
Fisiopatología de la ataxia de Friedreich: Transporte y degeneración axonal

Octubre de 2017

Memoria presentada por
Diana Carolina Muñoz Lasso
para optar por el título de
Doctora por la Universitat Politècnica de Valencia



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Dirigida por: Dr. Pilar González Cabo
Dr. Francesc Palau Martínez

D. Francesc Palau Martínez, Doctor en Medicina y Profesor de Investigación del CSIC, Jefe de Servicio de Genética del Hospital Sant Joan de Déu, Director del Instituto Pediátrico de Enfermedades Raras (IPER) y del Institut de Recerca Pediàtrica del Hospital Sant Joan de Déu, y Dña. Pilar González Cabo, Doctora en Ciencias Biológicas e Investigadora del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) en la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

CERTIFICAN: Que Dña. Diana Carolina Muñoz Lasso, licenciada en Ingeniería Biológica por la Universidad Nacional de Colombia, ha realizado bajo su codirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título "Fisiopatología de la ataxia de Friedreich: Transporte y degeneración axonal". Revisado el presente trabajo, expresan su conformidad para la presentación del mismo por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para la obtención del grado de Doctora.

En Valencia, a 25 de Octubre de 2017

Prof. Dr. Francesc Palau Martínez

Dra. Pilar González Cabo

Para mi familia: Nelly, Mauro, Yohana, Mauricio, Esteban, Andrés, David, y para tí pequeña(o).

Resumen

La Ataxia de Friedreich (FRDA) es una enfermedad autosómica recesiva del sistema nervioso central y periférico que afecta a niños y adultos jóvenes. Esta neuropatía sensitiva está caracterizada por una degeneración primaria de las neuronas sensitivas largas del ganglio dorsal (DRG). En la mayoría de los pacientes con FRDA, la mutación consiste en una expansión homocigota del trinucleótido guanina-adenina-adenina (GAA) en el intrón 1 del gen que codifica para una proteína mitocondrial, la frataxina (FXN). La consecuencia de la mutación es la deficiencia de la frataxina, lo cual condiciona cambios en la fisiología mitocondrial y celular, teniendo como resultado una disfunción del metabolismo energético mitocondrial asociado con el incremento del estrés oxidativo en la célula y a una alteración de la homeostasis del calcio. Estos procesos están estrechamente relacionados con la regulación del citoesqueleto de actina, microtúbulos, y con el tráfico de vesículas. En este trabajo de tesis se demuestra cómo la estabilidad del citoesqueleto axonal de las neuronas sensitivas de dos modelos murinos YG8R e YG8sR están afectados debido a la falta de frataxina. Cambios en el citoesqueleto de actina y microtúbulos, unido al fallo en la señalización por Ca^{2+} provocan una alteración en la dinámica de la forma del cono de crecimiento, disminuyendo el crecimiento y la regeneración axonal y afectando a la guía axonal en las neuronas sensitivas adultas. Este estudio muestra cómo estos eventos conducen a la neurodegeneración en la ataxia de Friedreich.

Palabras clave: Ataxia de Friedreich, Ganglios de la raíz dorsal, degeneración axonal, Frataxina, Cono de crecimiento, Citoesqueleto.

Abstract

Friedreich ataxia (FRDA) is a recessive human disease of central and peripheral nervous system that affects children and young adults. FRDA is a peripheral neuropathy characterized by a initial degeneration of the large neurons of the dorsal root ganglia (DRG) or proprioceptive neurons. Most of the patients with FRDA have a homozygous guanine-adenine-adenine (GAA) expansion within the first intron of the gen that codifies for a small mitochondrial protein, frataxin (FXN). This mutation leads to a reduction of frataxin expression in all human cells, which produces changes in both the cell and mitochondrial physiology, resulting in a dysfunction of the mitochondrial energetic metabolism linked to the increase of oxidative stress and calcium dyshomeostasis. These cellular proceses are tightly related with the regulation of the actin and microtubule cytoskeletons and with vesicle trafficking. Here, we show how the absence of frataxin in the mouse models YG8R and YG8sR affects the axonal cytoskeleton of adult sensory neurons. Changes of actin and microtubule cytoskeletons and the failure of Ca^{2+} signaling induce alterations of dynamics growth cones of sensory neurons, which in turn produce a reduction of their capacity to grow and regenerate their axons. This study shows how these events can lead to the neurodegeneration in Friedreich's ataxia.

Keywords: Friedreich Ataxia, Dorsal Root Ganglia, Axonal degeneration, Frataxin, Growth cone, Cytoskeleton.

Resum

L'Ataxia de Friedreich (FRDA) és una malaltia autosòmica recessiva del sistema nerviós central i perifèric que afecta a xiquets i adults joves. Aquesta neuropatia sensitiva ve caracteritzada per una degeneració primària de les neurones sensitives llargues del gangli dorsal (DRG). En la majoria dels pacients de FRDA la mutació consisteix en una expansió homozigòtica del trinucleòtid guanina-adenina-adenina (GAA) en l'intró 1 del gen que codifica per a la proteïna mitocondrial frataxina (FXN). La conseqüència d'aquesta mutació és la deficiència de frataxina, aquest fet condiciona canvis en la fisiologia mitocondrial i cel·lular, tenint com a resultat una disfunció del metabolisme energètic mitocondrial associat a l'increment de l'estrés oxidatiu en la cèl·lula i una alteració de la homeòstasi del calci. Aquests processos estan íntimament relacionats amb la regulació del citoesquelet d'actina, microtúbuls i el tràfic de vesícules. En aquest treball de tesi doctoral es mostra com l'estabilitat del citoesquelet axonal de les neurones sensitives de dos models murins YG8R i YG8sR es troben afectats a causa de la deficiència de frataxina. Canvis en el citoesquelet d'actina i microtúbuls, juntament a la fallida en la senyalització per Ca^{2+} provoquen una alteració en la dinàmica de la forma del con de creixement, disminuint-lo junt amb la regeneració axonal i afectat la guia axonal en les neurones sensitives adultes. Aquest estudi posa de manifest com aquests events condueixen a la neurodegeneració en la ataxia de Friedreich.

Paraules clau: Ataxia de Friedreich, Glanglis de l'arrel dorsal, Degeneració axonal, frataxina, con de creixement, Citoesquelet.

Agradecimientos

Creo que somos el resultado de las personas que conocemos a lo largo de nuestra vida, y bueno, en mi caso particular, agradezco que esta tesis me ha dado la oportunidad de conocer una multitud de personas maravillosas:

Gracias a mis directores, **Pili y Paco**,

En especial a tí **Pili**: por aceptarme como parte del **Frataxin's group**. No imaginas cuánto he aprendido de tí, de Arantxa, Belén y Fátima. Gracias por estar siempre disponible para mí, y más en esta última etapa, que resultó ser contra todo pronóstico, la más exigente de todas. Gracias por brindarme tu confianza. Gracias por tu paciencia, por no tirar la toalla al traducir mi español - colombiano; por creer en mí cuando sentía perder el camino. Esta tesis no habría sido posible sin tu guía y apoyo incondicional. Eres uno de los pilares más importantes de mi formación profesional.

Paco: gracias por permitirme hacer parte de un grupo extraordinario. Me formé en un ambiente multidisciplinario y muy ameno. Me he sentido como en casa desde el primer día, tal como me lo prometió **Pili**. Durante estos años estuve rodeada de compañeros top, los mejores en su campo, y de quienes he aprendido lo que sé hoy día. Gracias por exigirnos tanto en los lab-meetings, siempre resultaron ser una motivación para mejorar.

Gracias al **Centro de Excelencia en Innovación Tecnológica en Bio-Imagen, Ministerio Regional de Salud de Valencia (CEIB-CS)**,

A **María de la Iglesia Vayá**, líder del grupo: por creer en nuestras ideas y hacerlas realidad!. Mariam, sin tu apoyo y respaldo esta tesis no habría sido

posible. Gracias por ser la científica que eres!. A mi compatriota **Jhon Sáenz**, gracias por currártelo tanto y querer mis datos como si fueran tuyos!.

Gracias a mis ex-compañeros de laboratorio,

Arantxa (mi sensei for ever!, no hay nadie como tú!), Manoli, Paula, Lola, Edu, Vincenzo, Belén, David, Ibo, Carmina, Victor, María. Gracias por compartir conmigo su conocimiento abiertamente, y brindarme un espacio en su vida fuera del laboratorio. Ustedes hicieron que cada día me levantara con ganas y entusiasmo para ir al laboratorio, esos años fueron una experiencia única e inolvidable!.

Gracias a todos aquellos que han contribuido indirectamente a mis experimentos,

A **Benito** en el Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV), gracias por tus consejos para el uso del microscopio confocal. **Alberto** en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), por las extensas horas en el microscopio confocal, por tu asesoría y por nuestras charlas colombo-españolas. Gracias parceró!. Eres genial!.

A **Fátima**, por ser tan excelente profesional en el campo de la histología, eres una crack!. Por aliviar nuestras largas horas de trabajo en la disección de ratones. Mi espalda te lo agradecerá eternamente!. Por adaptar tu horario al mío cuando era incapaz de madrugiar tanto.

*Thanks to all at **Brunel University-London**,*

*The **Italian Mafia**: Gabri, Giovanna and Lorena. You made of my days in Uxbridge an especial experience. Thanks for your friendship. Thanks Saba, Inês (I will never forget our Tuna Potatoes), Parissa and Sheba (you made me feel very wellcome). Especially thanks to **Mark and Sahar**, this thesis would not have been possible without your unconditional support. Thanks **Sahar** for your guidance, you remembered me why I wanted to be a scientist.*

Gracias al **Laboratorio de Fisiopatología de Enfermedades Raras**,

A **Fede**: gracias por recibirme en tu grupo y hacerme sentir como una más de tus discípulas(os). Eres un gran científico Fede, de tí he aprendido que se puede ser, a la vez, un excelente líder y un valioso ser humano.

A los **Raritos**: Eva, Giselle, José Luis, Marta, Santi, Marta, José Francisco (quiero una rosca de chocolate para el día de la defensa!), Pablo, Carlos y todos los nuevos estudiantes (seguro olvido más de uno). Gracias por hacer

este último año en el laboratorio más agradable e enriquecedor. **Vos trobaré prou a faltar!**

A nuestros vecinos de laboratorio: **Elena, César y José**: por ser tan guais y estar dispuestos a traficar (digo compartir), los reactivos de laboratorio.

Gracias a tí, por los buenos y malos momentos compartidos durante todos estos años. Gracias por todo el apoyo que me diste. Hemos crecido juntos, y bueno, considero que tuvimos la lección más grande de todas al final del camino.

Gracias a mis amigas,

A **Ceci**, por haberte convertido en mi hermana, por siempre estar dispuesta a escuchar, por ser paciente y aceptarme con lo mejor y peor de mí; por disfrutar tanto de la culinaria (...gracias a ésto me alimentaba mejor en los días más caóticos...mi madre te lo agradecerá eternamente!); por ser una excelente amiga y confidente. Te admiro y respeto por el hermoso ser humano que eres y por ser la científica en la que te has convertido; me hace feliz haber podido compartir esta aventura hasta el final contigo. No te imaginas cuánto voy a extrañar nuestras tertulias en el *International Journal of PakiFood* of Benimaclet.

A **Estela**, por tu amistad incondicional, dentro y fuera del laboratorio. Gracias por llorar y reír conmigo; por estar siempre dispuesta a debatir mis dudas experimentales y personales. Empiezo a creer que aquel sueño tuyo de la científica hippie (...obviamente yo...) y moderna (tú), era una predicción del futuro. Las palabras se quedan cortas para agradecerte haber sido mi bastón de apoyo cuando más lo necesite. Nos espera el resto de la vida para recorrer el mundo *mi parcerita*.

A **Estrella**, gracias Bela por todos los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio. Jamás olvidaré las fiestas del Ángel de Teruel (sólo en España se puede tomar una ducha de buen vino). Gracias por nuestras sesiones terapéuticas de running por el río.

A **Lucía**, gracias por tener siempre tiempo para ir por un vinito o una cerveza. Por ser la prueba viviente de que se puede ser, a la vez, una mujer inteligente, moderna y muy chic. Eres única!

A mis *latin girls* **Carito, Sora, Karent**, gracias por hacer de mi vida fuera del laboratorio tan amena. Gracias por ser únicas y hacerme sentir que siempre puedo contar con ustedes.

A tí comadre, **Angélica**, gracias por hacer que nuestra amistad no tenga barreras ni fronteras!

A ustedes **Red Lips**: Estela, Estrella, Lucía, Manoli, Fátima, Elena y Carmen. Gracias por escuchar atentas las frustraciones experimentales; por estar en los buenos y malos momentos. Siempre recordaré nuestros viajes y aventuras por España.

Gracias a tí **Lola**: por tu cariño, tu respaldo, tu comprensión y por siempre estar dispuesta a escuchar mis agobios. Has creado una nueva fan de la música en vinilo!.

Gracias a mi grupo adoptivo **CEQA** en la UPV: Ismael, Sandra, Eva, Aitor, Ilde y Ceci, por aceptarme como su refugiada sentimental y darme un espacio con aire acondicionado durante el verano para poder escribir aquel artículo. Ustedes son una bella sorpresa que me dió la vida.

Gracias a la **bodeguita Baltasar Seguí** en Benimaclet, y en especial a tí Pedro, por propiciar un ambiente único para nuestras tertulias con vermut de los viernes. Mis fines de semana en Valencia no habrían sido los mismos sin ustedes.

Gràcies a **València** per ser un dels millors llocs del món per viure!.

Este trabajo ha sido posible gracias a cada colombiano(a) que contribuye con su trabajo a la creación de las becas José Francisco de Caldas - "Generación del Bicentenario". Esta beca me fue otorgada por el Departamento Administrativo, Tecnología e Innovación - Colciencias (Colombia). Gracias a todos **ustedes** por darme la oportunidad de formarme como investigadora en España. Espero poder retribuir en el futuro esta maravillosa oportunidad.

Gracias a mi familia: esta tesis es por y para ustedes,

Mauro y Nelly: gracias por tanto amor, por creer en mí y por apoyarme incondicionalmente, gracias por hacer de mí la persona que soy hoy. **Papá**, te acuerdas aquella noche vieja en la que te prometí que iba a ser Dr en Biotecnología?, bueno aquí lo tienes. **Mamá**, ésta es la única oportunidad que tendré para *gritarle* al mundo cuánto te admiro y respeto: eres la mujer más sabia que he conocido, y que creo conoceré, durante mi vida. Siempre has tenido las palabras y la actitud indicada en medio del caos, esta meta cumplida es tuya mi *morenita adorada*.

Mis hermanos **Yohana, Mauricio y Esteban** y sobrinos, **Andrés, David, y tu pequeña(o)** que vienes en camino: gracias por existir. En la distancia, son mi motivo para continuar.

"Las personas más bellas con las que me he encontrado son aquellas que han conocido la derrota, conocido el sufrimiento, conocido la lucha, conocido la pérdida, y han encontrado su forma de salir de las profundidades. Estas personas tienen una apreciación, una sensibilidad y una comprensión de la vida que los llena de compasión, humildad y una profunda inquietud amorosa. La gente bella no surge de la nada". Elizabeth Kübler-Ross.

Índice general

Resumen	III
Índice general	XVII
1 Introducción	3
1.1 Sistema nervioso periférico	3
1.1.1 Sistema nervioso somático (voluntario)	3
1.1.2 Sistema nervioso autónomo (involuntario)	4
1.1.3 Estructura de los ganglios de las raíces dorsales y tipos neuronales	4
1.2 El citoesqueleto neuronal	11
1.2.1 Filamentos de actina	13
1.2.2 Dinámica de los microtúbulos en el axón	18
1.3 El crecimiento axonal y el cono de crecimiento	21
1.3.1 Dinámica del citoesqueleto de actina en el cono de crecimiento	25
1.3.2 Dinámica del citoesqueleto de actina en el axón	27
1.3.3 Microtúbulos en el cono de crecimiento	29
1.4 Regeneración y degeneración axonal en el sistema nervioso periférico	32
1.4.1 Regeneración axonal	32
1.4.2 Degeneración axonal	37

1.5 Enfermedades del sistema nervioso periférico: la ataxia de Friedreich	44
1.5.1 Características clínicas y neuropatología de la enfermedad	44
1.5.2 Patogénesis molecular de la ataxia de Friedreich	47
1.6 Modelos murinos para el estudio de la ataxia de Friedreich	55
2 Hipótesis y Objetivos	59
2.1 Hipótesis	59
2.2 Objetivos	60
3 Materiales y métodos	63
3.1 Material Biológico	63
3.1.1 Animales	63
3.1.2 Sistema de cruces y alojamiento de la colonia	64
3.1.3 Sistema de genotipado	66
3.1.4 Anticuerpos y sondas	71
3.2 Métodos	76
3.2.1 Cultivo primario de las neuronas de la raíz del ganglio dorsal (DRGs)	76
3.2.2 Procesamiento de las raíces dorsales de los DRGs lumbares para cortes en criostato	79
3.2.3 Procedimientos de inmunofluorescencia	79
3.2.4 Inmunofluorescencia en tejidos de las raíces dorsales del ganglio dorsal.	81
3.2.5 Ensayos <i>time lapse</i>	82
3.2.6 Análisis de la expresión de proteínas por Western blot.	82
3.2.7 Axotomía in vitro	84
3.2.8 Análisis de imagen para el estudio de la longitud de las neuritas y el área del cono	85
3.2.9 Análisis de número de conos y tipos de conos	86
3.2.10 Cuantificación de la fluorescencia de actina F y actina G	86
3.2.11 Medida de la intensidad de fluorescencia de las modificaciones post-traduccionales de tubulina	87
3.2.12 Análisis de los parámetros morfométricos del cono	88
3.2.13 Análisis manual del movimiento del cono	89
3.2.14 Estudio de la dinámica del cono de crecimiento mediante el Análisis de Com- ponentes Principales (PCA)	89
3.2.15 Análisis de los patrones de movimiento de los conos de crecimiento mediante tensores	92

3.2.16	Análisis del crecimiento y regeneración axonal en las cámaras microfluídicas . . .	93
3.2.17	Análisis estadístico.	95
4 Resultados		97
4.1	Estudio in vitro de la dinámica del crecimiento axonal	97
4.1.1	Las neuronas del DRG del modelo YG8R presentan un menor número de conos de crecimiento y una morfología aberrante.	97
4.1.2	El déficit de frataxina afecta el área del cono de crecimiento y la longitud de las neuritas en las neuronas adultas del DRG.	101
4.1.3	El déficit de frataxina altera la dinámica de la actina en las neuronas sensitivas adultas	102
4.1.4	El déficit de frataxina altera la dinámica de los microtúbulos en las neuronas del DRG adultas	105
4.1.5	Activación de la cofilina en las neuronas del DRG y su influencia en la dinámica del citoesqueleto	113
4.1.6	Análisis del sistema de regulación de la Cofilina.	117
4.1.7	Regulación del proceso de desensamblaje de la actina	119
4.1.8	Estudio del perfil proteómico de los ganglios dorsales del ratón deficiente en frataxina YG8R: proteínas del citoesqueleto y el transporte axonal	120
4.2	Estudio in vivo de la dinámica del crecimiento axonal	129
4.2.1	El déficit de frataxina en las neuronas sensitivas del ratón YG8sR altera la morfología de los conos de crecimiento	134
4.2.2	Los conos de crecimiento de las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8sR exhiben una dinámica aberrante.	138
4.2.3	Estudio de la dinámica de la morfología del cono de crecimiento mediante análisis de componentes principales (PCA) y cálculo tensorial.	141
4.3	Fenómeno de dying-back en la ataxia de Friedreich: estudio de cambios estructurales en el axón.	148
4.3.1	Regeneración axonal de las neuronas sensitivas adultas deficientes en frataxina	150
4.3.2	El déficit de frataxina en las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8sR causa una reducción en su respuesta regenerativa	153
5 Discusión		157
5.1	Alteración del citoesqueleto en el cono de crecimiento de neuronas deficientes para frataxina.	158
5.2	El déficit de frataxina incrementa la actividad de cofilina y el complejo ARP2/3	164

5.3 El déficit de frataxina afecta la dinámica de los conos de crecimiento neuronales	168
5.3.1 Estudio de la dinámica del cono mediante parámetros morfométricos y rastreo manual	168
5.3.2 Estudio de la dinámica de la morfología del cono mediante métodos basados en ordenador	170
5.3.3 Metodología basada en ordenador de la dinámica de la morfología del cono. . .	172
5.4 El déficit de frataxina reduce el crecimiento y la regeneración axonal	173
6 Conclusiones	179
7 Conclusions	183
8 Anexos	187
Bibliografía	201

Índice de figuras

1.1. Estructura del sistema nervioso humano	5
1.2. Organización de la médula espinal	7
1.3. Células gliales en el ganglio de las raíces dorsales	8
1.4. Funciones de las células gliales en el DRG	10
1.5. Principales componentes del citoesqueleto neuronal	12
1.6. Polimerización de los filamentos de actina	14
1.7. Proteínas de unión a actina que regulan el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina	15
1.8. Inicio de las ramas de los filamentos de actina por el complejo ARP2/3	17
1.9. Ensamblaje de los microtúbulos	19
1.10. Modificaciones post-traduccionales de la α -tubulina.	21
1.11. Estructura del cono de crecimiento	22
1.12. Organización del citoesqueleto en el cono de crecimiento	24
1.13. Dinámica de actina en el cono de crecimiento	26
1.14. Ensamblajes del citoesqueleto de actina en el axón	29

1.15. Comportamiento de los microtúbulos durante las diferentes fases de la actividad del cono de crecimiento	31
1.16. Formación del cono de crecimiento o del bulbo de retracción	34
1.17. Provisión del material necesario para la extensión axonal	36
1.18. Compartimentalización de las enzimas biosintéticas de NAD ⁺ en las neuronas.	38
1.19. Mecanismo molecular emergente para la degeneración Walleriana.	40
1.20. Degeneración axonal en el fenómeno de <i>dying back</i>	43
1.21. Zonas del sistema nervioso alteradas en ataxia de Friedreich (FRDA)	46
1.22. Gen que codifica para frataxina (FXN)	48
1.23. Estructura de frataxina	50
3.1. Esquema que muestra la estrategia de cruces para la obtención del modelo murino YG8R para la FRDA	65
3.2. Sitios de hibridación de las parejas de oligonucleótidos utilizados	67
3.3. Estrategia genética para aumentar las repeticiones GAA en el intrón 1 de la FXN humana para conseguir el YAC utilizado para generar el ratón transgénico YG8	68
3.4. Esquema representativo de una cámara microfluídica para cultivos neuronales (placas microfluídicas	78
3.5. Esquema utilizado para realizar la axotomía in vitro en las cámaras microfluídicas	85
3.6. Procesamiento de las imágenes de los experimentos <i>time lapse</i>	91
3.7. Pasos para realizar las medidas del área axonal en las cámaras microfluídicas	94
4.1. El número de conos de crecimiento por neurona en el genotipo YG8R es menor que en el control C57BL/6J.	99

4.2. Imágenes confocales de las diferentes formas del cono de crecimiento en las neuronas del DRG.	100
4.3. Efecto del déficit de frataxina en el área y la morfología de los conos de crecimiento	101
4.4. Longitud de las neuritas en las neuronas del DRG del genotipo YG8R esta reducida	102
4.5. Expresión de la actina F/G en los conos de crecimiento de las neuronas de la raíz dorsal del ratón control C57BL/6J	103
4.6. Expresión de la actina F/G en los conos de crecimiento de las neuronas de la raíz dorsal del modelo YG8R	104
4.7. Efecto del déficit de frataxina en los niveles de actina F y actina G.	105
4.8. Distribución neuronal de los microtúbulos acetilados en las neuronas del DRG del genotipo control (C57BL/6J)	107
4.9. Distribución neuronal de los microtúbulos acetilados en las neuronas del DRG del genotipo YG8R	108
4.10. Distribución neuronal de los microtúbulos tirosinados en las neuronas del DRG del genotipo control (C57BL/6J)	109
4.11. Distribución neuronal de los microtúbulos tirosinados en las neuronas del DRG del genotipo YG8R	110
4.12. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de los microtúbulos acetilados y tirosinados	111
4.13. Los niveles de expresión de la α -tubulina acetilada esta incrementada en las raíces de los ganglios dorsales del ratón YG8R.	112
4.14. El déficit de frataxina incrementa los niveles de de cofilina-1 en las raíces de los ganglios dorsales.	114
4.15. Análisis de la expresión Cofilina en el asta dorsal del ratón YG8R.	116
4.16. La actividad de proteínas que regulan la fosforilación de cofilina esta alterada en las raíces de los ganglios dorsales del ratón YG8R.	118
4.17. Niveles de ARP en las raíces del DRG	119

4.18. Funciones moleculares de las proteínas expresadas diferencialmente en el ratón YG8R asociadas con el citoesqueleto y el transporte axonal	121
4.19. Mapa de la vía de regulación del citoesqueleto de actina en la base de datos KEGG.	123
4.20. Mapa de la vía de regulación de la guía axonal en la base de datos KEGG	126
4.21. Proteínas identificadas en el ciclo de vesículas sinápticas.	128
4.22. Comparación del crecimiento axonal in vitro de las neuronas del DRG a los 2 meses de edad	132
4.23. Comparación del crecimiento axonal in vitro de las neuronas del DRG a los 6 meses de edad	133
4.24. Comparación del crecimiento axonal in vitro de las neuronas del DRG a los 9 meses de edad	134
4.25. La morfología de los conos de crecimiento varia en neuronas del DRG adultas de ratones YG8sR a los 2 y 6 meses de edad	136
4.26. La morfología de los conos de crecimiento varia en neuronas del DRG adultas de ratones YG8sR a los 9 meses de edad	137
4.27. Parámetros de medida para conos de crecimiento del ratón YG8R con 2, 6 y 9 meses	138
4.28. Secuencia de recuadros (1 min separados) de los experimentos <i>time lapse</i> de los conos de crecimiento de neuronas sensitivas adultas	139
4.29. La dinámica de los conos de crecimiento esta alterada en las neuronas del DRG del ratón YG8sR	140
4.30. Gráfica de comparación de los componentes principales del movimiento $CP1 \perp CP2$ de los conos de crecimiento	144
4.31. Gráfica de los principales patrones de movimiento tensoriales de los conos de crecimiento	147
4.32. La capacidad de extensión axonal de las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8sR esta reducida.	149

4.33. Las neuronas del DRG de ratón YG8sR logran formar nuevos conos de crecimiento pocas horas después de haber sido axotomizadas 152

4.34. La capacidad regenerativa axonal de las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8sR esta reducida. 155

4.35. Respuesta regenerativa y la degeneración axonal en las neuronas sensitivas del ratón YG8sR. 156

Índice de tablas

3.1. Oligonucleótidos empleados	69
3.2. Reactivos y volúmenes utilizados en las PCR	69
3.3. Programas del termociclador utilizados en las PCR	70
3.4. Reactivos y volúmenes utilizados en la PCR a tiempo real para la amplificación y cuantificación del transgén YG8	70
3.5. Programa del termociclador para la amplificación del transgén YG8 por PCR cuantitativa	70
3.6. Anticuerpos primarios empleados	72
3.7. Anticuerpos primarios empleados	73
3.8. Anticuerpos secundarios empleados	74
3.9. Sondas empleadas	75
4.1. Resumen experimentos Time Lapse de los conos de crecimiento	142
8.1. Proteínas subreguladas en el DRG del ratón YG8R relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos	188

8.2. Proteínas subreguladas en el DRG del ratón YG8R relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos	189
8.3. Proteínas subreguladas en el DRG del ratón YG8R relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos	190
8.4. Proteínas subreguladas en el DRG del ratón YG8R relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos	191
8.5. Proteínas subreguladas en el DRG del ratón YG8R relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos	192
8.6. Proteínas subreguladas en el DRG del ratón YG8R relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos	193
8.7. Proteínas subreguladas en el DRG del ratón YG8R relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos	194
8.8. Proteínas subreguladas en el DRG del ratón YG8R relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos	195
8.9. Proteínas subreguladas en el DRG del ratón YG8R relacionadas con la guía axonal	196
8.10. Proteínas subreguladas en el DRG del ratón YG8R relacionadas con el transporte axonal	197
8.11. Proteínas subreguladas en el DRG del ratón YG8R relacionadas con el transporte axonal	198
8.12. Proteínas subreguladas en el ganglio de la raíz dorsal del ratón YG8R relacionadas con el transporte axonal -continuación . .	199

Capítulo 1

Introducción

1.1 Sistema nervioso periférico

El sistema nervioso humano está compuesto por dos sistemas, el Sistema Nervioso Central (SNC) y el Sistema Nervioso Periférico (SNP). El SNP está constituido por los nervios periféricos y los ganglios de la raíz dorsal, localizados fuera de la médula espinal y del cerebro (Figura 1.1, a). La principal función del SNP es conectar el SNC con las extremidades y órganos (Figura 1.1, b), formando un circuito nervioso en el cual la información fluye desde el SNC hacia las extremidades y órganos, y desde allí hacia el SNC. El SNP está integrado por dos subsistemas, *el sistema nervioso somático* y *el sistema nervioso autónomo*.

1.1.1 Sistema nervioso somático (voluntario)

Este sistema nos permite percibir y reaccionar de manera consciente a estímulos ambientales. Anatómicamente, el SNP está compuesto por los nervios periféricos, los cuales comprenden 12 pares de nervios craneales y 31 pares de nervios espinales. Estos nervios conectan el cerebro y la médula espinal con estructuras del cuerpo humano como la piel y los músculos esqueléticos.

Los nervios emergen de varios segmentos de la médula espinal, tienen una raíz ventral (motora) y una raíz dorsal (sensitiva). La raíz dorsal contiene las fibras aferentes (sensitivas) que transmiten la información desde los receptores sensitivos hacia la médula espinal (Figura 1.1, b). Los cuerpos celulares (somas) de las fibras aferentes residen en los ganglios de las raíces dorsales (DRG) (también conocido como ganglio espinal). La raíz ventral contiene las fibras eferentes (motoras) que llevan la información desde la médula espinal a los efectores. Los somas de las fibras eferentes residen en la materia gris de la médula espinal. La raíz ventral y dorsal se fusionan y convierten en nervios periféricos que inervan músculos y órganos.

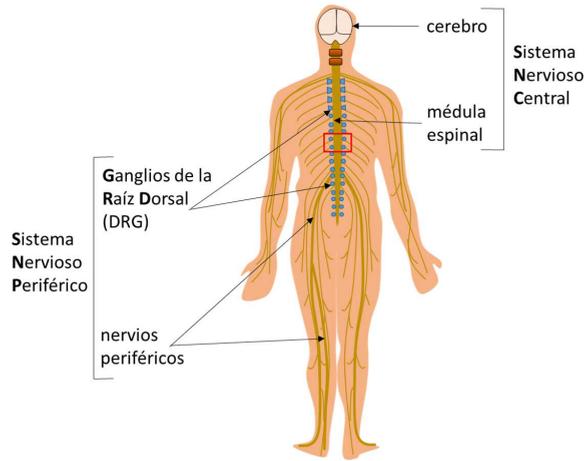
1.1.2 *Sistema nervioso autónomo (involuntario)*

Este sistema está distribuido a lo largo de tejidos periféricos y órganos, y controla la musculatura lisa del sistema vascular y de los tractos alimentarios, urinarios y reproductivos por medio de ganglios autónomos periféricos. El sistema recibe la información de las vísceras y del medio interno del cuerpo humano para actuar sobre sus músculos, glándulas y vasos sanguíneos. Los centros de control de este sistema están en el hipotálamo y el tronco encefálico, de aquí envían fibras nerviosas autonómicas que conectan con fibras pre-ganglionares (ganglio autónomo periférico) en la médula espinal o el tronco encefálico, las cuales emergen fuera del SNC para conectar con el ganglio autónomo periférico, de dónde emergen fibras post-ganglionares para formar las redes terminales en los tejidos diana.

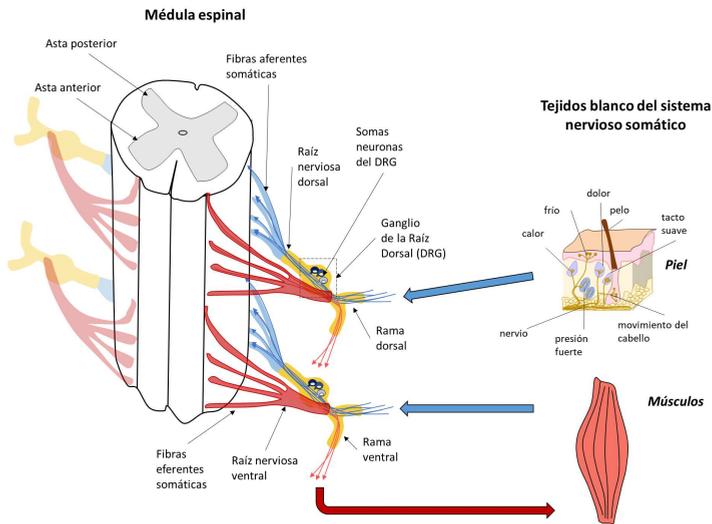
1.1.3 *Estructura de los ganglios de las raíces dorsales y tipos neuronales*

El ganglio de las raíces dorsales (DRG)

Los nervios espinales están formados por la unión de una raíz ventral (anterior) y una raíz dorsal (posterior) en sus puntos de salida del canal vertebral (Figura 1.1, b). Dentro del foramen intervertebral, donde la raíz dorsal y ventral se unen para formar el nervio espinal, está el **ganglio espinal o ganglio de la raíz dorsal (DRG)**. Los DRGs se designan según la vértebra donde se encuentran, la cual puede ser cervical (C), torácica (T), lumbar (L) ó sacral (S). Los ganglios torácicos albergan los somas de al menos unas 50×10^4 neuronas, y rutas espinocerebrales que sirven a las extremidades conteniendo unas 10×10^5 neuronas. Sus axones son morfológicamente indistinguibles de sus



(a) Sistema Nervioso Humano



(b) Sección transversal de la médula espinal

Figura 1.1: Estructura del Sistema Nervioso humano. a) En el ser humano el Sistema Nervioso Central (SNC) está compuesto por el cerebro y la médula espinal; el Sistema Nervioso Periférico (SNP) está compuesto por los nervios periféricos y los ganglios de las raíces dorsales (DRGs). La selección en rojo de la médula espinal se detalla en (b). (b) Composición y distribución de los nervios espinales dorsales. Los nervios que emergen de la médula espinal, tienen una raíz ventral (motora-rojo) y una raíz dorsal (sensitiva-azul). La raíz ventral contiene las fibras eferentes (motoras) que llevan la información desde la médula espinal a los efectores. La raíz dorsal contiene las fibras aferentes (sensitivas) que transmiten la información desde los tejidos diana hasta la médula espinal.

somas porque están adheridos a un pequeño tallo axonal. Los somas de estas neuronas están acompañados por células gliales satélite.

Neuronas del ganglio de la raíz dorsal (neuronas sensitivas)

Las neuronas de los ganglios dorsales (neuronas sensitivas) son diversas pero tienen una función en común, transducir un estímulo ambiental y transmitir la información resultante al SNC. La mayoría de las neuronas sensitivas en el DRG presentan una morfología pseudo-unipolar, es decir presentan un único axón que se bifurca en dos, formando un axón central que viaja a través de la raíz dorsal hacia la médula espinal (\rightarrow SNC), y un axón periférico que se extiende hacia la periferia inervando los órganos sensitivos receptores, en donde reciben información sensorial para ser transmitida hacia el axón central (SNC \leftarrow). Las neuronas en los DRGs forman subpoblaciones celulares heterogéneas que se diferencian por: la morfología de su soma y sus axones (1-4); su función; la sensibilidad a factores de crecimiento neuronal; y la expresión de algunos neuropéptidos. En general, se distinguen tres grandes sub-poblaciones neuronales basadas en las señales sensoriales que transducen *neuronas nociceptivas*, *mecanoreceptivas* y *propioceptivas* (Figura 1.2).

- *Neuronas nociceptivas*. Tienen como función transducir la sensación de dolor (nociocepción). Morfológicamente, presentan somas pequeños, y axones con calibre reducido y no mielinizados. Estas neuronas expresan en sus terminales axonales receptores que responden a estímulos de daño enviando señales de dolor a la médula espinal y el cerebro. La mayoría de neuronas nociceptivas expresan el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP) y la sustancia P (un neuropéptido). Estas neuronas también expresan mayoritariamente el receptor Tropomiosin quinasa A (TrkA), que responde al factor de crecimiento neuronal (NGF). Las neuronas nociceptivas no peptidérgicas responden a varios miembros de la familia de factores neurotróficos derivado de células gliales, incluyendo el GDNF (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*).
- *Neuronas mecanoreceptivas*. Se ocupan de transducir señales de presión o distorsión mecánica. Morfológicamente, son neuronas más grandes que las nociceptivas y sus axones sí están mielinizados. Estas neuronas proyectan axones hacia la periferia, vía los nervios cutáneos, hacia una variedad de receptores especializados en la piel. Muchas de estas neuronas expresan el receptor TrkB que responde al factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF).

- *Neuronas propioceptivas*. Estas neuronas transducen las señales asociadas con el posicionamiento del cuerpo y de la tensión y longitud muscular. Morfológicamente, son las neuronas más grandes del DRG, proyectan sus axones hacia la periferia vía los nervios musculares inervando en los husos musculares y el órgano tendinoso de Golgi (un órgano tendinoso humano). Estas neuronas responden a las neurotrofina NT3 vía receptores TrkC, y muchas de ellas expresan el receptor GFRa1, que es el receptor del factor GDNF. Los axones centrales de las neuronas propioceptivas se proyectan a capas ventrales de la médula espinal donde proveen una entrada excitatoria a las motoneuronas e interneuronas implicadas en la locomoción.

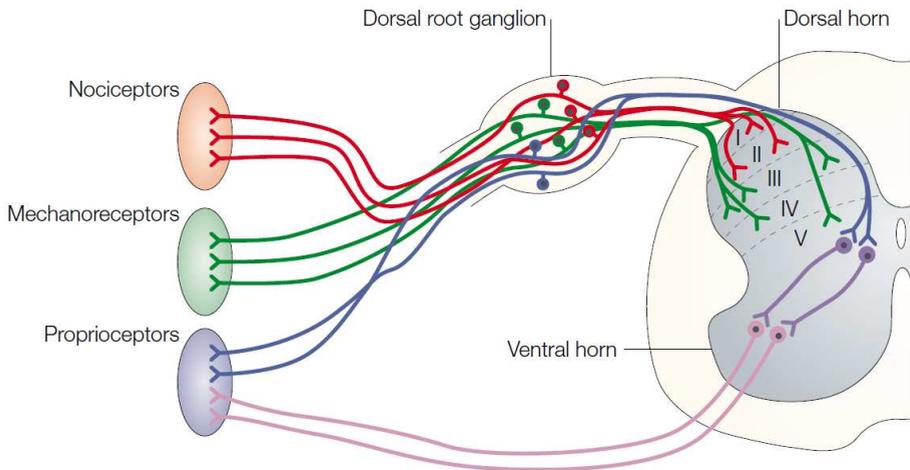
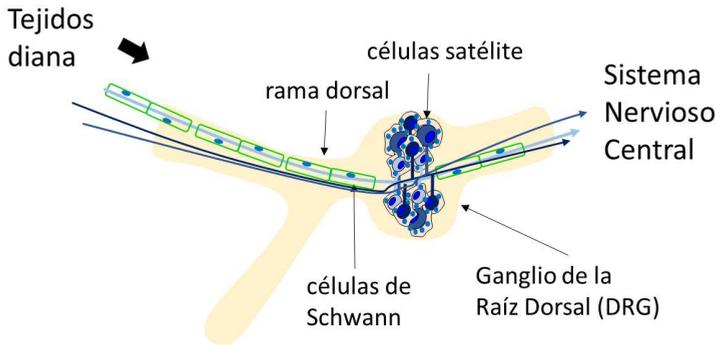


Figura 1.2: Organización de la médula espinal. Esquema de los circuitos neuronales en la médula espinal de un ratón en estadio embrionario. Los axones de las neuronas sensitivas proyectan axones desde el ganglio dorsal en dos direcciones, hacia la lámina específica de la médula espinal y hacia los tejidos periféricos. El dolor y la temperatura son recogidos por las neuronas nociceptivas (rojas) y la información se integra en la lámina I y II. El tacto se recoge mediante los mecanorreceptores (verde) en los tejidos periféricos que conectan con la lámina III, IV y V. La propiocepción es mediada por las neuronas sensitivas (azul) que proyectan a través de la médula espinal con las neuronas motoras localizadas ventralmente. Las motoneuronas también conectan directamente con el músculo periférico para dirigir el movimiento (rosa). Los números romanos indican la lámina de la médula espinal. Reimpreso con el permiso de Macmillan Publishers Ltd: [NATURE REVIEWS, NEUROSCIENCE] (5), copyright (2017).

Células gliales del Sistema Nervioso Periférico

Las células de la glia son células no neuronales que contribuyen a la homeostasis neuronal. En el sistema nervioso periférico (SNP) las células gliales son las células satélite, que provén de soporte y protección a las neuronas; y las células de Schwann, las cuales rodean el axón formando la llamada vaina de mielina (Figura 1.3).



(a) Células gliales en el ganglio de las raíces dorsales

Figura 1.3: Células gliales en el ganglio de las raíces dorsales. En el sistema nervioso periférico (SNP) las células gliales son las células satélite y las células de Schwann. Las células gliales satélite rodean los somas de las neuronas formando una vaina que las separa de las otras neuronas. Las células gliales de Schwann rodean los axones periféricos para formar una vaina de mielina gruesa que tiene un efecto aislante sobre los axones, y permite la transmisión de los impulsos nerviosos a grandes distancias.

■ Células gliales satélite.

Las células gliales satélite (CGS) rodean los somas de las neuronas sensitivas formando una vaina (Figura 1.4, a). Morfológicamente, se caracterizan por ser células de forma laminar, irregular y generalmente mononucleares (6, 7). Las CGS de una vaina se unen entre sí mediante adhesión y uniones gap, y se separan de la vaina perineuronal por tejido conjuntivo (8-10). De esta forma cada soma está rodeado por su vaina de CGS para formar una unidad morfológica y funcional que mantiene a los somas en su lugar y los separa de los otros somas (11).

A nivel fisiológico, existe un soporte trófico bidireccional entre las CGS y los somas de las neuronas. Otra característica de estas células es que regulan la concentración iónica del espacio extracelular y el reciclaje de neurotransmisores. Las células satélite son positivas para marcadores mo-

leculares como la glutamina sintasa (síntesis de metabolitos provisionales de glutamina), proteínas de la familia S100 que participan de la regulación del calcio intracelular, y la proteína gliofibrilar ácida (GFAP) (12), una proteína fibrosa que forma los filamentos del citoesqueleto celular, especialmente en las células gliales.

A nivel electrofisiológico, las CGS exhiben un potencial de membrana de reposo altamente negativo, y expresan canales de Ca^{2+} y de K^{+} dependientes de voltaje (13-15), sugiriendo un papel en las propiedades electrofisiológicas de las neuronas sensitivas.

- Células gliales de Schwann.

Cuando un axón requiere ser mielinizado, varias células de Schwann se adhieren a lo largo del axón (Figura 1.4), y cada una de las células rodea el axón generando una envoltura espiral. Luego, varias capas sucesivas de la membrana plasmática se añaden y forman las líneas densa mayor y densa menor de la vaina de mielina; al final del proceso, el citoplasma de la célula de Schwann se elimina (16).

La vaina de mielina no es continua, durante su formación las células de Schwann dejan huecos libres de mielina que dejan la membrana axonal expuesta al espacio extracelular (Figura 1.4, b); estos huecos son denominados *nodos de Ranvier*. Una sola célula de Schwann podría ser responsable de la mielinización de 0,3-1 mm de la longitud del axón, y teniendo en cuenta que los axones periféricos pueden llegar a medir hasta 1 metro de longitud, entonces un axón puede tener miles de células de Schwann rodeando su axón.

Las vainas de mielina están compuestas en un 70% por lípidos (ricos en colesterol) y 30% en otras proteínas. Las interacciones entre las neuronas y las células gliales controlan la localización y el espaciado de las vainas de mielina, así como el ensamblaje de la maquinaria de transmisión nerviosa en los nodos de Ranvier. En los nodos de Ranvier se congregan los canales de Na^{+} y las bombas de $\text{Na}^{+} / \text{K}^{+}$, indispensables para una apropiada transmisión del impulso nervioso. A nivel electrofisiológico, en las fibras nerviosas no mielinizadas la velocidad de conducción del impulso nervioso es más lenta (2 m/s) que en las fibras que sí lo están ($v_{max} = 120 \text{ m/s}$), esto se debe a que la mielina actúa como un aislante eléctrico y a que en los nodos de Ranvier se permite que el impulso salte de nodo a nodo.

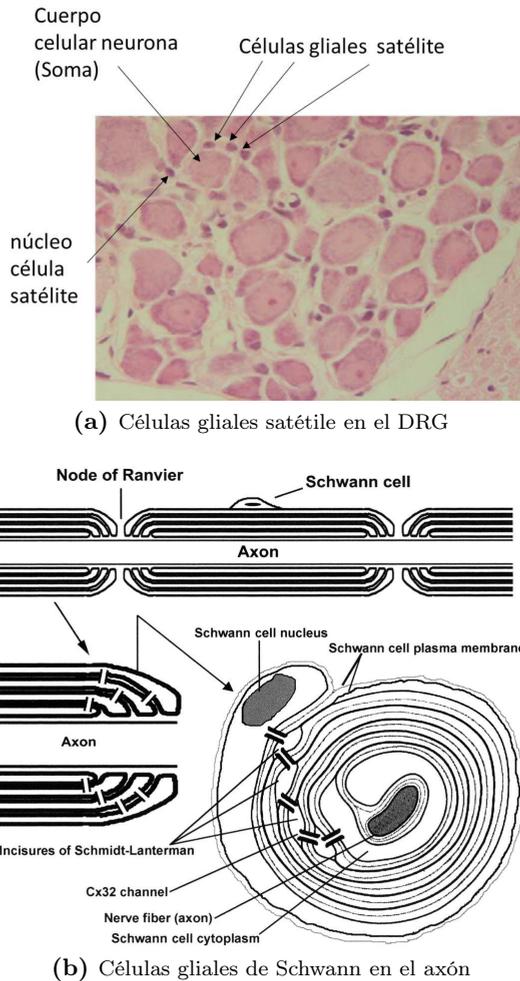


Figura 1.4: Funciones de las células gliales en el DRG. (a) Imagen de una sección transversal del ganglio de las raíces dorsales de ratón teñidas con hematoxilina-eosina. Las células gliales satélite rodean los somas de las neuronas sensitivas formando una vaina que las separa de otros somas. El núcleo de estas células se tiñe de color azul-purpura. Imagen adaptada de (17). (b) Dibujo representativo de formación de la vaina de mielina por una célula de Schwann. Durante la formación de la mielina las células de Schwann dejan gaps libres de mielina ó nodos de Ranvier. La vaina de mielina tiene una forma de envoltura en espiral creada por el citoplasma de la célula de Schwann. Al final del proceso el citoplasma de la célula de Schwann se elimina (abajo). Adaptada de (18, 19).

1.2 El citoesqueleto neuronal

El citoesqueleto es un orgánulo celular formada por el entramado tridimensional de proteínas que provee el soporte interno de la célula; organiza sus estructuras internas; y provee los medios necesarios para el transporte y tráfico intracelular. Estas características son importantes para la función de las neuronas, y en especial para las neuronas del sistema nervioso periférico, las cuales pueden extender axones de hasta ~ 1 metro de longitud en el ser humano. El citoesqueleto neuronal está compuesto principalmente por tres tipos de filamentos: los filamentos de actina (microfilamentos), los microtúbulos y los filamentos intermedios (Figura 1.5). Cada uno de estos filamentos tiene una función determinada en la neurona y garantizan una apropiada formación del sistema nervioso durante el desarrollo embrionario, y su función en la edad adulta.

Los **filamentos intermedios** son el componente más abundante en los axones. Están formados por tres subunidades: el neurofilamento liviano (NF-L, de las siglas en inglés neurofilament light), medio (NF-M, de las siglas en inglés *neurofilament medium*) y pesado (NF-H, de las siglas en inglés *neurofilament heavy*). Los neurofilamentos forman el núcleo del citoesqueleto a lo largo del axón.

Los **filamentos de actina** son el segundo componente del citoesqueleto axonal. Los filamentos de actina crean estructuras superiores, *haces y redes de actina*, que sostienen y estabilizan la membrana plasmática del axón o *axolemma*. A diferencia de los neurofilamentos, que son bastante estables y presentan una tasa de intercambio baja, los filamentos de actina pueden ser muy dinámicos en respuesta a las necesidades fisiológicas de la neurona. Esta propiedad le confiere un papel importante durante el crecimiento axonal en el desarrollo embrionario o la regeneración axonal.

El último componente son los **microtúbulos** y las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs). Los microtúbulos forman estructuras tubulares a lo largo del axón. Las MAPs se asocian a los microtúbulos para interconectar las estructuras de microtúbulos entre sí y a otros componentes del citoesqueleto, como los NFs o los filamentos de actina. A continuación se provee información

detallada de los filamentos de actina y microtúbulos, los cuales han resultado ser relevantes para este trabajo.

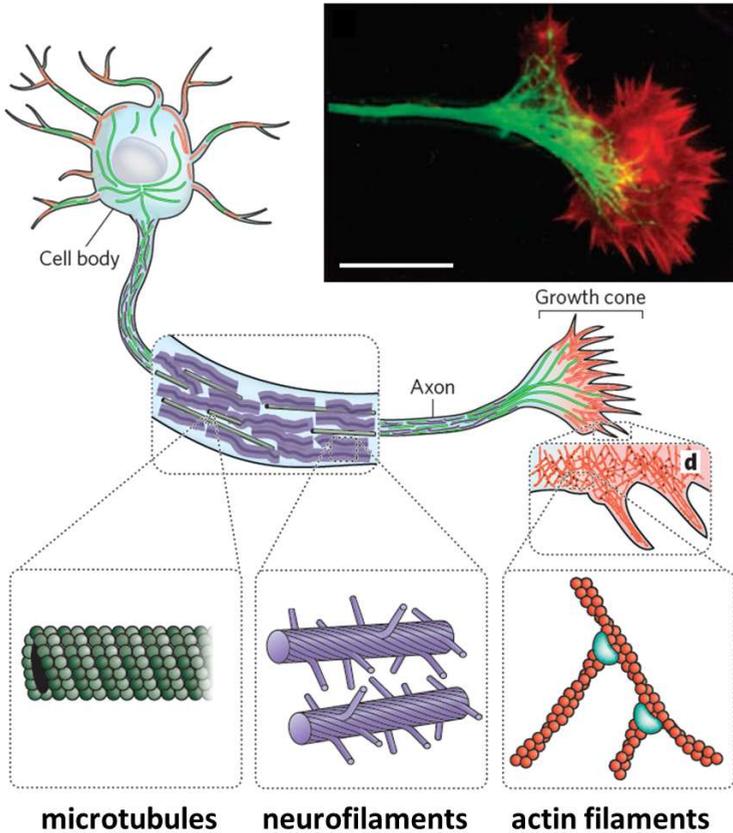


Figura 1.5: Principales componentes del citoesqueleto neuronal. El citoesqueleto neuronal está compuesto principalmente por neurofilamentos, filamentos de actina y microtúbulos. Los filamentos de actina y los microtúbulos pueden ser muy dinámicos en respuesta a las necesidades fisiológicas, como por ejemplo durante el desarrollo embrionario o la regeneración axonal, dos etapas en las que la neurona necesita formar un nuevo axón y dirigirlo a su diana, para lo cual depende del cono de crecimiento, una estructura motil que se forma en el extremo más distal del axón en crecimiento (*growth cone*). Barra de escala 20 μm . Reimpreso con el permiso de Macmillan Publishers Ltd: [Nature] (20), copyright (2017).

1.2.1 Filamentos de actina

El citoesqueleto de actina está formado por el entrecruzamiento de haces y redes de actina que se forman a partir de la organización de los **filamentos de actina**. Estos filamentos crean el andamiaje que sostiene y estabiliza el *axolemma*; proveen el medio necesario para que ciertos complejos proteicos interactúen; y participa en el transporte axonal interactuando con proteínas motoras para transportar orgánulos a cortas distancias.

Formación de los filamentos de actina

Los filamentos de actina están formados por *actina*, una proteína globular de 42 kDa abundante en todas las células eucariotas. En los organismos mamíferos existen tres isoformas α , γ y β , de las cuales α y mayoritariamente β se expresan en las neuronas. Actina existe como un monómero globular llamado **actina G**, el cual polimeriza y forma los filamentos de actina (actina F). La polimerización de actina ocurre en tres etapas (Figura 1.6). La primera fase es la formación de un pequeño agregado constituido por tres monómeros de actina (fase de nucleación). Luego, los filamentos crecen por la adición reversible de monómeros a ambos extremos del núcleo pero uno de ellos, el extremo (+) crece cinco a diez veces más rápido que el otro extremo (-) (fase de elongación). En tanto que los filamentos de actina F crecen, la concentración de los monómeros de actina se reducen hasta que se alcanza el equilibrio entre filamentos y monómeros (fase de estabilización). Normalmente, los monómeros de actina (actina G) tienen acoplado adenosina trifosfato (ATP). Aunque el ATP no es requerido para la polimerización, los monómeros que lo tienen polimerizan más rápido que los que tienen unido ADP.

Los filamentos de actina F pueden despolimerizarse y liberar los monómeros, permitiendo que los filamentos se descompongan cuando sea requerido en la neurona. El ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina, así como la formación de haces y redes, y su asociación con otras estructuras celulares, son reguladas por las proteínas de unión a actina (ABPs, por sus siglas en inglés *actin binding proteins*), cuya actividad es regulada por medio de varias vías de transducción de señales. Las ABPs se clasifican según su función en: proteínas de secuestro o de unión a las subunidades de actina G; proteínas de nucleación que inician la polimerización de actina; proteínas de unión al extremo (+) del filamento de actina F (*capping proteins*), las cuales bloquean la polimerización de actina; proteínas que forman los haces y redes de actina o que estabilizan la actina F; proteínas que regulan el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina; proteínas que transportan cargas a lo largo de los filamentos de actina

o que transportan filamentos de actina; y proteínas de anclaje que conectan la actina F a otros componentes celulares (21).

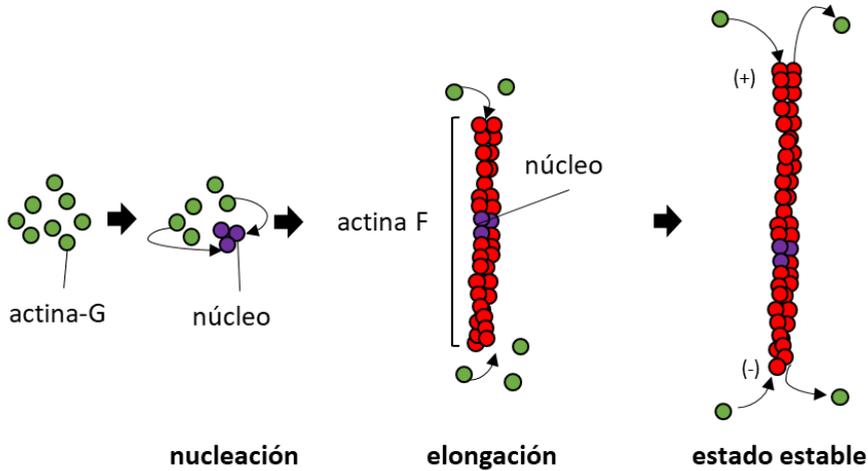


Figura 1.6: Polimerización de los filamentos de actina. Los monómeros de actina acoplados a ATP (actina G, verde) forman lentamente un agregado (violeta) que crece exponencialmente por la adición de monómeros a ambos extremos del filamento (fase de elongación). Al final, los filamentos de actina están en estado estacionario con la actina G. Los filamentos de actina presentan una conformación de doble hélice.

Remodelación de los filamentos de actina

La remodelación de los filamentos de actina está a cargo de proteínas que regulan el intercambio rotatorio de actina en los filamentos (*treadmilling*) (Figura 1.7). Las proteínas que regulan éste intercambio son *cofilina* y *profilina*, las cuales favorecen la tasa de ensamblaje de los filamentos de actina.

La *profilina* es una proteína pequeña ($\sim 14-19$ kDa) que se une a la subunidad ADP-actina G, promoviendo la pérdida de ADP, el cual es rápidamente remplazado por el ATP, más abundante que ADP en condiciones fisiológicas. El complejo *profilina*-ATP-actina sólo se puede unir al extremo (+) del filamento; al hacerlo, la *profilina* añade la subunidad y se disocia (Figura 1.7). La actividad de *profilina* no incrementa la tasa de ensamblaje del filamento, pero sí provee nuevas subunidades ATP-actina G a partir de las subunidades liberadas. Como consecuencia, la mayoría de toda la actina G en las células tiene acoplado ATP.

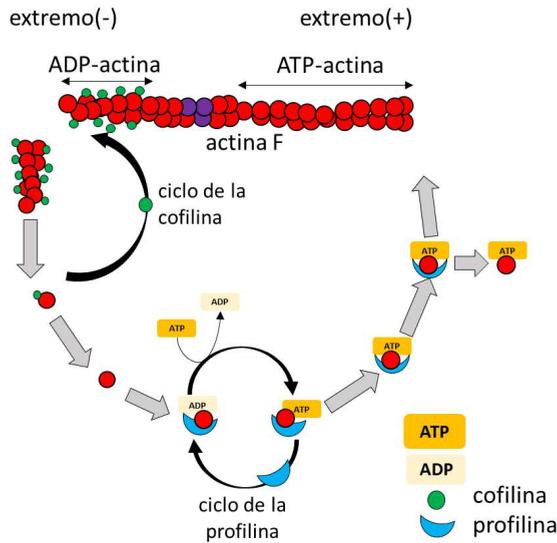


Figura 1.7: Proteínas de unión a actina que regulan el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina. En el ciclo de la profilina, la profilina se une a ADP-actina G y cataliza el intercambio de ADP por ATP. El complejo ATP-actina G-profilina se puede unir al extremo (+) del filamento ó también puede disociarse. En el ciclo de cofilina, cofilina se une preferencialmente a los filamentos de actina que tienen actina-ADP (el extremo (-)), induciendo que los filamentos se fragmenten e incrementando la despolimerización al dejar más extremos (-).

La *cofilina* también es una proteína pequeña (~ 19 kDa), que se une específicamente a actina F, preferentemente a las subunidades que contienen acoplado ADP, que son las subunidades más antiguas en el filamento y están localizadas hacia el extremo (-) del filamento. Cofilina se une a dos monómeros de actina e induce un cambio de la rotación del filamento, lo destabiliza y fragmenta el segmento del filamento en pequeñas piezas. Al romper el filamento de esta manera, cofilina genera muchos más extremos (-) y por lo tanto causa un incremento en el desensamblaje del extremo (-) (Figura 1.7). En este proceso se liberan subunidades de ADP-actina G, las cuales son *secuestradas* por *profilina* para ser adicionadas al extremo (+). De esta forma *cofilina* y *profilina* logran incrementar la tasa de ensamblaje de los filamentos de actina.

Otra proteína ABP secuestradora del monómero actina G que tiene un papel importante en este proceso es Timosina- β_4 . Timosina- β_4 se une a la subunidad ATP-actina G inhibiendo la adición de la subunidad a cualquiera de los

dos extremos del filamento. Timosina- β_4 actúa como un tampón de la actina no polimerizada para liberarla cuando se necesite. Esta función es esencial para la célula debido a las altas concentraciones intracelulares de actina no polimerizada ($\sim 50\text{-}200 \mu\text{m}$).

Debido a que *cofilina* juega un papel importante para la dinámica (ensamblaje, desensamblaje y estabilización) de los filamentos de actina, las células tienen varios mecanismos para regular su actividad. Hasta el momento se conoce que cofilina es regulada mayoritariamente por la fosforilación de un único residuo [Ser3], la cual es catalizada (forma inactiva) por las quinasas LIM (Lin11, Isl-1 y Mec-3). Las LIM quinasas son reguladas aguas arriba por miembros de las familias proteínas Rho quinasa (RhoB) o las proteínas quinasas activadas por p21 (Pak), las cuales son a su vez reguladas por RhoGTP o RacGTP/cdc42-GTP, respectivamente (22-24). La cofilina se activa mediante su desfosforilación catalizada por Slingshot-1L (SSH1L) (25), una fosfatasa específica neuronal, y por *Chronophin/PDXP* (CIN), una fosfatasa general. La actividad de CIN es regulada por los niveles fisiológicos de ATP, que promueven la interacción de CIN con Hsp90; cuando los niveles de ATP se reducen, CIN se libera y desfosforila cofilina (26). Por otra parte, la fosfatasa neuronal SSH1L es regulada por proteína quinasa D y es desfosforilada por calcineurina, una fosfatasa dependiente de calmodulina/ Ca^{2+} , una proteína reguladora en la transducción de la señal de calcio.

La alteración de cualquiera de las proteínas implicadas en la regulación de la actividad de cofilina puede comprometer la estabilidad del citoesqueleto de actina y por ende la funcionalidad del axón y la viabilidad de la neurona.

Varios factores pueden iniciar la desestabilización del citoesqueleto de actina, entre los que se incluyen el estrés oxidativo ó la formación de agregados intracelulares. Estos factores podrían causar la alteración de las proteínas que regulan la actividad de cofilina y causar por ejemplo la formación de inclusiones de actina y cofilina con forma de barras (*rods*), las cuales hacen parte del proceso degenerativo en la enfermedad de Alzheimer (27); también pueden causar arreglos anómalos en la organización de los filamentos de actina como ocurre en en la enfermedad de Parkinson (28); y producir la reducción de la dinámica de los filamentos de actina como ocurre en la enfermedad Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) (29).

Iniciación de las ramas de los filamentos de actina

El punto limitante en la polimerización de la actina es la formación del núcleo inicial (Figura 1.6). La formación de éste núcleo es regulado por las proteínas nucleadoras de actina: *forminas* y el *complejo ARP2/3*. Estas proteínas controlan dónde deben ser construidos los filamentos de actina.

Las *forminas* dirigen el ensamblaje de filamentos de actina largos, mientras que el complejo ARP2/3 dirige el inicio de ramas en los filamentos de actina. El complejo ARP2/3 está conformado por siete subunidades, dos de las cuales son proteínas relacionadas con actina (ARP2 y ARP3). El complejo ARP2/3 es un nucleador débil por sí sólo. Para que el complejo se active se necesita una proteína reguladora y un filamento previamente formado. Una de las proteínas reguladoras del complejo es la proteína del síndrome Wislott-Aldrich (WASp, de sus siglas en inglés Wislott-Aldrich syndrome protein). La formación del núcleo inicia con la unión de ARP2/3 al filamento de actina previamente formado (Figura 1.8), en presencia de la proteína activadora (reguladora) el complejo ARP2/3 cambia su conformación permitiendo que las unidades ARP2 y ARP3 imiten el extremo (+) del filamento de actina, proveyendo el molde para el ensamblaje de un nuevo filamento.

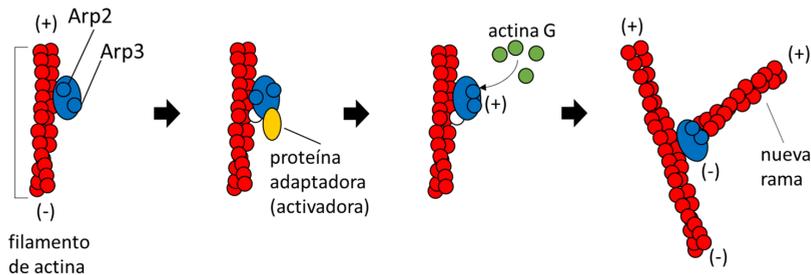


Figura 1.8: Inicio de las ramas de los filamentos de actina por el complejo ARP2/3. El complejo ARP2/3 se une en la presencia de una proteína activadora cerca de los extremos (+) del filamento de actina e inicia la formación de las ramas.

La dinámica de la actina F es particularmente importante para el sistema nervioso durante el desarrollo embrionario y la regeneración axonal. La dinámica del citoesqueleto de actina permite que el cono de crecimiento, una estructura móvil en el extremo distal de un axón en crecimiento, explore el ambiente y responda a las señales de guía axonal.

1.2.2 *Dinámica de los microtúbulos en el axón*

En las neuronas, los microtúbulos forman haces tubulares a lo largo del axón y las dendritas formando rutas de navegación para proteínas motoras que median el transporte axonal. Adicionalmente, estas rutas se conectan con otras estructuras del citoesqueleto axonal, como los filamentos de actina, para en conjunto asegurar la homeostasis axonal. La unidad estructural de los microtúbulos en las neuronas son las isoformas α - y mayoritariamente β -tubulinaIII. Los microtúbulos, al igual que en los filamentos de actina, se forman por polimerización de subunidades, las cuales en el caso de los microtúbulos son dímeros de α - β -tubulina. Cuando los dímeros polimerizan forman un filamento denominado *protofilamento*, los cuales se ensamblan alrededor de un centro hueco para formar el MT (Figura 1.9).

La formación del MT se inicia en el centrosoma, localizado en el soma de la neurona. Desde allí, los dímeros α/β -tubulina se ensamblan produciendo un arreglo radial de microtúbulos con extremos positivos (+, *plus end*,) hacia la periferia (Figura 1.9). Los microtúbulos en el axón no son continuos pero sí tienen la misma polaridad (*minus end* \rightarrow *plus end*), los microtúbulos del axón, que se crean en el centrosoma presentan diferentes longitudes y posteriormente son liberados por *katanina*, una proteína con actividad dependiente de adenosina trifosfato (ATP). Tras su liberación son transportados hacia el axón en diferentes direcciones por proteínas *quinesinas* o *dineínas*, las proteínas motoras más importantes asociadas a los microtúbulos. Mientras son transportados, los microtúbulos pueden experimentar ciclos de polimerización (crecimiento) y despolimerización (acortamiento), un proceso conocido como *inestabilidad dinámica*.

