



**PROBIOL**  
PROGRAMA DE POSGRADO  
EN BIOLOGÍA



**UNCUYO**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE CUYO

I M B E C U

# **MECANISMO DE CONTROL SOBRE LA PLASTICIDAD NEURONAL MEDIANTE LA FOSFORILACIÓN/DESFOSFORILACIÓN DE WAVE 1**

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Biología de la Universidad Nacional  
de Cuyo

**Lic. Ivonne Denise Uzair**

Director: **Dr. Angel Matias Sanchez**

Co-Directora: **Dra. Graciela Alma Jahn**

**Laboratorio de Transducción de Señales**

Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo

Centro Científico y Tecnológico - CONICET Mendoza

## **Agradecimientos**

**...A cada una de las personas que fueron parte de mi vida durante éste arduo trabajo, todas ellas fueron clave para concluirlo...**

**Un especial agradecimiento para mis directores, para todo el personal del IMBECU, para mi comité tutorial, para PROBIOL y la Universidad Nacional de Cuyo.**

**Un especial agradecimiento para mi familia y amigos, maravillosas personas que me acompañaron y me dieron su apoyo para llegar hasta la meta.**

## **ÍNDICE**

<b>ÍNDICE.....</b>	<b>1</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
1.1 Plasticidad Neuronal y Plasticidad Sináptica.....	8
1.2 Estrógenos, progestágenos y la plasticidad de espinas dendríticas.....	10
1.3 Espinas dendríticas, su morfología y el citoesqueleto de actina.....	10
1.3.1 Espinas dendríticas, contribuciones de Santiago Ramón y Cajal.....	10
1.3.2 Formación de las espinas dendríticas.....	11
1.3.3 Dinámica de los filamentos de actina: pasos en la formación de ED.....	13
1.3.4 Dinámica de los filamentos de actina: vías de señalización que regulan la formación de ED.....	14
1.3.5 Integradores de señales, paxilina y Rac1 GTPasa.....	18
1.4 WAVE1 y la formación de espinas dendríticas.....	20
1.5 El <i>switch On-Off</i> : Cdk5 y PP2A.....	23
1.5.1 Rol de Cdk5 en la fosforilación de WAVE1.....	23
1.5.2 PP2A y la desfosforilación de WAVE1.....	24
1.6 WAVE1, Cortactina y Arp2/3.....	26
<b>CAPÍTULO 2: OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....</b>	<b>28</b>
2.1 Fundamentación del problema de investigación.....	28
2.2 Objetivo general e hipótesis de trabajo.....	28
2.3 Objetivos específicos.....	29
<b>CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>

3.1 Lista de abreviaturas.....	31
3.2 Sistema de estudio.....	32
3.3 Metodología.....	32
3.3.1 Cultivo primario de células neuronales corticales embrionarias.....	32
3.3.2 Seguimiento del cultivo a partir del día de siembra.....	34
3.3.3 Tratamientos.....	34
3.4 Inmunoensayos: detección mediada por anticuerpos (Ac).....	37
3.4.1 Western blot.....	37
3.4.2 Inmunofluorescencia.....	41
3.4.2.1 Análisis y cuantificación de las espinas dendríticas.....	41
3.4.2.1a Selección de neuronas y dendritas.....	41
3.4.2.1b Cuantificación de espinas dendríticas.....	43
3.4.3 Inmunoprecipitación.....	44
3.5 Análisis estadístico.....	44
<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1 Resultados del primer objetivo específico.....</b>	<b>46</b>
4.1.1 Regulación de las hormonas sexuales E2 y P4 en la formación de ED en neuronas corticales.....	46
4.1.2 Src/FAK/Paxilina son claves en la activación de Rac1 y en la formación de ED impulsadas por E2 y P4.....	48
4.1.3 E2 y P4 regulan la formación de ED mediada por WAVE1 a través del <i>switch</i> molecular quinasa Cdk5/fosfatasa PP2A.....	51
4.1.4 E2 y P4 estimulan la fosforilación de PP2A y WAVE1 y la formación de ED.....	51
<b>4.2 Resultados del segundo objetivo específico.....</b>	<b>54</b>
4.2.1 La expresión exógena de constructos mutantes de PP2A alteran la fosforilación de WAVE1 y la formación de ED mediada	

por E2 o P4.....	54
4.2.2 La fosforilación de PP2A en Y307 dependiente de E2 y P4 es mediada por Src quinasa.....	54
<b>4.3 Resultados del tercer objetivo específico.....</b>	<b>56</b>
4.3.1 Cortactina participa en la formación de ED mediada por E2/P4 a través de una vía dependiente de Rac1/PAK1.....	56
4.3.2 E2 y P4 promueven la fosforilación de Cortactina y Arp2 y una disrupción de la interacción de Cortactina con Arp3.....	58
4.3.3 E2 y P4 regulan la fosforilación de Arp2 dependiente de WAVE1 y Cortactina.....	59
4.3.4 E2 y P4 impulsan la formación de ED a través del complejo Arp2/3.....	61
4.3.5 Las hormonas E2 y P4 inducen la formación de ED a través de WAVE1/Complejo Arp2/3 vía sus receptores.....	61
<b>CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>64</b>
5.1 Discusión.....	64
5.2 Conclusiones.....	75
<b>CAPÍTULO 6: REFERENCIAS.....</b>	<b>76</b>
<b>CAPÍTULO 7: ANEXO.....</b>	<b>84</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: adenosina difosfato

Arp: proteína relacionada a la actina

ARPC1-5: proteínas del complejo Arp2/3, subunidades de la 1 a la 5

ATP: adenosina trifosfato

cAMP: adenosina monofosfato cíclica

Cdc42: *Cell division control protein 42*, GTPasa de la de proteínas familia Rho

Cdk5: proteína quinasa dependiente de ciclina 5

CIP2A: proteína inhibitoria de PP2A del tipo cancerosa

CTTBP2: proteína de unión a cortactina tipo 2

E2: 17- $\beta$ -estradiol

ED: espinas dendríticas

ES: esteroides sexuales

FAK: quinasa de adhesiones focales

GAP: proteína activadora de GTPasas

GDP: guanosina difosfato

GEF: factor intercambiador de GTP

GPCR: receptor de superficie celular acoplado a proteína G

GTP: guanosina trifosfato

GTPasa: enzima guanosina trifosfatasa

ICAM: molécula de adhesión intercelular, receptor de superficie celular

LTD: depresión a largo plazo

LTP: potenciación a largo plazo

MRCK: quinasa de unión a Cdc42 relacionada con la distrofia miotónica

NMDA: N-metil-D-aspartato

NPF: factor promotor de la nucleación actínica.

N-WASP: proteína WASP neural

P4: progesterona

PAK1: quinasa activada por Rac1

PIX: *PAK-interacting exchange factor*, proteína GEF de Rac1

PKA: proteína quinasa A

PP2A: proteína fosfatasa 2A

PP2B: proteína fosfatasa 2B

Rac1: GTPasa de la familia de proteínas Rho

RhoA: GTPasa de la familia de proteínas Rho

ROCK: quinasa asociada a la GTPasa Rho

RTK: receptor tirosina quinasa

SET: proteína inhibitoria de PP2A

SH2: dominio homólogo a Src, secuencia específica de aminoácidos que reconocen residuos de tirosina fosforilados.

SNC: sistema nervioso central

Src: tirosina quinasa relacionada con el virus del sarcoma

TLR: receptor de superficie celular de tipo toll

WASP: proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich

WAVE1: proteína *Wiskott-Aldrich syndrome Verprolin Homologue-1*

## RESUMEN

Este trabajo se focalizó en el estudio del mecanismo molecular implicado en la regulación de la formación de espinas dendríticas (ED). Las mismas constituyen la base, tanto estructural como funcional para el establecimiento de conexiones sinápticas entre neuronas. Este proceso es altamente dinámico y está sujeto a la regulación de importantes neuromoduladores que determinan el accionar de las proteínas responsables en promover la formación de ED. El objetivo general de este trabajo radicó en estudiar la vía de señalización de las hormonas 17- $\beta$ -estradiol (E2) y progesterona (P4) hacia la plasticidad neuronal, a través del mecanismo que controla la fosforilación de WAVE1 (activador clave del complejo Arp2/3, último responsable de la formación de ED) y su regulación sobre la formación dendrítica en neuronas corticales de rata. La hipótesis de trabajo plantea que el *switch* molecular quinasa Cdk5/fosfatasa PP2A controla la formación de ED, modulando la actividad de WAVE1 a través de su fosforilación/desfosforilación, respectivamente. Se determinó que las hormonas E2 y P4 regulan la morfología de neuronas corticales incrementando significativamente el número de ED. Este proceso ocurre través de un control preciso sobre WAVE1 mediado por Cdk5 y PP2A. Tanto E2 como P4, promueven la fosforilación/activación de Cdk5 (evidenciado por un aumento en los niveles de p-Cdk5<sup>Y15</sup>) e inactivación de PP2A (incremento en los niveles de p-PP2A<sup>Y307</sup>), afectando el estado fosforilado/desfosforilado de WAVE1 regulando de esta manera la densidad dendrítica. Además, E2 y P4 inducen la fosforilación de cortactina (un segundo activador clave de Arp2/3), y de Arp2 mediando la formación de ED. Como conclusión de este estudio, las hormonas E2 y P4 promueven la formación de ED regulando la actividad de proteínas claves de nucleación actínica como WAVE1 y cortactina, contribuyendo así al desarrollo de procesos de plasticidad sináptica en el sistema nervioso central.



## ABSTRACT

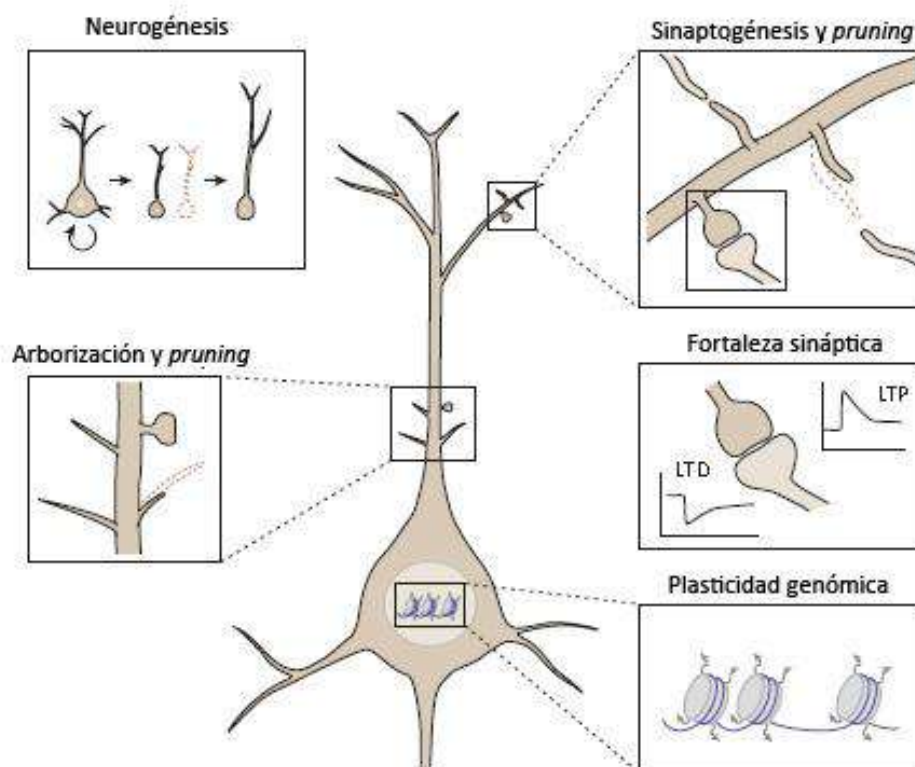
This work focused on the study of the molecular mechanism involved in the regulation of dendritic spine (DS) formation. These structures are responsible for structural and functional establishment of synaptic connections between neurons. This process is highly dynamic and is subjected to an important regulation by neuromodulators that determine the activity of proteins responsible for promoting DS formation. The general objective of this work was to study the signaling pathway of 17- $\beta$ -estradiol (E2) and progesterone (P4) hormones in neuronal plasticity, through the mechanism that regulate WAVE1 phosphorylation (key activator of the Arp2/3 complex responsible for actin nucleation) and its regulation on dendritic spines formation in rat cortical neurons. The working hypothesis was that the molecular switch Cdk5 kinase/PP2A phosphatase controls DS formation, modulating the activity of WAVE1 through phosphorylation mechanisms. E2 and P4 regulated cortical neurons morphology by significantly increasing the number of DS. This process was mediated by Cdk5 and PP2A through WAVE1 phosphorylation. Both E2 and P4 promoted Cdk5 phosphorylation/activation (evidenced by an increase in p-Cdk5<sup>Y15</sup> levels) and PP2A inactivation (increase in p-PP2A<sup>Y307</sup> levels) affecting WAVE1 phosphorylated/dephosphorylated state of and thus regulating dendritic spine density. Furthermore, E2 and P4 induced Cortactin and Arp2 phosphorylation (a second key step in the activation of Arp2/3 complex). The conclusions of this study state that E2 and P4 promote DS formation by regulating the activity of key actin nucleation proteins such as WAVE1 and Cortactin, thus contributing to the development of synaptic plasticity processes in the central nervous system.

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN

#### 1.1 Plasticidad Neuronal y Plasticidad Sináptica

El cerebro es un importante blanco de los esteroides sexuales (ES), los cuales desempeñan múltiples funciones regulatorias como la proliferación, supervivencia y diferenciación celular [1]. Una de las acciones más interesantes de estas hormonas es el control que pueden ejercer sobre la **plasticidad neuronal**, proceso fundamental para el desarrollo de funciones cognitivas como la memoria y el aprendizaje [2]. Se define a la plasticidad neuronal como la capacidad del cerebro de modificar sus circuitos neuronales, su función y/o estructura en respuesta a la actividad generada por algún estímulo [3]. De esta manera, se producen modificaciones que pueden afectar el pensamiento, los sentimientos, emociones y comportamiento. La plasticidad neuronal puede ocurrir en diferentes niveles estructurales en el sistema nervioso central (SNC) (Figura 1) [4]. Aquellos más relevantes son la neurogénesis; el crecimiento y remodelamiento dendrítico (arborización y *pruning*); la sinaptogénesis, fortaleza sináptica y los cambios que modifican la expresión génica (plasticidad genómica) [5].



**Figura 1. Niveles de plasticidad neuronal.** Distintos estímulos pueden provocar modificaciones en cada uno de ellos. Durante la **neurogénesis**, nuevas neuronas se integran a circuitos neuronales preexistentes. La **arborización y el *pruning*** constantemente permiten el remodelamiento de las dendritas, en ellas se establecen microfilamentos (líneas punteadas) que pueden dar a origen o no, a

espinas dendríticas. La **sinaptogénesis** ocurre entre dos neuronas a partir de las extensiones de dichos microfilamentos, aquellos que logran conectarse constituyen una sinapsis (recuadro) mientras que aquellos que no lo logran son eliminados (*pruning*). La **fortaleza sináptica**, o transferencia de información a través de las sinapsis puede regularse a través de LTP o LTD (potenciación o depresión a largo plazo, por sus siglas en inglés *long term potentiation* o *depression*, respectivamente); donde las sinapsis activas son fortalecidas por LTP y las inactivas o inadecuadas se eliminan por LTD. Finalmente, en la **plasticidad genómica**, los estímulos en el SNC pueden regular la transcripción de genes involucrados en cada uno de estos procesos de plasticidad neuronal. Con modificaciones de Castrén & Hen, 2013. [4].

Una de las acciones más interesantes desarrolladas en el sistema nervioso es el proceso de sinapsis. La sinapsis consiste en sitios de unión entre dos neuronas por la cual se transmite un impulso nervioso. Las sinapsis están sujetas a procesos de **plasticidad sináptica**, que implican modificaciones en la fuerza o eficacia de la transmisión de la señal que proviene de una sinapsis preexistente [6]. La plasticidad sináptica es el proceso por el cual el cerebro convierte una experiencia transitoria en rastros de memoria persistentes [6]. También ocupa un rol fundamental en el desarrollo de los circuitos neuronales. Por lo tanto, aquello que afecte la plasticidad sináptica puede desencadenar desordenes neurodegenerativos diversos [7]. Es así, que el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen a la plasticidad sináptica en cualquier área del cerebro, es fundamental para comprender las bases neurales de la función cerebral normal y anormal.

Los ES cumplen un rol preponderante no sólo en las primeras etapas del desarrollo neuronal, sino también en las neuronas maduras, para el mantenimiento y la reorganización de las estructuras dendríticas [8]. Las dendritas son los principales sitios celulares en donde las neuronas reciben, procesan e integran las múltiples señales pre-sinápticas [9]. Tanto la ramificación, densidad, como también la forma de sus espinas, pueden sufrir cambios significativos durante el desarrollo y la vida de una neurona. Las **espinas dendríticas** (ED) se componen de microfilamentos de actina sometidos a una remodelación dinámica necesaria para el desarrollo de circuitos neuronales que están sujetos a la regulación de varios estímulos tanto externos como internos al organismo [10]. Las hormonas sexuales, como estrógenos y progestágenos, están implicadas en la formación de las ED durante eventos de plasticidad estructural en la sinapsis de las neuronas maduras, incrementando la densidad de las mismas a través del control dinámico de los filamentos de actina [11].

Estudios clínicos sugieren que niveles deficientes de ES podrían contribuir a la degeneración de las células neuronales, y esto podría estar relacionado con las diferencias género-específicas y/o aparición o la progresión de enfermedades neurodegenerativas como la demencia, Alzheimer o Parkinson [12]. En estas enfermedades se observan importantes deterioros cognitivos que podrían estar relacionados con alteraciones o fallas en los procesos de

plasticidad sináptica [12]. Interesantemente, estas mismas patologías están correlacionadas con la falta de ES, o alteraciones en sus niveles, [13]. Por ello, los estrógenos y progestágenos son importantes moduladores de la morfología celular del SNC, y se piensa que son críticos para la función y disfunción cerebral [14, 15].

## **1.2 Estrógenos, progestágenos y la plasticidad de espinas dendríticas**

Los ES ejercen importantes funciones regulatorias en el cerebro. Actúan a nivel de neuronas, células gliales, en el tejido endotelial y sirven para adaptar la actividad neuronal a las condiciones fisiológicas cambiantes [3]. Entre ellos, el 17- $\beta$ -estradiol (E2) y la progesterona (P4) son neuromoduladores del tejido cerebral. Estas hormonas tienen acciones homeostáticas, entre ellas la cognición, para la cual la plasticidad sináptica es fundamental.

Los procesos de plasticidad sináptica también pueden ocurrir en distintos niveles de organización del sistema nervioso central. Uno de ellos, es a nivel de las espinas dendríticas. Las mismas son microestructuras que se encuentran en neuronas tanto excitatorias como inhibitorias, que incluyen a las neuronas piramidales de la corteza cerebral y del hipocampo, también en las neuronas de Purkinje en el cerebelo y en neuronas espinosas de tamaño medio del cuerpo estriado [16]. Es en las ED donde se establecen puntos de conexión sináptica entre las neuronas. Por esta razón, las mismas son el sustrato de procesos de plasticidad sináptica que pueden alterar tanto la estructura como la función de la sinapsis excitatoria. Por ello también, han suscitado un gran interés, ya que podrían ser el origen de patologías cerebrales ante una desregulación en su establecimiento [13]. Los ES tienen considerables efectos en la regulación de la formación de ED. El componente estructural fundamental de las ED es el citoesqueleto de actina, que subyace y controla el correcto desarrollo y morfología de las espinas [2].

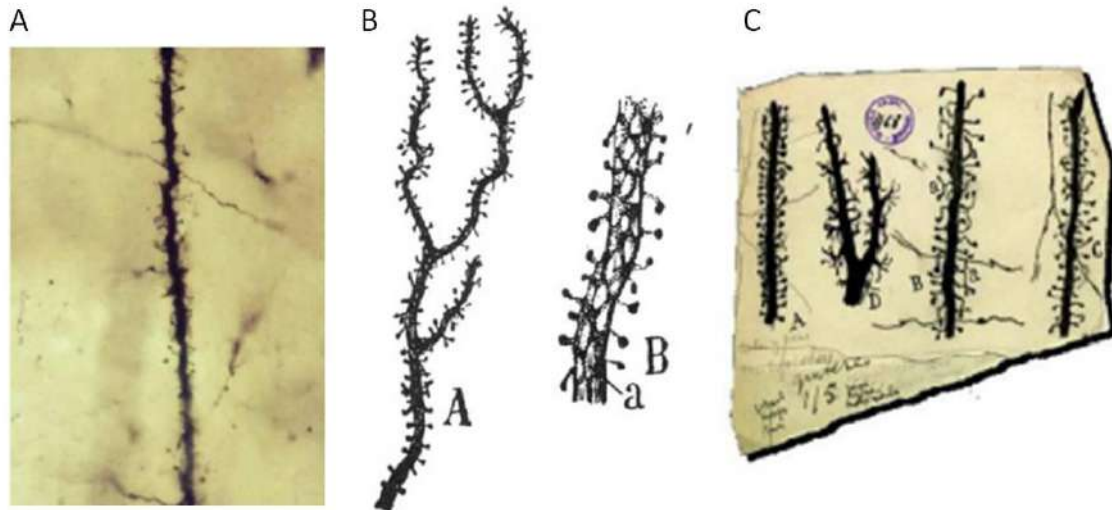
De acuerdo con este concepto, Sanchez, AM y col. han demostrado que tanto E2 como P4 controlan el remodelamiento del citoesqueleto actínico, la formación de complejos de adhesión focal y la ramificación actínica, con el desarrollo de estructuras de membrana especializadas, tales como la formación de espinas dendritas en neuronas corticales [17, 18].

