconvertasas (la más abundante es furina) presentes en el aparato de Golgi y en vesículas secretoras. También enzimas extracelulares como las metaloproteasas de matriz presentes en la matriz extracelular pueden procesar este precursor inmaduro (Lee, Kermani, Teng y Hempstead, 2001). Este clivaje enzimático intra- o extracelular da origen a dos péptidos llamados BDNF maduro (mBDNF) y prodominio de BDNF (de ahora en más pBDNF) (Gibon y Baker, 2017; Zanin, Unsain y Anastasia, 2017) (Figura 1).

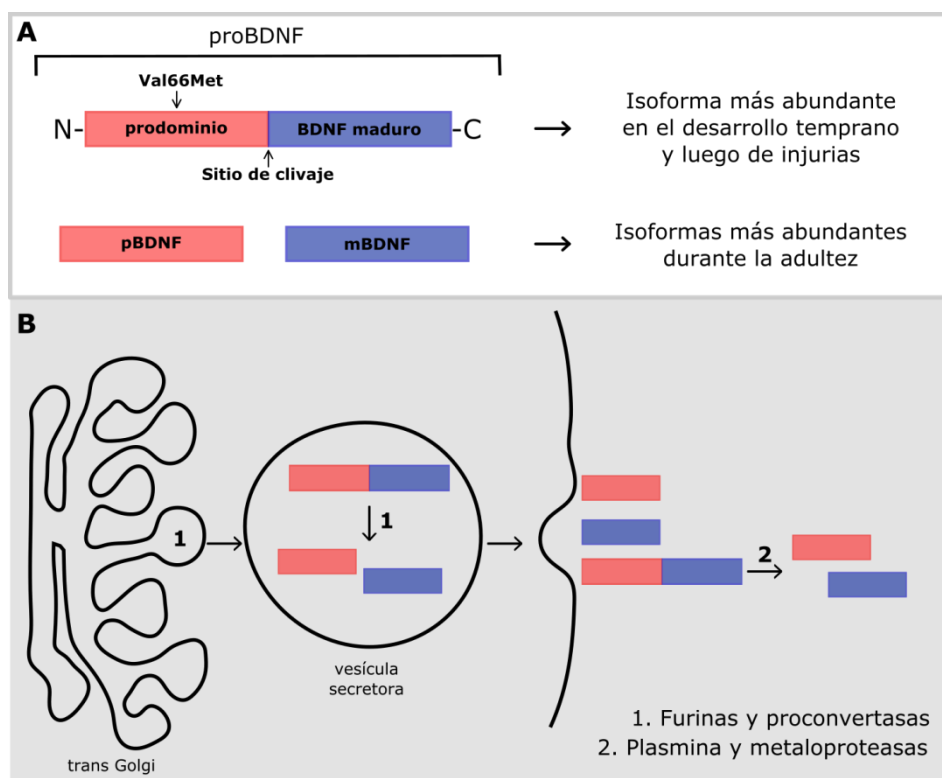


Figura 1: Procesamiento y secreción de las isoformas del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). (A) El gen de BDNF codifica para un precursor llamado proBDNF que contiene un prodominio (también llamado pro-péptido) en el extremo amino terminal, y el llamado BDNF maduro (mBDNF) en el extremo carboxi terminal. En medio de ambos dominios hay un sitio de clivaje en donde pueden actuar enzimas intra- o extracelulares. El procesamiento de proBDNF libera el prodominio que de ahora en más llamaremos pBDNF. En rojo: pBDNF; en azul: mBDNF. (B) Actividad enzimática de la furina y otras pro-convertasas en el *trans* Golgi y dentro de las vesículas secretoras (1). Actividad enzimática de los derivados de plasmina y metaloproteasas extracelularmente (2).

A pesar de que el clivaje enzimático genera cantidades estequiométricas de mBDNF y pBDNF, este último no había sido detectado en el sistema nervioso (Yang *et al.*, 2009). Se especulaba que solo participaba en el correcto plegamiento y tráfico de mBDNF, y que luego se degradaba como ocurre con prodominios de otros factores de crecimiento y hormonas. Sin embargo, mediante la utilización de fijación de proteínas a la membrana de transferencia luego del Western Blot, se encontró que pBDNF se expresa en altos niveles en el sistema nervioso, y en particular en el hipocampo (Anastasia *et al.*, 2013; Dieni *et al.*, 2012). Además, este péptido se encuentra en altos niveles en el líquido cefalorraquídeo humano y murino (manuscrito en preparación de nuestro laboratorio).

Las tres isoformas, proBDNF, mBDNF y pBDNF pueden ser secretadas por neuronas de manera dependiente de la actividad (Anastasia *et al.*, 2013; Barde, 1994; Yang *et al.*, 2009). La secreción de proBDNF ocurre en bajos niveles y es solo detectable muy temprano en el desarrollo postnatal (Anastasia *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2009, 2014;). Los niveles de este precursor pueden incrementar por ciertas injurias, como por ejemplo en el hipocampo y en el líquido cefalorraquídeo murino luego de convulsiones epilépticas inducidas por pilocarpina (Friedman, 2010; Unsain, Montroull y Mascó, 2009; Volosin *et al.*, 2008). Esta proneurotrofina se puede unir a un complejo de dos receptores no relacionados llamados sortilina y p75NTR (Hempstead, 2014; Teng *et al.*, 2005) (Figura 2A). Más recientemente se publicó que proBDNF, alternativamente, se puede unir a un miembro de la familia de sortilina llamado SorCS2 (sortilin related VPS10 domain containing receptor 2) (Anastasia *et al.*, 2013; Glerup *et al.*, 2014). Este complejo de señalización proBDNF-sortilina/SorCS2-p75NTR promueve la degeneración de procesos en diversas poblaciones neuronales como en el hipocampo y sistema dopaminérgico (Glerup *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014), muerte de neuronas simpáticas del ganglio cervical superior (Teng *et al.*, 2005), e induce depresión de larga duración (LTD, long-term depression, una forma de plasticidad sináptica) (Woo *et al.*, 2005) (Figura 2A). Por otro lado, mBDNF pueden unirse al receptor tirosina kinasa TrkB (tropomyosin receptor kinase B) e inducir sobrevida y diferenciación neuronal, mientras que si se une al receptor de neurotrofinas p75NTR puede inducir apoptosis y/o una retracción de la arborización de ciertas neuronas (Park y Poo, 2013) (Figura 2B, C).

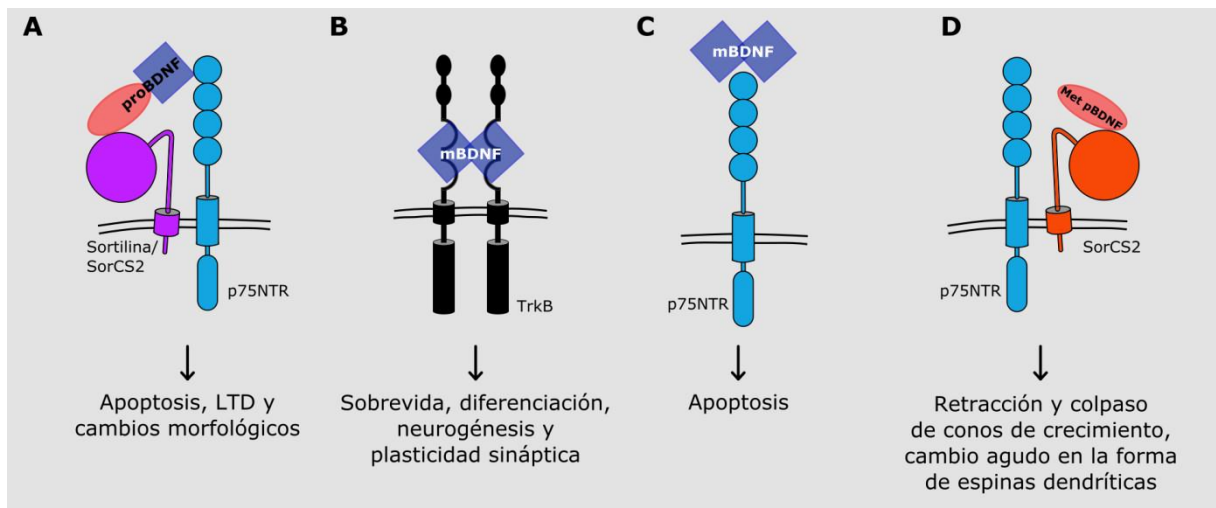


Figura 2: Isoformas de BDNF junto a receptores y principales funciones en neuronas. (A) proBDNF se puede unir a un complejo de receptores formado por p75NTR y sortilina o alternativamente SorCS2, y promover la degeneración de procesos en diversas poblaciones neuronales, la depresión de larga duración (LTD: long-term depression), y la apoptosis. Por otro lado, mBDNF da lugar a respuestas celulares diferentes dependiendo del receptor al cual se une: (B) si interactúa con TrkB promueve la supervivencia y diferenciación neuronal, neurogénesis y plasticidad sináptica; (C) si interactúa con p75NTR promueve el remodelado neuronal y la apoptosis. (D) La unión de la variante Met de pBDNF a SorCS2, y en cooperación con p75NTR, puede inducir la retracción y colapso de conos de crecimiento en neuronas hipocámpicas, LTD y cambio agudo en la forma de espinas dendríticas.

Interesantemente, animales knock-in que expresan el polimorfismo Val66Met en el gen de BDNF reproducen varios fenotipos comportamentales que se encuentran en los humanos portadores. Por ejemplo, expresan conductas relacionadas con la ansiedad luego de la presentación de un estresor (Chen *et al.*, 2006). El mecanismo propuesto para explicar estos efectos comportamentales en humanos y en roedores ha sido que la sustitución Val66Met resulta en una menor secreción de mBDNF y por lo tanto en una consecuente pérdida de función de mBDNF-TrkB (Chen *et al.* 2004, 2005, 2006; Egan *et al.*, 2003). Sin embargo, publicaciones recientes de nuestro grupo proponen un mecanismo adicional para explicar la mayor incidencia de enfermedades neuropsiquiátricas en los portadores del SNP: la ganancia de función de pBDNF Met afectando la estructura neuronal como se describe a continuación. Por un lado, la variante Met es capaz de inducir colapso y retracción de los conos de crecimiento en neuronas hipocámpicas inmaduras (Anastasia *et al.*, 2013) (Figura 2D). Además, se ha reportado que pBDNF Met inhibe la depresión a largo termino (LTD) (Mizui *et al.*, 2015), y también es capaz de dismantelar de manera aguda la estructura de las espinas dendríticas

maduras (con forma de hongo) convirtiéndolas en finas/filopodiales (Giza *et al.*, 2018). Sin embargo, pBDNF Val ha resultado inactivo afectando la estructura neuronal en todos estos experimentos realizados con concentraciones fisiológicamente relevantes (Anastasia *et al.*, 2013; Giza *et al.*, 2018; Mizui *et al.*, 2015). El mecanismo molecular propuesto por nuestro grupo de investigación implica que el reemplazo de un único aminoácido (Val66Met) altera significativamente la estructura secundaria de esta proteína resultando en una interacción diferencial con el receptor SorCS2 (Anastasia *et al.*, 2013; Wang, Bains, Anastasia y Bracken, 2018) (Figura 2D). Este complejo pBDNF Met-SorCS2 requiere de la presencia de p75NTR para tener efectos en neuronas (Anastasia *et al.*, 2013) (Figura 2D). A pesar de los efectos encontrados de las variantes polimórficas de pBDNF y de estos avances en la estructura de los péptidos, los mecanismos moleculares subyacentes (vías de señalización, alteraciones del citoesqueleto, etc.) son desconocidos. Además, se desconoce el impacto de estos péptidos en distintas etapas del desarrollo neuronal. Dilucidar estos mecanismos proveerá una posible explicación molecular a las enfermedades neuropsiquiátricas de los humanos portadores.