La polimerización de los microtúbulos es catalizada por las proteínas de unión a microtúbulos (MAPs) y la tasa de cambio entre el crecimiento (rescate) y el acortamiento (catástrofe) es regulada por medio de la actividad intrínseca GTPasa de las tubulinas, así como también de la actividad de proteínas del extremo final de los microtúbulos (+TIPs, de las siglas en inglés *plus-end-tracking proteins*) y de proteínas motoras.

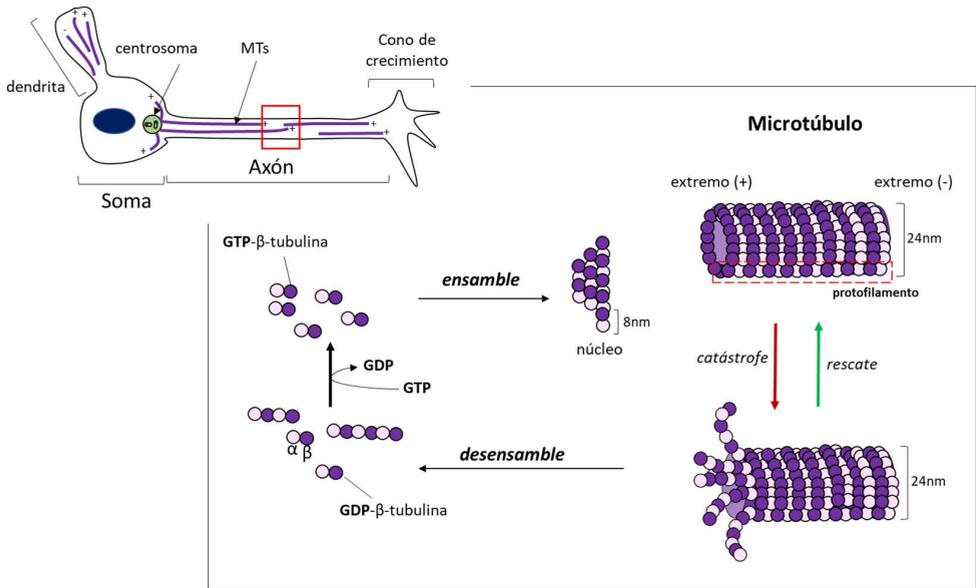


Figura 1.9: Ensamblaje de los microtúbulos. En el axón y las dendritas, los microtúbulos se ensamblan desde el centrosoma, localizado en el soma de la neurona, luego son liberados para ser transportados hacia el axón maduro o hacia el cono de crecimiento de un axón o dendrita en crecimiento. Los microtúbulos del axón presentan diferentes tamaños pero la misma polaridad, en cambio los microtúbulos de las dendritas presentan una polaridad mixta (arriba-izquierda). Mientras los microtúbulos son transportados a través del axón sufren ciclos de crecimiento y acortamiento. El esquema en el centro de la imagen muestra la dinámica del ensamblaje de los microtúbulos. La subunidad GTP- β -tubulina en los extremos de los protofilamentos favorece el crecimiento del microtúbulo, en cambio la subunidad GTP- β -tubulina en los extremos de los protofilamentos favorece el desensamblaje. La tasa de cambio entre crecimiento (rescate) y acortamiento (catástrofe) es regulada por proteínas de unión a microtúbulos.

Las propiedades funcionales de los microtúbulos pueden ser modificadas por medio de modificaciones post-traduccionales (MPTs) de la tubulina. Estas modificaciones pueden generar diferencias químicas que son suficientes para determinar funciones específicas de los microtúbulos en las neuronas (revisado en (30-32)). Particularmente, en neuronas se ha demostrado un enriquecimiento de tubulinas acetiladas, des-tirosinadas y poli-glutamiladas (33-38). Entre estas modificaciones, la acetilación y la tirosinación/destirosinación de la tubulina han resultado tener un efecto importante para el crecimiento axonal de las neuronas durante el desarrollo embrionario y para el mantenimiento de la homeostasis del axón maduro.

- *α -tubulina tirosinada (Tub-Tyr)*. La adición de Tyr tiene lugar sobre el dímero de α/β -tubulina y es un proceso reversible. El ciclo de tirosinación y destirosinación de la tubulina se inicia por la remoción de un grupo funcional Tyr en el extremo carboxilo terminal de la α -tubulina (Figura 1.10), mientras que la re-adición de Tyr, sirve como una modificación reversa y retorna la tubulina a su estado nativo. La enzima que adiciona Tyr es la *Tubulina Tisosina Ligasa* (TTL), la cual depende de iones de Mg^{2+} y ATP para su actividad (39). Las enzimas des-tirosinizantes (p.e. enzimas carboxipeptidasas) favorecen el estado polimerizado de la tubulina (40) mientras que la TTL trabaja exclusivamente sobre los dímeros solubles de α/β -tubulina.

En neuronas, la tubulina des-tirosinada se distribuye, acumulándose en los axones maduros (33, 41), donde parece facilitar el transporte axonal anterógrado (hacia el extremo más distal del axón) de la proteína motora quinesina (KIF5)(42). En cambio, la Tub-Tyr se encuentra principalmente en los microtúbulos recién formados (nuevos) y más dinámicos ($t_{vidamedia}1/2 \sim 3-5$ min), por lo que resulta indispensable en procesos dinámicos como el crecimiento axonal, donde se acumula en los conos de crecimiento (43).

- *α -tubulina acetilada (Tub-Ace)*. Al igual que la Tub-Tyr, la acetilación se da principalmente sobre el polímero de α/β -tubulina (44). La acetilación ocurre en el extremo amino terminal de la α -tubulina (Figura 1.10), el cual es catalizado por enzimas como el complejo N-acetiltransferasa (ARD1-NAT1) (45) y el complejo elongador (ELP)(46). Entre las proteínas que des-acetilan la tubulina está la *histona deacetilasa-6* (HDAC6)(47) y *sirtuina 2* (SIR2)(48), la cuales también modifican otras proteínas.

La acetilación, al igual que la tirosinación, está enriquecida en la misma población de microtúbulos destirosinados (33), está implicada en el desarrollo neuronal (34, 49), así como también promueve la unión de proteínas motoras como dineínas (50) y KIF5 (51).

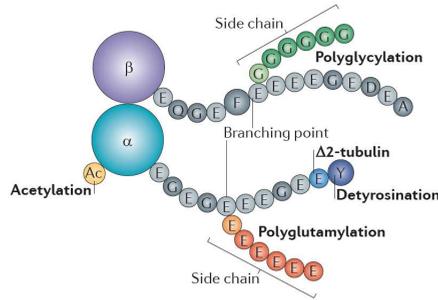


Figura 1.10: Modificaciones post-traduccionales de la α -tubulina. El esquema muestra el dímero de α/β -tubulina y sus modificaciones post-traduccionales. Los extremos carboxilo terminales de las dos sub-unidades se presentan como secuencia de aminoácidos (los cuales corresponden a la isoforma $\alpha 1A$ -tubulina, y a la $\beta 2$ -tubulina. Las dos, α - y β -tubulina, pueden ser modificadas por poli-glutamilación, poli-glicilación en diferentes residuos Glu dentro de sus extremos terminales. La des-tirosinación en el extremo carboxilo terminal y seguida de la eliminación del penúltimo residuo Glu (lo que genera $\Delta 2$ -tubulina), son específicas del extremo carboxilo terminal de la tubulina. La acetilación (Ac) del residuo Lys40 está localizado en el dominio amino-terminal de la α -tubulina. Reimpreso con el permiso de Macmillan Publishers Ltd: [Nature Reviews Molecular Cell Biology] (52), copyright (2017).

1.3 El crecimiento axonal y el cono de crecimiento

El crecimiento axonal es un proceso importante para la formación de los circuitos neuronales durante el desarrollo embrionario. Pero además, en el caso de las neuronas del sistema nervioso periférico (SNP), el crecimiento axonal es clave durante la edad adulta debido a que las neuronas del SNP pueden regenerar sus axones y remodelarlos tras ser dañados. Esta característica es intrínseca en las neuronas periféricas, siendo las neuronas del ganglio dorsal las que poseen la mayor capacidad para regenerar sus axones (53).

El crecimiento axonal es un proceso complejo dónde interactúan varios mecanismos moleculares y celulares. Por una parte requiere de una fina coordinación entre los componentes del citoesqueleto neuronal y organelas esenciales como la mitocondria y el retículo endoplasmático que proveen la energía y el material necesario como la *síntesis de lípidos y proteínas* para construir el nuevo axón. La mitocondria en especial, genera trifosfato de adenosina (ATP), requerido para la función de varias proteínas del citoesqueleto, y contribuye a la regulación del calcio subcelular y la homeostasis redox de la neurona. El calcio (54)

y las especies reactivas de oxígeno (55) son moléculas reguladoras de la guía del crecimiento axonal.

Cuando un axón está creciendo debe recorrer cortas o largas distancias a través de los tejidos para conectar de forma precisa con el tejido diana. La estructura responsable para esta importante tarea es el *cono de crecimiento*. El cono de crecimiento es una estructura sensitiva y motil, cuya morfología varía rápidamente. Su estructura se reconoce generalmente por dos partes: una estructura ancha, dispersa y aplanada denominada *lamelipodio* y una extensión de picos afilados denominado *filopodio* (Figura 1.11). Teniendo en cuenta la organización del citoesqueleto dentro del cono de crecimiento, su estructura se puede dividir en varias regiones: un dominio central (C) rico en microtúbulos, un dominio periférico (P) enriquecido con filamentos de actina y un dominio de transición, que consiste en una zona en la interfase del dominio P y el central C (Figura 1.12).

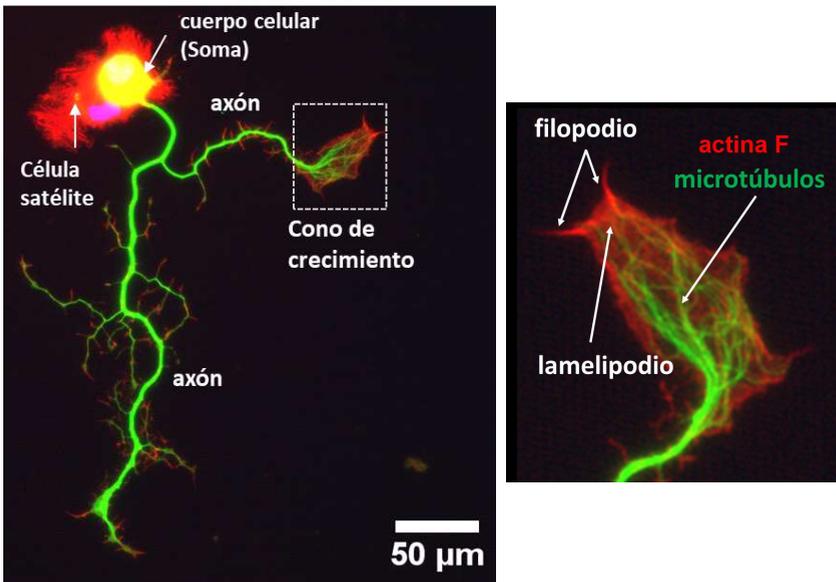


Figura 1.11: Estructura del cono de crecimiento. Se muestra una imagen de fluorescencia de una neurona sensitiva murina en crecimiento (izquierda). La neurona está teñida con Faloidina-Rodamina para identificar la actina filamentososa, con anti- β -tubulinaIII para identificar los microtúbulos neuronales y DAPI para identificar el núcleo. En el extremo más distal del axón en crecimiento se encuentra el cono de crecimiento (derecha), una estructura altamente sensitiva y mótil, cuya morfología se caracteriza por presentar dos partes: una estructura ancha, dispersa y aplanada denominada *lamelipodio*; y una extensión de picos afilados denominado *filopodio*.

El crecimiento del cono se da en tres fases: *primero la protrusión*, después *la obstrucción* y por último *la consolidación*. La *protrusión* es la extensión del lamelipodio y el filopodio; la *obstrucción* es la hinchazón del lamelipodio y el filopodio en tanto que el cono los engulle; y la *consolidación* es el estrechamiento activo del cono de crecimiento convirtiéndose en el nuevo axón. Estas tres fases ocurren continuamente en tanto el cono de crecimiento avanza.

El comportamiento del cono de crecimiento es un evento dinámico que se da por la coordinación del citoesqueleto de actina y microtúbulos. La dinámica de éstos dos componentes, el ensamblaje-desensamblaje y estabilización, permiten la función exploratoria del cono y por ende garantizan la formación adecuada del axón. El cono de crecimiento puede extenderse, retraerse y girar para explorar el ambiente y dirigir la dirección del crecimiento. Esta dinámica implica una continua reorganización de los filamentos de actina y los microtúbulos en el cono de crecimiento.

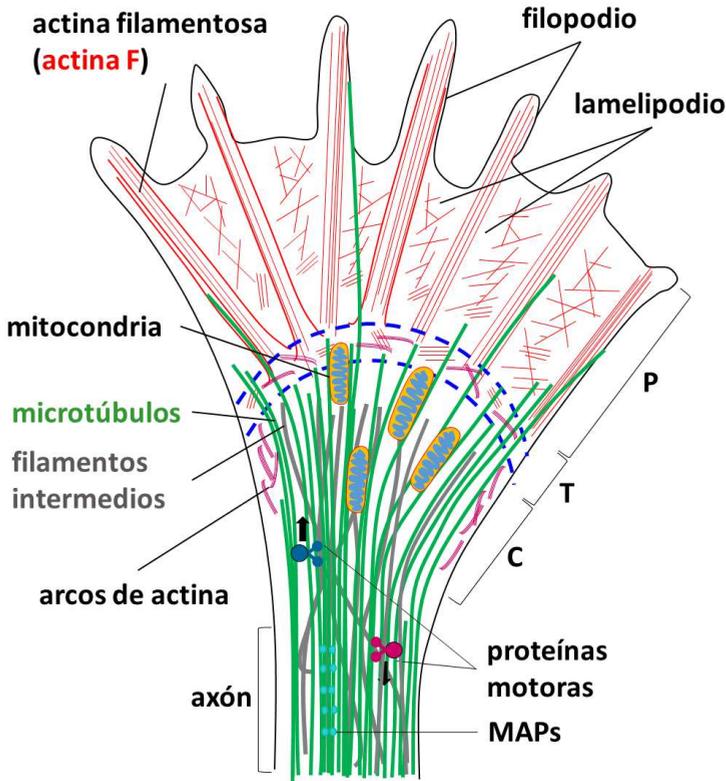


Figura 1.12: Organización del citoesqueleto en el cono de crecimiento. (a) Los conos de crecimiento varían en forma y tamaño, pero generalmente se logran distinguir tres dominios: el dominio central (C), un dominio periférico (P) y una zona intermedia denominada zona de transición (T). (b) El cono es una estructura expandida y motil que está dividida en varias regiones (líneas discontinuas, azul). En el eje axonal, los microtúbulos (microtúbulos) (líneas verdes) están organizados en haces paralelos por las proteínas de unión a microtúbulos (MAPs) (esferas cian), mientras que en el dominio C los microtúbulos se dispersan y extienden individualmente a través de la zona T hasta alcanzar el dominio P, donde se alinean con los haces de filamentos de actina (actina F, líneas rojas) en el filopodio. En el filopodio, los filamentos de actina están organizados en haces paralelos que se extienden hacia atrás a través del dominio P para terminar en la zona T, donde son cortados en filamentos cortos por un mecanismo aún desconocido. La actina F en el lamelipodio está organizado en redes ramificadas. En la zona T y en la periferia del dominio C están los arcos de actina (líneas fucsia), compuestas por haces anti-paralelos de actina F y la proteína motora miosina II (no mostrada en el gráfico). Los arcos de actina producen las fuerzas compresivas en el dominio C que curvan los microtúbulos dispersos y facilitan su agrupamiento en la *muñeca* del cono de crecimiento. Las proteínas motoras suministran al cono de los materiales y organelos necesarios para la formación del nuevo segmento axonal (transporte anterógrado), así como también transportan vesículas implicadas en las vías endocíticas (transporte retrógrado).

1.3.1 *Dinámica del citoesqueleto de actina en el cono de crecimiento*

El citoesqueleto de actina es importante para el cono de crecimiento por dos razones, la primera es que provee las fuerzas para la protrusión del cono a través de la cual el filopodio y el lamelipodio exploran el ambiente. La segunda es que genera las fuerzas de tracción en el dominio P del cono, las cuales jalan el cono de crecimiento hacia delante en contra las adhesiones y dirige el giro del cono.

En el filopodio, los filamentos de actina se reorganizan constantemente mediante la polimerización y el reciclaje de los filamentos de actina. El reciclaje de los filamentos de actina se da por medio de un proceso denominado flujo retrógrado de actina F, que es la traslocación retrograda de los filamentos del extremo líder que luego se reciclan por medio de rompimiento y/o desensamblaje gracias a la acción de la *cofilina* y la *profilina* (Figura 1.13). El cono de crecimiento avanza cuando la velocidad de polimerización de los filamentos de actina F en el extremo líder excede la del flujo retrogrado (valor promedio 3 - 6 $\mu\text{m}/\text{min}$) (Figura 1.13) (56-59). El flujo retrógrado está dirigido por la proteína motora miosina II, la cual genera fuerzas de tracción que jalan el cono de crecimiento hacia delante en contra de las adhesiones que lo atan al sustrato, dirigiendo así el avance del cono (60).

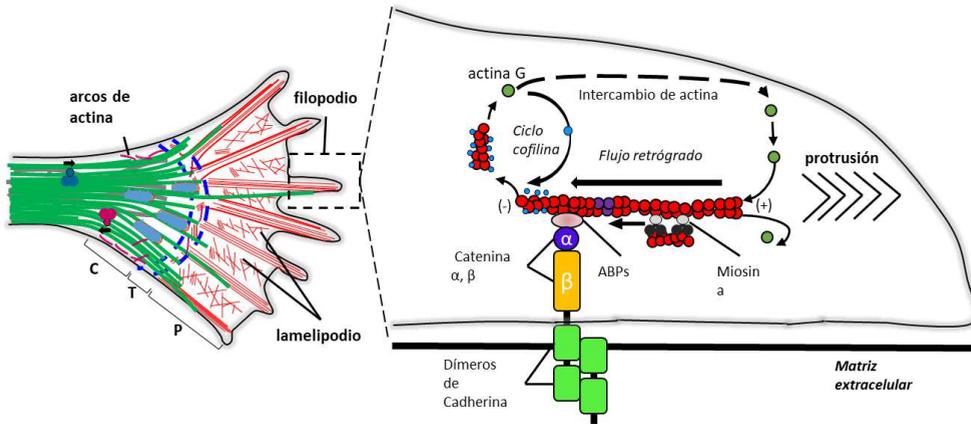


Figura 1.13: Dinámica de actina en el cono de crecimiento. El balance entre la polimerización y el flujo retrógrado de actina F, controla la protrusión del cono de crecimiento. La actina F es desensamblada en la zona de transición y es polimerizada en el filopodio del cono de crecimiento. La fase de protrusión se da cuando la velocidad de polimerización de actina F excede la del flujo retrógrado. Una vez el filopodio reconoce un sustrato adhesivo en la matriz extracelular, éste se une a él usando proteínas de adhesión como las cadherinas, que a su vez interactúan con los receptores transmembranarios heterodiméricos de α/β -integrina en el cono de crecimiento. Estos receptores interactúan con algunas proteínas de unión a actina (p.e. Vinculina, Talina, Paxilina) para comunicar la actina F con la matriz extracelular. Las proteína quinasa *Src* y *quinasa de adhesión focal (FAK)* se unen a las ABPs para activar la adhesión de otras proteínas adicionales (no se muestra en la figura). Se cree que la unión de las ABPs restringen el flujo retrógrado y permiten la fuerza de la polimerización de actina para generar la protrusión de la membrana. Adaptado de (59).

La dinámica del cono de crecimiento es controlada a través de la regulación de las proteínas que intervienen en la polimerización de los filamentos de actina y en el flujo retrógrado. La polimerización de actina en el extremo líder del filopodio (extremo + del filamento de actina) es controlado por las proteínas que intervienen en la nucleación de actina: el complejo ARP2/3 y formina. El complejo ARP2/3 está concentrado en el dominio C y T del cono, y debido a que permite la formación de las ramificaciones de los filamentos de actina es importante para la formación del lamelipodio y el filopodio del cono (59). El complejo ARP2/3 es el mayor efector de las proteínas quinasas RAC1 y CDC42. Estas quinasas activan la proteína adaptadora WASp, sin la cual el complejo no puede activarse (61, 62).

Formina, promueve la nucleación de los filamentos largos de actina, necesarios para la formación del filopodio y posiblemente media la integridad de los haces

de actina filamentosa en el filopodio (63). Su actividad está regulada por las proteínas Rac GTPasas (64).

El flujo retrógrado de actina y el desensamblaje de los filamentos de actina es regulado a través de proteínas efectoras de la GTPasa RhoA (miembro A de la familia de genes homólogos Ras). Una de las proteínas efectoras es la proteína quinasa ROCK, que regula la actividad de las proteínas quinasa:

1. MLCK (proteína quinasa de cadena ligera de miosina): La fosforilación de MLCK activa miosina II y promueve su asociación con los filamentos de actina dirigiendo el flujo retrogrado de la actina F.
2. LIMK (proteína quinasa con dominio LIM): Cuando LIMK está activa, fosforila e inactiva a la proteína ADF/cofilina, la cual promueve la rotura de los filamentos.
3. el complejo ERM (ezrina,radixina y moesina): Las proteínas del complejo ERM son proteínas de unión a actina que cuando están fosforiladas (activas) atan los filamentos de actina a la membrana celular. Adicionalmente, la actividad de las proteínas ERM es regulada por receptores de adhesión específicos del cono de crecimiento como L1CAM. Las proteínas ERM son importantes para la remodelación de la actina F en respuesta a factores neurotróficos como las neurotrofinas (factores que favorecen la supervivencia de las neuronas) y posiblemente para la redistribución de los receptores de adhesión del cono al sustrato (65).

1.3.2 Dinámica del citoesqueleto de actina en el axón

El citoesqueleto de actina y su dinámica ha sido estudiado en profundidad en el cono de crecimiento, sin embargo poco se conocía sobre la dinámica del citoesqueleto de actina en el axón. Recientemente, se ha generado conocimiento novedoso que muestra que el citoesqueleto de actina en el axón es más dinámico de lo que se pensaba. Hasta la fecha se han descrito tres estructuras mayoritarias del citoesqueleto de actina en el axón: ondas (*actin waves*), anillos (*ring waves*) y senderos de actina (*trails waves*) (Figura 1.14).

Anillos de actina (ring waves)

Los anillos de actina forman una estructura cilíndrica y periódica debajo la membrana plasmática axonal. Cada uno de los anillos está formado por filamentos de actina F estabilizados por una proteína encapsulante (*adducin*) y están separados entre sí mediante los multímeros de espectrina, una proteína de unión a actina (66) (Figura 1.14, izquierda). Esta organización de la actina hace que los anillos sean estructuras estables y formen una coraza subplasmática axonal.

Olas (actin waves)

Las olas de actina son estructuras similares a los conos de crecimiento en su estructura y dinámica. Las olas de actina emergen en la base de las neuritas, migrando lentamente hasta la punta y sobresaliendo sobre la membrana plasmática (Figura 1.14, centro) (67-69). Las olas de actina exhiben un movimiento lento (2-3 $\mu\text{m}/\text{min}$) y periódico con 1-2 olas apareciendo cada hora. Dentro de la ola de actina, los filamentos de actina se dispersan, orientándose con ángulos agudos (90-180) hacia el eje más largo de la ola (69). Los filamentos de actina dentro de la ola presentan intercambio rotatorio direccional similar a lo que ocurre en los conos de crecimiento, donde los monómeros de actina (actina G) se adicionan en el extremo líder del filamento y se ensamblan en la base. Las olas de actina parecen depender de los microtúbulos, ya que se ha observado como algunos microtúbulos individuales se extienden hasta alcanzar las olas de actina (70). Estos microtúbulos están enriquecidos en doublecortina (71), una proteína estabilizadora del citoesqueleto que se une tanto a la actina como a los microtúbulos.

Senderos de actina (actin trails)

Los *senderos* de actina son las estructuras de actina que más recientemente se han descrito en el axón (72) (Figura 1.14, derecha). Consiste en un fenómeno que ocurre en ciertos puntos del axón, donde los filamentos de actina experimentan continuamente polimerización y despolimerización. Estas zonas, separadas entre sí unos 2-3 μm (72), forman un *nido* para el ensamblaje rápido de actina F. En este nido, los filamentos largos de actina aceleran bidireccionalmente a lo largo del eje axonal (72).

El ensamblaje de la actina F en los senderos de actina posiblemente se da en endosomas axonales estacionarios y parece depender de la proteína nucleadora

de actina *formina*, pero no del complejo ARP2/3 (72). Al parecer estos *puntos calientes* de ensamblaje proveen de actina F a los botones sinápticos (72).

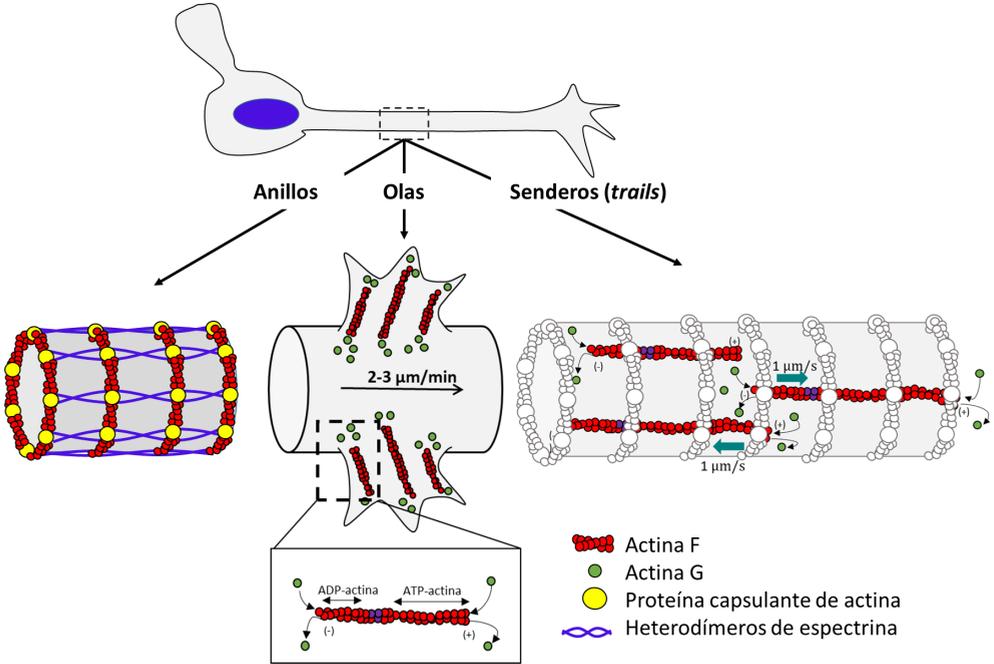


Figura 1.14: Ensamblajes del citoesqueleto de actina en el axón. Se muestra el esquema de los tres ensamblajes de actina en el axón descritos en el texto: anillos de actina (izquierda), olas de actina (centro) y senderos de actina (derecha). La flecha negra del centro indica el movimiento anterógrado de las olas de actina. Las flechas verdes en la derecha indican la dirección de la polimerización de los filamentos de actina.

1.3.3 Microtúbulos en el cono de crecimiento

La dinámica (ensamblaje, desensamblaje y estabilización) de los microtúbulos (ver sección 1.2.2) les permite explorar todo el cono de crecimiento, para lo cual se organizan constantemente formando varios arreglos: dispersos, enlazados y en haces. La principal función de los microtúbulos en el cono está relacionada con la trayectoria del cono de crecimiento. Cuando el cono debe girar, los microtúbulos que están agrupados en el dominio central del cono, se dispersan y penetran en la zona de transición e invaden el dominio periférico preferiblemente en la zona por donde se va a producir el giro (73) (Figura 1.15, A). Para que los microtúbulos invadan el dominio P, los filamentos de

actina deben reorganizarse o despolimerizarse en determinadas zonas del cono. Cuando el cono avanza, el flujo retrógrado de la actina F produce una fuerza de tracción que los empuja hacia el dominio C del cono (74, 75) (Figura 1.15, B). Se ha propuesto que los microtúbulos podrían usar la fuerzas generadas por las proteínas motoras como las *dineínas* y *quinesinas* para vencer el flujo retrogrado de la actina F y así lograr invadir el dominio P (76) (Figura 1.15, C-D). Las proteínas motoras asociadas a actina (p.e. MiosinaII) y a los microtúbulos (dineínas y quinesinas) generan fuerzas dependientes de ATP que regulan la dinámica de los filamentos de actina y microtúbulos así como su interacción entre sí en los conos de crecimiento, convirtiéndose entonces en proteínas clave para la dinámica del cono de crecimiento.

Dos vías de señalización intracelular han emergido como candidatas para la regulación de la dinámica de los microtúbulos en los axones y en el cono de crecimiento: la familia de proteínas Rho GTPasas, las cuales también participan en la regulación del citoesqueleto de actina (77), y la proteína glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3), que es una quinasa dentro de la vía de señalización WNT (78-80).

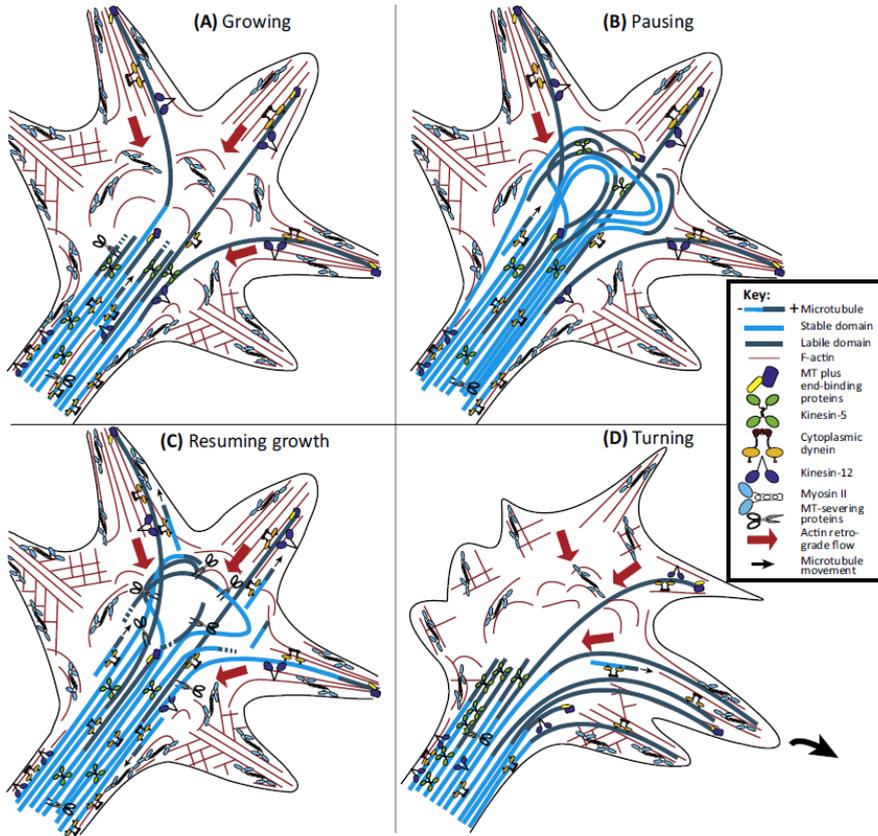


Figura 1.15: Comportamiento de los microtúbulos durante las diferentes fases de la actividad del cono de crecimiento. (A) Durante el avance del cono de crecimiento, las fuerzas de tracción de dineína permiten que los microtúbulos sobrepasen el flujo retrógrado de actina permitiendo que éstos microtúbulos invadan el dominio periférico y el filopodio. El recorte de la porción lábil de los microtúbulos (azul oscuro) regula la longitud de esa porción de microtúbulos, mientras que el corte de la porción estable de los microtúbulos (azul claro) crea microtúbulos cortos y móviles. (B) Cuando el crecimiento pausa, el avance de los microtúbulos resulta en un cono de crecimiento no compartimentalizado en dominios central y periférico, que es dominado por un haz de microtúbulos curvados. (C) Cuando el axón reanuda el crecimiento, los microtúbulos se dispersan rápidamente e incrementa el corte de los microtúbulos haciendo que más microtúbulos cortos sean lanzados lejos del haz. (D) Durante el giro del cono, las fuerzas generadas por las proteínas motoras quinesina-5 y quinesina-12 llegan a estar polarizadas hacia el lado del cono opuesto a la dirección del giro, de esta forma las fuerzas conducidas por dineína permiten la invasión de los microtúbulos solo del lado del cono que va a girar. Las flechas pequeñas negras indican la dirección del movimiento de microtúbulos cortos. Las flechas largas rojas indican el flujo retrógrado de actina. Reimpreso desde *Trends in Neurosciences*, Vol. 39, Issue 7. Kahn, Olga I and Baas, Peter W. Microtubules and Growth Cones: Motors Drive the Turn, pag 6, Copyright (2017), con el permiso de Elsevier (76).

1.4 Regeneración y degeneración axonal en el sistema nervioso periférico

Durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso, las neuronas periféricas extienden axones bastante largos con la ayuda del cono de crecimiento, el cual se transforma en una terminal presináptica cuando alcanza su tejido diana. Luego, los somas cambian el programa de crecimiento axonal a programa de estabilización. El programa de crecimiento axonal se activa nuevamente solo cuando el axón necesita ser reconstruido tras sufrir un daño físico (corte o compresión) o químico (toxicidad). Este proceso se denomina *regeneración axonal*.

Contrario a la regeneración axonal, las neuronas también pueden sufrir un proceso de autodestrucción axonal, un proceso que puede darse a lo largo de varias etapas de la vida del sistema nervioso, en las cuales las neuronas o un segmento del axón debe ser eliminados.

1.4.1 Regeneración axonal

A diferencia de las neuronas del sistema nervioso central (SNC), las neuronas del sistema nervioso periférico (SNP) y en especial las neuronas sensitivas, tienen una alta capacidad intrínseca para regenerar sus axones tras sufrir un daño. Por ejemplo, en condiciones de *in vitro*, tras cortar los axones de las neuronas sensitivas adultas murinas, el $\sim 65\%$ de los axones sensitivos son capaces de regenerar su cono de crecimiento (81). La regeneración axonal es un mecanismo importante para el mantenimiento de la función axonal en las neuronas sensitivas debido a que sus axones están más expuestos al daño que los axones de las neuronas del SNC.

La capacidad regenerativa de las neuronas sensitivas es alta durante el desarrollo embrionario y en edades tempranas, pero ésta decrece con la edad del organismo dejando a las neuronas más propensas a procesos patológicos en el axón, lo cual unido a otros factores como el incremento del estrés oxidativo, terminaría por afectar la viabilidad de las neuronas (82, 83).

La regeneración del axón se da en tres etapas, primero se repara la membrana axonal en el lugar del daño, luego se crea el cono de crecimiento y finalmente varios procesos como el transporte axonal y la síntesis de proteínas colaboran para suministrar el material necesario para la extensión axonal (84-86). Para sellar la membrana rota, el calcio libre ($[Ca]^{2+}$) del espacio extracelular fluye hacia el interior del axón a través de la membrana dañada ó de los canales

de calcio activados por voltaje (87). Este flujo incrementa los niveles de calcio libre intracelulares ($[Ca]_i^{2+}$) en el lugar del daño y activa proteínas como las *calpaínas*, con actividad proteasa, las cuales liberan la tensión de la membrana permitiendo el acceso de vesículas lipídicas a la membrana plasmática (88).

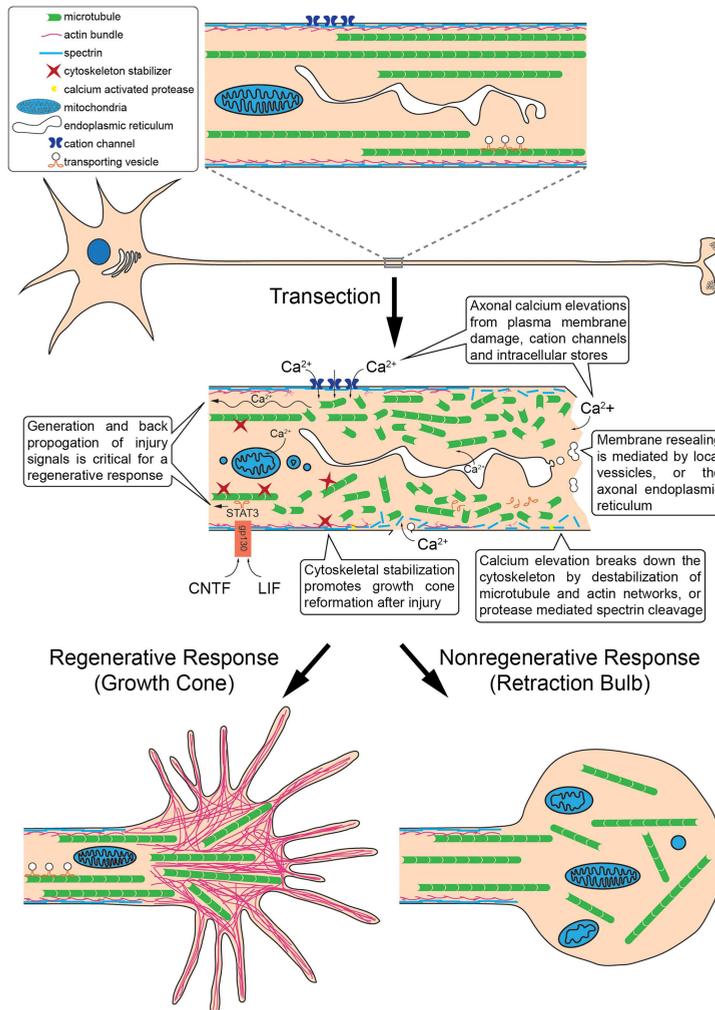


Figura 1.16: Formación del cono de crecimiento o del bulbo de retracción. Tras el daño axonal, varios procesos ocurren en el sitio del daño, incluyendo la rotura de la membrana plasmática axonal; el influjo de iones y calcio; y el desensamblaje del citoesqueleto entre otros. Aunque el segmento distal se somete a un proceso de degeneración axonal autodestructivo, el destino del segmento proximal depende principalmente del tipo de axón y la naturaleza del daño. En neuronas competentes para regeneración (cómo las neuronas sensitivas), el cono de crecimiento se vuelve a formar con los componentes del citoesqueleto organizados, para guiar la extensión polarizada del axón. Sin embargo, en neuronas no-competentes para regenerar, cómo ocurre en las neuronas del SNC, los bultos formados después del daño axonal se transforman en bulbos de retracción axonal, caracterizados por presentar microtúbulos desorganizados y otras organelas. Reimpreso desde Neuron, Vol. 90, Issue 3, p437-451. He, Zhigang and Jin, Yishi. Intrinsic Control of Axon Regeneration, página 440, Copyright (2017), con el permiso de Elsevier (86).

Una vez se ha sellada la membrana, se ensambla el cono de crecimiento. El incremento en los niveles de $[Ca]^{2+}$ regula la reorganización del citoesqueleto en el extremo distal del axón produciendo primero una ola de retracción de despolimerización de los microtúbulos a lo largo del segmento axonal (89-91), y en paralelo, la despolimerización de los filamentos de actina de los complejos de adhesión al sustrato (92). Luego, la calpaína, activada por los niveles de $[Ca]_i^{2+}$ rompe localmente las redes corticales de espectrina en el extremo distal axonal (88, 93). Finalmente, el citoesqueleto de actina y microtúbulos se reorganiza y da forma al cono de crecimiento.

Con el cono de crecimiento formado, el axón puede crecer (extensión axonal), para lo cual el cono es provisto del material necesario (p.e. organelas, proteínas, vesículas) gracias a la síntesis local de proteínas en el axón y del transporte axonal, sin la intervención del soma (94, 95), al menos durante las primeras etapas de la regeneración. Esta característica explica que las neuronas sensitivas logren reparar sus axones, incluso cuando el daño ocurre a largas distancias del soma. Entre más largo sea el axón, el transporte axonal demandará una mayor energía para mantener la respuesta regenerativa. Se piensa que la mayoría de los materiales necesarios para el crecimiento del nuevo axón se transportan por medio de los microtúbulos, debido a que el transporte basado en actina-miosina no es eficaz para el transporte a largas de distancias. Por otra parte, la descripción reciente de las zonas de ensamblaje/desensamblaje de actina F en los axones (senderos de actina) sugiere un papel más importante de la actina en el transporte axonal.

Durante la regeneración axonal, la dinámica del citoesqueleto de actina, la síntesis de proteínas y el transporte axonal están regulados por vías de señalización que operan en lo axones y también por los cambios en los niveles de $[Ca]_i^{2+}$. Se ha demostrado que la vía de las MAP (proteínas quinasas activadas por mitógenos), a través de la activación de DLK-1 (de las siglas en inglés *Dual Leucine-Zipper Kinase*), es esencial para la regeneración axonal y posiblemente funciona como sensor temprano del daño axonal (96-99). La proteína DLK parece ser activada por el incremento inicial en los niveles de $[Ca]_i^{2+}$ y viaja

hacia el soma para inducir una respuesta transcripcional y la alteración de la estabilidad de los microtúbulos (100, 101).

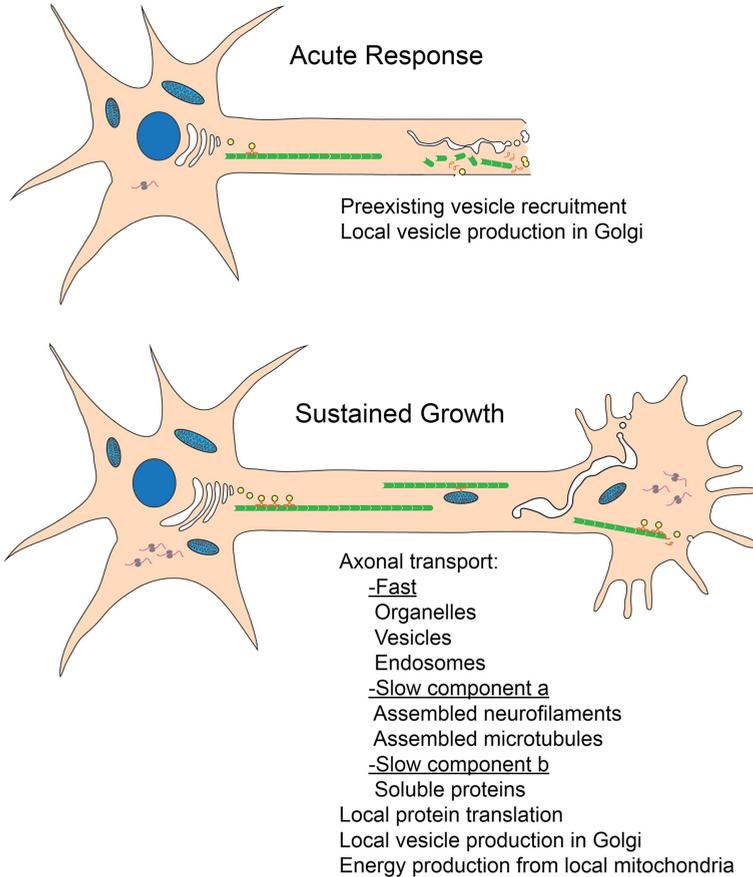


Figura 1.17: Provisión del material necesario para la extensión axonal. Inmediatamente después del daño, la extensión (el crecimiento) del axón regenerado depende del suministro de materiales desde dos fuentes: (1) En la etapa temprana de la regeneración, vesículas pre-existentes en el segmento axonal proximal podrían fusionarse con el *axolemma* (membrana plasmática axonal) para resellar la membrana y brotar transientemente el axón. (2) La síntesis local de lípidos y proteínas podrían adicionar el material necesario al extremo axonal en crecimiento. Sin embargo, esta actividad es muy limitada en las neuronas adultas del SNC. Para sostener la extensión axonal, el transporte axonal anterógrado de largo rango (soma \rightarrow terminal axonal) sirve como la mayor fuente de material (proteínas, vesículas, organelas). Reimpreso desde Neuron, Vol. 90, Issue 3, p437-451. He, Zhigang and Jin, Yishi. Intrinsic Control of Axon Regeneration, página 441, Copyright (2017), con el permiso de Elsevier.

1.4.2 Degeneración axonal

La degeneración axonal es un mecanismo neuronal de autodestrucción axonal estrictamente controlado que hace parte de varios procesos en los que un segmento del axón debe ser eliminado. En cada uno de estos procesos, las señales que inducen la degeneración pueden ser varias y los eventos morfológicos que ocurren durante el proceso degenerativo son bastante similares, estos últimos son: el desensamblaje de microtúbulos, la formación de *swellings*, y la fragmentación del citoesqueleto axonal, que termina con la eliminación de los restos del axón fragmentado (102, 103).

Uno de estos procesos degenerativos, la limpieza axonal o axonal pruning, tiene lugar durante múltiples etapas del desarrollo del sistema nervioso humano. En este proceso, el sistema nervioso sufre una eliminación progresiva de las sinapsis y las terminales axonales para crear una especificación de los circuitos neuronales (104-106). Otros procesos degenerativos axonales relacionados con el daño axonal externo y enfermedades neurodegenerativas son la degeneración Walleriana y el fenómeno del *dying back* o marcha hacia atrás.

Degeneración Walleriana

Otra situación que involucra la degeneración axonal es cuando el axón es lesionado a causa de un corte o por el bloqueo del transporte axonal, ó la alteración química de su microambiente. En este caso, el segmento axonal distal al sitio de la lesión degenera de forma anterógrada. Este tipo de degeneración se denomina *degeneración Walleriana*, y los eventos moleculares y morfológicos que forman parte de él pueden durar entre 12-24 horas en condiciones de in vitro (107, 108), y entre 24-48 horas en condiciones de in vivo (109). Durante este tiempo, proteasas activadas por $[Ca]^{2+}$ cortan el axón y la vaina de mielina formando fragmentos axonales que luego son recogidos por macrófagos, los cuales cooperan con las células de Schwann para proveer factores tróficos y moléculas que actúan como señales para la guía del axón, en el caso de que el axón sea competente para regenerar (109-112).

En los últimos años ha emergido un modelo molecular propuesto en Wang y col. (113) y Conforti y col. (114) para la degeneración Walleriana (Figura 1.19). En ausencia de daño, la neurona presenta un balance de los niveles de un factor de supervivencia, la proteína Nicotinamida mononucleotida adenililtransferasa (NMNAT) con sus distintas isoformas (115-118) (Figura 1.18).

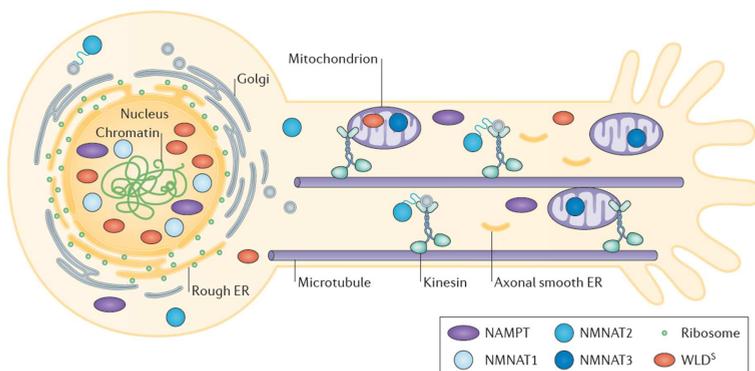


Figura 1.18: Compartimentalización de las enzimas biosintéticas de NAD⁺ en las neuronas. Varias isoformas del factor de supervivencia NMNAT están distribuidas en varios sitios de la neurona. Las isoformas NMNAT1, NMNAT2, NMNAT3 son proteínas endógenas que están localizadas en el núcleo, el citoplasma y la mitocondria respectivamente, esta distribución es paralela a la de otras enzimas metabolizantes de NAD⁺. La proteína WLD5, se encuentra en axones con mucha más concentración que en el núcleo. En condiciones normales el transporte axonal anterógrado mediado por quinesinas asegura una continua provisión de los factores de supervivencia al axón. Reimpreso y adaptado con fines de ilustración desde Nature Reviews Neuroscience, Vol. 15, No.6, p394-409. Conforti, Laura and Gilley, Jonathan and Coleman, Michael P. Wallerian degeneration: an emerging axon death pathway linking injury and disease, página 398, Copyright (2017), con el permiso de Nature Research.

La actividad enzimática de NMNAT2 mantiene altos los niveles de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada, NAD⁺, que mantiene bajos los niveles de [Ca]²⁺ a través de la regulación de la entrada y salida de [Ca]²⁺ de los almacenes intracelulares tales como el retículo plasmático (119-122) y la mitocondria (123-125). La regulación a la baja de los niveles de [Ca]²⁺ en el axoplasma previene la activación de las proteínas proteasas dependientes de [Ca]²⁺ como las *calpaínas* (111, 126-128), evitando su actuación sobre las proteínas del citoesqueleto como la espectrina, preservando así la estructura y la integridad del axón.

Cuando se presentan alteraciones patológicas en el axón como el bloqueo del transporte axonal ó el daño mecánico, se produce una disminución de los niveles de NMNAT2 y NAD⁺ en el axón. La reducción en los niveles de NAD⁺ regulan a la alta los niveles de [Ca]²⁺ en el axoplasma, lo cual se acompaña de un incremento en la entrada de [Ca]²⁺ desde el espacio extracelular a través de canales, y la consecuente liberación de [Ca]²⁺ de los almacenes internos. El incremento de [Ca]²⁺_i activa las calpaínas, las cuales inician una degradación

proteolítica de las proteínas del citoesqueleto axonal y la posterior destrucción del axón.

La actividad de NMNAT2 puede ser promovida por la proteína de degeneración Walleriana lenta (WLDS, por sus siglas en inglés *Slow Wallerian degeneration protein*) (129, 130), la cual comparte el dominio para la síntesis de NAD^+ (118, 131). Existe evidencia de que la proteína WLDS podría aumentar los niveles de NMNAT2 ó sustituirla, manteniendo así los niveles de NAD^+ dónde sea necesario. Además WLDS también podría aumentar la actividad de las otras isoformas, como por ejemplo NMNAT3, localizada preferentemente en la mitocondria (116).

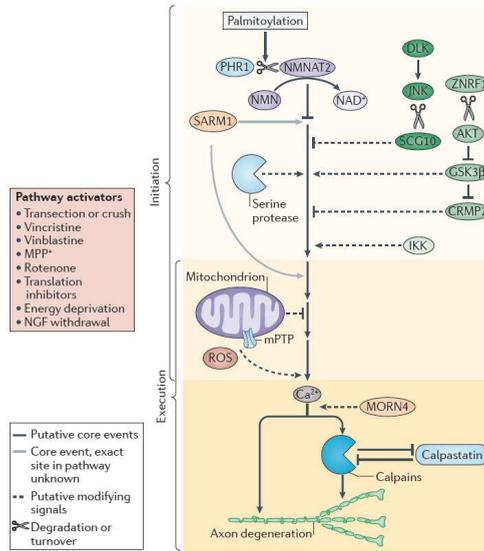


Figura 1.19: Mecanismo molecular emergente para la degeneración Walleriana.

Ruta molecular especulativa de los eventos que ocurren durante la degeneración Walleriana y la degeneración axonal sensitiva WLDS propuesta por (114). A la izquierda se listan varias señales de estrés, que se presumen podrían activar esta ruta (El factor de crecimiento nervioso [NGF] activa una ruta posiblemente paralela que implica la señalización de un receptor de muerte celular y la activación de caspasa que es requerida para el *prunning axonal*). Esta ruta está relacionada con los eventos que ocurren en un segmento central del axón que debe ser eliminado y no corresponde a la degeneración axonal del sitio cercano del daño. Se propone que el núcleo de la ruta, consistente de una fase de iniciación y una fase de ejecución, recibe la entrada adicional de otras señales modificantes. Algunas moléculas y señales se pueden asignar a la fase de inicio o ejecución con algo de certeza, sin embargo es difícil asignar algunos participantes, como SARM1, la cual se cree contribuye al núcleo central, y la mitocondria con las especies reactivas de oxígeno (ROS), la cual puede actuar en cualquiera de las dos fases. Estos participantes se muestran provisionalmente influenciando los pasos en ambas fases, aunque posiblemente actúen en un único punto. Se propone que la regulación de la actividad y sustitución de NMNAT2 representa un nodo temprano en la ruta y en el punto en el que WLDS y/o la sobre expresión de las isoformas de NMNAT ó la pérdida de PHR1 probablemente actúan para retardar la degeneración. La NMNAT2 endógena está predicha inhibir la ruta en axones sanos, y la pérdida de esta proteína podría actuar como un iniciador de la activación de la ruta en situaciones en las que el suministro al axón falla. CRMP2, collapsin response mediator protein2); DLK, de las siglas en inglés dual leucine zipper kinase; GSK3 β , glycogen synthase kinase 3 β ; IKK, inhibitor of nuclear factor- κ -kinase; JNK, JUN amino-terminal kinase; MORN4, MORN repeat-containing protein 4; MPP+, 1-methyl-4-phenylpyridinium; mPTP, mitochondrial permeability transition pore; SCG10, superior cervical ganglion 10. Reimpreso y adaptado con fines de ilustración desde Nature Reviews Neuroscience, Vol. 15, No.6, p394-409. Conforti, Laura and Gilley, Jonathan and Coleman, Michael P. Wallerian degeneration: an emerging axon death pathway linking injury and disease,página 398, Copyright (2017), con el permiso de Nature Research.

El fenómeno de dying back

La degeneración de las fibras nerviosas puede ocurrir en la edad adulta del organismo como parte de la patología de enfermedades que afectan al sistema nervioso (neuropatías). Este tipo de degeneración tiene un patrón *dying back* o de *muerte hacia atrás* (102), el cual consiste en una regeneración retrograda que se inicia en la sinápsis o en el extremo más distal de axones sensitivo-motores, y que generalmente ocurre de forma anticipada a la pérdida del soma de la neurona (132, 133) (Figura 1.20). Este tipo de fenómeno es patogénico y puede comprometer la supervivencia neuronal, y por ende puede ocasionar graves defectos en la función neuronal de los dos sistemas nerviosos central y periférico.

Este fenómeno se ha observado como parte de los mecanismos neurodegenerativos de varias enfermedades humanas como Alzheimer(134), Parkinson (135), Huntington (136), Esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (137, 138) y ataxia de Friedreich (139).

El fenómeno de *dying back* inicia con una degeneración axonal distal en la sinapsis, causando la denervación de los tejidos diana, continuando con una degeneración retrógrada del axón que es más lenta que la observada en la degeneración Walleriana, y que a diferencia de ésta se dirige hacia el soma de la neurona (137, 138). Una de las características más importantes de éste fenómeno es que la degeneración se presenta anticipadamente a la manifestación clínica de los síntomas de la enfermedad neurodegenerativa. El proceso degenerativo del axón, al igual que en la degeneración Walleriana, incluye el desensamblaje de microtúbulos, la formación de hinchazones axonales, y la fragmentación del citoesqueleto axonal, que termina con la eliminación de los restos del segmento del axón (102, 103). Sin embargo, diversos estudios en modelos animales para las enfermedades neurodegenerativas como ELA, han permitido conocer mejor cuales son los eventos moleculares que provocan la degeneración en la sinapsis. Una de las teorías propone que la acumulación de complejos proteicos insolubles en la sinapsis causaría un microambiente tóxico que podría interrumpir el suministro de moléculas necesarias para el mantenimiento del axón, promoviendo a la denervación de los tejidos mientras que el soma permanece intacto (140). Otra teoría propone que la acumulación de neurofilamentos impide un correcto transporte retrogrado en el axón, alterando la homeostasis axonal y provocando la pérdida del soporte mecánico del axón (141, 142). Además, la alteración del transporte anterógrado bloquea el suministro de factores neurotróficos derivados del tejido inervado induciendo el fenómeno de *dying back* (138).

Por otra parte también se han propuesto teorías enfocadas en la susceptibilidad a la degeneración axonal de cierto tipo de neuronas. Por ejemplo, las diferencias en el ratio de inervación y el calibre axonal parecen influir la degeneración de las motoneuronas, las cuales presentan grandes tamaños y las altas demandas metabólicas (143, 144).

Otras teorías están relacionadas con la alteración de los niveles de expresión de proteínas asociadas con la guía y el crecimiento axonal. Por ejemplo, en las sinapsis musculares de las neuronas motoras (uniones neuromusculares ó NMJ, por las siglas del inglés *Neuromuscular Junctions*) se ha encontrado altos niveles de la proteína semaforina-3a (Sema3A), la cual es una proteína señalizadora de repulsión durante la guía axonal. Altos niveles de esta proteína podría provocar la denervación de las sinapsis musculares e iniciar un proceso degenerativo retrógrado (145-147).

El actual conocimiento de los eventos moleculares que subyacen bajo el proceso de degeneración axonal en el fenómeno de *dying back* parecen ser similares en algunos puntos a los de la degeneración Walleriana, sin embargo la evidencia sugiere que existen ciertos eventos moleculares específicos asociados con en el fenómeno de *dying back* las cuales podrían determinar el inicio de la degeneración en las diferentes neuropatías.

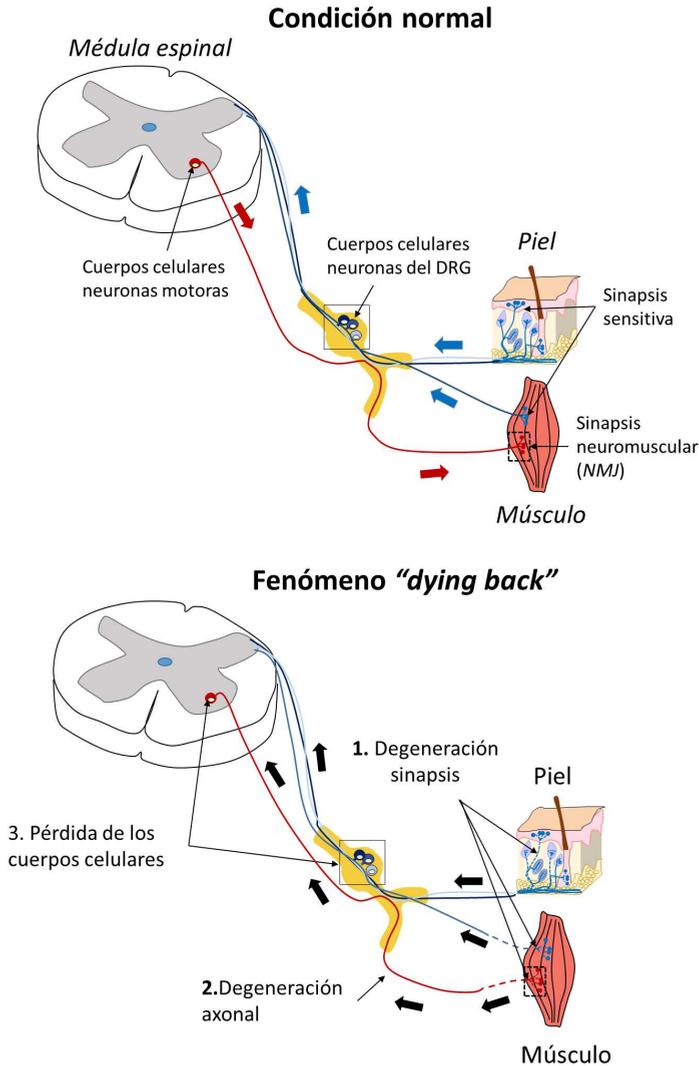


Figura 1.20: Degeneración axonal en el fenómeno de *dying back*. En un sistema nervioso sano, el transporte axonal anterógrado (soma \rightarrow extremo distal) y retrógrado (soma \leftarrow extremo distal del axón) mantiene un suministro continuo de proteínas y biomoléculas, que garantiza el mantenimiento de las sinapsis de las neuronas del DRG (neuronas sensitivas) y las neuronas motoras (uniones neuromusculares ó NMJ, por las siglas del inglés Neuromuscular Junctions) en sus tejidos diana. En el fenómeno de *dying back*, ocurre una degeneración progresiva retrógrada que podría iniciar con la degeneración en las sinapsis que causa una denervación de los tejidos diana, seguido de una degeneración axonal y una eventual pérdida del soma. Las flechas azules y rojas indican la dirección de la transmisión sináptica. Las flechas negras indican la dirección del proceso degenerativo en el fenómeno de *dying back*.

1.5 Enfermedades del sistema nervioso periférico: la ataxia de Friedreich

El sistema nervioso central y periférico (SNP) de ser humano pueden verse afectados por diversos trastornos que afectan las fibras nerviosas. El trastorno del sistema nervioso se conoce como *neuropatía*, y si ésta ocurre particularmente en los nervios periféricos se denomina *neuropatía periférica*. Las *neuropatías periféricas* pueden ser *mononeuropatías* si el trastorno afecta un único nervio, y *polineuropatías* si afecta a varios.

Dentro de los factores que pueden causar las neuropatías periféricas están las enfermedades crónicas como la diabetes, procesos inflamatorios, sustancias neurotóxicas y causas genéticas hereditarias. Una de las neuropatías periféricas hereditarias es la ataxia de Friedreich.

En el año 1863, Nikolaus Friedreich (1825-1882) diagnosticó por primera vez la condición, que ahora es denominada ataxia de Friedreich (FRDA, OMIM 229300). La FRDA es una enfermedad de herencia autosómica recesiva cuya prevalencia es de unos 4,7 casos por 100,000 habitantes en España, y se considera la ataxia hereditaria más común en la población caucásica (148, 149).

1.5.1 Características clínicas y neuropatología de la enfermedad

La edad promedio de aparición de los síntomas de la FRDA son los 11 años, y generalmente antes de los 25 años. Los síntomas clínicos en pacientes FRDA pueden incluir una ataxia progresiva con marcha alterada; dismetría; disartria; disfagia; pérdida severa de la sensibilidad propioceptiva y superficial; debilidad y atrofia en las extremidades; pérdida del tono muscular, espasticidad, o una combinación de ambos; reflejos deprimidos; reflejos extensores plantares; pérdida visual; déficit auditivo y la presencia de una neuropatía axonal sensitiva. La FRDA se caracteriza por presentar velocidades de conducción motora dentro de los valores normales.

Aproximadamente el 85 % de los pacientes mueren por causa de una cardiomiopatía hipertrófica, y aproximadamente el 25 % desarrollan diabetes mellitus, como causa de un efecto combinado entre la deficiencia de la insulina y la resistencia a insulina (150). En lo que respecta a la progresión del trastorno neurológico, éste se considera variable, los pacientes siempre terminan necesitando sillas de ruedas entre los 15-20 años desde la aparición de la enfermedad (151, 152).

Existen otras variantes de la FRDA que se consideran atípicas, pero son causadas por mutaciones en el mismo gen FRDA. La primera de este tipo es una FRDA de aparición tardía con un inicio de la enfermedad superior a los 25 años, y con una progresión más lenta y con menor frecuencia de los defectos esqueléticos (pie cavo y escoliosis). La segunda variante es una FRDA que se caracteriza por presentar reflejos de estiramiento conservados, de aparición más tardía y con menor incidencia de los defectos esqueléticos y cardiomiopatía, además de conservar el reflejo muscular profundo (153, 154).

Los pacientes FRDA, presentan una neuropatía axonal sensitiva caracterizada por una degeneración primaria en las raíces dorsales de los ganglios dorsales (DRG) con la pérdida selectiva de las neuronas sensitivas grandes, encargadas de la propiocepción o sentido del posicionamiento (neuronas propioceptivas) (150) (Figura 1.21). El proceso degenerativo continua con la degeneración axonal de las columnas posteriores, los tractos espinocerebelares, los tractos corticoespinales, y las fibras largas mielinizadas de los nervios periféricos localizados en el sistema nervioso central (SNC) (155) (Figura 1.21).

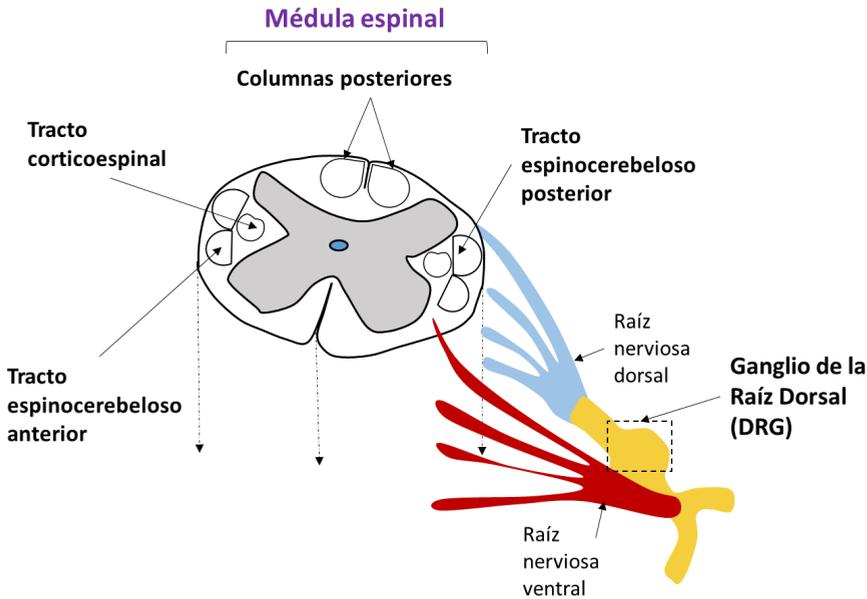


Figura 1.21: Zonas del sistema nervioso alteradas en ataxia de Friedreich (FRDA). Se ilustra las zonas del sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP) afectadas por la ataxia de Friedreich: El primer sitio de afectación es el ganglio de la raíz dorsal (DRG) que alberga los somas de las neuronas sensitivas. Posteriormente, las columnas posteriores, los tractos espinocerebelosos y corticoespinales en el SNC.