## **1.3 Espinas dendríticas, su morfología y el citoesqueleto de actina**

### **1.3.1 Espinas dendríticas, contribuciones de Santiago Ramón y Cajal**

Santiago Ramón y Cajal fue un neurólogo e histólogo español que en 1888, aplicando el método de tinción de Golgi describió la presencia de “espinas” sobre las dendritas de neuronas de Purkinje en el cerebelo de aves (Figura 2). En su estudio titulado *Estructura de los centros*

*nerviosos de las aves* de 1888, las espinas dendríticas fueron definidas y descritas como tal por este investigador, quien sembró las bases para los miles de estudios posteriores que se realizaron sobre estas estructuras [19].



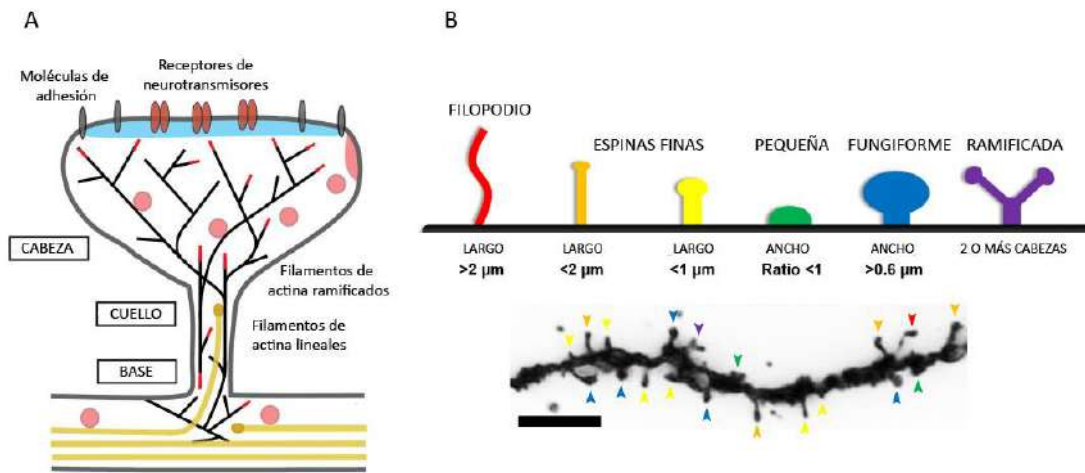
**Figura 2. Láminas de Santiago Ramón y Cajal sobre su estudio de las espinas dendríticas. A.** Microfotografía de una dendrita de neurona piramidal de uno de sus preparados con la tinción de Golgi. **B.** Ilustraciones de las espinas dendríticas a partir de sus preparados. **C.** Ilustración de espinas de conejo (A), de un niño (B), de un gato (C) y de una neurona motora (D). A partir de estas imágenes, Ramón y Cajal indagó sobre la funcionalidad de estas estructuras en las neuronas, y a pesar de no contar con la tecnología suficiente para comprobarlo de manera experimental, sugirió que las espinas podrían ser sitios receptores para conexiones axonales. Propuso la idea de que las espinas se debieran extender en gran medida por toda la superficie de las dendritas y, por lo tanto, esto aumentaría drásticamente su capacidad para recibir las conexiones axonales. Además Cajal propuso que los cambios físicos en las espinas podrían estar asociadas con la función neuronal y el aprendizaje, premisa que actualmente se encuentra comprobada por numerosos estudios. Todos ellos basados en los descubrimientos de este notable investigador. Modificado de [19].

### 1.3.2 Formación de espinas dendríticas

La morfología de las espinas es altamente variable. Se ha determinado que los cambios morfológicos de las ED se correlacionan con la fuerza que tiene una sinapsis, y esto contribuye a fortalecer la memoria de una red neuronal [20].

En las ED se distinguen tres compartimientos distintos: la **base** (o eje dendrítico) es la unión entre la dendrita y el cuello de la espina. El **cuello** propiamente dicho en la parte media, y finalmente una **cabeza** bulbosa (Figura 3A). Estas estructuras se presentan en una gran variedad de formas y de tamaños [21]. De manera convencional, a través de estudios de microscopía se han establecido tres categorías principales de ED basadas en su morfología; **espinas finas** (*thin spines*), de cuello largo y cabeza angosta; **espinas pequeñas** (*stubby spines*), que son cortas sin un cuello definido; y **espinas fungiformes**, con un cuello angosto y una

cabeza ancha (*mushroom spines*) (Figura 3). A pesar del continuo consenso por clasificar estas estructuras de acuerdo a la morfología, las ED pueden presentarse en una amplia variedad de formas (incluidas filopodios y espinas con cabeza ramificada) y, dependiendo de la estimulación recibida pueden cambiar de una forma a otra (Figura 3B).



**Figura 3. Estructura y morfología de las espinas dendríticas. A)** Esquema de una espina dendrítica fungiforme, en el mismo se muestran los compartimentos típicos de estas espinas y también algunos componentes celulares básicos que las forman: microtúbulos (en amarillo), filamentos de actina (en negro), endosomas (en rosa), y la densidad postsináptica (en azul) que incluye a proteínas de adhesión y receptores de neurotransmisión. Nótese que los filamentos de actina se extienden desde la base, se mantienen comprimidos de forma lineal en el cuello y se ramifican en la cabeza (en rojo se indican los extremos positivos\* que permiten la polarización de los filamentos). Adaptado de Hotulainen & Hoogenraad, 2010 [21]. **B)** El esquema superior ejemplifica los tipos de ED que se encuentran en neuronas de corteza cerebral y los parámetros geométricos a tener en cuenta para su distinción. En la parte inferior se muestra una fotografía de un segmento de dendrita de neurona piramidal donde se señalan los diferentes morfotipos con flechas de colores correspondientes al tipo de espina. La barra de escala corresponde a una longitud de 5  $\mu\text{m}$ . Adaptado de Risher *et al.* 2014, [22] y de Sorra & Harris, 2000 [23]. \*Los filamentos de actina se caracterizan por poseer extremos polarizados, esto es un extremo de crecimiento rápido o extremo positivo y el extremo opuesto de crecimiento lento o extremo negativo. Los monómeros de actina G se incorporan al extremo positivo de un filamento y se desprenden por el extremo negativo [24].

Si bien no existe un consenso universal en cuanto a las dimensiones de cada componente de una espina para realizar una clasificación, los autores Sorra & Harris, 2000 [23] mediante estudios de microscopía electrónica establecieron desde temprano los parámetros que se indican en la Figura 3B (parte superior) para clasificar ED en los morfotipos anteriormente mencionados. Así, una prolongación fina de la dendrita de más de 2  $\mu\text{m}$  de extensión y sin cabeza, es considerada un **filopodio**, una espina con un cuello de longitud entre 2 y 1  $\mu\text{m}$ , es **fina**, si carece de cuello y su ancho es menor a 1  $\mu\text{m}$  es **pequeña**, y si posee un cuello fino y una cabeza de ancho superior a 0,6  $\mu\text{m}$  es **fungiforme**.

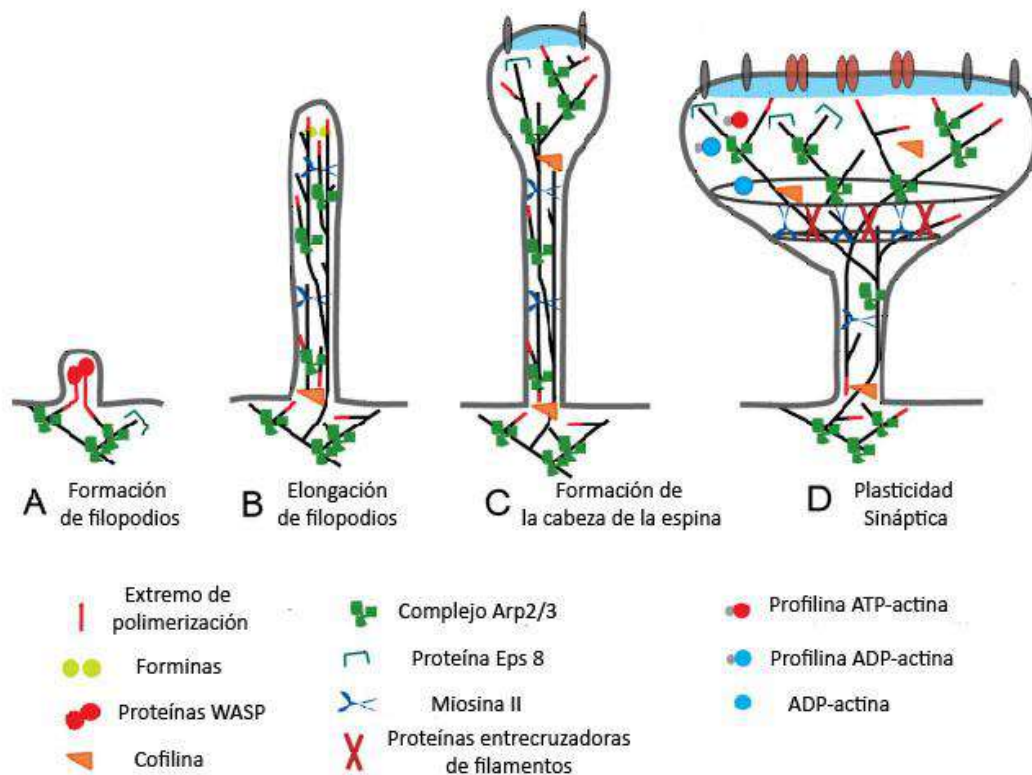
Los cambios estructurales que sufren las ED influyen en su función. Al ser ricas en filamentos de actina, que a su vez sufren cambios dinámicos de ensamblaje y desensamblaje, se entiende que tanto la estructura como la función de las ED es dictada por los cambios dinámicos que puede sufrir la actina. Existen miles de proteínas asociadas a la actina, cuyas interacciones funcionales constituyen un área activa de investigación [25]. Los cambios en la plasticidad se producen en respuesta a estímulos específicos e implican una señalización intracelular hacia esas proteínas que modulan la organización actínica de las ED [26].

### **1.3.3 Dinámica de los filamentos de actina: pasos en la formación de ED**

Durante el desarrollo del cerebro, en las etapas postnatales tempranas, se produce un rápido desarrollo de sinapsis excitatorias [27]. Esto es posible, gracias a una explosión masiva en la formación de filopodios a partir de los ejes dendríticos [21]. Estas estructuras son cruciales para alcanzar y mantener una correcta densidad de ED, ya que comienzan a contactar con axones, y esto permite que se transformen en espinas maduras y establezcan sinapsis. Por ejemplo durante el *pruning* (constante depleción de contactos inapropiados o innecesarios), los brotes de microespinas son modelados y transformados en la base para formar las ED, dependiendo de los inputs que reciban [28].

La dinámica del citoesqueleto de actina en las ED ha sido foco de numerosas investigaciones [29] que cada vez se realizan con mayor nivel de detalle. Por ejemplo, se ha determinado que en espinas maduras están presentes dos reservorios de filamentos de actina, uno estable que ocupa un 5-25% de la espina localizándose en la base de la cabeza constituyendo el esqueleto central de la misma con una tasa de recambio de 17 minutos; el otro, un reservorio dinámico que representa el 80-95% del volumen con una tasa de recambio de tan solo 40 segundos [30]. Los estudios en este activo campo de investigación, comenzaron con la determinación de los pasos que permiten el establecimiento de estas estructuras. La formación de las ED se encuentra marcada por una serie de transformaciones progresivas comenzando en los ejes dendríticos (Figura 4) [21]. Para que una espina emerja de estos puntos, ciertas proteínas se adhieren a la membrana de la dendrita ocasionando su curvatura, con posterior desarrollo de fuerzas mecánicas que empujan la membrana hacia el exterior de la dendrita [21]. Este paso es posible gracias a la naturaleza de la actina G (monómero) y su capacidad de polimerizarse para formar filamentos perpendiculares al eje dendrítico que proporcionan la fuerza necesaria para iniciar la formación de un filopodio (Figura 4A), fina protuberancia sin cabeza, considerados como precursores de ED. La formación de una espina continua con la elongación del filopodio (Figura 4B) y la formación de su cabeza (Figura 4C). En este paso las ED son delgadas, largas y de cabeza pequeña (espinas finas). A partir de este punto, y dependiendo de los estímulos

fisiológicos que reciben, las ED son sitios activos de plasticidad (Figura 4D), donde pueden aumentar o disminuir de tamaño, de número y/o de morfología.



**Figura 4. Mecanismos moleculares durante la formación de ED.** **A.** Formación de filopodios. A partir de los filamentos de actina existentes en el eje dendrítico, las proteínas de la familia WASP (como WAVE1) activan al complejo Arp2/3 que permite la ramificación de los mismos previa inactivación de la proteína Eps8 que impide la polimerización de los filamentos en los extremos libres. **B.** Elongación de filopodios. En este paso las proteínas forminas permiten la polimerización en la punta de los filamentos, miosina II regula la longitud de los filamentos permitiendo su contractilidad, cofilina los estabiliza desde la base y el complejo Arp2/3 continua promoviendo la ramificación de los mismos. **C.** Formación de la cabeza de la espina. Para esto ocurre una ramificación masiva de los filamentos a cargo del complejo Arp2/3. **D.** Plasticidad de la espina. Las ED pueden alcanzar un morfotipo maduro (espinas fungiformes) que albergan numerosas proteínas reguladoras de la actina (por ejemplo, profilinas que permiten el cambio de ADP-actina a ATP-actina fundamental para la polimerización) y que en respuesta a los estímulos recibidos permiten que las ED sean estructuras sumamente dinámicas que constantemente crecen, se encogen o cambian de forma. Adaptado de Hotulainen & Hoogenraad, 2010 [21].

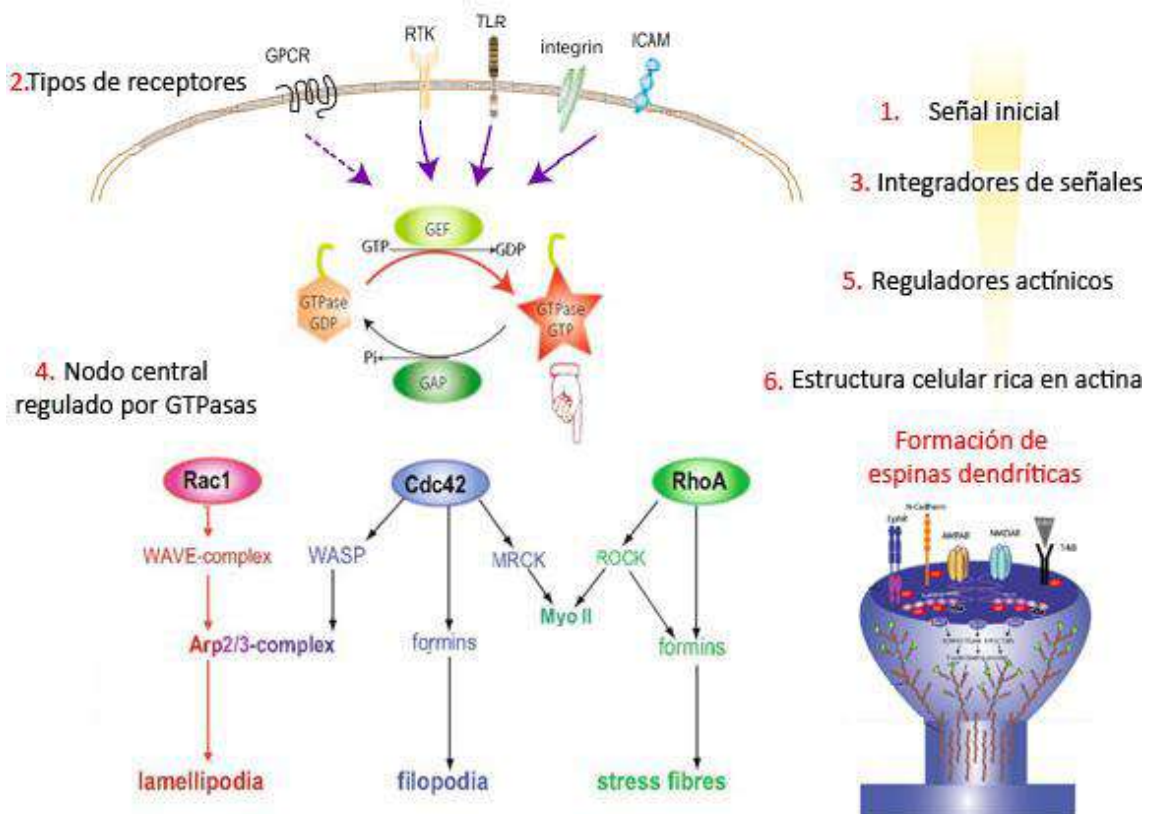
### 1.3.4 Dinámica de los filamentos de actina: vías de señalización que regulan la formación de ED

Las ED son estructuras altamente dinámicas. Su formación, maduración y plasticidad depende especialmente del remodelamiento del citoesqueleto de actina [31]. La vasta mayoría de los estudios sobre la formación dendrítica son acompañados por determinaciones de las proteínas involucradas, ya sea estudiando vías de señalización o



enfocándose en proteínas claves de unión a actina (para un mayor nivel de detalle en cuanto a las proteínas involucradas en la formación de ED, se recomienda el review de Sala & Segal, 2014) [32]. Esta tesis comprende el estudio de vías de señalización impulsadas por hormonas, como estradiol y progesterona, hacia la reorganización del citoesqueleto de actina en cultivos primarios de neuronas corticales de rata. Una de nuestras principales inquietudes es elucidar la vinculación entre las proteínas que disparan el inicio y el recambio de estructuras ricas en actina, como sucede en la formación de las espinas dendríticas [33]. El estudio detallado de estas vías de señalización proporcionan importante avances en la comprensión de los mecanismos de regulación de la reorganización de los filamentos actínicos en la formación dendrítica, y su asociación con las funciones cognitivas (aprendizaje y memoria) en un contexto hormono-dependiente [33].

Estudiar una vía de señalización completa, implica evaluar el efecto de una señal inicial, su interacción con el receptor de la misma, la consecuente transducción de señal que implica diversos mecanismos de codificación y finalmente culmina con una respuesta celular (Figura 5) [34].



**Figura 5. Pasos que requiere una vía de señalización para la formación de ED.** 1 y 2. Frente a un estímulo o **señal inicial**, distintos tipos de **receptores** inician una señalización mediada por diversos mecanismos. 3 y 4. Luego, **proteínas integradoras de señales** como quinasas y proteínas andamio modulan la actividad de los GEFs, factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (activadores de GTPasas) y GAPs, proteínas activadoras de actividad GTPasa (inhibidores de GTPasas) regulando así la

**activación de las GTPasas. 5.** La señalización continúa cascada abajo hacia los **reguladores actínicos** que son proteínas efectoras de las GTPasas. **6.** Las mismas pueden ser también proteínas quinasas y andamio pero su función es estrictamente la regulación de la formación de estructuras actínicas como las espinas dendríticas. Adaptado de Steffen *et al.* 2017 [34] y de Bolognin *et al.* 2014 [35].

Un nodo central de las vías de señalización relacionadas con la actina es la acción ejercida por las pequeñas GTPasas de la familia Rho. Estas proteínas regulan los procesos bioquímicos que afectan la formación de diversas estructuras de actina, incluidas las espinas dendríticas. La familia de las Rho GTPasas comprende aproximadamente 20 miembros en mamíferos. De ellas, las más estudiadas son RhoA, Rac1 y Cdc42. Cada una de ellas tiene una función específica en lo que respecta a la reorganización del citoesqueleto actínico (Figura 5) [34].

Si tomamos como señal inicial la estimulación de E2/P4, y como respuesta celular la formación de ED, tenemos en el medio una vía de transducción de señales para decodificar. Partimos de una señal inicial que debe llegar hasta el complejo Arp2/3 pasando por el nodo de las GTPasas. Para dilucidar este camino evaluamos el rol de una serie de proteínas cuya función y relación con la formación de ED se resumen en la siguiente tabla (Tabla 1).