Objetivo general

Actualmente solo se conoce que el tratamiento agudo con pBDNF variante Met induce cambios morfológicos en conos de crecimiento de neuronas hipocampales inmaduras (3DIV, días in vitro) y en la forma de espinas dendríticas en neuronas maduras (14-21DIV). A pesar que pBDNF se expresa abundantemente en el hipocampo, y que esta región está involucrada en los desórdenes neuropsiquiátricos asociados con el polimorfismo Val66Met, los efectos de la variante Val y Met de pBDNF no han sido estudiados en la diferenciación de axones y dendritas, en el desarrollo de los mismos y en la densidad sináptica en neuronas maduras luego de tratamientos con dosis dentro del rango fisiológico de estos péptidos. Es por esto que **el objetivo general del presente trabajo es estudiar los efectos del pBDNF Val y Met en la citoarquitectura de neuronas en distintos estadios de desarrollo y madurez.** Estos efectos en la citoarquitectura neuronal inducida por pBDNF podrían resultar en cambios en los circuitos y alteraciones en la conducta humana. Por lo tanto, esta investigación permitirá acercarse a un mecanismo molecular que explique la mayor incidencia de enfermedades neuropsiquiátricas en los humanos portadores del SNP.

Objetivos específicos

- 1- Estudiar los efectos de pBDNF Val y Met en concentraciones fisiológicamente relevantes en el establecimiento de la polaridad en neuronas hipocampales inmaduras (2DIV).
- 2- Determinar los efectos de pBDNF Val y Met en concentraciones fisiológicamente relevantes en la longitud axonal y en la complejidad dendrítica en neuronas hipocampales en un estadio intermedio de maduración (9DIV).
- 3- Analizar el impacto de pBDNF Val y Met en concentraciones fisiológicamente relevantes en la densidad de contactos sinápticos en neuronas hipocampales maduras (16DIV).

Materiales y Métodos

Diseño experimental para los tres objetivos

Se utilizaron cultivos de neuronas hipocampales de rata (Kaech y Banker, 2006, detalles debajo) de 2, 9 y 16DIV para estudiar los efectos de las dos variantes polimórficas Val y Met de pBDNF. Ambas proteínas utilizadas fueron generadas recombinantes en cultivos de bacterias y purificadas en columnas de afinidad (detalles debajo), y se administraron solubles al medio de cultivo. Las concentraciones de pBDNF utilizadas para los tratamientos fueron de 10 a 20ng/ml, que se encuentran dentro de un rango fisiológicamente relevante estimado en el líquido cefalorraquídeo humano ($36\pm 5,3$ ng/ml; manuscrito en preparación de nuestro laboratorio) y murino. Además, Los cultivos control fueron administrados con vehículo (PBS). Las 4 condiciones experimentales fueron: (1) PBS (control), (2) pBDNF Val, (3) pBDNF Met, y (4) pBDNF Val+Met simultáneamente. Esta última condición experimental tiene como objetivo estudiar si los posibles efectos de las dos variantes juntas interactúan. Las neuronas de todos los estadios de diferenciación fueron fijadas 24hs después del tratamiento con los péptidos para proceder con las inmunodetecciones correspondientes (ver detalles debajo) (Figura 3).

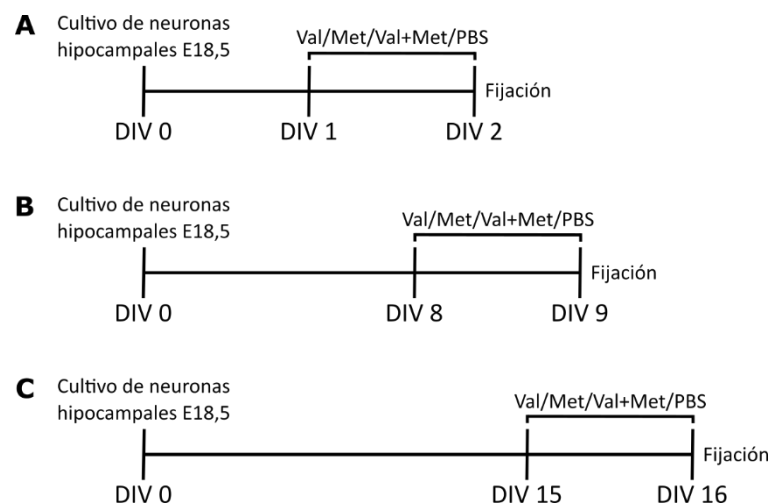
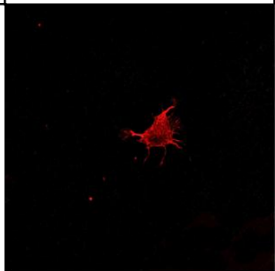
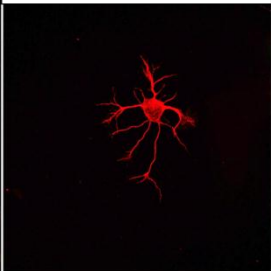
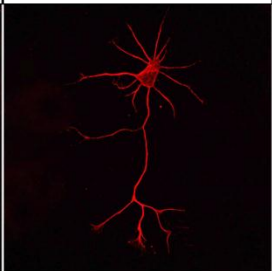
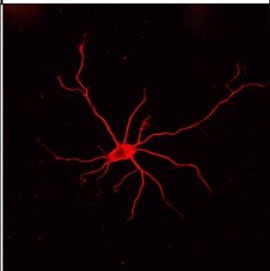
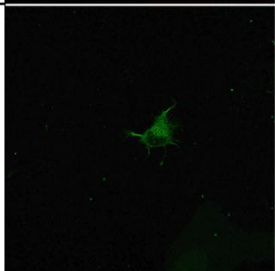
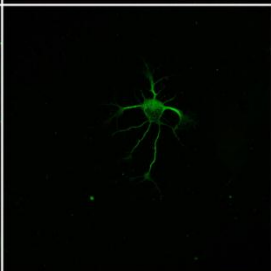
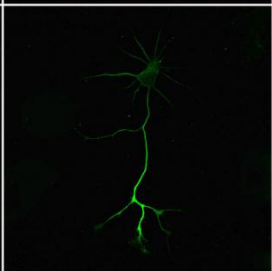
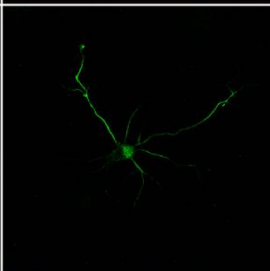
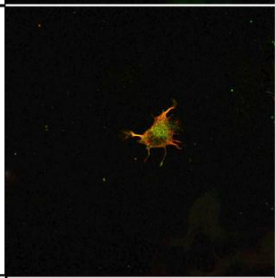
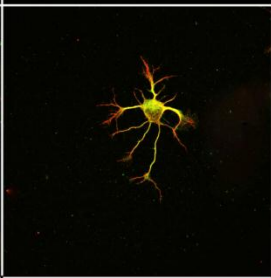
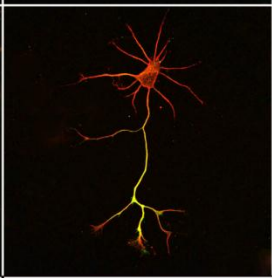
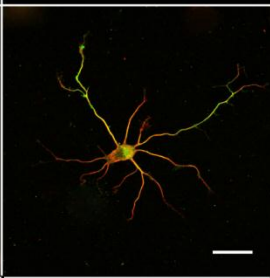


Figura 3: Líneas de tiempo del diseño experimental de cada objetivo. (A) Para el objetivo 1, cultivos hipocampales de 1 día in vitro (DIV) fueron administrados con pBDNF Val, pBDNF Met o ambos simultáneamente (péptidos recombinantes en una concentración de 20ng/ml). Se administró un volumen equivalente de vehículo (PBS) como control. (B) Para el objetivo 2, cultivos hipocampales de 8DIV fueron administrados con pBDNF Val, pBDNF Met o ambos simultáneamente (péptidos recombinantes en una concentración de 10ng/ml). Se administró un volumen equivalente de vehículo (PBS) como control. (C) Par el objetivo 3, cultivos hipocampales de 15DIV fueron administrados con pBDNF Val, pBDNF Met o ambos simultáneamente (péptidos recombinantes en una concentración de 20ng/ml). Se administró un volumen equivalente de vehículo (PBS) como control. Las neuronas de todos los estadios de diferenciación fueron fijadas con paraformaldehído 24hs después de los tratamientos para proceder a las inmunodetecciones correspondientes.

Diseño experimental Objetivo 1

- a) Determinar si pBDNF Val, pBDNF Met, o ambos simultáneamente afectan la proporción de neuronas en distintos estadios de diferenciación/maduración a los 2DIV. Para este objetivo se analizó la frecuencia de neuronas en los siguientes estadios: (1) soma redondeado, sin procesos y con lamelipodios; (2) neuritas cortas de similar longitud y sin axón Tau1 positivo; (3) con procesos elongados, y uno de ellos con más de 80µm de largo y positivo para el marcador axonal Tau1. Por último, se cuantificó el número de neuronas consideradas multipolares al tener dos o más procesos de 80µm y que ambos fueran Tau1 positivo. Imágenes representativas de estos estadios se pueden encontrar en la Figura 4. Para la cuantificación de estos experimentos se utilizó el plug-in cell counter y las herramientas de medición del software libre FIJI (Fiji is just ImageJ, <https://fiji.sc>).
- b) Determinar el efecto de pBDNF Val, pBDNF Met, o ambos pBDNFs simultáneamente sobre el largo axonal y dendrítico en neuronas en un estadio temprano de desarrollo (2DIV). Se cuantificaron solo las neuronas de estadio 3 (criterio descrito en el apartado anterior), donde los axones se identificaron como procesos Tau1 positivo, y las dendritas mediante la marcación de tubulina tirosinada (la cual marca todos los procesos) y que además fueran Tau1 negativas. La proteína asociada a microtúbulos MAP2 no fue utilizada como marcador de dendritas porque en este estadio temprano del desarrollo todavía se localiza en toda la célula. Para realizar estas mediciones se utilizaron las herramientas de medición de FIJI en imágenes previamente calibradas espacialmente.