En el SNC, la columna de Clarke localizada entre el asta anterior y posterior está atrofiada. En la columna de Clarke reside un grupo de interneuronas, las cuales intervienen en la coordinación y la regulación de la actividad motora. Sin embargo, las neuronas motoras residentes en el asta anterior están intactas. En el bulbo raquídeo, los núcleos *gracilis* y *cuneatus*, donde terminan las columnas dorsales de la médula espinal, están atrofiados, indicando una degeneración trans-sináptica. Los tractos corticoespinales están severamente afectados en las porciones distales sugiriendo un patrón degenerativo de tipo *dying back*. En el cerebelo, donde tiene lugar el procesamiento de la información propioceptiva y el ajuste de los movimientos finos, el núcleo dentado está severamente afectado y hay pérdida de células de Purkinje acompañada de una pérdida de células piramidales en la corteza cerebral. Adicionalmente, investigaciones recientes sugieren una atrofia de materia gris subcortical en el ganglio basal, el mesencéfalo y el tálamo. Se ha observado el déficit de funciones cognitivas de orden superior, incluida la planificación motora (156) y el control cognitivo (157),

lo cual puede ser explicado por la combinación de trastornos cerebelosos y cerebrales (158).

Varios estudios apoyan la hipótesis de que la axonopatía característica de la ataxia de Friedreich ocurre mediante el fenómeno de *dying back*, que afectaría a los nervios sensitivos y a los tractos centrales espinocerebelosos y corticospinales. En pacientes FRDA, se ha observado una pérdida preferentemente distal de fibras nerviosas (159, 160) y la pérdida de fibras mielinizadas (150, 161) en el nervio sural, un nervio sensorial localizado en una región de la pantorrilla. La hipomielinización se podría asociar a la falta de interacción entre los axones y las células de Schwann, lo que sugiere una contribución mixta de varios factores en la axonopatía de la FRDA (161).

El estudio patológico del DRG y de biopsias del nervio sural de pacientes FRDA descrito por Koeppen y Mazurkiewicz (150), muestra que en el DRG, en tanto que la enfermedad progresa la destrucción de las neuronas sensitivas del DRG se manifiesta por una proliferación de las células satélite y la formación de nódulos residuales. En el nervio sural, que está localizado mucho más lejos del DRG que las raíces dorsales, se observó la persistencia de axones delgados, una reducción de las vainas de mielina y una reducción significativa de las células de Schwann. Estas observaciones sugieren que la mejor interpretación de la patogénesis de la neuropatía sensitiva en la FRDA es la combinación de un retraso en el desarrollo de las neuronas sensitivas o hipoplasia neuronal, una mielinización ineficiente y una axonopatía progresiva lentamente superpuesta.

1.5.2 Patogénesis molecular de la ataxia de Friedreich

La ataxia de Friedreich (FRDA) es una enfermedad neurodegenerativa causada por mutaciones en el gen que codifica para la proteína mitocondrial frataxina (FXN)(162). La FRDA es una enfermedad con un patrón de herencia autosómica recesiva. El 98% de los pacientes presentan dos alelos que contienen una expansión patológica de un triplete (guanina-adenina-adenina) en el intrón 1 del gen *FXN* (162), localizado en el cromosoma 9 (9q21.11) (163-165) (Figura 1.22). Cuando la secuencia del trinucleótido GAA es mayor de aproximadamente 60 repeticiones, se forman complejos de triple hélice del ADN, que promueven la desacetilación de las histonas durante el proceso de la transcripción del mRNA (166) bloqueando la expresión de la frataxina (167, 168).

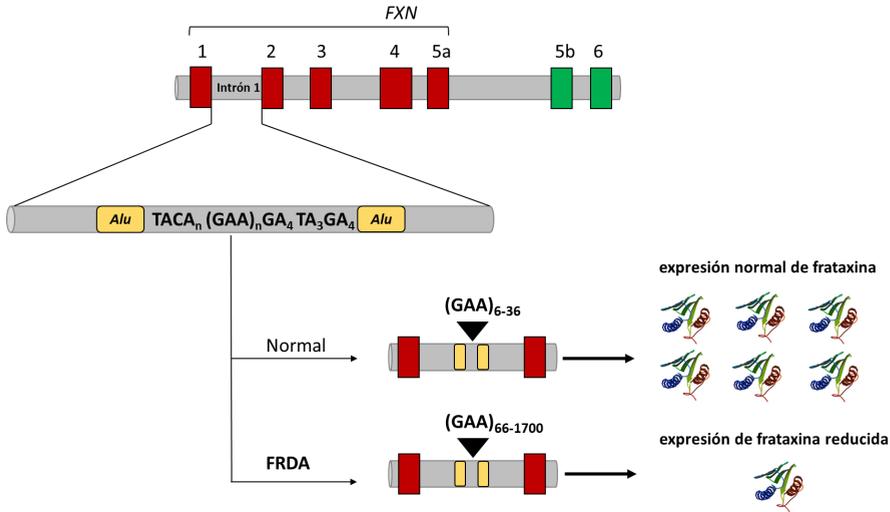


Figura 1.22: Gen que codifica para frataxina (FXN). El gen FXN que codifica para frataxina está compuesto por 6 exones: 1-5a (rojo). Los exones 5b y 6 (verde) hacen parte de dos transcritos alternativos que codifican para dos isoformas de frataxina. El intrón 1 contiene el elemento *Alu* (amarillo) en cuya secuencia se encuentra la expansión del triplete guanina-adenina-adenina (GAA). La expansión contiene entre 6 y 36 repeticiones en la población sana, mientras que en los pacientes FRDA puede contener hasta 1700 repeticiones, lo cual resulta en un bloqueo de la transcripción de la proteína y consecuentemente la reducción severa en los niveles de frataxina. Adaptado desde (169).

En los pacientes de FRDA, la expresión de frataxina se conserva en un nivel bajo, pero nunca llega a ser nula, de hecho, la ausencia total de frataxina resulta ser letal para embriones murinos de los modelos murinos para FRDA (170). Un pequeño porcentaje de pacientes (2%) tienen una expansión del triplete GAA en uno de los alelos y una mutación puntual en el otro (170, 171).

El debut y la progresión de la enfermedad es inversamente proporcional con el número de las repeticiones del triplete GAA. A mayor número de repeticiones mas temprana es la edad de aparición de la enfermedad.

Estructura de frataxina

La frataxina es una proteína pequeña mitocondrial de ~ 21 kDa, es codificada por el genoma nuclear. La frataxina está altamente conservada y distribuida de forma ubicua en organismos procariotas y eucariotas (172, 173).

En la célula, la frataxina es sintetizada como un precursor de 210 aminoácidos (~ 23 kDa) conteniendo una etiqueta mitocondrial en su extremo amino terminal y luego, en la mitocondria, se obtiene una forma intermedia (42-210aa, 19 kDa) y la forma madura (81-210 aa, 14,2 kDa) al ser procesada por una peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP) (174). En la mitocondria, frataxina (81-210 aa, 14,2 kDa) se localiza en la matriz mitocondrial donde se asocia con la membrana interna mitocondrial.

La estructura tridimensional de frataxina está compuesta por dos hélices α terminales que forman un plano, sobre cinco hojas β que forman un segundo plano. Otra hoja β intersecciona los dos planos para formar una estructura tipo sándwich (175, 176). La secuencia proteica de frataxina contiene una gran cantidad de residuos conservados (Asp,D; Glu,E), localizados entre la primera hélice y el borde de la hoja β -1 (177). Esta cresta ácida semi-conservada genera una superficie cargada negativamente que cuenta para casi un cuarto del área total accesible de frataxina. Varios estudios han demostrado la importancia de esta región para la función de frataxina (178) y particularmente en el caso de la FRDA se han observado varias mutaciones de éstos aminoácidos en los pacientes FRDA. En la parte central de frataxina se han descrito las mutaciones: L106S, I154F, L156P, W173G, L182H, L182F y H183R; en la superficie cargada negativamente se ha descrito la mutación D122Y; y en el plano formado por las hojas β se ha descrito la mutaciones G130V, W155R y R165C (171, 179-181).

El RNAm de frataxina está expresado predominantemente en tejidos con una alta tasa metabólica como por ejemplo el corazón, el hígado, músculo esquelético y el páncreas (162). Los niveles de expresión de frataxina es alta en el sistema nervioso, sin embargo éstos niveles se reducen de forma gradual observándose los mayores niveles de expresión en el sistema nervioso periférico y los menores en el sistema nervioso central. Mientras que frataxina tiene altos niveles de expresión en los ganglios de las raíces dorsales (DRG), seguido por la médula espinal, en el cerebelo y el cerebro se detectan menores niveles de expresión (162), el cerebro es por tanto, el tejido que presenta los valores más bajos de expresión.

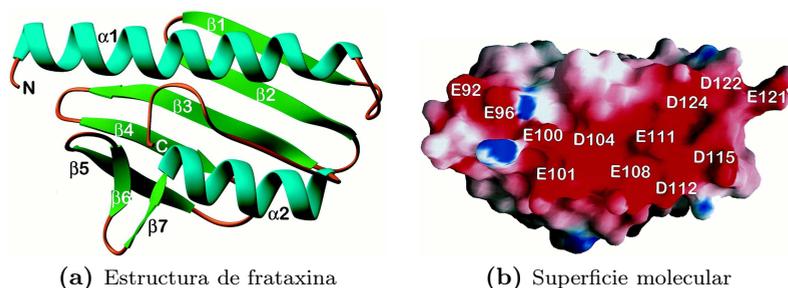


Figura 1.23: (a) Diagramas *Ribbon* que muestran el plegamiento de la frataxina, un sándwich compacto α/β , con las hélices α en color turquesa y la hojas β en verde. Las hojas $\beta1\beta5$ forman un plano de hojas β anti-paralelo que interactúa con las dos hélices, $\alpha1,\alpha2$. Las dos hojas son anti-paralelas entre sí y al plano de las hojas β . Una segunda hoja β , más pequeña esta formada por el extremo C terminal de las hojas $\beta5$, y las hojas $\beta6$ y $\beta7$. (b) Figura que muestra la superficie molecular de frataxina. La molécula está orientada como se muestra en (a). Se muestran los 12 residuos ácidos (Asp,D; Glu,E) que hacen parte de la cresta ácida semi-conservada que genera una superficie cargada negativamente. Extraído de Dhe-Paganon y col. (177).

Función de frataxina

Una larga línea de evidencia demuestra que frataxina (FXN) participa en la biosíntesis de los centros de hierro-azufre (Fe/S), en el metabolismo del hierro y en la protección contra el estrés oxidativo. Los centros de Fe/S (ISC, de las siglas en inglés *Iron Sulfur cluster*) son cofactores de proteínas y son requeridos para varios procesos biológicos en los organismos eucariotas tales como la fosforilación oxidativa. En los organismos eucariotas, la vía biosintética de los ISC está localizada en la matriz mitocondrial y es responsable de la síntesis de los ISC: [2Fe-2S] , [4Fe-4S], así como también distribuyen estos ISC a las proteínas que los requieren (182).

Varios estudios apoyan la función de frataxina como una proteína activadora alostérica del complejo multicomponente biosintético de los ISC en los organismos eucariotas. El núcleo del éste complejo biosintético está compuesto por la proteína NFS1 (proteína cisteína desulfurasa, donadora de azufre), la proteína mitocondrial ISD11 (donadora de azufre), y la subunidad catalítica ISCU2 (andamiaje sobre la cual se ensamblan nuevos centros). Recientemente se ha propuesto que la proteína ACP (*acyl carrier protein*) como un componente funcional esencial para el complejo biosintético de los ISC en los organismos eucariotas (182-184). La FXN se une al complejo como una proteína donadora de Fe. La ACP, al igual que FXN, está localizada en la mitocondria e

interviene en la vía de síntesis de ácidos grasos mitocondrial (FASmt) y ayuda a organizar otras proteínas importantes para la producción de energía. En la mitocondria ACP funciona como una subunidad requerida para el complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa) de la cadena de transporte de electrones (CTE) que contribuye a la producción de ATP (185-187). Recientemente Cory y col. (182) han presentado la estructura cristalográfica y electro-microscópica del complejo biosintético formado por NFS1-ISD11-ACP que forma el núcleo del complejo de ensamblaje de los ISC en el ser humano y que se ensambla con ISCU2 y FXN. Los autores también proponen que el ensamblaje del complejo NFS1-ISD11-ACP ha adoptado una arquitectura particular en los organismos eucariotas que les permite a FXN y ACP controlar la biosíntesis de los ISC (182).

En el caso particular de FXN, sorprendentemente se ha observado que la forma intermedia (FXN⁴²⁻²¹⁰) y la forma madura (FXN⁸¹⁻²¹⁰) de FXN tienen propiedades funcionales diferentes. Por una parte FXN⁴²⁻²¹⁰ presenta tendencia a formar oligómeros que almacenan hierro como mineral férrico estable, mientras que FXN⁸¹⁻²¹⁰ es una proteína monomérica que solo puede donar hierro ferroso pero no puede almacenarlo. Las dos isoformas pueden donar hierro para la síntesis de los ISC, pero la forma monomérica FXN⁸¹⁻²¹⁰ es incapaz de mantener la síntesis de los ISC en condiciones oxidantes. Además, las dos isoformas exhiben diferentes sitios de unión a las otras proteínas que forman el complejo biosintético de los ISC (188). En el caso de la biogénesis de los ISC, se ha propuesto que una disminución en la expresión de frataxina afectaría la actividad de los complejos I, II (succinato deshidrogenasa) y III (complejo citocromo bc₁) de la CTE que contienen ISC, y también la actividad de proteínas mitocondriales que requieren de ésta fuente de hierro e ISC la ferrocatalasa (protoporfirina + Fe⁺² ↔ heme B + 2 H⁺) y la aconitasa mitocondrial (189).

Se piensa que en la ausencia de FXN, el hierro no puede ser incorporado en los ISC quedando libre en una forma reactiva que se acumula incrementando la sensibilidad de las células al estrés oxidativo, y exponiéndolas aún más a toxinas endógenas y ambientales (190). Sin embargo, el fenotipo de acumulación de hierro en modelos murinos y pacientes FRDA continua siendo motivo de controversia. Por ejemplo, la ausencia de frataxina en pacientes FRDA causa la acumulación de hierro en el núcleo dentado ó en las células gliales del ganglio dorsal (DRG) (191, 192), y más recientemente Chen y col. (193) mostraron por primera vez evidencia directa de la acumulación de hierro ferroso (Fe⁺²) y hierro férrico (Fe⁺³) en el cerebro de un modelo murino en el que los niveles de Fxn fueron reducidos en el sistema nervioso usando el sistema AAV (virus adenoasociados) y CRISPR/Cas9 (193, 194).

Otros estudios sugieren que el hierro no es el único metal con el cual frataxina puede interactuar, estudios de frataxinas bacterianas y el modelo de *Drosophila* para la FRDA sugieren que frataxina podría interactuar con otros metales como cobre (Cu^{2+}), Europio (Eu^{3+}), Manganeseo (Mn^{2+}) y Zinc (Zn^{2+}) (175, 195). Estos metales son importantes para la mitocondria porque los requiere para varias de sus funciones fisiológicas, y además todos ellos incluyendo el hierro, son importantes para la estructura y la función de las proteínas (catálisis, transferencia de electrones, unión de ligandos).

Una larga línea de evidencia obtenida a partir de pacientes FRDA, y el silenciamiento de frataxina en líneas celulares y modelos murinos muestran que el déficit de frataxina causa una disfunción en la CTE, sin embargo esta afectación es variable y ha mostrado ser dependiente del tipo celular. Por ejemplo, el estudio en biopsias de corazón de pacientes FRDA revelaron un déficit de la actividad de los complejos I, II y III, pero no se observaron alteraciones en otros tejidos incluido el tejido nervioso (196, 197). La actividad de los complejos II, III y IV resultó estar afectada en linfoblastos derivados de pacientes FRDA, sin embargo en neuronas y miocardiocitos derivados de células madre pluripotentes de pacientes FRDA no se observó alteración de la CTE (198). El análisis del tejido cardíaco del modelo murino **YG8R** para la FRDA mostró una afectación de los complejos I, II, III, que no siempre resultó ser significativo (199). Por otra parte, en nuestro laboratorio el análisis proteómico del ganglio dorsal del ratón **YG8R** ha revelado una disminución de cuatro subunidades implicadas directamente en el flujo de electrones del núcleo catalítico del complejo I (NDUFA10, NDUFAF7, NDUFS1, NDUFA10) (200). También se observó la disminución dos componentes del complejo I caracterizadas por ser proteínas Fe/S (NDUFS3 y NDUFS1) (200).

El análisis de la CTE en modelos celulares con silenciamiento de frataxina han mostrado resultados variables de la afectación de los complejos. Por ejemplo, el silenciamiento de oligodendroglioma produjeron defectos en la actividad de las enzimas aconitasa y adrenoxina que requieren ISC (201). El silenciamiento de frataxina en una línea celular murina híbrida como motoneuronas (NSC34) produce la inhibición de la actividad del complejo I de la CTE (202). Además, en nuestro laboratorio el silenciamiento de frataxina en células de neuroblastoma humano mostró la pérdida significativa de la actividad del complejo IV de la CTE asociada a una menor presencia del complejo IV y la despolarización mitocondrial (169, 203).

Una de los aspectos más llamativos es la sensibilidad que produce el déficit de frataxina al estrés oxidativo. Varios estudios en modelos celulares y animales muestran que el déficit de frataxina produce un incremento en las especies

reactivas de oxígeno (ROS) (200, 203-209), generado por las alteraciones de la CTE o la acumulación de hierro (210, 211). Las ROS pueden interferir y destruir estructuras celulares y moléculas como lípidos, proteínas y material genético (ADN, ARN) incluyendo el ADN mitocondrial (ADNmt). Se ha observado que los pacientes FRDA son susceptibles a deleciones y mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt) (212), lo cual podría incrementar aun más los niveles de estrés oxidativo en la célula debido a que varias de las enzimas de la cadena respiratoria están codificadas por este material genético.

En las células FRDA el incremento del estrés oxidativo afecta la estabilidad del citoesqueleto de actina (213) y microtúbulos (214, 215). Esta afectación está relacionada principalmente con el hecho de que las proteínas del citoesqueleto son más sensibles a la oxidación por el alto contenido de grupos tiol (-SH) que contienen, haciendo que las proteínas del citoesqueleto sean oxidadas según la cantidad y la posición de los grupos tiol que contienen en sus secuencias. Los estudios en células FRDA han revelado que las proteínas del citoesqueleto de las células deficientes para frataxina son particularmente sensibles a la oxidación debido a un incremento de la glutationilación de la tubulina y la actina (213, 214). La glutationilación es una forma de oxidación reversible cuya función es la protección del aminoácido cisteína de las proteínas, las cuales contienen un grupo tiol en su cadena lateral susceptible a oxidación y que tiene un importante papel estructural en las proteínas. Específicamente, Sparaco y col. (214) mostraron mediante estudios inmunohistoquímicos en la médula espinal de pacientes FRDA existía un incremento de los niveles de la tubulina tirosinada en las motoneuronas que coincidían con un incremento de la glutationilación de los microtúbulos y una distribución patológica de la forma fosforilada del NF-H, revelando una posible relación entre el desbalance redox y la alteración de las modificaciones post traduccionales de los microtúbulos en las neuronas FRDA.

Recientemente, Piermarini y col. (215) mostraron que el silenciamiento de frataxina en una línea celular híbrida como motoneuronas (NSC34) puede causar un incremento en la glutationilación de la α -tubulina, el cual los autores relacionan con una disminución de la polimerización de los microtúbulos, una disminución del ratio de tubulina tirosinada/destirosinada, y una disminución de los microtúbulos estables. En el caso de la actina, Pastore y col. (213) observaron que los fibroblastos de pacientes FRDA experimentan un incremento del estrés oxidativo con un déficit significativo del ratio de glutatión y la forma oxidada disulfuro de glutatión (GSH/GSSG). La alteración del ratio se relacionó con un incremento de la glutationilación de varias proteínas que incluían a la actina. Adicionalmente, en este trabajo se observó una disminución de la

fluorescencia de la actina filamentosa en fibroblastos de los pacientes FRDA, lo cual los autores consideran una consecuencia del desensamblaje de los filamentos de actina probablemente inducida por la oxidación de actina (213). Estas observaciones sugieren que la dinámica de las proteínas del citoesqueleto están siendo alteradas como consecuencia del desbalance redox en las células FRDA producido por el déficit de frataxina.

Estudios previos han demostrado que la función de frataxina es importante para la morfología y la función mitocondrial, la cual es a su vez indispensable para la función celular, y especialmente la función neuronal. Amorós (169) demostró que el déficit de frataxina causa una disfunción mitocondrial en un modelo celular deficiente para frataxina, dicha disfunción está caracterizada por un incremento en los niveles de estrés oxidativo; alteraciones en la morfología mitocondrial, específicamente caracterizada por el hinchamiento de las mitocondrias y crestas desorganizadas; una depolarización de la mitocondria; y una reducción de la capacidad tamponadora de calcio mitocondrial (169, 203). Por otra parte Moliner (200) mostró que el déficit de frataxina en las neuronas del ganglio dorsal del modelo murino **YG8R** para la FRDA, produce una disfunción mitocondrial axonal caracterizada por presentar mitocondrias más redondas y más interconectadas entre sí, y distribuidas de forma aberrante a lo largo de las neuritas; también observó una despolarización de la mitocondria; un incremento en la producción de las especies reactivas de oxígeno; un fallo en la energética mitocondrial; y un fallo en la capacidad tamponadora del calcio, que provoca un incremento en los niveles de calcio intracelular mantenida en el tiempo.

Como podemos observar el déficit de frataxina puede ocasionar graves consecuencias para las células FRDA relacionadas con la disfunción mitocondrial que causa un incremento del estrés oxidativo, un fallo en el suministro energético para la célula, y particularmente la alteración del balance de los iones de calcio Ca^{2+} intracelulares debido a que éstos impactan casi todos los aspectos de la vida celular, desde los cambios conformacionales de proteínas hasta diversos procesos celulares como el crecimiento y guía axonal; la regeneración axonal; la autofagia; y la muerte celular programada (apoptosis), entre otros.

Nuevas isoformas para frataxina

En la FRDA, se han descrito la existencia de variantes transcripcionales que codifican isoformas de FXN que tienen una localización extramitocondrial (216, 217). Entre estas variantes dos exhiben especificidad de tejido y se piensa que pueden tener un papel en los mecanismos patológicos de la FRDA (217). Estas dos variantes codifican para la *Isoforma II y III* de FXN, la secuencia de estas dos isoformas pierden la etiqueta mitocondrial. Específicamente, mientras la variante transcripcional que codifica para la isoforma canónica contiene el exón 1 (ahora denominado exón1A)-exón5, el transcrito que codifica para la isoforma II de FXN pierde el exón 1A, y contiene el exón1B ó el exón1B perdiendo 18 nucleótidos del extremo 5' del transcrito (exón1B Δ 18). La variante transcripcional que codifica para la isoforma III contiene el transcrito canónico sin el exón3(Δ exón3) (217).

Estudios de fibroblastos y linfocitos de pacientes FRDA han revelado una distribución compartimentalizada de las isoformas, mientras la isoforma I de FXN ó isoforma canónica (exon1A; 14,2 kDa) se localiza predominantemente en la mitocondria, la isoforma II (transcrito conteniendo exon1A Δ 141; 14,9 kDa) se localiza en el citoplasma y la isoforma III (18kDa) en el núcleo (217). Además, el análisis de la expresión de la isoforma II y III en tejidos relevantes para la FRDA mostraron que la expresión de la isoforma II parece limitarse al cerebelo, la médula espinal y a los ganglios de las raíces dorsales y que la expresión de la isoforma III se limita al corazón. Estudios adicionales in vitro revelaron que las isoformas II y III son funcionales, logrando formar un complejo de ensamblaje de los ISC (217). El papel de éstas isoformas en la patología de la FRDA es actualmente un campo bastante llamativo dado el potencial que tiene para el entendimiento de los mecanismos moleculares subyacentes a la fisiopatología de la enfermedad.

1.6 Modelos murinos para el estudio de la ataxia de Friedreich

Los modelos murinos representan una herramienta importante para el estudio de la fisiopatología de la ataxia de Friedreich. En el caso de la FRDA, los esfuerzos por generar un modelo murino óptimo que reúna tanto la progresión de los síntomas en los tejidos afectados como los mecanismos celulares alterados en la enfermedad, han resultado ser infructuosos.

El primer modelo murino creado fué un modelo knockout para el gen de la frataxina murina (*Fxn*^{-/-}), localizado en el cromosoma 19, 19 C1; Gene ID:

14297. Este modelo resultó ser letal a nivel embrionario (E6.5), lo cual demostró la importancia de la función de frataxina para el desarrollo embrionario (170). Posteriormente se han generado modelos knockout condicionales específicos de tejido usando varios sistemas, como por ejemplo el modelo que crearon Puccio y col. (218) usando el sistema Cre-LoxP y con los promotores MCK (de las siglas en inglés *muscle creatine kinase*) y NSE (de las siglas en inglés *neuron specific enolase*). En este modelo se eligió deletar la frataxina en los mismos tejidos afectados en los pacientes como son el corazón y el sistema nervioso, y es reconocido como un modelo neurológico progresivo y específico para la FRDA. Este modelo reproduce las características fisiopatológicas y bioquímicas más importantes de la enfermedad humana como la hipertrofia cardíaca y ataxia progresiva específica con pérdida de la propiocepción, pero presentan una excesiva agresividad y signos no específicos de la FRDA, lo cual es una desventaja.

Luego, Simon y col. (219) generaron un nuevo modelo knockout condicional inducible con el sistema Cre-LoxP bajo el promotor PrP (proteína priónica). En este caso se induce la deleción de frataxina de forma tejido específica en ganglio dorsal, médula espinal y cerebelo. Este modelo se caracteriza por presentar un daño específico en los cuerpos celulares de las neuronas sensitivas largas o propioceptivas, en las raíces del ganglio dorsal, una degeneración de las columnas posteriores de la médula espinal (traslucidas debido a la desmielinización), una pérdida de las fibras nerviosas y lesiones severas en las neuronas de la columna de Clarke, pero también presenta otros signos no característicos de la FRDA (219).

Recientemente Chen y col. (193) han generado un nuevo modelo knockout condicional para la FRDA. Este modelo se generó mediante la reducción de los niveles de *Fxn* de forma selectiva en sistema nervioso del ratón usando una estrategia de CRISPR/Cas9 y el sistema de liberación de virus adeno asociados (AAV) (193, 194). Esta estrategia permite realizar modificaciones genómicas específicas y estables en tejidos específicos in vivo (194). Esta estrategia consiste en la inyección de dos vectores en los ratones recién nacidos, uno de éstos vectores es el virus que libera la nucleasa SpCas9 y el otro libera el RNA de guía único (sgRNAs) que dirige el gen diana de interés. Este modelo *Fxn*-sgRNA (ratones inyectados con el vector *Fxn*-sgRNA AAV) se caracteriza por presentar un deterioro de la función neuronal severo a tan solo cuatro meses de edad (193). El fenotipo de este modelo es más pequeño y corcovado que el del ratón control, coincidiendo con lo observado en el modelo condicional de Puccio y col. (218). Estos ratones también resultaron ser menos motiles que

los ratones control, con reflejos aberrantes y una coordinación sensorimotora deteriorada (193).

También se han desarrollado modelos murinos basados en la mutación que contienen el 98 % de los pacientes FRDA, que es la expansión del triplete GAA en el primer intrón del gen que codifica para frataxina. Uno de estos modelos es el modelo KIKI que contiene la expansión (GAA)₂₃₀ en el primer intrón del locus de la frataxina murina en homocigosis y que luego se cruzó con el modelo knockout completo de la frataxina murina para obtener un modelo en heterocigosis llamado KIKO (220). Estos modelos presentan entre el 66-83 % y un 25-36 % de la expresión de la proteína frataxina comparado con el control, respectivamente. El modelo murino KIKO no reproduce el fenotipo cardíaco o neurológico característico de la FRDA, debido a que posiblemente los niveles de expresión de frataxina superan el umbral patológico que es el 25 %.

La expansión de la repetición de GAA en el primer intrón del gen de FXN característica de la FRDA es una mutación dinámica, lo que complica su reproducción en los modelos murinos. Para reproducir un contexto genómico de la mutación característica de la FRDA se han generado modelos basados en la expansión. El ratón denominado **YG8R** es uno de estos modelos. En concreto es un ratón knockout para el gen *Fxn*, que presenta una letalidad embrionaria, rescatado con un YAC que contiene el gen FRDA humano con la expansión GAA. Este modelo fue obtenido a partir del cruce de sus antecesor YG8 que contenía una expansión GAA₉₀₊₁₉₀ con el knockout completo de frataxina murina. La presencia de las repeticiones GAA en el mismo contexto genómico que presentan los pacientes FRDA, bloquea la transcripción de la frataxina humana (*FXN*) produciendo cantidades reducidas de frataxina humana, pero suficientes para rescatar la letalidad embrionaria. La expresión de frataxina es mayor en el cerebro, seguido del cerebelo y disminuye gradualmente en la médula espinal, los ganglios dorsales y las raíces del ganglio dorsal (200). Este modelo **YG8R humanizado** exhibe síntomas neurológicos progresivos que se asemejan a los observados en pacientes FRDA, específicamente presentan un fenotipo progresivo leve, con un ligero impedimento en la coordinación y defectos locomotores, también presentan una moderada degeneración de las neuronas sensitivas grandes del ganglio dorsal, en el cual se observan vacuolas, signos de cromatólisis (un conjunto de fenómenos que aparecen cuando una neurona recibe una lesión) y una disminución de la actividad de la proteína *aconitasa*; y eventuales signos de estrés oxidativo (139, 221, 222).

Además el estudio de ultraestructural de las raíces del ganglio dorsal y los axones sensitivos en el cultivo primario del ganglio dorsal revelaron una disrupción de las capas de la vaina de mielina, acompañada de signos de degeneración axo-

nal y la aparición de vacuolas en el compartimento adaxonal (139). En general, este modelo presenta una afectación de la estructura distal de los nervios, particularmente el ganglio dorsal, las raíces dorsales y el huso muscular que es consistente con el fenómeno de muerte hacia atrás descrito en pacientes FRDA (139).

Debido a que la presencia de una expansión GAA_{90+190} en el modelo **YG8R** se consideraba sub-óptima se desarrolló un nuevo modelo para la FRDA denominado **YG8sR**. Este modelo contiene una sola copia del transgén humano para FXN y una sola expansión del triplete GAA, la expansión contenía 120 repeticiones en el ratón fundador. La repetición GAA permanece como una única unidad después de la transmisión pero exhibe variación inter-generacional y somática en el tamaño de la expansión, sugiriendo que éstos ratones pueden llegar a contener más de ~ 200 repeticiones (17). Este modelo presenta déficit progresivo del comportamiento. Estas alteraciones incluyen una disminución de la coordinación motora, la actividad locomotora, la habilidad de coordinación y alteraciones del paso (17). Este modelo también exhibe intolerancia a la glucosa a los 12 meses de edad, observándose un efecto mas pronunciado en los machos. Actualmente, este modelo *humanizado* representa uno de los modelos más convenientes para la investigación de los mecanismos y la terapia de la FRDA (17).

Los ratones **YG8sR** (machos y hembras) presentan una expresión de frataxina humana reducida en el cerebro (16%), en el cerebelo (70%) y en el hígado (24%) (17). El modelo **YG8sR** también presenta una reducción de la actividad de la proteína *aconitasa* en el cerebro, y la presencia de vacuolas en el DRG (17), similares a las observadas en el modelo **YG8R** (199).

Hipótesis y Objetivos

La formación, el crecimiento y el mantenimiento de las redes axonales, durante el desarrollo y la edad adulta de las neuronas, depende totalmente de la bioenergética mitocondrial y la homeostasis del calcio. Estos procesos están estrechamente relacionados con la regulación del citoesqueleto de actina, microtúbulos, y con el tráfico de vesículas. La deficiencia en frataxina conlleva un incremento del estrés oxidativo y cambios en la homeostasis del calcio. Teniendo en cuenta lo anterior, este proyecto de tesis basa sus objetivos en la siguiente hipótesis.

2.1 Hipótesis

La deficiencia en frataxina conlleva una disfunción mitocondrial asociada a un metabolismo anormal de calcio en la mitocondria y la generación de estrés oxidativo, que a través de la alteración del citoesqueleto de actina y/o microtúbulos provocan una dinámica del cono de crecimiento anormal que conduce a la neurodegeneración de la ataxia de Friedreich.

2.2 Objetivos

Los mecanismos que controlan la remodelación de los componentes del citoesqueleto, la formación del cono de crecimiento y su avance tienen una importancia particular para las neuronas, porque la afectación de estos procesos impacta directamente la capacidad de las neuronas adultas para mantener y reparar redes neuronales exactas. El objetivo principal de la tesis es establecer la relación entre el mecanismo de neurodegeneración en la ataxia de Friedreich con la alteración del citoesqueleto de actina y/o microtúbulos. Los objetivos específicos son:

1. Estudio *in vitro* de la dinámica del crecimiento axonal en neuronas del ganglio dorsal del modelo murino **YG8R** para la ataxia de Friedreich.
 - a) Estudio de la morfología del cono de crecimiento.
 - b) Estudio de la forma del cono de crecimiento.
 - c) Estudio de la longitud de las neuritas.
 - d) Dinámica del citoesqueleto de actina en los conos de crecimiento de neuronas del DRG.
 - e) Dinámica de los microtúbulos mediante el estudio de la tubulina tirosinada y la tubulina acetilada en las neuritas de las neuronas del DRG.

2. Dinámica del crecimiento axonal en neuronas de la raíz del ganglio dorsal del modelo murino **YG8sR** para la ataxia de Friedreich: Estudios *in vitro* con condiciones de *in vivo* realizando un seguimiento mediante *time lapse*.
 - a) Estudio de la morfología de los conos de crecimiento.
 - b) Análisis de los patrones de movimiento de los conos de crecimiento.
 - c) Análisis de la velocidad de crecimiento, longitud y trayectoria.

3. Estudio de la degeneración y regeneración axonal en la neuropatía axonal sensitiva de la ataxia de Friedreich en un modelo de daño axonal *in vitro* (axotomía).
 - a) Fenómeno de *dying-back*: estudio de cambios estructurales como la fragmentación y retracción axonal.

b) Regeneración axonal de las neuronas sensitivas adultas.

Material y métodos

3.1 Material Biológico

3.1.1 Animales

Los animales fueron alojados en grupos bajo condiciones estándar de albergue con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, con alimentos y agua ad libitum. Los procedimientos animales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), el Instituto de Biomedicina de Valencia, el Centro de Investigación Príncipe Felipe y la Universidad de Brunel-UK (United Kingdom).

Los experimentos se llevaron a cabo con las siguientes cepas de ratón:

1. **B6.Cg-*Fxn*^{tm1Mkn} Tg(*FXN*)YG8Pook/J**: Ratón homocigoto para una mutación en el gen *Fxn* (knock-out para el alelo de *Fxn*; *Fxn*⁻) y hemocigoto para el transgén YG8 (construcción que incluye dos copias del gen *FXN* con 82 y 190 repeticiones del triplete GAA respectivamente). Los ratones se adquirieron en The Jackson Laboratory (stock no. 008398 Bar Harbor, Maine). Los ratones YG8R, que no expresan frataxina murina, presentan unos niveles bajos de expresión de la frataxina humana, pero suficiente para ser compatible con la vida. Un estudio previo desveló

diferencias en los niveles de expresión en distintos tejidos neuronales, presentándose los niveles más bajos de frataxina humana en las raíces del ganglio dorsal, seguido de los ganglios dorsales, después los cordones posteriores y el tronco del encéfalo (200). Se utilizaron ratones con 24 meses de edad.

2. **Cepa control C57BL/6J**: Ratón control con fondo puro C57BL/6J. Se utilizaron ratones con 24 meses de edad.
3. **Fxn^{tm1Mkn} Tg(*FXN*)YG8Pook/2J**: Ratón homocigoto para una mutación en el gen *Fxn* (knock-out para el alelo de *Fxn*; *Fxn*⁻) y hemocigoto para el transgén YG8s (una copia del gel *FXN* con ~250-300 repeticiones del triplete GAA), denominado **YG8sR**. Comparado con el ratón **YG8R**, el ratón **YG8sR** expresa una menor cantidad de frataxina humana. Se utilizaron ratones con 2, 6 y 9 meses de edad.
4. **Cepa control Fxn^{tm1Mkn} Tg(*FXN*)Y47Pook/J**: Ratón homocigoto para una mutación en el gen *Fxn* (knock-out para el alelo de *Fxn*; *Fxn*⁻) y hemocigoto para el transgén Y47R (construcción que incluye el gen *FXN* con ~9 repeticiones normales del triplete GAA). Se utilizaron ratones con 2, 6 y 9 meses de edad.

3.1.2 Sistema de cruces y alojamiento de la colonia

Modelo YG8R para la FRDA

Los ratones **YG8R** se generaron partir de la generación inicial de un ratón transgénico que se le introdujo un YAC que contenía el gen *FXN* humano con la expansión de la repetición de GAA (YG8), seguido del cruce con el ratón $Fxn^{+/-}$ para generar el ratón **YG8R** que contiene una sola copia del transgén sobre un fondo $Fxn^{-/-}$ ($Fxn^{-/-};FXN^{+}$)(221) (Figura 3.1). El modelo murino **YG8R** FRDA se amplificó realizando el cruce entre ratones ($Fxn^{-/-};FXN^{+/-}$), obteniendo ratones **YG8R** con una copia del transgén YG8 ($Fxn^{-/-};FXN^{+/-}$) y ratones con dos copias del transgén YG8 ($Fxn^{-/-};FXN^{+/+}$) denominados YG8YG8R. En este trabajo se utilizó únicamente el ratón YG8R ($Fxn^{-/-};FXN^{+/-}$). Como línea control de éste ratón se utilizó la cepa pura de ratón C57BL/6J, que es el fondo genético sobre el que se realizó el modelo **YG8R**.

El número de ratones YG8R en la descendencia presenta ratios mendelianos correctos, con un tiempo de vida normal de dos años de edad (200), de acuerdo con la descripción del modelo hecha por su autor Al-Mahdawi y col. (222).

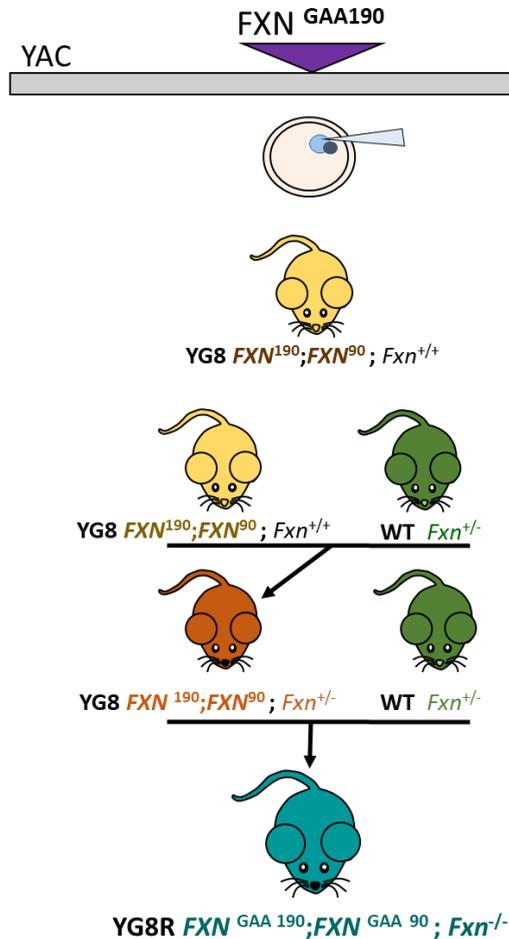


Figura 3.1: Esquema que muestra la estrategia de cruces para la obtención del modelo murino **YG8R** para la FRDA. Los ratones **YG8R** se generaron partir de la generación inicial de un ratón transgénico que contenía el cromosoma artificial de levaduras (YAC, de las siglas en inglés *yeast artificial chromosome*) conteniendo el gen *FXN* humano con la expansión de la repetición de GAA (YG8), seguido del cruce con el ratón *Fxn*^{+/-} para generar el ratón **YG8R** que contiene una sola copia del transgén sobre un fondo *Fxn*^{-/-}. Adaptado de (223).

Modelo YG8sR para la FRDA

Los ratones **YG8sR** se generaron a partir de la descendencia normal del ratón **YG8R**. Inicialmente, Virmouni y col. (17) encontraron un ratón fundador único que contenía una única secuencia del triplete GAA de 120 repeticiones. A partir de este ratón fundador Virmouni y col. (17) establecieron una nueva línea de ratones transgénicos que contienen un YAC conteniendo el gen humano *FXN* con una expansión de ~200 repeticiones del triplete GAA sobre un fondo genético predominantemente C57BL/6J. El mayor tamaño de esta expansión podría generar una mayor afectación del ratón. Este modelo se amplificó cruzando los ratones YG8sR con una única copia del transgén YG8s (*Fxn*^{-/-}; *FXN*⁺) y los ratones Y47R que contienen una única copia del transgén YG8 conteniendo 9 repeticiones normales del triplete GAA sobre un fondo *Fxn*^{-/-}. En este trabajo se utilizó únicamente el ratón **YG8sR** (*Fxn*^{-/-}; *FXN*^{+/-}). Como línea control de éste ratón se utilizó el ratón **Y47R** con una única copia del transgén Y47.

3.1.3 Sistema de genotipado

La identificación de la descendencia de los dos modelos, **YG8R** e **YG8sR**, y los ratones control, Y47R y C57BL/6J, se realizó mediante el tatuado de las falanges.

Para el genotipado de los ratones, se obtuvo el ADN genómico a partir de fragmentos de cola de ratón postnatal (~1 cm) usando el siguiente procedimiento. El fragmento se lisó en el tampón de lisis [Tris 100 mM; EDTA pH 8, 5 mM; SDS 0.2%; NaCl 200 mM] suplementado con 10 mg/mL proteinasa-K mediante incubación a 55°C durante toda la noche. Luego, las muestras se homogenizaron y centrifugaron a 13.000 rpm a temperatura ambiente. Se adiciono isopropanol (ratio 1:1 con el tampón de lisis) al sobrenadante, se homogenizó y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos. El pellet, se lavó tres veces con etanol 70 % centrifugando a 13.000 durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras los lavados, el pellet se dejó secar al aire libre durante 2 minutos y se resuspendió en el tampón TE [Tris 10 mM; EDTA 0.1 mM] mediante incubación a 55°C durante 15 minutos, y manualmente por pipeteo. Finalmente, la muestra se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante que contiene el DNA genómico purificado y se almacenó a 4°C hasta su posterior uso.

Para la descendencia del cruce YG8RxYG8R se realizaron dos reacciones de PCR:

- Reacción de PCR múltiple del exón 4 de la frataxina murina (*Fxn*) para determinar la presencia del alelo normal y/o del alelo deleciónado (Figura 3.2) (170).
- Reacción de PCR para detectar la presencia del transgén de la frataxina humana YG8 (*FXN*) (Figura 3.3).

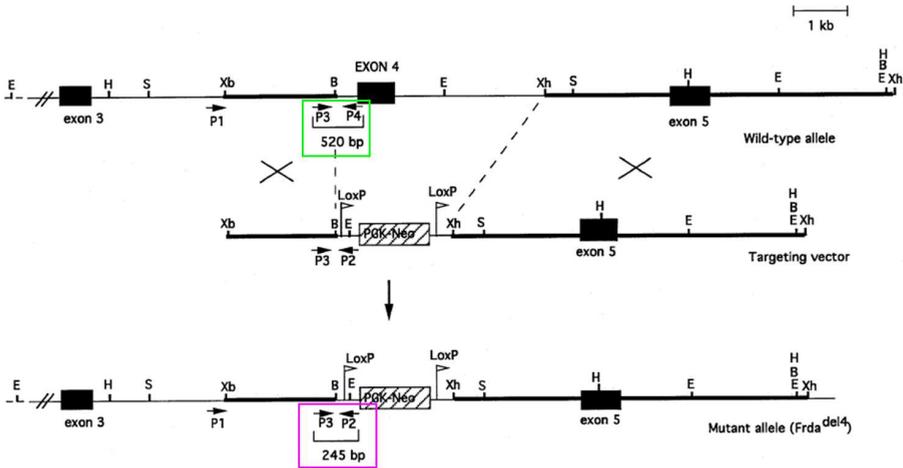


Figura 3.2: Sitios de hibridación de las parejas de oligonucleótidos utilizados para la detección del alelo salvaje (rectángulo verde) y del alelo deleciónado (rectángulo purpura). El oligonucleótido P3 forward hibrida antes del sitio LoxP, el oligonucleótido WT2 reverse hibrida antes del exón 4 y el oligonucleótido P2 reverse hibrida después del sitio LoxP y antes del cassette PGK-Neo insertados en el inicio del exón 4. Por lo tanto, el par P3-WT2 (rectángulo verde) amplifica el alelo normal que contiene el exón 4 y no presenta sitios LoxP ni cassette PGK-Neo. El par P3-P2 (rectángulo purpura) amplifica el alelo deleciónado que contiene los sitios LoxP y el cassette PGK-Neo. Adaptado desde (170, 200).

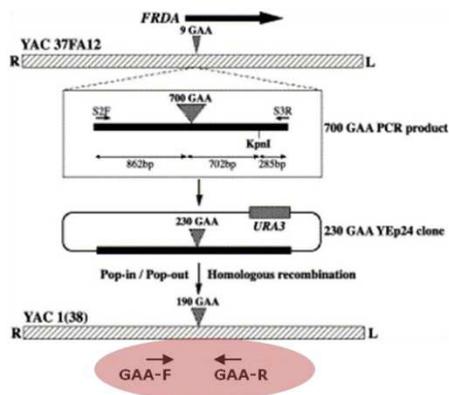


Figura 3.3: Estrategia genética para aumentar las repeticiones GAA en el intrón 1 de la FXN humana para conseguir el YAC utilizado para generar el ratón transgénico YG8 (219). Los oligonucleótidos iniciadores GAA-F y GAA-R hibridan en el brazo derecho e izquierdo del YAC, respectivamente, (círculo rosado) amplificando el gen completo de la frataxina humana junto con las repeticiones del triplete GAA. Adaptado de (199, 200)

Para determinar el número de copias del transgén YG8 en los ratones se realizó una PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR), utilizando la tecnología Universal Probe Library de Roche. Como método de cuantificación se realizó una curva patrón, con concentraciones conocidas: 6.25, 12.5, 25 y 50 ng/ μ l, a partir del ADN genómico de un ratón YG8R con una sola copia en hemizigosis del transgén YG8 (200). El sistema de PCR a tiempo real utilizado fue el 7900HT Fast Real Time PCR System, el programa de PCR el 7500 Fast (40 minutos) y el software 7500 V2.0.4 (Applied Biosystems).

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la técnica de la PCR y qPCR están en la Tabla 3.1. Los reactivos y los programas del termociclador se han obtenido de la tesis de Mollá y col. (200) (Tablas 3.2,3.3,3.4,3.5).

Nombre	Especie	Secuencia 5'→3'	T (°C)
P3-forward	ratón	<i>CTGTTTACCATGGCTGAGATCTC</i>	63.7
WT2-reverse	ratón	<i>TACCATGGCTGAGATCTCAGGC</i>	67.1
P2-reverse	ratón	<i>CGCCTCCCCTACCCGGTAGAATTC</i>	73.3
GAA-R	hum.	<i>GATCTAAGGACCATCATGGCCACACTTGCC</i>	77.3
GAA-F	hum.	<i>GGGATTGGTTGCCAGTGCTTAAAAGTTAG</i>	71.5
FRDA-hum-rev	hum.	<i>CTCAAGGTCCCGCACTTG</i>	63.7
FRDA-hum-dir	hum.	<i>CCCCTGATTTGCTGTATGCT</i>	63.9

Tabla 3.1: Oligonucleótidos empleados. Se indica el nombre, la secuencia y la temperatura de anillamiento de los oligonucleótidos empleados en las diferentes reacciones de PCR y PCR a tiempo real.

A		B	
Componente	Volumen	Componente	Volumen
DNA genómico(80ng/ μ l)	2 μ l	DNA genómico(80ng/ μ l)	2 μ l
dNTP mezcla (20 mM)	0.5 μ l	dNTP mezcla(20mM)	0.5 μ l
P2-reverse (10 μ M)	0.5 μ l	GAA-R(10 μ M)	0.5 μ l
P3-forward (10 μ M)	0.5 μ l	GAA-F(10 μ M)	0.5 μ
WT2-reverse (10 μ M)	0.5 μ l		
Tampón reacción 10x (sin MgCl ₂)	2.5 μ l	Tampón reacción 10x (sin MgCl ₂)	2.5 μ l
DNA-polimerasa-Biotoools (1U/ μ l)	0.5 μ l	DNA-polimerasa-Biotoools (1U/ μ l)	0.5 μ l
H ₂ O csp 25 μ l	18 μ l	H ₂ O csp 25 μ l	18.5 μ l

Tabla 3.2: Reactivos y volúmenes utilizados en las PCR. (A) Amplificación múltiple del alelo normal y/o el alelo deleciónado de la frataxina murina. (B) amplificación del transgén YG8.

Fases	A		B	
	T (°C)	Tiempo	T (°C)	Tiempo
Desnat.inicial	96	1'	95	3'
Desnaturalización	94	30''	94	30''
Anillamiento	60	30''	60	30''
Elongación	72	1'	60	2'
Elongación final	72	10'	72	20'
Mantenimiento	4	Indefinido	4	Indefinido

Tabla 3.3: Programas del termociclador utilizados en las PCR. (A) Amplificación múltiple del alelo normal y/o el alelo deleciónado de la frataxina murina. (B) amplificación del transgén YG8. Los pasos de desnaturalización, anillamiento y elongación se repiten 35 veces en ambos programas.

Componente	Volumen
DNA genómico patrón o muestras	1 μ l
TaqMan Fast universal PCR Master Mix (2x)	10 μ l
FRDA-hum-rev(10 μ M)	0.4 μ l
FRDA-hum-dir(10 μ M)	0.4 μ l
Sonda Taqman n°9 Roche	0.2 μ l
H ₂ O csp 25 μ l	8 μ l

Tabla 3.4: Reactivos y volúmenes utilizados en la PCR a tiempo real para la amplificación y cuantificación del transgén YG8. (B) amplificación del transgén YG8.

Fases	T (°C)	Tiempo
Desnat.inicial	95	20''
Desnaturalización	95	30''
Elongación	60	30''

Tabla 3.5: La tabla muestra el programa del termociclador para la amplificación del transgén YG8 por PCR cuantitativa. El ciclo de desnaturalización a elongación se repite 40 veces.

3.1.4 Anticuerpos y sondas

En la tabla 3.6,3.7 se muestran los anticuerpos primarios y en la tabla 3.9 se muestran las sondas usadas en las técnicas de inmunofluorescencia (IFI) y western blot (WB) a lo largo de este trabajo. Se muestran las características de los anticuerpos primarios y sondas usados, así como también las condiciones en las que se han utilizado.

Anticuerpo	Detalles de la proteína identificada	Casa comercial	Dilución IFI	Dilución WB
anti- β -TubulinaIII	Subunidad β de la tubulina, microtúbulos	Sigma-Aldrich T2200	1:1000	
anti-Peripherin III	Periferina, filamento intermedio tipo III	Millipore AB1530	1:2000	
anti-Acetylated- α -Tubulin	Reconoce la isoforma α -tubulina cuando el aminoácido Lys-40 está acetilado	Sigma-Aldrich T7451	1:10000	1:2000
anti-Tyrosinated- α -Tubulin	Reconoce la isoforma α -tubulina cuando el aminoácido Lys-40 está acetilado	Sigma-Aldrich T7451	1:10000	1:2000
anti-actin	Reconoce las seis isoformas de la actina.	Sigma-Aldrich A2066		1:2000
anti-cofilin	Reconoce la cofilina total. La cofilina es una proteína de unión a la actina que despolimeriza los microfilamentos.	Abcam ab54532	1:100	1:1000
Anti-GAPDH (6C5)	Reconoce GAPDH, proteína ubicada intracelular que hace parte de la ruta glicolítica, transcripción, apoptosis, estrés oxidativo y transporte del ER al Golgi	Santa cruz sc-32233		1:1000

Tabla 3.6: Anticuerpos primarios empleados

Anticuerpo	Proteína identificada	Casa comercial	Dilución IFI	Dilución WB
anti-cofilin(hSer3)	Reconoce la cofilina cuando ésta está fosforilada en el aminoácido Ser3. Esta es la forma inactiva de la cofilina.	Santa Cruz sc-12912	1:100	1:1000
anti-LIMK1	Reconoce LIMK1 que es una serina/treonina kinasa que regula la dinámica de la actina filamentosos.	Abcam ab81046	1:100	1:500
anti-LIMK1(phosphoT508)	Reconoce LIMK1 cuando está fosforilado en el aminoácido Thr508. LIMK1 es activada por kinasas como ROCK1, PAK1 y PAK4.	Abcam ab38508	1:100	1:500
anti-Chronophin/PDXP(C85E3)	Reconoce la Chronophin/ PDXP, una proteína serina fosfatasa que fosforila el aminoácido Ser3 de cofilina.	Cell Signaling # 4686		1:500
Anti-ARP2/3 complex (3C9)	Reconoce el complejo ARP2/3, un complejo proteico que regula la polimerización de la actina en el citoesqueleto.	Millipore MABT95		1:500

Tabla 3.7: Anticuerpos primarios empleados

Anticuerpo	Detalles de la proteína identificada		Casa comercial	Dilución IFI	Dilución WB
Goat anti-Rabbit IgG (H&L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate	IgG	IgG de conejo, conjugado con fluorocromo alexa fluor 488	Molecular Probes	1:2000	
Goat anti-mouse IgG (H&L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate	IgG	IgG de ratón, conjugado con fluorocromo alexa fluor 488	Molecular Probes	1:2000	
Goat anti-Rabbit IgG (H&L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 633 conjugate	IgG	IgG de conejo, conjugado con fluorocromo alexa fluor 633	Molecular Probes	1:2000	
Goat anti-mouse IgG (H&L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 633 conjugate	IgG	IgG de ratón, conjugado con fluorocromo alexa fluor 633	Molecular Probes	1:2000	
Rabbit anti-Rat IgG Secondary Antibody, Texas Red conjugate	IgG	IgG de rata, conjugado con fluorocromo texas red	Molecular Probes	1:2000	
Goat anti-Mouse IgG (H&L) Chain Specific Peroxidase Conjugate	IgG	IgG de ratón, conjugado con peroxidasa	Millipore		1:5000
Anti-rabbit IgG,HRP-linked Antibody	IgG	IgG de conejo, conjugado con peroxidasa	Cell Signaling		1:5000

Tabla 3.8: Anticuerpos secundarios empleados

Sonda	Proteína identificada	Casa comercial	Dilución IFI	Dilución WB
Deoxyribonuclease I, Alexa Fluor® 488 conjugate	Se une con gran afinidad a la actina globular, la actina no polimerizada.	ThermoScientific D12371	1:200	
Phalloidin, Tetramethylrhodamine-B-isothiocyanate (TRITC) conjugate	Se une con gran afinidad a la actina filamentososa, la actina polimerizada.	Sigma-Aldrich P1951	1:200	

Tabla 3.9: Sondas empleadas

3.2 Métodos

3.2.1 *Cultivo primario de las neuronas de la raíz del ganglio dorsal (DRGs)*

Se diseccionaron aproximadamente 50 ganglios dorsales (DRGs) de toda la columna vertebral y fueron depositados en medio Leibovitz's L-15 (Sigma Aldrich) a 4°C (hielo). Posteriormente, los DRGs fueron incubados con colagenasa 2mg/mL (Worthington Biochemical Corporation, NJ, US) a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂ durante 1 hora. La colagenasa se eliminó mediante un lavado con medio de cultivo Ham's F12 (Sigma-Aldrich), luego los DRGs se incubaron con tripsina 0,25% (v/v) (Gibco), a 37°C en baño maría durante 30 minutos. La tripsina fue neutralizada usando medio Ham's F12 suplementado con suero fetal bovino (FBS) inactivado 10% (v/v) (Sigma). Los residuos de tripsina se eliminaron mediante un lavado con medio Ham's F12. Los DRGs fueron incubados con 1 unidad de DNAsa-1A (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente durante 5 minutos, seguido de una disgregación mecánica en 1 mL de medio de cultivo completo [Medio Ham's F12 suplementado con L-glutamina 2 mM (Sigma), albumax 35% (w/v) (InvitrogenTM), putrescina 16 µg/mL; progesterona 60 ng/mL, L-tiroxina 400 ng/mL, selenito sódico 38 ng/mL, Tri-iodo-Tironina 340 ng/mL, penicilina 60 µg/mL, streptomycin 100 µg/mL] y suplementado con neurotrofinas [β -NGF murina 10 ng/mL, BDNF humana 10 ng/mL y NT3 humana 10 ng/mL]. Para la disgregación mecánica se utilizaron dos pipetas pasteur de vidrio 150 mm estériles con diferentes diámetros y pre-tratadas con Sigmacote (Sigma). Los DRGs se resuspendieron 40 veces con la pipeta de mayor diámetro y 40 veces con la de menor para obtener una suspensión homogénea.

La suspensión celular se cuantificó y se sembró a la densidad celular apropiada para cada soporte.

Placas de 24 pocillos

Tras el recuento celular se sembraron las neuronas a una densidad de 1500 células/pocillo en placas de 24 pocillos sobre cubres de vidrio de 13 mm de diámetro, los cuales fueron tratados previamente con poli-DL-Ornitina 0,5 mg/mL (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente toda la noche, y con laminina 0,02 mg/mL (Sigma-Aldrich) a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂ durante toda la noche.

Las neuronas se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂ en medio de cultivo completo durante 24 horas ó 48 horas.

Placas glass bottom

Las cámaras microfluídicas se prepararon previamente siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (Xona Microfluidics, SND150). Las cámaras (Figura 3.4) se prepararon mediante el sistema de adhesión reversible. Una lámina cubreobjetos (No.1, grosor 1mm) que servirá como soporte para el accesorio suministrado por Xona Microfluidics, se sumerge en agua estéril y se somete a sonicación durante 30 minutos. Se sumerge en etanol 70% (v/v) (preferiblemente etanol absoluto) y se deja secar en ambiente estéril. La lámina se cubre con poli-DL-Ornitina 0,5 mg/mL (w/v) y se incuba durante toda la noche en condiciones de esterilidad. La lámina se lava tres veces con agua destilada estéril y una vez más, permitiendo que el agua actúe durante 3 horas. Se elimina el agua y se deja secar en ambiente estéril. El accesorio se limpia cuidadosamente con celo invisible blanco y luego se esteriliza sumergiéndolo en etanol 70% (v/v) y dejándolo secar en ambiente estéril (alrededor de 1 hora). El accesorio se presiona sobre la lámina tratada previamente. Se adicionan 200 μ l de laminina 0.02 mg/mL en los pocillos superiores y se incuba la cámara a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂ durante toda la noche. Al día siguiente, se retira la laminina y se adiciona 150 μ l de medio Ham's F12 en el pocillo superior izquierdo y 200 μ l de medio en el pocillo superior derecho. Se incuba la cámara a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂ durante toda la noche. Al día siguiente se confirma que la cámara este bien preparada verificando que los pocillos inferiores contentan medio.

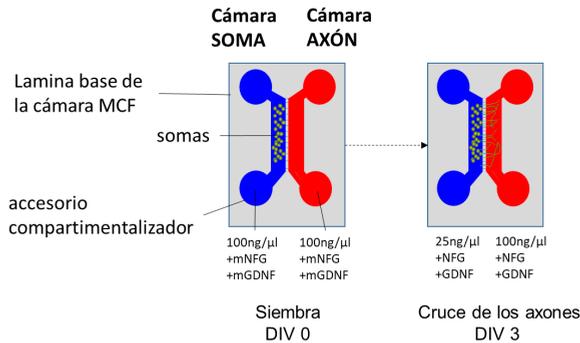


Figura 3.4: Esquema representativo de una cámara microfluídica para cultivos neuronales (placas microfluídicas). La cámara se divide en tres partes, un compartimento donde se siembran los somas (zona azul), una zona de micro canales por donde los axones a medida que van creciendo los atraviesas y llegan al tercer compartimento donominado axonal (zona roja). En el día de inicio del cultivo, los somas de las neuronas aisladas del ganglio dorsal se siembran en la cámara SOMA. Durante los días posteriores (DIV1 hata DIV3) se cambia el medio de cultivo reduciendo secuencialmente la concentración de neurotrofinas en la cámara SOMA para dirigir el cruce de los axones hasta la cámara AXÓN.

Cultivo primario en las cámaras microfluídicas

La extracción de los DRGs y procesamiento se realizó tal como se describe en el apartado 3.2.1, excepto en el momento de la disgregación que se realizó de manera diferente. Los DRGs se resuspendieron en 1 mL de medio de cultivo completo. Para la disgregación mecánica se utilizó una pipeta P1000 convencional, y se resuspendieron 40 veces con la pipeta para obtener una suspensión homogénea. La suspensión se centrifugó (59g durante 8 minutos) a través de un gradiente de albumina de suero bovino 15% (v/v, preparada en HBSS(-/-) en relación 1:1) para sedimentar las neuronas de la suspensión celular. Los residuos de albumina se eliminaron mediante un lavado con el mismo medio. Las neuronas se cuantificaron y se resuspendieron 30×10^4 neuronas en $5 \mu\text{l}$ de medio completo suplementado con neurotrofinas [100 ng/mL mNFG y 100 ng/mL mGDNF]. Las neuronas se sembraron en las cámaras microfluídicas (Xona Microfluidics, SND150) en la zona del soma previamente tratadas con 0,5 mg/mL of poly-DL-Ornitin y 0,01 mg/mL de laminina (Sigma). Las neuronas se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO_2 durante 7 días. Durante los primeros cuatro días el medio de cultivo se cambio serialmente disminuyendo la concentración de las neurotrofinas en la zona del soma y manteniéndola en la zona del axón: desde el día 0 (siembra) hasta el día 1:

100 ng/mL en las dos cámaras; desde el día 1 hasta el día 2: cámara SOMA, 50 ng/mL; cámara AXÓN, 100 ng/mL; desde el día 3 en adelante: cámara SOMA, 25 ng/mL; cámara AXÓN, 100 ng/mL. A partir del día 3, el medio de cultivo se cambió cada 48 horas manteniendo la concentración de neurotrofinas.

3.2.2 Procesamiento de las raíces dorsales de los DRGs lumbares para cortes en criostato

Procesamiento de las raíces dorsales de los DRGs lumbares para cortes en criostato. Se extrajeron las astas dorsales de los DRGs lumbares (L4, L5 y L6) y se fijaron por inmersión con paraformaldehído 4% (p/v) en PBS-1X a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, las astas se crioprotegieron por inmersión en un gradiente de sacarosa (10, 20 y 30%) a 4°C. Cada una de las inmersiones en sacarosa se realizó hasta que el tejido se hundió completamente en la solución. Las muestras se embebieron en la solución OCT (ThermoScientific) con una orientación longitudinal. Los bloques se almacenaron a -80°C hasta su utilización. Para obtener las secciones longitudinales de las raíces del ganglio se obtuvieron cortes longitudinales en el criostato de los tejidos previamente fijados. El bloque que contenía el tejido se colocó en el soporte para cortar cubierto con OCT. Se obtuvieron cortes seriados de 7 μm .

3.2.3 Procedimientos de inmunofluorescencia

Inmunofluorescencia para visualizar los conos de crecimiento

Las neuronas se sembraron en placas de 24 pocillos tal como se describe en el apartado 3.2.1. Los cubres de vidrio se trataron para fijar las células en diferentes tiempos del cultivo. Para la visualización de neuronas individuales, los cultivos se fijaron después de 24 horas de incubación. Los cultivos primarios fueron fijados en paraformaldehído 4% suplementado con sacarosa 4% a temperatura ambiente durante 15 minutos. Los cultivos fueron lavados cuidadosamente con PBS-1X 3 veces. Las células fueron bloqueadas y permeabilizadas simultáneamente durante 30 minutos [suero fetal bovino (FBS) 10% (v/v), TritónX-100 0,1%]. Se adicionó el anticuerpo primario β -tubulina III, diluido en el tampón de bloqueo, y se incubó a 4°C en una cámara húmeda y en la oscuridad durante toda la noche. Se realizaron tres lavados con PBS-1X, dejando actuar 5 minutos cada lavado. Se prepararon juntos en tampón de bloqueo, el anticuerpo secundario de interés y el conjugado para visualizar la actina F [Phalloidin-TRITC].

Inmunofluorescencia para visualizar la actina F/G

Las neuronas se sembraron en placas de 24 pocillos tal como se describe en el apartado 3.2.1. Los cubres de vidrio se trataron para fijar las células en diferentes tiempos del cultivo. Para la visualización de neuronas individuales, los cultivos se fijaron tras 48 y 72 horas de incubación para analizar el citoesqueleto de actina (actina filamentosa y globular). Los cultivos primarios fueron fijados en paraformaldehído 4 % suplementado con sacarosa 4 % a temperatura ambiente durante 15 minutos. Los cultivos fueron lavados cuidadosamente con PBS-1X 3 veces. Las células fueron bloqueadas y permeabilizadas simultáneamente durante 30 minutos [suero fetal bovino (FBS) 10 % (v/v), TritónX-100 0,1 %].

Para la detección doble de la actina filamentosa (actina F) y la actina globular (actina G), se prepararon juntos en tampón de bloqueo, el anticuerpo secundario de interés y los conjugados para visualizar la actina F y actina G [1:200, Phalloidin-TRITC (Red) (Sigma-Aldrich); 1:200, DNasa I conjugada con Alexa Fluor 488], se adicionaron e incubaron a temperatura ambiente en cámara húmeda y en la oscuridad durante 1 hora. Todos los cubres se montaron sobre portaobjetos con medio de montaje DAPI-Fluoromont-GOR (Southern-Biotech).