<b>Tabla 1. Proteínas involucradas en la señalización de E2 y P4 hacia la formación de ED</b>		
<b>Integradores de señales</b>		
<b>Proteínas</b>	<b>Función</b>	<b>Implicancia en la formación de ED</b>
<b>Src y FAK</b>	Proteínas quinasa no receptoras. Regulan numerosas vías rápidas de señalización implicadas en la progresión del ciclo celular, la diferenciación, la respuesta inmune, el desarrollo neuronal y la reorganización del citoesqueleto a través de mecanismos de fosforilación. Interactúan con una gran variedad de factores de crecimiento, integrinas y receptores celulares que disparan su activación. Ambas forman un complejo, tras su activación por fosforilación en Tirosina (Y) 419 (Src) y 397 (FAK) [36, 37].	El tratamiento de neuronas tanto de corteza cerebral como de hipocampo, mediante el uso del inhibidor específico de Src (PP2), impide la formación de ED y afecta la sinaptogénesis [38, 39]. La fosforilación de FAK en Y397 permite la formación y estabilización de ED fungiformes, mediante receptores tirosina quinasa, y su silenciamiento disminuye la densidad dendrítica en neuronas de hipocampo [40].
<b>Paxilina</b>	Proteína de andamio. Cumple un rol en las adhesiones focales reclutando a numerosas moléculas estructurales y de señalización del citoesqueleto actínico, tras su fosforilación específica en residuos de tirosina y serina. Además, regula la activación de las pequeñas GTPasas Cdc42, Rac1 y RhoA, al reclutar GEFs y GAPs, tras su fosforilación en Y118 [41].	Paxilina es reclutada por Src y FAK en neuronas de hipocampo, vía receptores tirosina quinasa, y tras su fosforilación se localiza en sitios de formación de ED [42]. Forma parte de las adhesiones focales durante la formación de ED en neuronas de hipocampo, vía receptores de integrinas [43].
<b>GTPasas</b>		
<b>Proteína</b>	<b>Función</b>	<b>Implicancia en la formación de ED</b>
	GTPasa clave en numerosas vías de	El tratamiento con diversos inhibidores

<b>Rac1</b>	<p>señalización que regulan el citoesqueleto de actina. Muta de un estado inactivo (unida a GDP) a uno activo (unida a GTP). Su activación está sujeta a la acción de proteínas corriente arriba, que la reclutan, activan, desactivan y/o estabilizan. Tras su activación interactúa con proteínas efectoras como Cdk5, PAK1 y proteínas WASP (descriptas en la próxima sección) [44].</p> <p>Su fosforilación en Serina (S) 71 regula su actividad GTPasa y la unión con sus proteínas efectoras. [45].</p>	<p>de Rac1 disminuyen la densidad dendrítica en neuronas de hipocampo. [46].</p> <p>En neuronas de corteza cerebral, la expresión de un constructo dominante negativo de Rac1 impidió la transmisión sináptica, afectando la polimerización actínica en las ED [47].</p> <p>La ausencia de Rac1 provoca una disminución en la formación y maduración de espinas dendríticas en cultivos de neuronas de hipocampo [48].</p>
<b>Reguladores actínicos</b>		
<b>Proteína</b>	<b>Función</b>	<b>Implicancia en la formación de ED</b>
<b>Cdk5</b>	<p>Es una quinasa de Serina (S)/Treonina (T) dependiente de ciclinas, que regula numerosas vías de señalización directamente implicadas con el remodelamiento actínico en el SNC [49]. Su activación depende de la interacción con las proteínas p35 y p39, junto a su fosforilación específica en Y15 [50].</p> <p>Entre sus diversas proteínas blanco se encuentra WAVE1 que es fosforilada en S310, S397 y S441 [51].</p>	<p>El uso de su inhibidor Roscovitina impide la formación de ED en neuronas de corteza mediada por E2 y P4. [18, 52].</p> <p>Ratones <i>knockout</i> para las proteínas p35 y p39 exhiben una disminución en la densidad dendrítica en corteza e hipocampo [53].</p> <p>La fosforilación de Cdk5 sobre Karilina7, proteína GEF de Rac1 regula la morfología y densidad de ED en neuronas corticales [54].</p>
<b>PAK1</b>	<p>Quinasa S/T con una elevada expresión en cerebro. Regula vías directamente implicadas en la reorganización actínica. Su fosforilación en T423, presente en su sitio catalítico, permite su activación. IPA-3 es un inhibidor alostérico de dicha proteína [55].</p>	<p>La expresión del constructo mutante constitutivamente activo vs. PAK1 incrementa la densidad dendrítica en neuronas de corteza [56].</p>
<b>WAVE1</b>	<p>Factor promotor de la nucleación actínica tipo I. Su función y características se explican con detalle en la próxima sección.</p>	<p>En neuronas de hipocampo provenientes de ratones knock-out para WAVE1 se observa un acortamiento marcado en la extensión de dendritas y axones, con una baja densidad de ED [57].</p> <p>El silenciamiento de WAVE1 en neuronas de corteza e hipocampo, y en ratones disminuye drásticamente la densidad dendrítica [51].</p> <p>La sobreexpresión de WAVE1, en neuronas estriatales restaura la densidad de espinas dendríticas [58].</p>
<b>Cortactina</b>	<p>Factor promotor de la nucleación actínica tipo II. Su función y características se explican con detalle en la próxima sección.</p>	<p>La sobreexpresión de Cortactina restaura los niveles de densidad dendrítica en neuronas de hipocampo silenciadas para su proteína reguladora CTTBP2 [59].</p> <p>Cortactina estabiliza y se localiza en ED de neuronas de hipocampo que sobreexpresan la quinasa Abl2/Arg [60].</p>

<p><b>Complejo Arp2/3 (Arp: actin related protein)</b></p>	<p>Complejo multiproteico compuesto por 7 subunidades: Arp2, Arp3, ARPC1-5. Su función es generar redes de filamentos de actina entrecruzados en procesos vitales como la motilidad celular, el tráfico de vesículas, la formación y establecimiento de uniones adherentes, entre otros [61]. Su actividad es regulada por la unión de proteínas inhibitoras y activadoras, las últimas conocidas como factores promotores de la nucleación actínica o NPFs [62]. La fosforilación en la subunidad Arp2, en el residuo específico T237, es clave para la completa activación del complejo, junto con la interacción con los NPFs [63].</p>	<p>El silenciamiento de ARPC3 produce una pérdida en el número de sinapsis y ED de neuronas de corteza cerebral de ratón [64] y de hipocampo [65]. En muestras de corteza cerebral de pacientes con esquizofrenia se detectó una baja expresión de los componentes del complejo Arp2/3, junto a una escasa densidad de ED [66].</p>
--	--	---

### 1.3.5 Integradores de señales, paxilina y Rac1 GTPasa

Durante la formación de estructuras de membrana basadas en filamentos de actina, las proteínas quinasas Src y FAK cumplen un rol preponderante en la integración de señales extracelulares. Las mismas actúan reclutando señales que comunican a proteínas adaptadoras como paxilina, y pequeñas GTPasas como Rac1. Una vez activada Rac1, cumple un rol esencial regulando proteínas claves del citoesqueleto, como cortactina y WAVE1. Src es la principal tirosina quinasa no receptora de su familia, y junto a FAK, forma parte de un complejo responsable en la formación de adhesiones focales. Ambas proteínas poseen un papel importante como proteínas señalizadoras en los procesos que involucran la diferenciación, adhesión, migración e invasión celular [36, 67]. La estructura, función e interacción entre Src y FAK, junto a sus implicancias clínicas frente a un desbalance en su actividad quinasa, han sido ampliamente estudiadas en el desarrollo de distintos tipos de cáncer, debido a su rol como activadoras del citoesqueleto de actina durante la invasión celular [68, 69]. Ambas proteínas se encuentran en una conformación tridimensional “cerrada” dada por interacciones intermoleculares que ocultan el dominio quinasa regulando de esta manera su actividad. Por ello, la activación de las mismas consiste en “abrir” dichas conformaciones y exponer los dominios quinasas [36, 67]. Dos eventos permiten la activación de Src y FAK en respuesta a estímulos extracelulares, en primer lugar FAK se autofosforila en Y397, esto permite reclutar a Src que se une a FAK mediante un dominio SH2 (que reconoce y permite la unión a residuos de Y fosforilados). Esta interacción provoca un cambio conformacional en Src, seguido de su autofosforilación en Y416. De esta manera, Src es reclutada y activada y posteriormente fosforila a FAK en Y576 y Y577 en su dominio quinasa, lo que provoca una mayor activación de FAK. Por lo tanto, Src y FAK trabajan estrechamente para formar un complejo molecular, que regula numerosas vías de señalización, en particular las relacionadas a la motilidad celular

junto con otras proteínas adaptadoras como paxilina y pequeñas GTPasas de la familia Rho, como Rac1 [70].

Otra proteína reclutada por FAK quinasa es la proteína andamio Paxilina. La misma se encuentra conformada por múltiples dominios conservados entre diferentes especies (mamíferos, aves e insectos), y posee un rol fundamental en la regulación del citoesqueleto de actina [41]. Entre ellos, presenta cinco motivos ricos en leucina (repeticiones LD) y cuatro dominios LIM dispuestos en tándem que median la localización de paxilina en las adhesiones focales [41]. Las repeticiones LD permiten que paxilina interactúe con proteínas de unión a actina, quinasas y proteínas GEF y GAP de las GTPasas de la familia Rho [41]. Es por ello que paxilina es una proteína adaptadora presente en las adhesiones focales junto con FAK, con quien se asocia tras su fosforilación en Y118 y es necesaria para la migración de distintos tipos de células, incluidas neuronas de corteza en pleno desarrollo [71]. Paxilina es regulada mediante su fosforilación, la cual controla su actividad biológica y le permite coordinar la activación espacio-temporal de diversas GTPasas, como RhoA, Cdc42, y Rac1. Paxilina recluta a GEFs y GAPs específicos y esto le permite regular la adhesión durante la migración celular polarizada [41]. Asimismo, se ha descrito también que la activación de receptores tirosina quinasa puede conducir al reclutamiento y fosforilación de Src, FAK, y paxilina, iniciando una vía de señalización corriente abajo que incluye a GTPasas en el ensamblaje de filamentos de actina durante la formación de espinas dendríticas en cultivos de neuronas de hipocampo [42]. Es por ello, que paxilina podría resultar un nexo clave entre las señales que transmiten Src y FAK hacia reguladores actínicos como Rac1. Se ha descrito que tras su fosforilación en Y118, por Src/FAK, recluta a la proteína PIX (un GEF de Rac1), y a PAK1 (quinasa efectora de Rac1) para el establecimiento de adhesiones focales mediadas por Rac1 durante la protrusión de lamelipodios (estructuras de membrana basadas en filamentos de actina) [72]. Paralelamente, estudios previos de nuestro laboratorio determinaron que Rac1 es un componente fundamental en la organización del citoesqueleto de actina durante la formación de ED tras ser reclutado por Src y FAK [17, 18]. A nivel cerebral, Rac1 cumple un importante rol en diferentes aspectos del desarrollo neuronal, incluyendo la migración neuronal, extensión y ramificación de neuritas (axones y dendritas), y sinaptogénesis [73].

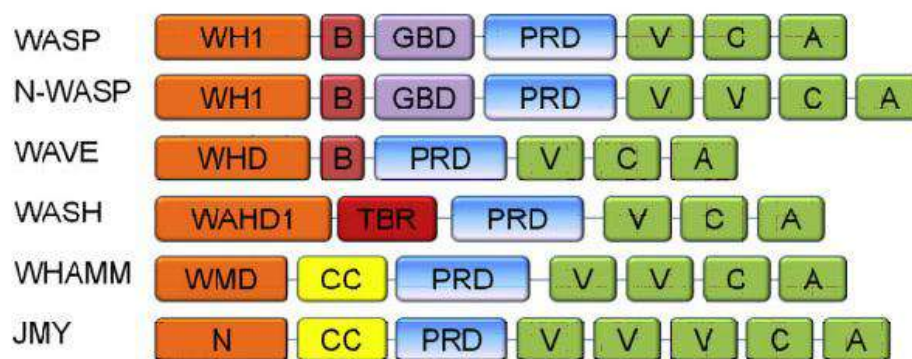
De esta manera, Src y FAK son esenciales en integrar y transmitir señales provenientes desde diversos tipos de receptores a proteínas reguladores de la reorganización citoesqueleto actínico como paxilina y Rac1.

A nivel neuronal, Src, FAK, paxilina y Rac1 cumplen un rol crucial en la organización estructural de las neuronas, modulando distintos procesos como: la migración neuronal durante el desarrollo de la corteza [74], del hipocampo [75] y del cerebelo [76]; el guiado de neuritas [77,

78] y la estabilización de contactos sinápticos a través de la formación de ED [39, 40, 79]. Por ello, la regulación de la actividad de éstas proteínas resulta ser crítica para un preciso y delicado funcionamiento neuronal.

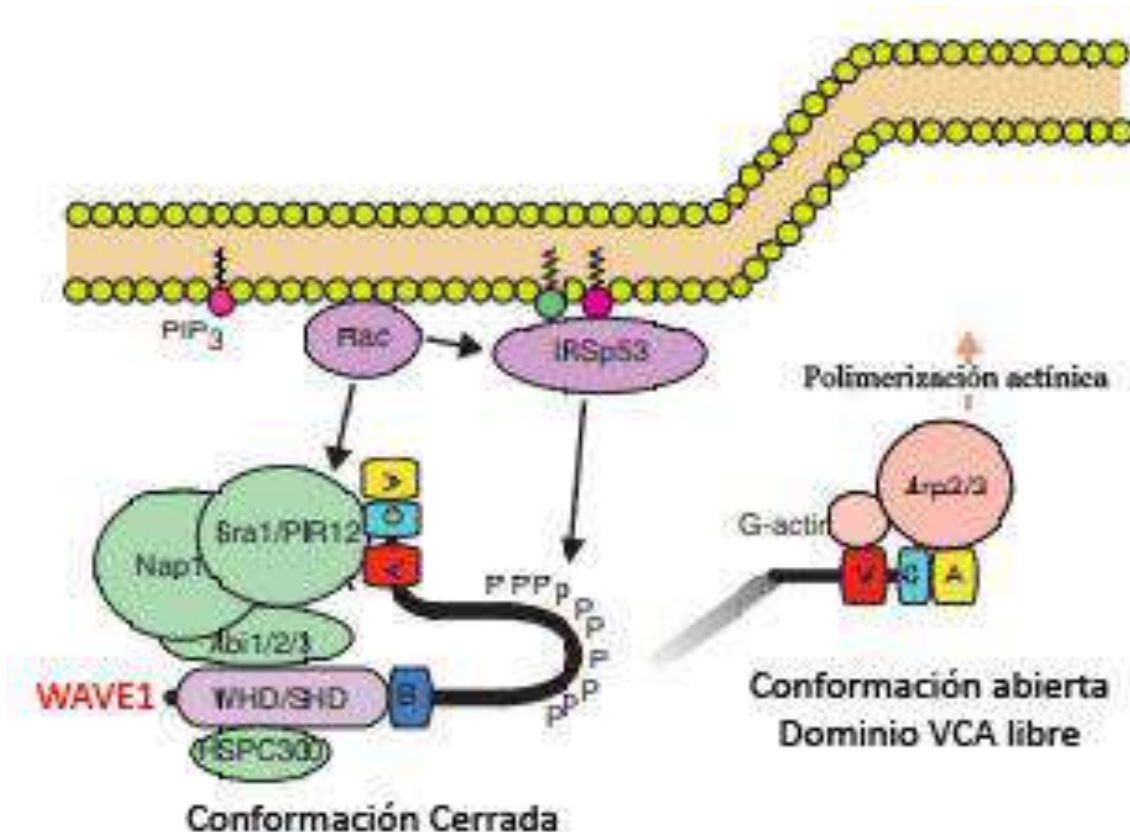
#### 1.4 WAVE1 y la formación de espinas dendríticas

Existe un importante mecanismo de nucleación del citoesqueleto actínico mediado por proteínas pertenecientes a la familia de las proteínas Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP), entre ellas se encuentra la proteína de la familia WASP con dominio *verproline* homólogo tipo 1 o WAVE1 [80]. Esta familia comprende varios miembros que comparten similitudes estructurales entre ellas (Figura 6).



**Figura 6. Esquema estructural de la familia de las proteínas WASP.** Cada color indica los distintos dominios de estas proteínas. Todas ellas comparten el dominio rico en prolina (PRD) indicado en celeste, y en verde se muestra, en el extremo C-terminal, el dominio VCA (también llamado WA o WCA) por el cual se caracterizan. El mismo contiene tres secuencias: la secuencia (V) que permite unir monómeros de actina G, la secuencia conectora (C) y la secuencia (A) que permite la unión con el complejo Arp2/3. Nótese que WAVE carece del dominio GBD (lila) de unión a GTPasa y posee en su extremo N-terminal el dominio homólogo WAVE (naranja). En el texto principal se indica la función del mismo. Adaptado de Burianek & Soderling, 2013 [81].

Existen tres isoformas de WAVE, WAVE1-3, todas ellas comparten los mismos dominios (Figura 6). Su diferencia radica en los tejidos donde se expresan y en el caso de WAVE1, su expresión es elevada en el SNC [82]. WAVE1 es una proteína reguladora del citoesqueleto, la cual desempeña un importante rol en la formación de andamios actínicos. Esta proteína une filamentos actínicos y promueve el proceso de polimerización/despolimerización, por medio de su estado fosforilado/desfosforilado, respectivamente [51]. WAVE1 transmite señales desde GTPasas específicas (como Rac1), hacia el complejo Arp2/3, dando lugar a la polimerización actínica [83]. Este proceso es fundamental para la rápida formación de redes de actina hacia la periferia de la célula, proporcionando la fuerza de protrusión necesaria para la formación de las espinas dendríticas durante la plasticidad y transmisión neuronal [84] (Figura 7).



**Figura 7. Mecanismo de activación de las proteínas WAVE.** En un estado basal, permanecen en una conformación “cerrada”, mediante la interacción con las proteínas regulatorias Sra1, Nap1, HSPC300 y Abl formando un complejo. En este estado, el dominio VCA necesario para la activación de Arp2/3 se encuentra resguardado por la unión con Sra1. A través de la interacción con Rac1 se produce un cambio conformacional que rompe la interacción de Sra1 con el dominio VCA, liberándolo para que se una al complejo Arp2/3 y lo active. Adaptado de Kuriso & Takenawa, 2009 [85], y Burianek & Soderling, 2013 [81].

La regulación sobre la actividad de WAVE1 resulta de total interés, debido a que la falta de control sobre la activación de WAVE1 podría ser perjudicial para procesos cognitivos [51]. De hecho, ratones *knock-out* para el gen WAVE1 exhiben un déficit en el aprendizaje y la memoria [86], formulando una interesante hipótesis que postula que la prevalencia de un incremento en el deterioro cognitivo y algunos desordenes degenerativos observados en condiciones de disminución o pérdida de estrógenos y/o progestágenos podrían deberse, en cierta medida, a la falta de activación y control de WAVE1 por estas hormonas [18, 52].

Si bien el mecanismo de señalización del E2 y P4 en el control de la formación dendrítica vía moesin, FAK y WAVE1, fue recientemente elucidado por nuestro grupo de trabajo, estos resultados sugieren que existe un “preciso mecanismo de control” que regula la formación dendrítica a través del estado fosforilado/desfosforilado de WAVE1 [17, 18]. Cdk5 (*cyclin-dependent kinase 5*) es la proteína quinasa responsable en la fosforilación y activación de WAVE1 en tres sitios específicos (Ser<sup>310</sup>, Ser<sup>397</sup> y Ser<sup>441</sup>), promoviendo la formación de espinas





### **1.5 El switch On-Off: Cdk5 y PP2A**

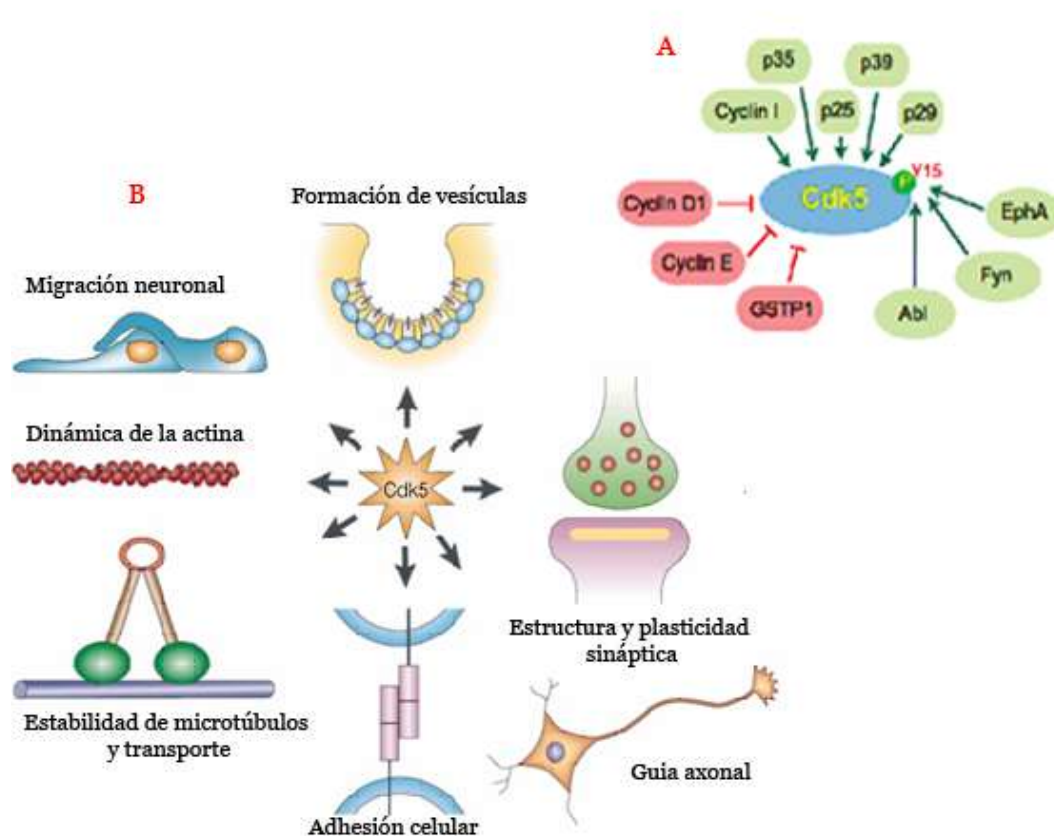
En las células, las proteínas llevan a cabo miles de funciones específicas para regular distintos procesos. Para ello, las células requieren herramientas moleculares que modulen la actividad de dichas proteínas específicas. Por ejemplo, las proteínas quinasas y fosfatasas, cuya función es la de regular la fosforilación reversible de las proteínas. Actualmente, se han descrito 518 quinasas humanas que presentan un alto grado de similaridad y una estructura conservada [87]. El estudio de las quinasas ha mantenido una increíble atención por parte de la industria farmacológica, y varios compuestos inhibidores de quinasas forman parte de los protocolos de quimioterapia [88].

A diferencia de las quinasas, las fosfatasas son estructuralmente más complejas, y su número es considerablemente menor al de las quinasas con tan solo 189 fosfatasas regulando la desfosforilación en las células [89]. Por esta razón, las fosfatasas recibieron muy poca atención, ya que se consideraba su rol como uno más pasivo y de mantenimiento. Sin embargo, estudios recientes han revelado la importancia del rol que poseen las fosfatasas y las dificultades que hoy existen para diseñar herramientas que regulen su funcionamiento [90]. Es por ello, que estudiar el *switch* molecular quinasa/fosfatasa hacia la regulación en la fosforilación de WAVE1, mediada por E2 y P4, y su repercusión en la formación de ED es de gran interés para nuestro grupo de trabajo.

#### **1.5.1 Rol de Cdk5 en la fosforilación de WAVE1**

Las quinasas dependientes de ciclinas o Cdks, son quinasas de residuos de serinas/treoninas esenciales para la progresión del ciclo celular [91]. Actualmente se han descrito más de 20 miembros en la familia de Cdks [91]. Entre ellas se destaca Cdk5 por presentar características únicas. Si bien Cdk5 comparte grandes homologías con el resto de las Cdks, difiere en dos aspectos fundamentales, posee mecanismos de activación distintos al resto y regula funciones celulares distintivas [91].