A	Estadio 1	Estadio 2	Estadio 3	Multipolar
TyrTub				
Tau1				
Merge				
	Soma redondeado, sin procesos, con lamelipodios	Neuritas cortas de largo similar y sin axón Tau1+	Procesos elongados y uno más largo de 80µm y Tau1+	Dos o más procesos de al menos 80µm y Tau1+

B

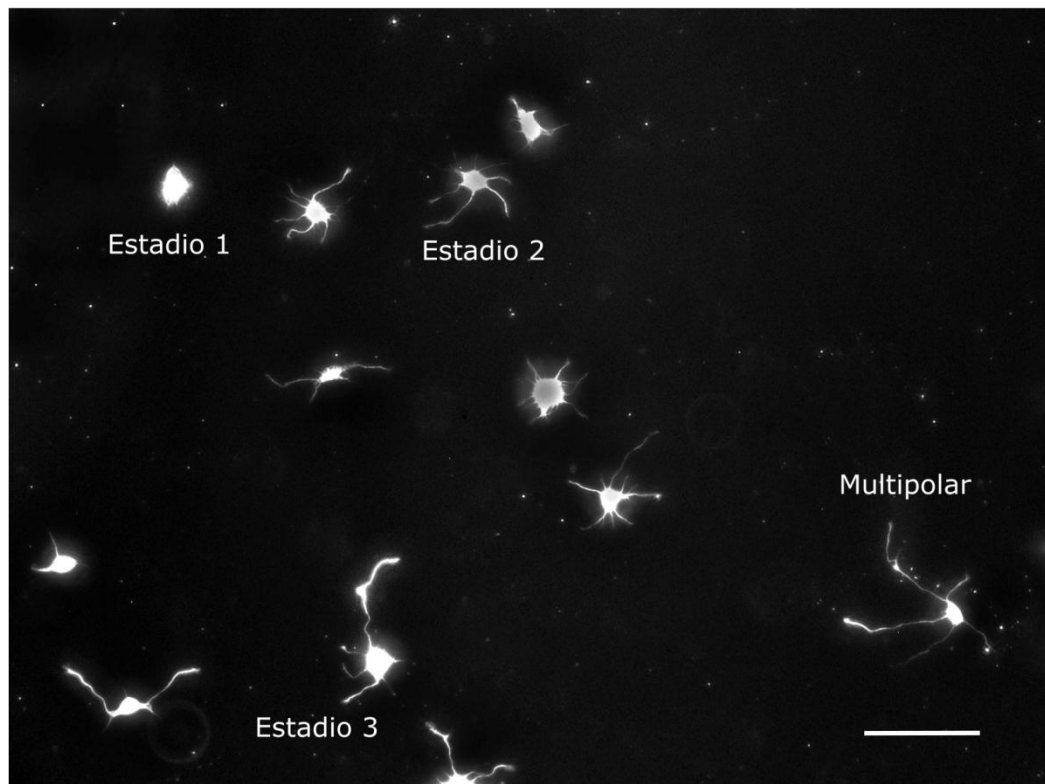


Figura 4: Criterios para la determinación de los distintos estadios de maduración de neuronas hipocampales *in vitro*. (A) Los estadios se caracterizan por presentar distinta morfología y por expresar proteínas distintas en diferentes compartimientos (axones y dendritas). Tau1 se encuentra presente en axones en estadios tempranos del desarrollo neuronal. Tubulina tiosinada (TyrTub) se encuentra presente en todos los procesos neuronales sin distinguir axones y dendritas. En estos estadios tempranos del desarrollo neuronal, la proteína MAP2 no es un buen marcador de dendritas como lo es en neuronas maduras; por lo tanto, las dendritas fueron consideradas como los procesos TyrTub+ Tau1-. Escala=30µm (B) Imagen de un campo con neuronas hipocampales marcadas para TyrTub donde se pueden observar los distintos estadios. Escala=100µm.

Diseño experimental Objetivo 2

- a) Determinar si pBDNF Val, pBDNF Met, o ambos pBDNFs juntos afectan la longitud axonal de neuronas en un estadio intermedio de diferenciación a los 9DIV. Para identificar los axones se realizó la doble inmunomarcación con anticuerpos contra tubulina tiosinada (presente en todos los procesos) y MAP2 (exclusiva de dendritas en este estadio de diferenciación). Los procesos cuantificados como axones fueron los tubulina tiosinada positivos y MAP2 negativos (Figura 5A). En este estadio Tau1 ya no se encuentra restringido solo a axones por eso no fue utilizado para su detección. La cuantificación se realizó poblacionalmente por campo (y no en neuronas individuales) en imágenes tomadas al azar de cada cultivo. Brevemente, se procedió a realizar una selección en el canal de MAP2 que luego fue sustraída de la imagen en el canal de tubulina tiosinada. La imagen resultante fue analizada con la herramienta “skeletonize” del software FIJI, la cual permite estimar la longitud total de procesos en la imagen provista (Figura 5A). Estas mediciones fueron realizadas en imágenes previamente calibradas espacialmente.
- b) Determinar si el pBDNF Val, pBDNF Met, o ambos pBDNFs juntos afectan la arborización dendrítica de neuronas en cultivo de 9 DIV. Se identificaron las dendritas mediante inmunodetección de MAP2, y se procedió a realizar el análisis de Sholl en neuronas individuales (Sholl, 1953) (Figura 5B). Este análisis permite estimar la complejidad del árbol dendrítico, número de ramificaciones, largo de los procesos, y largo de la dendrita más larga mediante la cuantificación de las intersecciones de dendritas con círculos concéntricos desde el soma neuronal de radios crecientes.

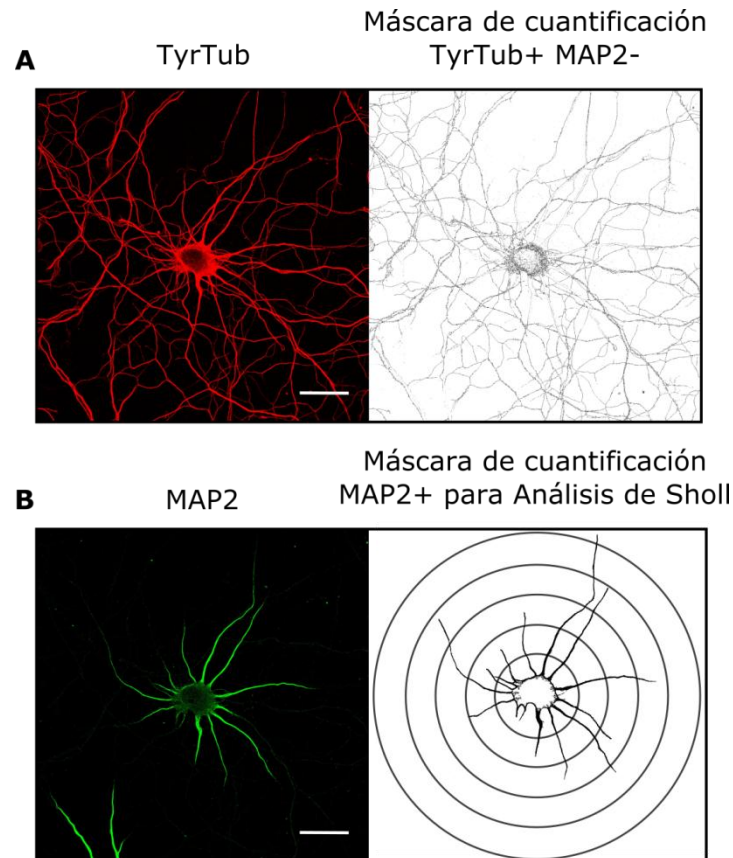


Figura 5: Determinación de la longitud axonal y la arborización dendrítica en neuronas de 9DIV. (A) La cuantificación de axones fue poblacional en imágenes de campos obtenidos al azar en los cultivos de neuronas hipocámpales. Para identificar los axones se realizó la doble inmunomarcación con anticuerpos contra tubulina tirosinada (TyrTub, presente en todos los procesos) y MAP2 (exclusiva de dendritas en este estadio de diferenciación). Los procesos cuantificados como axones fueron los TyrTub positivos y MAP2 negativos. Para esto, se realizó una selección en el canal de MAP2 que luego fue sustraída de la imagen en el canal de TyrTub. La imagen resultante fue analizada con la herramienta “skeletonize” del software FIJI, la cual permite estimar la longitud total de procesos. Escala=30 μ m. (B) Se identificaron las dendritas mediante inmunodetección de MAP2, y se procedió a realizar el análisis de Sholl en neuronas individuales. Este análisis permite estimar la complejidad del árbol dendrítico, número de ramificaciones, largo de los procesos, y largo de la dendrita más larga mediante la cuantificación de las intersecciones de dendritas con círculos concéntricos desde el soma neuronal de radios crecientes. Escala=30 μ m.

Diseño experimental Objetivo 3

Estudiar si pBDNF Val, pBDNF Met, o ambos pBDNFs combinados modifican la densidad de contactos sinápticos en cultivos de neuronas maduras a los 16 DIV. Para estimar el número de contactos sinápticos se realizaron doble inmunofluorescencias para detectar la proteína pre-sináptica sinaptofisina y la proteína post-sináptica PSD95. El criterio de cuantificación de contactos sinápticos fue arbitrario pero igual para todas las condiciones experimentales y repeticiones de los mismos. Se consideraron contactos sinápticos cuando detectamos (1)

superposición de objetos sinaptofisina+ y PSD95+, (2) contacto de objetos sinaptofisina+ y PSD95+, y (3) cercanía de objetos sinaptofisina+ y PSD95+ que se encuentren a una distancia máxima de 0,3 μm (Figura 6). La presencia de estos últimos fue minoritaria en las cuantificaciones. La cuantificación se realizó semiautomáticamente utilizando el software FIJI.

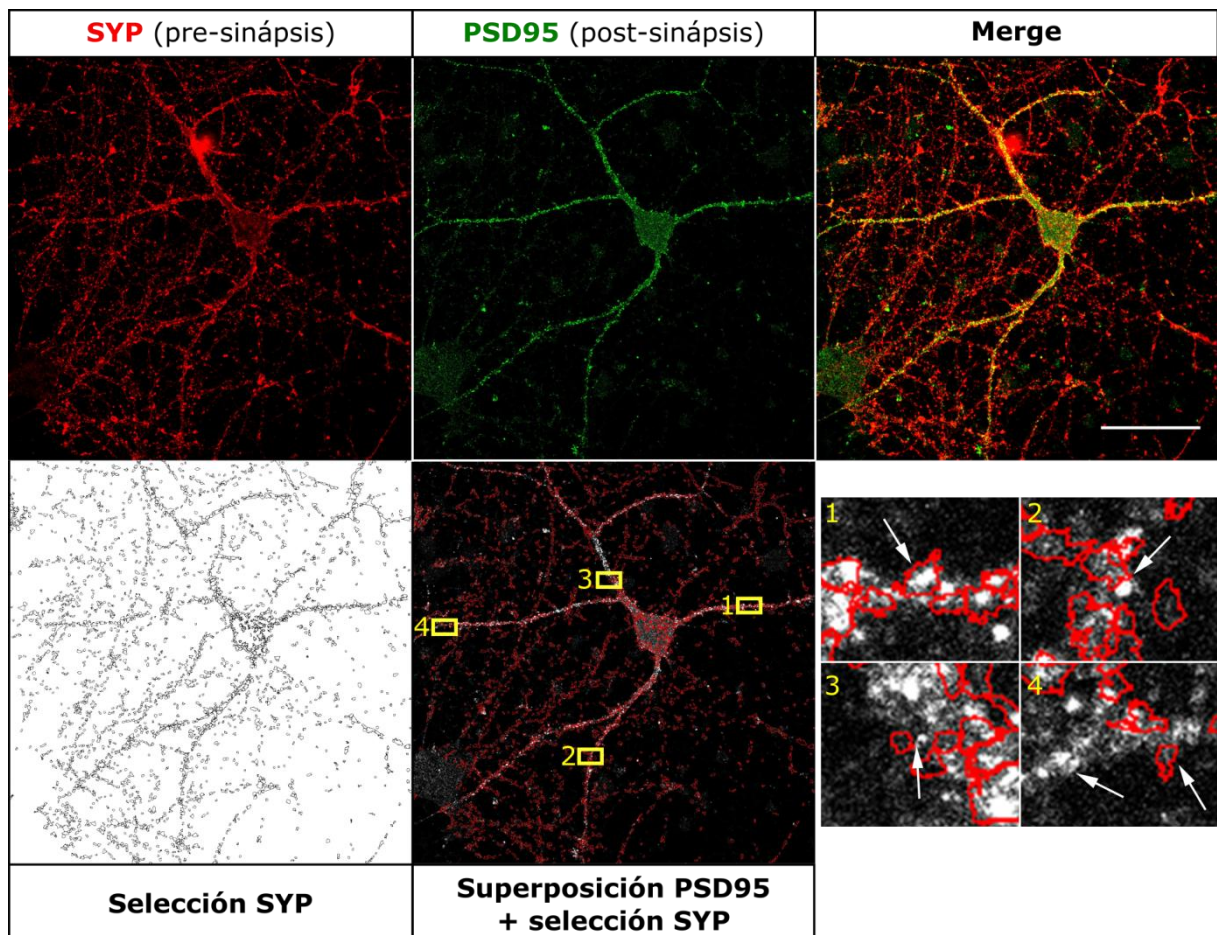


Figura 6: Estimación de la densidad de contactos sinápticos en neuronas de 16DIV. Cultivos hipocámpales fueron inmunomarcados para detectar las proteínas sinaptofisina (SYP, localización pre-sináptica) y PSD95 (localización post-sináptica) (paneles superiores). Se seleccionó en el canal de SYP una máscara que luego fue superpuesta sobre el canal de PSD95 (panel inferior izquierdo). Los criterios para considerar un contacto sináptico fueron los siguientes (ejemplos en panel inferior derecho, señalados con una flecha): (1) superposición de objetos SYP+ PSD95+; (2) contacto de objetos SYP+ PSD95+; (3) objetos SYP+ PSD95+ que se encuentran a menos de 0,3 μm de distancia; (4) ausencia de contacto sináptico. Escala=50 μm .