Inmunofluorescencia para visualizar las modificaciones post-traduccionales de la tubulina

Las neuronas se sembraron en placas de 24 pocillos tal como se describe en el apartado 3.2.1. Para la visualización de la tubulina acetilada y tirosinada total integrada en los microtúbulos sin las subunidades de tubulina que no ha sido polimerizada, se usó un procedimiento de extracción y fijación simultaneo, basado en el protocolo descrito por (224) y la adaptación descrita por (225). Para la visualización de neuronas individuales, los cultivos se dejaron tras 48 y 72 horas de crecimiento. Las células fueron simultáneamente fijadas y permeabilizadas durante 15 minutos usando el tampón PHEM [Pipes 60 mM, Hepes 25 mM, EGTA 5 mM, y MgCl 1 mM (Sigma-Aldrich)] suplementado con glutaraldehído 0,25 %, paraformaldehído 4 % y sacarosa 4 %. Para detener la acción de la extracción se realizaron tres lavados de PBS-1X y se adiciono cloruro de amonio 50 mM a temperatura ambiente y se dejó actuar durante 5 minutos. Se eliminaron los residuos con tres lavados de PBS-1X. Las células fueron simultáneamente bloqueadas y permeabilizadas a temperatura ambiente en una solución de FBS 10 % y TritónX-100 0,1 % durante 30 minutos. Los

cubres de vidrio se trataron para fijar las células en diferentes tiempos del cultivo.

Los anticuerpos primarios (β -TubulinaIII, α -Tubulina-tirosinada, α -Tubulina-acetilada), diluidos en la solución de bloqueo [FBS 10% y TritónX-100 0,1%], se adicionaron e incubaron a 4°C en una cámara húmeda y en oscuridad durante toda la noche. Se realizaron tres lavados con PBS-1X, dejando actuar 5 minutos cada lavado. Los anticuerpos secundarios, diluidos en el tampón de bloqueo, se adicionaron y se incubaron a temperatura ambiente en cámara húmeda y en la oscuridad durante 1 hora. Como anticuerpos secundarios se usaron los anticuerpos anti mouse o anti rabbit conjugados con Alexa Fluor 488 (1: 1,000, para todas las tubulinas) ó Alexa Fluor 633 (1: 1,000, para β -TubulinaIII). Finalmente, todos los cubres se montaron sobre portaobjetos con medio de montaje DAPI-Fluoromont-G(SouthernBiotech).

3.2.4 Inmunofluorescencia en tejidos de las raíces dorsales del ganglio dorsal

Se obtuvieron cortes de 7 μm de las raíces del ganglio dorsal embebidas en solución OCT con una orientación longitudinal (apartado 3.2.2). El portaobjetos que contiene la muestra se descongela a temperatura ambiente durante 5 minutos. Para eliminar los residuos de OCT se lavó la muestra tres veces con PBS-1X frío. El tejido se permeabilizó con una solución TritónX-100 0,5% (v/v), PBS-1X y se dejó actuar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS-1X, dejando actuar 5 minutos cada lavado. Los anticuerpos secundarios, diluidos en el tampón de bloqueo, se adicionaron y se incubaron a temperatura ambiente en cámara húmeda y en la oscuridad durante 2 horas. Los anticuerpos primarios (1:200 β -TubulinaIII, 1:50 p-cofilina [Ser-3], 1:100 cofilina), diluidos en la solución de bloqueo [BSA 1%; FBS 5%; TritónX-100 0,2%], se adicionaron e incubaron a temperatura ambiente en una cámara húmeda y en oscuridad durante 2 horas. Como anticuerpos secundarios se usaron los anticuerpos anti-mouse o anti-rabbit conjugados con Alexa Fluor 488 (1: 250, para p-cofilina [Ser-3], cofilina) ó Alexa Fluor 594 (1: 250, para β -TubulinaIII). Finalmente, todos los cubres se montaron sobre portaobjetos con medio de montaje DAPI-Fluoromont-G (SouthernBiotech).

3.2.5 *Ensayos time lapse*

Se aislaron las neuronas sensitivas del ganglio dorsal según lo descrito anteriormente y se sembraron en las placas *glass bottom* tal como se describe en el apartado 3.2.1. Las neuronas se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂ durante 14-16 horas. Antes de comenzar el experimento se cambió el medio por medio fresco y se permitió a las células ajustarse a las nuevas condiciones de incubación en el microscopio durante 15 minutos. Los experimentos time lapse se adquirieron con un microscopio invertido adaptado para experimentos de célula viva (Axiovert 200 M, Zeiss) con un objetivo seco LD Achroplan 40x/0.60 (Zeiss). A lo largo de una hora se fueron adquiriendo imágenes cada 30 segundos con el software AxioVision (Zeiss) de los conos de crecimiento.

3.2.6 *Análisis de la expresión de proteínas por Western blot*

Obtención de los extractos de proteína totales

Por cada ratón se diseccionaron aproximadamente 50 ganglios dorsales (DRGs) y sus raíces de toda la columna vertebral de cada cepa de ratón (control C57BL/6J n=4; YG8R n=4). Para el análisis de western blot, los tejidos se suspendieron en 200 μ l de tampón de lisis [Tris-HCl pH 7,4 50 mM, TritónX-100 1%, MgCl 1,5 mM, NaF 50 mM, EDTA 5 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, PMSF 0,1 mM, DTT 1 mM, inhibidores de proteasas y de fosfatasas (Roche)]. Todas las muestras se homogeneizaron mecánicamente de forma simultánea con el equipo TissueLyser II (QIAGEN) usando esferas de hierro (5mm). Se aplicaron cinco ciclos de 50 Hz durante 30 segundos intercalados con 30 segundos en hielo. Los lisados tisulares se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Los extractos proteicos se cuantificaron con el reactivo de Bradford (Bio-Rad).

Electroforesis en geles desnaturalizantes

Los extractos proteicos se resuspendieron en tampón de carga de proteínas 5x [Tris-HCl 250 mM pH 6.8, SDS 10% (p/v), azul de bromofenol 0,5% (p/v), glicerol 50% (v/v) y DTT 500 mM]. Entre 30 y 40 μ g de las proteínas se desnaturalizaron hirviendo las muestras durante 5 minutos antes de cargarlas en el sistema de electroforesis Miniprotein Electroforesis System (BioRad). Las proteínas se cargaron en geles de 12% (p/v) de poliacrilamida. La primera fase de entrada y concentración de las muestras en el gel se realizó a un voltaje

constante de 120 V. La segunda fase de separación de las proteínas se realizó a un voltaje constante de 200 V. La electroforesis se realizó en un tampón Tris-Glicina [Tris 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0,1 % (p/v)].

La transferencia de las proteínas se realizó a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) durante 1 hora a 100 V constantes a 4°C en un tampón de transferencia Tris 25 mM, Glicina 192 mM y Metanol 20 % (v/v). Para comprobar la eficiencia de la transferencia, las membranas se lavaron levemente con agua ultrapura y se tiñeron con solución de rojo Ponceau [Ponceau S 0,1 % (p/v), ácido acético 5 % (v/v)] durante 10 minutos. Posteriormente, las membranas se lavaron con agua miliQ y se incubaron con solución de bloqueo (proteínas fosforiladas: BSA 5 % (p/v) en TBS-T [Tris HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1 % (v/v)]; el resto de proteínas: leche desnatada 5 % en TBS-T). Luego se incubaron con los anticuerpos primarios específicos diluidos en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C y en agitación.

Al día siguiente la membrana se lava tres veces con TBS-T durante 10 minutos y se incuban con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con el enzima peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Tras lavar tres veces las membranas con TBS-T durante 10 minutos, las proteínas se detectaron mediante quimioluminiscencia, usando el reactivo ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare). La imagen se obtuvo mediante el lector LAS-3000 (FUGIFILM).

La densitometría de las bandas se midió utilizando el software Fiji/ImageJ(N.I.H). Cada una de las proteínas cuantificadas por inmunodetección consta al menos de tres réplicas experimentales biológicas (ratones N=3). La densitometría de las proteínas detectadas se normalizó con la densitometría de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) correspondiente y se calculó el porcentaje de expresión de la proteína con respecto al control C57BL/6J, incluido en cada una de las membranas analizadas. Para obtener los niveles de actividad de las proteínas fosforiladas, se dividió la densitometría de la proteína fosforilada entre la de la proteína total. Las medias de los porcentajes de expresión de cada proteína se compararon con la prueba t-student.

3.2.7 Axotomía *in vitro*

Se realizó el cultivo primario en las cámaras microfluídicas descrito previamente en el apartado 3.2.1. La axotomía *in vitro* consiste en cortar axones, y se realizó mediante succión por vacío durante 5 segundos con una pipeta de vidrio fina estéril (Figura 3.5). Tras la axotomía, la cámara axonal se lavó con medio de cultivo Ham's F12 para eliminar los residuos axonales, y se reemplazó con medio de cultivo completo fresco suplementado con las neurotrofinas [β -NGF murina 100 ng/mL y GDNF murina 100 ng/mL en la zona del axón; β -NGF murina 25 ng/mL y GDNF murina 25 ng/mL en la zona del soma]. Luego, los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂ durante 2 días adicionales. Las imágenes de las cámaras SOMA y AXÓN se adquirieron en diferentes etapas del cultivo: en el quinto día *in vitro* (antes de la axotomía), y tras la axotomía a las 4 horas y a las 48 horas. La adquisición de las imágenes se realizó con un microscopio invertido adaptado para experimentos de célula viva con contraste de fases (Axiovert 200 M, Zeiss) utilizando objetivos 20x o 40x.

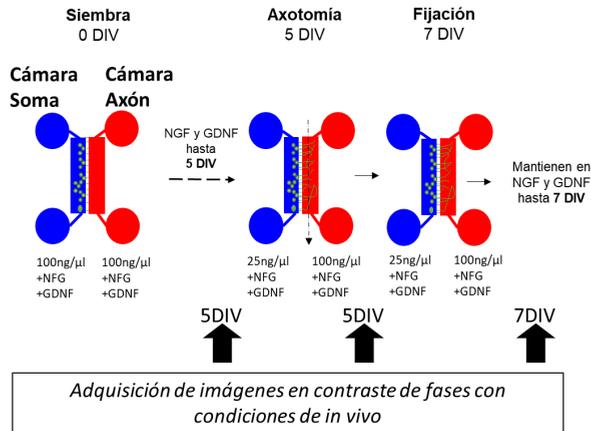


Figura 3.5: Esquema utilizado para realizar la axotomía in vitro en las cámaras microfluídicas. La cámara microfluídica está formada por una zona donde se siembran los somas de las neuronas sensitivas (azul) conectada a otra zona mediante microcanales en donde van a crecer los axones de las neuronas (zona roja). El cultivo de las neuronas del DRG en las cámaras microfluídicas se mantuvo a 37°C en un incubador humidificado 5% CO₂. El medio de cultivo se suplementó con β-NGF y GDNF murina de la siguiente forma: Día 0-1, 100 ng/mL (en las dos cámaras); Día 1-2, 50 ng/mL (cámara de los somas) y 100 ng/mL (cámara axonal); Día 3 en adelante: 25 ng/mL (cámara de los somas) y 100 ng/mL (cámara axonal). Después del día in vitro 3 (DIV3), el cultivo se incubó durante 48 horas adicionales sin cambiar el medio. En el día DIV5 se realizó la axotomía aplicando succión durante 5 segundos con una pipeta de vidrio fina. Posteriormente, los cultivos se incubaron por 48 horas más (DIV7). En el DIV7, los cultivos se fijaron y se procesaron para estudios de inmunofluorescencia. Durante el cultivo, se adquirieron imágenes en contraste de fases en cuatro puntos claves del experimento. En el DIV5: antes y después de realizar la axotomía; 4 horas tras haber realizado la axotomía.

3.2.8 Análisis de imagen para el estudio de la longitud de las neuritas y el área del cono

Para cuantificar la medida de la longitud de las neuritas se adquirieron imágenes confocales de neuronas marcadas para detectar β-tubulinaIII y actina F (Phalloidin-TRITC) (apartado 3.2.3). Las imágenes confocales fueron adquiridas en una posición representativa en el eje Z con un microscopio confocal Leica TCS SP8 con dos objetivos HCX PL APO CS 20x/0.70 DRY y HC PL APO CS2 40x/1.30 OIL. Luego, las imágenes se procesaron en el software Fiji/ImageJ (N.I.H) con el plugin NeuronJ (226) para obtener la medida de la neurita más larga de cada una de las neuronas registradas.

La medida del área de los conos de crecimiento se realizó con el software LAS AF-Advanced Fluorescence (Leica). Se utilizó la herramienta polígono para seleccionar manualmente el cono de crecimiento más grande de cada una de las neuronas. Para la selección del cono se siguió el contorno del filopodio. En total se evaluaron entre 20-40 neuritas por cada una de tres replicas experimentales biológicas (ratones N=3).

Las diferencias entre las medidas de la longitud de la neurita más larga de los dos genotipos se analizó con la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov debido a que la distribución de estos datos no pasan los test de normalidad (Shapiro Wilk, D'Agostino Pearson). Además esta prueba estadística es usada comúnmente para analizar las diferencias entre poblaciones de la longitud de las neuritas (227, 228). Las diferencias entre genotipos de las medidas de área del cono se analizaron con la prueba U de Mann Withney, que es una prueba no paramétrica. Se usa en este caso porque la distribución de estos datos no pasaron los test de normalidad (Shapiro Wilk, D'Agostino Pearson) y debido a que las áreas de los conos del ganglio dorsal son bastante heterogéneas.

3.2.9 Análisis de número de conos y tipos de conos

El número de conos de crecimiento por neurona se obtuvo mediante inspección visual de las imágenes confocales de neuronas marcadas para visualizar la β -TubulinaIII y la actina F. En total, se inspeccionaron entre 10 y 30 neuronas de tres experimentos independientes por genotipo (YG8R, control C57BL/6J). Las diferencias entre genotipos se analizaron usando la prueba no paramétrica Mann Whitney para comparar la distribución de los dos grupos de datos no apareados. Los conos se clasificaron también según la forma como dispersos, retraídos o colapsados. En este caso las diferencias entre las distribuciones de éstos datos se analizaron mediante la prueba Chi cuadrado (X^2).

3.2.10 Cuantificación de la fluorescencia de actina F y actina G

Para evaluar la intensidad de la fluorescencia de actina F y G en los conos de crecimiento se adquirieron series de imágenes en el eje Z (Z-stacks) (10-15 secciones de 0,29 μm). Las imágenes se adquirieron con el microscopio confocal Leica TCS SP8 usando un objetivo HC PL APO CS2 40x/1.30 OIL y manteniendo constantes la intensidad de los láseres, la amplificación y la resolución [1024x1024]. Estas condiciones se establecieron después de revisar todas las muestras del ratón control. Cada una de las series contenían 100 μm del segmento axonal más distal de una neurona y su cono de crecimiento.

Para analizar las relaciones de la intensidad de la fluorescencia las series se procesaron con el software Fiji/ImageJ(N.I.H). Primero se crearon los stacks para cada una de las señales (actina F, actina G) y se obtuvo la máxima proyección de la señal. Para cuantificar la señal de actina F y actina G éstos se seleccionaron manualmente siguiendo el contorno del filopodio. Para obtener la medida en el segmento axonal, se selecciono manualmente un área de $\sim 50 \mu\text{m}^2$ desde la base del cono. La medida de la intensidad de fluorescencia que se escogió fue la suma de valores de los pixeles (RawIntDen).

El ratio de actina F/G se calculó para 43-72 conos y segmentos axonales de tres replicas biológicas (ratones N=3) . El ratio se calculo dividiendo la intensidad actina F por la de actina G. Luego, se obtuvo un valor promedio para el ratio de cada uno de los tres experimentos independientes, y finalmente éstos tres valores se promediaron para obtener un único valor por genotipo. Las medias del ratio para los dos genotipos se compararon con la prueba t-student con la corrección de Welch, debido a que la varianzas de los dos grupos son distintas. Para analizar si las diferencias en el ratio correspondían a diferencias significativas en la intensidad de actina F o actina G, también se compararon las medias obtenidas para estas dos intensidades con la prueba t-student con la corrección de Welch.

3.2.11 Medida de la intensidad de fluorescencia de las modificaciones post-traduccionales de tubulina

Para evaluar la intensidad de fluorescencia de microtúbulos acetilados y tirosinados se adquirieron series de imágenes en el eje Z (~ 10 secciones de $0,35 \mu\text{m}$ de grosor). Las imágenes contenían la neurona completa o las neuritas más largas de la neurona. Las imágenes fueron adquiridas con el microscopio confocal Leica TCS SP8 usando un objetivo HC PL APO CS2 40x/1.30 OIL y manteniendo constantes la intensidad de los láseres, la amplificación y la resolución [1024x1024].

Para analizar las relaciones de la intensidad de la fluorescencia las series se procesaron con el software Fiji/ImageJ(N.I.H). Primero se crearon los stacks para cada una de las señales (tub-Tyr, tub-Acet) y se obtuvo la máxima proyección de la señal. Para cuantificar la señal se seleccionó manualmente $\sim 50 \mu\text{m}^2$ del segmento central de las neuritas. La medida de la intensidad de fluorescencia que se escogió fue la suma de valores de los pixeles (RawIntDen).

Para analizar las relaciones de la intensidad de la fluorescencia se obtuvieron los valores para la máxima proyección de la señal de tub-tirosinada y tub-acetilada de 38-43 neuronas por cada uno de tres replicas biológicas (ratones

N=3) por genotipo (YG8R, control C57BL/6J). Las medias se compararon con la prueba t-student.

3.2.12 *Análisis de los parámetros morfométricos del cono*

Para analizar la morfología del cono de crecimiento se obtuvieron imágenes de contraste de fases con condiciones de célula viva y se procesaron con el software Fiji/ImageJ(N.I.H). Se seleccionó manualmente el cono de crecimiento siguiendo el contorno del filopodio y se obtuvieron los valores para diferentes parámetros morfométricos:

- Área: representa la extensión de la forma del cono, $a=(\pi*r^2)$.
- Diámetro de Feret: este parámetro representa la distancia entre dos líneas paralelas tangenciales al contorno del cono. Pueden determinarse varios diámetros de Feret de acuerdo a la dirección con la que se tracen las tangentes. En el caso del cono, las líneas tangenciales se trazan por los dos puntos paralelos más alejados entre sí dentro de la forma seleccionada.
- Circularidad: este parámetro indica que tan circular es la forma del cono. Este parámetro se calcula con la formula $circ=(4\pi * area/perimetro^2)$. Un valor de 1.0 indica un círculo perfecto, y en tanto el valor se aproxima a 0 indica un incremento de la forma elongada.
- Redondez: este parámetro indica que tan redonda es la forma del cono. Este parámetro se calcula con la formula $red= (4 * rea/\pi * ejemayor^2)$.
- Solidez: este parámetro refleja que tan convexa es la forma del cono. Este parámetro se calcula con la formula $s=(rea/areaconvexa)$.

Para analizar las diferencias de los parámetros morfológicos entre genotipos (YG8sR, control Y47R) se analizaron un total de 105-179 conos de crecimiento de tres replicas biológicas (ratones N=3). Las comparaciones de las distribuciones de los datos entre el genotipo YG8sR y control Y47R se realizó mediante la prueba no paramétrica de Mann Whitney debido a que las distribuciones de estos datos no pasaron las pruebas de normalidad (Shapiro Wilk, D'Agostino Pearson).

3.2.13 *Análisis manual del movimiento del cono*

El experimento time lapse de los conos de crecimiento (sección 3.2.5) se procesaron en el software Fiji/ImageJ(N.I.H) con el plugin MTrackJ (229). Este plugin permite seguir paso a paso una partícula o una posición de interés en todas las imágenes que forman el time lapse y obtener varios parámetros como la distancia recorrida, velocidad de desplazamiento y ángulos de giro.

Para homogenizar la orientación inicial de todos los conos de los experimentos, en la primera imagen de cada uno de los archivos time lapse, cada cono se orientó de tal forma que quedara en una posición vertical y apuntando hacia la derecha en el caso de que estuviera girando. Luego, para obtener los parámetros se marcó la posición central de la base del cono cada 5 minutos (10 frames) durante 1 hora. Estas condiciones se escogieron basándonos en el trabajo de (230).

Para analizar los parámetros de movimiento del cono (distancia recorrida, velocidad de desplazamiento y ángulos de giro) de crecimiento entre genotipos (YG8sR, control Y47R) se analizó el movimiento de al menos 25 conos de crecimiento de tres replicas biológicas (ratones N=3) por cada uno de los genotipos. Las distribuciones de los datos se compararon mediante la prueba no paramétrica de Mann Whitney debido a que éstos no pasaron las pruebas de normalidad (Shapiro Wilk, D'Agostino Pearson).

3.2.14 *Estudio de la dinámica del cono de crecimiento mediante el Análisis de Componentes Principales (PCA)*

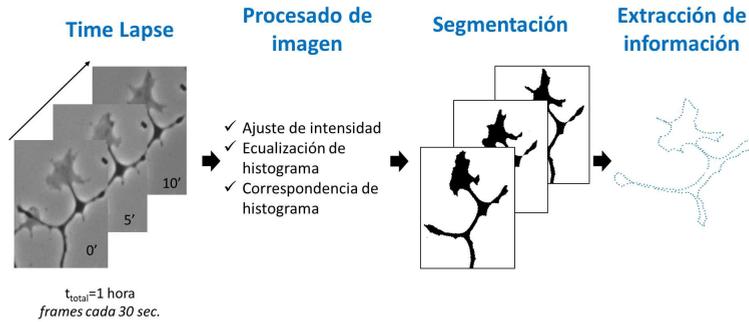
La dinámica de la morfología del cono de crecimiento es compleja y difícil de cuantificar. El tamaño, forma, posición del cono de crecimiento cambian en tan solo minutos (231, 232) y refleja el comportamiento del citoesqueleto de actina y microtúbulos en el cono, así como también la homeostasis axonal. Para caracterizar la dinámica del cono de crecimiento implementamos un método propuesto previamente por Goodhill y col. (231). Para lograr este objetivo hicimos una colaboración con el Centro de Excelencia e Innovación Tecnológica de Bioimagen, Conselleria de Sanitat (CEIB-CS).

La metodología incluyó varias fases (Figura 3.6, a), la primera fué la obtención de las imágenes segmentadas a partir de todos los archivos time lapse. Para alcanzar este objetivo se desarrollo una plataforma personalizada en el software MATLAB (The MathWorks, Inc.) en la que se procesaron todos los archivos time lapse de forma semi-automática, requiriendo alrededor de ~ 1 hora el procesamiento de cada uno de los archivos (Figura 3.6, b). Con las imágenes

segmentadas, los contornos de los conos se estimaron y almacenaron como una lista de coordenadas (x,y) . Luego se obtuvieron nuevos pares de coordenadas (x,y) que representaban cada uno de los contornos como un único punto en un espacio de 500 dimensiones. A continuación, se aplicó el *Análisis de Componentes Principales* (PCA) para obtener las direcciones de los patrones principales en el espacio.

El PCA es un procedimiento estadístico que permite la reducción de la dimensión de un conjunto de datos formado por un número elevado de variables relacionadas, para obtener un número menor de variables nuevas y representativas ó *componentes principales*. Las nuevas variables contienen la mayor parte de la variabilidad presente en el conjunto de datos, siendo combinaciones lineales de las variables originales y ortogonales entre sí. La transformación de los datos realizada con PCA al nuevo sistema de coordenadas, agrupa la mayor varianza de los datos en la primera nueva variable transformada ó *primera componente principal*, la segunda, tercera y así sucesivamente.

Este análisis nos permite obtener un entendimiento cuantitativo de la dinámica morfológica del cono de crecimiento y el comportamiento del cono (231).



(a) Pasos para obtener los contornos de los conos de crecimiento

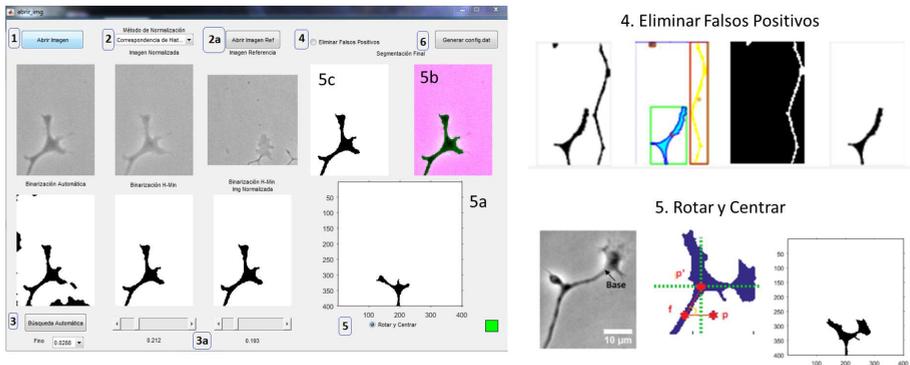
(b) Plataforma en MATLAB para el procesamiento semi-automático de los experimentos *time lapse*

Figura 3.6: Procesamiento de las imágenes de los experimentos *time lapse*. (a) esquema que resume los pasos del procesamiento de los experimentos *time lapse* (izquierda) para obtener imágenes segmentadas de los conos de crecimiento (centro). Las imágenes segmentadas se usan para la extracción del contorno (derecha) de los conos de crecimiento. (b) Muestra la plataforma creada para el procesamiento semi-automático de los experimentos *time lapse*. **1.** Se abre la primera imagen del experimento *time lapse*. La aplicación aplica un método de normalización para mejorar el contraste de las imágenes: ajusta la intensidad de la imagen en un rango específico (0.3-0.5); **3.** Si el primero método no funciona, se usa este botón para buscar de forma automática un mejor rango de ajuste supervisado por el investigador. El rango se puede ajustar manualmente (**3a**); **4.** Se confirman los falsos positivos y se eliminan; **5.** Se muestra la imagen segmentada final (arriba-izquierda) y la superposición de la imagen segmentada sobre la original (derecha). La imagen segmentada se rota dejando la base del cono perpendicular al eje x (abajo). La imagen segmentada se almacena como coordenadas horizontales y verticales. En este punto, la imagen se puede describir matemáticamente como una matriz o un arreglo bidimensional (2D); **6.** Al final del proceso se aplican los parámetros establecidos a todas la secuencia de imágenes de cada uno de los experimentos *time lapse*. La plataforma permite procesar y obtener un archivo *time lapse* en 1 hora.

3.2.15 *Análisis de los patrones de movimiento de los conos de crecimiento mediante tensores*

El análisis tensorial ha sido un área relativamente nueva en el procesamiento de imágenes y señales. En la parte central de este tipo de análisis se encuentra el concepto de tensor, el cual provee al analista de estructuras que separan las dimensiones espaciales del tiempo, y por lo tanto constituyen la manera natural de almacenar secuencias de imágenes que se correlacionan en el tiempo.

Por una parte, en (231) se evidencia la aplicación de análisis de componentes principales (PCA, principal component analysis) en la detección de patrones de movimiento principales. Esta técnica está basada en análisis matricial, y no puede manejar estructuras espacio-temporales como las secuencias de imágenes de células vivas. En este caso, las imágenes (que son estructuras espaciales en 2 dimensiones) son convertidas en vectores (estructuras de 1 dimensión), destruyendo así las correlaciones espaciales que son relevantes para el subsecuente análisis.

Por otra parte, los tensores son generalizaciones multidimensionales del concepto de vectores y matrices, y dado que la estructura espacial de 2 dimensiones en las imágenes es conservada, también es posible de conservar las correlaciones espacio-temporales en una secuencia de imágenes. Similarmente al caso matricial, existe un tipo de análisis multilineal de componentes principales (MPCA multilineal principal component analysis) que es usado para encontrar patrones de movimiento principales en una secuencia de imágenes. Particularmente en el área de biología celular, no existen referencias de la aplicación de éstas técnicas numéricas para el análisis de los conos de crecimiento.

Las ventajas de la aplicación de este tipo de herramientas para el procesamiento de imágenes radican primero en la compresión y síntesis de la información experimental, y segundo en la automatización del análisis. Primero, la compresión de la información es fundamental cuando se cuenta con una enorme cantidad de datos experimentales. Para ejemplificar, en el caso tratado en esta disertación, se realizaron 171 experimentos en el que cada uno consta de 120 imágenes, para un total de 20520 muestras de la evolución espacio-temporal de los conos de crecimientos de las neuronas sensitivas. Sin una herramienta matemática para la compresión de información se hace imposible realizar el análisis en tiempo real. Segundo, la automatización del análisis es también crucial para acelerar las conclusiones cuando hay tareas que son repetitivas e involucran una gran cantidad de información. Por ejemplo, en esta disertación se trataron modelos ratones de diferentes edades y se encontraron los patrones de movimiento principales para los tres casos. El análisis es similar, pero

las muestras experimentales son diferentes, y el diseño de un código que lee automáticamente las carpetas de los datos experimentales, y realiza el análisis secuencial e independientemente para los tres casos aceleró el desarrollo de las conclusiones.

3.2.16 *Análisis del crecimiento y regeneración axonal en las cámaras microfluídicas*

Para cuantificar el crecimiento axonal y la respuesta regenerativa de las neuronas sensitivas en las cámaras microfluídicas se analizaron las imágenes adquiridas con las condiciones previamente descritas (apartado 3.2.16) con el método basado en computador descrito previamente por (233).

En total, se adquirieron al menos 50 imágenes de diferentes campos en la zona soma y la zona axón de tres replicas experimentales (ratones N=3) por genotipo (Figura 3.5). Las medidas se obtuvieron para dos etapas del experimento: antes (5DIV) y 48 horas después (DIV7) de haber cortado los axones. Para obtener la medida del área cubierta por la red axonal, el área fragmentada y un índice de degeneración axonal, las imágenes se procesaron con el módulo *Analyze particles* del software Fiji/ImageJ (N.I.H) (226). Los pasos establecidos para el procesamiento de estas imágenes para obtener la cuantificación se basaron en el método propuesto por (233) (Figura 3.7). Este proceso consistió en extraer, de forma aleatoria, diez regiones cuadrículadas [700x700 pixeles] desde las imágenes adquiridas en diferentes campos de la zona axón de tres replicas experimentales (en total 30 regiones a partir de N=3 ratones) por genotipo. Para comparar el área total ocupada por la red axonal, los fragmentos y el índice de degeneración axonal se analizaron 30 campos aleatorios de tres replicas biológicas (ratones N=3) por genotipo (control Y47R, YG8sR) y edad (2,6,9 meses).

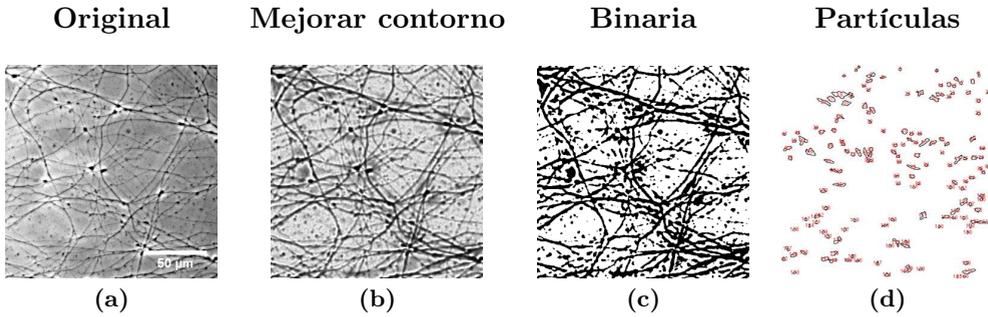


Figura 3.7: Pasos para realizar las medidas del área axonal en las cámaras microfluídicas. Las secciones cuadriculadas de las imágenes originales de la zona axón (a) se ajustaron con el software Fiji/ImageJ(N.I.H) para incrementar el contraste de la red axonal (b). Luego, se obtuvieron imágenes binarias (c) para obtener medidas del área total ocupada por la red axonal (suma total de píxeles) y el área ocupada por los fragmentos de la red axonal (área total de las partículas detectadas). Barra de escala 50 μm .

Luego, todas las imágenes de cada genotipo se agruparon en un stack y se manipularon para aumentar el contraste y la resolución usando los siguientes pasos y parámetros en el módulo de procesado:

- Radio 0.2 píxeles Procesar todas las imágenes
- Filtros:Media
Radio 0.2 píxeles
Procesar todas las imágenes
- Substraer fondo:
Radio rolling ball: 5 píxeles
Fondo claro Paraboloide deslizante
Procesar todas las imágenes
- Incrementar contraste
Píxeles saturados: 0.3 %
Normalizar
Ecuilizar histograma.

Procesar todas las imágenes

Posteriormente se utilizó el software Fiji/ImageJ(N.I.H) para obtener imágenes binarias de la red axonal siguiendo los siguientes pasos y parámetros:

- Threshold
Método: Otsu
- Modo de presentación Blanco y Negro (B&W)
- Fondo claro Los valores se ajustan manualmente en orden de eliminar el fondo inespecífico.

Debido a la variaciones de la escala de grises de las imágenes, éstas se agruparon en función del contraste y se aplicó el programa threshold global de Otsu a cada grupo de imágenes. Las imágenes binarias se procesaron con el módulo *particle analyzer* para obtener medidas del área ocupada por los fragmentos de la red axonal (área total de las partículas detectadas). Este análisis se realizó con los siguientes pasos y parámetros:

- Tamaño de las partículas: 20-10000 Unidades en pixeles
- Circularidad: 0.5-1.0
- Excluir análisis en los bordes: si
- Adicionar al manager

Para cuantificar el área total ocupada por la red axonal en las imágenes binarias se utilizó la herramienta ROI manager para obtener la suma total de pixeles (RawIntDen). Con estos datos se calculó el índice de degeneración que consistió en dividir el área ocupada por los fragmentos de la red axonal entre el valor del área total ocupada por la red axonal. La significancia de las diferencias entre genotipos y edades se evaluó mediante la prueba ANOVA simple y el test *post-hoc* de Holm-Sidak para las comparaciones múltiples.

3.2.17 Análisis estadístico

Toda la estadística de los datos se analizó con el software GraphPad Prism 6 para windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) y Statgraphics Centurion XVI V 16.2.04 (Statpoint Technologies, Inc. The Plains, Virginia). Las gráficas de los datos se realizaron con el software GraphPad Prism 6.

Cada experimento se replicó al menos tres veces usando muestras biológicas o cultivos neuronales obtenidos a partir de tres animales diferentes por genotipo y edad (N=3). Para realizar las réplicas experimentales el sacrificio, el cultivo primario neuronal y los experimentos se realizaron con los dos genotipos al mismo tiempo en paralelo.

Capítulo 4

Resultados

La regulación de la dinámica de la actina y microtúbulos es necesaria para la formación, el crecimiento y la regeneración del axón. A diferencia de otras enfermedades neurodegenerativas, el proceso neurodegenerativo presente en la fisiopatología de la FRDA no ha sido asociado con la alteración del citoesqueleto en los conos de crecimiento neuronales ni con la dinámica del citoesqueleto de actina. Para determinar si estas características se presentan en modelos murinos para la FRDA, se siguió el siguiente razonamiento experimental.

4.1 Estudio in vitro de la dinámica del crecimiento axonal en neuronas del ganglio dorsal del modelo murino YG8R para la ataxia de Friedreich

4.1.1 Las neuronas del DRG del modelo YG8R presentan un menor número de conos de crecimiento y una morfología aberrante

Los somas de las neuronas del DRG adultas tienen la capacidad de crear una nueva red axonal en tan solo pocas horas. Durante esta etapa, los conos de crecimiento son la estructura que refleja la capacidad neuronal para crear un nuevo axón y una nuevas dendritas. Para evaluar si el déficit de frataxina afecta el crecimiento axonal de las neuronas sensitivas adultas, analizamos los conos de crecimiento en el cultivo primario del DRG. En concreto fueron objeto de

estudio la cantidad, el tamaño, la forma del cono de crecimiento en las neuronas del DRG tanto del modelo YG8R como su control. Las neuronas se marcaron con un anticuerpo anti β -tubulinaIII y con el conjugado Phalloidin-TRITC, para detectar la actina F. El núcleo se tiñió con DAPI. El número de conos de crecimiento por neurona se identificó visualmente y se cuantificó manualmente a partir de las imágenes de fluorescencia usando el software Fiji/ImageJ (N.I.H). En el ganglio dorsal hay subpoblaciones neuronales que se distinguen entre sí por su morfología (pseudopolar, bipolar, multipolar), para este estudio las neuronas se seleccionaron aleatoriamente sin tener en cuenta su morfología (Figura 4.1).

Las neuronas del genotipo YG8R presentaban un número reducido de conos de crecimiento en comparación con el genotipo control C57BL/6J (Figura 4.1). Al analizar la morfología de los conos observamos una variación de las formas y los tamaños entre los dos genotipos. Por lo cual clasificamos los conos de crecimiento según su forma para determinar si la morfología estaba afectada por el déficit de frataxina. Se identificaron tres formas de conos, descritas previamente en la literatura (234), basándose en la estructura molecular de los microtúbulos y la actina filamentosa (actina F):

Conos Dispersos Aparecen como estructuras anchas con una red de microtúbulos bien organizada.

Conos Retraídos Presentan una forma de flecha en la que los microtúbulos son visibles.

Conos Colapsados Se caracterizan por tener una forma circular y por incluir microtúbulos sinusoidales y enrollados.

Para la cuantificación de los conos de crecimiento según su forma, los conos de crecimiento se clasificaron en dos grupos: dispersos, y retraídos ó colapsados. El hecho de agrupar los retraídos y colapsados se debe a que la distinción entre estas formas requiere la detección de tubulina no polimerizada (234). El resultado que se observó fue un incremento significativo en el número de los conos retraídos y colapsados y una reducción en el número de los conos dispersos en nuestro modelo en comparación a los observados para el ratón control C57BL/6J (valor $p < 0.001$) (Figura 4.2), indicando que la morfología de los conos de crecimiento estaba alterada en nuestro modelo.

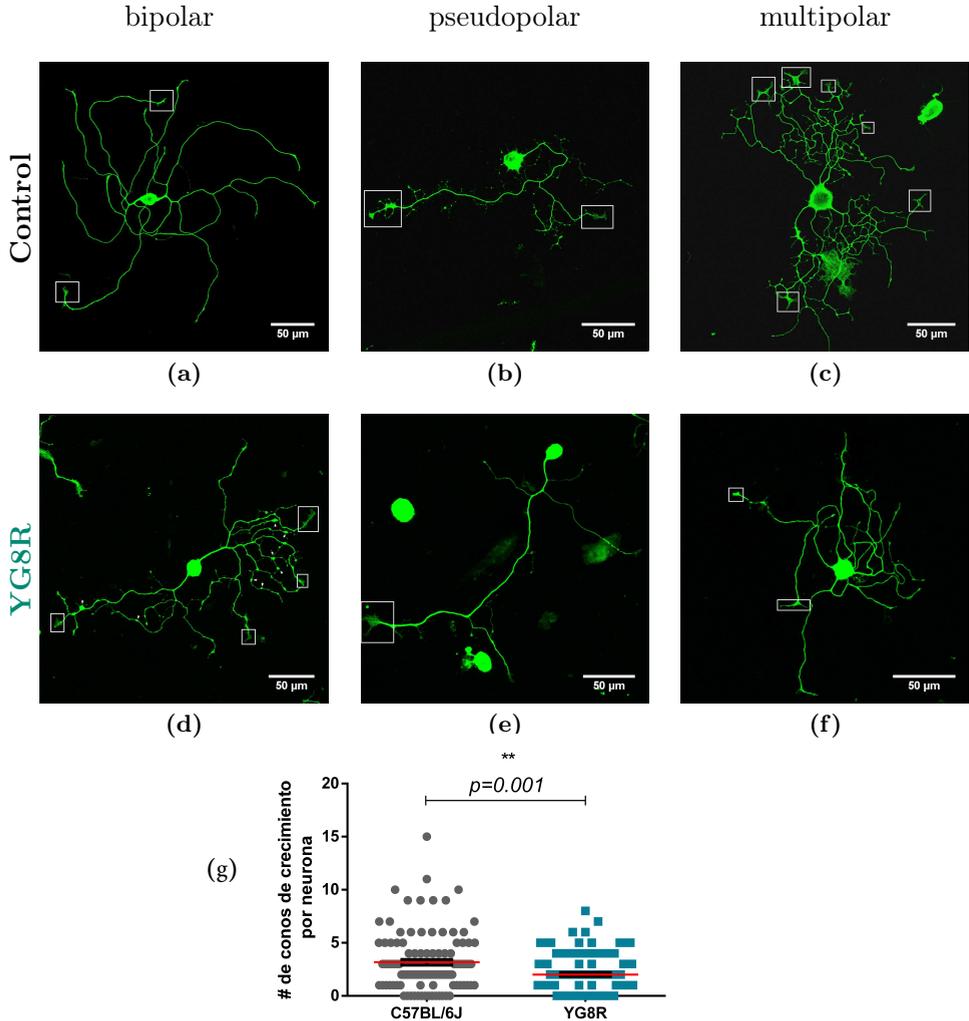
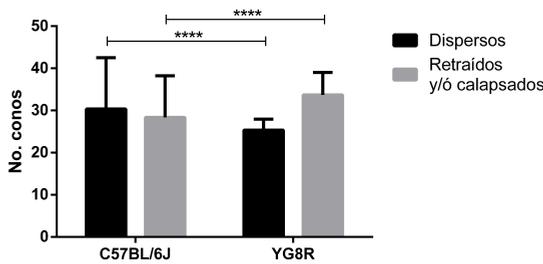
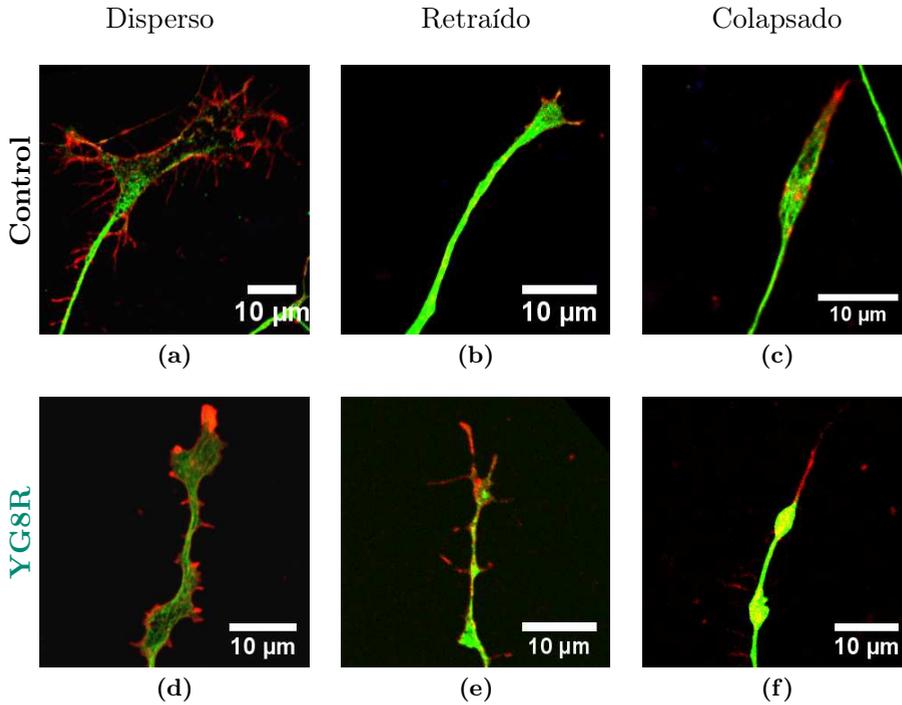


Figura 4.1: Análisis del número de conos de crecimiento en los genotipos YG8R y control C57BL/6J. (a-f) Imágenes confocales de 3 subtipos de neuronas sensitivas para los dos genotipos, YG8R y control C57BL/6J (neurona de tipo bipolar (a), tipo pseudopolar (b) y de tipo multipolar (c)). Las neuronas se detectaron con anti- β -tubulinaIII (verde). Las imágenes fueron obtenidas a partir del cultivo primario del DRG con un tiempo de cultivo de 24 horas. Los recuadros blancos indican los conos de crecimiento. (g) Gráfico que muestra todos los datos obtenidos para el número conos de crecimiento por neurona en los dos genotipos y el valor de la media (línea roja). Se puede observar como las neuronas sensitivas del genotipo YG8R presentan menos conos de crecimiento por neurona que las del genotipo control (valor $p=0.0013$). La comparación entre genotipos de los números de conos de crecimiento por neurona se realizó mediante la prueba de Mann Whitney, $**$ valor $p<0.01$ ($n=108$ células de tres experimentos independientes).



(g) Cuantificación

Figura 4.2: Análisis morfológico del cono de crecimiento en las neuronas del DRG. Las imágenes confocales muestran un ejemplo de cada una de las morfologías del cono de crecimiento descritas: dispersa (a,d), colapsada (b,e) y retraída (c,f). Las imágenes fueron obtenidas a partir del cultivo primario de las neuronas del DRG a las 48h de cultivo. La β -tubulinaIII (verde) se concentra en el dominio central del cono y la actina filamentososa (rojo) se concentra en el filopodio. (g) Porcentajes obtenidos en la cuantificación de los conos de crecimiento (dispersos y colapsados ó retraídos) para el genotipo YG8R y el genotipo control. (n=150-200 neuronas de tres experimentos independientes). La comparación entre poblaciones de conos de crecimiento dispersos o retraídos/colapsados de cada genotipo se realizó mediante la prueba Chi cuadrado χ^2 , **** valor $p < 0.001$ (n= 100 neuronas de tres experimentos independientes).

4.1.2 *El déficit de frataxina afecta el área del cono de crecimiento y la longitud de las neuritas en las neuronas adultas del DRG*

La morfología del cono de crecimiento está directamente relacionada con la funcionalidad del cono de crecimiento. La función del cono de crecimiento es fundamental para el crecimiento y guía axonal, por lo cual pensamos que las neuronas del DRG de nuestro modelo podrían tener alterados estos procesos. Para determinar si el tamaño de los conos de crecimiento estaba afectado en el genotipo YG8R, se cuantificó el área de los conos de crecimiento. El área de los conos de crecimiento en el genotipo YG8R resultó ser significativamente menor que la observada para el genotipo control a las 24 horas de cultivo (Figura 4.3). En el gráfico de frecuencias que muestra los datos obtenidos a las 24 horas de cultivo, se puede observar que un 92,6 % de las neuronas del genotipo YG8R formaron conos con áreas entre 0-100 μm^2 en comparación con el 86,5 % de las neuronas del genotipo control C57BL/6J, indicando que los conos de crecimiento de las neuronas YG8R del genotipo YG8R son más pequeños que los del control.

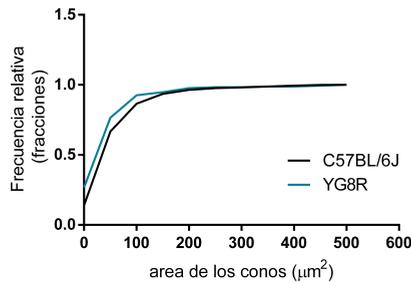


Figura 4.3: Efecto del déficit de frataxina en el área y la morfología de los conos de crecimiento La gráfica muestra las frecuencias relativas obtenidas para el área de los conos de crecimiento de las neuronas sensitivas de los dos genotipos tras 24 horas de cultivo. En las gráficas de frecuencias se puede observar como los conos de crecimiento de las neuronas sensitivas del genotipo YG8R son significativamente más pequeños que los observados en el control a 24 horas de cultivo (** $p=0.0058$). La comparación de las áreas de los conos entre genotipos se realizó mediante la prueba de Mann Whitney, ($n=150-200$ células de tres experimentos independientes).

Basándonos en estas observaciones y debido a que la morfología del cono de crecimiento está directamente asociada con la longitud del axón y las neuritas, evaluamos si la extensión de las neuritas también estaba afectada. Para cuan-

tificar la longitud de las neuritas se seleccionó la neurita más larga de cada neurona tras 24 horas de cultivo. La comparación de la longitud de las neuritas mostró una diferencia significativa entre los dos genotipos (Figura 4.4). Las neuronas del genotipo YG8R exhibieron neuritas más cortas que las del ratón control, evidenciando una vez más que el déficit de frataxina produce cambios intracelulares que terminan por afectar el crecimiento axonal.

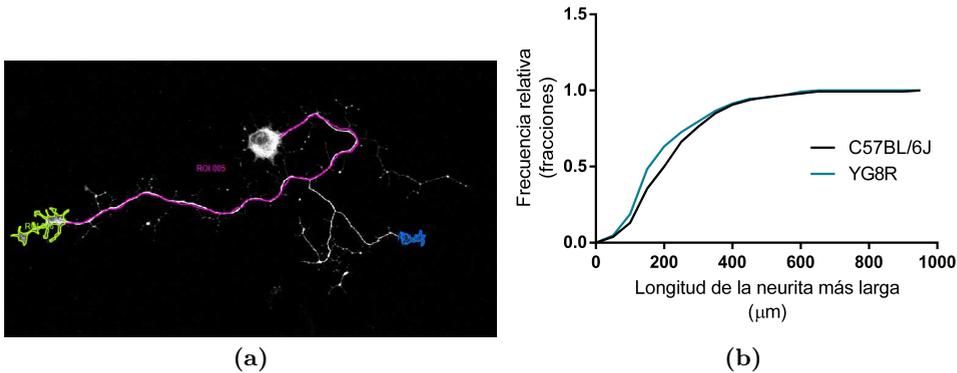


Figura 4.4: Longitud de las neuritas en las neuronas del DRG del genotipo YG8R esta reducida. (a) Imagen confocal de una típica neurona sensitiva adulta del ratón control C57BL/6J tras 24 horas de cultivo. La neurona fue teñida para marcar la β -tubulina III. Se señala la neurita más larga en color fucsia y algunos conos de crecimiento. (b) Gráfica que muestra las frecuencias relativas (fracciones) de todos los datos obtenidos para la longitud de la neurita más larga en los dos genotipos. La distribución de frecuencias muestra cómo la mayoría de las neuronas del genotipo YG8R extienden neuritas con longitudes de 50 hasta 200 μm , mientras que, en el control, la mayoría de las neuritas presentan longitudes de 150 hasta 500 μm (* $p=0.0468$). La comparación entre las distribuciones se realizó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, ($n=128-160$ células de tres experimentos independientes).

4.1.3 *El déficit de frataxina altera la dinámica de la actina en las neuronas sensitivas adultas*

Nuestros resultados muestran claramente que la morfología de los conos de crecimiento en nuestro modelo está afectada. Siendo que la morfología del cono es un claro indicador de su funcionalidad, y que dicha funcionalidad está determinada por la arquitectura del citoesqueleto de actina y de microtúbulos, investigamos si la dinámica de la actina y de los microtúbulos estaba afectada en nuestro modelo. La dinámica de la actina en el cono de crecimiento garantiza la formación de los filamentos de actina (actina F) por la polimerización de

la actina globular (actina G). En este sentido, se analizó la intensidad de la fluorescencia de la actina F y la actina G en el cono de crecimiento y en la sección más distal de las neuritas (Figura 4.5, Figura 4.6).

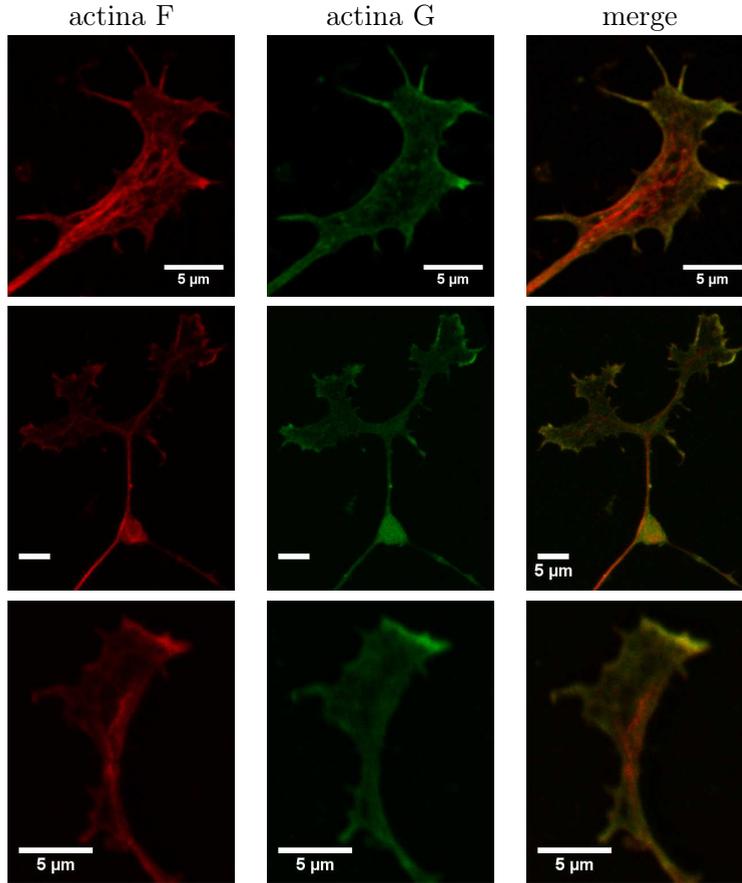


Figura 4.5: Expresión de la actina F/G en los conos de crecimiento de las neuronas de la raíz dorsal del modelo C57BL/6J. Se usó el conjugado Alexa Fluor 488 DNase I y Faloidina-TRITC para detectar, respectivamente, los niveles endógenos de actina filamentososa (rojo) y actina globular (verde) en los conos de crecimiento de las neuronas del DRG; se usó anti- β -tubulinaIII como marcador neuronal. Las imágenes en merge muestran las regiones de colocalización de la actina F y G en los conos de crecimiento, así como también exhiben las diferencias de su distribución y expresión en el cono. Barra de escala 5 μ m.

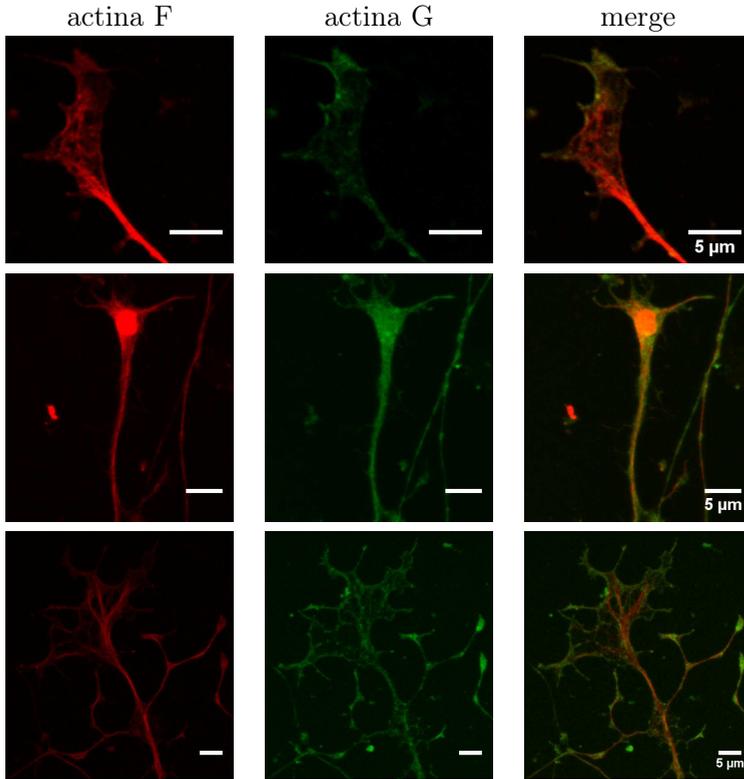


Figura 4.6: Expresión de la actina F/G en los conos de crecimiento de las neuronas de la raíz dorsal del modelo YG8R. Se usó el conjugado Alexa Fluor 488 DNase I y Faloidina-TRITC para detectar los niveles endógenos de actina filamentosa (actina F, rojo) y actina globular (Actina G, verde) en los conos de crecimiento de las neuronas del DRG; se usó anti- β -tubulinaIII como marcador neuronal; DAPI se usó para teñir el núcleo. Las imágenes en merge muestran la colocalización de la actina F y G en los conos de crecimiento (amarillo), así como también exhiben las diferencias de su distribución y expresión en el cono. Barra de escala 5 μ m.

La dinámica de la actina resultó estar alterada en el modelo YG8R. El ratio de la intensidad de la actina F en relación a la actina G para el genotipo YG8R resultó estar incrementado en los conos de crecimiento. Comprobamos que el incremento del ratio se debía a un incremento en la intensidad de la actina F y la actina G en relación a la obtenida para el genotipo control C57BL/6J (Figura 4.7). De esta forma demostramos que la dinámica de la actina está alterada en nuestro modelo debido a un incremento de la actina filamentosa y la actina globular en los conos de crecimiento.

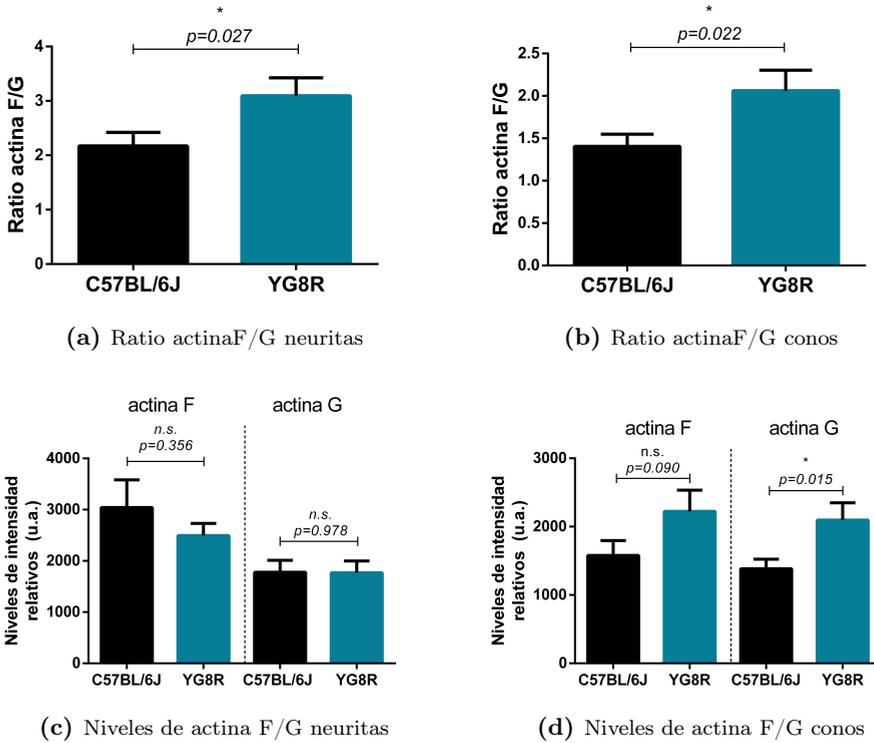


Figura 4.7: Efecto del déficit de frataxina en los niveles de actina F y actina G. (a,b) Media de los ratios de la intensidad de la actina F/G relativa al área en el extremo más distal de las neuritas y en los conos de crecimiento (b). (c,d) Niveles de la intensidad de la actina F y actina G relativos al área en el extremo más distal de las neuritas (c) y en los conos de crecimiento (d). La comparación del ratio y los niveles de intensidad entre las células control se realizó mediante el test t-student con la corrección de Welch's.* valor $p < 0, 05$ ($n=34-42$ células de tres experimentos independientes). Las barras de error indican el error estándar de la media.

4.1.4 El déficit de frataxina altera la dinámica de los microtúbulos en las neuronas del DRG adultas

En los últimos años han aumentado los estudios que sugieren una asociación entre la alteración de la regulación de la dinámica de los microtúbulos con la neurodegeneración (52, 234, 235), siendo el transporte axonal el principal mecanismo afectado. En nuestro laboratorio Mollá y col. (236) confirmó la

acumulación de la mitocondria y neurofilamentos (NF160, SMI32, RT97 y periferina) a lo largo del axón en esferoides axonales en las neuronas sensitivas del ratón YG8R sugiriendo un bloqueo del transporte mitocondrial. Además también se confirmó una gran acumulación de marcadores del transporte axonal rápido anterógrado de vesículas (β -APP y sinaptofisina), que colocalizan con la mitocondria acumulada, en las neuronas sensitivas del ratón YG8R (200, 236). Estos resultados sugerían que el transporte axonal en el ratón YG8R estaba afectado. Para definir si el déficit de frataxina alteraba la dinámica de los microtúbulos y por ende, el transporte axonal, estudiamos la dinámica de los microtúbulos en las neuronas del DRG usando dos aproximaciones: primero estudiamos la distribución y la intensidad de α -tubulina acetilada (Tuba-Acet) y α -tubulina tirosinada (Tuba-Tir) mediante inmunofluorescencia en el cultivo primario del DRG, y luego comparamos por western blot los niveles de Tuba-Acet y Tuba-Tir en los tejidos de DRG y raíces del ganglio dorsal de ratones YG8R y control C57BL/6J.

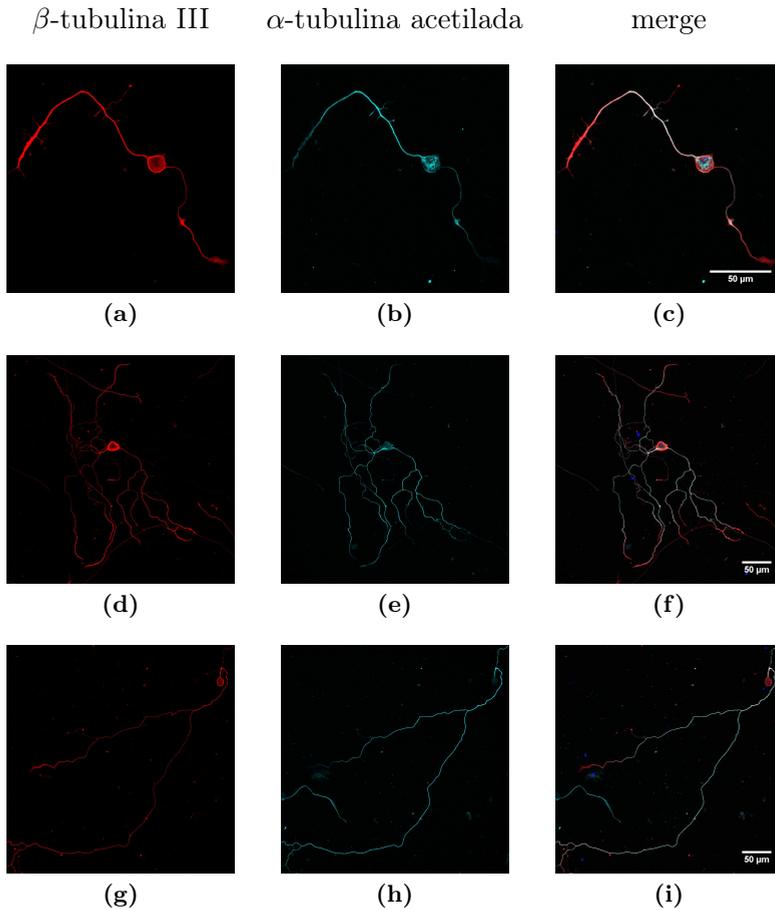


Figura 4.8: Distribución neuronal de los microtúbulos acetilados en las neuronas del DRG del genotipo control(C57BL/6J). Imágenes de neuronas del DRG en diferentes estados de crecimiento, inmadura (a-c), intermedia (d-f) y madura (g-i), marcadas con anticuerpo anti- β -tubulinaIII y anti- α -tubulina acetilada. Se puede observar cómo la acetilación (α -tubulina acetilada) se distribuye a lo largo de las neuritas estando menos concentrada en el extremo más distal de las neuritas. El núcleo se marco con DAPI (azul). Las neuronas se mantuvieron en cultivo por 72 horas. Barra de escala 50 μm . Las imágenes muestran la máxima proyección de Z-stacks (10 a 15 secciones de 0,29 μm de grosor).

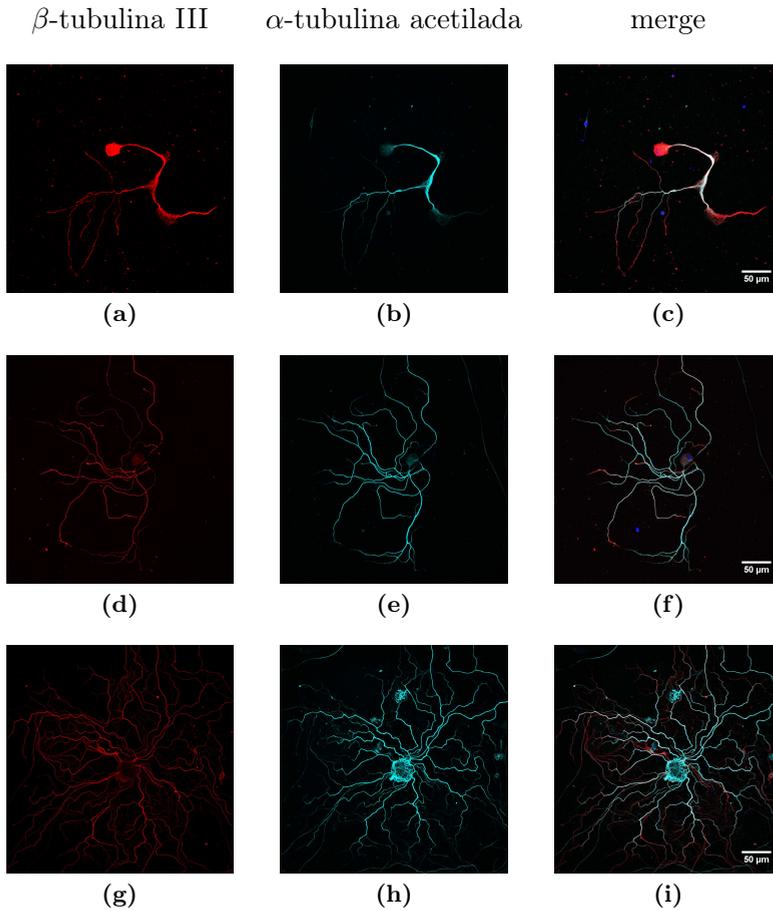


Figura 4.9: Distribución neuronal de los microtúbulos acetilados en las neuronas del DRG del genotipo YG8R. Imágenes de neuronas del DRG en diferentes estados de crecimiento, inmadura (a-c), intermedia (d-f) y Madura (g-i), marcadas con anticuerpo anti- β -tubulinaIII y anti- α -tubulina acetilada. Se puede observar cómo la acetilación (α -tubulina acetilada) se distribuye a lo largo de las neuritas estando menos concentrada en el extremo más distal de las neuritas. El núcleo se marco con DAPI (azul). Las neuronas se mantuvieron en cultivo por 72 horas. Barra de escala 50 μm . Las imágenes muestran la máxima proyección de Z-stacks (10 a 15 secciones de 0,29 μm de grosor).