Cdk5 fue descrita por primera vez en 1992 por Hellmich y colaboradores [92]. Esta proteína se encuentra altamente expresada en el tejido nervioso, se diferencia de otras quinasas dependientes de ciclina por su activación y rol en funciones celulares distintas al ciclo celular [93]. Cdk5 controla la reorganización del citoesqueleto de actina, adhesión celular, tráfico de membranas, progresión del ciclo celular y diferenciación neuronal. En cuanto a la migración celular, en las neuronas Cdk5 regula la formación de procesos multipolares, la adquisición de polaridad neuronal, la formación de los procesos guía y el modo de locomoción de la migración de estas células (Figura 9) [93].



**Figura 9. Regulación de Cdk5 y los procesos que modula en el cerebro. A.** En verde se señalan las proteínas que ejercen una regulación positiva sobre la actividad de esta quinasa. La fosforilación específica en el residuo Y15 gatillada por distintas quinasas, activan a esta proteína. En rojo se señalan mecanismos inhibitorios. **B.** Cdk5 juega un rol fundamental en cada uno de estos procesos. Adaptado de Dhavan & Li-Huei Tsai, 2001 [94] y de Shah & Debomoy, 2014 [95].

A diferencia del resto de las Cdk5, cuya activación depende de ciertas ciclinas, la activación de Cdk5 en el SNC depende de la asociación con las proteínas p35 o p39 y de la fosforilación en su residuo tirosina Y15 [50, 96, 97].

Cdk5 es un regulador clave en la formación de ED al fosforilar a WAVE1 en sus residuos específicos de serina, descrito por primera vez por Kim J. y colaboradores (2006) [51]. Años más tarde, nuestro grupo de trabajo determinó un rol preponderante de E2 y P4 hacia la regulación de la actividad de Cdk5, desencadenando su fosforilación específica en Y15. Esta vía dependiente de Rac1 hacia la fosforilación de Cdk5, regula la fosforilación de WAVE1 y consecuente formación dendrítica neuronal [17, 18]. Cdk5 actúa como quinasa efectora de Rac1 fosforilando proteínas blanco de Rac1, activándolas o inhibiéndolas, controlando así la dinámica de la actina en distintos procesos neurológicos de gran importancia [49] (Figura 9).

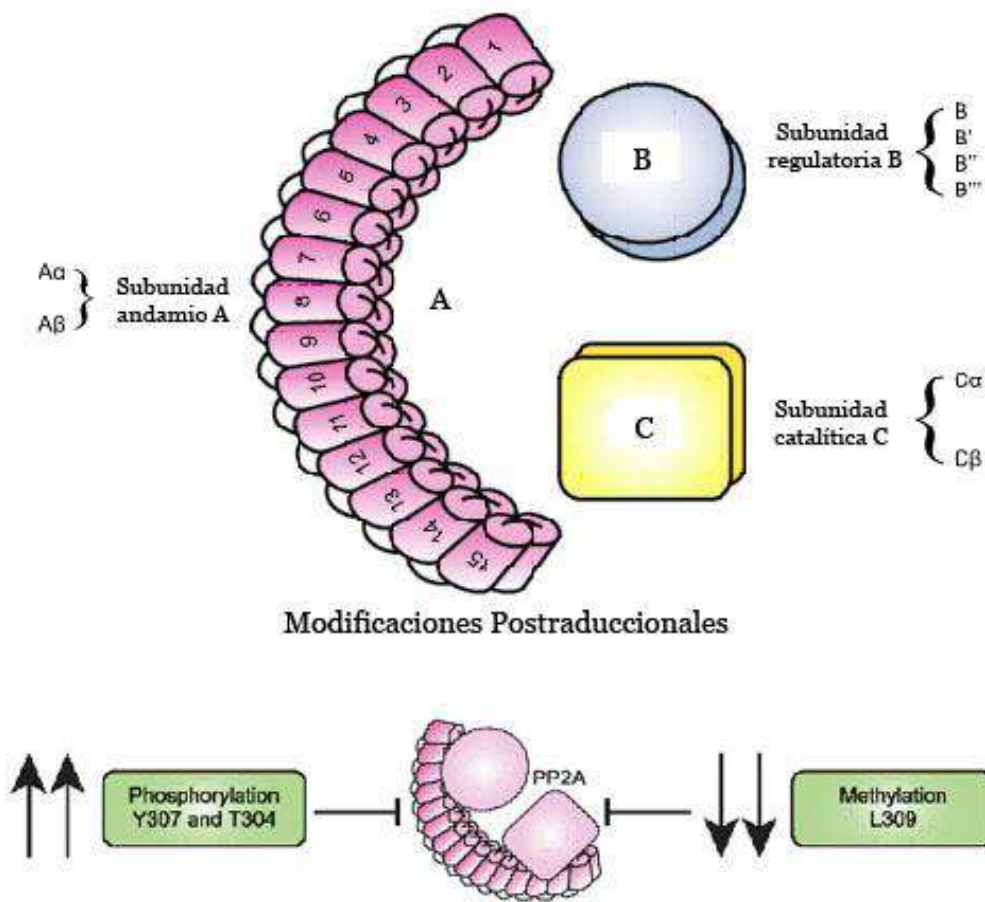
### 1.5.2 PP2A y la desfosforilación de WAVE1

Existen dos clases principales de proteínas fosfatasa, las fosfatasas de tirosina PTPs (por sus siglas en inglés, *Protein Tyrosine Phosphatases*), y las fosfatasas de S/T. Ésta última clase se

divide en tres familias, las fosfatasa de fosfoproteínas (cuyas siglas son PPPs), las fosfatasa dependientes de metaloproteínas y las fosfatasa con secuencia DxDxT [98].

Dentro de las PPPs, que resulta ser la familia más grande, se encuentran las fosfatasa PP1, PP2A, PP2B y PP4. Entre ellas se destaca PP2A, debido a que su disfunción se ha reportado en numerosos tipos de cáncer y en enfermedades neurodegenerativas [90].

PP2A es un heterocomplejo de tres subunidades, una de andamio (A) con quince repeticiones HEAT en tándem, una regulatoria (B) y una catalítica (C). Las subunidades A y C poseen dos variantes  $\alpha$  y  $\beta$ , siendo las versiones  $\alpha$  las más comunes en la mayoría de los tipos celulares. La subunidad B tiene 4 clases de variantes, B, B', B'', y B''' cada clase a su vez, posee entre dos y cinco isoformas. Esta variedad de variantes arrojaría 80 combinaciones distintas de PP2A. De esta forma, la actividad de PP2A puede ser regulada, así como también su localización subcelular y la especificidad por el sustrato, de acuerdo al tipo de subunidad B con el que se forme el heterocomplejo [90] (Figura 10).



**Figura 10. Estructura de PP2A con sus tres subunidades y variantes.** Se muestran además las modificaciones postraduccionales más preponderantes de esta enzima. Las mismas se encuentran en la subunidad C catalítica. PP2A puede ser metilada en leucina (L) 309, fosforilada en tirosina (Y) 307 y treonina (T) 304. La desmetilación en el residuo mencionado y la fosforilación en Y307 inhiben la actividad fosfatasa de PP2A. Adaptado de Sangodkar y col., 2016 [90].

Existen diversos mecanismos que regulan la actividad de PP2A, los más predominantes son las modificaciones postraduccionales en las distintas subunidades y la interacción con sus proteínas inhibitorias endógenas SET y CIP2A [99]. La fosforilación en el residuo Y307 de la subunidad C de PP2A inhibe su actividad (Figura 10). A raíz de esto, se ha determinado que PP2A se encuentra hiperfosforilada en regiones del cerebro afectadas por Alzheimer y esto se correlaciona con elevados niveles de la proteína tau fosforilada en esos pacientes [100].

A pesar de su rol protagónico en el crecimiento celular y la proliferación, PP2A puede alterar el estado de fosforilación de proteínas claves para la regulación del citoesqueleto de las células, afectando la formación de ED [101].

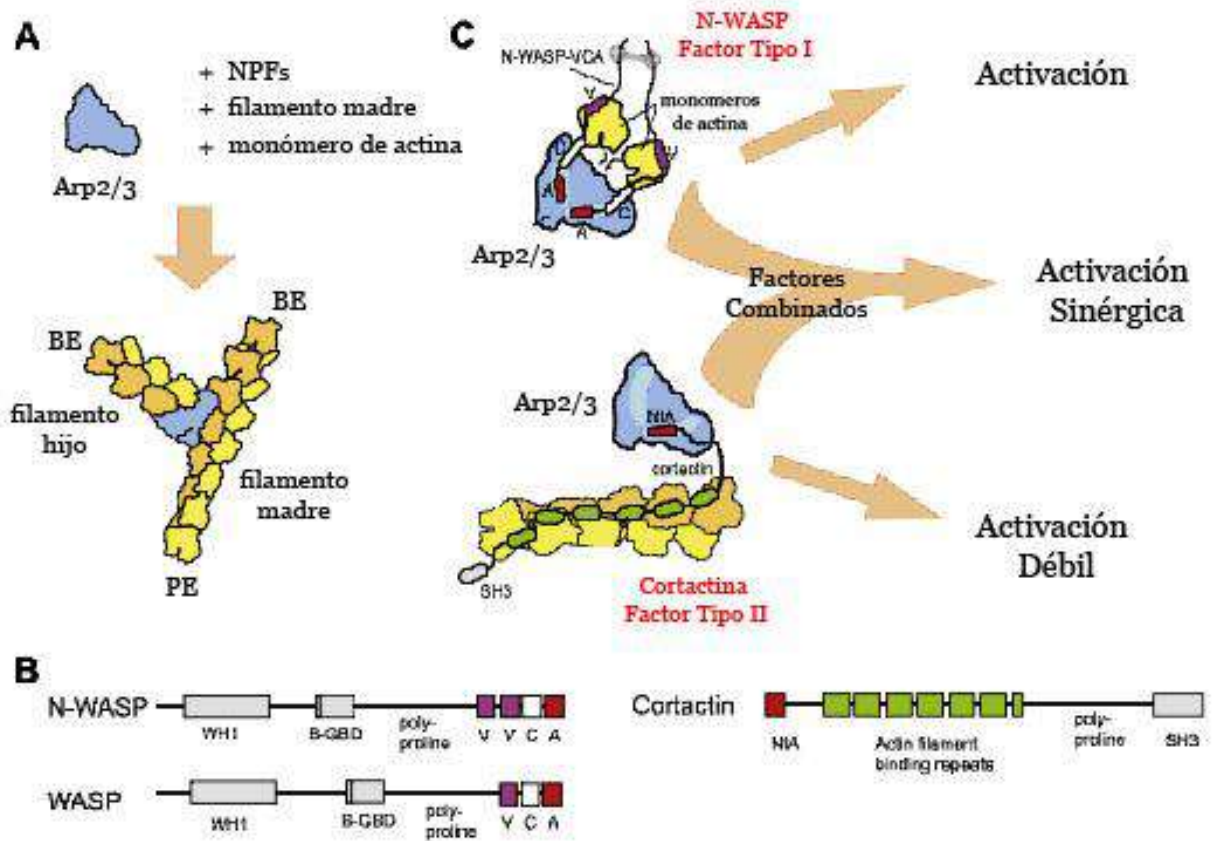
### **1.6 WAVE1, Cortactina y Arp2/3**

Para la formación de ED es fundamental el proceso de *ramificación o nucleación* actínica (formación y ramificación de los filamentos de actina), y esto implica la activación del complejo Arp2/3 por las proteínas regulatorias WAVE1 y cortactina. Esto proporciona la fuerza de protrusión necesaria para la ampliación de la membrana dendrítica y dar lugar a la nueva espina.

Existen dos tipos de proteínas que pueden activar al complejo Arp2/3 y son llamados factores de la nucleación actínica o (NPFs) del tipo I, tal es el caso de WAVE1; y del tipo II como cortactina [102]. Los NPFs interactúan con el complejo Arp2/3 para lograr una ramificación de filamentos eficiente frente a diversos estímulos y responder a las demandas de la célula de manera dinámica, por ejemplo frente a la formación de ED [103].

Cortactina es una proteína capaz de unir filamentos de actina. Es el factor tipo II más conocido por ser sustrato de Src. Esta proteína se une directamente al complejo Arp2/3 y provoca su activación [104]. Su estructura contiene tres sitios claves, una región acídica en su extremo N-terminal (NtA) que interactúa con el complejo Arp2/3, una secuencia de unión a filamentos de actina con repeticiones en tándem, y en el extremo C-terminal un dominio SH3 que le permite interactuar con diversas proteínas regulatorias (Figura 11) [105]. Se ha propuesto que Cortactina recluta al complejo hacia un filamento de actina pre-existente para estimular la nucleación. Sin embargo, la activación de Arp2/3 por cortactina es débil. Este escenario cambia en presencia de las proteínas WASP, en esas condiciones, la activación de Arp2/3 por cortactina es potente. A partir de estas observaciones, se ha sugerido que ambos tipos de NPFs actúan de manera sinérgica sobre Arp2/3 para lograr formar estructuras de actina ramificadas [103] (Figura 11). Para ello, la interacción entre estos factores es crucial. A través de su región NtA, cortactina se une a la subunidad 3 (Arp3) del complejo, y las proteínas WASP a través de

su dominio VCA se unen a Arp3, Arp2 y ARPC1/p40 [102]. En algunas circunstancias, cortactina y las proteínas WASP pueden unirse simultáneamente a Arp2/3, a través de la interacción de ambas con la subunidad Arp3 [102]. Cabe destacar que estos estudios se han realizado estudiando a N-WASP como factor tipo I. A la fecha se desconoce si WAVE1 interactúa de forma similar.



**Figura 11. Modelo de sinergismo entre los NPFs tipo I y II.** **A.** Los componentes necesarios para la ramificación actínica constan del complejo Arp2/3, filamentos preexistentes, monómeros de actina y NPFs. La interacción de todos ellos, dan como resultado ramificaciones actínicas en forma de Y. (BE: extremos barbudos, PE: extremos puntiagudos). **B.** NPFs tipo I (a la izquierda), se muestra la estructura de N-WASP y WASP con sus respectivos dominios; y tipo II (a la derecha), se muestra cortactina con sus dominios NtA (rojo); de unión a filamentos de actina (verde) y SH3 (gris). **C.** Activación del complejo Arp2/3 por ambos tipos de factores. En el caso de N-WASP se propone que dos moléculas son necesarias para la activación del complejo. En el caso de Cortactina, ésta proteína une los filamentos preexistentes a través de su región de repeticiones (en verde) y con su región NtA recluta al complejo Arp2/3. Estos dos tipos de activación combinados dan como resultado una nucleación actínica potenciada. Adaptado de Helgeson & Nolen, 2013 [103].

## CAPÍTULO 2

### OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### 2.1 Fundamentación del problema de investigación

Los esteroides sexuales afectan la morfología celular a través de la regulación no genómica de la actividad de proteínas del citoesqueleto de actina en distintos tipos celulares [106]. Nuestro grupo ha demostrado que en neuronas de corteza cerebral, tanto el estrógeno como la progesterona activan vías de señalización del citoesqueleto de actina fundamentales para el remodelamiento neuronal [17, 18]. Sin embargo el efecto de estas hormonas sobre la actividad de determinados actores clave (presentados en la Tabla 1 del capítulo 1) durante la formación de ED, queda aún por ser determinado. Reguladores actínicos como WAVE1, cortactina y el complejo Arp2/3 inducen la ramificación actínica y son fundamentales para la formación de ED [107]. Estas microestructuras albergan miles de conexiones sinápticas fundamentales para el desarrollo neuronal normal. Este fenómeno es crítico para los procesos cognitivos que dependen fuertemente de la capacidad de las neuronas para modelar sus conexiones. Esto podría sugerir que deterioros cognitivos y ciertos trastornos degenerativos observados en condiciones de bajos niveles de E2 y P4 podrían deberse, en cierta medida, a la falta de regulación de las proteínas involucradas en la formación de ED. Por lo tanto, estudiar las bases moleculares de la acción de estas hormonas a nivel cerebral resulta de gran importancia para comprender los efectos fisiológicos en un contexto de deficiencia hormonal como sucede durante el envejecimiento, donde se observan deficiencias cognitivas, una disminución en la tasa de renovación neuronal y en los niveles de hormonas sexuales circulantes. Teniendo en cuenta estos hechos, el estudio de las vías de señalización que regulan E2 y P4 en neuronas de corteza cerebral permitiría identificar aquellos mecanismos claves durante la formación de ED que pueden ser blancos de nuevas terapias que apunten a disminuir los efectos perjudiciales de una deficiencia hormonal.

#### 2.2 Objetivo general e hipótesis de trabajo

El *objetivo general* de esta tesis fue contribuir al conocimiento de un complejo mecanismo de control regulado por E2 y/o P4, estrictamente involucrado en el control de la plasticidad sináptica mediante la formación de las espinas dendríticas.

La hipótesis central postuló:

**El 17- $\beta$ -estradiol (E2) y la progesterona (P4) controlan la morfología neuronal mediante el remodelamiento del citoesqueleto actínico estimulando la formación de espinas dendríticas**

**a través de la activación del regulador actínico WAVE1 en neuronas corticales, actuando como dos potentes moduladores de la plasticidad neuronal.**

Se desprenden de la misma, las siguientes hipótesis parciales:

**1) El tratamiento con E2 o P4 induce la formación de espinas dendríticas, a través del mecanismo de control quinasa Cdk5/fosfatasa PP2A.**

Nuestros trabajos precedentes han determinado que tras el tratamiento rápido con E2 o P4 (15-20 minutos) se producen modificaciones morfológicas neuronales, a través de la reorganización del citoesqueleto actínico en neuronas corticales de ratas. Tales modificaciones estructurales fueron evidenciadas mediante el incremento en la formación de ED. Es por ello, que nuestras hipótesis apuntan a que estos cambios en la estructura actínica de las neuronas pudiesen estar sujetas a la actividad quinasa/fosfatasa de Cdk5 y PP2A.

**2) El E2 o P4 controlan el sistema Cdk5/PP2A regulando la fosforilación/desfosforilación específica de WAVE1 (S397).**

En la siguiente etapa de investigación se evaluó el mecanismo molecular responsable de los cambios en la plasticidad neuronal provocados por E2 y P4. Nuestra hipótesis se basó, en que el estado de fosforilación de WAVE1 estuviese controlado por Cdk5 y PP2A y este mecanismo de control preciso fuese el responsable de regular la formación de espinas dendríticas, en respuesta a los tratamientos hormonales.

**3) El conjunto quinasa/fosfatasa Cdk5/PP2A regula la ramificación actínica a través de WAVE1/cortactina y el complejo Arp2/3.**

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos en los objetivos precedentes, se profundizó el estudio de la vía de señalización dirigida al complejo Arp2/3, responsable de de la nucleación actínica. Se esperaba que el mismo fuera reclutado a las zonas de formación de espinas dendríticas luego de la fosforilación de WAVE1 y cortactina y que su actividad se correlacionara con el estado del interruptor Cdk5/PP2A de manera dependiente de las hormonas E2 o P4.

### **2.3 Objetivos Específicos**

**Objetivo #1: Determinar si el mecanismo de control, quinasa Cdk5/fosfatasa PP2A, regula la formación de espinas dendríticas, inducidas por el tratamiento con E2 o P4.**

En primer lugar, para estudiar la formación de ED se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para caracterizar los cambios morfológicos tras los tratamientos

hormonales. Luego se evaluó la fosforilación de FAK, paxilina y Rac1 mediante ensayos de pérdida de función, y su impacto sobre la formación de ED tras los tratamientos con E2 o P4 con el fin de determinar la vía de señalización posible que conduciría al punto de regulación quinasa Cdk5/ fosfatasa PP2A. Finalmente, se usaron inhibidores y activadores de Cdk5 y PP2A respectivamente, con el fin de determinar si la formación de espinas dendríticas sobre neuronas de corteza cerebral resultó alterada a través de la actividad del *switch* Cdk5/PP2A.

**Objetivo #2: Comprobar si el sistema Cdk5/PP2A regula la fosforilación/desfosforilación específica de WAVE1 (S397), tras el efecto de E2 o P4.**

Para probar la hipótesis parcial 2) utilizamos inhibidores y activadores de Cdk5 y PP2A respectivamente y evaluamos su efecto en la fosforilación específica de WAVE1 sobre el residuo S397. Además, se estudió la actividad de PP2A evaluando su fosforilación puntual Y307 utilizando plásmidos con mutaciones específicas sobre ese residuo y su impacto sobre la formación de ED.

**Objetivo #3: Establecer el rol de Cdk5/PP2A en la ramificación actínica mediante el estudio de WAVE1/cortactina y el complejo Arp2/3.**

Finalmente para probar la hipótesis parcial 3) hicimos uso de experimentos de pérdida de función de WAVE1, cortactina y el complejo Arp2/3 a través de siRNAs, plásmidos mutantes e inhibidores respectivamente para determinar la formación de ED a través de la activación de estas proteínas profundizando en las interacciones y los mecanismos de regulación que conducen a este evento.



## CAPÍTULO 3

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Lista de abreviaturas

BCA: ácido bicinconínico

BSA: albumina sérica bovina

CK-666: inhibidor de CK-666

DAPI: 4'-6-diamidino-2-fenilindol

DNA: ácido desoxiribonucleico

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

HRP: peroxidasa del rábano

IPA-3: inhibidor de PAK1

PBS: *buffer* fosfato salino

PEI: polietilenimina

PFA: paraformaldehído

PMSF: fenilmetilsulfonilo

PP2: 4-Amino-5-(4-chlorofenil)-7-(dimetiletil)pyrazolo[3,4-*d*]pirimidina, inhibidor de Src

PVDF: fluoruro de polivinilideno

RNA: ácido ribonucleico

Rpm: revoluciones por minuto

SDS: dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

SFB: suero fetal bovino

TA: temperatura ambiente

TBS: *buffer* tris salino

TBST: buffer tris salino con Tween20®

### **3.2 Sistema de estudio**

Como sistema de estudio para este trabajo se utilizaron neuronas piramidales de la corteza de embriones de rata de la cepa Sprague Dawley. Estas células fueron mantenidas en cultivo con los medios adecuados para su maduración y en ellas se evaluaron *cambios morfológicos*, principalmente la formación y el número de espinas dendríticas, y; *cambios bioquímicos*, principalmente cambios en los niveles de fosforilación de diversas proteínas reguladoras del citoesqueleto de actina frente a diversos tratamientos.