Cultivo de hipocampo

Se realizó mediante la técnica estándar. Brevemente, a partir de embriones de rata en estadio embrionario 18,5 (E18,5) se disecó el hipocampo y las neuronas se disociaron con tripsina (Gibco). Las neuronas fueron sembradas en cubreobjetos previamente tratados con polietilenimina (PEI, Sigma) y en medio de siembra (MEM + 10% suero de caballo + glutamax + penicilina/estreptomicina, todos de la marca Gibco) por 3hs. Posteriormente se reemplazó el medio por neurobasal (Gibco) con suplementos estándares (B27/GS21/B27+, glutamax, penicilina/estreptomicina, todos de la marca Gibco) sin suero. El medio se reemplazó parcialmente cada 3 días.

Producción y purificación de los pBDNF recombinantes (Anastasia *et al.*, 2013).

Se utilizó el plásmido pET28 (Novagen) que contiene el gen de pBDNF humano Val o Met (aminoácidos 19-128 del pBDNF precedidos por un tag N-terminal de 6 histidinas y Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO)). Este plásmido fue transformado en células competentes *E. coli* (BL21(DE3)pLysS) (Invitrogen). Las muestras de pBDNF fueron purificadas usando columnas cargadas con resina de níquel (Ni-NTA, Invitrogen). Luego, el tag de 6 histidinas y SUMO fue clivado por proteólisis con la enzima Ulp-1 que también contenía un tag de 6 histidinas. Para la purificación final de los pBDNF, la muestra fue seleccionada negativamente en una segunda columna con resina de níquel, donde el pBDNF ya sin tags fue obtenido en la fracción eluída (flow through). En esta segunda columna el tag de 6 histidinas + sumo y la proteína Ulp-1 fueron retenidas en la comuna. La proteína resultante fue precipitada usando acetona, resuspendida y dializada en 50mM NaH₂PO₄ 100mM NaCl pH 7.0. La pureza de los pBDNF fue evaluada por SDS-PAGE utilizando Coomassie blue y métodos de tinción de plata. La concentración de prodominios fue calculada usando el coeficiente de absorción UV para una proteína desordenada en agua ($\epsilon_{(280)}=4,470 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), y confirmada usando el método de Bradford.

Inmunofluorescencia

Los cultivos fueron fijados con 4% paraformaldehído (Aldrich) en PBS + 4% de sucrosa (Anedra). Las neuronas se permeabilizaron con 0,1% Tritón X100 (BioRad) en PBS. Para la inmunodetección de Tau1, tubulina tirosinada y MAP2, los cultivos fueron tratados con 0,1% Tween (Biopack) en PBS, y luego se utilizaron los

siguientes anticuerpos primarios: anti-Tau 1 hecho en ratón (1:500, 2 horas a temperatura ambiente (TA), Millipore), anti-tubulina tirosinada hecho en rata (1:1000, 2 horas a TA, Abcam), anti-MAP2 hecho en ratón (1:1000, 2 horas a TA, Sigma). Posteriormente se utilizaron anticuerpos secundarios anti IgG de ratón y rata conjugados con fluoróforos Alexa (488 y 568, ThermoFisher), y Dapi (Dako) para identificar los núcleos. Para la inmunodetección de contactos sinápticos los cultivos fueron bloqueados con 5% de suero de caballo (Gibco) en PBS, y luego se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-sinaptofisina hecho en conejo (1:1500, 18 horas a 4°C, Santa Cruz) y anti-PSD95 hecho en ratón (1:250, 18 horas a 4°C, Abcam). Posteriormente se utilizaron anticuerpos secundarios anti IgG de ratón y conejo conjugados con fluoróforos Alexa (488 y 546, ThermoFisher), y Dapi para identificar los núcleos.

Microscopía

Para controlar las inmunodetecciones se utilizó un microscopio de epifluorescencia (Nikon, Eclipse TE-2000E). Las imágenes para el objetivo 1 y objetivo 2 fueron adquiridas un microscopio invertido (Olympus IX81) equipado con epifluorescencia y contraste de interferencia diferencial (DIC) usando un objetivo de 20X y un microscopio confocal ZEISS LSM 800. Para la detección de contactos sinápticos del objetivo 3 solo se adquirieron las imágenes en un microscopio confocal ZEISS LSM 800 ya que se requiere una mayor resolución espacial en el plano z para poder colocalizar las marcas precisamente.

Análisis de imágenes y estadístico

Los análisis de imágenes se realizaron con el programa informático FIJI (<https://fiji.sc>), y los estadísticos mediante Infostat (Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad Nacional de Córdoba). Para el objetivo 1, se cuantificaron 5 experimentos independientes, 1 cubreobjeto por cada tratamiento de cada experimento, y 50 neuronas por cubreobjeto aproximadamente. Para el objetivo 2, se cuantificaron 2 experimentos independientes, 1 o 2 cubreobjetos por cada tratamiento de cada experimento, y 50 neuronas por cubreobjeto aproximadamente. Para el objetivo 3, se cuantificaron 4 experimentos independientes, 1 cubreobjeto por tratamiento de cada experimento, y 5 neuronas por cubreobjeto. Se analizaron los datos y los errores para determinar si se distribuían ajustándose a una normal en

cuyo caso se utilizó ANAVA. Alternativamente se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis en las comparaciones de los tratamientos según correspondía. Las diferencias fueron consideradas significativas con $p < 0,05$.

Resultados

pBDNF Val o Met no afectan la dinámica de maduración de neuronas hipocampales en cultivo.

El desarrollo, maduración y plasticidad de las redes neuronales se basan en la correcta diferenciación de sus axones y dendritas, en la elongación, arborización y retracción de dichos procesos neuronales, y en la dinámica de sus contactos sinápticos. Condiciones genéticas y/o ambientales que afecten cualquiera de estos eventos del desarrollo de las neuronas hipocampales podrían resultar en alteraciones en la conexión de sus circuitos y en consecuentes dolencias humanas como enfermedades neuropsiquiátricas o neurodegenerativas. Por lo tanto, y como una primera aproximación, estudiamos si las variantes de pBDNF Val o Met afectan la dinámica del establecimiento de la polaridad en neuronas hipocampales. Para este objetivo, neuronas de 1DIV fueron administradas con pBDNF Val, pBDNF Met, o ambos conjuntamente, y 24 horas después (DIV2) se cuantificó la proporción de neuronas que se encontraban en estadio 1 (soma redondeado, sin procesos y con lamelipodios), estadio 2 (neuritas cortas de similar longitud y sin axón Tau1+), estadio 3 (con procesos elongados, y uno de ellos con más de 80µm de largo y positivo para el marcador axonal Tau1), o multipolares (dos o más procesos de 80µm y que ambos fueran Tau1+). La condición experimental en donde ambos pBDNFs fueron administrados simultáneamente tiene como objetivo estudiar si la presencia de las dos variantes al mismo tiempo tienen un efecto antagónico, aditivo, sinérgico o si simplemente no interactúan. Esta condición experimental, junto con experimentos que exceden el presente plan, permitirán simular la condición de heterocigosis en donde ambas variantes son secretadas por neuronas en concentraciones equimolares.

La proporción de neuronas en los estadios estudiados no fue afectada significativamente por el tratamiento con las variantes de pBDNF, juntos o por separado (Figura 7). La proporción de neuronas en estadio 1 y las multipolares fueron entre 4 y 7% independientemente del tratamiento. La cantidad de neuronas en estadio 2 varió entre 49 y 64% en las distintas condiciones experimentales, mientras que las neuronas en estadio 3 fueron entre el 26 y el 40% del total en los distintos tratamientos (Figura 7).

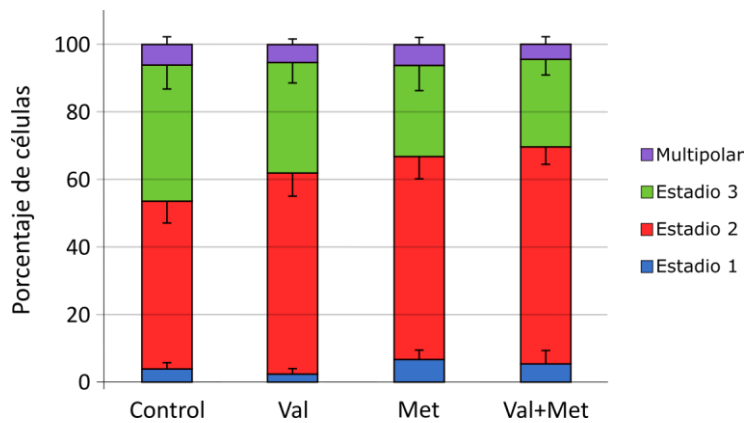


Figura 7: pBDNF Val o Met no afectan la dinámica de maduración de neuronas hipocampales en cultivo. Proporción de neuronas hipocampales en distintos estadios de maduración a los 2DIV y que fueron previamente administradas en el medio de cultivo con pBDNF Val, pBDNF Met, ambos simultáneamente, o con vehículo (PBS) como control durante 24hs. No se observaron diferencias significativas en la proporción de neuronas en cada estadio en ninguna condición experimental.

pBDNF Val o Met no alteran el número, ramificaciones y longitud de los procesos neuronales en un estadio temprano del desarrollo.

Se conoce que pBDNF Met induce el colapso y retracción de conos de crecimiento en neuronas hipocampales inmaduras (Anastasia *et al.*, 2013). Este efecto ocurre a los 20-30 minutos luego de su administración. Teniendo en cuenta estos resultados, que el ~80% de las neuronas de 1-2DIV expresan el receptor p75NTR (Anastasia *et al.*, 2013), y que virtualmente todas las neuronas a este tiempo en cultivo expresan el receptor SorCS2 (Anastasia *et al.*, 2013; Deinhardt *et al.*, 2012), estudiamos si la presencia de variantes de pBDNF por un tiempo más prolongado (24 horas) pueden afectar la longitud, ramificaciones y número de dendritas y axones. Los cultivos hipocampales de 1DIV fueron administrados con pBDNF Val, pBDNF Met, o ambos conjuntamente, y 24 horas después (DIV2) se cuantificaron las siguientes variables: (1) largo axonal (identificado como la neurita Tau1+ con más de 80µm) (Figura 8B), (2) número de ramificaciones por axón (Figura 8C), (3) longitud de dendritas por célula (identificadas como procesos tubulina tirosinada (TyrTub)+ Tau1-) (Figura 8D), (4) número de dendritas por neurona (Figura 8E). Estas cuantificaciones fueron realizadas solamente en neuronas en estadio 3 (con procesos elongados, y uno de ellos con más de 80µm de largo y positivo para el marcador axonal Tau1). No se observaron diferencias significativas en ninguna de estos cuatro parámetros analizados y en ninguna de las condiciones experimentales (Figura 8A-E).