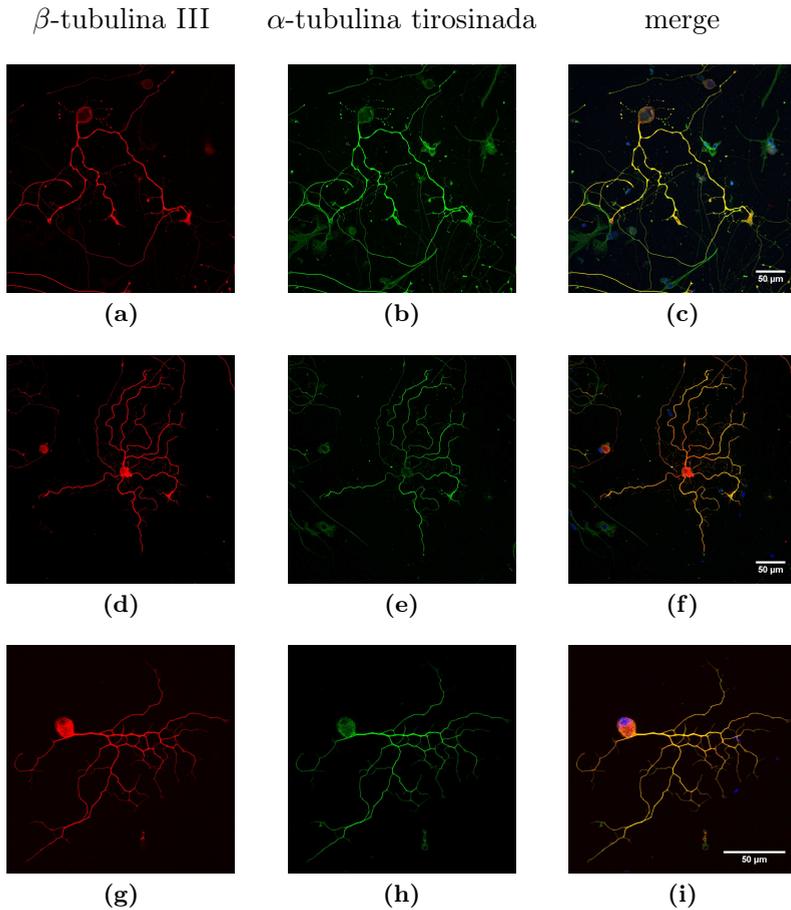


Figura 4.10: Distribución neuronal de los microtúbulos tirosinados en las neuronas del DRG del genotipo control (C57BL/6J). Imágenes de tres neuronas del DRG en diferentes estados de crecimiento (de arriba a abajo: inmadura, intermedia y madura) marcadas con anticuerpo anti- β -tubulinaIII y anti- α -tubulina tirosinada. El núcleo se marco con DAPI (azul). Las neuronas se mantuvieron en cultivo por 72 horas. Barra de escala 50 μ m. Las imágenes muestran la máxima proyección de Z-stacks (10 a 15 secciones de 0,29 μ m de grosor). Se puede observar cómo la tirosinación (α -tubulina tirosinada) de los microtúbulos se distribuye lo largo de las neuritas incluyendo los conos de crecimiento.

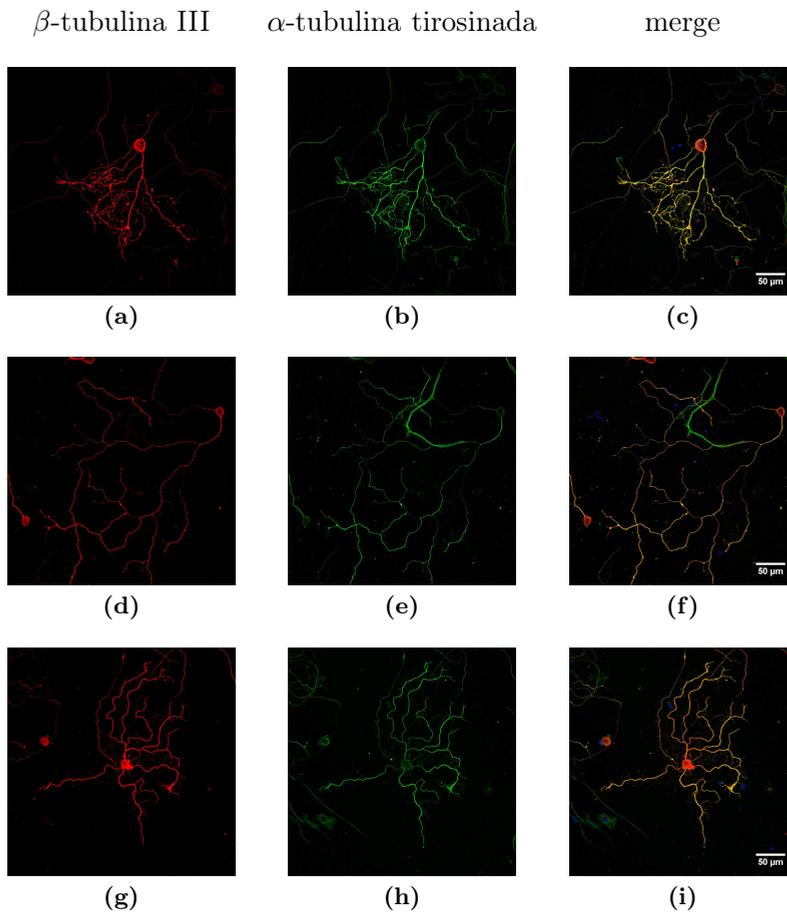


Figura 4.11: Distribución neuronal de los microtúbulos tirosinados en las neuronas del DRG del genotipo YG8R Imágenes de tres neuronas del DRG en diferentes estados de crecimiento (de arriba a abajo: inmadura, intermedia y madura) marcadas con anticuerpo anti- β -tubulina III y anti- α -tubulina tirosinada. El núcleo se marco con DAPI. Las neuronas se mantuvieron en cultivo por 72 horas. Barra de escala 50 μm . Las imágenes muestran la máxima proyección de Z-stacks (10 a 15 secciones de 0,29 μm de grosor). Se puede observar cómo la tirosinación (α -tubulina tirosinada) de los microtúbulos se distribuye lo largo de las neuritas incluyendo los conos de crecimiento.

Al estudiar la distribución de las modificaciones post-traduccionales de los microtúbulos en el ratón YG8R y control C57BL/6J, se observó que los microtúbulos acetilados estaban localizados preferentemente en el axón y ausentes

en los extremos distales de las neuritas (10-20 μm desde el extremo más distal) (Figura 4.8; Figura 4.9). En el caso de los microtúbulos tirosinados, el patrón de localización abarca todos los compartimentos neuronales: cuerpo celular, axón y neuritas, incluyendo los conos de crecimiento (Figura 4.10; Figura 4.11). Estas distribuciones de la fluorescencia de los microtúbulos acetilados y tirosinados coinciden con la reportada previamente por Lim y col., Bouquet y col. (237, 238).

Una vez descrito el patrón de expresión comprobamos si existía diferencias en el modelo de déficit de frataxina, realizando un análisis cuantitativo de la cantidad de microtúbulos en las neuritas de nuestros modelos. Se cuantificó la intensidad de la fluorescencia de la α -tubulina acetilada y tirosinada en experimentos independientes usando el software de análisis de imagen LAS Image Analysis. Se obtuvieron series-Z de neuronas completas para el genotipo control C57BL/6J (Figura 4.8, 4.10) y para el genotipo YG8R (Figura 4.9, Figura 4.11). El proceso consistió en delimitar de forma precisa las regiones distales del axón que excluían el cono de crecimiento. Se analizaron entre 38 y 40 neuronas por genotipo y se conservó el área seleccionada en $50\mu\text{m}^2$. Los resultados no mostraron diferencias significativas, sin embargo se observó que la acetilación tendía a estar incrementada en las neuritas del modelo YG8R con respecto al control C57BL/6J, mientras que la tirosinación tendía a estar reducida (Figura 4.12).

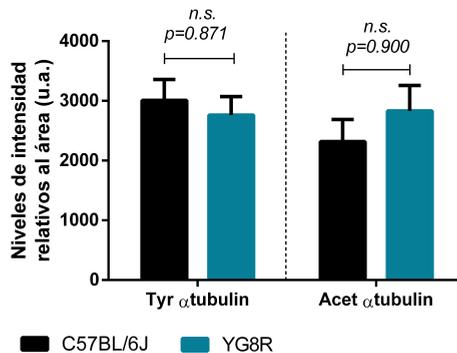


Figura 4.12: Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de los microtúbulos acetilados y tirosinados. La gráfica de barras representa los valores obtenidos de la intensidad media relativos al área. Se puede observar una tendencia de incremento de la α -tubulina acetilada. La comparación entre genotipos se realizó mediante el test t-student. (n=38-43 neuronas de tres experimentos independientes). Las barras de error indican el error estándar de la media.

El análisis por western blot los niveles de acetilación y tirosinación de los microtúbulos desde tejidos de ganglio dorsal de ambos ratones, donde se localizan los somas de las neuronas, y de las raíces del ganglio dorsal que corresponde a los axones (Figura 4.13), mostró que los niveles de acetilación de los microtúbulos estaban incrementados de forma significativa en las raíces de los ganglios dorsales de nuestro modelo. En cambio, los niveles de tirosinación no cambiaron significativamente entre los genotipos. Con estos resultados mostramos que el déficit de frataxina alteraba la dinámica de los microtúbulos en los axones de las neuronas adultas del DRG incrementando los niveles de la acetilación de los microtúbulos.

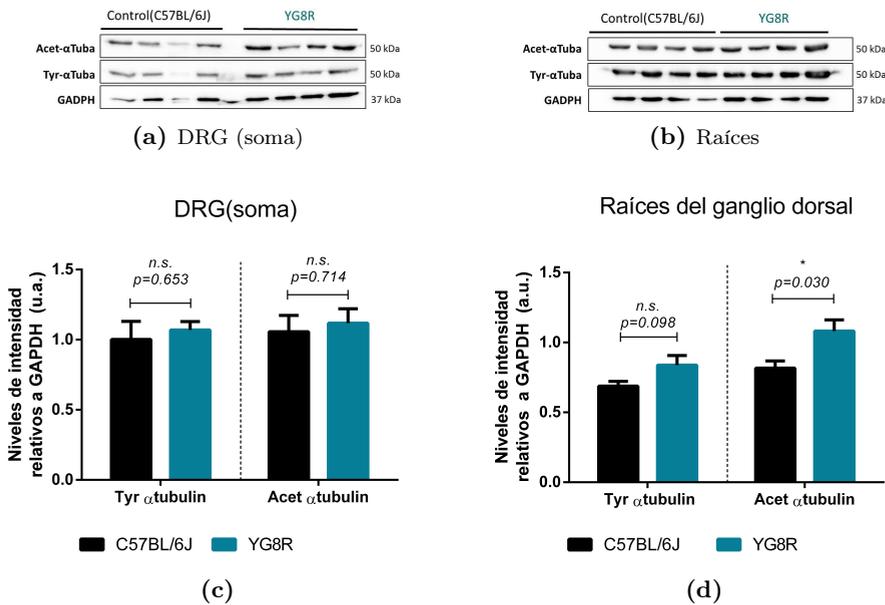


Figura 4.13: Los niveles de expresión de la α -tubulina acetilada esta incrementada en las raíces de los ganglios dorsales del ratón YG8R. El análisis por *western blot* de la expresión de la α -tubulina acetilada y tirosinada en el DRG y las raíces de los ganglios dorsales confirmó el incremento significativo de la acetilación en las raíces de los ganglios dorsales del ratón YG8R. Las diferencias entre genotipos se determino mediante la prueba t-student. Significatividad * $p < 0.05$.

4.1.5 *Activación de la cofilina en las neuronas del DRG y su influencia en la dinámica del citoesqueleto*

Nuestros resultados muestran una clara afectación de la morfología de los conos de crecimiento en las neuronas del DRG del modelo YG8R asociado a un incremento de la actina F y la actina G. Para indagar sobre los mecanismos moleculares que podrían estar asociados al incremento de los niveles de actina F en los conos de crecimiento, decidimos estudiar la expresión de proteínas especializadas que regulan la longitud, y la remodelación de los filamentos de actina, específicamente la familia ADF/cofilina (actin depolymerizing factor).

Cofilina se une específicamente a los filamentos de actina, y los desestabiliza rompiéndolos en pequeñas piezas favoreciendo aun más el ensamblaje de filamentos. Lo más interesante de ADF/cofilina es que su actividad está regulada por varios mecanismos que incluyen fosforilación, la unión de fosfolípidos de membrana, los niveles de pH local y estrés oxidativo (239). Debido a que está bien descrito que las células de FRDA presentan un incremento en el estrés oxidativo (169, 236), pensamos que era muy probable que la regulación de la cofilina estuviera alterada en las neuronas del DRG del modelo YG8R. Para confirmar si la regulación de la cofilina estaba alterada en las neuronas del DRG del modelo YG8R, analizamos por western blot, en tejido de DRG y raíces del ganglio dorsal, los niveles de activación de cofilina-1 mediante la detección de la cofilina-1 total y fosforilada. Estos resultados muestran una disminución significativa de la p-cofilina-1 (forma inactiva) en las raíces de los ganglios dorsales (Figura 4.14) asociado a un incremento de la cofilina-1 total (forma activa). Estos resultados podrían dar una explicación al incremento de actina filamentosa observado en los conos de crecimiento, posiblemente debido a la sobreactivación de la cofilina-1.

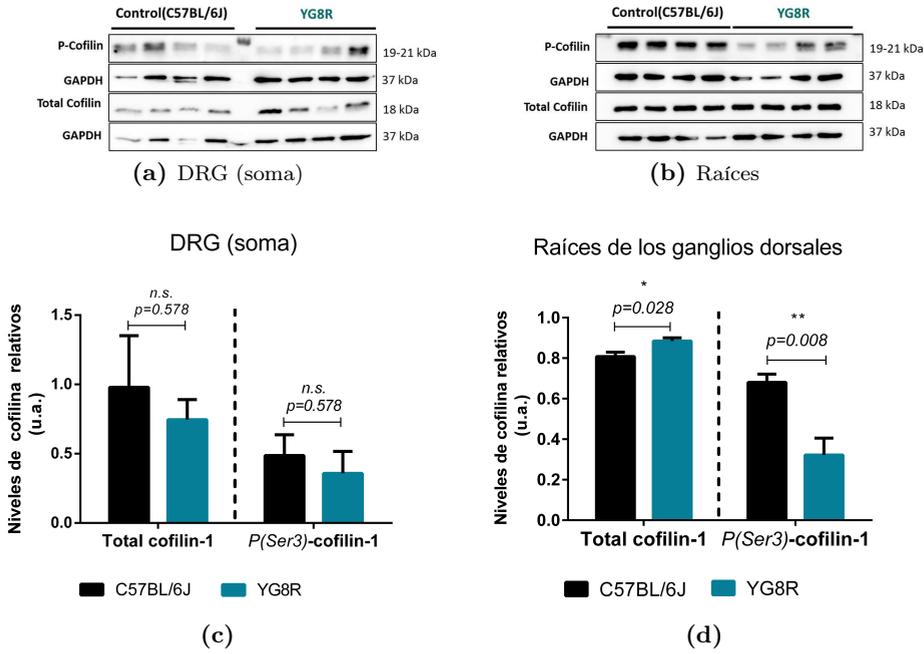


Figura 4.14: El déficit de frataxina incrementa los niveles de de cofilina-1 en las raíces de los ganglios dorsales. El análisis por western blot de la expresión de la cofilina en el DRG y las raíces de los ganglios dorsales mostró una disminución significativa p-cofilina-1 en las raíces de los ganglios dorsales del ratón YG8R que estaba relacionada con un incremento significativo de la cofilina-1 total. Las diferencias entre genotipos se determino mediante la prueba t-student. Significatividad * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Para confirmar estos resultados, quisimos analizar por inmunofluorescencia la localización y distribución de cofilina en los axones del asta dorsal de nuestros modelos. Con este propósito, se obtuvieron secciones longitudinales del asta dorsal (7 μm de grosor), y se marcaron para identificar la β -TubulinaIII, cofilina-1, p-cofilina-1 y el núcleo de las células circundantes (Figura 4.15. Observamos que cofilina-1 se expresa de forma abundante en los axones y se distribuye uniformemente a lo largo del axoplasma tanto en el control C57BL/6J como en el YG8R (Figura 4.15, a, d), sin presentar cambios evidentes en los niveles de expresión entre los dos genotipos. La p-cofilina-1, presenta una distribución parecida entre ambos genotipos, con una expresión restringida puntos específicos y regiones a lo largo de los axones (Figura 4.15, g). Este patrón de expresión es similar al observado en otros tipos de tejido nervioso como los axones del nervio facial de ratón (240). Donde sí que observamos diferencias

fue en los niveles de expresión, ya que en los axones del asta dorsal del ratón YG8R resultó evidente la disminución en p-cofilina-1 (Figura 4.15, g, j), coincidiendo con los resultados obtenidos por western blot.

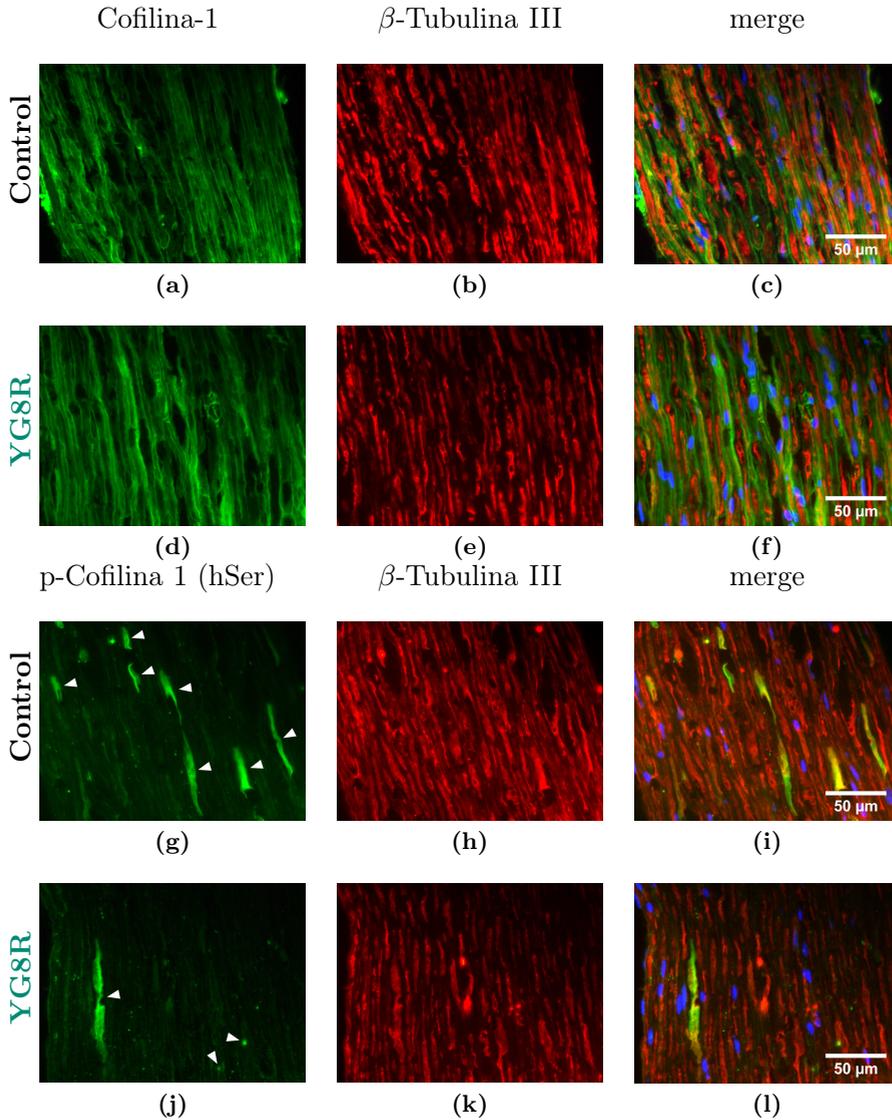


Figura 4.15: Análisis de la expresión cofilina en el asta dorsal del ratón YG8R. Se utilizaron cortes longitudinales del asta dorsal ($7 \mu\text{m}$ grosor) de los dos genotipos para analizar la distribución de cofilina-1, cofilina-1 fosforilada y β -TubulinaIII en la raíz del ganglio dorsal que corresponde a la rama sensitiva. Las imágenes muestran que una señal abundante de cofilina-1 que se distribuye a lo largo de los axones. La señal de cofilina-1 fosforilada es menos abundante y esta concentrada en ciertos puntos a lo largo del axón (flechas blancas) y en ciertas estructuras que rodean a los axones, presumiblemente células de Schwann. Los núcleos de las células glia axonales aparecen en azul. Escala $50 \mu\text{m}$.

4.1.6 *Análisis del sistema de regulación de la Cofilina*

La actividad de cofilina es regulada negativamente por la fosforilación del aminoácido Ser3 por LIM quinasas (Lin-11, Isl-1, y Mec-3), y es reactivada mediante su desfosforilación por las fosfatasas slingshot o chronophin (CIN/PDXP), permitiendo que cofilina se una y rompa los filamentos de actina (actina F), regulando el ciclo de polimerización/despolimerización de actina (Figura 1.7). El balance entre la fosforilación y desfosforilación de cofilina es importante para permitir la motilidad del cono de crecimiento y la dinámica de la extensión de las neuritas.

Para determinar si la reducción de p-cofilina-1 causada por el déficit de frataxina en las raíces de los ganglios dorsales de nuestro modelo se debe a la alteración de proteínas que fosforilan/desfosforilan a cofilina-1, decidimos evaluar en tejido de DRG y la raíces del ganglio dorsal los niveles de expresión de la quinasa LIMK-1 en su forma basal y fosforilada Phospho-LIMK-1 [Thr508], y la fosfatasa CIN/PDXP (Figura 4.16, a, b). La cuantificación de los niveles de chronophin (CIN/PDXP) mostró un incremento significativo con respecto al control C57BL/6J en los ganglios dorsales y un incremento en las raíces, aunque esta diferencia no fuera significativa (Figura 4.16, c). Por otra parte, los niveles de LIMK-1 estaban reducidos significativamente en las raíces de los ganglios dorsales del ratón YG8R (Figura 4.16, d) sin presentar cambios significativos en el DRG. Por último, los niveles de activación de LIMK-1 (Phospho-LIMK-1 [Thr508]) resultaron estar incrementados en las raíces de los ganglios dorsales de forma significativa, lo cual contradice reducción de la inactivación de cofilina.

Estos resultados exhibían un desajuste de la regulación de la actividad de las proteínas que regulan la fosforilación de cofilina, sin embargo, no resultó claro que la disminución de los niveles de fosforilación de la cofilina se debieran a la alteración de CIN/PDXP y LIMK-1. Consideramos que se necesita un estudio mas profundo de los mecanismos que regulan la actividad de cofilina para entender cómo el déficit de frataxina produce la reducción de su fosforilación.

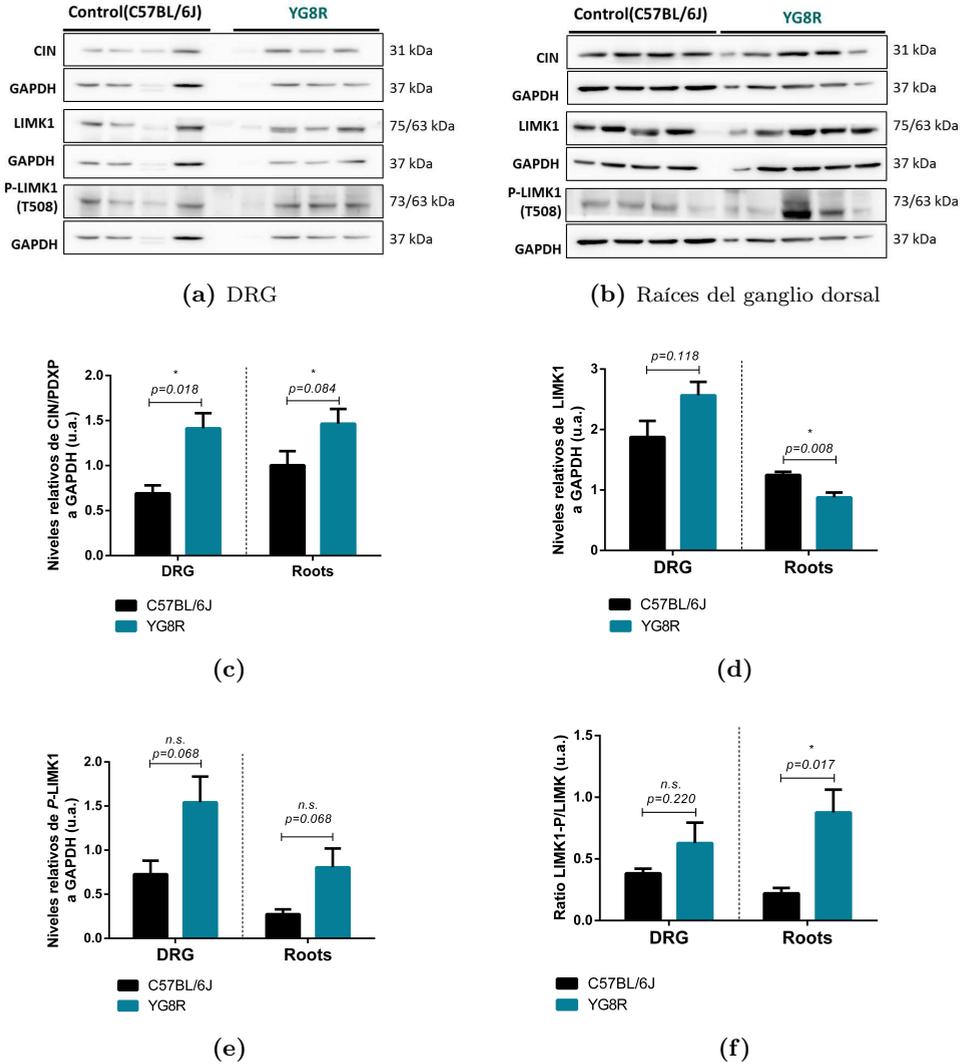


Figura 4.16: Regulación de la actividad de cofilina. El análisis por western blot de la expresión de la fosfatasa Chronophin/PDXP y la quinasa LIMK-1 en el DRG y las raíces de los ganglios dorsales mostró un incremento significativo de Chronophin/PDXP en el DRG del ratón YG8R y una disminución significativa de la expresión de LIMK-1 en las raíces del ganglio dorsal del ratón YG8R. La actividad de LIMK-1, medida en los niveles de la proteína fosforilada (P-LIMK-1) resultó estar incrementada significativamente en las raíces del ganglio dorsal del ratón YG8R. Este incremento de la actividad de LIMK-1 se confirmó al calcular el ratio de P-LIMK-1/LIMK-1 en las raíces del ganglio dorsal del ratón YG8R. Las diferencias entre genotipos se determinó mediante la prueba t-student. Significatividad * $p < 0.05$.

4.1.7 Regulación del proceso de desensamblaje de la actina

Con los resultados obtenidos hasta el momento observamos una clara afectación de la dinámica de los filamentos actina debido al déficit de frataxina en las raíces de los ganglios dorsales, y que podría deberse a una sobre-activación de cofilina. Dado que cofilina controla la tasa de ensamblaje/desensamblaje de los filamentos de actina, quisimos investigar si este proceso se veía afectado por una alteración en los niveles de expresión de las proteínas que directamente intervienen en el ensamblaje de los filamentos de actina. Existen dos clases de proteínas nucleadoras de actina, la familia de proteínas formina y el complejo ARP2/3. La formina dirige el ensamblaje de filamentos largos de actina mientras que el complejo ARP2/3 dirige el de redes ramificadas, estructuras importantes para la formación de la lamelipodio y el filopodio, y la protusión de los conos de crecimiento.

Se realizó un análisis por western blot de la expresión del complejo ARP2/3 en tejidos de DRG y raíces del ganglio dorsal de los ratones control C57BL/6J e YG8R. En el caso de los DRG no se logro obtener señal, posiblemente debido a bajos niveles de expresión de éste complejo en el soma de las neuronas. Los niveles de expresión del complejo ARP2/3 mostraron un incremento significativo en las raíces del ganglio dorsal del ratón YG8R comparados a los del control C57BL/6J. Estos resultados sugieren que la desestabilización del citoesqueleto de actina, debido al déficit de frataxina, podría deberse a un desajuste en los niveles de expresión de las proteínas que regulan la tasa de ensamblaje/desensamblaje de los filamentos de actina, tales como cofilina y el complejo ARP2/3.

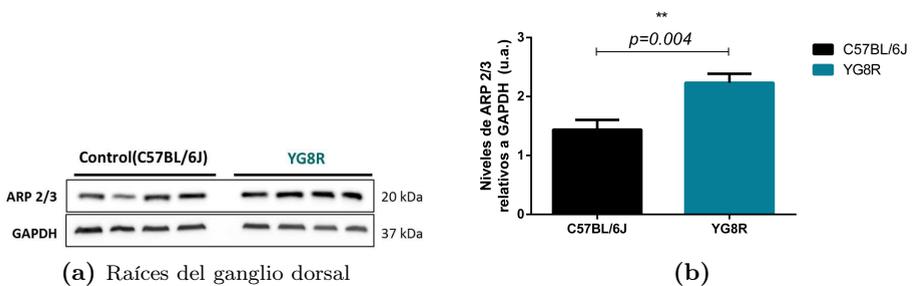


Figura 4.17: Niveles de ARP en las raíces del DRG. El análisis por western blot de la expresión del complejo ARP2/3 en las raíces de los ganglios dorsales mostró un incremento significativo en el ratón YG8R. Las diferencias entre genotipos se determino mediante la prueba t-student. Significatividad ** $p < 0.01$.

4.1.8 *Estudio del perfil proteómico de los ganglios dorsales del ratón deficiente en frataxina YG8R: proteínas del citoesqueleto y el transporte axonal*

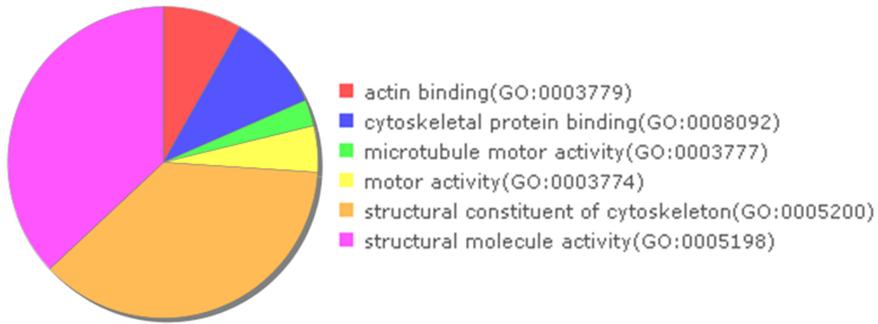
Nuestros resultados mostraban que el déficit de frataxina en los ratones YG8R, alteraba la estructura y la dinámica del citoesqueleto de actina y microtúbulos en los axones de las neuronas del DRG. Tal como observamos, esta alteración podría deberse a una desregulación en los niveles de expresión de algunas proteínas reguladoras del proceso. El problema es que la regulación no solo viene dada por las proteínas integradas en este estudio, ya que es mucho más complejo de lo expuesto en esta tesis. Por lo tanto, basándonos en un análisis comparativo del perfil proteómico mediante 2D-DIGE de los ganglios dorsales del modelo murino YG8R y el control C57BL/6J con 24 meses de edad (200), se realizó un análisis para identificar proteínas implicadas en la dinámica del citoesqueleto, el crecimiento y el transporte axonal. El estudio, realizado previamente en nuestro laboratorio, identificó 964 proteínas diferenciales que correspondían a 495 genes. De forma interesante, todas las proteínas identificadas resultaron estar reducidas en los ratones deficientes para frataxina YG8R con respecto al control C57BL/6J.

Análisis bioinformático de la expresión de proteínas del citoesqueleto neuronal

Para relacionar las proteínas de interés en procesos celulares específicos se utilizaron las herramientas de *PANTHER* (<http://www.pantherdb.org>) y *PaintOmics* (<http://www.paintomics.org>). Estas herramientas permiten identificar las proteínas dentro de las bases de datos de rutas moleculares: *PANTHER* (*Protein Annotation Through Evolutionary Relationship*) y *KEGG* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Las bases de datos de *PANTHER* y *KEGG* contienen una colección de mapas de rutas que representan nuestro conocimiento en la interacción molecular y redes de reacción para el metabolismo, procesamiento de información genética, procesamiento de información ambiental, procesos celulares, sistemas de organismos, enfermedades humanas y desarrollo de fármacos. El análisis identificó que las 495 proteínas aparecen implicadas en 82 vías *PANTHER* y 199 vías *KEGG* distintas (200). En el trabajo de tesis de Moliner (200) se detallan dos rutas relevantes: la fosforilación oxidativa, por ser la vía clásicamente implicada en la fisiopatología de la FRDA; y la señalización por calcio, debido a que Moliner (200) demostró que está participando en el proceso de neurodegeneración de las neuronas del DRG. Aquí, se detalla a continuación el análisis de la vía de la regulación del citoesqueleto de actina, por ser una vía novedosa en el campo de la FRDA, debido a que nuestros resultados demuestran que la desestabilización del ci-

toesqueleto de actina hace parte del proceso degenerativo en las neuronas del DRG.

En este trabajo se analizaron los datos obtenidos previamente pero filtrando aquellas proteínas que tenían alguna relación con la regulación del citoesqueleto y transporte. Dentro de las proteínas identificadas, se reconocieron 29 proteínas asociadas con el citoesqueleto y 16 con el transporte axonal (Figura 4.18). Estos resultados confirman que el déficit de frataxina afecta dos procesos biológicos clave para la función de las neuronas del DRG: la regulación del citoesqueleto de actina, microtúbulos y neurofilamentos; extensión y guía axonal; tráfico vesicular; y el transporte axonal.



(a) Funciones moleculares

Figura 4.18: Funciones moleculares de las proteínas expresadas diferencialmente en el ratón YG8R asociadas con el citoesqueleto y el transporte axonal. El estudio de la función molecular según la base de datos *Gene Ontology* con el sistema de clasificación *PANTHER* (<http://www.geneontology.org>) reveló que el 13,19% de las proteínas e isoformas tienen una actividad de unión a actina (GO:0003779); el 16,48% tienen actividad de unión al citoesqueleto (GO:0008092); el 4,4% tienen actividad motora asociada a microtúbulos (GO:0003777); el 7,69% tienen actividad motora (GO:0003774); el 59,34% tienen actividad estructural del citoesqueleto (GO:0005200); el 59,34% tienen actividad molecular estructural (GO:0005198). Estos porcentajes se calcularon sobre las proteínas seleccionadas relacionadas con el citoesqueleto y el transporte axonal.

Citoesqueleto de actina

El análisis proteómico del ganglio dorsal mostró la reducción de 14 proteínas asociadas con la estructura del citoesqueleto de actina y la regulación de su dinámica (Ver Anexos, Tablas 8.1, 8.4). Se identificaron 6 isoformas de actina (Actc1, Acta1, Acta2, Actb, Actg1, Actg2) las cuales forman los filamentos de actina; 6 proteínas de unión a actina (*ABPs*) que organizan los filamentos

de actina en microfilamentos (Avil, Actr3, Flnb, Fmnl2, Gsn), y 2 isoformas de la proteína de entrecruzamiento α -actinina (Actn1, Actn4), que entrelaza los filamentos de actina dejando espacios para que la proteína motora miosina pueda interactuar con la actina (una característica específica de α -actinina) (Figura 4.19).

El citoesqueleto de actina es uno de los componentes más dinámicos del citoesqueleto debido a que ensambla/desensambla filamentos de actina en respuesta a las necesidades fisiológicas de las células. En las neuronas adultas, el citoesqueleto de actina es el soporte estructural, y junto a la proteína motora miosina, permite el transporte axonal de vesículas. La reducción en la expresión de proteínas relacionadas con la formación de los filamentos de actina y su organización en haces y redes funcionales indican claramente una desestructuración del citoesqueleto de actina en los cuerpos celulares de las neuronas del DRG debido del déficit de frataxina.

En su conjunto, todos los resultados descritos en este trabajo asociados con el citoesqueleto de actina, muestran que el déficit de frataxina causa la inestabilidad de las proteínas que regulan la actividad del citoesqueleto de actina en los cuerpos celulares y una desestructuración del citoesqueleto de actina en el axón asociada con la degeneración axonal de las neuronas del DRG.

Citoesqueleto de los microtúbulos

El análisis proteómico del ganglio dorsal mostró la reducción de 13 isoformas de tubulina, de las cuales 4 corresponden a los isotipos neuronales $\alpha 1$ y βIII (Tuba1a, Tuba1b, Tuba1c, Tuba3a, Tuba4a, Tuba8, Tubb2, Tubb3) (Ver Anexos, Tablas 8.4-8.8). Los microtúbulos se forman por la polimerización de dímeros α -tubulina y β -tubulina. En el genoma humano, hay 6 genes que codifican para α -tubulina y 7 genes para β -tubulina. En el sistema nervioso se expresan los isotipos 1, 2 y 4 de la α -tubulina, y los isotipos I, II, III, y IV de la β -tubulina. Adicionalmente, se encontró una reducción de proteínas de asociación a microtúbulos MAPs, MAP1A y MAP1B, necesarias para interconectar microtúbulos entre ellos y con otros componentes del citoesqueleto. Por último, la proteína *chaperona específica de Tubulina-E* (TBCE) resultó estar reducida. Muchas proteínas deben interactuar con chaperonas moleculares para alcanzar su conformación nativa. La reducción de la expresión de estas proteínas en los cuerpos celulares causaría una reducción en la provisión de microtúbulos al axón, alterando su dinámica y con ello alterando el transporte axonal mediado por las proteínas motoras quinesina y dineína.

Citoesqueleto de los filamentos intermedios

El análisis proteómico del ganglio dorsal mostró la reducción de 5 proteínas que forman filamentos intermedios. Éstas incluyen 4 subunidades que forman los neurofilamentos del sistema nervioso periférico, neurofilamento (NF) liviano, NF medio y NF pesado (Nefh, Nefl, Nefm) y periferina (Prph). Los neurofilamentos forman el mayor sistema de filamentos en las neuronas adultas, éstos se interconectan y entrelazan con los microtúbulos, los filamentos de actina y otros elementos fibrosos del citoesqueleto para establecer una red que sirve para organizar otras organelas y proteínas. También resultaron estar reducidas proteínas indispensables para la integración de los citoesqueletos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos (Dst, Plec).

Estos resultados sugieren que el déficit de frataxina causaría una disminución en la cantidad de NFs en los cuerpos celulares y en los axones de las neuronas del DRG, lo cual produciría una reducción proporcional del crecimiento radial de los axones (disminución del diámetro), de la conducción nerviosa y de la respuesta regenerativa intrínseca de los axones de las neuronas del DRG.

Proteínas relacionadas con la extensión y guía axonal

El análisis proteómico del ganglio dorsal mostró la reducción de 4 proteínas asociadas directamente con la extensión y guía axonal (Rufy3, Crmp1, Crmp2, Crmp3) (Ver Anexos, Tabla 8.9). La extensión y guía axonal es el proceso mediante el cual se forman las conexiones entre neuronas y entre neuronas y sus tejidos blanco. Cuando un axón esta creciendo o necesita regenerarse forma el cono de crecimiento, una estructura motorizada altamente sensitiva y exploradora, cuya función es dirigir el crecimiento del axón hacia su blanco (neurona o tejido), y después de llegar, permite reconocer y crear una sinapsis.

Una de las proteínas identificadas es Rufy3. Rufy3 es una proteína con especificidad neuronal que se distribuye en el cuerpo celular, el axón y los conos de crecimiento de las neuronas. Se expresa con altos niveles en neuronas en desarrollo y se regula a la baja con la edad. Interactúa con las proteínas de entrelazamiento de actina *Fascina* y *Debrina* para controlar la distribución de los filamentos de actina en el cono de crecimiento (241). Se ha demostrado que la ausencia de Rufy3 en neuronas de hipocampo de ratón (Rufy3 RNAi) resulta en axones más cortos y en un incremento de las neuronas multipolares, lo que evidencia su papel en el control del crecimiento y la polarización axonal.

Las otras proteínas identificadas son proteínas mediadoras de respuesta a colapsina (siglas en inglés *CRMPs*) (Crmp1, Crmp2/Dpysl2, Crmp3/Dpysl3). Actúan como fosfoproteínas de señalización modulando la organización del citoesqueleto y regulando la extensión y la retracción de las neuritas. Las CRMPs tienen afinidad para unirse a microtúbulos y a la actina filamentosa controlando su agrupamiento (242, 243). En el sistema nervioso la expresión de éstas proteínas es regulada a la alta durante el desarrollo embrionario, disminuyendo con la edad.

Estos resultados sugerían que el déficit de frataxina en el modelo YG8R podría estar alterando procesos axonales intrínsecos de las neuronas periféricas como lo es la regeneración axonal. La regeneración axonal requiere de la reactivación del proceso de extensión y guía axonal, que depende a su vez de la maquinaria reguladora del citoesqueleto de actina, microtúbulos y transporte axonal.

Proteínas asociadas al tráfico vesicular

El análisis proteómico del ganglio dorsal mostró la reducción de 5 proteínas necesarias para la formación de vesículas (Ver Anexos, Tablas 8.10, 8.12) y 2 proteínas motoras.

Entre las proteínas relacionadas con el tráfico vesicular identificadas están la clatrina, el componente α del complejo proteína adaptadora-2 y la dinamina-1, (Cltc, Ap2a2, Dnm1). En particular para el axón, el transporte de vesículas media el transporte de proteínas como receptores, canales iónicos, transportadores y moléculas de adhesión celular, fundamentales para su función.

Existen varios tipos de proteínas que revisten las vesículas, una de ellas es clatrina. Clatrina se adapta a otras proteínas como el complejo AP2 para formar las vesículas y transportar proteínas desde la membrana al endosoma (orgánulos delimitados por una única membrana de clatrina), en dónde la mayor parte del material es transferido a los lisosomas para su degradación (Figura 4.21). Por otra parte, dinamina, es una proteína fundamental para la formación de las vesículas revestidas de clatrina. Dinamina facilita la liberación de la vesícula de la membrana plasmática cuando la vesícula está madura.

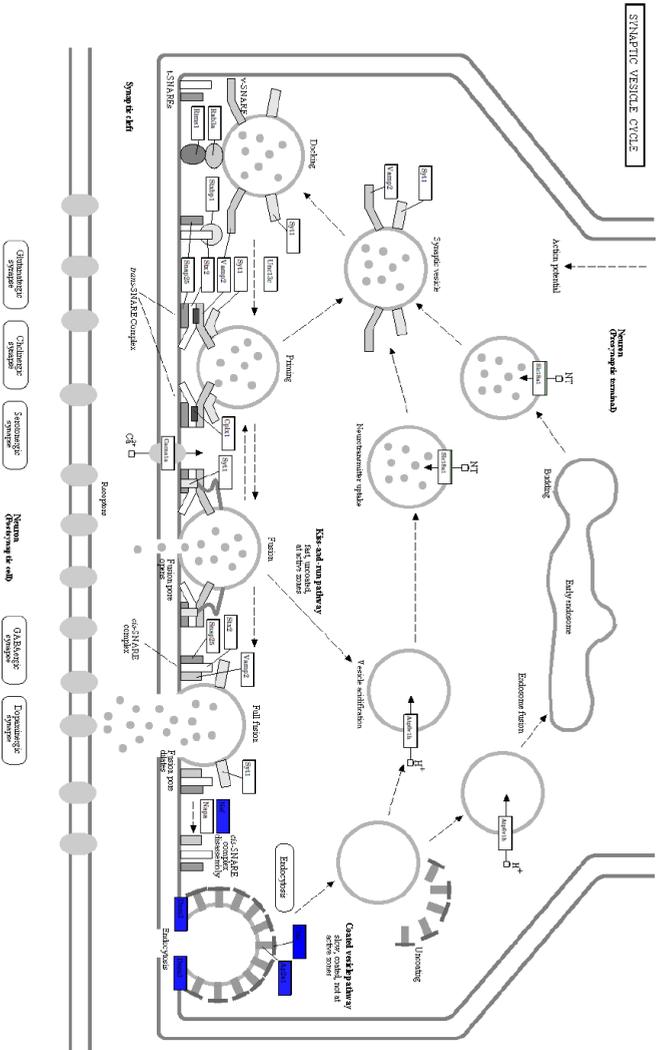


Figura 4.21: Proteínas identificadas en el ciclo de vesículas sinápticas. La vía de señalización del ciclo de vesículas sinápticas (VVs) de la base de datos KEGG muestra los episodios repetitivos de exocitosis y endocitosis en una terminal nerviosa. Las VVs son cargadas (arriba-izquierda), luego son acopladas (abajo-izquierda) y después liberan el neurotransmisor tras la llegada de un potencial de acción por exocitosis. Después de la fusión la vesícula se recupera por endocitosis y se vuelve a cargar para otra ronda de exocitosis. Se resalta en azul las proteínas que han aparecido disminuidas en el ganglio dorsal del ratón YG8R.

Proteínas requeridas para el transporte axonal

Las proteínas **motoras** permiten el movimiento de organelas y otras estructuras en las células a través de los filamentos de actina (miosina) y los microtúbulos (kinesina, dineína). En este trabajo se detectó la reducción de dos clases de Miosinas (Myh10, Myh9) y tres isoformas de la quinesina-5 (Kif5a, Kif5c, Kif5b) (Ver Anexos, Tablas 8.10, 8.12).

Las miosinas son un tipo de motor molecular (convierte energía química en forma de ATP en energía mecánica, generando fuerza y movimiento) que se mueve a través de los filamentos de actina. Myh10 y su parálogo Myh9 (*Myosin heavy chain*) son miosinas de tipo no muscular. Poco o nada es conocido sobre su relación con enfermedades que afectan al sistema nervioso.

Las quinesinas junto a las dineínas son las proteínas motoras que se mueven a lo largo de los microtúbulos impulsadas por la hidrólisis de ATP y median el transporte anterógrado en las neuronas. El complejo quinesina-5 (KIF5) transporta las vesículas que contienen varias cargas a lo largo de los axones, como proteína precursora amiloide (siglas en inglés APP) junto a enzimas que participan su procesamiento, el receptor-2 de apolipoproteína E (APOER2), mitocondrias y tubulina oligomérica (asociación de dímeros de tubulina). Estos resultados sugieren que el déficit de frataxina en el modelo YG8R podría estar alterando el suministro de proteínas del citoesqueleto y organelas a los axones de las neuronas del DRG debido a la ausencia de KIF5 en los cuerpos celulares del DRG.

4.2 Estudio in vivo de la dinámica del crecimiento axonal en neuronas del ganglio dorsal del modelo murino YG8sR para la ataxia de Friedreich

Llegados a este punto, con los resultados obtenidos podíamos afirmar que el déficit de frataxina en las neuronas sensitivas del modelo YG8R causaba una alteración de la organización y la dinámica del citoesqueleto. Por lo tanto, nos pareció interesante comprobar si las alteraciones en la extensión axonal, la morfología y estructura molecular de los conos de crecimiento de las neuronas sensitivas adultas podrían afectar a la guía axonal. La alteración de la guía axonal induciría la aparición de modificaciones aberrantes en la inervación de los axones sensitivos a sus tejidos diana, provocando una patología axonal que las neuronas lograrían sobrellevar durante algún tiempo, pero que sumado a otros

factores externos como el incremento del estrés oxidativo, sería insostenible y terminaría con la degeneración del axón y la muerte de las neuronas.

El proceso de extensión y guía axonal es dirigido por la función del cono de crecimiento, la cual depende de la organización y la dinámica del citoesqueleto de actina y microtúbulos. La principal fuente de energía que suple a los procesos dinámicos del citoesqueleto es la mitocondria, por lo tanto la formación del cono y su motilidad exige un suministro y una distribución adecuada de la red mitocondrial. Por otra parte, los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ son importantes para regular la formación y la motilidad del cono de crecimiento a través de la regulación del citoesqueleto de actina y microtúbulos, y la liberación de ATP de la mitocondria. La mitocondria es capaz de localizarse en compartimientos subcelulares donde se requiere la liberación de Ca^{2+} o su tamponamiento. De modo interesante, se ha demostrado que los niveles fisiológicos de las especies reactivas de oxígeno (ROS) regulan el ensamblaje de la actina filamentososa en los conos de crecimiento neuronales y durante la extensión axonal (55).

Previamente en nuestro laboratorio se ha demostrado que la reducción de frataxina en un modelo de silenciamiento celular causaba una disfunción en el metabolismo energético mitocondrial (un déficit en la producción de ATP) (169). Además, en el modelo YG8R para la FRDA se demostró que el déficit de frataxina en las neuronas sensitivas del DRG causaba una disfunción mitocondrial, un aumento de producción de ROS y un aumento del $[Ca^{2+}]_i$ (200).

Los experimentos de guía axonal los realizamos en un nuevo modelo de murino disponible en ese momento en el laboratorio, el ratón YG8sR. La base de este ratón es igual que el modelo YG8R, un ratón knock-out para la frataxina murina con presencia de un transgén que contiene el gen humano *FXN* con la expansión GAA patológica. La diferencia es que dicha expansión es mayor y por tanto la expresión de frataxina se ve más reducida que en el ratón YG8R. Este ratón exhibe una patología progresiva como en la FRDA. Como ratón control utilizamos el ratón Y47R.

Análisis visual de las neuronas sensitivas del ganglio dorsal en cultivo

Para determinar si el déficit de frataxina producía cambios aberrantes en la morfología de las neuronas y la dinámica de los conos de crecimiento decidimos analizar in vivo el crecimiento de un cultivo primario de las neuronas sensitivas de los ratones YG8sR y control Y47R mediante ensayos de time-lapse con un microscopio de contraste de fases (ver sección 3.2.1). Se analizaron los cultivos

de neuronas sensitivas de ratones con distintas edades a 2, 6 y 9 meses de edad tras 14-16 horas de cultivo. Se adquirieron imágenes de contraste de fases con condiciones de in-vivo de al menos 100 neuronas sensitivas por cada una de tres replicas biológicas (ratones N=3) por edad (2,6,9 meses) y genotipo (control Y47R, YG8sR).

Primero analizamos las imágenes para determinar si las neuronas sensitivas de los ratones YG8sR exhibían cambios aberrantes en la morfología neuronal y en los conos de crecimiento. En estos cultivos se observaron todas las subpoblaciones neuronales del ganglio dorsal en varias etapas del crecimiento: (a) Formación de las neuritas: el soma libera proteínas del citoesqueleto y forma conos de crecimiento gigantes con una actividad protrusiva intensa del lamelilopodio y el filopodio, que llevan a la formación de múltiples neuritas inmaduras. (b) Polarización: aparecen neuritas más largas con conos de crecimiento más pequeños, los cuales exhiben la estructura típica de conos de crecimiento de tipo disperso; (c) Extensión axonal y ramificación: las neuritas de neuronas inmaduras extienden axones y construyen ramificaciones, con mayor presencia de conos de crecimiento por neurona y con un tamaño más reducido (Figura 4.22).

A los 2 meses de edad, las neuronas sensitivas del ratón control Y47R y el ratón YG8sR fueron capaces de formar neuritas y axones sanos (se asume como axón la neurita más larga) en el cultivo (Figura 4.22). Se observaron algunos cambios morfológicos en los extremos distales de las neuritas del ratón YG8sR como la presencia de estructuras en forma de esferoides y barras, que estaban ausentes en los cultivos del ratón control.

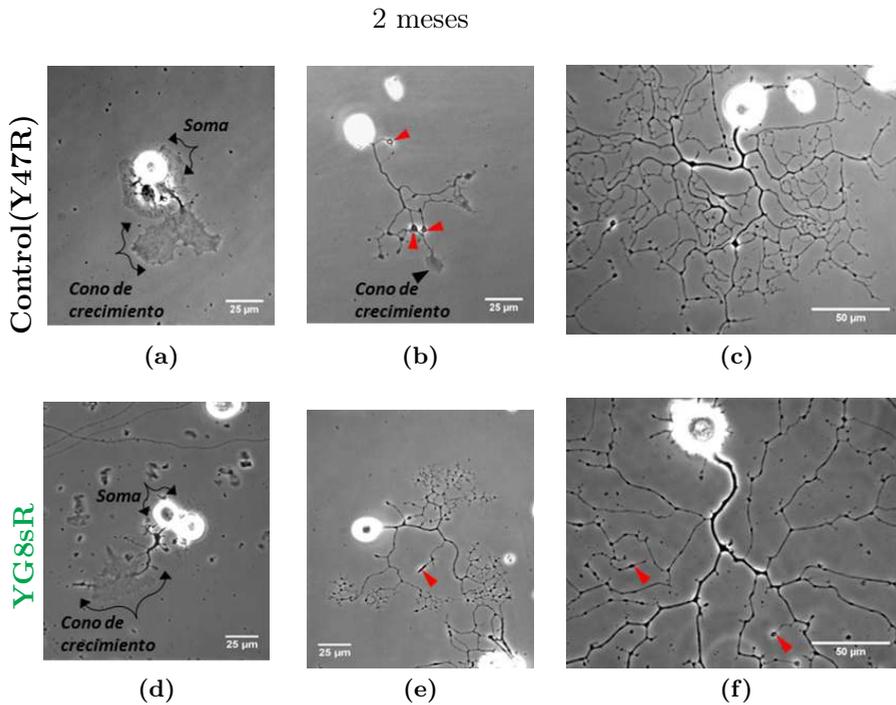


Figura 4.22: Comparación del crecimiento axonal in vitro de las neuronas del DRG a los 2 meses de edad. (a-f) De izquierda a derecha, las imágenes muestran tres etapas secuenciales de crecimiento axonal de las neuronas adultas del DRG de los ratones YG8sR y control Y47R con 2 meses de edad. Las imágenes fueron adquiridas tras 12-14 horas de cultivo en placas tipo glass bottom. (a,d) Formación de las neuritas, (b,e) Polarización, (c,f) extensión axonal y ramificación. El cuerpo celular (soma) y el cono de crecimiento se resaltan (corchetes y flechas negras). Las flechas rojas indican algunas estructuras esféricas y elipsoidales en los extremos distales de las neuritas. Barra de escala 25 μm .

A los 6 meses de edad, al igual que a los 2 meses de edad, la mayoría de las neuronas sensitivas del ratón control Y47R y el ratón YG8sR lograron extender sus axones (Figura 4.23, arriba). En esta edad se observaron algunos cambios morfológicos a lo largo de las neuritas del ratón YG8sR como la presencia de estructuras en forma de esferoides y que estaban presentes en los cultivos del ratón control Y47R pero visiblemente mas pequeños (Figura 4.23, flechas rojas).

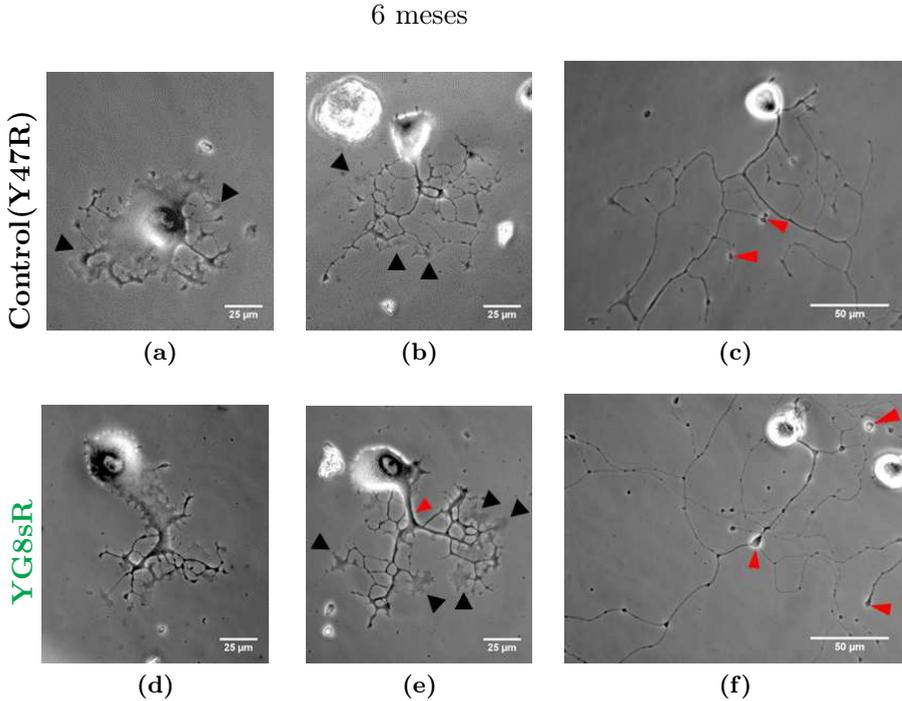


Figura 4.23: Comparación del crecimiento axonal in vitro de las neuronas del DRG a los 6 meses de edad. (a-f) De izquierda a derecha, las imágenes muestran tres etapas secuenciales de crecimiento axonal de las neuronas adultas del DRG de los ratones YG8sR y control Y47R con 6 meses de edad. Las imágenes fueron adquiridas tras 12-14 horas de cultivo en placas tipo glass bottom. (a, d) Formación de las neuritas, (b, e) Polarización, (c, f) extensión axonal y ramificación. El cuerpo celular (soma) y el cono de crecimiento se resaltan (corchetes y flechas negras). Las flechas rojas indican algunas estructuras esféricas y elipsoidales en los extremos distales de las neuritas. Barra de escala 25 μm .

A los 9 meses de edad, se percibió que un menor número de neuronas sensitivas del ratón control Y47R y el ratón YG8sR extendieron sus axones en el cultivo cuando se comparó con lo observado en los cultivos de 2 y 6 meses de edad. A diferencia de las observaciones previas en los cultivos de 2 y 6 meses de edad, en estos cultivos no se observaron cambios morfológicos considerables a lo largo de las neuritas del ratón YG8sR. En general, cuando comparamos entre los genotipos (control Y47R, YG8sR) en 2, 6 y 9 meses de edad, la mayoría de las neuronas sensitivas del ratón YG8sR en los cultivos lograron iniciar la formación de neuritas y extender ramificaciones bien definidas, presentando

algunos cambios morfológicos a lo largo y en el extremo mas distal de las neuritas.

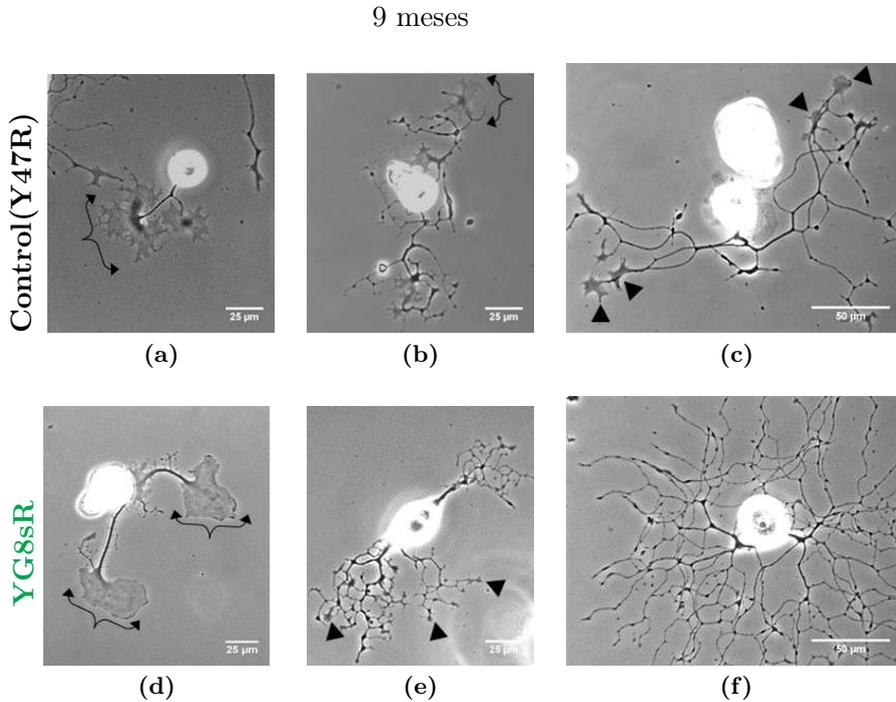


Figura 4.24: Comparación del crecimiento axonal in vitro de las neuronas del DRG a los 9 meses de edad. (a-f) De izquierda a derecha, las imágenes muestran tres etapas secuenciales de crecimiento axonal de las neuronas adultas del DRG de los ratones YG8sR y control Y47R con 9 meses de edad. Las imágenes fueron adquiridas tras 12-14 horas de cultivo en placas tipo glass bottom. (a, d) Formación de las neuritas, (b, e) Polarización, (c, f) extensión axonal y ramificación. El cuerpo celular (soma) y el cono de crecimiento se resaltan (corchetes y flechas negras). Las flechas rojas señalan los signos de degeneración axonal: puntos de acumulación. Barra de escala 25 μ m.

4.2.1 *El déficit de frataxina en las neuronas sensitivas del ratón YG8sR altera la morfología de los conos de crecimiento*

Con el propósito de identificar cambios en la morfología de los conos de crecimiento de neuronas vivas se midió el área, el diámetro de Feret y parámetros de forma como la circularidad, redondez y la solidez de los conos de crecimiento de las neuronas sensitivas del ratón YG8sR con 2, 6 y 9 meses de edad

(Figura 4.25, 4.26). Estos parámetros están descritos en material y métodos (Figura 3.2.12). El cono de crecimiento se seleccionó manualmente siguiendo el contorno, incluyendo el lamelipodio y el filopodio, y se obtuvieron las medidas utilizando el Software Fiji/ImageJ (N.I.H).

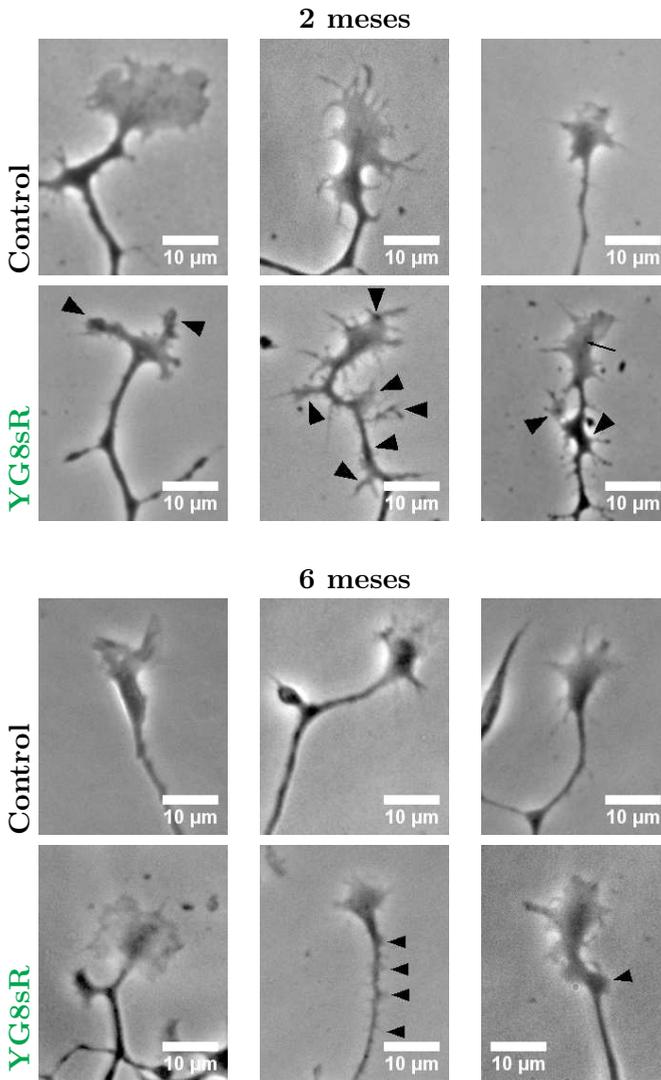


Figura 4.25: La morfología de los conos de crecimiento varía en neuronas del DRG adultas de ratones YG8sR a los 2 y 6 meses de edad. Se muestran imágenes de contraste de fases de conos de crecimiento en las neuronas del DRG de los ratones Control(Y47R) e YG8sR. Las imágenes fueron adquiridas con condiciones de in vivo tras haber sido cultivadas durante 14-16 horas. Se resaltan signos de una arquitectura aberrante de la actina filamentososa en los conos de crecimiento y en el extremo más distal de la neurita (flechas negras). Barra de escala 10 μm.

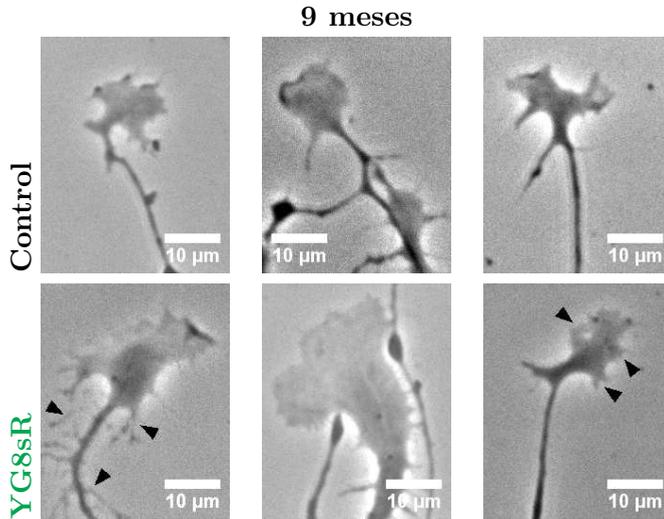


Figura 4.26: La morfología de los conos de crecimiento varía en neuronas del DRG adultas de ratones YG8sR a los 9 meses de edad. Se muestran imágenes de contraste de fases de conos de crecimiento en las neuronas del DRG de los ratones Control(Y47R) e YG8sR. Se puede observar una arquitectura aberrante de la actina filamentosa que se evidencian por la forma desorganizada del filopodio en los conos y en el segmento axonal que el cono va construyendo (flechas negras). Las imágenes fueron adquiridas con condiciones de in vivo tras haber sido cultivadas durante 14-16 horas. Barra de escala 10 μm .