### **3.3 Metodología**

#### **3.3.1 Cultivo primario de células neuronales corticales embrionarias:**

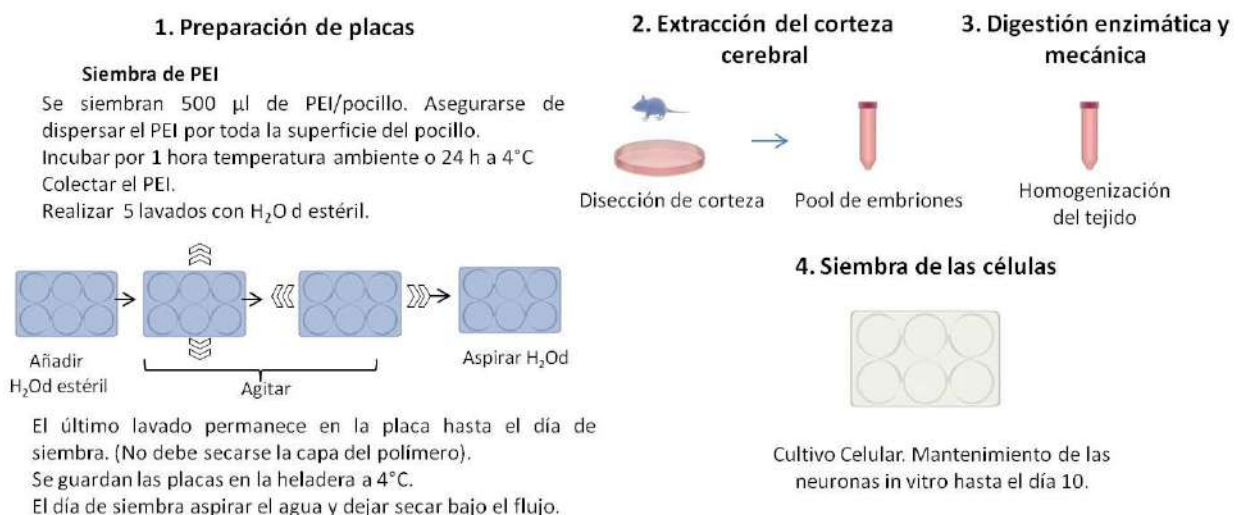
*Modelo animal.* Los cultivos se realizaron a partir de embriones de rata de la cepa Sprague Dawley de 17-18 días de gestación. El manejo y los procedimientos experimentales realizados con los animales durante esta tesis fueron aprobados por el comité de cuidado y uso de animales de laboratorios (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo. Protocolos Aprobados N° 33/2014 y 100/2017, Mendoza, Argentina.

*Extracción de corteza cerebral.* Tras sacrificar al animal en el día de gestación mencionado anteriormente, se realizó una incisión abdominal para extraer los fetos. Los mismos se colocaron en un recipiente con **PBS 1X** estéril a 4° C (**buffer fosfato salino pH 7, NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM**). Se tomaron las cabezas con pinzas y a partir de las mismas, se extrajeron las cortezas cerebrales que posteriormente fueron disgregadas y cultivadas siguiendo los protocolos de Brewer G, 1997 [108] y Kaech S & Banker G, 2006 [109]. Esta metodología permite obtener cultivos celulares consistentes en un 95 % neuronas y un 5 % de células gliales. Las cortezas de los embriones fueron colectadas en un tubo de 50 mL con 5 mL de PBS 1X. Todos los procedimientos fueron realizados en condiciones de esterilidad.

*Digestión enzimática y mecánica de las cortezas.* La homogenización del tejido comenzó con una digestión química añadiendo 250 µl de tripsina/EDTA al 0,25% (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc.) al tubo con las cortezas, e incubándolo por 10 minutos a 37° C en estufa con 5% CO<sub>2</sub>. A continuación, se aspiró el medio cuidadosamente con pipeta Pasteur y se añadieron 5 mL de medio de cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Gibco, Invitrogen Life Technologies) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco) para detener la reacción de la tripsina. Se agitó el tubo suavemente y se dejó reposar por 3 min. Posteriormente, se procedió a lavar la suspensión aspirando el medio y añadiendo 5 mL de PBS 1X (estéril). El tubo se agitó suavemente y se dejó reposar por 3 min dejando que los

fragmentos de tejido decanten en el fondo del tubo en cada lavado. Este procedimiento se repitió 3 veces. Luego del último lavado, se aspiró el PBS y se añadieron 5 mL de medio de cultivo específico para cultivo primario neuronal, Neurobasal® (Gibco) suplementado con B-27® al 2% v/v, 10 U/mL de penicilina, 10 ug/mL de streptomina (Gibco) y 0,5 mM de glutamina (Gibco). (Esta formulación se utilizó para el mantenimiento de las células durante el tiempo de su crecimiento *in vitro*). En este punto comenzó la disgregación del tejido para obtener las células a partir de la corteza, resuspendiendo la mezcla con pipetas tipo Pasteur de vidrio con puntas pulidas a con distintos diámetros de mayor a menor calibre. Las puntas de las pipetas se pulieron con la llama de un mechero de Bunsen. Se comenzó con la pipeta de mayor calibre (punta sin pulir), disgregando el tejido contra la pared del tubo suavemente evitando formar espuma. A continuación, se adicionaron 5 mL de medio y se continuó resuspendiendo con las pipetas de 2° calibre (mitad del diámetro original) y 3° calibre (1/3 del diámetro original) en orden decreciente. Finalmente, para eliminar restos de tejido sin digerir, se pasó la suspensión celular por un filtro de 40 µm a un tubo de 50 mL nuevo.

*Siembra de las células en placas de 6 pocillos.* Se determinó la densidad celular con cámara de Neubauer y se sembraron  $1 \times 10^6$  células/mL de Neurobasal por pocillo en las placas previamente tratadas con polietilenimina (PEI, 2% p/v en buffer borato pH 8.3). De esta manera fueron mantenidas *in vitro* por 10 días en estufa a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub>. El siguiente esquema (Figura 12) detalla la preparación de las placas con PEI y los pasos seguidos en este protocolo.

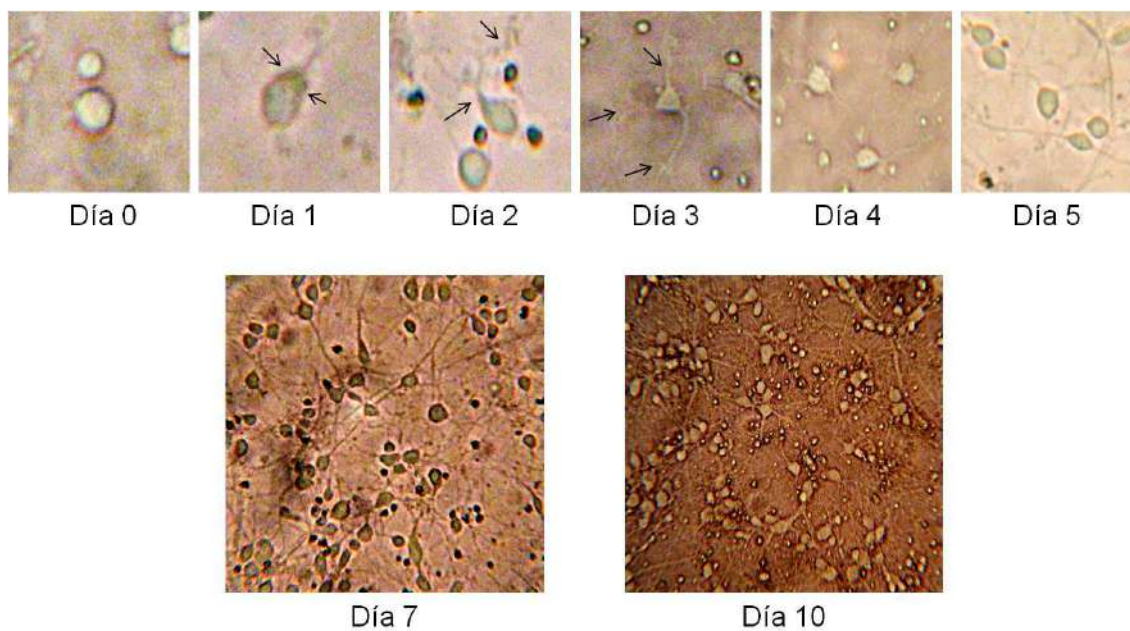


**Figura 12. Protocolo empleado en esta tesis para la obtención de neuronas de corteza cerebral de rata.** 1. Previo al día de sacrificio de los animales, se prepararon las placas con el polímero PEI, para proporcionar a las células un sustrato para que se adhirieran a la placa de cultivo. Los pasos 2, 3 y 4 se encuentran detallados en el texto principal. Este protocolo se llevó a cabo en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar vertical.

### 3.3.2 Seguimiento del cultivo a partir del día de siembra

Una vez sembradas las células, se llevó a cabo un monitoreo diario de los cultivos con el fin de evaluar el crecimiento y la maduración de las neuronas (Figura 13). Las observaciones realizadas se basaron en el trabajo de Gary Banker y colaboradores, pioneros en ésta técnica [110]. El cambio de medio se realizó cada 4 días, reemplazando 50% de medio original por medio fresco en el primer cambio de medio, seguido por un cambio completo en el segundo cambio.

Luego de ser sembradas en las placas, las neuronas se adhieren al sustrato proporcionado (Día 0). Al cabo de 24 h extienden una especie de lamela alrededor del cuerpo celular (Día 1, flechas negras). A continuación, comienzan a emerger los primeros *procesos* o prolongaciones que luego dan lugar a las dendritas y el axón (Día 2, flechas negras). Al cabo de 72 h, los procesos ya se han diferenciado en dendritas y axones (Día 3, flechas negras).



**Figura 13. Fotografías de neuronas de corteza cerebral de rata obtenidas del cultivo primario.** La imágenes fueron tomadas con una cámara digital vinculada a un microscopio óptico. Magnificación 60X.

Cabe destacar que estas primeras etapas ocurren de manera asincrónica en el cultivo. A partir del día 4, las dendritas crecen en longitud y ramificaciones. Las neuronas ya muestran su morfología característica y empiezan a establecer complejas conexiones entre ellas (Día 7 y 10).

### 3.3.3 Tratamientos

A partir del día 10 en cultivo las neuronas fueron tratadas por separado con las hormonas E2 o P4 (ambas de Sigma-Aldrich Co. LLC) con una concentración final de 10 nM por 20 min. Tanto

la dosis como el tiempo utilizado se basan en los estudios previos de nuestro grupo de trabajo [17, 18].

*Inhibición o activación enzimática.* Consiste en la unión de una pequeña molécula a una enzima, modulando su actividad. Modificar el accionar de una enzima por un químico particular es una herramienta muy útil que permite evaluar su rol en la vía estudiada, a través de los cambios en las proteínas blanco de la enzima. Con el fin de determinar las vías de señalización moduladas por estas hormonas se realizaron tratamientos con diferentes inhibidores y activadores químicos de las proteínas de interés. La siguiente tabla (Tabla 2) reúne los compuestos empleados. Las concentraciones inhibitorias indicadas ( $IC_{50}$ ) corresponden a las concentraciones finales en los pocillos con las células, luego de resuspender los compuestos en 1 mL de medio de cultivo.

Tabla 2. Compuestos químicos utilizados en esta tesis.			
Compuesto	Proteína blanco	$IC_{50}$ (tiempo de incubación previo al tratamiento con hormonas)	Compañía/Catálogo
<b>PP2 (inhibidor)</b>	Src	10 $\mu$ M (24 h)	Calbiochem/ 529573
<b>FAKi (inhibidor)</b>	FAK	1 $\mu$ M (24 h)	Santa Cruz Biotech/ sc-203950A
<b>Roscovitina (inhibidor)</b>	Cdk5	50 $\mu$ M (45 minutos)	Calbiochem/ 186692-46-6
<b>Ácido Okadaico (inhibidor)</b>	PP2A	0,5 $\mu$ M (2 h)	Sigma Aldrich/ O7760
<b>Forskolina (activador)</b>	PP2A	1 $\mu$ M (30 minutos)	Sigma Aldrich/ F6886
<b>IPA-3 (inhibidor)</b>	PAK1	10 $\mu$ M (1 h)	Santa Cruz Biotech/ sc-204016
<b>CK-666 (inhibidor)</b>	Complejo Arp2/3	4 $\mu$ M (24 h)	Santa Cruz Biotech/ sc-361151
<b>ICI 182,780 (antagonista)</b>	receptores de estrógeno	100 nM (1 h)	Sigma Aldrich/ I4409
<b>ORG 31710 (antagonista)</b>	receptores de progesterona	1 $\mu$ M (1 h)	Organon Akzo Nobel

*Transfección con plásmidos y pequeños interferentes de ARN.* Otras maneras de interceptar proteínas para estudiar vías de señalización consisten, por un lado, en silenciar la expresión de las mismas con pequeños RNA sintéticos de interferencia (siRNA por sus siglas en inglés, *small interfering RNA*). Los siRNA inhiben la traducción del ácido ribonucleico mensajero (mRNA por

sus siglas en inglés, *messenger RNA*) correspondiente a su proteína blanco, uniéndose al mismo y provocando su degradación. Por el otro lado, es posible sobreexpresar las proteínas en estudio con alguna modificación en su composición que afecte su función. Los plásmidos son pequeñas moléculas de DNA circulares que contienen la secuencia que codifica a la proteína modificada junto con sitios de reconocimiento para la maquinaria de transcripción que permiten su expresión en las células utilizadas. La entrada de los siRNA y de los plásmidos a las células se realiza vía transfección celular mediada por lípidos. Se emplean lípidos catiónicos que forman complejos con los ácidos nucleicos con una gran afinidad por la membrana plasmática, la cual atraviesan y así ingresa su contenido al citoplasma, y en el caso de los plásmidos al núcleo. La transfección de las neuronas se llevó a cabo en los días 8 o 9 de cultivo, coincidiendo con el segundo cambio de medio. Se utilizaron siRNA comerciales contra las siguientes proteínas: paxilina (Pax siRNA, Santa Cruz Biotechnology), y WAVE-1 (WAVE1 siRNA, Dharmacon, Thermo Fisher Scientific Inc), cada uno incluía un siRNA control, con una secuencia de nucleótidos random. Adicionalmente, se utilizaron los siguientes plásmidos (Tabla 3):

<b>Tabla 3. Descripción de las mutaciones presentes en los plásmidos utilizados.</b>		
<b>Plásmido</b>	<b>Modificación</b>	<b>Origen</b>
<b><i>cortactina</i><sup>3YF</sup></b>	Mutaciones puntuales Y-> F en los aminoácidos Y421, Y466 y Y482. Mutante no fosforilable en los sitios que fosforila la quinasa Src.	Donado al laboratorio por el Dr. John Cooper (Washington University School of Medicine, USA).
<b><i>PP2A</i><sup>Y307E</sup></b>	Mutación puntual Y-> E en el aminoácido Y307. Mutante que simula una fosforilación en ese sitio.	Donados al laboratorio por el Dr. David C. Pallas (Winship Cancer Institute, Emory University School of Medicine, Atlanta, USA)
<b><i>PP2A</i><sup>Y307F</sup></b>	Mutación puntual Y-> F en el aminoácido Y307. Mutante no fosforilable en ese sitio.	
<b><i>Rac1</i><sup>T17N</sup></b>	Mutación puntual T-> N en el aminoácido T17. Mutante incapaz de unir GTP.	Guthrie cDNA Resource Center ( <a href="http://www.cdna.org/">www.cdna.org/</a> RAC01000D0 Rac1 T17N)

Los insertos de cada plásmido estaban clonados en un vector pcDNA3.1+. Se realizaron transfecciones controles con el mismo vector vacío (sin inserto). Como agente de transfección se utilizó Lipofectamina 2000® (Invitrogen, catálogo 11668-019) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el comerciante. En tubos estériles se prepararon dos soluciones A y B, que

luego de ser mezcladas se añadieron a los pocillos con las neuronas a tratar y se mantuvo durante el tiempo que duró la transfección. La eficacia del silenciamiento de genes se comprobó por la técnica western blot, (detallada en la siguiente sección) al cabo de 24 o 48 h y se estableció como óptima a las 24 h. La siguiente tabla (Tabla 4) detalla el protocolo de transfección empleado.

Tabla 4. Protocolo de transfección			
Día 8-9 de cultivo primario	<b>Transfección</b>  <i>Medio: Neurobasal®</i>  <i>Agente: Lipofectamina®</i>	<b>Solución A</b>  200 µL de Medio 3 µL de Agente 50-75 nM de los siRNA específicos o 10 µg de plásmido	Se incuba a TA por 45 min.
		<b>Solución B</b>  1,3 mL de Medio por pocillo	Transcurridos 45 min. se añade la Solución A
Día 10	Tratamientos con E2 o P4 seguido de lisis celular.		

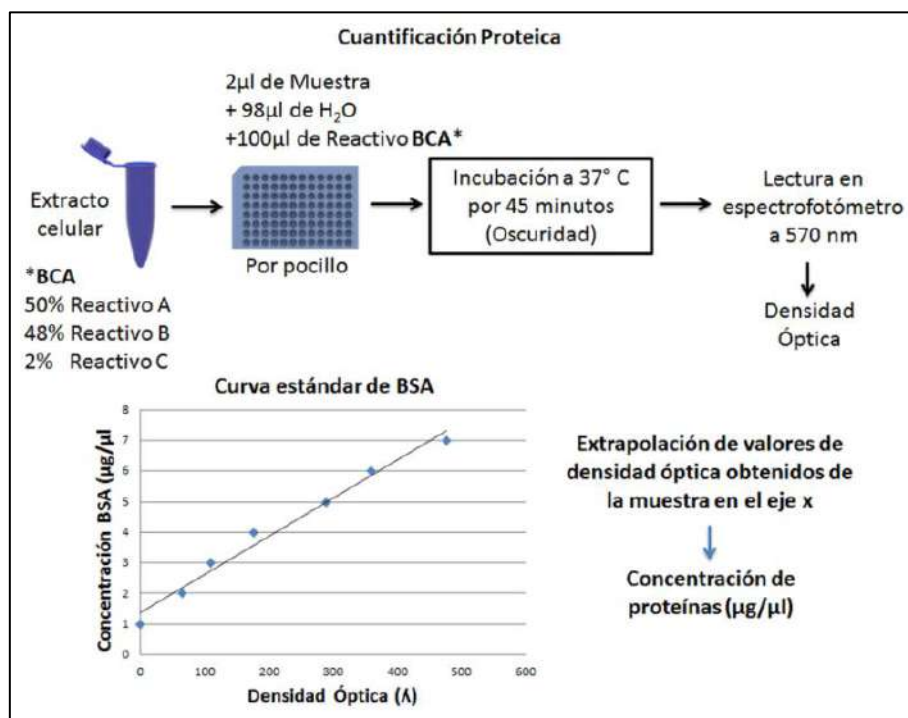
### 3.4 Inmunoensayos: detección mediada por anticuerpos (Ac)

En células y tejidos es posible realizar la detección de antígenos de proteínas en estudio, usando Ac específicos conjugados con reporteros y visualizar este proceso de distintas maneras. La detección puede ser directa, empleando un Ac primario-reportero o indirecta a través de un Ac secundario-reportero. También, es posible utilizarlos para concentrar una proteína particular en una muestra de homogenato celular, si se incuban con un sustrato sólido. Para la realización de esta tesis se llevaron a cabo tres inmunoensayos ampliamente usados: Western blot (Wb), Inmunofluorescencia (IF) e Inmunoprecipitación (IP).

#### 3.4.1 Western blot

*Obtención de lisados celulares.* Luego de realizar los tratamientos correspondientes, las células fueron lavadas con PBS 1X estéril e inmediatamente fueron lisadas con 200 µl de **buffer de lisis celular** en frío (**100 mM Tris-HCl pH 6,8; 20% v/v glicerol, 4% p/v SDS; y H<sub>2</sub>O MiliQ**), suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa: 1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo o PMSF; 1mM ortovanadato de sodio, 1 mM fluoruro de sodio; cocktail de inhibidores de proteasas 1X (catálogo P8340, Sigma-Aldrich) y cocktail de inhibidores de fosfatasa 1X catálogo. P5726, Sigma-Aldrich). El homogenato celular se preservó a -20°C hasta su uso.

*Cuantificación proteica por el método del ácido bicinonínico (BCA).* Este método permite la cuantificación de las proteínas presentes en un lisado celular a partir de la detección colorimétrica, proceso basado en una reacción química. A partir de los lisados celulares obtenidos de cultivo, se realizó la cuantificación proteica según el siguiente protocolo (Figura 14), utilizando como solución estándar, albumina sérica bovina (BSA).



**Figura 14. Esquema del protocolo para estimar la concentración proteica.** Se utilizó un kit de micro-BCA (catálogo. 23235, Pierce, Thermo Fisher Scientific,). La curva estándar se preparó con diluciones seriadas (0-100 µg/mL) de BSA. En una placa de 96 pocillos, se cargaron 100 µL de cada concentración de la curva por duplicado. Luego para las muestras se cargaron por pocillo 2 µL de la misma y 98 µL de agua. Posteriormente se incorporó a cada pocillo 100 µL de la solución de reactivo BCA preparada con 50% del reactivo A, 48% del reactivo B y 2% del reactivo C. La placa se dejó incubar a 37°C durante 40 minutos en oscuridad. La lectura de absorbancia a una longitud de onda de 570 nm se llevó a cabo en un lector de microplacas MULTISKAN EX (Thermo Scientific).