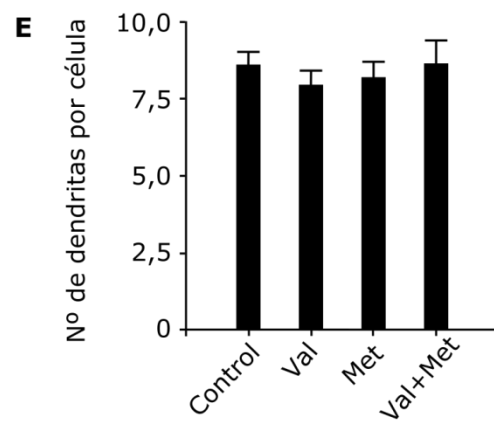
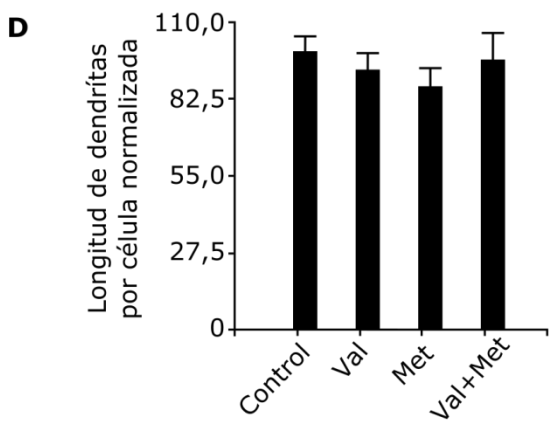
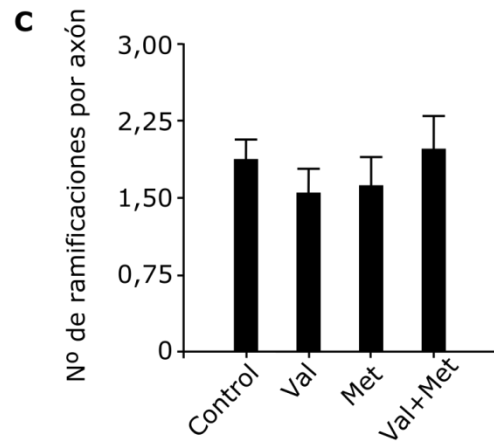
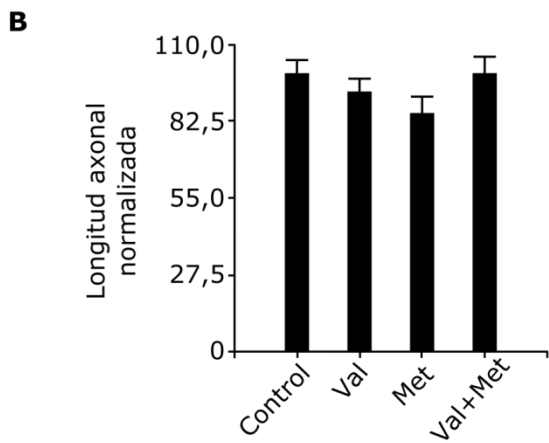
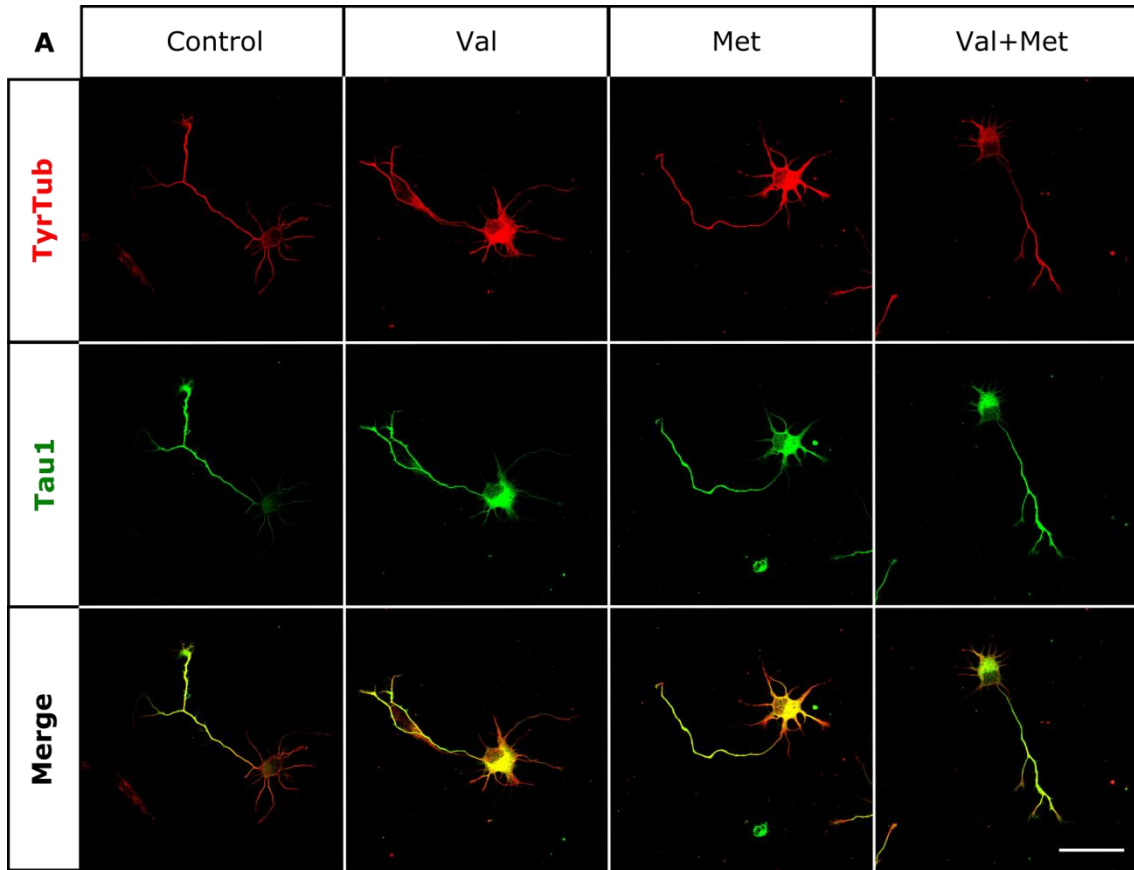


Figura 8: pBDNF Val o Met no alteran el número, ramificaciones y longitud de los procesos neuronales en un estadio temprano del desarrollo (DIV2). Neuronas hipocampales de 1DIV fueron administradas por 24hs con pBDNF Val, pBDNF Met, ambos simultáneamente, o con vehículo (PBS) como control. Se cuantificaron parámetros morfométricos axonales y dendríticos solo en las neuronas en estadio 3. (A) Micrografías representativas de neuronas en estadio 3 en cultivos de 2 DIV marcadas mediante inmunofluorescencia contra la proteína axonal Tau1 y tubulina tiosinada (TyrTub, presente en todos los procesos neuronales). Escala=50 μ m. (B) Cuantificación de la longitud axonal. (C) Cuantificación del número de ramificaciones por axón. (D) Cuantificación de la longitud total de todas las dendritas de cada neurona, incluyendo ramificaciones si las hubiere. (E) Cuantificación del número de dendritas por célula. No se detectaron diferencias significativas en ningún parámetro medido de las diferentes condiciones experimentales.

pBDNF Val o Met no alteran la longitud axonal y la arborización dendrítica en un estadio intermedio del desarrollo neuronal.

Ratones knock-in que expresan la variante Met de pBDNF exhiben una complejidad dendrítica disminuida en neuronas hipocampales *in vivo* (Chen *et al.*, 2006). Se desconocen los mecanismos por los cuales este péptido altera la citoarquitectura neuronal. Una hipótesis es que pBDNF Met actúa como un ligando y afecta la citoarquitectura neuronal, como se ha observado de manera aguda en conos de crecimiento (Anastasia *et al.*, 2013). Para poner a prueba esta hipótesis, cultivos hipocampales de 8DIV fueron administrados con pBDNF Val, pBDNF Met, o ambos conjuntamente, y 24 horas después (DIV9) se cuantificó la longitud total de los axones y la complejidad dendrítica (Figura 5, materiales y métodos). La longitud axonal fue estimada poblacionalmente por campo analizando procesos TyrTub positivos y MAP2 negativos (Figura 9A). La administración de una o ambas variantes de pBDNF no indujo cambios detectables en la longitud axonal total por campo (Figura 9B). Adicionalmente, la complejidad del árbol dendrítico fue estimado mediante el análisis de Sholl sobre los procesos MAP2 positivos (Figura 5B, materiales y métodos). Este análisis consiste en cuantificar las intersecciones de las dendritas con círculos concéntricos (que incrementan su radio de a 5 μ m) que parten desde el soma neuronal. En la Figura 10 se muestra que a un radio de aproximadamente 35 μ m, las neuronas alcanzan un pico de entre 9 y 11 dendritas que intersecan ese radio, independientemente de la condición experimental. A su vez, se puede observar que las dendritas más largas tienen aproximadamente 120 μ m desde el soma, sin detectarse diferencias significativas en este parámetro entre los tratamientos.