Cuando comparamos los descriptores de la forma entre genotipos YG8sR y control Y47R a los 2 meses de edad, observamos que los conos de crecimiento de las neuronas sensitivas del ratón YG8sR formaban conos de crecimiento más pequeños (Figura 4.28, a), más circulares (Figura 4.28, b) y con una geometría más sólida (Figura 4.28). Cuando comparamos los descriptores de la forma entre genotipos a los 6 meses de edad no se detectaron diferencias, recuperándose las diferencias a los 9 meses de edad únicamente para el diámetro de Feret. Estos resultados muestran que con la edad las diferencias morfológicas observadas a los 2 meses tienden a perderse con la edad.

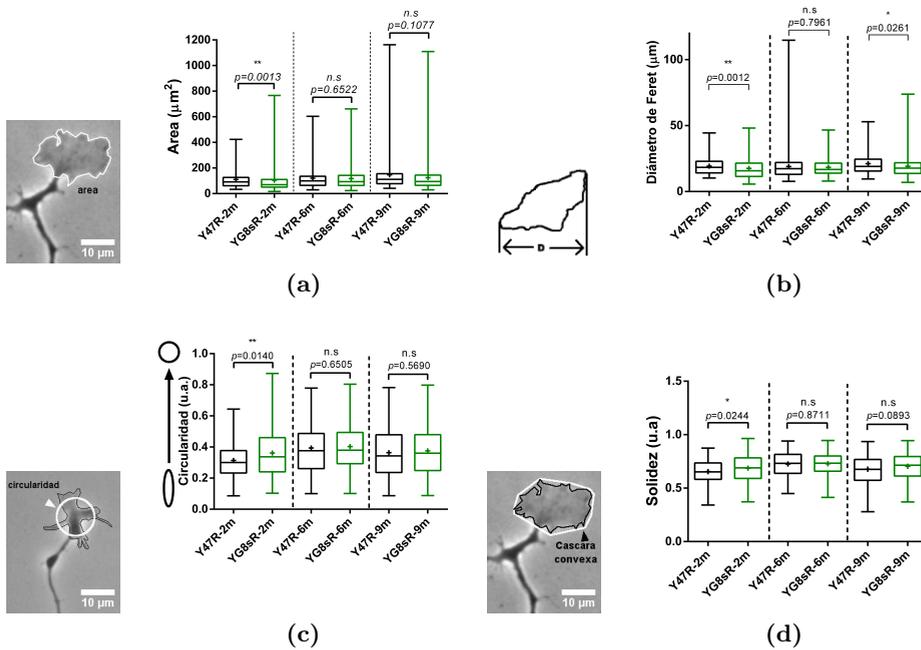


Figura 4.27: Parámetros de medida para conos de crecimiento del ratón YG8R con 2, 6 y 9 meses. El cono de crecimiento se delimito con la herramienta polígono del software Fiji/ImageJ (N.H.I) y se obtuvieron los parámetros de forma:área (a), el diámetro de Feret (b), la circularidad (c) y la solidez (d). En los gráficos se muestran los valores de la mediana (barra intermedia en la caja) y la media (+). Las comparaciones entre genotipo YG8sR y control Y47R se realizaron mediante el test de Mann Whitney. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, (n=105-179 conos de crecimiento de tres experimentos independientes).

4.2.2 *Los conos de crecimiento de las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8sR exhiben una dinámica aberrante*

La dinámica y las actividades motiles y sensitivas de los conos están relacionadas con su morfología. Cuando un cono de crecimiento gira, un comportamiento fundamental para la guía axonal, el citoesqueleto de actina y microtúbulos del cono necesita interactuar y reorganizarse rápidamente. La organización del citoesqueleto en el cono de crecimiento responde a varias vías de señalización mediadas principalmente por Ca^{2+} y por las proteínas RhoGTPasas. Para determinar si la ausencia de frataxina en las neuronas sensitivas del ratón YG8sR podría estar induciendo cambios en el comportamiento de los conos de creci-

miento analizamos los ángulos de giro y la velocidad de desplazamiento de los conos de crecimiento mediante experimentos *time lapse* con microscopia de contraste de fases (Figura 4.28).

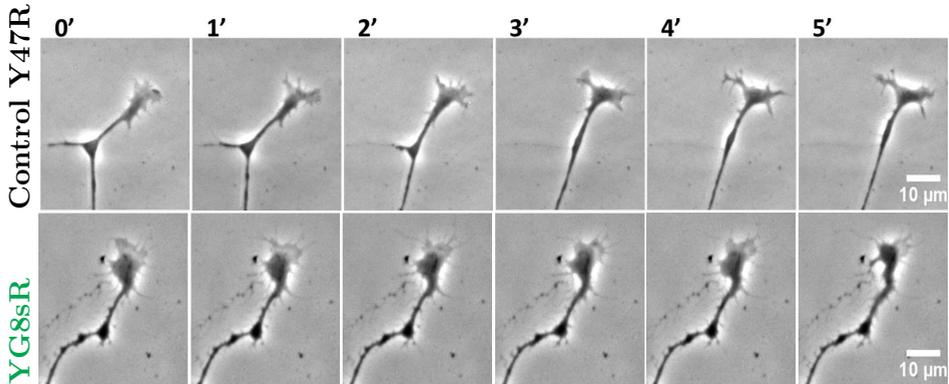


Figura 4.28: Secuencia de recuadros (1 min separados) de los experimentos *time lapse* de los conos de crecimiento de neuronas sensitivas adultas. Las imágenes se adquirieron a partir del cultivo primario de los ratones YG8sR y control Y47R con 2 meses de edad. Barra de escalas: 10 μm . Para ver los vídeos acceder a https://www.youtube.com/playlist?list=PLoR0L7ERjSj0k_MS8TMkMvxwo5C1djsaS.

Para los experimentos de *time lapse* se adquirieron imágenes de los conos de crecimiento cada 30 segundos durante 1 hora con un microscopio de contraste de fases utilizando el software Axiovision de Zeiss. Para obtener las medidas se registraron conos de crecimiento activos (forma dispersa). Posteriormente, se aislaron las secuencias de imágenes del *time-lapse*, aislando los conos de crecimiento y se rotaron de tal forma que la base del cono quedara perpendicular al eje x, y orientado hacia el centro o la derecha (Figura 4.29, a). La base del cono se siguió y se marco su posición manualmente con el plugin MTrackJ. El marcaje de la posición de la base del cono se realizó cada 5 minutos (230). Cuando comparamos entre genotipos a los 2 meses de edad, se observó que los conos de crecimiento de las neuronas sensitivas del ratón YG8sR se movían con una menor velocidad, recorrían menos distancias que los del ratón control Y47R (Figura 4.29, b, c). Además, los ángulos de giro mostraron que los conos del ratón YG8sR giraban predominantemente paralelos al eje x (horizontalmente) y los ángulos del ratón control giraban paralelos al eje x y al eje y (verticalmente), sugiriendo una alteración de la trayectoria de crecimiento (Figura 4.29, d).

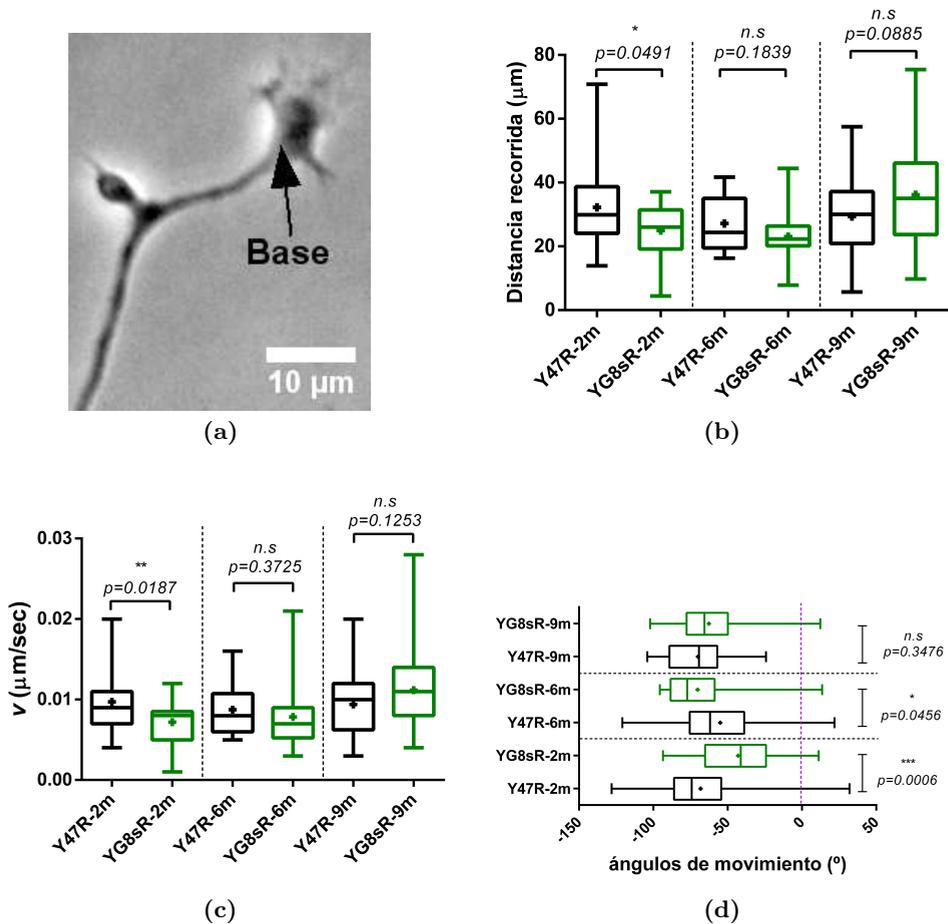


Figura 4.29: La dinámica de los conos de crecimiento está alterada en las neuronas del DRG del ratón YG8sR. (a) Imagen del cono de crecimiento adquirida con un microscopio con contraste de fases. Se señala con una flecha negra la base del cono, la cual es perpendicular al eje x y con el cono dirigido hacia la derecha. Todos los time lapse de los conos fueron orientados en esta posición para evadir variabilidad. Barra de escala 10 µm. (b-d), Gráfico de caja y bigotes que muestra la mediana y la media (+) de los valores obtenidos para la distancia recorrida (b), la velocidad promedio (c) y la oscilación (ángulos de movimiento) (d) de los conos de crecimiento del ratón control Y47R e YG8sR con 2, 6 y 9 meses de edad. Se analizaron $n=25$ conos de crecimiento de tres experimentos independientes por genotipo (control Y47R/YG8sR). La comparación entre genotipos se realizó mediante la prueba U de Mann Whitney. *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$.

4.2.3 *Estudio de la dinámica de la morfología del cono de crecimiento mediante análisis de componentes principales (PCA) y cálculo tensorial*

Hasta éste momento el análisis de la morfología del cono de crecimiento utilizando el software de ImageJ nos había desvelado como la falta de frataxina promovía alteraciones en su forma. Además, el análisis de la dinámica del cono con la herramienta de rastreo MTrackJ nos permitió identificar una alteración del comportamiento del cono en las neuronas sensitivas del ratón YG8sR. En ambos casos, los cambios observados se daban a los 2 meses de edad, perdiéndose estas diferencias a medida que se incrementaba la edad. Debido a que el rastreo de la dinámica del cono se realizó siguiendo la base del cono se perdía mucha información relacionada con el comportamiento de la morfología del cono. Con el propósito de integrar ambos factores, la morfología y la dinámica del cono de crecimiento, utilizamos dos aproximaciones novedosas para analizar los patrones de movimiento de los conos teniendo en cuenta la morfología del cono de crecimiento.

Método de componentes principales

El primer método es un análisis de componentes principales (análisis eingenshape) que provee información cuantitativa acerca del comportamiento del cono de crecimiento. Este análisis se adaptó a partir del método propuesto por Goodhill y col. (231), con modificaciones optimizadas para nuestros datos. Para realizar este análisis se necesitaba binarizar (segmentar) todas las imágenes de los experimentos time-lapse (Tabla 4.1), por lo que se creó una plataforma semi-automatizada con el software MATLAB(MathWorks) para optimizar el procesamiento de las imágenes.

Edad (meses)	Genotipo	No. Exp. <i>Time-Lapse</i> analizados	No. total de imágenes
2	control	40	4800
	Y47R	19	2280
	YG8sR		
6	control	28	3360
	Y47R	22	2640
	YG8sR		
9	control	25	3000
	Y47R	37	4440
	YG8sR		

Tabla 4.1: Resumen experimentos Time Lapse de los conos de crecimiento. Se adquirieron 4 experimentos *time-lapse* para cada uno de los 3 ratones por genotipo y edad. Los experimentos *time-lapse* contenían al menos 2 y máximo 4 conos de crecimiento activos.

Cuando comparamos los componentes principales 1 y 2 a los 2 meses de edad, los conos de los ratones control Y47R exhibieron un gran número de trayectorias definidas desde el inicio, indicando una alta actividad sensitiva y exploratoria de los conos. Sin embargo, los conos de crecimiento del ratón YG8sR exhibieron patrones de movimiento con trayectorias desorganizadas y menor desplazamiento comparadas a las del control Y47R (Figura 4.30, a). A los 6 meses de edad, los conos de crecimiento del ratón YG8sR exhibieron patrones de movimiento desorganizados pero no tan distintos de los exhibidos por los conos del control Y47R (Figura 4.30, b). Resultó evidente una dispersión de las trayectorias sugiriendo una disminución en la alta actividad sensitiva y exploratoria de los conos. A los 9 meses de edad, los conos de crecimiento del ratón control YG8sR exhiben trayectorias más organizadas que a los 2 y 6 meses de edad, tendiendo a ser similares a las del control Y47R en los 2 meses de edad (Figura 4.30, c). Los conos del ratón control Y47R exhibieron un movimiento con menos trayectorias, sugiriendo una menor actividad sensitiva y exploratoria de los conos. Los conos de crecimiento del ratón YG8sR a los 9 meses de edad no se definen desde el inicio, en cambio en el ratón control se observan trayectorias definidas desde el inicio.

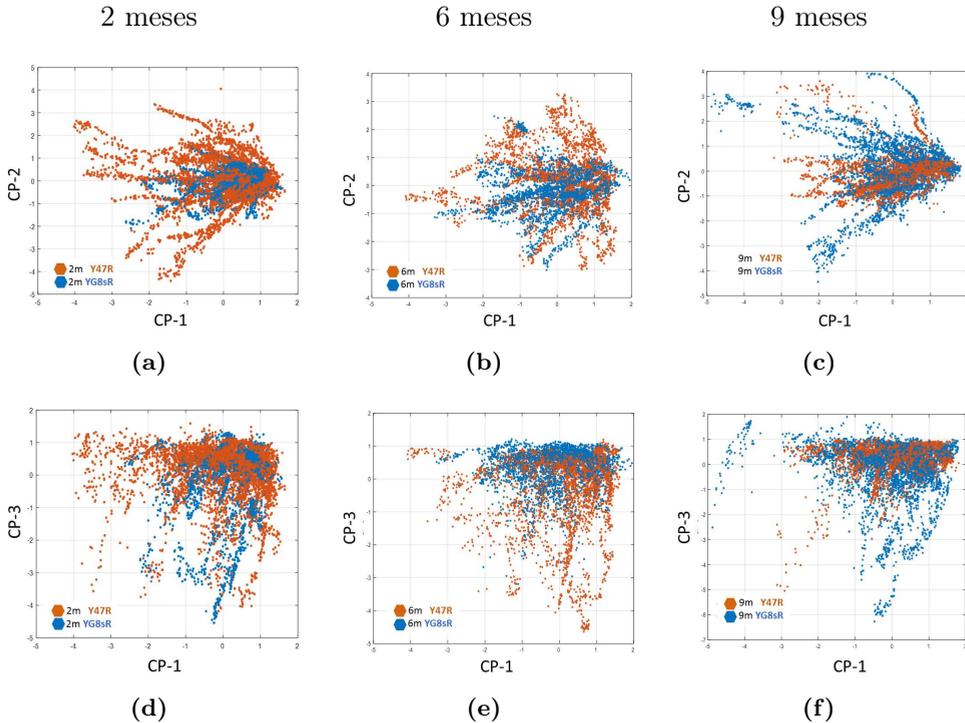


Figura 4.30: Gráfica de comparación de los componentes principales del movimiento de los conos de crecimiento del ratón YG8sR ($CP1 \perp CP2$) y el control Y47R ($CP1 \perp CP2$). Se ilustra la comparación de los componentes principales para el ratón YG8sR (azul) y control Y47R (anaranjado) a los 2 (a,d), 6 (b,e) y 9 meses de edad (c,g). Las continuidades de puntos indican trayectorias de crecimiento definidas de los conos de crecimiento, por lo tanto, entre mas dispersos están los puntos en las gráficas se considera que hay menos trayectorias de crecimiento. Las longitudes de las trayectorias indican que tanto se desplazaron los conos desde su posición inicial hasta la posición final. (a-c) Gráficas de comparación de los componentes 1 y 2 ($CP1 \perp CP2$). Observar que los conos de crecimiento del ratón control Y47R pierden trayectorias con la edad, estas se vuelven más dispersas a 6 y 9 meses, indicando la pérdida de la capacidad del cono para dirigir el crecimiento axonal. En el caso del ratón YG8sR, se observan muy pocas trayectorias de movimiento a los 2 meses de edad, y aumentan a los 6 y 9 meses de edad, pero éstas son bastante más dispersas que las del ratón control Y47R, sugiriendo una afectación de la capacidad del cono para dirigir el crecimiento axonal en estas neuronas. (d-f). Gráficas de comparación de los componentes 1 y 3 ($CP1 \perp CP3$).

Para confirmar si otros componentes principales arrojaban información adicional del comportamiento de los conos del ratón YG8sR comparamos los compo-

nente 1 con la 3 (Figura 4.30, d-f). Al hacerlo se observó que el comportamiento de los conos nuevamente se pueden diferenciar entre el ratón control Y47R y el ratón YG8sR. Se observó que los conos de crecimiento del ratón YG8sR exhibieron patrones de movimiento similares a las observadas cuando comparamos los componentes 1 y 2 (Figura 4.30, a-c). A los 2 y 6 meses de edad los conos de los ratones control Y47R exhibieron un gran número de trayectorias definidas desde el inicio, indicando una alta actividad sensitiva y exploratoria de los conos (Figura 4.30,d,e). A los 9 meses de edad, los conos de crecimiento del ratón YG8sR exhiben trayectorias más organizadas que a los 2 y 6 meses de edad (Figura 4.30, f). En general, los conos del ratón control Y47R exhibieron un movimiento con menos trayectorias definidas que las observadas cuando comparamos los componentes 1 y 2, mostrando una gran variabilidad en la actividad sensitiva y exploratoria de los conos. En cambio, los conos de crecimiento del ratón YG8sR presentaron poca variabilidad en el comportamiento de los conos a 2 y 6 meses pero la variabilidad incrementa a los 9 meses de edad

Estos resultados muestran un comportamiento diferencial de los conos de crecimiento de las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8sR a 2, 6 y 9 meses de edad. Interesantemente, se detecto una gran diferencia en la dinámica del cono a los 2 meses de edad. Estas observaciones coincidían con una velocidad de desplazamiento reducida, una morfología alterada y diferencias en los ángulos de giro de los conos mostradas previamente en este trabajo. Con estos resultados pudimos concluir que la dinámica del cono de crecimiento estaba siendo alterada en las neuronas sensitivas por el déficit de frataxina, proceso muy importante en las neuronas durante la etapa del desarrollo neuronal.

Uso de tensores para el reconocimiento de los patrones de movimiento del cono de crecimiento

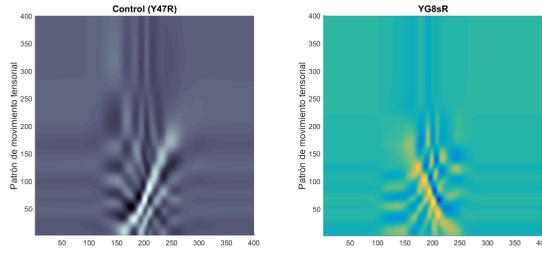
El segundo método es el reconocimiento de los patrones de movimiento usando tensores. Cada una de las imágenes segmentadas tiene coordenadas horizontales y verticales, y puede ser descrita matemáticamente como una matriz o un arreglo bidimensional (2D). Si se considera el tiempo una coordenada temporal, se incluye para la representación matemática del experimento en la forma de un arreglo tridimensional o tensor, el cual es una generalización de vectores y matrices desde la álgebra lineal. Adicionalmente, si se consideran múltiples experimentos (e.j. 2 genotipos y 3 edades), se puede incorporar una coordenada extra para los experimentos, y un tensor 4D con la imagen, coordenadas de experimentos y tiempo. Este análisis extrae los patrones más relevantes de la dinámica de los conos de crecimiento de las neuronas sensitivas del ratón

YG8sR y control Y47R a los 2, 6 y 9 meses de edad. El grupo de datos fueron los mismos utilizados para el método basado en PCA (Tabla 4.1).

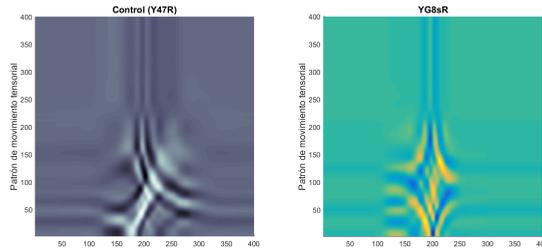
Los patrones de movimiento del cono de crecimiento más relevantes obtenidos a partir del análisis tensorial se muestran en la Figura 4.31. A los dos meses de edad, se observó que el patrón de movimiento de los conos de crecimiento de las neuronas sensitivas de los ratones control Y47R fue mayormente unidireccional (vertical), mientras que el de los ratones YG8sR, fue un patrón de movimiento combinado (vertical y horizontal), exhibiendo una alteración de la actividad exploratoria del cono de crecimiento ó de la guía axonal. Estos resultados se relacionaban con los resultados obtenidos mediante el PCA y la morfología aberrante de los conos de crecimiento observada en los ratones YG8sR a los 2 meses de edad.

Para las otras edades, 6 y 9 meses, se observó que los conos de crecimiento de las neuronas sensitivas de los ratones YG8sR tendían a presentar patrones de movimiento más homogéneos y similares al ratón control Y47R, contrario a lo observado en 2 meses de edad y coincidiendo con los resultados obtenidos mediante el PCA.

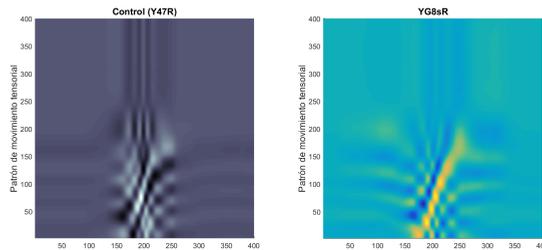
Aunque los resultados mostraron una clara diferencia de los patrones de movimiento entre los dos genotipos para todas las edades, resultó bastante llamativo el patrón de recuperación del comportamiento de los conos de crecimiento del ratón YG8sR con el incremento de la edad. Esta tendencia se observó tanto en los dos análisis aplicados aquí, PCA y tensores, como en todas las observaciones realizadas anteriormente.



(a) Patrones de movimiento conos 2 meses



(b) Patrones de movimiento conos 6 meses



(c) Patrones de movimiento conos 9 meses

Figura 4.31: Gráfica de los principales patrones de movimiento tensoriales de los conos de crecimiento. Los principales componentes indican los principales patrones de movimiento de todos los puntos que forman el cono de crecimiento incluyendo el segmento axonal que va construyendo en el tiempo. Estos patrones se ven en las gráficas como líneas continuas que resaltan sobre el color del fondo. Las líneas inician en la parte baja-central de las imágenes (posición inicial de los conos en el $t=0$) y se dirigen hacia la derecha, izquierda ó arriba en las imágenes con diferentes ángulos (posición final de los conos en el $t=60$ min). Cuando se comparan los componentes principales del ratón YG8sR (derecha) y el control Y47R (izquierda) a los 2 meses de edad, el análisis muestra que los patrones de movimiento de los conos del ratón YG8sR (amarillo y azul) son distintos de los del control, presentando patrones de movimiento más cortos y dirigidos hacia la derecha o izquierda (horizontales). A los 6 meses, comparado con el control, los patrones de movimiento de los conos del ratón YG8sR son más heterogéneos y más cortos, presentando patrones de movimientos hacia la derecha e izquierda (horizontales) y hacia arriba (verticales). A los 9 meses, los patrones de movimiento de los conos son similares entre los genotipos.

4.3 Fenómeno de dying-back en la ataxia de Friedreich: estudio de cambios estructurales en el axón

Con el propósito de comparar la capacidad de crecimiento axonal de las neuronas sensitivas entre los dos genotipos, decidimos analizar el área total de la red axonal para los dos genotipos a 2, 6 y 9 meses de edad. Las neuronas sensitivas se aislaron del ganglio dorsal de los ratones YG8sR y control Y47R con 2, 6 y 9 meses de edad, y se sembraron igual cantidad de neuronas (30×10^3) en cámaras de cultivo compartimentalizadas, denominadas microfluídicas. Cómo se explica en el apartado de material y métodos (ver 3.2.1), las cámaras disponen de dos zonas, y en una de ellas se siembran las neuronas. Gracias a un gradiente de neurotrofinas se consigue que a medida que crecen los axones sean capaces de atravesar los canales que dan paso a la segunda área de cámara. Se permitió que las neuronas crecieran durante 5 días.

Al analizar la morfología y la densidad de los cuerpos celulares de la zona soma, no se observaron alteraciones evidentes cuando comparamos entre genotipos en todas las edades. A los 2 meses de edad, se observó que las neuronas del ratón control Y47R exhibían una alta capacidad de extensión axonal y lograron crecer sus axones dentro de la cámara AXÓN. En cambio, pocas neuronas del ratón YG8sR atravesaron sus axones a través de los microcanales y casi no se observa la red axonal, sugiriendo una reducción en la capacidad de respuesta al gradiente de neurotrofinas que impulsa el cruce de los axones hacia la zona axonal (Figura 4.32, b-izquierda). Estas observaciones se confirmaron con la reducción significativa del área ocupada por la red axonal (Figura 4.32, c).

A 6 meses de edad, comparando con las neuronas sensitivas del ratón control Y47R, pocas neuronas del ratón YG8sR atravesaron sus axones a través de los microcanales y casi no se observa la red axonal, sugiriendo una reducción en la capacidad de respuesta al gradiente de neurotrofinas que impulsa el cruce de los axones hacia la zona axonal (Figura 4.32, b-centro). Estas observaciones se confirmaron con la reducción significativa del área ocupada por la red axonal (Figura 4.32, c).

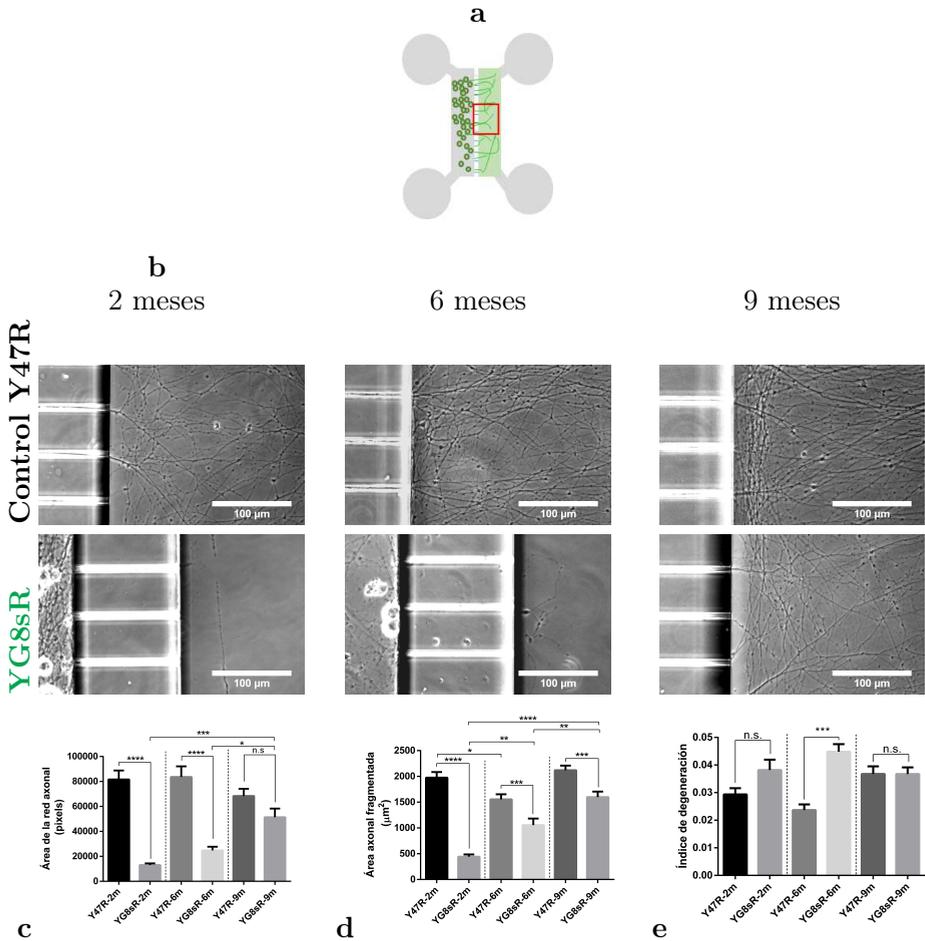


Figura 4.32: La capacidad de extensión axonal de las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8sR está reducida. (a) Esquema de una cámara microfluídica, el cuadrado en rojo muestra un ejemplo de dónde se adquirieron las imágenes de contraste de fases. (b) Imágenes representativas de las redes axonales en la cámara AXÓN en el 5DIV (antes de cortar los axones) para tres edades (2, 6 y 9 meses). Las neuronas sensitivas del ratón YG8sR exhiben una red axonal reducida comparada a la observada en el control Y47R. Barra de escala, $100 \mu\text{m}$. Las gráficas de barras muestran los valores obtenidos para el área total cubierta por la red axonal (c), el área fragmentada (d), y el índice de degeneración axonal en la cámara AXÓN a los 2, 6 y 9 meses de edad (5DIV). (d). Los gráficos de barras muestran la media \pm el error estándar de la media (SEM) de al menos 30 campos aleatorios de tres experimentos independientes ($N=3$ genotipo/edad). La significancia de las diferencias entre genotipo y edades se evaluó mediante la prueba ANOVA simple y el test *post-hoc* de Holm-Sidak para las comparaciones múltiples. ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$.

A 9 meses de edad, de forma llamativa la mayoría de las neuronas del ratón YG8sR lograron cruzar sus axones a través de los microcanales similar a lo observado en el ratón control Y47R, el cual mantuvo su capacidad para extender y formar redes axonales robustas en la zona axón de la cámara microfluídica (Figura 4.32, b-derecha), sugiriendo que los axones de las neuronas YG8sR responden mejor al gradiente neurotróficos en esta edad. Cuando observamos las redes axonales del ratón YG8sR se logra distinguir la ausencia de patrones lineales de los axones (desde izquierda a la derecha) que si se observan en el ratón control Y47R. Al cuantificar y comparar entre genotipos el área de las redes axonales éstas diferencias no resultaron ser significativas (Figura 4.32, c), indicando de nuevo que las neuronas del ratón YG8sR responden mucho mejor al gradiente neurotrófico a los 9 meses de edad.

Cuando comparamos la capacidad de crecimiento axonal de las neuronas sensitivas del ratón control Y47R entre las edades (2, 6 y 9 meses), se observó una capacidad de crecimiento alta que se mantuvo en todas las edades (Figura 4.32). Los cuerpos celulares y la red axonal de éstas neuronas estaban sanos. En el caso de las neuronas del ratón YG8sR, se observó un incremento de la densidad de las redes axonales en la cámara axonal asociado con la edad (Figura 4.32, b-abajo). A los 9 meses de edad, la capacidad de crecimiento resultó ser mayor que a los 2 y 6 meses de edad. Particularmente a los 2 meses, los pocos axones que lograron cruzar los canales se agruparon cerca de los microcanales y no exploraron el resto de la cámara AXÓN (Figura 4.32, b-izquierda). Este comportamiento se observó en las tres replicas biológicas (ratones N=3).

Con estos resultados logramos concluir que, bajo las mismas condiciones de cultivo, mientras que la mayoría de las neuronas sensitivas adultas del ratón control Y47R responden de forma óptima al gradiente neurotrófico (NGF, GDNF) de las cámaras microfluídicas y logran extender sus axones a través de los microcanales, solo una reducida cantidad de neuronas del ratón YG8sR lo hace. Estos resultados sugieren que los conos de crecimiento de las neuronas del ratón YG8sR, particularmente a los 2 meses de edad, presentarían un problema en la respuesta a señales de la guía axonal y del crecimiento.

4.3.1 Regeneración axonal de las neuronas sensitivas adultas deficientes en frataxina

Formación de conos de crecimiento tras la axotomía

La capacidad regenerativa de los axones de las neuronas sensitivas in vivo se correlaciona con el potencial para formar un nuevo cono de crecimiento tras

realizar una axotomía in vitro y este fenómeno ocurre a tan solo unas pocas horas después del daño (81).

Nuestro interés se centró en observar si las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8sR eran capaces de formar tantos conos de crecimiento como el ratón control, tras sufrir un daño axonal. Con este propósito implementamos un modelo de axotomía in vitro para el daño axonal. Las neuronas sensitivas se aislaron del ganglio dorsal de los ratones YG8sR y control Y47R con 2, 6 y 9 meses de edad, y se sembraron en cámaras de cultivo microfluídicas. Se permitió que las neuronas crecieran sus axones durante 5 días. Luego, en el quinto día in vitro (DIV5), se procedió a cortar los axones (axotomía) y a las 4 horas después de haber realizado la axotomía se adquirieron imágenes de la red axonal en la cámara AXÓN.

A los 2 meses de edad, observamos que mientras la mayoría de los axones cortados de las neuronas sensitivas del ratón control Y47R fueron capaces de formar una abundante cantidad de conos de crecimiento (Figura 4.33, c), tan solo unos pocos lo hicieron en el caso del ratón YG8sR (Figura 4.33, d). Resultados similares se observaron a los 6 meses (Figura 4.33, e, f). A los 9 meses de edad, la mayoría de axones cortados de las neuronas sensitivas del ratón YG8sR lograron formar nuevos conos de crecimiento, siendo el número de conos observado bastante similar al del ratón control Y47R.

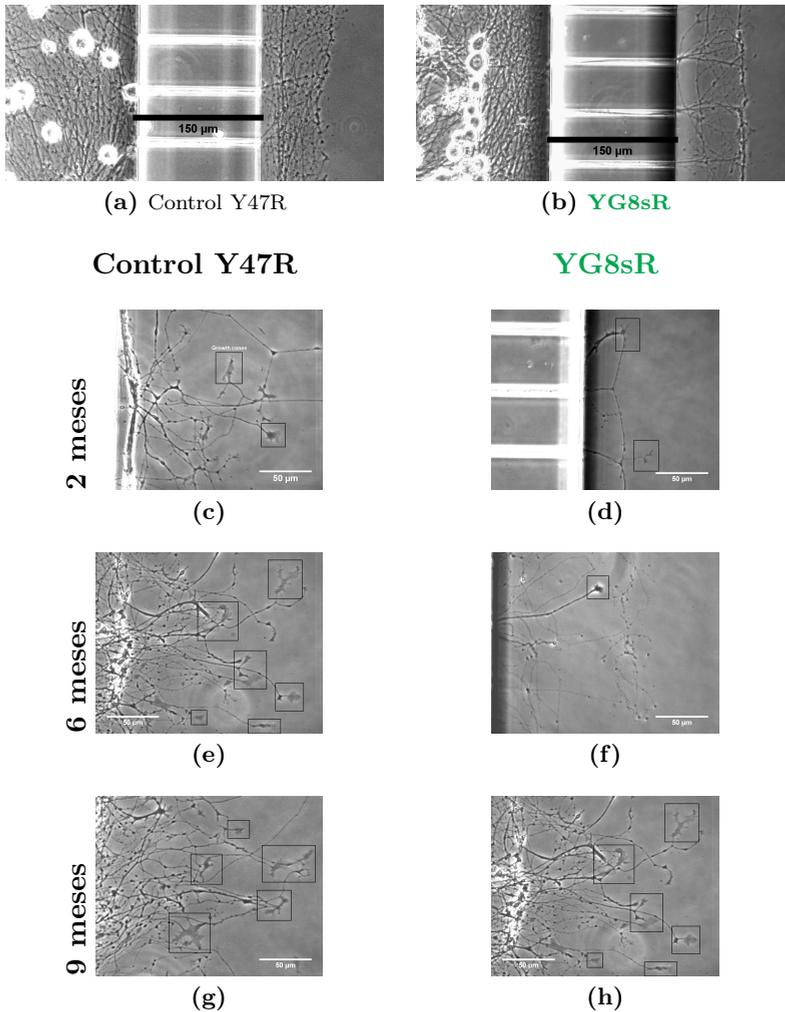


Figura 4.33: Las neuronas del DRG de ratón YG8sR logran formar nuevos conos de crecimiento pocas horas después de haber sido axotomizadas. (a-b) Imágenes en contraste de fases que muestran la red axonal en el DIV5, 10 minutos después de haber sido cortada mediante la axotomía (axotomía). Se muestra una imagen representativa para cada uno de los genotipos a la edad de 9 meses (YG8sR y control Y47R). (c-h) Las imágenes muestran la red axonal en el DIV5, 4 horas después de haber realizado la axotomía. Se pueden observar la formación de nuevos conos de crecimiento de gran tamaño (recuadros negros). Al comparar entre genotipos, se puede observar cómo los axones cortados de los ratones YG8sR, logran formar menos conos de crecimiento que el ratón control Y47R a 2 y 6 meses de edad. Estas diferencias no se mantienen a los 9 meses de edad. Barra de escala 50 μm .

Cuando comparamos entre las edades, las neuronas del ratón control exhibieron un potencial regenerativo alto en todas las edades, debido a que se observó un gran número de nuevos conos de crecimiento. Por otro lado, las neuronas del ratón YG8sR exhibieron un incremento del potencial regenerativo con la edad. El número de nuevos conos en el extremo distal de los axones fueron muy bajos a 2 y 6 meses de edad y más alto para 9 meses de edad, alcanzando una cantidad de axones competentes para regenerar similar a la observada para el ratón control Y47R.

4.3.2 El déficit de frataxina en las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8sR causa una reducción en su respuesta regenerativa

Para determinar si el daño axonal en las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8sR inducía cambios en la respuesta regenerativa intrínseca, los cultivos de las neuronas sensitivas de los dos genotipos se mantuvieron en las cámaras microfluídicas durante 48 horas adicionales después de la axotomía (hasta el DIV7). En el DIV7, se adquirieron imágenes de contraste de fases con condiciones *in vivo* de la cámara SOMA y la cámara AXÓN (Figura 4.34). Las imágenes se procesaron según el método descrito anteriormente (ver apartado 3.2.7) para detectar y cuantificar el área total y fragmentada de las redes axonales. Para estimar la degeneración axonal, se calculó un índice de degeneración axonal (ID), como la razón entre el área fragmentada y el área total ocupada por la red axonal.

Cuando comparamos estos resultados entre los genotipos control Y47R, e YG8sR en 2, 6 y 9 meses de edad, se observó a todas las edades cómo las redes axonales de las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8sR ocupaban una menor área que las redes axonales del ratón control Y47R (Figura 4.34, a), lo cual sugería una reducción en el potencial regenerativo debido a la ausencia de frataxina en 2, 6 y 9 meses de edad.

Cuando comparamos el potencial regenerativo entre las edades (área total de las redes axonales), se observó que las neuronas sensitivas del ratón control Y47R mantenían el potencial regenerativo en todas las edades. En cambio, en el caso del ratón YG8sR se observó un incremento de la respuesta regenerativa con la edad (Figura 4.34) que estaba relacionada con el número de axones que había en la zona axón antes realizar la axotomía (Figura 4.32, b). Esto significa que mientras más axones fueron cortados un mayor número de axones regeneraron, lo que evidencia la importancia de la densidad axonal para estimular la respuesta regenerativa.

Cuando comparamos el índice de degeneración axonal (ID) entre genotipos (Figura 4.34), se observó un incremento significativo del ID en los axones de las neuronas sensitivas adultas deficientes para frataxina (YG8sR) en 2 y 9 meses de edad comparado con el obtenido para control Y47R. Estos resultados sugieren que las neuronas deficientes para frataxina logran regenerar sus axones tras una axotomía pero no logran mantenerlos sanos. Es muy probable que de haber mantenido los cultivos durante un periodo más largo de tiempo, el efecto degenerativo habría resultado en la desaparición de las redes axonales y por consiguiente con la muerte de las neuronas.

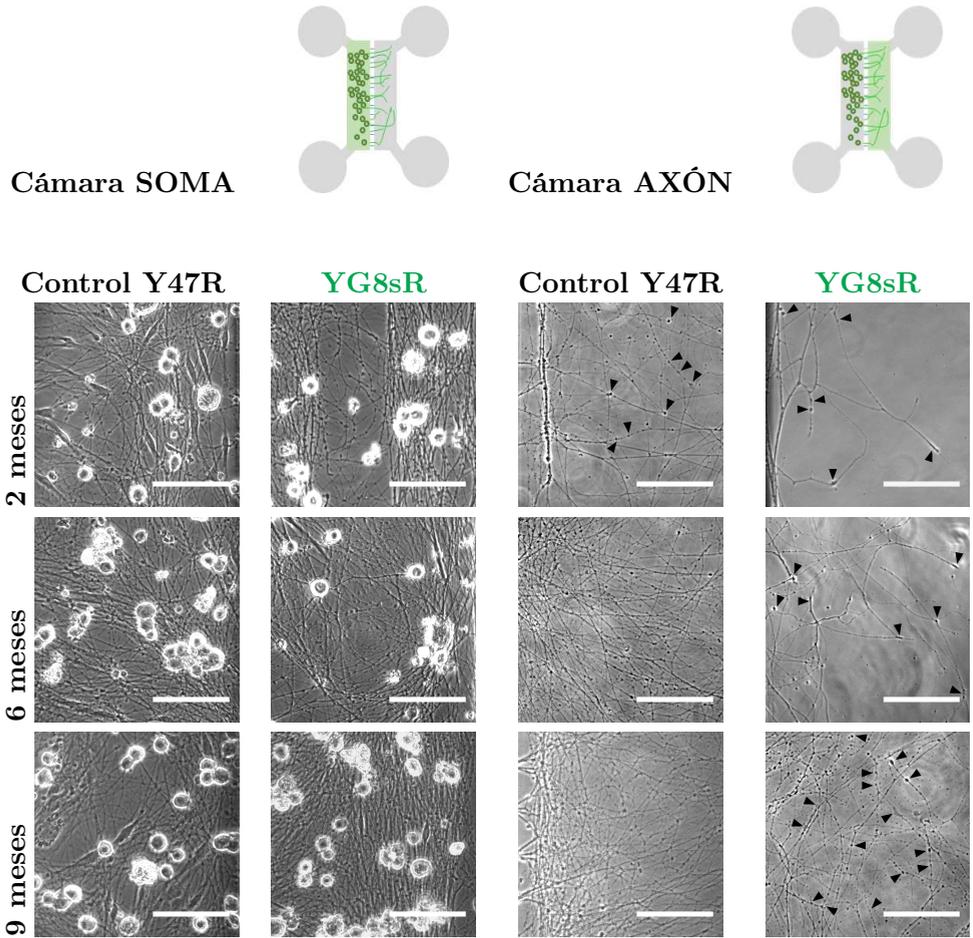
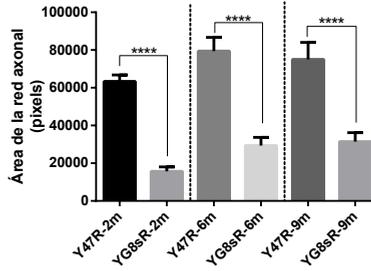
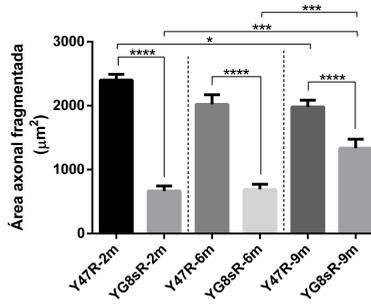


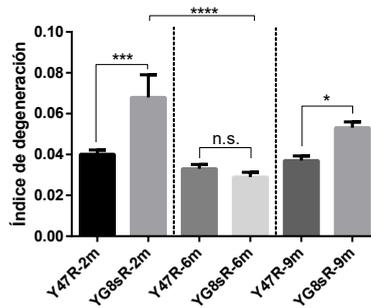
Figura 4.34: Regeneración y degeneración axonales en las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8sR. Los esquemas muestran la forma de una cámara microfluídica típica, se resalta (verde) el compartimento donde se adquieren las imágenes (arriba). Se muestran imágenes representativas de los cultivos de las neuronas sensitivas de los dos genotipos (control Y47R, YG8sR) en las cámaras microfluídicas 48 horas después de haber realizado la axotomía (DIV7). En la cámara SOMA se observan los somas de las neuronas sensitivas y en la cámara AXÓN la red axonal de las neuronas con 2, 6 y 9 meses de edad. Las imágenes en contraste de fases se adquirieron con condiciones de in vivo. La red axonal de las neuronas sensitivas adultas del ratón control Y47R exhiben una capacidad regenerativa más robusta que la de las neuronas del ratón YG8sR en todas las edades (2, 6 y 9 meses). En las redes axonales de los ratones YG8sR, se observa un incremento en los signos de degeneración axonal como la fragmentación axonal y puntos de acumulación (flechas negras). Estos signos no resultaron evidentes en la cámara SOMA. Barra de escala 100 μm .



(a)



(b)



(c)

Figura 4.35: Respuesta regenerativa y la degeneración axonal en las neuronas sensitivas del ratón YG8sR. Las gráficas de barras muestran la cuantificación del área ocupada por la red axonal (a), el área fragmentada (b) y el índice de degeneración axonal (d), 48 horas después de haber realizado una axotomía in vitro (DIV7). Los gráficos de barras muestran la media \pm el error estándar de la media (SEM) de al menos 30 campos aleatorios de tres experimentos independientes ($N=3$ genotipo/edad). La significancia de las diferencias entre genotipo y edades se evaluó mediante la prueba ANOVA simple y el test *post-hoc* de Holm-Sidak para las comparaciones múltiples. ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$.

Capítulo 5

Discusión

La Ataxia de Friedreich (FRDA) es una enfermedad neurodegenerativa, de herencia autosómica recesiva que causa un daño progresivo del sistema nervioso humano, y que afecta típicamente a adolescentes y adultos jóvenes. Actualmente no existe tratamiento para la enfermedad por lo que son necesarios los avances en la investigación de la fisiopatología de la enfermedad. El primer sitio de afectación en la FRDA son las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales (DRGs) ó neuronas sensitivas, las cuales sufren un proceso degenerativo axonal escasamente entendido a nivel molecular. En este trabajo, nuestro interés se centró en investigar la morfología y la dinámica del cono de crecimiento y su relación con la degeneración axonal característica de la FRDA. Con este propósito se utilizaron dos modelos murinos humanizados para la FRDA, YG8R e YG8sR. Estos ratones contienen la mutación humana que está presente en todos los pacientes de FRDA, y por lo tanto representan uno de los modelos más apropiados para el estudio de la FRDA.

El modelo murino YG8R ha sido estudiado en profundidad en nuestro laboratorio (200, 222). Este ratón presenta una expresión diferencial de frataxina en los tejidos neuronales, siendo las raíces del ganglio dorsal las que presentan los menores niveles de frataxina, seguido del ganglio dorsal, las columnas dorsales y tronco encefálico. Los estudios histológicos junto con el análisis molecular realizado en estos tejidos sugieren la presencia de un proceso de neurodegeneración dying-back in vivo originado en las raíces periféricas del ganglio dorsal y

que implica al estrés oxidativo como mecanismo fisiopatológico (200). El déficit de frataxina causa la disfunción mitocondrial en las neuronas sensitivas con despolarización mitocondrial, aumento de producción de ROS, fallo energético y disminución de la recaptación mitocondrial de Ca^{2+} (200).

Nuestros resultados proveen nuevas evidencias relacionadas con los mecanismos moleculares mediante los cuales el citoesqueleto de actina es afectado por el déficit de frataxina en las neuronas sensitivas adultas, y proveen por primera vez resultados de una afectación de la dinámica del cono de crecimiento y la capacidad regenerativa axonal de las neuronas sensitivas deficientes para frataxina del ratón YG8sR.

5.1 Alteración del citoesqueleto en el cono de crecimiento de neuronas deficientes para frataxina

La creación de un nuevo cono de crecimiento en cultivo requiere que las neuronas sensitivas usen toda la maquinaria molecular requerida para extender un nuevo axón con la guía del cono de crecimiento. Este proceso implica la reorganización del citoesqueleto de actina y microtúbulos (MTs) regulado por vías de señalización del calcio (244, 245), el transporte axonal de proteínas y organelas, y un importante incremento del metabolismo energético suministrado principalmente por la mitocondria (246, 247). En la primera parte de éste trabajo (sección 4.1.1) se investigó la funcionalidad del cono de crecimiento estudiando el área, la forma y la longitud de las neuritas. Nuestros resultados mostraron una disminución en la longitud de las neuritas en las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8R comparados a los del ratón control C57BL/6J. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Shan y col. (248), donde se observa una disminución de la longitud de las neuritas de las neuronas sensitivas en el modelo YG8R, que los autores explican como una consecuencia de la sensibilidad al estrés oxidativo. La disminución de la longitud de las neuritas se ha asociado previamente con la desaparición prematura del cono (249). Así que un estudio morfológico del cono de crecimiento era necesario para dar una explicación de la disminución de las neuritas observado en las neuronas deficientes en frataxina. Observamos que el número de conos de crecimiento era menor que el ratón C57BL/6J, y además con un área más reducida. También fue interesante comprobar como un mayor porcentaje de estos conos presentaban una morfología de conos retraídos o colapsados. Esto sugiere una menor actividad del crecimiento axonal (234) debido a que normalmente los conos dispersos indican conos de crecimiento activos, y los conos retraídos o colapsados indican la retracción de la neurita o un crecimiento pausado. Por

lo tanto, podíamos afirmar que la alteración en el cono de crecimiento en las neuronas deficientes en frataxina provocaba un problema en el crecimiento de sus neuritas. Estos resultados hicieron que nos preguntáramos por qué la morfología del cono se veía afectada. El cono es una estructura motil que requiere un dinamismo constante, y lo consigue gracias a la re-estructuración continua del citoesqueleto. Especial importancia en su estructura tienen los filamentos de actina, uno de los elementos básicos del citoesqueleto.

Cómo ya se comentó en la introducción, la actina se presenta en la célula como actina globular (actina G) o filamentosa (actina F), siendo su equilibrio (ratio) lo que marca la estabilidad del citoesqueleto y su respuesta (227). Al evaluar el ratio de la conversión de actina G a actina F se observó que dicho ratio estaba incrementado significativamente en el ratón YG8R en los conos de crecimiento y en el segmento axonal más cercano al cono. En este trabajo se comprobó que dicho incremento se debía al aumento de la actina G y F en los conos de crecimiento, y a la disminución de actina F en el segmento axonal.

Esta primera observación no deja de ser llamativa, sin embargo pensamos que estas diferencias podrían reflejar una adaptación específica de la regulación del citoesqueleto de actina en cada compartimento de la neurona. Mientras que en el cono de crecimiento la actina F está siendo constantemente polimerizada y des-polimerizada en el filopodio, en el axón el citoesqueleto de actina se ajusta a las necesidades de la neurona y presenta varias estructuras propias como los anillos, olas y senderos de actina (66, 72). Por lo tanto no es de sorprenderse que la señal de actina F y G cambie en los diferentes compartimentos neuronales.

El incremento en los niveles de actina F en el cono de crecimiento han sido observados previamente en neuronas del hipocampo de ratón como causa de una mutación en la proteína encapsulante de actina ó capping protein (CP), la cual normalmente impide la adición de nuevos monómeros de actina al extremo (+) del filamento de actina (250). La mutación en esta proteína causa cambios aberrantes en la morfología de los conos y la reducción en la longitud de las neuritas, lo cual coincide con nuestras observaciones en las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8R. También se ha observado una reducción de los niveles de actina G en los conos de crecimiento de motoneuronas primarias como causa de mutaciones (C71G, M114T, G118V) en el gen de profilina-1 (*PFN1*) que causan casos muy raros de Esclerosis Lateral Amiotrófica familiar (FALS), un desorden neurodegenerativo de inicio tardío (227). La profilina-1 es uno de los mayores reguladores de la conversión de actina G a actina F (251), y en este caso su alteración causó una reducción del ratio actina F/G en los conos, una disminución del área de los conos con una morfología alterada caracterizada

por presentar un filopodio rico en actina F, y una reducción en la longitud de las neuritas, lo cual coincide con algunas de nuestras observaciones en las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8R.

En ataxia de Friedreich se han publicado varios trabajos que hacen referencia al citoesqueleto. En fibroblastos de pacientes FRDA se ha descrito una reducción en los niveles de actina F, lo cual los autores atribuyen a la regulación a la baja de la isoenzima fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 5-quinasa (PIP5K β) (252), una proteína responsable de la organización del citoesqueleto de actina (253, 254). El gen PIP5KB está localizado a \sim 26 kb del extremo 5' del gen de *FXN* (9q13) y los autores explican que la disminución en los niveles de esta proteína se debe a la expansión del triplete GAA que presentan los pacientes. Por lo tanto, concluyen que frataxina no interviene directamente en la alteración del citoesqueleto. Pero con nuestros resultados esta conclusión es discutible, ya que el ratón YG8R no presenta ninguna alteración en la proteína PIP5KB y sin embargo nuestros resultados revelan una alteración del ratio de actina F/G distintiva en el segmento axonal (reducción de la actina F) y en el cono de crecimiento (incremento de la actina F y G) de las neuronas sensitivas adultas.

Otros estudios, también han observado una reducción de la actina filamentosa en fibroblastos y neuronas de la médula espinal de pacientes FRDA (213, 214). En estos estudios los autores explican que la reducción de la actina filamentosa podría ser una consecuencia del incremento de la sensibilidad de la actina a ser oxidada y por ende al desensamble de los filamentos de actina (213). El incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidos por la acumulación de hierro libre en las células FRDA podrían ser las causantes de la oxidación de actina.

Estas observaciones coinciden con la disminución de los niveles de actina F observado en los segmentos axonales de nuestro modelo, pero se contradicen con el incremento de actina F y G observado en los conos de crecimiento de nuestro modelo. Debido a que dentro de la misma neurona los niveles de actina F y G parecen variar entre los diferentes compartimentos (axón, cono de crecimiento) es posible que en otros tipos de células como los fibroblastos la regulación del ratio actina F/G podría sea distinta a la de las neuronas y por lo tanto las consecuencias para cada tipo celular podrían ser también diferentes. Los niveles de actina F y G no tienen porque ser similares en los diferentes tipos celulares porque debemos tener en cuenta que los fibroblastos no se afectan de igual manera que las neuronas sensitivas adultas en la FRDA.

En nuestro modelo también se ha observado un incremento en el estrés oxidativo (200, 222), específicamente se ha descrito que las neuronas sensitivas

deficientes para frataxina sufren un proceso oxidativo crónico, de forma relevante en las raíces periféricas in vivo y en el cultivo neuronal in vitro (200), por lo que es posible que éste sea una causa de la alteración del citoesqueleto de actina.

La interacción entre el citoesqueleto de actina y de MTs asegura un correcto funcionamiento del cono de crecimiento. Puesto que nuestros resultados exhibieron una alteración en la ratio de la actina F/G quisimos explorar la estabilidad de los MTs en los axones de las neuronas sensitivas del DRG. Durante el crecimiento axonal los microtúbulos dinámicos, enriquecidos en tubulina tirosinada, dirigen el crecimiento de la neurita, mientras que los MTs estables, enriquecidos en tubulina acetilada, proveen el soporte para el crecimiento (255). Al cuantificar los niveles de fluorescencia para la tubulina acetilada y tirosinada en las neuronas del ganglio dorsal del ratón YG8R no observamos diferencias significativas con el control C57BL/6J. Sin embargo, cuando analizamos la expresión de estas modificaciones mediante western blot si observamos un incremento significativo de la tubulina acetilada en las raíces del ganglio dorsal de nuestro modelo YG8R. Una posible explicación de estos resultados es que la actividad de las enzimas que regulan la acetilación del α -tubulina (Lys40) (enzima acetiltransferasa MEC17 ó α -TAT1 (256), la desacetilasa HDAC6 (257) estén siendo alteradas en nuestro modelo. Hasta el momento no existe ninguna referencia de estudios asociados con estas enzimas en la FRDA, por lo que consideramos sería interesante profundizar en este tema.

En condiciones normales, la acetilación de los MTs se ha relacionado directamente con el transporte anterógrado en las neuritas (258). Específicamente se ha propuesto que la acetilación de los microtúbulos influencia la unión de la proteína motora quinesina-1 (51) dirigiendo el transporte de quinesina hacia las neuritas en crecimiento durante el desarrollo embrionario o hacia el axón en neuronas maduras (51, 259, 260). En el estudio proteómico del ganglio dorsal del modelo YG8R encontramos que tres isoformas de la quinesina-5 estaban reguladas a la baja. Por lo tanto, pensamos que los cambios en los niveles de acetilación, como el incremento de la acetilación que hemos observado en nuestro modelo, podría estar causando cambios en el transporte basado en quinesina-1 en las neuritas y alterando la liberación de proteínas y vesículas a sitios subcelulares específicos.

En nuestros experimentos no observamos cambios significativos en los niveles de tirosinación, sin embargo, un estudio inmunohistoquímico de las motoneuronas en médula espinal de pacientes FRDA ha revelado un incremento de la tubulina tirosinada (214). Estas diferencias pueden explicarse por las di-

ferencias de los tejidos evaluados, en nuestro caso la evaluación se dirigió a los axones de las neuronas sensitivas y el de Sparaco y col. (214) a los somas de las motoneuronas, y como se ha explicado previamente en la introducción, las modificaciones post-traduccionales de tubulina presentan una distribución compartimentalizada en las neuronas.

Por otra parte, Piermarini y col. (215) han mostrado en una línea celular de motoneuronas (NSC34) que el silenciamiento de frataxina induce un incremento de la glutationilación de los microtúbulos asociada con una reducción de la su polimerización. Por lo tanto, los autores proponen que estas alteraciones podrían contribuir al fenómeno de retracción axonal. La glutationilación no ha sido evaluada hasta el momento en las neuronas sensitivas del ganglio dorsal, sin embargo consideramos que sería interesante explorarlo y compararlo con las demás modificaciones.

Cartelli y col. (234) asoció el incremento en la acetilación de los MTs con la reducción del transporte anterógrado al someter células PC12 diferenciadas a la acción de la neurotoxina 1-metil 4-fenilpiridina, que afecta a la cadena de transporte de electrones en la mitocondria (196, 234). Estos resultados indican que los microtúbulos y la red mitocondrial están fuertemente correlacionados. En la Ataxia de Friedreich existe una clara disfunción mitocondrial, generada en parte por una deficiencia en la cadena de transporte electrónico (203). Esta circunstancia hace que el entorno bioquímico de la célula se asemeje a la presencia de la neurotoxina 1-metil 4-fenilpiridina, lo cual nos plantea la posibilidad de que el incremento en la acetilación se asocie a la disfunción mitocondrial y que esto podría llevar a una alteración en el transporte axonal.

Todas estas observaciones y nuestros resultados confirman que el déficit de frataxina induce una alteración de las modificaciones post-traduccionales en motoneuronas y las neuronas sensitivas del ganglio dorsal. Siendo las neuronas del DRG el primer sitio de afectación de la FRDA consideramos que la profundización en el estudio de estos mecanismos podría guiar a establecer nuevas rutas moleculares subyacentes en la fisiopatología de la enfermedad.

Cuando analizamos el estudio proteómico del DRG del modelo YG8R encontramos que muchas de las proteínas del citoesqueleto neuronal estaban reguladas a la baja, confirmando la afectación del citoesqueleto de actina y microtúbulos en los dos compartimentos de las neuronas sensitivas del ratón YG8R. Dos de las proteínas identificadas son α -actinina y β -actina. Se ha confirmado en fibroblastos subconfluentes de pacientes con FRDA, una distribución sub-celular anómala de la α -actinina y una reducción parcial de la expresión de β -actina (252). Además se ha observado también una disminución de la fluorescencia

de actina F y una organización defectuosa de las fibras de estrés de actina en fibroblastos de pacientes FRDA (213).

El análisis proteómico también mostró la afectación de proteínas que son importantes para el transporte axonal. Por ejemplo, el neurofilamento NF-H resultó estar reducido y parece tener efecto sobre la velocidad de conducción nerviosa (261). Además, varias isoformas de las proteínas motoras miosinas y quinesinas resultaron estar también reguladas a la baja. Estos resultados sumados a las alteraciones de la acetilación de los microtúbulos que hemos observado en las raíces del ganglio dorsal del modelo YG8R y los estudios previos de los marcadores del transporte axonal realizados por (200) nos permiten confirmar que existe una afectación importante del transporte axonal en las neuronas deficientes para frataxina.

El tráfico vesicular también parece estar alterado en las neuronas sensitivas del modelo YG8R. Clatrina, el componente del complejo proteína adaptadora-2 y dinamina-1 también resultaron estar reguladas a la baja. La regulación a la baja de estas proteínas en nuestro modelo YG8R, podría estar causando la agregación de componentes en el citoplasma de los cuerpos celulares del DRG y a una posible alteración en el ciclo de vesículas presinápticas, lo cual contribuiría al proceso degenerativo axonal en las neuronas del DRG. En nuestro laboratorio se ha observado la aparición de vesículas en los axones del DRG del modelo YG8R (datos no publicados), y también se han observado la aparición de vacuolas en los somas del DRG del modelo YG8R y del nuevo modelo YG8sR para la FRDA (17, 222). Estas observaciones evidencian una clara alteración del tráfico vesicular debido al déficit de frataxina.

De forma interesante, el complejo quinesina-5 (KIF5), que también resultó estar reducido, transporta las vesículas que contienen varias cargas a lo largo de los axones. Una de ellas es la proteína precursora amiloide (siglas en inglés APP) junto a enzimas que participan en el procesamiento proteolítico de APP para producir el péptido amiloide, que es el principal constituyente de las placas amiloides extracelulares en la enfermedad de Alzheimer (260, 262). KIF5 también transporta vesículas que transportan el receptor-2 de apolipoproteína E (APOER2) (263), el cual apareció acumulado en esferoides a lo largo del axón de las neuronas sensitivas adultas del modelo YG8R (200). De forma llamativa, APOER2 es el receptor para reelina, una proteína de la matriz extracelular, cuya deficiencia en el modelo murino de reeler produce ataxia con una típica marcha tambaleante y una organización neuronal anormal (263, 264). Por otra parte, KIF5 también transporta la mitocondria (73, 265) y tubulina oligomérica (asociación de dímeros de tubulina) (266). Estos resultados sugieren que el suministro de proteínas hacia el axón podría estar alterado. La relación

de estas alteraciones del tráfico vesicular con el bloqueo del transporte axonal observado en las neuronas sensitivas del modelo YG8R (200) son importantes porque hasta el momento, el transporte vesicular es un campo inexplorado en la FRDA.

5.2 El déficit de frataxina incrementa la actividad de cofilina y el complejo ARP2/3

Si bien el estrés oxidativo está demostrado que afecta al citoesqueleto de actina directamente, también es verdad que puede estar alterando la actividad de proteínas que regulan la polimerización de los filamentos de actina. Esta regulación es compleja, ya que intervienen muchas proteínas. En este trabajo nos centramos especialmente en dos de ellas, ya que actúan directamente sobre el ensamblaje y desensamblaje de la actina: la cofilina y ARP2/3.

La cofilina promueve la fragmentación de los filamentos de actina lo que causa un incremento en el desensamblaje. Nuestro trabajo muestra por primera vez la desregulación de la actividad de cofilina-1 en las raíces del ganglio dorsal del ratón YG8R. La desregulación se asoció con una reducción en la fosforilación de cofilina (p-cofilina[Ser3]), que corresponde a la forma inactiva de la proteína, acompañada de un incremento de la cofilina total.

El complejo ARP2/3 es una proteína nucleadora de actina. En este trabajo hemos observado un incremento significativo de los niveles de expresión del complejo ARP2/3 en las raíces de los ganglios dorsales del ratón YG8R. El incremento de la expresión del complejo ARP2/3 refleja la hiperactividad de cofilina, debido a que el incremento en el corte de los filamentos de actina por cofilina-1 generaría más moldes de filamentos de actina para que el complejo ARP2/3 inicie la formación de ramas de actina (267). Esta afirmación se basa en estudios de modelos cinéticos que indican que la polimerización de actina mediada por el complejo ARP2/3 es autocatalítica, es decir que la tasa de reacción incrementa mientras más polímeros de actina se generen (267), sugiriendo que si aumenta la expresión de cofilina-1 esto podría inducir el incremento de la actividad del complejo ARP2/3.

La cofilina tiene funciones esenciales en varios procesos del sistema nervioso incluyendo la guía y crecimiento axonal; la formación de las sinapsis y regulación de la neurotransmisión; y la función de las espinas dendríticas, componentes de la plasticidad sináptica, esencial para el aprendizaje y la memoria. La actividad de cofilina es regulada aguas arriba por vías de señalización activadas por las proteínas GTPasas: RhoA, Cdc42 y Rac1 (268). En neuronas, la desregulación

de proteínas pertenecientes a estas vías como LIMK, AMPK, SSH1L y CIN se han asociado con varios procesos neurodegenerativos de varias enfermedades como Alzheimer (EA), Parkinson y Creutzfeldt-Jakob (ECJ). Por ejemplo, en la EA se ha observado que bajas dosis del agregado amiloide β incrementan la actividad de cofilina, lo cual promueve la formación de barras de actina ó actin-cofilin rods (269), las cuales han sido implicadas en la degeneración axonal en enfermedades neurodegenerativas (270). En la enfermedad de Parkinson, los resultados de Lim y col. (271) muestran que la proteína parkina interacciona con LIMK-1 (271) por lo que se ha propuesto que las mutaciones en parkina podrían contribuir a los defectos del citoesqueleto de actina en células neuronales y no neuronales (272), y provocar defectos en el transporte de vesículas (273, 274).