Una vez obtenidos los valores de la cuantificación, las muestras se separaron por medio de SDS-PAGE en geles de acrilamida/bisacrilamida del 8 al 12%, dependiendo de los pesos moleculares de las proteínas a evaluar. Se sembraron las muestras con 30 µg de proteína por carril para evaluar expresión de proteínas totales y 60 µg de proteína para evaluar las fosforilaciones correspondientes. La corrida electroforética se realizó bajo condiciones estándar (apilamiento a 90 V por 30 minutos y resolución a 120 V por 90 minutos), utilizando **buffer de corrida 1X (Tris base 25mM; Glycina 192mM; SDS 0,1% p/v)**. Una vez obtenido el gel tras la corrida electroforética se procedió con la transferencia de las proteínas a membranas de fluoruro de polivinilideno o PVDF, previamente activadas con metanol absoluto



y humedecidas luego en **buffer de transferencia 1X (Tris base 25mM; Glicina 1,92mM; Metanol 10% v/v)**. Se realizó la transferencia a voltaje constante 100 V por 70 minutos a 4°C. A continuación, las membranas se incubaron con **buffer de bloqueo (BSA 2% p/v en TBS-Tween20 0,1% v/v)** por 45 minutos a temperatura ambiente (TA), y se incubaron con anticuerpos primarios (Ac 1°) durante toda la noche a 4° C. Al día siguiente se retiraron las membranas y se lavaron 3 veces durante 5 minutos con **buffer TBST (buffer Tris 1X pH 7.6, NaCl 137 mM; Tris base 20 mM; Tween-20 al 0,1% v/v)**. A continuación se incubaron con los anticuerpos secundarios (Ac 2°) correspondientes conjugados con la enzima peroxidasa del rábano o HRP durante 2 h a TA. Finalmente, se lavaron las membranas (3 veces por 5 min con TBST) para retirar el excedente de anticuerpos. Como buffer de dilución de anticuerpos se utilizó BSA 0,5% p/v en TBST. En la Tabla 5, se detallan todos los anticuerpos utilizados.

Ac 1° (especie)	Dilución	Compañía/Catálogo
<b>p-WAVE1<sup>S397</sup> (conejo)</b>	1:1000	Sigma Aldrich/ W2768
<b>WAVE1 (conejo)</b>	1:1000	Sigma Aldrich/ W0267
<b>p-Cdk5<sup>Y15</sup> (cabra)</b>	1:500	Santa Cruz Biotech/ sc-12918
<b>Cdk5 (ratón)</b>	1:1000	Santa Cruz Biotech/ sc-56278
<b>p-PP2A<sup>Y307</sup> (cabra)</b>	1:500	Santa Cruz Biotech/ sc-112615
<b>PP2A (ratón)</b>	1:1000	Santa Cruz Biotech/ sc-13601
<b>p-Src<sup>Y416</sup> (conejo)</b>	1:1000	Cell Signaling Technology/ #2101
<b>Src (ratón)</b>	1:1000	Santa Cruz Biotech/ sc-5266
<b>p-FAK<sup>Y397</sup> (conejo)</b>	1:1000	BD Transduction Lab/ 611807
<b>FAK (ratón)</b>	1:1000	BD Transduction Lab/ 610088
<b>p-Pax<sup>Y118</sup> (ratón)</b>	1:1000	Santa Cruz Biotech/ sc-365020
<b>Pax (cabra)</b>	1:1000	Santa Cruz Biotech/ sc-31010
<b>p-Rac1<sup>S71</sup> (conejo)</b>	1:1000	Santa Cruz Biotech/ sc-12924-R
<b>Rac1 (conejo)</b>	1:1000	Santa Cruz Biotech/ sc-217
<b>p-PAK1<sup>T423</sup> (cabra)</b>	1:1000	Santa Cruz Biotech/ sc- 135755
<b>PAK1 (conejo)</b>	1:1000	Santa Cruz Biotech/ sc- 881
<b>p-Cortactin<sup>Y466</sup> (conejo)</b>	1:500	Santa Cruz Biotech/ sc- 101661
<b>Cortactin (conejo)</b>	1:1000	Santa Cruz Biotech/ sc-11408
<b>p-Arp2<sup>T237</sup> (conejo)</b>	1:1000	Biorbyt/ orb155730
<b>Arp3 (ratón)</b>	1:1000	BD Transduction Lab/ 612135
<b>α-tubulin (ratón)</b>	1:1000	Sigma Aldrich /T6074
<b>Actin (cabra)</b>	1:1000	Santa Cruz Biotech/ sc-1615

Anticuerpos secundarios utilizados para western blot.		
Ac 2°	Dilución	Compañía/Catálogo
Anti-conejo IgG-HRP	1:2000	Santa Cruz Biotech/ sc-2357
Anti-ratón IgG-HRP	1:2000	Santa Cruz Biotech/ sc-358914
Anti-cabra IgG-HRP	1:2000	Santa Cruz Biotech/ sc-2768

La inmunodetección de las proteínas se realizó mediante el uso de revelador quimioluminescente (ECL). Para esto, las membranas fueron incubadas con 1 mL del reactivo ECL que fue preparado mezclando en partes iguales las soluciones A y B, al momento de realizar la detección en oscuridad. El siguiente esquema (Figura 15) indica las recetas de ambas soluciones y el fundamento de la técnica.

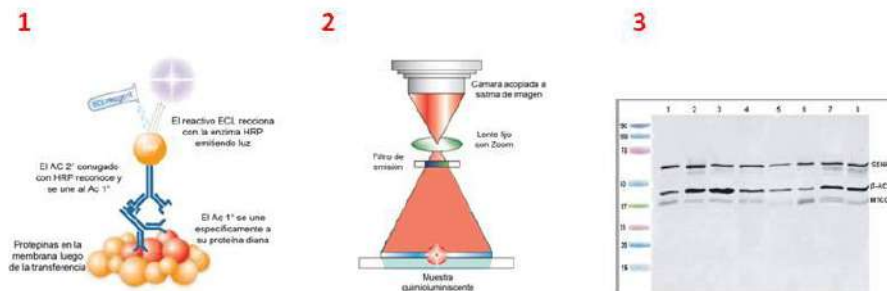
### Revelado de Proteínas por ECL. (Enhanced Chemiluminescence)

#### Solución A

- H<sub>2</sub>O 10ml
- Tris-HCl 1M pH 8.5
- Luminol 250 mM en DMSO
- Ácido Cumárico 90mM en DMSO

#### Solución B

- H<sub>2</sub>O 10ml
- Tris-HCl 1M pH 8.5
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30vol



**Figura 15. Principio de quimioluminiscencia en Wb.** 1. Los Ac 2° están conjugados con la enzima HRP que cataliza la oxidación de luminol en presencia de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) con la emisión de luz. 2. La intensidad de esta señal es detectada por una cámara acoplada a un sistema de imagen. 3. A través del equipo ChemiDoc™ XRS de BioRad (BioRad Laboratories), se obtienen imágenes que permiten visualizar la proteína de interés en cada uno de los carriles sembrados. Las mismas son analizadas con el programa Image Lab™ del equipo ChemiDoc™.

*Cuantificación relativa de los niveles de fosforilación de las proteínas estudiadas.* Los cambios en los niveles de fosforilación de las proteínas estudiadas fueron evaluados mediante el análisis densitométrico de las bandas obtenidas en los western blot. La cuantificación se llevó a cabo usando el programa Image J (NIH, USA) que permitió asignarle un valor en unidades de imagen (píxeles/cm<sup>2</sup>) a cada banda presente en las membranas. La intensidad de las bandas de la proteína fosforilada de interés fue normalizada con la intensidad de las bandas de su proteína total (*wild type*) obtenida en la misma membrana. En aquellos casos donde la

determinación proteica presentó la dificultad de que los anticuerpos (Ac) 1°, fosforilado y total de una proteína estuviesen hechos en la misma especie, se normalizó la intensidad de cada banda con la correspondiente banda de la proteína constitutiva  $\beta$ -actina, obtenidas en la misma membrana. En estos casos se corroboró en membranas duplicado, la expresión de la proteína total, junto a la actina.

### **3.4.2 Inmunofluorescencia**

Las neuronas fueron sembradas en cubreobjetos previamente tratados con PEI (al 2% en buffer borato pH 8.3) y se mantuvieron en cultivo con medio Neurobasal hasta el día 10 donde las células presentaron dendritas extensas y bien desarrolladas. A continuación se realizaron los tratamientos correspondientes con las hormonas y activadores/inhibidores.

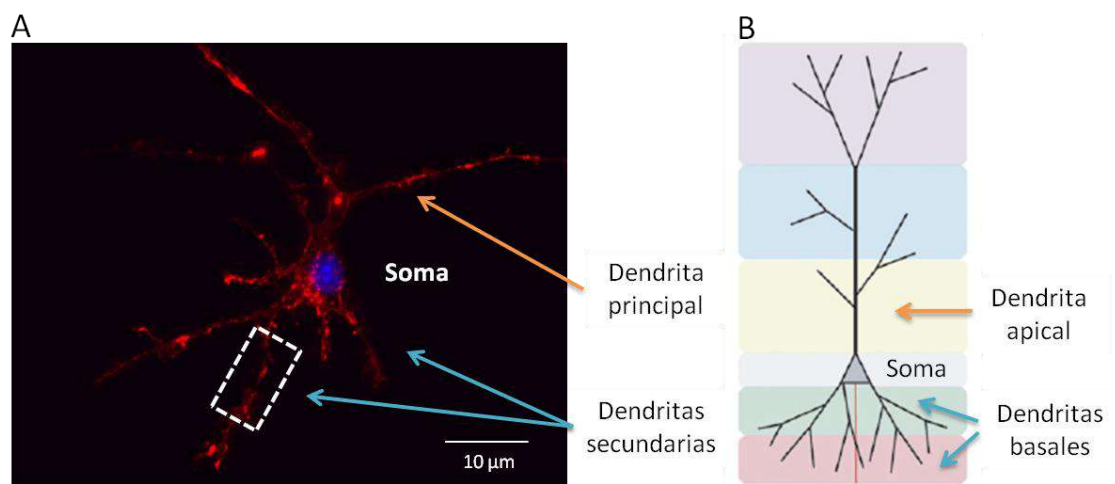
Finalizados los tratamientos las células fueron fijadas con paraformaldehído, (PFA, al 4% en PBS por 20 minutos a TA) permeabilizadas con tritón (X-100, al 0,1% en PBS) por 5 minutos y se bloquearon los sitios inespecíficos con albúmina sérica bovina (BSA, al 1% en PBS con 0,1% de tween 20 por 30 minutos a TA). Previo a cada uno de estos pasos, las células fueron lavadas cuidadosamente dos veces con PBS 1X. A continuación se realizó la incubación con los anticuerpos primarios: sinaptofisina (1:100), PSD-95 (1:100 catálogo sc-32290) y p-Cortactin<sup>Y466</sup> (1:50 catálogo sc-101661) (Santa Cruz Biotechnology), diluidos en buffer TBST en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche.

Al día siguiente se lavaron las células con PBS 1X para remover el exceso de anticuerpo primario y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor™ 488 (1:300, Invitrogen) por 2 horas a TA en cuarto oscuro. A continuación, las células fueron incubadas con Texas Red-faloidina (marcador de las fibras de actina, dilución 1:150 en buffer TBST) por 40 minutos a TA. Finalmente, se contratiñeron los núcleos de las células incubándolas con 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich, dilución 1:10000) por 5 minutos a TA. Previo a cada uno de estos pasos, las células fueron lavadas cuidadosamente dos veces con PBS 1X. Finalmente los cubreobjetos fueron montados con medio Vectashield (catálogo H1000, Vector laboratorios) y almacenados a 4°C en la oscuridad hasta su análisis. La inmunofluorescencia y la morfología de las células se visualizaron mediante microscopía utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E200 y se fotografiaron con cámara digital de alta resolución 590CU 5.0M CCD.

#### **3.4.2.1 Análisis y cuantificación de las espinas dendríticas**

##### **3.4.2.1a Selección de neuronas y dendritas**

Como se mencionó previamente, el procedimiento utilizado en este trabajo para obtener neuronas de corteza cerebral permite obtener cultivos que resultan en un 95 % de neuronas corticales y un 5 % de células gliales. Es importante destacar que las neuronas en cultivo carecen de las señales adecuadas que dictan la dirección, forma y extensión de las ramificaciones de las dendritas [111], y que da lugar a la morfología característica de estas células que consiste en el soma, una dendrita apical y dendritas basales [112] (Figura 16 B). Teniendo en cuenta esto, se ha establecido que las neuronas en cultivo desarrollan una dendrita principal o primaria y dendritas secundarias que equivaldrían a las dendritas apicales y basales, respectivamente [113] (Figura 16 A-B). Para estudiar la morfología de estas células una vez realizados los tratamientos, se incubaron con el marcador faloidina conjugado con Texas Red, que permite la tinción de los filamentos de actina de su citoesqueleto y con DAPI para visualizar los núcleos de las neuronas. Esto permitió una visualización de la célula completa, incluyendo el soma y el árbol dendrítico (Figura 16 A). Se tomaron entre 20 y 30 fotografías por condición experimental, que presentaron al menos una o dos neuronas. Luego de obtener las imágenes de microscopía se seleccionaron neuronas con un árbol dendrítico completo, que incluyera a las dendritas principal y secundarias para el estudio de los cambios morfológicos (Figura 16 A). Se excluyeron del análisis aquellas células con procesos incompletos o superpuestas con otras, o que variaran considerablemente en el tamaño del soma, tomando como referencia el núcleo de las células. Una vez seleccionadas las neuronas, se escogieron dos dendritas secundarias de manera arbitraria, próximas al soma de cada neurona. En cada dendrita se marcaron zonas con una extensión de 10  $\mu\text{m}$  utilizando el programa Image J (NIH, USA) que permite configurar la escala correspondiente entre los pixeles de las imágenes obtenidas y los  $\mu\text{m}$  (Figura 16 A-B).



**Figura 16. Criterios para la selección de neuronas y dendritas.** A. Fotografía de una neurona de corteza obtenida de cultivo primario donde se reconocen el soma y las dendritas de una neurona piramidal. A

partir de estas imágenes se seleccionaron segmentos de dendritas secundarias próximas al soma de la célula. La barra corresponde a una longitud de 10  $\mu\text{m}$ . Magnificación 60X. **B.** Esquema de una neurona piramidal donde se señalan las partes fundamentales de este tipo de células: la dendrita apical, el soma y las dendritas basales. Las neuronas piramidales presentan varias dendritas basales relativamente cortas y por lo general, una dendrita apical grande. Modificado de [112].

### 3.4.2.1b Cuantificación de espinas dendríticas

Para determinar el efecto de los diversos tratamientos realizados sobre las espinas dendríticas, se evaluaron la cantidad y la morfología de las mismas. Una vez seleccionadas las dendritas, para cuantificar las espinas presentes se tuvieron en cuenta los criterios expuestos en la Tabla 6. Se contabilizaron todas las espinas presentes en una extensión de dendrita de 10  $\mu\text{m}$  de longitud que cumplieran con los criterios de la tabla y los resultados se expresaron como el número de ED presentes en 10  $\mu\text{m}$  de dendrita.

<b>Tabla 6. Criterios para la selección de ED para su cuantificación y clasificación morfológica</b>			
<b>Espinas</b>	<b>Fungiformes (M)</b>	<b>Finas (T)</b>	<b>Pequeñas (S)</b>
Se consideraron las ED completas, es decir aquellas donde se visualizó la totalidad de su estructura desde el nacimiento del eje dendrítico hasta la punta. Las ED incompletas o fuera del plano de la imagen no fueron consideradas en el conteo (Figura 17).			
Para la medición de su tamaño se utilizó el programa Image J (NIH, USA) que permite establecer la escala entre píxeles de la imagen y los $\mu\text{m}$ correspondientes.	Cuello definido y cabeza ancha > a 0,6 $\mu\text{m}$	Cuello definido, largo hasta 2 $\mu\text{m}$ y sin cabeza	Sin cuello definido, protuberancia con un radio < 1 $\mu\text{m}$
La magnificación de las imágenes fue de 100 X. Se utilizó el microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E200 y el programa Micrometric Software. Todas las imágenes se tomaron utilizando los mismos parámetros de fluorescencia.			

Los parámetros de ésta clasificación se basaron en los trabajos de Rodriguez, A. y colaboradores [114] y de Risher, W. y colaboradores [22] (Figura 17).



**Figura 17. Fotografía de una dendrita de 10  $\mu\text{m}$  de extensión.** Los círculos naranjas indican los tres tipos de espinas mencionados M, *mushroom*; T, *thin* y S, *stubby*. Magnificación 100 X.

### 3.4.3 Inmunoprecipitación

*Obtención de lisados celulares.* Para esta técnica las células obtenidas a partir del cultivo primario fueron sembradas en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> y mantenidas in vitro como se indicó anteriormente. Tras realizar los tratamientos correspondientes, las células se lavaron con PBS 1X estéril, e inmediatamente se lisaron con **buffer no desnaturizante (Tris-HCl 20 mM, pH 7.4; EDTA 10 mM; NaCl 100 mM; Igepal al 1% v/v; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM; NaF 50 mM; PMSF 0,1 mg/L; aprotinina 0,3 mg/L y 0,01% v/v de cocktail inhibidor de proteasas de Sigma-Aldrich)** para mantener las estructuras nativas de las proteínas. A continuación se cuantificaron las muestras con la técnica de BCA y se colocaron 500 µg de proteínas por cada tratamiento en nuevos tubos de 1,5 mL, y se equipararon los volúmenes a 500 µL utilizando el mismo buffer de lisis.

*Inmunoprecipitación (IP).* Para la inmunoprecipitación se utilizó el anticuerpo anti-Arp3, descrito en la Tabla 3.4. El mismo fue añadido a cada tubo con las muestras en una concentración de 1 µg/500 µL. Las muestras con el anticuerpo se colocaron en un rotor y se incubaron de manera suave durante toda la noche a 4° C. Al día siguiente, se añadió a cada tubo 40 µL de proteína A-agarosa (proporción 1:1, Santa Cruz Biotech) y se incubaron en el agitador suavemente por 2 h a 4° C. Finalmente, se centrifugaron las muestras a 12.000 rpm durante 5 min. a 4° C, y se preservaron los pellets a -20° C.

*Lavados.* Tras descartar los sobrenadantes, se lavaron los pellets 3 veces con 500 µL de **buffer de lavado para IP (Tris-HCl 20 mM, pH 7.4; EDTA 10 mM; NaCl 150 mM; Igepal al 1% v/v; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM; NaF 50 mM; PMSF 0,1 mg/L; aprotinina 0,3 mg/L y 0,01% v/v de cocktail inhibidor de proteasas de Sigma-Aldrich)**. Luego de cada lavado, las muestras fueron centrifugadas a 12.000 rpm durante 5 min. a 4°C. Posteriormente, luego de descartar el último sobrenadante, se agregaron 30 µL de buffer de siembra y las muestras se almacenaron a -20°C hasta el momento de la electroforesis. Antes de realizar la electroforesis, las muestras se calentaron durante 5 min a 95°C para romper la unión del Ac con las partículas de agarosa. Se continuó con la siembra de las muestras en geles de poliacrilamida y se continuó con la técnica de Wb descrita anteriormente. Para verificar la efectividad de la IP y evaluar las interacciones proteicas, las membranas se incubaron con los anticuerpos anti-Arp3 y anti-cortactina.

**3.5 Análisis estadístico:** Todos los valores se expresaron como media ± desviación estándar. Los análisis estadísticos y gráficos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism, InStat. Las diferencias estadísticas entre los valores medios se determinaron mediante ANOVA, seguido por el test de Bonferroni para comparar las diferencias entre las medias de los

diferentes grupos. Cuando las varianzas no fueron homogéneas se aplicó transformación logarítmica de los datos para homogenizar las varianzas, y si aun aplicando la transformación las varianzas no eran homogéneas se utilizó el test de Mann Whitney. Se consideraron estadísticamente significativos valores de  $P < 0,05$ .

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS

#### 4.1 Resultados del primer objetivo específico

##### 4.1.1 Regulación de las hormonas sexuales E2 y P4 en la formación de ED en neuronas corticales.

Desde hace algunos años nuestro grupo se encuentra abocado al estudio de los efectos de las hormonas sexuales, como estradiol y progesterona, sobre el mecanismo de regulación de la remodelación actínica y de la morfología neuronal. Fundamentalmente nos hemos concentrado en la acción de diversas proteínas claves que regulan, en forma secuencial, el citoesqueleto actínico. Particularmente, estudiamos mecanismos de señalización rápidos a través de los cuales, los esteroides sexuales, controlan la formación de estructuras de membrana, como las espinas dendríticas en neuronas de corteza, regulando así los procesos de transmisión y plasticidad sináptica. Mediante varios estudios, hemos demostrado la existencia de un mecanismo preciso regulado por estrógenos y progestágenos en cultivos neuronales primarios [1, 17, 18].

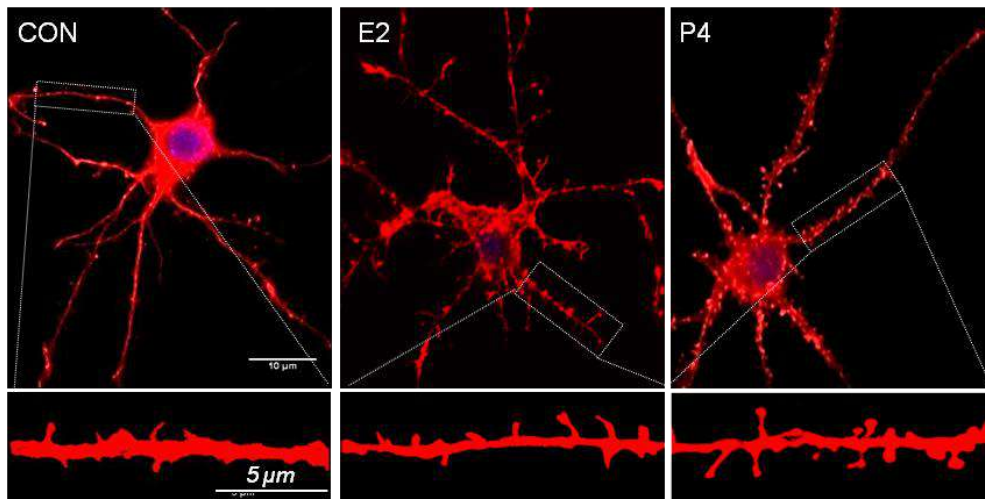
Con el objetivo de continuar profundizando las vías de señalización moduladas por ambas hormonas hacia el control en la formación dendrítica, cultivos primarios de neuronas corticales fueron tratados con pulsos rápidos de E2 (10 nM) o P4 (10 nM) y se visualizó mediante inmunofluorescencia la formación de espinas dendríticas (Figura 18 A). El tratamiento corto con ambas hormonas (20 min), rápidamente incrementó la densidad en la formación dendrítica respecto al tratamiento control (Figura 18 B).