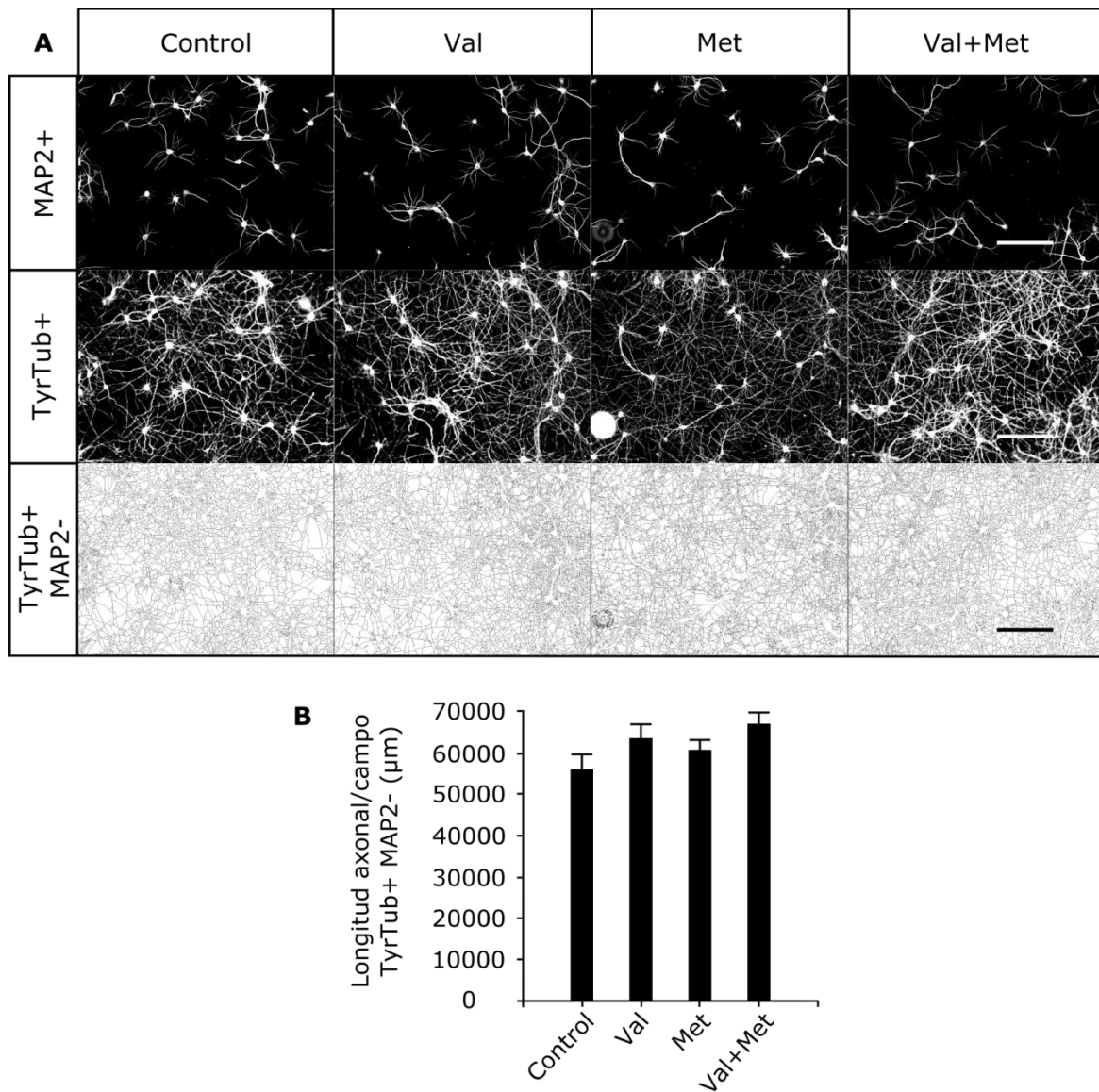


Figura 9: pBDNF Val o Met no alteran la longitud axonal en un estadio intermedio del desarrollo neuronal (DIV9). Neuronas hipocampales de 8DIV fueron administradas por 24hs con pBDNF Val, pBDNF Met, ambos simultáneamente, o con vehículo (PBS) como control. (A) Imágenes representativas de procesos MAP2+ (dendritas, paneles superiores), de todos los procesos marcados para tubulina tiosinada (TyrTub, paneles medios), y de la máscara de cuantificación que resulta de la sustracción de una selección de MAP2 al canal de TyrTub (TyrTub+ MAP2-, paneles inferiores). En esta máscara se estimó poblacionalmente la longitud axonal total por campo. Escala=200μm (B) Cuantificación de la longitud axonal por campo en las distintas condiciones experimentales.

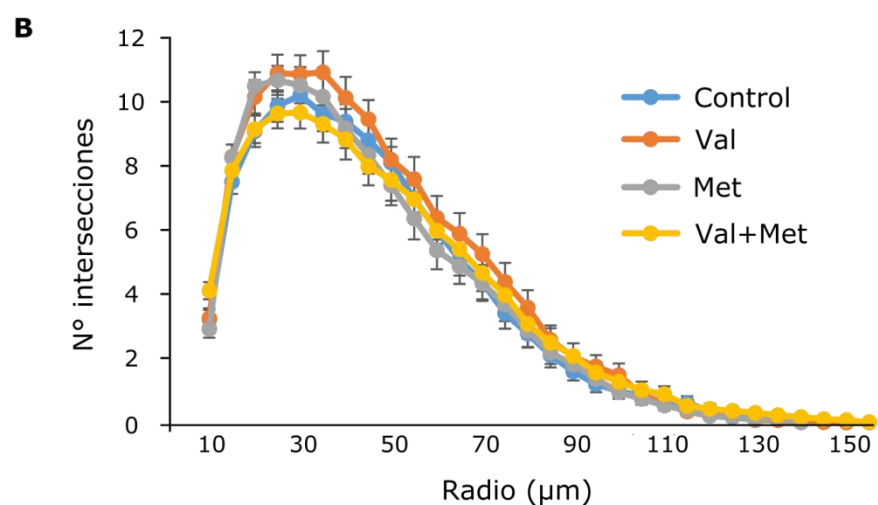
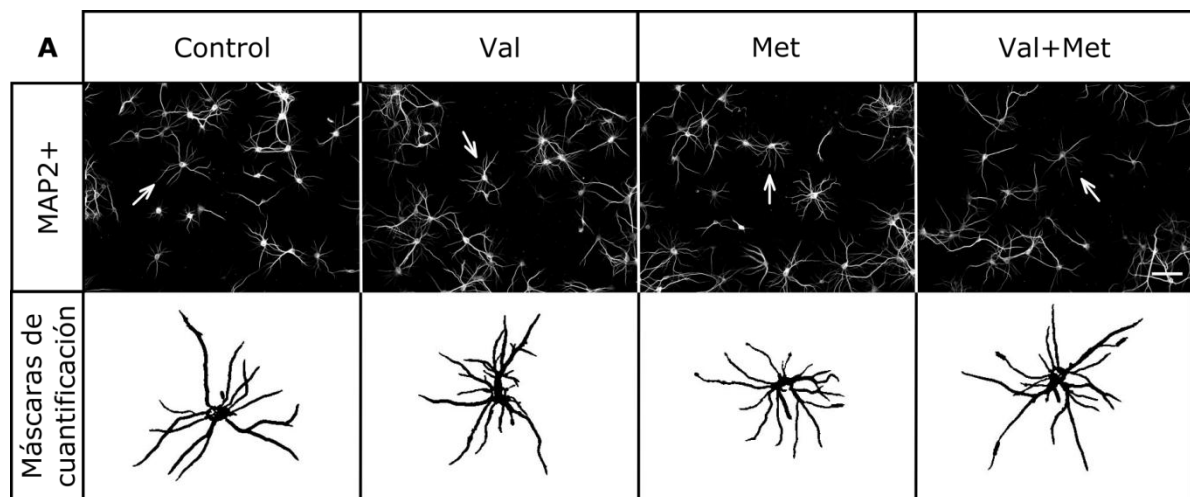


Figura 10: pBDNF Val o Met no alteran la arborización dendrítica en un estadio intermedio del desarrollo neuronal (DIV9). Neuronas hipocámpicas de 8DIV fueron administradas por 24hs con pBDNF Val, pBDNF Met, ambos simultáneamente, o con vehículo (PBS) como control. (A) Imágenes representativas de procesos MAP2+ (dendritas, paneles superiores) y sus respectivas máscaras utilizadas para la cuantificación. Las flechas en los paneles superiores señalan las neuronas de las cuales se muestran las máscaras representativas utilizadas en cuantificación (paneles inferiores). Escala=100µm. (B) Análisis de Sholl realizado sobre las máscaras obtenidas de imágenes MAP2+ de (A), donde se observa la complejidad dendrítica en las distintas condiciones experimentales. El gráfico muestra el número de intersecciones de dendritas con radios concéntricos generados cada 5 µm desde el soma neuronal.

Ambas variantes de pBDNF disminuyen el número de contactos sinápticos en neuronas maduras.

Recientemente, en un trabajo en colaboración entre nuestro grupo de investigación y el laboratorio del Dr. Francis S. Lee (Weill Cornell Medical College, Nueva York, USA), demostramos que pBDNF Met altera de manera aguda la forma de espinas dendríticas. Esta variante es capaz de convertir espinas maduras con

forma de hongo (asociadas con sinapsis activas), en espinas finas o filopodiales (consideradas inactivas) en 1 a 3 horas de tratamiento con la proteína recombinante. En estos estudios pBDNF Val fue inactivo. Sin embargo, se desconoce el impacto de las variantes de pBDNF por tiempos más prolongados y si afectan el número de contactos sinápticos. Por lo tanto, cultivos hipocampales de 15DIV fueron administrados con pBDNF Val, pBDNF Met, o ambos conjuntamente, y al cabo de 24 horas (DIV16) se estimó el número de contactos sinápticos mediante la inmunodetección de la proteína pre-sináptica sinaptofisina (SYP) y simultáneamente la proteína post-sináptica PSD95. A partir de la superposición de ambas marcas (Figura 6, materiales y métodos) se estimó el número de contactos sinápticos como objetos SYP+ PSD95+ superpuestos o muy próximos entre sí (criterios detallados en materiales y métodos). La densidad de contactos sinápticos fueron diferenciados en dendritas de primer orden (que emergen directamente desde el soma) o de segundo orden (que surgen a partir de una dendrita primaria y en un punto de ramificación).

Sorprendentemente, tanto pBDNF Val como pBDNF Met disminuyeron el número de contactos sinápticos en dendritas de primer orden y de segundo orden (Figura 11A-C). Esta es la primera vez que se detecta un efecto de pBDNF Val, presente en el sistema nervioso central del 75% de la población mundial, en la estructura neuronal y utilizando dosis fisiológicamente relevantes. Interesantemente, en las dendritas de primer orden, el número de contactos sinápticos en las neuronas tratadas simultáneamente con ambos pBDNF (Val+Met) fue significativamente menor que en el control y que con el agregado de ambas variantes por separado (Figura 11B).