En la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), que es una enfermedad neurodegenerativa causada por agregados de la proteína priónica y que provoca una rápida degeneración del cerebro, se ha observado que la expresión de cofilina está alterada en la corteza cerebral y el cerebelo de pacientes y modelos murinos. Dicha alteración se asocia con cambios en la expresión de la proteína quinasa LIMK-1 y la proteína fosfatasa específica de neuronas SSH1 (275).

Entonces, el estudio de los niveles de expresión de las proteínas reguladoras en nuestro modelo parecía esencial. Se observó que la actividad de las proteínas reguladoras de la fosforilación de cofilina, la quisasa LIMK-1 y la fosfatasa Chronophin/PDXP (CIN), estaban desreguladas en las raíces de los ganglios dorsales del ratón YG8R. Los niveles de CIN resultaron estar regulados al alta en los somas y las raíces dorsales, siendo estadísticamente significativa la diferencia en los somas. Este aumento explicaría la disminución en los niveles de p-cofilina[Ser3]. Es interesante recalcar que cuando los niveles fisiológicos de ATP son bajos, CIN es liberada del complejo formado con la proteína de choque térmico-90 (Hsp90) y puede desfosforilar a cofilina. En las células deficientes en frataxina, debido a la disfunción mitocondrial, los niveles de ATP están reducidos (169, 203), lo que podría contribuir a que se diera esta situación, fomentando la liberación de CIN para actuar sobre la cofilina. Así pues, según nuestros resultados, sería interesante la búsqueda de estas estructuras en tejidos neuronales de pacientes. Por otro lado, los niveles de la actividad de LIMK-1 (pLIMK-1[T508]) resultaron estar regulados al alta de forma estadísticamente significativa en las raíces de los ganglios dorsales del ratón YG8R. Esto no explicaría directamente los bajos niveles de p-cofilina[Ser3]. Por lo tanto pensamos que en nuestro modelo, el incremento en la actividad de LIMK-1 podría ser un intento de las neuronas por balancear la actividad de cofilina promovida por la hiperactividad de CIN, o bien existen otros parámetros que

no han sido evaluados en este trabajo y que intervienen en la regulación de cofilina.

Teniendo en cuenta nuestros resultados, pensamos que el ambiente patogénico causado por el déficit de frataxina en las neuronas sensitivas adultas, caracterizado por un incremento del estrés oxidativo y una reducción del metabolismo energético, estarían induciendo la desregulación de la actividad de las proteínas que regulan la actividad de cofilina, produciendo un incremento de su actividad. Entre las posibles consecuencias del incremento en la actividad de cofilina podrían estar la formación de estructuras patogénicas en el axón como lo son las barras de actina (*actin-cofilin rods*) que podrían intervenir en el bloqueo del transporte axonal, alteración descrita previamente en nuestras neuronas (200).

Pero la actividad de la cofilina no solo ejerce su función en el axón, también es importante en otros tipos de células neuronales. Para conocer la distribución de la cofilina activa e inactiva en las fibras sensitivas estudiamos mediante inmunofluorescencia secciones longitudinales del asta dorsal del ratón YG8R y control C57BL/6J. Encontramos que la cofilina activa (no fosforilada) presenta una distribución dispersa a lo largo de los axones, mientras que la cofilina inactiva (fosforilada en el residuo Ser3) se distribuye de forma localizada en ciertos puntos a lo largo del axón, sin embargo lo más llamativo resultado ser una concentración abundante de la señal en lo que pensamos son las células que rodean a los axones (células de Schwann). Estas observaciones coinciden con las descritas por Stern y col. (240) en el nervio facial murino, el cual contiene fibras nerviosas sensitivas y motoras. Entonces consideramos que es probable que el nivel reducido de cofilina inactiva que hemos observado en las raíces del ganglio dorsal mediante *western blot* se deba principalmente por los niveles que tengan las células que rodean a las fibras nerviosas y/ó el número de células que rodean a las fibras nerviosas. Estas observaciones resultan ser muy interesantes debido a que se ha demostrado que la actividad de cofilina-1 media los cambios dinámicos del citoesqueleto de actina en las células de Schwann que les permiten rodear y mielinizar las fibras nerviosas (276). Entonces, de confirmarse la falta de cofilina fosforilada en las células de Schwann podría darse una explicación a la hipomielinización de las fibras sensitivas observada en la neuropatía de la FRDA (161), debido a una incorrecta interacción de las células de Schwann con los axones sensitivos. Consideramos que nuestras observaciones apoyan la idea de que para entender la neuropatía sensitiva de la FRDA debemos tener en cuenta el papel de las células gliales, particularmente las células de Schwann.

Resumiendo, cuando analizamos la expresión de actina F y actina G en los conos de crecimiento y el segmento axonal más cercano en las neuronas sensitivas del ratón YG8R encontramos que había un incremento en el ratio de actina F/G, que podría explicarse por un incremento de cofilina-1. Un posible mecanismo sería que tras el desensamble de los filamentos de actina por la cofilina-1, se vería incrementada la cantidad de actina G libre, que sería totalmente funcional para polimerizar nuevos filamentos (277). En un segundo paso, al existir más filamentos cortos de actina F el complejo ARP2/3, que también resulto estar incrementado significativamente en las raíces del ganglio dorsal, podría estar formando una mayor cantidad de ramas de actina. Tanto cofilina-1 como las proteínas que regulan su actividad (LIMK, CIN, SSH1L) se expresan en gran abundancia en los conos de crecimiento de varios tipos de neuronas, incluidas las neuronas del ganglio dorsal (278-280). En nuestro caso, el ratio F/G también está incrementado en el cono, por lo que podríamos esperar algo parecido a lo que observamos en el axón, ya que es el propio axón el que provee al cono con las proteínas y materiales para su apropiado funcionamiento. Algunos estudios demuestran que la regulación de la fosforilación de cofilina mediante LIMK-1 y SSH1 es crítica para la motilidad del cono de crecimiento neuronal y la extensión axonal (279), dos efectos que nosotros observamos en nuestro modelo deficiente de frataxina y que por tanto apoya la teoría de que en el cono también tiene que existir una desregulación de estas proteínas.

Cómo ya se comento al principio de esta discusión, la regulación de la dinámica del citoesqueleto es muy compleja. A medida que se conoce más este proceso, aparecen más proteínas que intervienen favoreciendo o impidiendo que se lleve a cabo el ensamblaje o desensamblaje de la actina. Una nueva familia de proteínas de unión a actina, que por su relación con cofilina nos parece digna de mención, son las denominadas MICALs ó moléculas que interactúan con CasL (MICAL) cuya actividad es dependiente del estado redox de la célula. MICAL participa en una multitud de actividades que incluyen la repulsión del cono de crecimiento, el tráfico de membranas, la apoptosis, y el desarrollo de pelos en *Drosophila melanogaster*. Una característica interesante de las proteínas MICAL es que pueden oxidar proteínas o producir especies reactivas de oxígeno (ROS) (281, 282), y entre las proteínas que oxida está la actina (283). En condiciones normales MICAL oxida los filamentos de actina (actina F), gracias al coenzima NADPH, que induce el desensamble de actina. Lo más interesante es que se ha demostrado que MICAL actúa en sinergia con cofilina para incrementar el desensamble de los filamentos de actina. La expresión de las proteínas MICAL ha sido explorada en ratas y seres humanos, en ratas por ejemplo, MICAL-1 y MICAL-3 se expresan de forma ubicua durante el desa-

rollo del sistema nervioso (284), y en seres humanos MICAL se expresa en corazón, pulmón, hígado, riñón, timo, músculos, médula osea y cerebro (285, 286). Debido a que nuestros resultados confirman un incremento de la actividad de cofilina en las raíces de los ganglios dorsales sería interesante comprobar la actividad de MICAL. Además, no hay que perder de vista que MICAL necesita ejercer su función en un estado redox apropiado, y que la falta de frataxina altera en nuestro modelo de neurona sensitiva deficiente en frataxina.

5.3 El déficit de frataxina afecta la dinámica de los conos de crecimiento neuronales

5.3.1 *Estudio de la dinámica del cono mediante parámetros morfométricos y rastreo manual*

La motilidad del cono de crecimiento requiere una continua reorganización del citoesqueleto de actina y microtúbulos, la cual es coordinada vía varias rutas de transducción de señales que usan Ca^{2+} como segundo mensajero (54, 244, 245). Moliner (200) describió previamente que el déficit de frataxina causa la disfunción mitocondrial en las neuronas sensitivas con despolarización mitocondrial, aumento de producción de ROS, fallo energético y disminución de la recaptación mitocondrial de Ca^{2+} . Esta disfunción mitocondrial provoca un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal mantenida en el tiempo, sin activar la entrada en apoptosis.

Además, en este trabajo hemos mostrado una alteración del citoesqueleto de actina y microtúbulos en los axones sensitivos y en el cono de crecimiento de las neuronas sensitivas del ratón YG8R, entonces siguiendo la línea de nuestros resultados en el modelo YG8R decidimos realizar un estudio funcional del cono de crecimiento de las neuronas sensitivas adultas deficientes para frataxina usando el nuevo modelo murino YG8sR para la FRDA. Con este estudio quisimos investigar si las alteraciones observadas en el citoesqueleto de actina y microtúbulos en las raíces del ganglio dorsal y en el cono de crecimiento de las neuronas sensitivas adultas del modelo YG8R podrían estar asociadas con un comportamiento aberrante del cono de crecimiento adulto.

Nuestros resultados muestran por primera vez una alteración morfológica y dinámica de los conos de crecimiento de las neuronas sensitivas adultas de ratones YG8sR con tan solo 2 meses de edad. Cuando analizamos la morfología de los conos de crecimiento de nuestro modelo encontramos una reducción en varios parámetros morfométricos como el área, el diámetro de feret, la circulari-

dad y solidez. Estos resultados coinciden con algunas alteraciones morfológicas observadas en los conos de crecimiento que observamos en el modelo YG8R. Por lo tanto, es viable pensar que estos cambios morfológicos también se deban a alteraciones en el citoesqueleto de actina y microtúbulos. La alteración morfológica del cono en esta edad tan temprana es bastante llamativa, porque nos hacen pensar que podría existir una afectación funcional de los conos durante el desarrollo embrionario.

Cuando rastreamos manualmente la dinámica del cono de crecimiento de las neuronas sensitivas adultas del modelo YG8sR observamos que los conos con tan solo 2 meses de edad se desplazaban menos, con una velocidad de desplazamiento reducida y con ángulos de giro menos variables y amplios (entre -1.781° y -90°) que los del ratón control Y47R (entre -15° y -128°). Ensayos en los que se rastrea el giro del cono usando gradientes específicos de factores neurotróficos producen valores mas pequeños de los ángulos de giro que hemos observado en nuestros experimentos. Por ejemplo, cuando se rastrea el cono en un tipo especial de cámaras durante 1-2 horas se producen ángulos entre 10° y 25° con una gran variabilidad (287, 288). Cuando se rastrea el cono usando cámaras microfluídicas durante horas y días se producen ángulos promedio de giro aun mas pequeños entre 10° y 15° (289, 290). Estas observaciones pueden explicarse debido a que en estos experimentos se rastrea el giro del cono de neuronas embrionarias o postnatales usando diferentes moléculas quimioatrayentes. Por lo tanto, pensamos que nuestros resultados evidencian un patrón de giro particular de los conos de crecimiento de las neuronas sensitivas adultas, el cual no podemos comparar con otros estudios porque no existen referencias publicadas.

In vivo las trayectorias axonales pueden estar influenciadas por muchas mas señales de guía, en nuestros experimentos in vitro la trayectoria de los axones está influenciada por solo dos factores neurotróficos [NGF y GDNF] dispersos por todo el medio de cultivo, y aun así hemos observado una reducción en la amplitud y variación de los ángulos de giro en los conos de crecimiento de las neuronas del ratón YG8sR con tan solo 2 meses de edad. Pensamos que estos resultados indican una alteración de la capacidad exploratoria del cono de su microambiente, necesaria para un apropiado crecimiento del axón hasta su tejido diana y su ramificación.

En general, en nuestros experimentos no observamos un incremento significativo de las alteraciones de la dinámica del cono a 6 y 9 meses de edad. Sin embargo, creemos que es posible que los defectos en la dinámica del cono a los 2 meses de edad pueden influir negativamente la conectividad y reparación de

las redes axonales sensitivas durante la edad adulta. Por lo que resulta muy interesante profundizar en estos estudios.

5.3.2 *Estudio de la dinámica de la morfología del cono mediante métodos basados en ordenador*

Cuando estudiamos la dinámica de la forma del cono de crecimiento en las neuronas sensitivas adultas de ratones YG8sR mediante el análisis de *eigenshape* y *tensores* estábamos interesados en confirmar que la afectación de la dinámica del cono observada mediante rastreo manual de la base del cono se mantenía cuando incluíamos en el análisis la morfología completa del cono. Encontramos que las dinámicas de los conos de ratones YG8sR exhibían patrones de movimiento aberrantes comparados a los del ratón control, especialmente a los 2 meses de edad, lo cual coincidía con nuestras observaciones usando el rastreo manual. Estos resultados confirman que, en edades tempranas, el déficit de frataxina podría estar alterando la dinámica del filopodio y lamelipodio, que son los mayores componentes del cono de crecimiento y de los cuales depende la capacidad exploratoria del cono.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la patogénesis de la neuropatía sensitiva en la FRDA implica un retraso en el desarrollo de las neuronas sensitivas o hipoplasia neuronal (150). Pensamos que el déficit de frataxina produce cambios en el citoesqueleto de actina y microtúbulos, así como también a un fallo en la señalización por Ca^{2+} y que éstos cambios producen un fallo en la dinámica de la forma del cono de crecimiento axonal, que produciría una formación aberrante de los axones sensitivos.

En el estudio proteómico del ganglio dorsal del ratón YG8R encontramos que la expresión de proteínas que controlan la extensión y guía axonal como Ruffy3, Crmp1, Crmp2, Crmp3 estaban reducidas a la baja. La expresión de estas proteínas es alta en neuronas en desarrollo y se regula a la baja con la edad, por lo tanto, pensamos que las alteraciones de estas proteínas podrían explicar la afectación morfológica y dinámica de los conos de crecimiento que hemos observado a los 2 meses de edad. Cambios en los niveles de expresión de estas proteínas en neuronas han mostrado tener un efecto similar: anomalías en la extensión axonal y guía axonal (291-293). En el sistema nervioso adulto, la ausencia o el incremento de la expresión de CRMP1, CRMP2, CRMP3 ha sido asociado con el remodelamiento anómalo de las conexiones nerviosas en desórdenes neuropsiquiátricos tales como esquizofrenia, depresión, Alzheimer y enfermedades priónicas. De forma interesante, CRMP2 parece tener un papel importante en el crecimiento y la regeneración axonal debido a que regula

los canales Ca^{2+} presinápticos en los ganglios de las raíces dorsales de ratas adultas (294), además interactúa con las proteínas motoras quinesina (30) y dineína (295), experimenta proteólisis por calpaina durante la degeneración de las neuritas (296) y sus niveles se regulan a la baja con la edad (260).

Las diferencias de los parámetros morfométricos y dinámicas del cono de crecimiento de las neuronas sensitivas de ratones YG8sR se perdían con la edad, exhibiendo un leve patrón de recuperación comparado al comportamiento de los conos del ratón control. Al comparar los patrones de movimiento de los conos de crecimiento del ratón control a los 2 meses de edad con los de 6 y 9 meses de edad, pudimos observar que los conos de 6 y 9 meses perdían uniformidad en las trayectorias de movimiento y aumentaban los desplazamientos horizontales, lo cual coincide con el hecho de que la capacidad intrínseca de crecimiento axonal de los axones periféricos disminuye con la edad. Sin embargo, en el caso de los conos de los ratones YG8sR con 6 y 9 meses de edad, los patrones de movimiento de los conos se caracterizaron por ganar uniformidad en las trayectorias de movimiento y aumentar los desplazamientos en el eje vertical, asemejándose a los patrones de movimiento de los conos control. Una posible explicación para estos resultados es que los factores neurotróficos utilizados como suplemento del medio de cultivo [GDNF y NGF] estén enmascarando el comportamiento del cono de las neuronas deficientes para frataxina adultas haciendo que su comportamiento se parezca más al comportamiento del control, el cual va desmejorando con la edad. El enmascaramiento es posible debido a que está bien descrito que mientras el factor NGF promueve la extensión del cono (297), GDNF promueve la supervivencia de las neuronas sensitivas, funciona como un quimioatrayente permitiendo que los conos de crecimiento neuronales giren (289) y reduce el colapso del cono inducido por otras señales de guía axonal, manteniendo los axones en un estado competente de crecimiento (298). Consideramos que se necesitan estudios adicionales para lograr entender este patrón con mayor claridad.

Nuestros resultados muestran por primera vez que tanto la morfología como la dinámica del cono de crecimiento de las neuronas sensitivas está afectada por el déficit de frataxina en el modelo YG8sR en edades tempranas. Consideramos que un estudio más profundo del cono de crecimiento a nivel embrionario o postnatal podrían confirmar la afectación de proteínas relacionadas con la guía y extensión axonal y su relación con frataxina.

5.3.3 Metodología basada en ordenador de la dinámica de la morfología del cono

Para realizar el estudio de la dinámica del cono basado en ordenador hemos personalizado a nuestros datos dos métodos. El primero fue propuesto por Goodhill y col. (231) y que consideramos se puede adaptar a otro tipo de estructuras celulares diferentes al cono. El segundo es el método de *análisis tensorial* que es una aplicación novedosa y mas poderosa que nos permite describir de forma cuantitativa y cualitativa la actividad dinámica del cono de crecimiento. Los dos métodos tienen el potencial de proveer información cuantitativa y cualitativa de las diferencias del comportamiento del cono entre diferentes condiciones (p.e. genotipos, tratamientos). En este trabajo solo hemos presentado la información cualitativa que corresponde a los diferentes patrones de movimiento del cono, que dada la complejidad de la dinámica del cono no deben subestimarse.

Existen otras aproximaciones que permiten medir la dinámica de la morfología del cono. En una de ellas se debe proveer una lista en cada momento (tiempo) de la cuantificación del filopodio en termino de número, posiciones, ángulos, longitud, y del lamelipodio en termino del área total del cono. Aunque esta aproximación puede ser útil tiene varias limitaciones. Primero se debe tener una resolución suficiente para poder diferenciar todos los filopodios individuales, lo cual puede llegar a ser una tarea bastante difícil cuando se analiza el comportamiento del cono en largos periodos de tiempo, especialmente in vivo. Segundo, se ignoran varios aspectos de la forma del cono como el lamelipodio, y tercero, esta metodología depende en gran medida de la intuición humana para determinar donde está la mayor varianza de la forma del cono (231). También se podría pensar en teñir el cono usando sondas o proteínas fluorescentes y realizar el análisis de imagen in vivo o in vitro. Estas imágenes de fluorescencia luego pueden ser analizadas con herramientas basadas en ordenador que permiten cuantificar de forma automática el filopodio (299). Sin embargo, las neuronas adultas no son células fáciles de transfectar y además la adición de sondas o de proteínas fluorescentes podrían inducir cambios en la morfología del cono que no tendrían nada que ver con frataxina. Al analizar la dinámica del cono in vivo mediante microscopia de contraste de fases tuvimos que hacer un gran esfuerzo para poder extraer toda la información del contorno de los conos, estamos completamente seguros de que la información extraída de los archivos time lapse no está alterada por factores distintos a los del medio de cultivo y el déficit de frataxina.

Adicional a los resultados descritos en este trabajo hemos obtenido también información cuantitativa relacionada con el cambio de posición del cono en

el tiempo, así como también el cambio del área de los conos en el tiempo, y los ángulos que presentan los patrones de movimiento de los conos, pero debido al tiempo que requiere el procesamiento de esta información no fue posible incluirla en este trabajo. Consideramos que la metodología generada para nuestros estudios es valiosa, que provee información metodológica novedosa que puede ahorrar tiempo a quienes quieran analizar cambios en la morfología del cono neuronal u otras estructuras celulares de interés en diferentes condiciones usando experimentos in vivo. Normalmente muchos de los detalles y parámetros que describimos en nuestro trabajo no son provistos en la literatura ni en los protocolos.

5.4 El déficit de frataxina reduce el crecimiento y la regeneración axonal

La regeneración axonal es otro proceso neuronal intrínseco de las neuronas sensitivas adultas, que requiere de la reactivación de todas vías moleculares implicadas en el crecimiento axonal. La capacidad regenerativa de las subpoblaciones neuronales del DRG es diferencial, algunos estudios recientes han demostrado que tras realizar una transección del nervio ciático en condiciones de in vivo las neuronas propioceptivas (neuronas grandes mielinizadas) logran regenerar eficientemente sus axones tras sufrir el daño, mientras que las neuronas sensitivas cutáneas (neuronas pequeñas no mielinizadas y medianas levemente mielinizadas) sufren una neuropatía periférica de fibras pequeñas, un síndrome neurológico asociado con el dolor neuropático y muerte neuronal (300). Para regenerar un axón dañado las neuronas necesitan primero coordinar el citoesqueleto de actina y microtúbulos a través de varias vías de señalización que involucran la señalización por Ca^{2+} , y posteriormente necesitan enviar una señal de supervivencia que viaja a través del axón hacia el soma que permitirá sostener la respuesta regenerativa a través del transporte axonal. A lo largo de este trabajo hemos mostrado que el déficit de frataxina causa alteraciones en la morfología y en la dinámica de los conos de crecimiento de las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8R e YG8sR, por lo tanto es válido pensar que siendo las neuronas propioceptivas del DRG el primer sitio de afectación en la FRDA su capacidad regenerativa podría estar siendo alterada como parte del proceso degenerativo axonal de la FRDA.

Para investigar la respuesta regenerativa de las neuronas sensitivas adultas usamos un modelo de axotomía in vitro usando el cultivo primario en cámaras microfluídicas. Nuestros resultados muestran que el déficit de frataxina puede disminuir la tasa de crecimiento axonal y la respuesta regenerativa intrínseca de

las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8sR. Específicamente, observamos una densidad axonal reducida en el compartimento axonal antes de realizar la axotomía, que coincidió con una reducción en la respuesta regenerativa tras realizar la axotomía. Sin embargo, al igual que en los estudios de la dinámica de los conos, observamos una mayor afectación de las neuronas a los 2 meses de edad y un patrón de mejoría en las neuronas con 6 y 9 meses de edad. Aunque la respuesta de crecimiento y regeneración incrementó con la edad de los ratones YG8sR, esta respuesta no llegó a ser igual que la de las neuronas control (Figuras 4.32, 4.34). Estos resultados fortalecen la idea de que el suministro de los factores neurotróficos NGF y GDNF estarían enmascarando la verdadera capacidad de crecimiento y la regeneración axonal de las neuronas deficientes para frataxina en edades mayores a 2 meses de edad. Hasta la fecha este efecto protector se ha observado en neuronas corticales embrionarias deficientes para *FXN*, Katsu-Jiménez y col. (301) mostraron que la introducción del factor neurotrófico BDNF en estas neuronas prevenía el desarrollo de la neuropatología y el fenotipo atáxico. No existe evidencia publicada relacionada con la expresión de los receptores para NGF y GDNF en neuronas sensitivas con la edad que nos permita explicar este patrón de mejoría, por lo que pensamos que resulta ser un campo bastante llamativo por investigar más a fondo.

Al analizar las redes axonales construidas por las neuronas sensitivas del ratón YG8sR observamos que éstas presentaban una morfología aberrante distintiva de las redes construidas por las neuronas del ratón control Y47R. Estas alteraciones se caracterizaron por la desorganización de las trayectorias axonales, el incremento de signos de degeneración axonal como la fragmentación de los axones en los extremos más distales, y el incremento de acumulaciones (hinchazón, esferoides) a lo largo de los axones (Figuras 4.32, 4.34). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la función de frataxina es necesaria para una apropiada guía axonal y posiblemente reflejen las alteraciones morfológicas y dinámicas en el cono de crecimiento que se han descrito ampliamente en este trabajo. El incremento de signos de degeneración axonal en los axones en todas las edades coinciden con las observaciones de (200, 236) en el modelo YG8R a 24 meses de edad, por lo cual consideramos que el modelo YG8sR presenta una afectación morfológica más temprana.

Al observar los cultivos en las cámaras microfluídicas se puede apreciar la ausencia de signos que indiquen la afectación de los somas de las neuronas sensitivas del ratón YG8sR, incluso después de haber realizado la axotomía. En cambio si hemos observado la alteración morfológica de los axones en sus extremos más distales (Figuras 4.34). Estas observaciones apoyan la hipótesis

de que el proceso degenerativo axonal asociado a la FRDA se da por medio de un fenómeno de *dying back*.

¿Por medio de que mecanismos el déficit de frataxina podría estar causando las alteraciones en el crecimiento y la regeneración axonal en las neuronas sensitivas adultas?. Como lo hemos descrito en el capítulo 1 el crecimiento axonal y la regeneración axonal dependen de varios procesos celulares entre los que resaltan la dinámica mitocondrial; la regulación del citoesqueleto de actina y microtúbulos; y la señalización por Ca^{2+} . Una larga línea de evidencia obtenida a partir de pacientes, modelos celulares y animales muestra que las células FRDA presentan alteraciones en la función dinámica mitocondrial (200, 203, 218, 302) que incrementan el estrés oxidativo; alteraciones del citoesqueleto de actina (213, 214) y microtúbulos (215) que afectan la homeostasis axonal; y una alteración de las rutas de señalización mediadas por Ca^{2+} causadas por la alteración de la capacidad tamponadora de calcio por la mitocondria (200, 203, 303).

Entonces siendo que la regeneración axonal es una respuesta intrínseca de las neuronas sensitivas que se mantiene durante la vida del organismo, es posible que la alteración de todos estos procesos produzcan un daño axonal suficiente para activar la respuesta regenerativa en los axones sensitivos adultos durante las primeras etapas de la enfermedad, pero que no podría sostenerse hasta las etapas más tardías de la enfermedad, dónde la acumulación del daño axonal se haría insostenible.

El estudio de cofilina en las raíces de los ganglios dorsales de ratones YG8R con 24 meses de edad evidenció, un incremento de la actividad de cofilina asociado con una reducción de su fosforilación (Figura 4.14). Este resultado es interesante debido a que Stern y col. (240) mostraron la importancia de la regulación de la actividad de cofilina para activar la respuesta regenerativa axonal del nervio facial murino, particularmente demostraron que para activar la respuesta regenerativa del nervio facial tras realizar una axotomía in vivo los niveles de fosforilación de cofilina (fosforilación en el residuo Ser3) disminuían y los niveles de cofilina activa se incrementaban en el axoplasma, lo cual los autores proponen podría estimular la dinámica de actina en los extremos más distales de los axones axotomizados, facilitando la regeneración axonal. Entonces, es viable pensar que la desregulación de la actividad de cofilina en las raíces de los ganglios dorsales de ratones YG8R podría indicar la activación de la respuesta regenerativa causada por la patología axonal asociada al déficit de frataxina. Sin embargo, quedan varios puntos por investigar, como por ejemplo si la desregulación de cofilina se mantiene en las raíces del ganglio dorsal del

ratón YG8sR y si éste está relacionado con la respuesta regenerativa de los axones sensitivos deficientes para frataxina observada en este trabajo.

En general podemos observar que el déficit de frataxina en las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8sR reduce la capacidad de crecimiento y regeneración axonal comparada con la del ratón control a los 2, 6 y 9 meses de edad, lo cual apoya la hipótesis de que el déficit de frataxina altera el remodelamiento de las sinapsis de los axones sensitivos, así como también la capacidad para regenerar y reinervar los tejidos diana. Aunque no hemos observado un efecto progresivo con la edad, consideramos que es muy probable que en tanto aumenta la edad del organismo, las neuronas propioceptivas podrían estar perdiendo su capacidad intrínseca para formar conos de crecimiento y regenerar sus axones debido al microambiente patogénico creado por el déficit de frataxina.

De igual manera, es válido pensar que durante el desarrollo, el crecimiento axonal también estaría afectado, así como la dinámica del cono de crecimiento y la guía axonal. Trasladando esto a la fisiopatología que presentan los pacientes, es muy posible que la inervación de las neuronas sensitivas no sea totalmente correcta, por no llegar de forma efectiva muchos de los axones a los tejidos diana. Pocos estudios se han llevado a cabo en pacientes FRDA para estudiar como es la inervación final de los axones en las estructuras especializadas tanto en la piel como en el músculo. Nolano y col. (304) realizaron un estudio de piel de pacientes FRDA observando que existía un empobrecimiento de inervaciones cutáneas. En este trabajo ponían de manifiesto la diferencia observada entre los resultados obtenidos en piel y los previamente descritos en nervio sural donde no se aprecia afectación de las fibras desmielinizadas (305). En el ratón YG8R se testaron los husos neuromusculares y su inervación. El número y morfología del huso era correcta, y la inervación de la neurona grupo Ia también, pero el grosor del axón era menor respecto al ratón control C57BL/6J (139). Todos estos datos, hasta la fecha han hecho pensar que el problema era una degeneración tipo *dying-back* posterior a la inervación. Fue hasta el año 2013 cuando Koeppen y Mazurkiewicz (150), gracias a sus estudios en necropsias de pacientes, propusieron que la neuropatología de la FRDA podría ser una combinación entre un retraso en el desarrollo y una degeneración axonal tipo *dying-back*. La cuestión es cómo y por qué se producía este problema durante el desarrollo. Nuestros resultados permiten apoyar la hipótesis de que la inervación no se pueda producir correctamente, debido a los problemas de crecimiento y guía axonal. Cuando un axón no es capaz de inervar correctamente puede ser eliminado a través de la muerte neuronal fisiológica (306). Por lo tanto, la alteración en la dinámica del cono y su afectación en la maquinaria

de crecimiento axonal y regeneración explicaría porque en el DRG se puede apreciar una hipoplasia.

Conclusiones

1. Las neuronas sensitivas del DRG del ratón YG8R presentan una alteración en la dinámica de los microtúbulos asociada con el incremento de los niveles de acetilación de los microtúbulos en el segmento axonal cercano al extremo más distal del axón, sugiriendo una posible alteración del transporte axonal.
2. La longitud de las neuritas y el área del cono de crecimiento de las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8R están reducidas de forma significativa, sugiriendo una afectación del homeostasis axonal en los extremos más distales de los axones sensitivos adultos, los cuales aseguran la transmisión nerviosa desde el sistema nervioso periférico hacia el sistema nervioso central.
3. El déficit de frataxina produce un incremento de los niveles de actina F y actina G en los conos de crecimiento y en los segmentos axonales proximales al cono crecimiento de las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8R, sugiriendo que la regulación del ensamble y desensamble de actina esta siendo alterada por la ausencia de frataxina en los axones sensitivos adultos y también en sus extremos más distales.
4. El déficit de frataxina incrementa la actividad de cofilina-1 en las raíces de los ganglios dorsales del ratón YG8R a través de la desregulación de la actividad de las proteínas que controlan su fosforilación en el residuo

- Ser3. El incremento en los niveles de cofilina sugiere que ésta estaría contribuyendo al proceso degenerativo axonal de la FRDA bien sea formando estructuras patogénicas como las barras de actina, las cuales obstaculizan el transporte axonal y la transmisión nerviosa, y/ó promoviendo una reorganización aberrante de los filamentos de actina en los axones sensitivos.
5. El déficit de frataxina incrementa la actividad de la quinasa de cofilina-1 LIMK1 y de la fosfatasa *Chronophin* en las raíces de los ganglios dorsales del ratón YG8R, sugiriendo una desregulación de la actividad de proteínas pertenecientes a las vías de señalización de las GTPasas Rac, Cdc42, y RhoA.
 6. El déficit de frataxina incrementa la expresión del complejo ARP2/3 en las raíces de los ganglios dorsales del ratón YG8R, posiblemente como respuesta a la hiperactividad de cofilina-1 y sugiriendo un incremento aberrante de la polimerización de actina.
 7. El déficit de frataxina produce una regulación a la baja de la expresión de proteínas del citoesqueleto neuronal en los ganglios de las raíces dorsales del ratón YG8R. Muchas de éstas proteínas son isoformas de actina, tubulina, y proteínas reguladoras de la organización de los filamentos de actina (Gelsolina, Actinina, Formina) y microtúbulos (MAP1A y MAP1B). Además, también produce la reducción en la expresión de las proteínas que conforman los neurofilamentos, NF-L, NF-H y NF-M. El déficit de frataxina también causa la reducción en la expresión de proteínas motoras basadas en microtúbulos (quinesinas, dineínas) y en los filamentos de actina (miosinas). Adicionalmente, el déficit de frataxina reduce la expresión de proteínas implicadas en el tráfico vesicular de la sinapsis nerviosa como Clatrina, el complejo AP-2 y Dinamina.
 8. El déficit de frataxina produce una regulación a la baja de la expresión de proteínas esenciales para el crecimiento y guía axonal en los ganglios de las raíces dorsales del ratón YG8R que incluyen la proteína CRMP2 y las proteínas del citoesqueleto de actina y microtúbulos.
 9. El déficit de frataxina produce una alteración de la dinámica del cono de crecimiento de las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8sR, particularmente a los 2 meses de edad. Estos conos de crecimiento presentan una morfología aberrante, una velocidad de desplazamiento reducida con ángulos de giro más pequeños y patrones de movimiento aberrantes. Estos resultados sugieren que el déficit de frataxina altera la navegación de

los axones sensitivos hacia sus objetivos diana durante el desarrollo embrionario y posiblemente afecta la función de las sinapsis en los tejidos inervados durante la edad adulta.

10. El déficit de frataxina produce una reducción en el crecimiento y la regeneración axonal de las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8sR. La afectación es mayor a los 2 meses de edad, sugiriendo una afectación durante el desarrollo embrionario.
11. El déficit de frataxina en las neuronas sensitivas adultas del ratón YG8sR produce un incremento de los signos de la degeneración axonal antes y después de realizar una axotomía in vitro sin llegar a observar signos morfológicos de muerte neuronal en las cámaras del SOMA, sugiriendo que el déficit de frataxina causa la degeneración axonal de las neuronas sensitivas mediante el fenómeno del *dying back*.

En general, todos nuestros resultados hacen plausible la idea de que la muerte de las neuronas sensitivas del ganglio dorsal que se presenta en los pacientes FRDA tendrían un proceso degenerativo mediado por un mecanismo de *dying back*, que incluye una desregulación de la actividad de *cofilina-1* y la reducción de la capacidad intrínseca de las neuronas sensitivas para crecer y regenerar sus axones.

Conclusions

1. Adult sensory neurons of YG8R mouse model exhibit the alteration of microtubule dynamics related to the increase of tubuline acetylation. The results of the experiments suggest that this phenomena is present in the most distal part of their axons, suggesting an unlikely alteration of axonal transport.
2. Adult sensory neurons of YG8R mouse model exhibit significantly shorter neurites with smaller neurites growth cones of neurites and a reduction of the area of growth cones. This phenomena suggests that the axonal homeostasis is affected in the most distal part of the adult sensory axons, therefore affecting the transmission of a nerve impulse from the peripheral to the central nervous system.
3. The absence of frataxin in the YG8R mouse produces an increase of filamentous and globular actin into the growth cones of adult sensory neurons and in the closest axonal segment. This phenomena is an indication of alterations of the equilibrium of the assembly/disassembly of actin at the tip of sensory axons.
4. The absence of frataxin produces an increase of activity of cofilin-1, particularly at the roots of dorsal ganglia of YG8R mouse model. This phenomena happens throught the desregulation of the activity of proteins that regulates phosphorylation of cofilin-1 at Ser3 amino acid. The increase of

the activity of cofilin-1 contributes to the axon degenerative process of FRDA, specially in pathogenic structures like the actin rods and/or inducing aberrant organization of actin filaments. These structures contribute to block axonal transport and the transmission of a nerve impulse.

5. The absence of frataxin produces an increment of the expression of the general phosphatase *Chronophin*. In addition, it produces an increase of the activity of the neuronal specific kinase LIMK1 in roots of dorsal ganglia of YG8R mouse model. This observed phenomena indicates a desregulation of the activity of other proteins upstream in the pathway that regulates the activity of cofilin like the GTPases Rac, Cdc42, and RhoA.
6. The absence of frataxin produces an increase of the expression of complex ARP2/3 in roots of dorsal ganglia of YG8R mouse model. One of the potential causes of this phenomena could be a reaction to the hiperactive cofilin, which suggest an aberrant increase of the polimerization of actin.
7. The absence of frataxin produces downregulation of the expression of several proteins which are part of neuronal cytoskeleton in the dorsal ganglia of YG8R mouse model. Most of these proteins are isoforms of actin, tubulin, actin and microtubule binding proteins such as Gelsolin, Actinin, Formin, MAP1A y MAP1B, which are responsible for the regulation of the organization of actin filaments and microtubules. Furthermore, the levels of the expression of neurofilaments (NF-L, NF-H y NF-M), isoforms of motor proteins (which moves through microtubules (kinesin, dynein) and actin (myosin)) are also downregulated. Finally, the expression of proteins required for vesicular traffic were also downregulated (clathrin, AP2 complex and dynamin).
8. The absence of frataxin in the dorsal ganglia of YG8R mouse model produces downregulation of the expression of proteins that regulate (Rufy and Crmp2), which are important for axonal guidance (actin, tubulin, actin binding proteins and microtubule binding proteins).
9. The absence of frataxin induces alterations of growth cone dynamics of adult sensory neurons of YG8sR mouse model, particularly at 2 months of age. These growth cones exhibit an aberrant morphology, lower velocity of growth and an aberrant turning. These results suggest that the absence of frataxin affects the growth cone pathfinding during development of sensory neurons. It is likely that this phenomena has an impact on the sinapsis of inervated tissues during the adulthood.

-
10. The absence of frataxin affects negatively neuronal outgrowth and regeneration of adult sensory neurons of YG8sR mouse. This alteration is higher at 2 months of age, suggesting alterations during the development of sensory neurons.
 11. The absence of frataxin in adult sensory neurons of YG8sR mouse produces an increase of signs of axonal degeneration before and after perform an *in vitro* axotomy without observe sighs of death of neuronal somas, suggesting that the absence of frataxin causes axonal degeneration of adult sensory neurons by a mechanism like *dying back*.

As a whole, our results make plausible the idea that the death of sensory neurons of dorsal root ganglia that is present in FRDA patients, would involve a degenerative process like *dying back*, which includes a deregulation of the activity of *cofilin-1* and the loss of the intrinsic high capacity of sensory neurons to grow and regenerate their axons.

Capítulo 8

Anexos

Un.Prot- Score	% (95 %)	Cob	P (95 %)	UniProt ID	Nombre UniProt	Función abreviada de la proteína
2	77,86		78	P60710	Actin, cytoplasmic 1	En los vertebrados se han identificado tres grupos principales de isoformas de actina: α , β y γ . Las actinas- α se encuentran en tejidos musculares y son el mayor constituyente del aparato contráctil. Las isoformas de actina β y γ coexisten en la mayoría de células como componentes del citoesqueleto y como mediadores de la motilidad celular.
49,23	77,87		77	P63260	Actin, cytoplasmic 2	
12,56	55,44		32	P68033	Actin, alpha-cardiac muscle 1	
0	49,20		27	P63268	Actin, gamma-enteric smooth muscle	
0	49,60		31	P68134	Actin, alpha-skeletal muscle	
21,1	76,66		43	P62737	Actin, aortic-smooth muscle	
2	1,70		1	Q5DTU0	Actin-filament-associated-protein I-like 2	Incrementa la actividad quinasa del proto-oncogene tyrosine-protein kinasa SRC.
7,79	16,75		4	Q99JY9	Actin-related protein 3	Componente de unión a ATP del complejo Arp2/3, el cual esta implicado en la regulación de la polimerización de actina y media la formación de redes ramificadas de actina.

Tabla 8.1: Proteínas subreguladas en el ganglio de la raíz dorsal del ratón YG8R relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos-continuación

Un.Prot- Score	% Cob (95 %)	P (95 %)	UniProt ID	Nombre (UniProt)	Función abreviada de la proteína
11,79	19,74	8	P13020	Gelsolin	Pertenece a la superfamilia gelsolina. Proteínas de unión a actina reguladas por Ca^{2+} . <i>Gelsolin</i> y <i>advillin</i> , promueven el ensamble de monómeros de actina en filamentos (nucleación) y la ruptura de los filamentos ya formados.
10,92	14,41	6	O88398	Advillin	Podría tener funciones únicas en la morfogénesis de células neuronales, las cuales forman el ganglio. En neo-natos, juega un papel en la regeneración axonal de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal.
2	1,12	1	Q7TPR4	Alpha-actinin-1	Proteína de reticulación de la actina F. Su función es anclar actina a una variedad de estructuras intracelulares.
0	1,95	1	P57780	Alpha-actinin-4	Proteína de reticulación de la actina F. Esta implicada en tráfico vesicular y el ensamble de uniones estrechas.
0,09	3,75	0	P10107	Annexin A1	Proteínas de unión a membrana dependiente de Ca^{2+} . Promueve la reorganización del citoesqueleto de actina, la polarización y a migración celular.
5,89	10,91	3	P07356	Annexin A2	

Tabla 8.2: Proteínas subreguladas en el ganglio de la raíz dorsal del ratón YG8R relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos (MTs)-continuación

Un.Prot-Score	% Cob (95 %)	P (95 %)	UniProt ID	Nombre (UniProt)	Función abreviada de la proteína
14,52	16,85	10	Q07076	Annexin A7	Proteína de unión a membrana-dependiente de Ca^{2+} que podría promover la fusión de membranas y está implicada en exocitosis.
53,89	45,32	29	P14824	Annexin A6	Proteína de unión a membrana-dependiente de Ca^{2+} que podría regular la liberación de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} .
30,49	24,84	16	Q9D2V7	Coronin-7	Proteína reguladora de actina F implicada en el transporte anterogrado del Golgi al endosoma.
2,07	0,32	1	Q91ZU6	Dystonin	Proteína conectora del citoesqueleto que actúa como un integrador de filamentos intermedios, las redes de actina y MTs. En las neuronas del ganglio dorsal, regula la organización y la estabilidad de la red de MTs y permite el transporte axonal.
2,16	0,35	1	P11531	Dystrophin	Ancla la matriz extracelular al citoesqueleto vía actina F. Es un componente del complejo de distrofina-glicoproteína que se acumula en las uniones neuromusculares y en una gran variedad de sinapsis en el sistema nervioso central y periférico.

Tabla 8.3: Proteínas subreguladas en el ganglio de la raíz dorsal del ratón YG:8R relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos (MTs)-continuación

Un.Prot-Score	% (95%)	Cob (95%)	P (95%)	UniProt ID	Nombre (UniProt)	Función abreviada de la proteína
0,42	0,94	1		Q05AA6	Dystrophin-related protein 2	Drp2 contribuye con el complejo periaxina-DRP2-distroglicano (PDG) en la región abaxonal de la membrana de mielina que guía a la creación de las bandas de Cajal.
33,53	9,57	17		Q80X90	Filamin-B	Proteína de unión a actina. Forma puentes cruzados entre filamentos de actina. Es un soporte estructural de la superficie de la célula y conecta los constituyentes de la membrana celular al citoesqueleto de actina.
2	1,38	1		A2APV2	Formin-like protein 2	Tiene un papel en la regulación de la morfología celular y la organización del citoesqueleto.
16,13	27,78	14		P46660	Alpha-internexin	Filamento intermedio neuronal clase IV. Puede auto-ensamblarse. Esta implicado en la morfogénesis de neuronas.
0,06	0,00	0		Q9QYR6	Microtubule-associated protein 1A	Es una proteína asociada a MTs, implicada en el ensamblaje filamentosos entre los MTs y otros elementos esqueléticos.

Tabla 8.4: Proteínas subreguladas en el ganglio de la raíz dorsal del ratón YG8R relacionadas con el **citoesqueleto de actina** y **microtúbulos (MTs)**-continuación

Un.Prot-Score	% Cob (95 %)	P (95 %)	UniProt ID	Nombre (UniProt)	Función abreviada de la proteína
19,83	6,29	10	P14873	Microtubule-associated protein 1B	Proteína asociada a MTs. Durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso, regula procesos como la extensión y guía axonal. Durante la edad adulta, regula la estructura y fisiología de las espinas dendríticas en las sinapsis glutamatérgicas.
38,65	23,30	23	P19246	Neurofilament-heavy polypeptide	Proteínas de neurofilamentos que incluyen: NF-L (<i>light</i> -ligero), NF-M (<i>medium</i> -media), y NF-H (<i>heavy</i> -pesada). Mantienen el calibre de los axones. El NF-H tiene una función importante en axones maduros que no es provista por las otras proteínas de NF .
100,16	68,51	94	P08551	Neurofilament-light polypeptide	
55,65	41,98	40	P08553	Neurofilament-medium polypeptide	
31,47	20,92	15	O55103	Periaxin	Proteína de andamiaje que funciona como parte del complejo distroglicano en las células de Schwann. Asegura el mantenimiento de la vaina de mielina en los axones del sistema nervioso periférico, esencial para la transmisión normal de los impulsos nerviosos y el estímulo sensitivo.

Tabla 8.5: Proteínas subreguladas en el ganglio de la raíz dorsal del ratón YG8R relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos (MTs)-continuación

Un.Prot-Score	% Cob (95 %)	P (95 %)	UniProt ID	Nombre (UniProt)	Función abreviada de la proteína
47,62	45,89	27	P15331	Peripherin	Tipo de filamento intermedio tipo III, con especificidad neuronal. Se piensa que tiene un papel durante la elongación de las neuronas en el desarrollo embrionario y la regeneración axonal.
84,26	9,76	39	Q9QXS1	Plectin	Es una proteína que permite el entrelazado de los filamentos intermedios con los MTs, y de los microfilamentos a los desmosomas o hemidesmosomas.
19,64	41,55	9	P42208	Septin-2	Las septinas se consideran el cuarto componente del citoesqueleto. Tienen un sitio de unión a GTP. Actúan como andamio, se asocian con los filamentos de actina, los MTs y con fosfolípidos de la membrana. La Septina-2 facilita el transporte de vesículas manteniendo los MTs poliglutamilados.
67,82	16,34	39	P16546	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	También denominada fodrina. Esta implicada en el entrecruzamiento de actina. Interacciona con calmodulina en una forma dependiente de Ca^{2+} .
58,28	16,46	30	Q62261	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	

Tabla 8.6: Proteínas subreguladas en el ganglio de la raíz dorsal del ratón YG8R relacionadas con el **citoesqueleto de actina** y **microtúbulos (MTs)**-continuación

Un.Prot- Score	% Cob (95%)	P (95%)	UniProt ID	Nombre (UniProt)	Función abreviada de la proteína
10,88	4,68	6	P26039	Talin-1	Proteína del citoesqueleto que se concentra en regiones de contactos célula-superficie. Es uno de los mayores componentes de las placas de adhesión focal.
4,86	1,52	2	Q71LX4	Talin-2	
35,43	53,44	22	P683696	Tubulin alpha-1A chain	
4	53,44	22	P05213	Tubulin alpha-1B chain	
0	48,33	20	P68373	Tubulin alpha-1C chain	
0	38,89	13	P05214	Tubulin alpha-3 chain	La tubulina es el mayor constituyente de los MTs. tubulina es un dímero constituido por dos polipéptidos: α y β tubulina. Un tercer tipo de tubulina es la γ , localizada específicamente en el centrosoma, donde desempeña un papel clave en el ensamblaje de los MTs. Los dímeros de tubulina polimerizan para formar los microtúbulos. Tanto la α como la β tubulina se unen a GTP.
0	41,74	18	P68368	Tubulin alpha-4A chain	
0	30,73	14	Q9JJZ2	Tubulin alpha-8 chain	
13	18,43	9	Q7TMM9	Tubulin beta-2A chain	Es importante en el proceso de guía axonal en los tractos axonales del sistema nervioso central y periférico.
0	18,43	9	Q9CWF2	Tubulin beta-2B chain	

Tabla 8.7: Proteínas subreguladas en el ganglio de la raíz dorsal del ratón YG8R relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos (MTs)-continuación

Un.Prot-Score	% Cob (95%)	P (95%)	UniProt ID	Nombre (UniProt)	Función abreviada de la proteína
0,55	17,56	9	Q9ERD7	Tubulin beta-3 chain	Es importante en el proceso de guía axonal y el mantenimiento del axón.
2,18	12,34	6	Q9D6F9	Tubulin beta-4A chain	
0	8,09	3	P6837	Tubulin beta-4B chain	
0	18,47	9	P99024	Tubulin beta-5 chain	
0	8,28	4	Q922F4	Tubulin beta-6 chain	
4,09	8,59	2	Q8CIV8	Tubulin-specific chaperone E	Se requiere para una correcta organización del citoesqueleto de MTs y el mantenimiento de la red de MTs neuronales.
33,77	48,71	24	P20152	Vimentin	Es un filamento intermedio tipo III que está presente en varias células no epiteliales, especialmente en células madre mesenquimales. La vimentina se adhiere al núcleo, al retículo endoplásmico, y a la mitocondria, de forma lateral o terminal.
1,15	10,81	2	P16858	Gliceraldehido-3-fosfato	Tiene actividad deshidrogenasa y nitrosilasa, como resultado Gapdh presenta funciones en la glucólisis y el núcleo. Modula la organización y el ensamble del citoesqueleto.

Tabla 8.8: Proteínas subreguladas en el ganglio de la raíz dorsal del ratón YG8R relacionadas con el **citoesqueleto de actina** y **microtúbulos (MTs)**-continuación

Un.Prot- Score	% (95 %)	Cob (95 %)	P (95 %)	UniProt ID	Nombre (UniProt)	Función abreviada de la proteína
9,64	11,94	5	Q9D394	Protein RUFY3	Actúa en la generación de la polaridad neuronal y el crecimiento axonal. Regula la localización subcelular de <i>fascin</i> y <i>drebrin</i> en los conos de crecimiento.	
14,7	21,85	8	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2	Actúan en el desarrollo y la polarización neuronal, en la extensión y guía axonal, colapso del cono de crecimiento. Es necesaria para la señalización mediada por semaforinas clase 3 y el subsecuente remodelamiento del citoesqueleto.	
10,54	16,32	6	Q62188	Dihydropyrimidinase-related protein 3		
12,13	20,45	7	P97427	Dihydropyrimidinase-related protein 1		

Tabla 8.9: Proteínas subreguladas en el ganglio de la raíz dorsal del ratón YG8R relacionadas con la **extensión y guía axonal**

Un.Prot-Score	% Cob (95%)	P (95%)	UniProt ID	Nombre (UniProt)	Función abreviada de la proteína
23,8	15,14	15	P17427	AP-2 complex subunit alpha-2	Componente del complejo adaptador de proteínas-2 (AP-2). Su función es transportar proteínas en vesículas en varias rutas de tráfico de membranas.
29,44	13,37	15	Q68FD5	Clathrin-heavy chain-1	Clathrin es una proteína que forma el recubrimiento de las microcavidades de membranas celulares y vesículas.
30,49	24,84	16	Q9D2V7	Coronin-7	Proteína reguladora de actina F implicada en el transporte anterogrado del Golgi al endosoma.
5,22	5,11	3	P46460	Vesicle-fusing ATPase	Se requiere para el transporte mediado por vesículas. Cataliza la fusión de las vesículas dentro de la cisternas del Golgi.
6,9	5,30	4	O08788	Dynactin subunit-1	Complejo activador de la dineína, la une a su cargo y regula su actividad. En neuronas, regula la estabilidad de los MTs promoviendo su formación, nucleación y polimerización e inhibiendo la despolimerización.

Tabla 8.10: Proteínas subreguladas en el ganglio de la raíz dorsal del ratón YG8R relacionadas con el **transporte axonal**

Un.Prot- Score	% Cob (95%)	P (95%)	UniProt ID	Nombre (UniProt)	Función abreviada de la proteína
27,12	4,69	15	Q9JHU4	Cytoplasmic-dynein-1 heavy chain-1	Proteína motora, su función es transportar vesículas y organelas a lo largo del extremo (-) de los MTs (transporte retrogrado en los axones). Este transporte depende de ATP. Su estructura incluye dos cadenas pesadas idénticas, dos intermedias, y dos subunidades pequeñas.
5,19	9,55	4	O88485	Cytoplasmic-dynein-1 intermediate chain-1	Median la unión de la dineína a otras proteínas de carga y a proteínas adaptadoras.
6,59	9,97	4	O88487	Cytoplasmic-dynein-1 intermediate chain-2	
1,4	3,25	1	Q6PDL0	Cytoplasmic-dynein-1-light-intermediate chain-2	
2,43	0,81	1	P39053	Dynammin-1	Proteína citosólica, esencial para la liberación de vesículas completas.
7,65	5,63	4	P58281	Dynammin-like 120 kDa protein, mitochondrial	Es una GTPasa que regula la fusión mitocondrial y la estructura de las crestas en la membrana mitocondrial interna(MMI). Contribuye a la síntesis de ATP y regula la apoptosis.

Tabla 8.11: Proteínas subreguladas en el ganglio de la raíz dorsal del ratón YG8R relacionadas con el **transporte axonal**-
continuación

Un.Prot-Score	% Cob (95 %)	P (95 %)	UniProt ID	Nombre (UniProt)	Función abreviada de la proteína
2,18	1,56	1	P33175	Kinesin-heavy-chain isoform-5A	Las Kinesinas son una familia de proteínas motoras que median el transporte intracelular anterógrado sobre los MTs. Las subunidades Kif5a y Kif5c hacen parte de las proteínas que conforman un complejo multi-subunidades que contribuye al transporte axonal de neurofilamentos (NFM, NFM y NFL) y vesículas. Su movimiento requiere ATP.
0	1,67	1	P28738	Kinesin-heavy-chain isoform-5C	Está conformada por dos cadenas pesadas y dos livianas. Esta proteína es responsable del transporte anterógrado de la mitocondria y lisosomas a lo largo de los MTs. Su movimiento requiere ATP.
0	1,66	1	Q61768	Kinesin-1 heavy-chain	
2	0,91	1	Q61879	Myosin-10	Las miosinas son proteínas motoras que se mueven a lo largo de los filamentos de actina impulsadas por la hidrólisis de ATP. Tiene un papel importante en la reorganización del citoesqueleto, la formación de contactos focales y la extensión del lamelipodia.
22,29	8,46	13	Q8VDD5	Myosin-9	Antagoniza el papel de Myosin-10.

Tabla 8.12: Proteínas subreguladas en el ganglio de la raíz dorsal del ratón YG8R relacionadas con el **transporte axonal**-continuación

Bibliografía

- (1) Lawson, S. N., (1992). Morphological and biochemical cell types of sensory neurons. *Sensory neurons: diversity, development, and plasticity*, 27-59 (vid. pág. 6).
- (2) Wright, D., y Snider, W. D., (1995). Neurotrophin receptor mRNA expression defines distinct populations of neurons in rat dorsal root ganglia. *Journal of comparative neurology* 351, 329-338 (vid. pág. 6).
- (3) Verge, V., Richardson, P., Wiesenfeld-Hallin, Z., y Hokfelt, T, (1995). Differential influence of nerve growth factor on neuropeptide expression in vivo: a novel role in peptide suppression in adult sensory neurons. *Journal of Neuroscience* 15, 2081-2096 (vid. pág. 6).
- (4) Hall, A. K., Ai, X., Hickman, G. E., MacPhedran, S. E., Nduaguba, C. O., y Robertson, C. P., (1997). The generation of neuronal heterogeneity in a rat sensory ganglion. *Journal of Neuroscience* 17, 2775-2784 (vid. pág. 6).
- (5) Caspary, T., y Anderson, K. V., (2003). Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say. *Nature reviews. Neuroscience* 4, 289 (vid. pág. 7).
- (6) Pannese, E., *Roles of Satellite Cells in Sensory Ganglia*; Springer: 1981 (vid. pág. 8).

- (7) Pannese, E., (2010). The structure of the perineuronal sheath of satellite glial cells (SGCs) in sensory ganglia. *Neuron glia biology* 6, 3-10 (vid. pág. 8).
- (8) Hanani, M, Huang, T., Cherkas, P., Ledda, M, y Pannese, E, (2002). Glial cell plasticity in sensory ganglia induced by nerve damage. *Neuroscience* 114, 279-283 (vid. pág. 8).
- (9) Pannese, E, Ledda, M, Cherkas, P., Huang, T., y Hanani, M, (2003). Satellite cell reactions to axon injury of sensory ganglion neurons: increase in number of gap junctions and formation of bridges connecting previously separate perineuronal sheaths. *Anatomy and embryology* 206, 337-347 (vid. pág. 8).
- (10) Pannese, E, Procacci, P, Ledda, M, y Conte, V, (1996). Age-related reduction of the satellite cell sheath around spinal ganglion neurons in the rabbit. *Journal of neurocytology* 25, 137-146 (vid. pág. 8).
- (11) Pannese, E, Ledda, M, Arcidiacono, G, y Rigamonti, L, (1991). Clusters of nerve cell bodies enclosed within a common connective tissue envelope in the spinal ganglia of the lizard and rat. *Cell and tissue research* 264, 209-214 (vid. pág. 8).
- (12) Hanani, M., (2005). Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain research reviews* 48, 457-476 (vid. pág. 9).
- (13) Cherkas, P. S., Huang, T.-Y., Pannicke, T., Tal, M., Reichenbach, A., y Hanani, M., (2004). The effects of axotomy on neurons and satellite glial cells in mouse trigeminal ganglion. *Pain* 110, 290-298 (vid. pág. 9).
- (14) Vit, J.-P., Jasmin, L., Bhargava, A., y Ohara, P. T., (2006). Satellite glial cells in the trigeminal ganglion as a determinant of orofacial neuropathic pain. *Neuron glia biology* 2, 247-257 (vid. pág. 9).
- (15) Zhang, H., Mei, X., Zhang, P., Ma, C., White, F. A., Donnelly, D. F., y Lamotte, R. H., (2009). Altered functional properties of satellite glial cells in compressed spinal ganglia. *Glia* 57, 1588-1599 (vid. pág. 9).

-
- (16) Sherman, D. L., y Brophy, P. J., (2005). Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nature Reviews Neuroscience* 6, 683-690 (vid. pág. 9).
- (17) Virmouni, S. A., Ezzatizadeh, V., Sandi, C., Sandi, M., Al-Mahdawi, S., Chutake, Y., y Pook, M. A., (2015). A novel GAA-repeat-expansion-based mouse model of Friedreich's ataxia. *Disease models & mechanisms* 8, 225-235 (vid. págs. 10, 58, 66, 163).
- (18) White, T. W., y Paul, D. L., (1999). Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions. *Annual review of physiology* 61, 283-310 (vid. pág. 10).
- (19) Sáez, J. C., Berthoud, V. M., Branes, M. C., Martinez, A. D., y Beyer, E. C., (2003). Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiological reviews* 83, 1359-1400 (vid. pág. 10).
- (20) Fletcher, D. A., y Mullins, R. D., (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463, 485 (vid. pág. 12).
- (21) Konietzny, A., Bär, J., y Mikhaylova, M., (2017). Dendritic Actin Cytoskeleton: Structure, Functions, and Regulations. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11 (vid. pág. 14).
- (22) McNair, K., Spike, R., Guilding, C., Prendergast, G. C., Stone, T. W., Cobb, S. R., y Morris, B. J., (2010). A role for RhoB in synaptic plasticity and the regulation of neuronal morphology. *Journal of Neuroscience* 30, 3508-3517 (vid. pág. 16).
- (23) Zhou, Z., Meng, Y., Asrar, S., Todorovski, Z., y Jia, Z., (2009). A critical role of Rho-kinase ROCK2 in the regulation of spine and synaptic function. *Neuropharmacology* 56, 81-89 (vid. pág. 16).
- (24) Huang, W., Zhou, Z., Asrar, S., Henkelman, M., Xie, W., y Jia, Z., (2011). p21-Activated kinases 1 and 3 control brain size through coordinating neuronal complexity and synaptic properties. *Molecular and cellular biology* 31, 388-403 (vid. pág. 16).

- (25) Hsieh, S. H.-K., Ferraro, G. B., y Fournier, A. E., (2006). Myelin-associated inhibitors regulate cofilin phosphorylation and neuronal inhibition through LIM kinase and Slingshot phosphatase. *Journal of Neuroscience* 26, 1006-1015 (vid. pág. 16).
- (26) Huang, T. Y., Minamide, L. S., Bamburg, J. R., y Bokoch, G. M., (2008). Chronophin mediates an ATP-sensing mechanism for cofilin dephosphorylation and neuronal cofilin-actin rod formation. *Developmental cell* 15, 691-703 (vid. pág. 16).
- (27) Minamide, L. S., Striegl, A. M., Boyle, J. A., Meberg, P. J., y Bamburg, J. R., (2000). Neurodegenerative stimuli induce persistent ADF/cofilin-actin rods that disrupt distal neurite function. *Nature cell biology* 2, 628 (vid. pág. 16).
- (28) Vergara, D., Ferraro, M. M., Cascione, M., Loretta, L., Leporatti, S., Ferretta, A., Tanzarella, P., Pacelli, C., Santino, A., Maffia, M., y col. (2015). Cytoskeletal alterations and biomechanical properties of parkin-mutant human primary fibroblasts. *Cell biochemistry and biophysics* 71, 1395-1404 (vid. pág. 16).
- (29) Sivadasan, R., Hornburg, D., Drepper, C., Frank, N., Jablonka, S., Hansel, A., Lojewski, X., Sternecker, J., Hermann, A., Shaw, P. J., y col. (2016). C9ORF72 interaction with cofilin modulates actin dynamics in motor neurons. *Nature Neuroscience* 19, 1610-1618 (vid. pág. 16).
- (30) Kimura Arimura Fukata, T., Nariko, Y., Watanabe, H., Iwamatsu, A., y Kaibuchi, K., (2005). Tubulin and CRMP-2 complex is transported via Kinesin-1. *Journal of neurochemistry* 93, 1371-1382 (vid. págs. 19, 171).
- (31) Westermann, S., y Weber, K., (2003). Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4, 938 (vid. pág. 19).
- (32) Verhey, K. J., y Gaertig, J., (2007). The tubulin code. *Cell cycle* 6, 2152-2160 (vid. pág. 19).

-
- (33) Cambray-Deakin, M. A., y Burgoyne, R. D., (1987). Posttranslational modifications of α -tubulin: Acetylated and de-tyrosinated forms in axons of rat cerebellum. *J. Cell Biol* 104, 1569-1574 (vid. págs. 19, 20).
- (34) Black, M. M., y Keyser, P., (1987). Acetylation of alpha-tubulin in cultured neurons and the induction of alpha-tubulin acetylation in PC12 cells by treatment with nerve growth factor. *Journal of Neuroscience* 7, 1833-1842 (vid. págs. 19, 20).
- (35) Gundersen, G. G., Kalnoski, M. H., y Bulinski, J. C., (1984). Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently in vivo. *Cell* 38, 779-789 (vid. pág. 19).
- (36) Alexander, J. E., Hunt, D. F., Lee, M. K., Shabanowitz, J., Michel, H., Berlin, S. C., Macdonald, t. L., Sundberg, R. J., Rebhun, L. I., y Frankfurter, A., (1991). Characterization of posttranslational modifications in neuron-specific class III beta-tubulin by mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 4685-4689 (vid. pág. 19).
- (37) Edde, B., Rossier, J., Gros, F., Denoulet, P., Desbruyeres, E., y col. (1990). Posttranslational Glutamylation of (alpha)-Tubulin. *Science* 247, 83 (vid. pág. 19).
- (38) Rüdiger, M., Plessman, U., Klöppel, K.-D., Wehland, J., y Weber, K., (1992). Class II tubulin, the major brain β tubulin isotype is polyglutamylated on glutamic acid residue 435. *FEBS letters* 308, 101-105 (vid. pág. 19).
- (39) Raybin, D., y Flavin, M., (1977). Enzyme which specifically adds tyrosine to the α chain of tubulin. *Biochemistry* 16, 2189-2194 (vid. pág. 20).
- (40) Kumar, N., y Flavin, M., (1981). Preferential action of a brain de-tyrosinolytic carboxypeptidase on polymerized tubulin. *Journal of Biological Chemistry* 256, 7678-7686 (vid. pág. 20).
- (41) Konishi, Y., y Setou, M., (2009). Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nature neuroscience* 12, 559 (vid. pág. 20).

- (42) Jacobson, C., Schnapp, B., y Banker, G. A., (2006). A change in the selective translocation of the Kinesin-1 motor domain marks the initial specification of the axon. *Neuron* 49, 797-804 (vid. pág. 20).
- (43) Robson, S. J., y Burgoyne, R. D., (1989). Differential localisation of tyrosinated, detyrosinated, and acetylated α -tubulins in neurites and growth cones of dorsal root ganglion neurons. *Cell motility and the cytoskeleton* 12, 273-282 (vid. pág. 20).
- (44) Maruta, H., Greer, K., y Rosenbaum, J. L., (1986). The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *The Journal of cell biology* 103, 571-579 (vid. pág. 20).
- (45) Ohkawa, N., Sugisaki, S., Tokunaga, E., Fujitani, K., Hayasaka, T., Setou, M., e Inokuchi, K., (2008). N-acetyltransferase ARD1-NAT1 regulates neuronal dendritic development. *Genes to Cells* 13, 1171-1183 (vid. pág. 20).
- (46) Creppe, C., Malinouskaya, L., Volvert, M.-L., Gillard, M., Close, P., Malaise, O., Laguesse, S., Cornez, I., Rahmouni, S., Ormenese, S., y col. (2009). Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of α -tubulin. *Cell* 136, 551-564 (vid. pág. 20).
- (47) Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochin, S., y col. (2002). In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *The EMBO journal* 21, 6820-6831 (vid. pág. 20).
- (48) North, B. J., Marshall, B. L., Borra, M. T., Denu, J. M., y Verdin, E., (2003). The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Molecular cell* 11, 437-444 (vid. pág. 20).
- (49) Falconer, M. M., Vielkind, U., y Brown, D. L., (1989). Establishment of a stable, acetylated microtubule bundle during neuronal commitment. *Cell motility and the cytoskeleton* 12, 169-180 (vid. pág. 20).
- (50) Dompierre, J. P., Godin, J. D., Charrin, B. C., Cordelieres, F. P., King, S. J., Humbert, S., y Saudou, F., (2007). Histone deacetylase 6 inhi-

- bition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *Journal of Neuroscience* 27, 3571-3583 (vid. pág. 20).
- (51) Reed, N. A., Cai, D., Blasius, T. L., Jih, G. T., Meyhofer, E., Gaertig, J., y Verhey, K. J., (2006). Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Current biology* 16, 2166-2172 (vid. págs. 20, 161).
- (52) Janke, C., y Bulinski, J. C., (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nature reviews Molecular cell biology* 12, 773-786 (vid. págs. 21, 105).
- (53) Tucker, B. A., y Mearow, K. M., (2008). Peripheral sensory axon growth: from receptor binding to cellular signaling. *The Canadian Journal of Neurological Sciences* 35, 551-566 (vid. pág. 21).
- (54) Dent, E. W., Gupton, S. L., y Gertler, F. B., (2011). The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3, a001800 (vid. págs. 21, 168).
- (55) Munnamalai, V., y Suter, D. M., (2009). Reactive oxygen species regulate F-actin dynamics in neuronal growth cones and neurite outgrowth. *Journal of neurochemistry* 108, 644-661 (vid. págs. 22, 130).
- (56) Lin, C., Espreafico, E., Mooseker, M., y Forscher, P., (1996). Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. *Neuron* 16, 769-782 (vid. pág. 25).
- (57) Mitchison, T., y Kirschner, M., (1988). Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1, 761-772 (vid. pág. 25).
- (58) Okabe, S., e Hirokawa, N., (1991). Actin dynamics in growth cones. *Journal of Neuroscience* 11, 1918-1929 (vid. pág. 25).
- (59) Gomez, T. M., y Letourneau, P. C., (2014). Actin dynamics in growth cone motility and navigation. *Journal of neurochemistry* 129, 221-234 (vid. págs. 25, 26).