Con el fin de determinar el grado de modificación en la morfología neuronal inducido tras la exposición con E2 y/o P4, nos enfocamos en evaluar la densidad de tres tipos específicos de espinas dendríticas pequeñas, finas, y fungiformes. Nuestros resultados demostraron que los tratamientos con E2 (10 nM) o P4 (10 nM), durante 20 minutos, provocaron un aumento significativo en el número de espinas finas, respecto al tratamiento control (Figura 18 C).

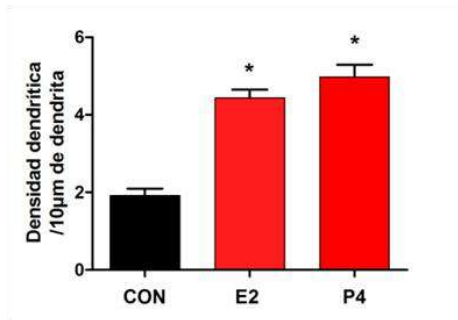
*Estos resultados sugieren que ambas hormonas promueven el desarrollo de la formación de espinas dendríticas finas. Las mismas resultan ser imprescindibles para la maduración de las espinas y posterior formación de sinapsis.*



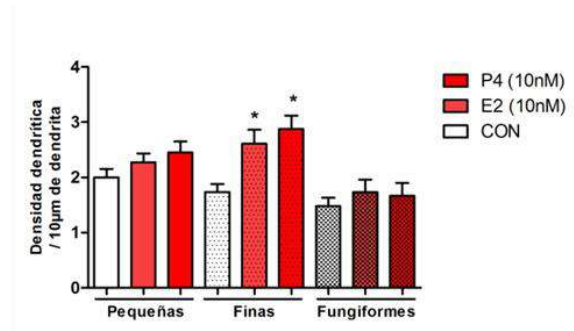
A



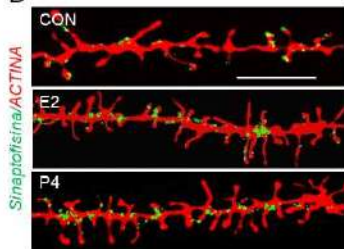
B



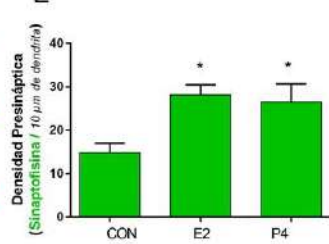
C



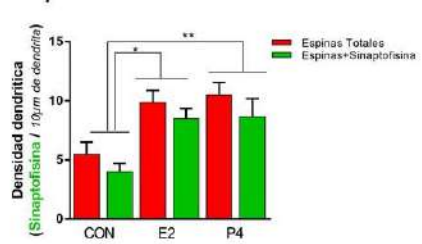
D



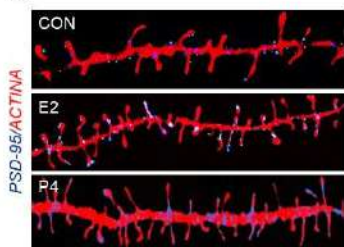
E



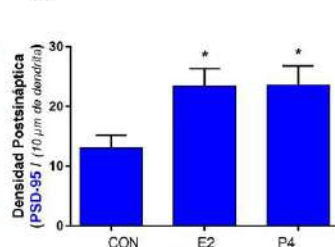
F



G



H



I

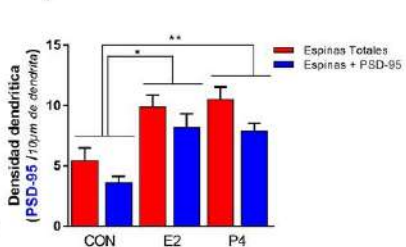


Figura 18. Tratamiento corto con las hormonas sexuales 17-β-estradiol (E2) y progesterona (P4) aumentan el número de espinas dendríticas. A. Se muestran imágenes de las neuronas piramidales obtenidas de cultivo primario en donde los filamentos de actina fueron teñidos con Faloidina conjugada con Texas Red (TRPh) y los núcleos celulares con DAPI. Magnificación 60 X. Las regiones seleccionadas se

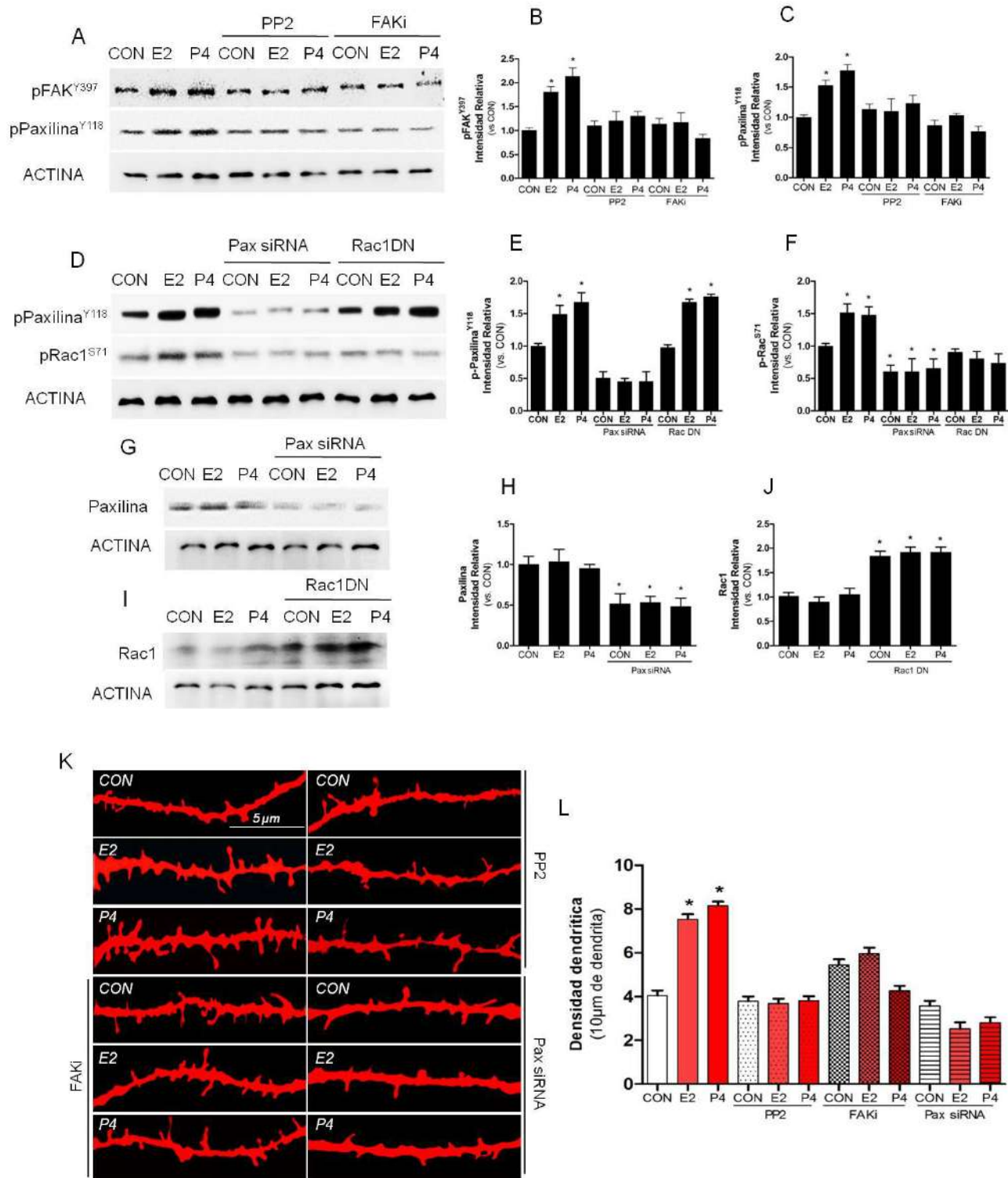
muestran en los paneles inferiores y corresponden a segmentos de dendritas donde se determinó la densidad de ED. Magnificación 100X. **B-C.** El gráfico muestra el valor medio  $\pm$  DE del número de espinas presentes en 10  $\mu\text{m}$  de longitud de la dendrita \*  $p < 0,05$  vs. Control (ANOVA y prueba post-hoc de Bonferroni). **D.** Dendritas positivas para el marcador sinaptofisina (en verde, Alexa Fluor 488). Magnificación 100X **E.** Valor medio  $\pm$  DE de la densidad de sinaptofisina vs. Control. **F.** Cuantificación de la cantidad de espinas que contienen sinaptofisina. \*  $p < 0,05$  vs. Control (ANOVA y prueba post-hoc de Bonferroni). **G.** Dendritas positivas para el marcador PSD-95 (en azul, Alexa Fluor 350). Magnificación 100X. **H.** Valor medio  $\pm$  DE de la densidad de sinaptofisina vs. Control. **I.** Cuantificación de la cantidad de espinas que contienen sinaptofisina. \*  $p < 0,05$  vs. Control (ANOVA y prueba post-hoc de Bonferroni. En cada determinación se analizaron 20-30 neuronas por condición a partir de tres experimentos independientes.

Para evaluar si estas modificaciones estructurales ocasionaron cambios fisiológicos, evaluamos el efecto de E2 y P4 en la expresión de los marcadores pre y post-sinápticos sinaptofisina y PSD-95 respectivamente, en las ED (Figura 18 D y G). Mediante inmunofluorescencia observamos que la exposición de ambas hormonas durante 20 minutos incrementó significativamente la densidad de Sinaptofisina (Figura 18 E) y PSD-95 (Figura 18 H), evaluada como puntos presentes en las dendritas (en una extensión de 10  $\mu\text{m}$  de longitud). Posteriormente, se determinó el número de ED que contenían los marcadores sinápticos tras el tratamiento con ambas hormonas. En las neuronas tratadas con E2 y P4 pudimos evidenciar un claro aumento en el número de ED positivas para Sinaptofisina (Figura 18 F) y de PSD-95 (Figura 18 I). Esta determinación se realizó teniendo en cuenta los tres tipos morfológicos de espinas (pequeñas, finas, y fungiformes) presentes en la extensión de dendrita analizada por cada condición.

*Estos resultados sugieren que tanto E2 como P4 incrementan la densidad de marcadores pre y post-sinápticos en los sitios de formación de las ED, modulando cambios estructurales claves para la plasticidad sináptica y el desarrollo de sinaptogénesis en neuronas corticales de rata.*

#### **4.1.2 Src/FAK/Paxilina son claves en la activación de Rac1 y en la formación de ED impulsadas por E2 y P4**

En la vía de señalización de E2 o P4 hacia la formación de ED mediada por WAVE1, se encuentran las quinasas Src y FAK que median la activación de la pequeña GTPasa Rac1, responsable de la activación de WAVE1 [79]. Debido a ello, y con el propósito de amplificar la vía de señalización, desde Src-FAK hacia la activación de Rac1, nos interesó evaluar el rol de paxilina. Teniendo en cuenta nuestros antecedentes previos en donde determinamos la formación de un complejo entre las proteínas Src/FAK/paxilina tras la estimulación con E2, paxilina es clave para la formación de estructuras de membranas que dependen del citoesqueleto de actina [115]. Por ello, hipotetizamos que ésta proteína podría ser reclutada



**Figura 19.** E2 y P4 regulan la formación de ED a través del regulador actínico paxilina. Neuronas corticales fueron tratadas con los inhibidores específicos PP2 y FAKi, durante 24 h previas al tratamiento con hormonas. Los niveles de fosforilación de FAKY397 y PaxilinaY118 fueron analizados con Western blot y la densidad de ED con inmunofluorescencia. **A-C.** Los blots representativos demuestran un incremento de la fosforilación de las 2 proteínas tras los tratamientos con E2 y P4. Los inhibidores PP2 y FAKi, previnieron dicho aumento. **D-F.** El silenciamiento de paxilina con su siRNA específico disminuyó su fosforilación junto a la de Rac1. La transfección del constructo Rac1DN no afectó la fosforilación de paxilina, pero sí impidió el aumento en los niveles de p-Rac1<sup>S71</sup> inducido por las hormonas. **G-H.** Control

de transfección de siRNA vs paxilina. La expresión de paxilina total se redujo significativamente en los tratamientos con su siRNA. **I-J.** Control de transfección del constructo Rac1 DN. La expresión de Rac1 total se incrementó significativamente en los tratamientos con Rac1DN. **Análisis estadístico de western blot.** Los gráficos corresponden a la cuantificación de los inmunoblots mediante densidad óptica de las bandas. Las bandas de pFAK<sup>Y397</sup> (B) y pPaxilina<sup>Y118</sup> (C, E) fueron normalizadas con las bandas de sus respectivos totales. Las bandas de pRac1<sup>S71</sup> fueron normalizadas con las bandas de actina, al igual que las bandas de paxilina (H) y Rac1 (J). Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control (CON) utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis y Dunn considerando estadísticamente significativo \*P<0,05. Las barras representan la media±DE. (Cada blot se realizó por duplicado a partir de 3 experimentos independientes). **K-L.** El número de ED se redujo tras la inhibición de Src (PP2), FAK (FAKi) y el silenciamiento con Pax siRNA. **Análisis estadístico de IF:** Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control (CON) utilizando el test ANOVA seguido del test de Bonferroni, considerando estadísticamente significativo \*P<0,05. El gráfico muestra el valor medio ± DE del número de ED presentes en 10 μm de dendrita (20-30 neuronas de 3 experimentos independientes fueron analizados por condición).

por Src/FAK y tras su fosforilación/activación regula la actividad de Rac1 en neuronas de corteza. Por lo tanto, el próximo experimento consistió en determinar si el complejo Src/FAK/paxilina regula la conexión intracelular entre las adhesiones focales y la GTPasa Rac1 utilizando a paxilina como andamio celular. Neuronas corticales fueron tratadas previamente con inhibidores específicos para Src (PP2; 10 μM) y FAK (FAKi; 1 μM) durante 1 h; y/o se realizaron transfecciones con ARN de interferencia contra paxilina (Pax siRNA) y analizamos los perfiles de fosforilación de las proteínas anteriormente descritas. En la Figura 18, observamos que los niveles de fosforilación de FAK<sup>Y397</sup> y paxilina<sup>Y118</sup> disminuyeron drásticamente tras la inhibición con PP2 y FAKi, en respuesta a E2 o P4 (Figura 19 A-C). Además determinamos que estos tratamientos impidieron el aumento en la formación de ED inducido por E2 o P4 (Figura 19 K y L).

El silenciamiento de paxilina indujo una disminución en sus niveles de fosforilación junto a los de Rac1<sup>S71</sup> (Figura 19 D-F), impidiendo también la formación de ED (Figura 19 K y L). A continuación expresamos en las neuronas un constructo dominante negativo de Rac1 (Rac1DN) y observamos que la expresión del mismo no interfirió con la fosforilación de paxilina<sup>Y118</sup> pero sí con los niveles de la fosforilación de Rac1<sup>S71</sup>, ambas estimuladas por E2 y P4 (Figura 19 D-F).

*Estos resultados sugieren que paxilina actúa como un nexo central entre las proteínas Src/FAK y Rac1, promoviendo la formación de ED mediadas por E2 y/o P4 en cultivos neuronales primarios.*

#### **4.1.3 E2 y P4 regulan la formación de ED mediada por WAVE1 a través del switch molecular quinasa Cdk5/fosfatasa PP2A**

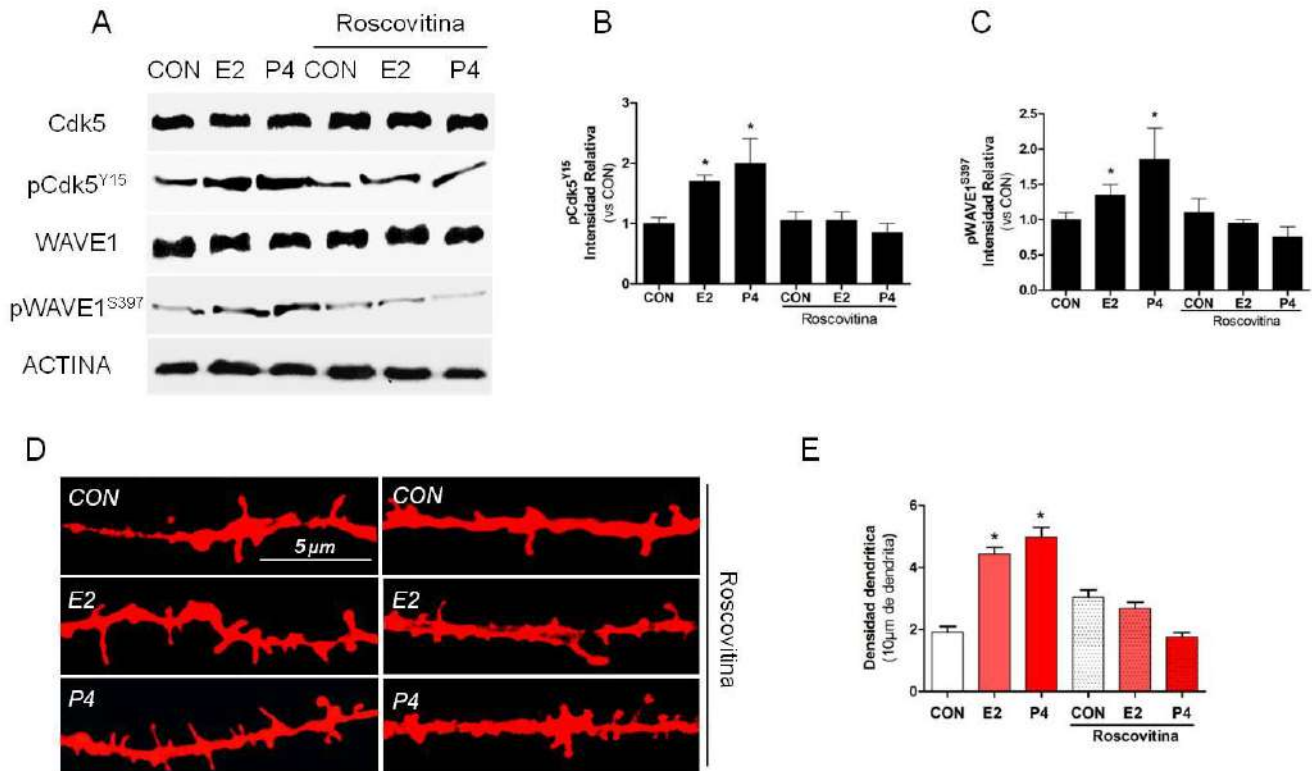
De acuerdo a investigaciones previas, las proteínas quinasa Cdk5/fosfatasa PP2A regulan la fosforilación de WAVE1 y la consecuente formación de ED [68], sin embargo el efecto de E2 y/o P4 sobre esta regulación no ha sido determinado. Teniendo en cuenta esto, hemos evaluado si la administración de E2 o P4 afecta el accionar de Cdk5 y PP2A en neuronas corticales, y si dicha estimulación afecta la fosforilación y desfosforilación de WAVE1. Para ello, las células fueron tratadas con E2 y P4 (10 nM, por 20 minutos) y se determinó el nivel de fosforilación de Cdk5<sup>Y15</sup> y WAVE1<sup>S397</sup> mediante Western blot. Los tratamientos con las hormonas incrementaron significativamente la fosforilación de ambas proteínas (Figura 20 A-C). Para confirmar la participación de Cdk5 en la fosforilación de WAVE1, las neuronas fueron tratadas previamente con su inhibidor Roscovitina (50 µM por 1 h). El tratamiento con Roscovitina impidió la fosforilación específica de Cdk5 como WAVE1 (Figura 20 A-C).

Para determinar si los cambios en los niveles de fosforilación de Cdk5 y WAVE1 repercuten en la formación dendrítica, neuronas corticales fueron tratadas con ambas hormonas, en presencia y/o ausencia del inhibidor de Cdk5, y se evaluó el número de ED por inmunofluorescencia. Los tratamientos con E2 y P4 incrementaron la densidad de ED, mientras que Roscovitina impidió dicho aumento mediado por E2 y/o P4 (Figura 20 E-F).

*Estos resultados sugieren que E2 y/o P4 incrementan la fosforilación de WAVE1, a través de la activación de Cdk5, promoviendo la formación de ED en cultivos neuronales primarios.*

#### **4.1.4 E2 y P4 estimulan la fosforilación de PP2A y WAVE1 y la formación de ED**

Recientemente, varios grupos han determinado un novedoso mecanismo de control hacia WAVE1, que bajo la acción de un estímulo (ligando), permanecería altamente fosforilada, pero frente a ligandos que activan la enzima adenilato ciclasa (incrementando los niveles de AMPc), la fosforilación de WAVE1 disminuye de forma notable [84], regulando la densidad dendrítica [51]. Por lo tanto, analizamos el efecto de E2 y P4 sobre los niveles de fosforilación de PP2A<sup>Y307</sup> y de WAVE1<sup>S397</sup>, así como también la consecuente formación de ED. Tras los tratamientos con E2 y/o P4 (10 nM, 20 minutos) hemos observado que ambas hormonas incrementan significativamente la fosforilación de PP2A<sup>Y307</sup> y WAVE1<sup>S397</sup> (Figura 21 A-C). Para evaluar la participación de PP2A se trató a las células con Forskolina, un activador específico de PP2A. Los tratamientos con Forskolina causaron una disminución significativa en la fosforilación conjunta de PP2A y WAVE1 (Figura 21 A-C). Al analizar la formación de ED, se observó además que Forskolina disminuyó significativamente el número de éstas estructuras (Figura 21 D-E).