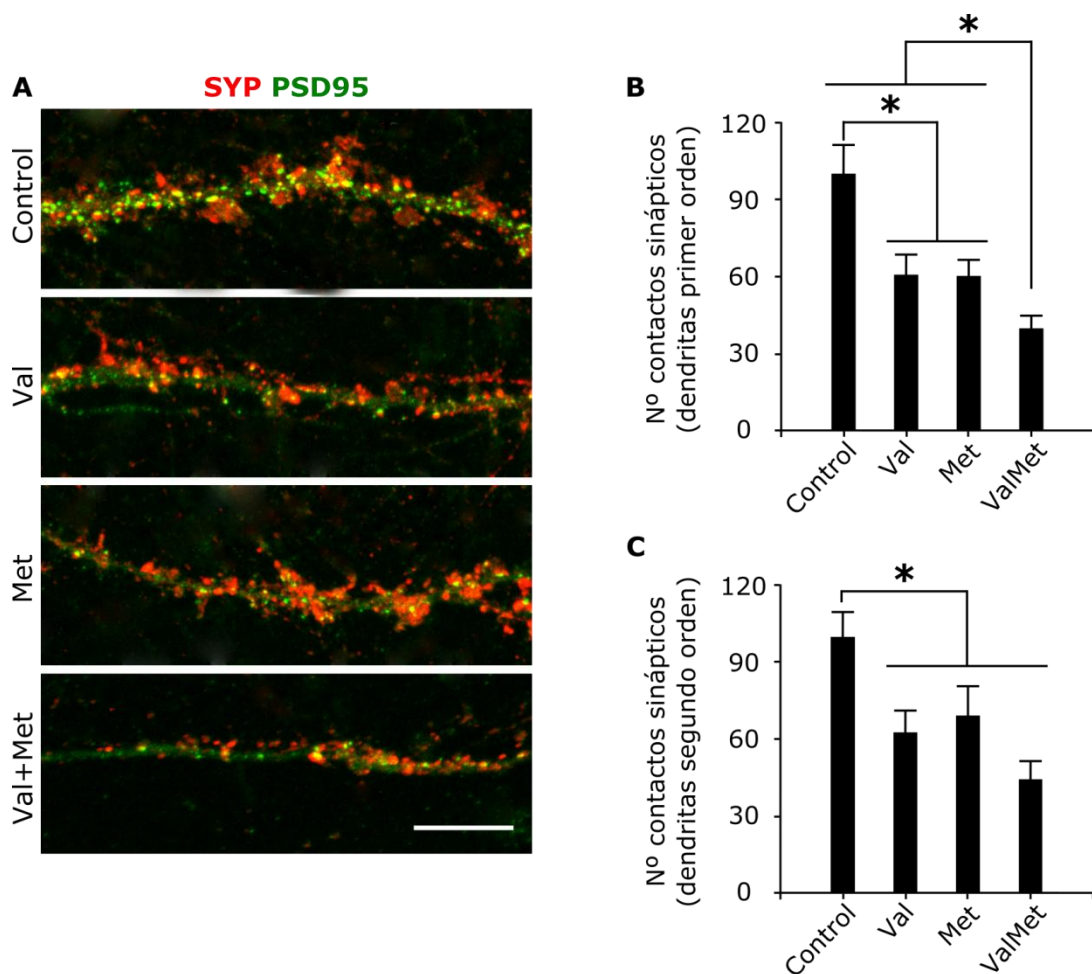


Figura 11: Ambas variantes de pBDNF disminuyen el número de contactos sinápticos en neuronas maduras (DIV16). Neuronas hipocámpales de 15DIV fueron administradas por 24hs con pBDNF Val, pBDNF Met, ambos simultáneamente, o con vehículo (PBS) como control. (A) Micrografías representativas de segmentos de dendritas de primer orden (que emergen directamente desde el soma neuronal) innumaradas con sinaptofisina (SYP, marcador pre-sináptico en rojo) y con PSD95 (marcador post-sináptico en verde) en las distintas condiciones experimentales. Escala=10µm (B) Cuantificación de contactos sinápticos en dendritas primarias (criterios de cuantificación en materiales y métodos). La cuantificación se encuentra normalizada llevando la condición control (PBS) al 100%. Se observó que pBDNF Val y Met disminuyen el número de contactos sinápticos significativamente, y si ambos son administrados conjuntamente su efecto podría ser aditivo. (C) Cuantificación de contactos sinápticos en dendritas de segundo orden (que nacen de una dendrita de primer orden a partir de un punto de ramificación). La cuantificación se encuentra normalizada llevando la condición control (PBS) al 100%. En este caso también se detectó que pBDNF Val y Met disminuyen el número de contactos sinápticos significativamente, sin embargo no se encontró un efecto aditivo significativo. *= $p \leq 0,05$.

Discusión

Las funciones de las redes neuronales dependen de la correcta diferenciación de sus axones y dendritas, de la elongación, arborización y retracción de dichos procesos neuronales, y de la plasticidad sináptica. Condiciones genéticas y/o ambientales que afecten cualquiera de estos eventos del desarrollo de las neuronas hipocampales podrían resultar en alteraciones en la conexión de sus circuitos y en enfermedades neuropsiquiátricas o neurodegenerativas. Por lo tanto, se requieren señales dinámicas y precisas que regulen constitutivamente y de manera dependiente de la actividad, la citoarquitectura neuronal. En este trabajo encontramos, por primera vez, que pBDNF (un péptido recientemente encontrado en el sistema nervioso central; Anastasia *et al.*, 2013) disminuye el número de contactos sinápticos cuando es administrado como un ligando en dosis fisiológicamente relevantes (similares a las encontradas en el líquido cefalorraquídeo humano, manuscrito en preparación). Un trabajo previo encontró utilizando dosis más elevadas, que pBDNF Val disminuye la densidad de espinas dendríticas (Guo *et al.*, 2016). Sin embargo, se requieren estudios para determinar la relevancia biológica de estas concentraciones. Existe un polimorfismo de nucleótido único (SNP) en el gen de BDNF humano que induce la sustitución de una valina por una metionina (Val66Met) en medio de la secuencia de pBDNF. Este SNP está presente en ~25% de la población mundial y se encuentra asociado con diversas enfermedades neuropsiquiátricas. Sin embargo, en el presente estudio encontramos que ambos pBDNFs, Val o Met, inducen cambios similares en la densidad de contactos sinápticos. Además, si ambos pBDNFs son administrados simultáneamente se observa una disminución aun mayor comparada con los pBDNFs por separado. Pero, este efecto combinado no resultó en la sumatoria de los efectos de los péptidos por separado. Una posible explicación es que los pBDNFs, los cuales interactúan con SorCS2 (Anastasia *et al.*, 2013), saturan este receptor debido a la doble concentración absoluta administrada en esta condición experimental. Teniendo en cuenta todos estos resultados, proponemos que ambos pBDNFs son moduladores de la densidad de contactos sinápticos, y esta función no estaría relacionada con la patogénesis de desórdenes neuropsiquiátricos en los humanos portadores del SNP Val66Met.

El gen de BDNF codifica, en un mismo exón, para el precursor proBDNF que luego es escindido enzimáticamente para liberar dos productos activos: pBDNF y mBDNF. Se conoce que mBDNF incrementa la densidad de espinas dendríticas (Alonso, Medina y Pozzo-Miller, 2004); sin embargo, nuestro estudio sugiere que las acciones de pBDNF resultan en una menor densidad de contactos sinápticos. Además, estos dos péptidos se producen en cantidades equimolares y se secretan por las mismas vesículas (Anastasia *et al.*, 2013; Dieni *et al.*, 2012). La pregunta que surge inevitablemente es porqué pBDNF y mBDNF, que tienen efectos diferentes o incluso opuestos, se sintetizan a partir del mismo gen/exón y se secretan conjuntamente. Una respuesta posible es que las funciones biológicas reguladas por estos productos génicos son extremadamente importantes para la homeostasis del sistema nervioso. Por lo tanto, diferentes funciones peptídicas pueden regular con precisión el ajuste fino de los circuitos neuronales. En concordancia con esta hipótesis, recientemente se ha propuesto que las tres isoformas de BDNF (proBDNF, pBDNF y mBDNF) conjuntamente son protagonistas cruciales para la neuroplasticidad inducida por antidepresivos y en las respuestas conductuales al estrés (Diniz, Casarotto, Resstel y Sâmia, 2018).

Previamente se ha publicado que pBDNF Met induce el colapso de conos de crecimiento de manera aguda (en 20 minutos) en neuronas hipocampales de 3DIV (Anastasia *et al.*, 2013). Sin embargo, en el presente trabajo, se observó que ninguna de las dos variantes de pBDNF, presentes por 24 horas en el medio de cultivo, provocaron cambios sobre distintos parámetros morfométricos en estadios tempranos (DIV2) del desarrollo neuronal. Una posible explicación, es que el fenómeno agudo de colapso de los conos de crecimientos sea corto y reversible alterando vías de señalización y elementos del citoesqueleto transitoriamente. Alternativamente, la presencia de pBDNFs por 24hs podría resultar en la síntesis de otras moléculas de señalización endógenas y/o receptores que compensen sus efectos, y que al cabo de cierto tiempo las neuronas puedan continuar con el desarrollo normal de sus dendritas y axones. En este estudio, tampoco se observaron cambios en la longitud axonal y complejidad del árbol dendrítico inducidos por ninguna de las variantes de pBDNF (por 24 horas en el medio de cultivo) en estadios intermedios (DIV9) del desarrollo neuronal. Cabe remarcar que, tanto a 2DIV como a 9DIV, los receptores conocidos para pBDNF (p75NTR y

SorCS2) se encuentran presentes en la gran mayoría de las neuronas del cultivo (Anastasia *et al.*, 2013; Giza *et al.*, 2018).

Se conoce las neuronas de la región CA1 del hipocampo de ratones knock-in que expresan el pBDNF Met (BDNF Met/Met), muestran una arborización dendrítica reducida en comparación con los ratones que expresan pBDNF Val (BDNF Val/Val) (Chen *et al.*, 2006). Sin embargo, en nuestro trabajo encontramos que pBDNF Met administrado como un ligando exógeno es inactivo en cultivos de 2DIV y 9DIV. Esta diferencia entre las neuronas que expresan endógenamente los pBDNFs y la administración exógena de los mismos, puede deberse a efectos de esta variante cuando se encuentra presente en la ruta biosintética (retículo endoplásmico, aparato de Golgi, o vesículas). Por ejemplo, este péptido podría estar afectando el tráfico de proteínas como receptores y moléculas de señalización, de esta manera modificando la citoarquitectura neuronal. Recientemente hemos encontrado que ambas variantes de pBDNF multimerizan en presencia de zinc formando clusters (manuscrito en preparación de nuestro laboratorio). Este ion está presente en distintas cantidades en los compartimientos de la ruta secretoria. Por lo tanto, una posibilidad es que la multimerización en organelas de esta vía, sea necesaria para inducir el plegamiento de los pBDNFs en una conformación más favorable. Por estas razones, estamos interesados en estudiar los efectos del polimorfismo Val66Met en el tráfico intracelular de proteínas cuando las variantes de pBDNF se encuentran presentes en los compartimientos de la vía exocítica (ya sean endógenas o sobreexpresadas), y no sólo como un ligando suministrado al medio de cultivo como hemos experimentado en el presente trabajo.

Como se dijo anteriormente, el 20% de la población mundial expresa el polimorfismo Val66Met en heterocigosis generando pBDNF Val y Met en cantidades equimolares. Considerando también que las vesículas secretorias contienen y secretan mBDNF junto a estos dos pro-péptidos, experimentos futuros determinarán el impacto fisiológico y/o patológico de estas moléculas de señalización conjuntamente. El correcto establecimiento de circuitos neuronales modelados por las isoformas de BDNF, probablemente también dependa del balance de receptores TrkB, sortilina, SorCS2, y p75NTR expuestos en la membrana plasmática. Otra variable involucrada en las respuestas de estas isoformas es la biodisponibilidad de cada una, que depende de su vida media y de otros receptores que las puedan estar capturando. También resulta interesante estudiar los efectos de los pBDNF Val y Met

endógenos en los distintos estadios de maduración de neuronas hipocampales. Para estos experimentos se utilizarán cultivos primarios de hipocampo provenientes de ratones knock-in que expresan bajo los promotores endógenos pBDNF Val (BDNF Val/Val), pBDNF Met (BDNF Met/Met), o ambos simultáneamente en heterocigosis (BDNF Val/Met). Por último, dilucidar los mecanismos moleculares, incluyendo vías de señalización y elementos del citoesqueleto involucrados, es de particular interés para conocer el desarrollo normal del sistema nervioso y la variedad de enfermedades neuropsiquiátricas en las cuales las isoformas de esta neurotrofina han sido involucradas.

La mayoría de los factores de crecimiento y hormonas se sintetizan como precursores inmaduros y se cree que sus prodominios funcionan principalmente para promover el correcto plegamiento de la proteína, para dirigir el tráfico intracelular o para bloquear el dominio maduro y de esta manera limitar su biodisponibilidad (Shi *et al.*, 2011). Nuestro grupo de investigación ha demostrado en una publicación reciente que pBDNF endógeno es secretado por neuronas hipocampales y que además se distribuye en varias regiones del sistema nervioso central (Anastasia *et al.*, 2013). En otros estudios se demostró que la variante Met es activa, ya que es capaz de inducir la retracción de los conos de crecimiento (Anastasia *et al.*, 2013), inhibir la depresión a largo termino (LTD) (Mizui *et al.*, 2015), y dismantelar la estructura de las espinas dendríticas maduras (Giza *et al.*, 2018). Sin embargo, en estos trabajos previos, pBDNF Val había resultado inerte. Aquí, demostramos por primera vez que pBDNF Val regula el número de contactos sinápticos. Por lo tanto, proponemos que es una nueva molécula de señalización relevante para el desarrollo del sistema nervioso central.