- (60) Sayyad, W. A., Amin, L., Fabris, P., Ercolini, E., y Torre, V., (2015). The role of myosin-II in force generation of DRG filopodia and lamellipodia. *Scientific reports* 5, 7842 (vid. pág. 25).
- (61) Sayyad, W. A., Fabris, P., y Torre, V., (2016). The Role of Rac1 in the Growth Cone Dynamics and Force Generation of DRG Neurons. *PloS one* 11, e0146842 (vid. pág. 26).
- (62) Korobova, F., y Svitkina, T., (2008). Arp2/3 complex is important for filopodia formation, growth cone motility, and neuritogenesis in neuronal cells. *Molecular biology of the cell* 19, 1561-1574 (vid. pág. 26).
- (63) Sahasrabudhe, A., Ghate, K., Mutalik, S., Jacob, A., y Ghose, A., (2016). Formin 2 regulates the stabilization of filopodial tip adhesions in growth cones and affects neuronal outgrowth and pathfinding in vivo. *Development* 143, 449-460 (vid. pág. 27).
- (64) Matusek, T., Gombos, R., Szécsényi, A., Sánchez-Soriano, N., Czibula, Á., Pataki, C., Gedai, A., Prokop, A., Raskó, I., y Mihály, J., (2008). Formin proteins of the DAAM subfamily play a role during axon growth. *Journal of Neuroscience* 28, 13310-13319 (vid. pág. 27).
- (65) Marsick, B. M., San Miguel-Ruiz, J. E., y Letourneau, P. C., (2012). Activation of ezrin/radixin/moesin mediates attractive growth cone guidance through regulation of growth cone actin and adhesion receptors. *Journal of Neuroscience* 32, 282-296 (vid. pág. 27).
- (66) Xu, K., Zhong, G., y Zhuang, X., (2013). Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science* 339, 452-456 (vid. págs. 28, 159).
- (67) Ruthel, G., y Banker, G., (1999). Role of moving growth cone-like wave structures in the outgrowth of cultured hippocampal axons and dendrites. *Journal of neurobiology* 39, 97-106 (vid. pág. 28).
- (68) Flynn, K. C., Pak, C. W., Shaw, A. E., Bradke, F., y Bamberg, J. R., (2009). Growth cone-like waves transport actin and promote axonogenesis and neurite branching. *Developmental neurobiology* 69, 761 (vid. pág. 28).

-
- (69) Katsuno, H., Toriyama, M., Hosokawa, Y., Mizuno, K., Ikeda, K., Sakumura, Y., e Inagaki, N., (2015). Actin migration driven by directional assembly and disassembly of membrane-anchored actin filaments. *Cell reports* 12, 648-660 (vid. pág. 28).
- (70) Ruthel, G., y Banker, G., (1998). Actin-dependent anterograde movement of growth-cone-like structures along growing hippocampal axons: A novel form of axonal transport? *Cell motility and the cytoskeleton* 40, 160-173 (vid. pág. 28).
- (71) Tint, I., Jean, D., Baas, P. W., y Black, M. M., (2009). Doublecortin associates with microtubules preferentially in regions of the axon displaying actin-rich protrusive structures. *Journal of Neuroscience* 29, 10995-11010 (vid. pág. 28).
- (72) Ganguly, A., Tang, Y., Wang, L., Ladit, K., Loi, J., Dargent, B., Leterrier, C., y Roy, S., (2015). A dynamic formin-dependent deep F-actin network in axons. *J Cell Biol* 210, 401-417 (vid. págs. 28, 29, 159).
- (73) Tanaka, E., y Kirschner, M. W., (1995). The role of microtubules in growth cone turning at substrate boundaries. *Journal of Cell Biology* 128, 139-156 (vid. págs. 29, 163).
- (74) Bard, L., Boscher, C., Lambert, M., Mège, R.-M., Choquet, D., y Thoumine, O., (2008). A molecular clutch between the actin flow and N-cadherin adhesions drives growth cone migration. *Journal of Neuroscience* 28, 5879-5890 (vid. pág. 30).
- (75) Suter, D. M., y Forscher, P., (2000). Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *Journal of neurobiology* 44, 97-113 (vid. pág. 30).
- (76) Kahn, O. I., y Baas, P. W., (2016). Microtubules and Growth Cones: Motors Drive the Turn. *Trends in neurosciences* 39, 433-440 (vid. págs. 30, 31).
- (77) Hall, A., (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514 (vid. pág. 30).

- (78) Wodarz, A., y Nusse, R., (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annual review of cell and developmental biology* 14, 59-88 (vid. pág. 30).
- (79) Dierick, H., y Bejsovec, A., (1998). 5 Cellular Mechanisms of Wingless/Wnt Signal Transduction. *Current topics in developmental biology* 43, 153-190 (vid. pág. 30).
- (80) Salinas, P. C., (2007). Modulation of the microtubule cytoskeleton: a role for a divergent canonical Wnt pathway. *Trends in cell biology* 17, 333-342 (vid. pág. 30).
- (81) Verma, P., Chierzi, S., Codd, A. M., Campbell, D. S., Meyer, R. L., Holt, C. E., y Fawcett, J. W., (2005). Axonal protein synthesis and degradation are necessary for efficient growth cone regeneration. *Journal of Neuroscience* 25, 331-342 (vid. págs. 32, 151).
- (82) Seifert, A. W., y Voss, S. R., (2013). Revisiting the relationship between regenerative ability and aging. *BMC biology* 11, 2 (vid. pág. 32).
- (83) Sousounis, K., Baddour, J. A., y Tsonis, P. A., (2014). Aging and regeneration in vertebrates. *Curr Top Dev Biol* 108, 217-246 (vid. pág. 32).
- (84) Sun, F., y Cavalli, V., (2010). Neuroproteomics approaches to decipher neuronal regeneration and degeneration. *Molecular & Cellular Proteomics* 9, 963-975 (vid. pág. 32).
- (85) Bradke, F., Fawcett, J. W., y Spira, M. E., (2012). Assembly of a new growth cone after axotomy: the precursor to axon regeneration. *Nature Reviews Neuroscience* 13, 183-193 (vid. pág. 32).
- (86) He, Z., y Jin, Y., (2016). Intrinsic control of axon regeneration. *Neuron* 90, 437-451 (vid. págs. 32, 34).
- (87) Ziv, N. E., y Spira, M. E., (1998). Induction of growth cone formation by transient and localized increases of intracellular proteolytic activity. *The Journal of cell biology* 140, 223-232 (vid. pág. 33).
- (88) Kamber, D., Erez, H., y Spira, M. E., (2009). Local calcium-dependent mechanisms determine whether a cut axonal end assembles a retar-

-
- ded endbulb or competent growth cone. *Experimental neurology* 219, 112-125 (vid. págs. 33, 35).
- (89) Erez, H., y Spira, M. E., (2008). Local self-assembly mechanisms underlie the differential transformation of the proximal and distal cut axonal ends into functional and aberrant growth cones. *Journal of Comparative Neurology* 507, 1019-1030 (vid. págs. 35).
- (90) Chen, L., Chuang, M., Koorman, T., Boxem, M., Jin, Y., y Chisholm, A. D., (2015). Axon injury triggers EFA-6 mediated destabilization of axonal microtubules via TACC and doublecortin like kinase. *Elife* 4, e08695 (vid. págs. 35).
- (91) Ertürk, A., Hellal, F., Enes, J., y Bradke, F., (2007). Disorganized microtubules underlie the formation of retraction bulbs and the failure of axonal regeneration. *Journal of Neuroscience* 27, 9169-9180 (vid. págs. 35).
- (92) Sahly, I., Khoutorsky, A., Erez, H., Prager-Khoutorsky, M., y Spira, M. E., (2006). On-line confocal imaging of the events leading to structural dedifferentiation of an axonal segment into a growth cone after axotomy. *Journal of Comparative Neurology* 494, 705-720 (vid. págs. 35).
- (93) Gitler, D., y Spira, M. E., (1998). Real time imaging of calcium-induced localized proteolytic activity after axotomy and its relation to growth cone formation. *Neuron* 20, 1123-1135 (vid. págs. 35).
- (94) Rishal, I., y Fainzilber, M., (2014). Axon-soma communication in neuronal injury. *Nature Reviews Neuroscience* 15, 32-42 (vid. págs. 35).
- (95) Holt, C. E., y Schuman, E. M., (2013). The central dogma decentralized: new perspectives on RNA function and local translation in neurons. *Neuron* 80, 648-657 (vid. págs. 35).
- (96) Hammarlund, M., Nix, P., Hauth, L., Jorgensen, E. M., y Bastiani, M., (2009). Axon regeneration requires a conserved MAP kinase pathway. *Science* 323, 802-806 (vid. págs. 35).

- (97) Yan, D., Wu, Z., Chisholm, A. D., y Jin, Y., (2009). The DLK-1 kinase promotes mRNA stability and local translation in *C. elegans* synapses and axon regeneration. *Cell* 138, 1005-1018 (vid. pág. 35).
- (98) Shin, J. E., Cho, Y., Beirowski, B., Milbrandt, J., Cavalli, V., y DiAntonio, A., (2012). Dual leucine zipper kinase is required for retrograde injury signaling and axonal regeneration. *Neuron* 74, 1015-1022 (vid. pág. 35).
- (99) Watkins, T. A., Wang, B., Huntwork-Rodriguez, S., Yang, J., Jiang, Z., Eastham-Anderson, J., Modrusan, Z., Kaminker, J. S., Tessier-Lavigne, M., y Lewcock, J. W., (2013). DLK initiates a transcriptional program that couples apoptotic and regenerative responses to axonal injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 4039-4044 (vid. pág. 35).
- (100) Ghosh-Roy, A., Goncharov, A., Jin, Y., y Chisholm, A. D., (2012). Kinesin-13 and tubulin posttranslational modifications regulate microtubule growth in axon regeneration. *Developmental cell* 23, 716-728 (vid. pág. 36).
- (101) Valakh, V., Walker, L. J., Skeath, J. B., y DiAntonio, A., (2013). Loss of the spectraplakins short stop activates the DLK injury response pathway in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience* 33, 17863-17873 (vid. pág. 36).
- (102) Cavanagh, J., (1963). The significance of the dying back process in experimental and human neurological disease. *International review of experimental pathology* 3, 219-267 (vid. págs. 37, 41).
- (103) GRIFFIN, J. W., GEORGE, E. B., HSIEH, S.-T., y GLASS, J. D., (1995). 20 Axonal degeneration and disorders of the axonal cytoskeleton. *The Axon: Structure, Function, and Pathophysiology*, 375 (vid. págs. 37, 41).
- (104) Saxena, S., y Caroni, P., (2007). Mechanisms of axon degeneration: from development to disease. *Progress in neurobiology* 83, 174-191 (vid. pág. 37).

-
- (105) Maor-Nof, M., Homma, N., Raanan, C., Nof, A., Hirokawa, N., y Yaron, A., (2013). Axonal pruning is actively regulated by the microtubule-destabilizing protein kinesin superfamily protein 2A. *Cell reports* 3, 971-977 (vid. pág. 37).
- (106) Vanderhaeghen, P., y Cheng, H.-J., (2010). Guidance molecules in axon pruning and cell death. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a001859 (vid. pág. 37).
- (107) Araki, T., Sasaki, Y., y Milbrandt, J., (2004). Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science* 305, 1010-1013 (vid. pág. 37).
- (108) Wang, J., Zhai, Q., Chen, Y., Lin, E., Gu, W., McBurney, M. W., y He, Z., (2005). A local mechanism mediates NAD-dependent protection of axon degeneration. *J Cell Biol* 170, 349-355 (vid. pág. 37).
- (109) George, R., y Griffin, J. W., (1994). Delayed macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration in the central nervous system: the dorsal radiclotomy model. *Experimental neurology* 129, 225-236 (vid. pág. 37).
- (110) Lunn, E., Perry, V., Brown, M., Rosen, H, y Gordon, S, (1989). Absence of Wallerian degeneration does not hinder regeneration in peripheral nerve. *European Journal of Neuroscience* 1, 27-33 (vid. pág. 37).
- (111) George, E. B., Glass, J. D., y Griffin, J. W., (1995). Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *Journal of Neuroscience* 15, 6445-6452 (vid. págs. 37, 38).
- (112) Vargas, M. E., y Barres, B. A., (2007). Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 153-179 (vid. pág. 37).
- (113) Wang, J. T., Medress, Z. A., y Barres, B. A., (2012). Axon degeneration: molecular mechanisms of a self-destruction pathway. *J Cell Biol* 196, 7-18 (vid. pág. 37).
- (114) Conforti, L., Gilley, J., y Coleman, M. P., (2014). Wallerian degeneration: an emerging axon death pathway linking injury and disease. *Nature Reviews Neuroscience* 15, 394-409 (vid. págs. 37, 40).

- (115) Coleman, M. P., y Freeman, M. R., (2010). Wallerian degeneration, wlds, and nmnat. *Annual review of neuroscience* 33, 245-267 (vid. pág. 37).
- (116) Berger, F., Lau, C., Dahlmann, M., y Ziegler, M., (2005). Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms. *Journal of Biological Chemistry* 280, 36334-36341 (vid. págs. 37, 39).
- (117) Gilley, J., y Coleman, M. P., (2010). Endogenous Nmnat2 is an essential survival factor for maintenance of healthy axons. *PLoS Biol* 8, e1000300 (vid. pág. 37).
- (118) Yan, T., Feng, Y., Zheng, J., Ge, X., Zhang, Y., Wu, D., Zhao, J., y Zhai, Q., (2010). Nmnat2 delays axon degeneration in superior cervical ganglia dependent on its NAD synthesis activity. *Neurochemistry international* 56, 101-106 (vid. págs. 37, 39).
- (119) Ellisman, M. H., y Porter, K. R., (1980). Microtrabecular structure of the axoplasmic matrix: visualization of cross-linking structures and their distribution. *The Journal of cell biology* 87, 464-479 (vid. pág. 38).
- (120) Lindsey, J., y Ellisman, M., (1985). The neuronal endomembrane system. III. The origins of the axoplasmic reticulum and discrete axonal cisternae at the axon hillock. *Journal of Neuroscience* 5, 3135-3144 (vid. pág. 38).
- (121) Henkart, M. P., Reese, T., y Brinley, F., (1978). Endoplasmic reticulum sequesters calcium in the squid giant axon. *Science* 202, 1300-1303 (vid. pág. 38).
- (122) Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F. S., Fogarty, K. E., Lifshitz, L. M., Tuft, R. A., y Pozzan, T., (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* 280, 1763-1766 (vid. pág. 38).
- (123) Kirichok, Y., Krapivinsky, G., y Clapham, D. E., (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 427, 360-364 (vid. pág. 38).

-
- (124) Perocchi, F., Gohil, V. M., Girgis, H. S., Bao, X. R., McCombs, J. E., Palmer, A. E., y Mootha, V. K., (2010). MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca²⁺ uptake. *Nature* 467, 291-296 (vid. pág. 38).
- (125) Rasola, A., y Bernardi, P., (2007). The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* 12, 815-833 (vid. pág. 38).
- (126) Billger, M., Wallin, M., y Karlsson, J.-O., (1988). Proteolysis of tubulin and microtubule-associated proteins 1 and 2 by calpain I and II. Difference in sensitivity of assembled and disassembled microtubules. *Cell calcium* 9, 33-44 (vid. pág. 38).
- (127) Johnson, G. V., Litersky, J. M., y Jope, R. S., (1991). Degradation of Microtubule-Associated Protein 2 and Brain Spectrin by Calpain: A Comparative Study. *Journal of neurochemistry* 56, 1630-1638 (vid. pág. 38).
- (128) Ma, M., Ferguson, T. A., Schoch, K. M., Li, J., Qian, Y., Shofer, F. S., Saatman, K. E., y Neumar, R. W., (2013). Calpains mediate axonal cytoskeleton disintegration during Wallerian degeneration. *Neurobiology of disease* 56, 34-46 (vid. pág. 38).
- (129) Wang, M. S., Fang, G., Culver, D. G., Davis, A. A., Rich, M. M., y Glass, J. D., (2001). The WldS protein protects against axonal degeneration: a model of gene therapy for peripheral neuropathy. *Annals of neurology* 50, 773-779 (vid. pág. 39).
- (130) Adalbert, R., Gillingwater, T. H., Haley, J. E., Bridge, K., Beirowski, B., Berek, L., Wagner, D., Grumme, D., Thomson, D., Celik, A., y col. (2005). A rat model of slow Wallerian degeneration (WldS) with improved preservation of neuromuscular synapses. *European Journal of Neuroscience* 21, 271-277 (vid. pág. 39).
- (131) Jia, H., Yan, T., Feng, Y., Zeng, C., Shi, X., y Zhai, Q., (2007). Identification of a critical site in Wld s: essential for Nmnat enzyme activity and axon-protective function. *Neuroscience letters* 413, 46-51 (vid. pág. 39).

- (132) Luo, L., y O'Leary, D. D., (2005). Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 127-156 (vid. pág. 41).
- (133) Neukomm, L. J., y Freeman, M. R., (2014). Diverse cellular and molecular modes of axon degeneration. *Trends in cell biology* 24, 515-523 (vid. pág. 41).
- (134) Coleman, P. D., y Yao, P. J., (2003). Synaptic slaughter in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 24, 1023-1027 (vid. pág. 41).
- (135) Tagliaferro, P., y Burke, R. E., (2016). Retrograde axonal degeneration in parkinson disease. *Journal of Parkinson's disease* 6, 1-15 (vid. pág. 41).
- (136) Li, H., Li, S.-H., Yu, Z.-X., Shelbourne, P., y Li, X.-J., (2001). Huntingtin aggregate-associated axonal degeneration is an early pathological event in Huntington's disease mice. *Journal of Neuroscience* 21, 8473-8481 (vid. pág. 41).
- (137) Frey, D., Schneider, C., Xu, L., Borg, J., Spooren, W., y Caroni, P., (2000). Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *Journal of Neuroscience* 20, 2534-2542 (vid. pág. 41).
- (138) Fischer, L. R., Culver, D. G., Tennant, P., Davis, A. A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., Khan, J., Polak, M. A., y Glass, J. D., (2004). Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Experimental neurology* 185, 232-240 (vid. pág. 41).
- (139) Mollá, B., Riveiro, F., Bolinches-Amorós, A., Muñoz-Lasso, D. C., Palau, F., y González-Cabo, P., (2016). Two different pathogenic mechanisms, dying-back axonal neuropathy and pancreatic senescence, are present in the YG8R mouse model of Friedreich's ataxia. *Disease models & mechanisms* 9, 647-657 (vid. págs. 41, 57, 58, 68, 176).
- (140) Rothstein, J. D., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., y Kuncl, R. W., (1993). Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 6591-6595 (vid. pág. 41).

-
- (141) Zhang, B., Tu, P.-h., Abtahian, F., Trojanowski, J. Q., y Lee, V. M.-Y., (1997). Neurofilaments and orthograde transport are reduced in ventral root axons of transgenic mice that express human SOD1 with a G93A mutation. *The Journal of cell biology* 139, 1307-1315 (vid. pág. 41).
- (142) Williamson, T. L., y Cleveland, D. W., (1999). Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nature neuroscience* 2, 50-56 (vid. pág. 41).
- (143) Bendotti, C., Calvaresi, N., Chiveri, L., Prella, A., Moggio, M., Braga, M., Silani, V., y De Biasi, S., (2001). Early vacuolization and mitochondrial damage in motor neurons of FALS mice are not associated with apoptosis or with changes in cytochrome oxidase histochemical reactivity. *Journal of the neurological sciences* 191, 25-33 (vid. pág. 42).
- (144) Siklós, L., Engelhardt, J., Harati, Y., Smith, R. G., Joó, F., y Appel, S. H., (1996). Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 39, 203-216 (vid. pág. 42).
- (145) De Winter, F., Vo, T., Stam, F. J., Wisman, L. A., Bär, P. R., Niclou, S. P., van Muiswinkel, F. L., y Verhaagen, J., (2006). The expression of the chemorepellent Semaphorin 3A is selectively induced in terminal Schwann cells of a subset of neuromuscular synapses that display limited anatomical plasticity and enhanced vulnerability in motor neuron disease. *Molecular and Cellular Neuroscience* 32, 102-117 (vid. pág. 42).
- (146) Pasterkamp, R. J., y Giger, R. J., (2009). Semaphorin function in neural plasticity and disease. *Current opinion in neurobiology* 19, 263-274 (vid. pág. 42).
- (147) Yin, P., Lv, H., Zhang, L., Zhang, L., y Tang, P., (2015). Semaphorin 3A: A Potential Target for Low Back Pain. *Frontiers in aging neuroscience* 7 (vid. pág. 42).
- (148) Polo, J., Calleja, J, Combarros, O, y Berciano, J, (1991). Hereditary ataxias and paraplegias in Cantabria, Spain. *Brain* 114, 855-866 (vid. pág. 44).

- (149) Lopez-Arlandis, J., Vilchez, J., Palau, F, y Sevilla, T, (1995). Friedreich's ataxia: an epidemiological study in Valencia, Spain, based on consanguinity analysis. *Neuroepidemiology* 14, 14-19 (vid. pág. 44).
- (150) Koeppe, A. H., y Mazurkiewicz, J. E., (2013). Friedreich ataxia: neuropathology revised. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 72, 78-90 (vid. págs. 44, 45, 47, 170, 176).
- (151) Geoffroy, G, Barbeau, A, Breton, G, Lemieux, B, Aube, M, Leger, C, y Bouchard, J., (1976). Clinical description and roentgenologic evaluation of patients with Friedreich's ataxia. *Canadian Journal of Neurological Sciences/Journal Canadien des Sciences Neurologiques* 3, 279-286 (vid. pág. 44).
- (152) Harding, A. E., (1981). Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain: a journal of neurology* 104, 589-620 (vid. pág. 44).
- (153) De Michele, G, Filla, A, Cavalcanti, F, Di Maio, L, Pianese, L, Castaldo, I, Calabrese, O, Monticelli, A, Varrone, S, y Campanella, G, (1994). Late onset Friedreich's disease: clinical features and mapping of mutation to the FRDA locus. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 57, 977-979 (vid. pág. 45).
- (154) Palau, F., De Michele, G., Vilchez, J. J., Pandolfo, M., Monrós, E., Cozza, S., Smeyers, P., Lopez-Arlandis, J., Campanella, G., Di Donato, S., y col. (1995). Early-onset ataxia with cardiomyopathy and retained tendon reflexes maps to the friedreich's ataxia locus on chromosome 9q. *Annals of neurology* 37, 359-362 (vid. pág. 45).
- (155) Alper, G., y Narayanan, V., (2003). Friedreich's ataxia. *Pediatric neurology* 28, 335-341 (vid. pág. 45).
- (156) Corben, L. A., Delatycki, M. B., Bradshaw, J. L., Churchyard, A. J., y Georgiou-Karistianis, N., (2011). Utilisation of advance motor information is impaired in Friedreich ataxia. *The Cerebellum* 10, 793-803 (vid. pág. 46).

-
- (157) Hocking, D. R., Corben, L. A., Fielding, J., Cremer, P. D., Millist, L., White, O. B., y Delatycki, M. B., (2014). Saccade reprogramming in Friedreich ataxia reveals impairments in the cognitive control of saccadic eye movement. *Brain and cognition* 87, 161-167 (vid. pág. 46).
- (158) Selvadurai, L. P., Harding, I. H., Corben, L. A., Stagnitti, M. R., Storey, E., Egan, G. F., Delatycki, M. B., y Georgiou-Karistianis, N., (2016). Cerebral and cerebellar grey matter atrophy in Friedreich ataxia: the IMAGE-FRDA study. *Journal of neurology* 263, 2215-2223 (vid. pág. 47).
- (159) Said, G., Marion, M.-H., Selva, J., y Jamet, C., (1986). Hypotrophic and dying-back nerve fibers in Friedreich's ataxia. *Neurology* 36, 1292-1292 (vid. pág. 47).
- (160) Jitpimolmard, S., Small, J., King, R., Geddes, J., Misra, P., McLaughlin, J., Muddle, J., Cole, M., Harding, A., y Thomas, P., (1993). The sensory neuropathy of Friedreich's ataxia: an autopsy study of a case with prolonged survival. *Acta neuropathologica* 86, 29-35 (vid. pág. 47).
- (161) Morral, J. A., Davis, A. N., Qian, J., Gelman, B. B., y Koeppen, A. H., (2010). Pathology and pathogenesis of sensory neuropathy in Friedreich's ataxia. *Acta neuropathologica* 120, 97-108 (vid. págs. 47, 166).
- (162) Campuzano, V., Montermini, L., Moltò, M. D., Pianese, L., y col. (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271, 1423 (vid. págs. 47, 49).
- (163) Chamberlain, S., Shaw, J., Rowland, A., Wallis, J., South, S., Nakamura, Y., von Gabain, A., Farrall, M., y Williamson, R., (1988). Mapping of mutation causing Friedreich's ataxia to human chromosome 9. (vid. pág. 47).
- (164) Hanauer, A., Chery, M., Fujita, R., Driesel, A., Gilgenkrantz, S, y Mandel, J., (1990). The Friedreich ataxia gene is assigned to chromosome 9q13-q21 by mapping of tightly linked markers and shows linkage disequilibrium with D9S15. *American journal of human genetics* 46, 133 (vid. pág. 47).

- (165) Montermini, L., Andermann, E., Labuda, M., Richter, A., Pandolfo, M., Cavalcanti, F., Pianese, L., Iodice, L., Farina, G., Monticelli, A., y col. (1997). The Friedreich ataxia GAA triplet repeat: premutation and normal alleles. *Human molecular genetics* 6, 1261-1266 (vid. pág. 47).
- (166) Wells, R. D., (2008). DNA triplexes and Friedreich ataxia. *The FASEB Journal* 22, 1625-1634 (vid. pág. 47).
- (167) Dürr, A., Cossee, M., Agid, Y., Campuzano, V., Mignard, C., Penet, C., Mandel, J.-L., Brice, A., y Koenig, M., (1996). Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *New England Journal of Medicine* 335, 1169-1175 (vid. pág. 47).
- (168) Montermini, L., Richeter, A., Morgan, K., Justice, C. M., Julien, D., Castellotti, B., Mercier, J., Poirier, J., Capozzoli, F., Bouchard, J.-P., y col. (1997). Phenotypic variability in Friedreich ataxia: role of the associated GAA triplet repeat expansion. *Annals of neurology* 41, 675-682 (vid. pág. 47).
- (169) Amorós, A. B., Papel de la mitocondria en la neurodegeneración de las neuropatías periféricas., Tesis doct., Universitat de València, 2014 (vid. págs. 48, 52, 54, 113, 130, 165).
- (170) Cossée, M., Puccio, H., Gansmuller, A., Koutnikova, H., Dierich, A., LeMeur, M., Fischbeck, K., Dollé, P., y Koenig, M., (2000). Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Human Molecular Genetics* 9, 1219-1226 (vid. págs. 48, 56, 67).
- (171) De Castro, M., García-Planells, J., Monrós, E., Cañizares, J., Vázquez-Manrique, R., Vílchez, J. J., Urtasun, M., Lucas, M., Navarro, G., Izquierdo, G., y col. (2000). Genotype and phenotype analysis of Friedreich's ataxia compound heterozygous patients. *Human genetics* 106, 86-92 (vid. págs. 48, 49).
- (172) Gibson, T. J., Koonin, E. V., Musco, G., Pastore, A., y Bork, P., (1996). Friedreich's ataxia protein: phylogenetic evidence for mitochondrial dysfunction. *Trends in neurosciences* 19, 465-468 (vid. pág. 49).

-
- (173) Adinolfi, S, Trifuoggi, M, Politou, A., Martin, S, y Pastore, A, (2002). A structural approach to understanding the iron-binding properties of phylogenetically different frataxins. *Human molecular genetics* 11, 1865-1877 (vid. pág. 49).
- (174) Koutnikova, H., Campuzano, V., Foury, F., Dollé, P., Cazzalini, O., y Koenig, M., (1997). Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nature genetics* 16, 345-351 (vid. pág. 49).
- (175) Han, T. H. L., Camadro, J.-M., Santos, R., Lesuisse, E., Chahine, J. E. H., y Ha-Duong, N. T., (2017). Mechanisms of iron and copper-frataxin interactions. *Metallomics* (vid. págs. 49, 52).
- (176) Bencze, K. Z., Kondapalli, K. C., Cook, J. D., McMahon, S., Millán-Pacheco, C., Pastor, N., y Stemmler, T. L., (2006). The structure and function of frataxin. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 41, 269-291 (vid. pág. 49).
- (177) Dhe-Paganon, S., Shigeta, R., Chi, Y.-I., Ristow, M., y Shoelson, S. E., (2000). Crystal structure of human frataxin. *Journal of Biological Chemistry* 275, 30753-30756 (vid. págs. 49, 50).
- (178) Huang, J., Dizin, E., y Cowan, J., (2008). Mapping iron binding sites on human frataxin: implications for cluster assembly on the ISU Fe-S cluster scaffold protein. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 13, 825-836 (vid. pág. 49).
- (179) Cossée, M., Dürr, A., Schmitt, M., Dahl, N., Trouillas, P., Allinson, P., Kostrzewa, M., Nivelon-Chevallier, A., Gustavson, K.-H., Kohlschütter, A., y col. (1999). Friedreich's ataxia: point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Annals of neurology* 45, 200-206 (vid. pág. 49).
- (180) De Michele, G, Filla, A, Cavalcanti, F, Tammara, A, Monticelli, A, Pianese, L, Di Salle, F, Perretti, A, Santoro, L, Caruso, G, y col. (2000). Atypical Friedreich ataxia phenotype associated with a novel missense mutation in the X25 gene. *Neurology* 54, 496-496 (vid. pág. 49).

- (181) Gellera, C., Castellotti, B., Mariotti, C., Mineri, R., Seveso, V., DiDonato, S., y Taroni, F., (2007). Frataxin gene point mutations in Italian Friedreich ataxia patients. *Neurogenetics* 8, 289-299 (vid. pág. 49).
- (182) Cory, S. A., Van Vranken, J. G., Brignole, E. J., Patra, S., Winge, D. R., Drennan, C. L., Rutter, J., y Barondeau, D. P., (2017). Structure of human Fe-S assembly subcomplex reveals unexpected cysteine desulfurase architecture and acyl-ACP-ISC11 interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201702849 (vid. págs. 50, 51).
- (183) Tsai, C.-L., y Barondeau, D. P., (2010). Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex. *Biochemistry* 49, 9132-9139 (vid. pág. 50).
- (184) Van Vranken, J. G., Jeong, M.-Y., Wei, P., Chen, Y.-C., Gygi, S. P., Winge, D. R., y Rutter, J., (2016). The mitochondrial acyl carrier protein (ACP) coordinates mitochondrial fatty acid synthesis with iron sulfur cluster biogenesis. *Elife* 5, e17828 (vid. pág. 50).
- (185) Runswick, M. J., Fearnley, I. M., Skehel, J. M., y Walker, J. E., (1991). Presence of an acyl carrier protein in NADH: ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria. *FEBS letters* 286, 121-124 (vid. pág. 51).
- (186) Vinothkumar, K. R., Zhu, J., e Hirst, J., (2014). Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature* 515, 80-84 (vid. pág. 51).
- (187) Fiedorczuk, K., Letts, J. A., Degliesposti, G., Kaszuba, K., Skehel, M., y Sazanov, L. A., (2016). Atomic structure of the entire mammalian mitochondrial complex I. *Nature* 538, 406-410 (vid. pág. 51).
- (188) Li, H., Gakh, O., Smith, D. Y., Ranatunga, W. K., e Isaya, G., (2013). Missense mutations linked to friedreich ataxia have different but synergistic effects on mitochondrial frataxin isoforms. *Journal of Biological Chemistry* 288, 4116-4127 (vid. pág. 51).
- (189) Gerber, J., Mühlenhoff, U., y Lill, R., (2003). An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO reports* 4, 906-911 (vid. pág. 51).

-
- (190) Zecca, L., Youdim, M. B., Riederer, P., Connor, J. R., y Crichton, R. R., (2004). Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neuroscience* 5, 863-873 (vid. pág. 51).
- (191) Boddaert, N., Sang, K. H.L. Q., Rötig, A., Leroy-Willig, A., Gallet, S., Brunelle, F., Sidi, D., Thalabard, J.-C., Munnich, A., y Cabantchik, Z. I., (2007). Selective iron chelation in Friedreich ataxia: biologic and clinical implications. *Blood* 110, 401-408 (vid. pág. 51).
- (192) Koeppen, A. H., Morral, J. A., Davis, A. N., Qian, J., Petrocine, S. V., Knutson, M. D., Gibson, W. M., Cusack, M. J., y Li, D., (2009). The dorsal root ganglion in Friedreich's ataxia. *Acta neuropathologica* 118, 763 (vid. pág. 51).
- (193) Chen, K., Ho, T. S.-Y., Lin, G., Tan, K. L., Rasband, M. N., y Bellen, H. J., (2016). Loss of Frataxin activates the iron/sphingolipid/PDK1/Mef2 pathway in mammals. *Elife* 5 (vid. págs. 51, 56, 57).
- (194) Swiech, L., Heidenreich, M., Banerjee, A., Habib, N., Li, Y., Trombetta, J., Sur, M., y Zhang, F., (2015). In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nature biotechnology* 33, 102-106 (vid. págs. 51, 56).
- (195) Soriano, S., Calap-Quintana, P., Llorens, J. V., Al-Ramahi, I., Gutiérrez, L., Martínez-Sebastián, M. J., Botas, J., y Moltó, M. D., (2016). Metal Homeostasis Regulators Suppress FRDA Phenotypes in a Drosophila Model of the Disease. *PloS one* 11, e0159209 (vid. pág. 52).
- (196) Rotig, A., Lonlay, P. d., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A., y Rustin, P., (1997). Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nature genetics* 17, 215-217 (vid. págs. 52, 162).
- (197) Bradley, J., Blake, J., Chamberlain, S, Thomas, P., Cooper, J., y Schapira, A., (2000). Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia. *Human molecular genetics* 9, 275-282 (vid. pág. 52).
- (198) Schoenfeld, R. A., Napoli, E., Wong, A., Zhan, S., Reutenauer, L., Morin, D., Buckpitt, A. R., Taroni, F., Lonnerdal, B., Ristow, M.,

- y col. (2005). Frataxin deficiency alters heme pathway transcripts and decreases mitochondrial heme metabolites in mammalian cells. *Human molecular genetics* 14, 3787-3799 (vid. pág. 52).
- (199) Pook, M., Al-Mahdawi, S, y Mouro Pinto, R, (2006). GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. (vid. págs. 52, 58, 68).
- (200) Moliner, B. M., Fenotipo celular de las neuronas sensitivas afectadas en la ataxia de Friedreich., Tesis doct., Universitat de València, 2016 (vid. págs. 52-54, 57, 64, 65, 67, 68, 106, 120, 130, 157, 158, 160, 161, 163, 164, 166, 168, 174, 175).
- (201) Napoli, E., Morin, D., Bernhardt, R., Buckpitt, A., y Cortopassi, G., (2007). Hemin rescues adrenodoxin, heme a and cytochrome oxidase activity in frataxin-deficient oligodendrogloma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1772, 773-780 (vid. pág. 52).
- (202) Carletti, B., Piermarini, E., Tozzi, G., Travaglini, L., Torracco, A., Pastore, A., Sparaco, M., Petrillo, S., Carrozzo, R., Bertini, E., y col. (2014). Frataxin silencing inactivates mitochondrial Complex I in NSC34 motoneuronal cells and alters glutathione homeostasis. *International journal of molecular sciences* 15, 5789-5806 (vid. pág. 52).
- (203) Bolinches-Amorós, A., Mollá, B., Pla-Martín, D., Palau, F., y González-Cabo, P., (2014). Mitochondrial dysfunction induced by frataxin deficiency is associated with cellular senescence and abnormal calcium metabolism. *Frontiers in cellular neuroscience* 8, 124 (vid. págs. 52-54, 162, 165, 175).
- (204) Emond, M., Lepage, G., Vanasse, M., y Pandolfo, M., (2000). Increased levels of plasma malondialdehyde in Friedreich ataxia. *Neurology* 55, 1752-1753 (vid. pág. 53).
- (205) Ristow, M., Mulder, H., Pomplun, D., Schulz, T. J., Müller-Schmehl, K., Krause, A., Fex, M., Puccio, H., Müller, J., Isken, F., y col. (2003). Frataxin deficiency in pancreatic islets causes diabetes due to loss of

- β cell mass. *The Journal of clinical investigation* 112, 527-534 (vid. pág. 53).
- (206) Napoli, E., Taroni, F., y Cortopassi, G. A., (2006). Frataxin, iron-sulfur clusters, heme, ROS, and aging. *Antioxidants & redox signaling* 8, 506-516 (vid. pág. 53).
- (207) Navarro, J. A., Ohmann, E., Sanchez, D., Botella, J. A., Liebisch, G., Moltó, M. D., Ganfornina, M. D., Schmitz, G., y Schneuwly, S., (2010). Altered lipid metabolism in a *Drosophila* model of Friedreich's ataxia. *Human molecular genetics*, ddq183 (vid. pág. 53).
- (208) Irazusta, V., Cabisco, E., Reverter-Branchat, G., Ros, J., y Tamarit, J., (2006). Manganese is the link between frataxin and iron-sulfur deficiency in the yeast model of Friedreich ataxia. *Journal of Biological Chemistry* 281, 12227-12232 (vid. pág. 53).
- (209) Anderson, P. R., Kirby, K., Orr, W. C., Hilliker, A. J., y Phillips, J. P., (2008). Hydrogen peroxide scavenging rescues frataxin deficiency in a *Drosophila* model of Friedreich's ataxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 611-616 (vid. pág. 53).
- (210) Santos, R., Lefevre, S., Sliwa, D., Seguin, A., Camadro, J.-M., y Lesuisse, E., (2010). Friedreich ataxia: molecular mechanisms, redox considerations, and therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling* 13, 651-690 (vid. pág. 53).
- (211) Bayot, A., Santos, R., Camadro, J.-M., y Rustin, P., (2011). Friedreich's ataxia: the vicious circle hypothesis revisited. *BMC medicine* 9, 112 (vid. pág. 53).
- (212) Heidari, M. M., Houshmand, M., Hosseinkhani, S., Nafissi, S., y Khatami, M., (2009). Complex I and ATP content deficiency in lymphocytes from Friedreich's ataxia. *Canadian Journal of Neurological Sciences/Journal Canadien des Sciences Neurologiques* 36, 26-31 (vid. pág. 53).
- (213) Pastore, A., Tozzi, G., Gaeta, L. M., Bertini, E., Serafini, V., Di Cesare, S., Bonetto, V., Casoni, F., Carrozzo, R., Federici, G., y col. (2003). Actin Glutathionylation Increases in Fibroblasts of Patients with Friedreich's Ataxia A POTENTIAL ROLE IN THE PATHO-

- GENESIS OF THE DISEASE. *Journal of Biological Chemistry* 278, 42588-42595 (vid. págs. 53, 54, 160, 163, 175).
- (214) Sparaco, M., Gaeta, L. M., Santorelli, F. M., Passarelli, C., Tozzi, G., Bertini, E., Simonati, A., Scaravilli, F., Taroni, F., Duyckaerts, C., y col. (2009). Friedreich's ataxia: oxidative stress and cytoskeletal abnormalities. *Journal of the neurological sciences* 287, 111-118 (vid. págs. 53, 160-162, 175).
- (215) Piermarini, E., Cartelli, D., Pastore, A., Tozzi, G., Compagnucci, C., Giorda, E., D'Ámico, J., Petrini, S., Bertini, E., Cappelletti, G., y col. (2016). Frataxin silencing alters microtubule stability in motor neurons: implications for Friedreich's ataxia. *Human Molecular Genetics*, ddw260 (vid. págs. 53, 162, 175).
- (216) Acquaviva, F., De Biase, I., Nezi, L., Ruggiero, G., Tatangelo, F., Pisano, C., Monticelli, A., Garbi, C., Acquaviva, A. M., y Coccozza, S., (2005). Extra-mitochondrial localisation of frataxin and its association with IscU1 during enterocyte-like differentiation of the human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *Journal of cell science* 118, 3917-3924 (vid. pág. 55).
- (217) Xia, H., Cao, Y., Dai, X., Marelja, Z., Zhou, D., Mo, R., Al-Mahdawi, S., Pook, M. A., Leimkühler, S., Rouault, T. A., y col. (2012). Novel frataxin isoforms may contribute to the pathological mechanism of Friedreich ataxia. *PloS one* 7, e47847 (vid. pág. 55).
- (218) Puccio, H., Simon, D., Cossée, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P., y Koenig, M., (2001). Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nature genetics* 27, 181-186 (vid. págs. 56, 175).
- (219) Simon, D., Seznec, H., Gansmuller, A., Carelle, N., Weber, P., Metzger, D., Rustin, P., Koenig, M., y Puccio, H., (2004). Friedreich ataxia mouse models with progressive cerebellar and sensory ataxia reveal autophagic neurodegeneration in dorsal root ganglia. *Journal of Neuroscience* 24, 1987-1995 (vid. págs. 56, 68).

-
- (220) Miranda, C. J., Santos, M. M., Ohshima, K., Smith, J., Li, L., Bunting, M., Cossée, M., Koenig, M., Sequeiros, J., Kaplan, J., y col. (2002). Frataxin knockin mouse. *FEBS letters* 512, 291-297 (vid. pág. 57).
- (221) Al-Mahdawi, S., Pinto, R. M., Ruddle, P., Carroll, C., Webster, Z., y Pook, M., (2004). GAA repeat instability in Friedreich ataxia YAC transgenic mice. *Genomics* 84, 301-310 (vid. págs. 57, 64).
- (222) Al-Mahdawi, S., Pinto, R. M., Varshney, D., Lawrence, L., Lowrie, M. B., Hughes, S., Webster, Z., Blake, J., Cooper, J. M., King, R., y col. (2006). GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. *Genomics* 88, 580-590 (vid. págs. 57, 65, 157, 160, 163).
- (223) Perdomini, M., Hick, A., Puccio, H., y Pook, M. A., (2013). Animal and cellular models of Friedreich ataxia. *Journal of neurochemistry* 126, 65-79 (vid. pág. 65).
- (224) Smith, C. L., (1994). Cytoskeletal movements and substrate interactions during initiation of neurite outgrowth by sympathetic neurons in vitro. *Journal of Neuroscience* 14, 384-398 (vid. pág. 80).
- (225) Witte, H., Neukirchen, D., y Bradke, F., (2008). Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J Cell Biol* 180, 619-632 (vid. pág. 80).
- (226) Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., y col. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9, 676-682 (vid. págs. 85, 93).
- (227) Wu, C.-H., Fallini, C., Ticozzi, N., Keagle, P. J., Sapp, P. C., Piotrowska, K., Lowe, P., Koppers, M., McKenna-Yasek, D., Baron, D. M., y col. (2012). Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 488, 499-503 (vid. págs. 86, 159).
- (228) Han, Q.-J., Gao, N.-N., Zhang, Z.-N., Yu, W.-H., Pan, J., Wang, Q., Zhang, X., Bao, L., y col. (2013). IPP5 inhibits neurite growth in pri-

- mary sensory neurons by maintaining TGF- β /Smad signaling. *J Cell Sci* 126, 542-553 (vid. pág. 86).
- (229) Meijering, E., Dzyubachyk, O., Smal, I., y col. (2012). 9 Methods for Cell and Particle Tracking. *Methods in enzymology* 504, 183-200 (vid. pág. 89).
- (230) Nguyen, H., Dayan, P., Pujic, Z., Cooper-White, J., y Goodhill, G. J., (2016). A mathematical model explains saturating axon guidance responses to molecular gradients. *Elife* 5, e12248 (vid. págs. 89, 139).
- (231) Goodhill, G. J., Faville, R. A., Sutherland, D. J., Bicknell, B. A., Thompson, A. W., Pujic, Z., Sun, B., Kita, E. M., y Scott, E. K., (2015). The dynamics of growth cone morphology. *BMC biology* 13, 10 (vid. págs. 89, 90, 92, 141, 172).
- (232) Goldberg, D. J., y Burmeister, D. W., (1986). Stages in axon formation: observations of growth of Aplysia axons in culture using video-enhanced contrast-differential interference contrast microscopy. *The Journal of cell biology* 103, 1921-1931 (vid. pág. 89).
- (233) Sasaki, Y., Vohra, B. P., Lund, F. E., y Milbrandt, J., (2009). Nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase-mediated axonal protection requires enzymatic activity but not increased levels of neuronal nicotinamide adenine dinucleotide. *Journal of Neuroscience* 29, 5525-5535 (vid. pág. 93).
- (234) Cartelli, D., Ronchi, C., Maggioni, M. G., Rodighiero, S., Giavini, E., y Cappelletti, G., (2010). Microtubule dysfunction precedes transport impairment and mitochondria damage in MPP⁺-induced neurodegeneration. *Journal of neurochemistry* 115, 247-258 (vid. págs. 98, 105, 158, 162).
- (235) Perdiz, D., Mackeh, R., Poüs, C., y Baillet, A., (2011). The ins and outs of tubulin acetylation: more than just a post-translational modification? *Cellular signalling* 23, 763-771 (vid. pág. 105).
- (236) Mollá, B., Muñoz-Lasso, D. C., Riveiro, F., Bolinches-Amorós, A., Pallardó, F. V., Fernandez-Vilata, A., Vaya, M. D.L. I., Palau, F., y Gonzalez-Cabo, P., (2017). Reversible axonal dystrophy by calcium

- modulation in frataxin-deficient sensory neurons of YG8R mice. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10, 264 (vid. págs. 105, 106, 113, 174).
- (237) Lim, S.-S., Edson, K. J., Letourneau, P. C., y Borisys, G. G., (1990). A test of microtubule translocation during neurite elongation. *The Journal of Cell Biology* 111, 123-130 (vid. pág. 111).
- (238) Bouquet, C., Soares, S., von Boxberg, Y., Ravaille-Veron, M., Propst, F., y Nothias, F., (2004). Microtubule-associated protein 1B controls directionality of growth cone migration and axonal branching in regeneration of adult dorsal root ganglia neurons. *Journal of Neuroscience* 24, 7204-7213 (vid. pág. 111).
- (239) Grintsevich, E. E., Yesilyurt, H. G., Rich, S. K., Hung, R.-J., Terman, J. R., y Reisler, E., (2016). F-actin dismantling through a redox-driven synergy between Mical and cofilin. *Nature Cell Biology* 18, 876-885 (vid. pág. 113).
- (240) Stern, S., Haverkamp, S., Sinske, D., Tedeschi, A., Naumann, U., Di Giovanni, S., Kochanek, S., Nordheim, A., y Knöll, B., (2013). The transcription factor serum response factor stimulates axon regeneration through cytoplasmic localization and cofilin interaction. *Journal of Neuroscience* 33, 18836-18848 (vid. págs. 114, 166, 175).
- (241) Wei, Z., Sun, M., Liu, X., Zhang, J., y Jin, Y., (2014). Rufy3, a protein specifically expressed in neurons, interacts with actin-bundling protein Fascin to control the growth of axons. *Journal of neurochemistry* 130, 678-692 (vid. pág. 125).
- (242) Fukata, Y., Itoh, T. J., Kimura, T., Ménager, C., Nishimura, T., Shimomizu, T., Watanabe, H., Inagaki, N., Iwamatsu, A., Hotani, H., y col. (2002). CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nature cell biology* 4, 583-591 (vid. pág. 125).
- (243) Rosslenbroich, V., Dai, L., Baader, S. L., Noegel, A. A., Gieselmann, V., y Kappler, J., (2005). Collapsin response mediator protein-4 regulates F-actin bundling. *Experimental cell research* 310, 434-444 (vid. pág. 125).

- (244) Dent, E. W., y Gertler, F. B., (2003). Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40, 209-227 (vid. págs. 158, 168).
- (245) Lowery, L. A., y Van Vactor, D., (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 332-343 (vid. págs. 158, 168).
- (246) Chada, S. R., y Hollenbeck, P. J., (2003). Mitochondrial movement and positioning in axons: the role of growth factor signaling. *Journal of Experimental Biology* 206, 1985-1992 (vid. pág. 158).
- (247) Wagner, O. I., Lifshitz, J., Janmey, P. A., Linden, M., McIntosh, T., y Leterrier, J.-F., (2003). Mechanisms of mitochondria-neurofilament interactions. *Journal of Neuroscience* 23, 9046-9058 (vid. pág. 158).
- (248) Shan, Y., Schoenfeld, R. A., Hayashi, G., Napoli, E., Akiyama, T., Iodi Carstens, M., Carstens, E. E., Pook, M. A., y Cortopassi, G. A., (2013). Frataxin deficiency leads to defects in expression of antioxidants and Nrf2 expression in dorsal root ganglia of the Friedreich's ataxia YG8R mouse model. *Antioxidants & redox signaling* 19, 1481-1493 (vid. pág. 158).
- (249) Gillingwater, T., y Wishart, T., (2013). Mechanisms underlying synaptic vulnerability and degeneration in neurodegenerative disease. *Neuropathology and applied neurobiology* 39, 320-334 (vid. pág. 158).
- (250) Davis, D. A., Wilson, M. H., Giraud, J., Xie, Z., Tseng, H.-C., England, C., Herscovitz, H., Tsai, L.-H., y Delalle, I., (2009). Capzb2 interacts with β -tubulin to regulate growth cone morphology and neurite outgrowth. *PLoS Biol* 7, e1000208 (vid. pág. 159).
- (251) Mockrin, S. C., y Korn, E. D., (1980). Acanthamoeba profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry* 19, 5359-5362 (vid. pág. 159).
- (252) Bayot, A., Reichman, S., Lebon, S., Csaba, Z., Aubry, L., Sterkers, G., Husson, I., Rak, M., y Rustin, P., (2013). Cis-silencing of PIP5K1B evidenced in Friedreich's ataxia patient cells results in ZAFARytoskeleton anomalies. *Human molecular genetics*, ddt144 (vid. págs. 160, 162).

-
- (253) Weernink, P. A. O., Schmidt, M., y Jakobs, K. H., (2004). Regulation and cellular roles of phosphoinositide 5-kinases. *European journal of pharmacology* 500, 87-99 (vid. pág. 160).
- (254) Van den Bout, I., y Divecha, N., (2009). PIP5K-driven PtdIns (4, 5) P2 synthesis: regulation and cellular functions. *J Cell Sci* 122, 3837-3850 (vid. pág. 160).
- (255) Craig, A. M., y Banker, G., (1994). Neuronal polarity. *Annual review of neuroscience* 17, 267-310 (vid. pág. 161).
- (256) Akella, J. S., Wloga, D., Kim, J., Starostina, N. G., Lyons-Abbott, S., Morrisette, N. S., Dougan, S. T., Kipreos, E. T., y Gaertig, J., (2010). MEC-17 is an [agr]-tubulin acetyltransferase. *Nature* 467, 218-222 (vid. pág. 161).
- (257) Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.-F., y Yao, T.-P., (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417, 455-458 (vid. pág. 161).
- (258) Bulinski, J. C., (2007). Microtubule modification: acetylation speeds anterograde traffic flow. *Current biology* 17, R18-R20 (vid. pág. 161).
- (259) Letourneau, P. C., y Wire, J. P., (1995). Three-dimensional organization of stable microtubules and the Golgi apparatus in the somata of developing chick sensory neurons. *Journal of neurocytology* 24, 207-223 (vid. pág. 161).
- (260) Nakata, T., e Hirokawa, N., (2003). Microtubules provide directional cues for polarized axonal transport through interaction with kinesin motor head. *The Journal of cell biology* 162, 1045-1055 (vid. págs. 161, 163, 171).
- (261) Križ, J., Zhu, Q., Julien, J.-P., y Padjen, A. L., (2000). Electrophysiological properties of axons in mice lacking neurofilament subunit genes: disparity between conduction velocity and axon diameter in absence of NF-H. *Brain research* 885, 32-44 (vid. pág. 163).
- (262) De Strooper, B., (2003). Aph-1, Pen-2, and nicastrin with presenilin generate an active γ -secretase complex. *Neuron* 38, 9-12 (vid. pág. 163).

- (263) Verhey, K. J., Meyer, D., Deehan, R., Blenis, J., Schnapp, B. J., Rapoport, T. A., y Margolis, B., (2001). Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. *The Journal of cell biology* 152, 959-970 (vid. pág. 163).
- (264) D'Arcangelo, G., y Curran, T., (1998). Reeler: new tales on an old mutant mouse. *Bioessays* 20, 235-244 (vid. pág. 163).
- (265) Willnow, T. E., Nykjaer, A., y Herz, J., (1999). Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nature cell biology* 1, E157-E162 (vid. pág. 163).
- (266) Kanai, Y., Okada, Y., Tanaka, Y., Harada, A., Terada, S., e Hirokawa, N., (2000). KIF5C, a novel neuronal kinesin enriched in motor neurons. *Journal of Neuroscience* 20, 6374-6384 (vid. pág. 163).
- (267) Pantaloni, D., Boujemaa, R., Didry, D., Gounon, P., y Carlier, M.-F., (2000). The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nature cell biology* 2, 385-391 (vid. pág. 164).
- (268) Cuberos, H, Vallée, B, Vourch, P, Tastet, J, Andres, C., y Bénédicti, H, (2015). Roles of LIM kinases in central nervous system function and dysfunction. *FEBS letters* 589, 3795-3806 (vid. pág. 164).
- (269) Maloney, M. T., Minamide, L. S., Kinley, A. W., Boyle, J. A., y Bamberg, J. R., (2005). β -secretase-cleaved amyloid precursor protein accumulates at actin inclusions induced in neurons by stress or amyloid β : a feedforward mechanism for Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* 25, 11313-11321 (vid. pág. 165).
- (270) Maloney, M. T., y Bamberg, J. R., (2007). Cofilin-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and other amyloidopathies. *Molecular neurobiology* 35, 21-43 (vid. pág. 165).
- (271) Lim, M. K., Kawamura, T., Ohsawa, Y., Ohtsubo, M., Asakawa, S., Takayanagi, A., y Shimizu, N., (2007). Parkin interacts with LIM Kinase 1 and reduces its cofilin-phosphorylation activity via ubiquitination. *Experimental cell research* 313, 2858-2874 (vid. pág. 165).

-
- (272) Huynh, D. P., Scoles, D. R., Ho, T. H., Del Bigio, M. R., y Pulst, S.-M., (2000). Parkin is associated with actin filaments in neuronal and nonneuronal cells. *Annals of neurology* 48, 737-744 (vid. pág. 165).
- (273) Kubo, S.-i., Kitami, T., Noda, S., Shimura, H., Uchiyama, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Mizuno, Y., y Hattori, N., (2001). Parkin is associated with cellular vesicles. *Journal of neurochemistry* 78, 42-54 (vid. pág. 165).
- (274) Ren, Y., Zhao, J., y Feng, J., (2003). Parkin binds to α/β tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *Journal of Neuroscience* 23, 3316-3324 (vid. pág. 165).
- (275) Zafar, S., Younas, N., Sheikh, N., Tahir, W., Shafiq, M., Schmitz, M., Ferrer, I., Andréoletti, O., y Zerr, I., (2017). Cytoskeleton-Associated Risk Modifiers Involved in Early and Rapid Progression of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. *Molecular Neurobiology*, 1-21 (vid. pág. 165).
- (276) Sparrow, N., Manetti, M. E., Bott, M., Fabianac, T., Petrilli, A., Bates, M. L., Bunge, M. B., Lambert, S., y Fernandez-Valle, C., (2012). The actin-severing protein cofilin is downstream of neuregulin signaling and is essential for Schwann cell myelination. *Journal of Neuroscience* 32, 5284-5297 (vid. pág. 166).
- (277) Ono, S., (2007). Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. *International review of cytology* 258, 1-82 (vid. pág. 167).
- (278) Bamberg, J. R., y Bray, D., (1987). Distribution and cellular localization of actin depolymerizing factor. *The Journal of Cell Biology* 105, 2817-2825 (vid. pág. 167).
- (279) Endo, M., Ohashi, K., Sasaki, Y., Goshima, Y., Niwa, R., Uemura, T., y Mizuno, K., (2003). Control of growth cone motility and morphology by LIM kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin. *Journal of Neuroscience* 23, 2527-2537 (vid. pág. 167).
- (280) Rosso, S., Bollati, F., Bisbal, M., Peretti, D., Sumi, T., Nakamura, T., Quiroga, S., Ferreira, A., y Cáceres, A., (2004). LIMK1 regulates Golgi dynamics, traffic of Golgi-derived vesicles, and process extension

- in primary cultured neurons. *Molecular biology of the cell* 15, 3433-3449 (vid. pág. 167).
- (281) Giridharan, S. S. P., Rohn, J. L., Naslavsky, N., y Caplan, S., (2012). Differential regulation of actin microfilaments by human MICAL proteins. *J Cell Sci* 125, 614-624 (vid. pág. 167).
- (282) Hung, R.-J., Yazdani, U., Yoon, J., Wu, H., Yang, T., Gupta, N., Huang, Z., van Berkel, W. J., y Terman, J. R., (2010). Mical links semaphorins to F-actin disassembly. *Nature* 463, 823-827 (vid. pág. 167).
- (283) Giridharan, S. S. P., y Caplan, S., (2014). MICAL-family proteins: complex regulators of the actin cytoskeleton. *Antioxidants & redox signaling* 20, 2059-2073 (vid. pág. 167).
- (284) Pasterkamp, R. J., Dai, H.-n., Terman, J. R., Wahlin, K. J., Kim, B., Bregman, B. S., Popovich, P. G., y Kolodkin, A. L., (2006). MICAL flavoprotein monooxygenases: expression during neural development and following spinal cord injuries in the rat. *Molecular and Cellular Neuroscience* 31, 52-69 (vid. pág. 168).
- (285) Ashida, S., Furihata, M., Katagiri, T., Tamura, K., Anazawa, Y., Yoshioka, H., Miki, T., Fujioka, T., Shuin, T., Nakamura, Y., y col. (2006). Expression of novel molecules, MICAL2-PV (MICAL2 prostate cancer variants), increases with high Gleason score and prostate cancer progression. *Clinical cancer research* 12, 2767-2773 (vid. pág. 168).
- (286) Suzuki, T., Nakamoto, T., Ogawa, S., Seo, S., Matsumura, T., Tachibana, K., Morimoto, C., e Hirai, H., (2002). MICAL, a novel CasL interacting molecule, associates with vimentin. *Journal of Biological Chemistry* 277, 14933-14941 (vid. pág. 168).
- (287) Höpker, V. H., Shewan, D., Tessier-Lavigne, M., Poo, M.-m., y Holt, C., (1999). Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* 401, 69-73 (vid. pág. 169).
- (288) Thompson, A. W., Pujic, Z., Richards, L. J., y Goodhill, G. J., (2011). Cyclic nucleotide-dependent switching of mammalian axon guidance depends on gradient steepness. *Molecular and Cellular Neuroscience* 47, 45-52 (vid. pág. 169).

- (289) Dudanova, I., Gatto, G., y Klein, R., (2010). GDNF acts as a chemo-attractant to support ephrinA-induced repulsion of limb motor axons. *Current Biology* 20, 2150-2156 (vid. págs. 169, 171).
- (290) Dudanova, I., Kao, T.-J., Herrmann, J. E., Zheng, B., Kania, A., y Klein, R., (2012). Genetic evidence for a contribution of EphA: ephrinA reverse signaling to motor axon guidance. *Journal of Neuroscience* 32, 5209-5215 (vid. págs. 169).
- (291) Yamashita, N., Ohshima, T., Nakamura, F., Kolattukudy, P., Honnorat, J., Mikoshiba, K., y Goshima, Y., (2012). Phosphorylation of CRMP2 (collapsin response mediator protein 2) is involved in proper dendritic field organization. *Journal of Neuroscience* 32, 1360-1365 (vid. págs. 170).
- (292) Quach, T. T., Massicotte, G., Belin, M.-F., Honnorat, J., Glasper, E. R., Devries, A. C., Jakeman, L. B., Baudry, M., Duchemin, A.-M., y Kolattukudy, P. E., (2008). CRMP3 is required for hippocampal CA1 dendritic organization and plasticity. *The FASEB Journal* 22, 401-409 (vid. págs. 170).
- (293) Chi, X. X., Schmutzler, B. S., Brittain, J. M., Wang, Y., Hingtgen, C. M., Nicol, G. D., y Khanna, R., (2009). Regulation of N-type voltage-gated calcium channels (Cav2. 2) and transmitter release by collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) in sensory neurons. *Journal of cell science* 122, 4351-4362 (vid. págs. 170).
- (294) Arimura, N., Hattori, A., Kimura, T., Nakamuta, S., Funahashi, Y., Hirotsune, S., Furuta, K., Urano, T., Toyoshima, Y. Y., y Kaibuchi, K., (2009). CRMP-2 directly binds to cytoplasmic dynein and interferes with its activity. *Journal of neurochemistry* 111, 380-390 (vid. págs. 171).
- (295) Touma, E., Kato, S., Fukui, K., y Koike, T., (2007). Calpain-mediated cleavage of collapsin response mediator protein (CRMP)-2 during neurite degeneration in mice. *European Journal of Neuroscience* 26, 3368-3381 (vid. págs. 171).
- (296) Capitanio, D., Vasso, M., Fania, C., Moriggi, M., Viganò, A., Procacci, P., Magnaghi, V., y Gelfi, C., (2009). Comparative proteomic profile

- of rat sciatic nerve and gastrocnemius muscle tissues in ageing by 2-D DIGE. *Proteomics* 9, 2004-2020 (vid. pág. 171).
- (297) Turney, S. G., Ahmed, M., Chandrasekar, I., Wysolmerski, R. B., Goeckeler, Z. M., Rioux, R. M., Whitesides, G. M., y Bridgman, P. C., (2016). Nerve growth factor stimulates axon outgrowth through negative regulation of growth cone actomyosin restraint of microtubule advance. *Molecular biology of the cell* 27, 500-517 (vid. pág. 171).
- (298) Keller-Peck, C. R., Feng, G., Sanes, J. R., Yan, Q., Lichtman, J. W., y Snider, W. D., (2001). Glial cell line-derived neurotrophic factor administration in postnatal life results in motor unit enlargement and continuous synaptic remodeling at the neuromuscular junction. *Journal of Neuroscience* 21, 6136-6146 (vid. pág. 171).
- (299) Nilufar, S., Morrow, A. A., Lee, J. M., y Perkins, T. J., (2013). Filo-Detect: automatic detection of filopodia from fluorescence microscopy images. *BMC systems biology* 7, 66 (vid. pág. 172).
- (300) Hu, G., Huang, K., Hu, Y., Du, G., Xue, Z., Zhu, X., y Fan, G., (2016). Single-cell RNA-seq reveals distinct injury responses in different types of DRG sensory neurons. *Scientific reports* 6 (vid. pág. 173).
- (301) Katsu-Jiménez, Y., Loría, F., Corona, J. C., y Díaz-Nido, J., (2016). Gene transfer of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) prevents neurodegeneration triggered by FXN deficiency. *Molecular Therapy* 24, 877-889 (vid. pág. 174).
- (302) Hick, A., Wattenhofer-Donzé, M., Chintawar, S., Tropel, P., Simard, J. P., Vaucamps, N., Gall, D., Lambot, L., André, C., Reutenauer, L., y col. (2013). Neurons and cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells as a model for mitochondrial defects in Friedreich's ataxia. *Disease models & mechanisms* 6, 608-621 (vid. pág. 175).
- (303) Mincheva-Tasheva, S., Obis, E., Tamarit, J., y Ros, J., (2013). Apoptotic cell death and altered calcium homeostasis caused by frataxin depletion in dorsal root ganglia neurons can be prevented by BH4 domain of Bcl-xL protein. *Human molecular genetics*, ddt576 (vid. pág. 175).

- (304) Nolano, M., Provitera, V., Crisci, C., Saltalamacchia, A. M., Wendelschafer-Crabb, G., Kennedy, W. R., Filla, A., Santoro, L., y Caruso, G., (2001). Small fibers involvement in Friedreich's ataxia. *Annals of neurology* 50, 17-25 (vid. pág. 176).
- (305) McLeod, J., (1971). An electrophysiological and pathological study of peripheral nerves in Friedreich's ataxia. *Journal of the neurological sciences* 12, 333-349 (vid. pág. 176).
- (306) Clarke, P., y Cowan, W., (1976). The development of the isthmo-optic tract in the chick, with special reference to the occurrence and correction of developmental errors in the location and connections of isthmo-optic neurons. *Journal of Comparative Neurology* 167, 143-163 (vid. pág. 176).