Agradecimientos

A mi familia, sobre todo a mamá y a papá, quienes me han dado su apoyo de manera incondicional, y aún lo siguen haciendo.

A la educación pública.

A mis amigas del cole, quienes a pesar de los diferentes caminos que decidimos tomar, han estado siempre que las necesité.

A Pachu, Lu, Flor, Giuli, Tati, Juan y Agos; la palabra Biología será un eterno recuerdo de ustedes, y todo lo que compartimos a lo largo de estos años.

A mis compañeros de la carrera; las clases y sobre todo los (no tan ansiados) viajes de campo, no hubieran sido igual sin ustedes.

A Agos y Tere, por contenerme y acompañarme siempre.

Al Agus, un mentor increíble, que con tanta pasión y dedicación me ha guiado como nadie lo hubiera hecho.

A Mili y Mile, compañeras de equipo que siempre supieron cómo estar para que nada se saliera (tanto) de control.

A la gente del Instituto Ferreyra quienes han hecho de esta experiencia un período de gran aprendizaje, con momentos hermosos y llenos de risas.

A Mariano Bisbal, por los preciosos cultivos que hicieron posible este trabajo.

Al CIN (Consejo Interuniversitario Nacional) por la BECA “Estímulo a las Vocaciones Científicas 2017” (EVC-CIN).

A las fuentes de financiamiento de nuestro proyecto: NARSAD Young Investigator Grant de la Brain y Behavior Research Foundation, PICT-FONCyT de la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica del Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación.

Bibliografía

- Alonso, M., Medina, J. H., y Pozzo-Miller, L. (2004). ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learning y memory*, 11(2), 172-178.
- Anastasia, A., Deinhardt, K., Chao, M. V., Will, N. E., Irmady, K., Lee, F. S., ... Bracken, C. (2013). Val66Met Polymorphism of BDNF Alters Prodomain Structure to Induce Neuronal Growth Cone Retraction. *Nature Communications*, 4, 2490.
- Barde, Y. A. (1994). Neurotrophic factors: an evolutionary perspective. *Developmental Neurobiology*, 25(11), 1329-1333.
- Barde, Y. A., Edgar, D., y Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO Journal*, 1(5), 549-553.
- Bassett, D. S. y Bullmore, E. T. (2009) Human brain networks in health and disease. *Curr. Opin. Neurol.* 22:340-347.
- Bradke, F., y Dotti, C. G. (1999). The role of local actin instability in axon formation. *Science*, 283(5409), 1931-1934.
- Bueller, J. A., Aftab, M., Sen, S., Gomez-Hassan, D., Burmeister, M., y Zubieta, J. (2006) BDNF Val66Met allele is associated with reduced hippocampal volume in healthy subjects. *Biol Psychiatry*, 59:812- 815.
- Cáceres, A. y Kosik, K. S. (1990) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature*, 343(6257):461-3.
- Cáceres, A., Banker, G.A., y Binder, L. (1986) Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci.*, 6(3):714-22.
- Cáceres, A., Ye, B., y Dotti, C. G. (2012) Neuronal polarity: demarcation, growth and commitment. *Current Opinion in Cell Biology*, 24:1-7.
- Chen, Z. Y., Ieraci, A., Teng, H., Dall, H., Meng, C. X., Herrera, D. G., ... y Lee, F. S. (2005). Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *Journal of Neuroscience*, 25(26), 6156-6166.

- Chen, Z. Y., Jing, D., Bath, K. G., Ieraci, A., Khan, T., Siao, C. J., ... y Hempstead, B. L. (2006). Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science*, 314(5796), 140-143.
- Chen, Z. Y., Patel, P. D., Sant, G., Meng, C. X., Teng, K. K., Hempstead, B. L., y Lee, F. S. (2004). Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF)(Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. *Journal of Neuroscience*, 24(18), 4401-4411.
- Cohen, S., Levi-Montalcini, R., y Hamburger, V. (1954). A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcom as 37 and 180. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 40(10), 1014–1018.
- Da Silva, J. S., Medina, M., Zuliani, C., Di Nardo, A., Witke, W., y Dotti, C. G. (2003). RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *The Journal of cell biology*, 162(7), 1267-1279.
- Deinhardt K, Kim T, Spellman DS, Mains RE, Eipper BA, Neubert TA, ... Hempstead BL. (2012) Neuronal growth cone retraction relies on proneurotrophin receptor signaling through Rac. *Sci Signal*, 4(202):ra82.
- Dieni, S., Matsumoto, T., Dekkers, M., Rauskolb, S., Ionescu, M. S., Deogracias, R., ... Barde, Y. A. (2012). BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J Cell Biol*, jcb-201201038.
- Diniz, C. R., Casarotto, P. C., Resstel, L., y Sâmia, R. J. (2018). Beyond good and evil: a putative continuum-sorting hypothesis for the functional role of proBDNF/BDNF-propeptide/mBDNF in antidepressant treatment. *Neuroscience y Biobehavioral Reviews*.
- Dwivedi, Y. (2012). Brain-Derived Neurotrophic Factor in Suicide Pathophysiology. En *The Neurobiological Basis of Suicide*. Chapter 8. CRC Press; Boca Raton (FL).
- Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A,... Weinberger DR. (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*, 112(2):257-69.
- Friedman, W. J. (2010). Proneurotrophins, seizures, and neuronal apoptosis. *The Neuroscientist*, 16(3), 244-252.

- Gibon, J., y Barker P.A. (2017) Neurotrophins and Proneurotrophins: Focus on Synaptic Activity and Plasticity in the Brain. *The Neuroscientist.*, 1-18.
- Giza, J. I., Kim, J., Meyer, H. C., Anastasia, A., Dincheva, I., Zheng, C. I.,... Lee, F. S. (2018). The BDNF Val66Met prodomain disassembles dendritic spines altering fear extinction circuitry and behavior. *Neuron*. Paper aceptado en prensa.
- Glerup, S., Olsen, D., Vaegter, C. B., Gustafsen, C., Sjoegaard, S. S., Hermey, G., ... Skeldal, S. (2014). SorCS2 regulates dopaminergic wiring and is processed into an apoptotic two-chain receptor in peripheral glia. *Neuron*, 82(5), 1074-1087.
- Guo, J., Ji, Y., Ding, Y., Jiang, W., Sun, Y., Lu, B., y Nagappan, G. (2016). BDNF pro-peptide regulates dendritic spines via caspase-3. *Cell death y disease*, 7(6), e2264.
- Hedstrom, K. L., Ogawa, Y., y Rasband, M. N. (2008). AnkyrinG is required for maintenance of the axon initial segment and neuronal polarity. *The Journal of cell biology*, 183(4), 635-640.
- Hempstead, B.L. (2014) Deciphering proneurotrophin actions. *Handb Exp Pharmacol.* 2014;220:17-32.
- Kaech, S. y Banker, G. (2006) Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc.*, 1(5):2406-15.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K., y Hempstead, B. L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, 294(5548), 1945-1948.
- Mandell, J. W. y Banker, G. A. (1996) A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *J Neurosci*, 16(18):5727-40.
- Mizui, T., Ishikawa, Y., Kumanogoh, H., Lume, M., Matsumoto, T., Hara, T., ... Uegaki, K. (2015). BDNF pro-peptide actions facilitate hippocampal LTD and are altered by the common BDNF polymorphism Val66Met. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(23), E3067-E3074.
- Park, H., y Poo, M.M. (2013) Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci.* 14(1):7-23.
- Penzes, P., Cahill, M. E., Jones, K. A., VanLeeuwen, J. E., y Woolfrey, K. M. (2011). Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nature neuroscience*, 14(3), 285.
- Price, J. L. y Drevets, W. C. (2010) Neurocircuitry of mood disorders. *Neuropsychopharmacology.* 35, 192–216.

Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A., McNamara, J. O., y Williams, S. M. (2004) *Neuroscience* (tercera edición). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.

Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1473), 1545–1564.

Shi, M., Zhu, J., Wang, R., Chen, X., Mi, L., Walz, T., y Springer, T. A. (2011). Latent TGF- β structure and activation. *Nature*, 474(7351), 343.

Sholl, D.A. (1953) Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *Journal of anatomy* 87: 387-406

Song, A. H., Wang, D., Chen, G., Li, Y., Luo, J., Duan, S., y Poo, M. M. (2009). A selective filter for cytoplasmic transport at the axon initial segment. *Cell*, 136(6), 1148-1160.

Sorrells, S. F., Paredes, M. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K. W., ... Chang, E. F. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*, 555(7696), 377.

Szeszko, P. R., Lipsky, R., Mentschel, C., Robinson, D., Gunduz-Bruce, H., Sevy, S., ... Malhotra, A. K. (2005) Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and volume of the hippocampal formation. *Molecular Psychiatry*, 10:631–636.

Teng, H. K., Teng, K. K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R. D.,... Hempstead B. L. (2005) ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J. Neurosci.*, 25(22):5455–5463.

Tsai, S. J. (2018). Critical Issues in the BDNF Val66Met Genetic Studies of Neuropsychiatric Disorders. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 156.

Unsain, N., Montroull, L. E., y Mascó, D. H. (2009). Brain-derived neurotrophic factor facilitates TrkB down-regulation and neuronal injury after status epilepticus in the rat hippocampus. *Journal of neurochemistry*, 111(2), 428-440.

Van Praag, H., Schinder, A., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. D., y Gage, F. H. (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415:1030–1034.

Volosin, M., Trotter, C., Cragolini, A., Kenchappa, R. S., Light, M., Hempstead, B. L., ... Friedman, W. J. (2008). Induction of proneurotrophins and activation of p75NTR-mediated apoptosis via

neurotrophin receptor-interacting factor in hippocampal neurons after seizures. *Journal of Neuroscience*, 28(39), 9870-9879.

Wang, J., Bains, H., Anastasia, A., y Bracken, C. (2018). NMR backbone resonance assignments of the prodomain variants of BDNF in the urea denatured state. *Biomolecular NMR assignments*, 12(1), 43-45.

Winckler, B., Forscher, P., y Mellman, I. (1999). A diffusion barrier maintains distribution of membrane proteins in polarized neurons. *Nature*, 397(6721), 698.

Woo, N.H., Teng, H.K., Siao, C.J., Chiaruttini, C., Pang, P.T., Milner, T.A., ... Lu, B. (2005) Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci.*, 8(8):1069-77. Epub 2005 Jul 17.

Yang J., Harte-Hargrove L. C., Siao C. J., Marinic T., Clarke R., Ma Q.,... Hempstead B. L. (2014) proBDNF negatively regulates neuronal remodeling, synaptic transmission, and synaptic plasticity in hippocampus. *Cell Rep.*, 7(3):796-806.

Yang, J., Siao, C.-J., Nagappan, G., Marinic, T., Jing, D., McGrath, K., ... Hempstead, B. L. (2009). Neuronal release of proBDNF. *Nature Neuroscience*, 12(2), 113–115.

Zanin, J. P., Unsain, N., y Anastasia, A. (2017) Growth Factors and Hormones Pro-Peptides: The Unexpected Adventures of the BDNF Prodomain. *J Neurochem* 141 (3), 330-340.

Zuccaro, E., Bergami, M., Vignoli, B., Bony, G., Pierchala, B. A., Santi, S., ... Canossa, M. (2014). Polarized expression of p75 NTR specifies axons during development and adult neurogenesis. *Cell reports*, 7(1), 138-152.