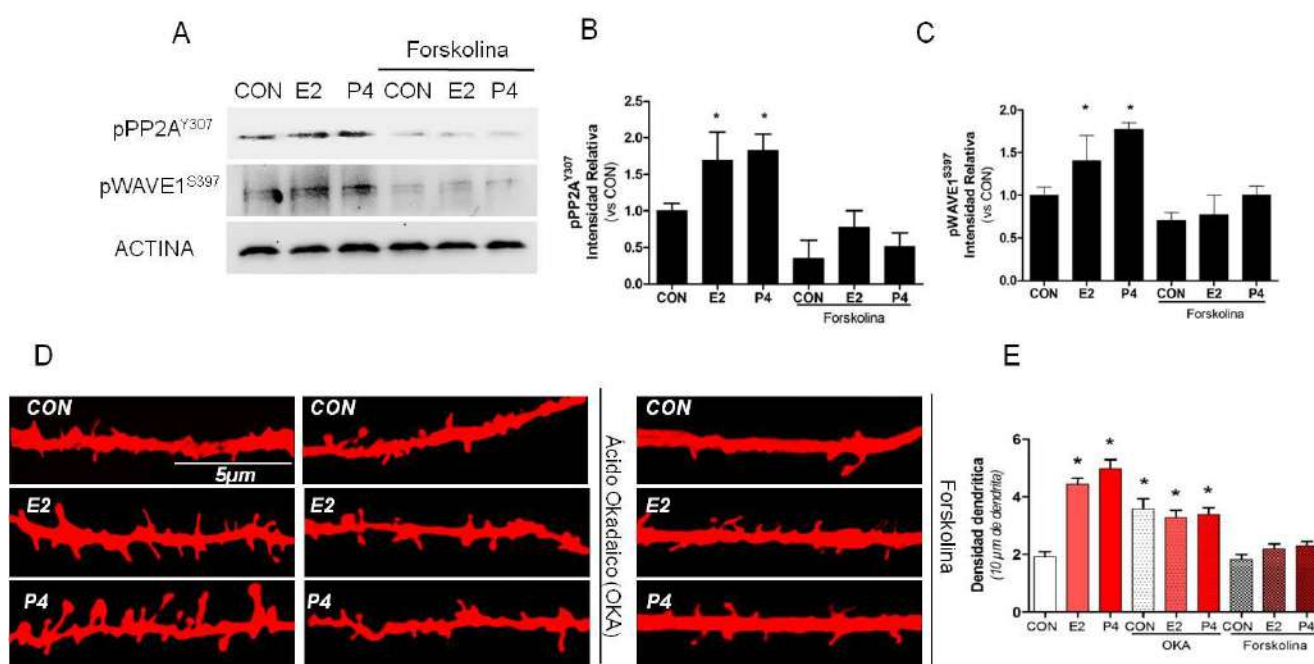


**Figura 20. E2 y P4 regulan la formación de ED a través de Cdk5-WAVE1.** Neuronas corticales fueron tratadas con Roscovitina (inhibidor de Cdk5, 50  $\mu$ M) 1 h previa a los tratamientos con hormonas. Los niveles de fosforilación de Cdk5<sup>Y15</sup> and WAVE1<sup>S397</sup> fueron analizados por Western blot, y el número de ED fueron visualizadas por inmunofluorescencia luego de marcar los filamentos de actina con Faloidina conjugado con Texas Red (TRPh/ACTINA). **A-C.** Blots representativos demostraron un incremento en la fosforilación de Cdk5 y WAVE1 tras el estímulo con E2 o P4. Los tratamientos con Roscovitina evitaron este incremento inducido por ambas hormonas. **Análisis estadístico de western blot.** Los gráficos corresponden a la cuantificación de los inmunoblots mediante densidad óptica de las bandas. Las bandas de pCdk5<sup>Y15</sup> (B) fueron normalizadas con las bandas de Cdk5 total. Las bandas de pWAVE1<sup>S397</sup> (C) fueron normalizadas con las bandas de actina. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control (CON) utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis y Dunn considerando estadísticamente significativo \*P<0,05. Las barras representan la media  $\pm$  DE. (Cada blot se realizó por duplicado a partir de 3 experimentos independientes). **D-E.** El número de ED se redujo tras la inhibición de Cdk5 con Roscovitina. **Análisis estadístico de IF.** Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control (CON) utilizando el test ANOVA seguido del test de Bonferroni, considerando estadísticamente significativo \*P<0,05. El gráfico muestra el valor medio  $\pm$  DE del número de ED presentes en 10  $\mu$ m de dendrita (20-30 neuronas de 3 experimentos independientes fueron analizados por condición).

Para confirmar esto, se utilizó en forma paralela Ácido Okadaico (OKA), un inhibidor específico de PP2A. Por lo tanto, las neuronas fueron tratadas con OKA y/o Forskolina, en presencia y/o ausencia de E2 y/o P4. Nuevamente, tanto E2 como P4 impulsaron la formación dendrítica tras

el tratamiento con ambas hormonas (Figura 21 D-E), pero tras el uso de Forskolina dichos incrementos fueron significativamente disminuidos (Figura 21 E). En cambio, el tratamiento con OKA promovió, de manera notable, la formación de ED en células neuronales (Figura 21 E).

*Estos resultados sugieren que tanto E2 como P4 controlan la actividad de PP2A, incrementando su fosforilación en Y307 y promulgando al aumento de la fosforilación de WAVE1<sup>S397</sup>, conduciendo a un aumento en el número de ED. El uso de un inhibidor (OKA) o activador (Forskolina) de PP2A, nos ha permitido poder elucidar este preciso mecanismo de control desde PP2A hacia WAVE1, y por consiguiente, poder visualizar éste fenómeno regulatorio a través de la formación de espinas dendríticas.*



**Figura 21. E2 y P4 median la fosforilación de PP2A regulando el control de WAVE1.** Neuronas corticales fueron tratadas con Forskolina (activador de PP2A, 1 µM) durante 20 min y/o el inhibidor específico de PP2A llamado ácido okadaico (OKA, 0,5 µM) durante 2 h previo a los tratamientos hormonales. Los niveles de fosforilación de PP2A<sup>Y307</sup> y WAVE1<sup>S397</sup> fueron analizados por Western blot y la densidad de ED mediante inmunofluorescencia. **A-C.** En dichas figuras, los blots muestran un incremento en los niveles de fosforilación de ambas proteínas tras los tratamientos con E2 y P4. Forskolina disminuyó la fosforilación de PP2A junto a WAVE1. **Análisis estadístico de western blot.** Los gráficos corresponden a la cuantificación de los inmunoblots mediante densidad óptica de las bandas. Las bandas de pPP2A<sup>Y307</sup> (B) fueron normalizadas con las bandas de PP2A total. Las bandas de pWAVE1<sup>S397</sup> (C) fueron normalizadas con las bandas de actina. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control (CON) utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis y Dunn considerando estadísticamente significativo \*P<0,05. Las barras representan la media ± DE. (Cada blot se realizó por

duplicado a partir de 3 experimentos independientes). **D-E.** Análisis del número de ED. El tratamiento con OKA incrementó la densidad dendrítica, mientras que Forskolina evitó dicho aumento. **Análisis estadístico de IF.** Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control (CON) utilizando el test ANOVA seguido del test de Bonferroni, considerando estadísticamente significativo \* $P < 0,05$ . El gráfico muestra el valor medio  $\pm$  DE del número de ED presentes en 10  $\mu\text{m}$  de dendrita (20-30 neuronas de 3 experimentos independientes fueron analizados por condición).

## **4.2 Resultados del segundo objetivo específico**

### **4.2.1 La expresión exógena de constructos mutantes de PP2A alteran la fosforilación de WAVE1 y la formación de ED mediada por E2 o P4.**

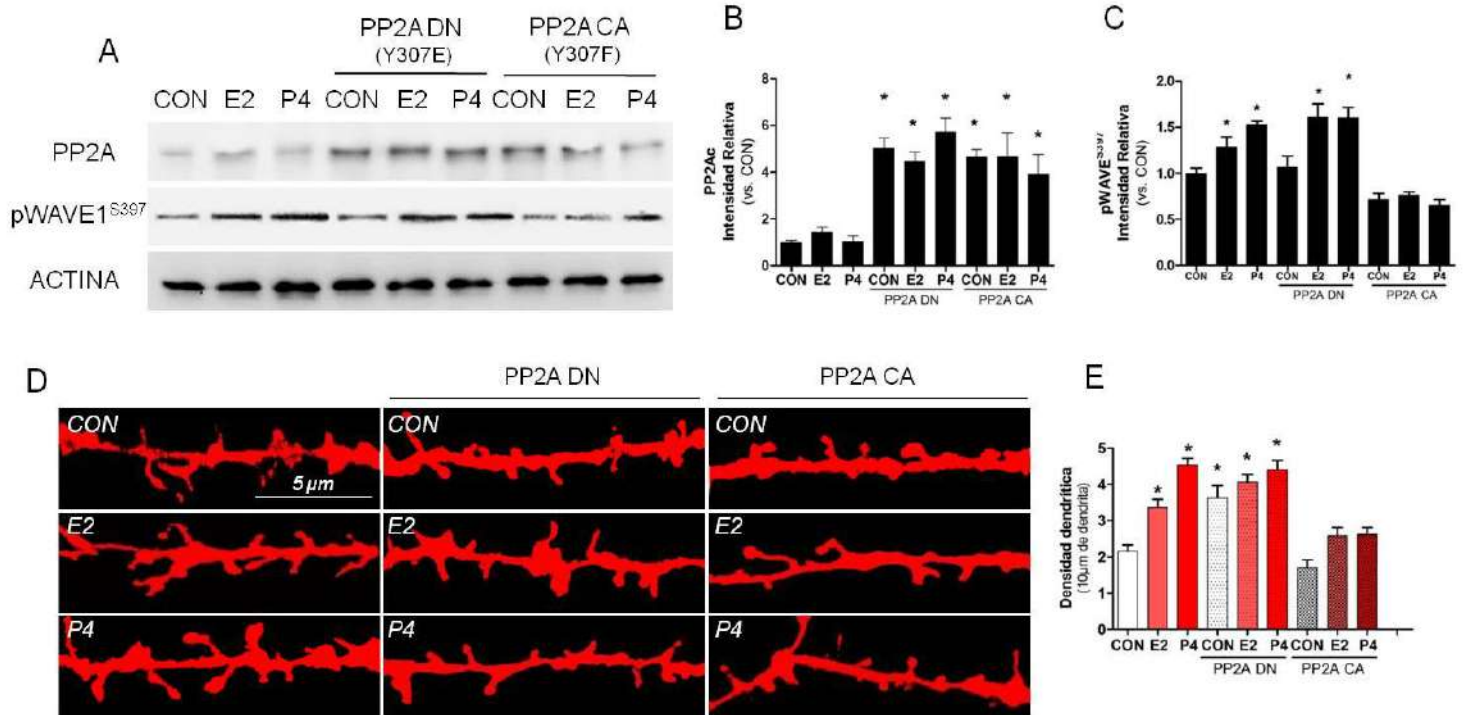
En investigaciones previas, Chen Jian y colaboradores demostraron que la actividad de PP2A es regulada por su fosforilación específica en Y307 [116]. Por lo tanto, luego de determinar que PP2A forma parte de la señalización de E2 y P4 hacia WAVE1, y regula la formación de ED, investigamos la especificidad de la fosforilación inhibitoria de PP2A en Y307. Para ello expresamos constructos mutantes de PP2A, uno Dominante Negativo PP2A DN (con la mutación puntual Y307E) el cual simula el estado fosforilado del residuo y por lo tanto inactivo de PP2A; y el otro constructo Constitutivamente Activado PP2A CA (con la mutación específica Y307F) es un mutante no fosforilable, simulando el estado activo de la proteína. A través de dicho experimento, se observó que la expresión del mutante PP2A DN ocasiona un incremento en los niveles de fosforilación de WAVE1<sup>S397</sup> (Figura 22 A y C) y en el número de ED (Figura 22 D-E). En cambio, la expresión del mutante PP2A CA impidió ambos aumentos (Figura 22 A y C-E). Para determinar la eficiencia de transfección de los constructos se utilizó el anticuerpo primario contra la subunidad catalítica de PP2A (PP2Ac, Figura 22 A-B).

*Estos resultados sugieren que la fosforilación de PP2A en Y307 cumple un rol específico y preponderante en el control de WAVE1 y en la formación de ED, determinando que la actividad de PP2A conduce específicamente al control en la fosforilación de WAVE1.*

### **4.2.2 La fosforilación de PP2A en Y307 dependiente de E2 y P4 es mediada por Src quinasa**

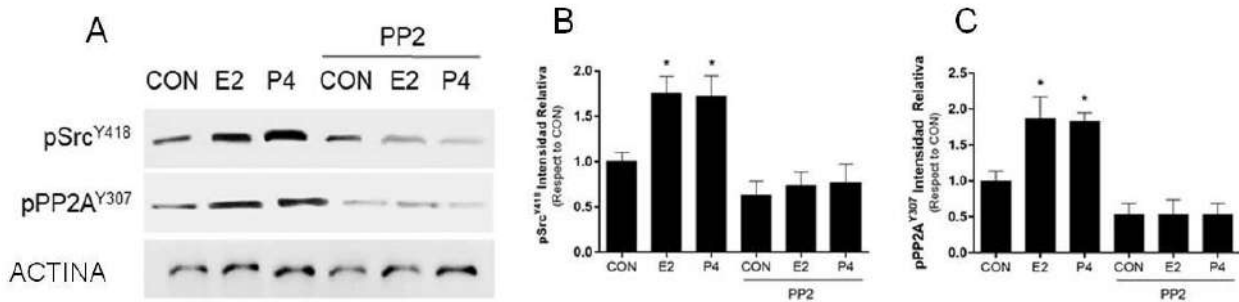
Se ha reportado que PP2A interactúa con Src quinasa y que ésta interacción lleva a la inhibición de la fosfatasa, mediante su fosforilación en Y<sup>307</sup> por parte de Src [2, 3]. Teniendo en cuenta esto, evaluamos si Src regula la fosforilación de PP2A, usando su inhibidor específico PP2. Para ello tratamos a las neuronas con el inhibidor y posteriormente realizamos los tratamientos correspondientes con E2 y P4. Como resultado se observó que ambas hormonas inducen las fosforilaciones de Src<sup>Y418</sup> y PP2A<sup>Y307</sup>, y que las mismas fueron impedidas por PP2 (Figura 23 A-C).





**Figura 22. Modulación de constructos mutantes de PP2A en la formación dendrítica.** Neuronas corticales fueron transfectadas con constructos mutantes vs. PP2A, uno dominante negativo *PP2A DN* (*PP2AY307E*) y uno constitutivamente activo *PP2A CA* (*PP2AY307F*); y los niveles de fosforilación de WAVE1<sup>S397</sup> y la expresión de la subunidad catalítica de PP2A (PP2Ac) fueron determinados con Western blot y el análisis de la densidad de las ED fueron analizados con inmunofluorescencia. **A-C.** Se observa un incremento en la fosforilación de WAVE1 luego del estímulo con E2 o P4. PP2A DN aumentó los niveles de p-WAVE1<sup>S397</sup>. Por el contrario, PP2A CA contrarrestó tal efecto. Además, utilizamos el anticuerpo primario contra la subunidad catalítica de PP2A (PP2Ac) para determinar la eficiencia de transfección de los constructos. **Análisis estadístico de western blot.** Los gráficos corresponden a la cuantificación de los inmunoblots mediante densidad óptica de las bandas. Las bandas de PP2A (B) y de pWAVE1<sup>S397</sup> (C) fueron normalizadas con las bandas de actina. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control (CON) utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis y Dunn considerando estadísticamente significativo \*P<0,05. Las barras representan la media ± DE. (Cada blot se realizó por duplicado a partir de 3 experimentos independientes). **D-E.** Análisis de la densidad de ED. La expresión de PP2A DN incrementa el número de ED, mientras que la de PP2A CA bloqueó dicho aumento en neuronas corticales. **Análisis estadístico de IF.** Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control (CON) utilizando el test ANOVA seguido del test de Bonferroni, considerando estadísticamente significativo \*P<0,05. El gráfico muestra el valor medio ± DE del número de ED presentes en 10 µm de dendrita (20-30 neuronas de 3 experimentos independientes fueron analizados por condición).

*Estos resultados sugieren que Src está implicado en la fosforilación inhibitoria de PP2A y que E2 y P4 promueven dicho fenómeno.*



**Figura 23. Src quinasa media la fosforilación de PP2A dependiente de E2 y P4. A-C.** Neuronas corticales fueron tratadas con PP2 (10  $\mu$ M) por 24 h previo al tratamiento con E2 y P4 durante 20 min, y se analizó la fosforilación de Src y PP2A, a través de Western blot. **Análisis estadístico de western blot.** Los gráficos corresponden a la cuantificación de los inmunoblots mediante densidad óptica de las bandas. Las bandas de pSrc<sup>Y416</sup> (B) y de pPP2A<sup>Y307</sup> (C) fueron normalizadas con las bandas de sus respectivos totales. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control (CON) utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis y Dunn considerando estadísticamente significativo \*P<0,05. Las barras representan la media  $\pm$  DE. (Cada blot se realizó por duplicado a partir de 3 experimentos independientes).

### **4.3 Resultados del tercer objetivo específico**

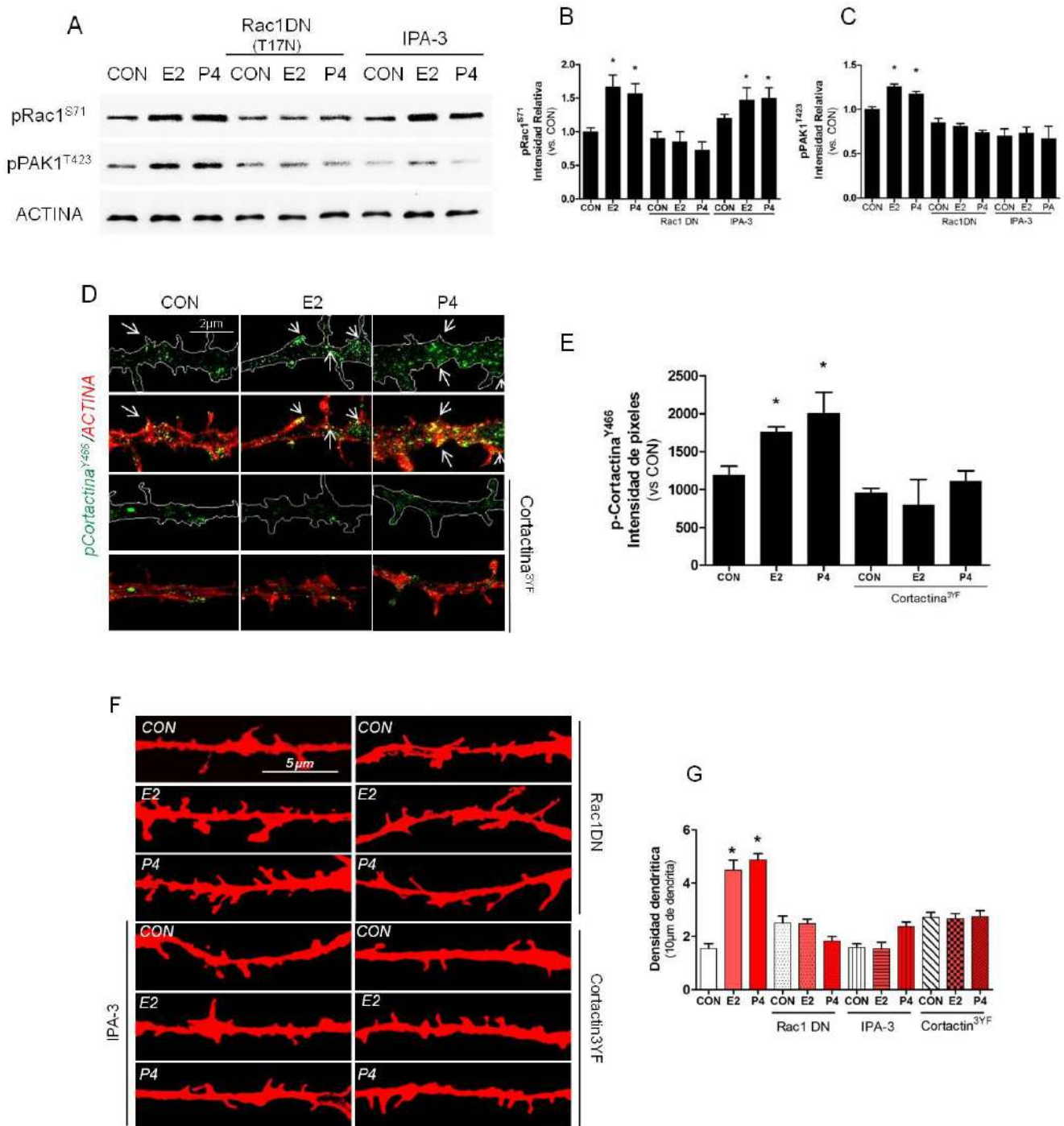
#### **4.3.1 Cortactina participa en la formación de ED mediada por E2/P4 a través de una vía dependiente de Rac1/PAK1**

Cortactina es una proteína monomérica ubicada en el citoplasma de las células, la cual es activada mediante estímulos externos para promover la polimerización y la reorganización del citoesqueleto de actina, especialmente en sitios puntuales alrededor de la periferia celular [117]. Una particular característica de cortactina es su capacidad de unión a la actina y regular su dinámica a través de la activación del complejo Arp2/3, habilidad compartida y complementaria con la proteína WAVE1 [102]. Estudios previos han reportado que la fosforilación de cortactina se encuentra regulada por una vía de señalización mediada por Rac1 junto a su quinasa efectora PAK1 [118]. Por lo tanto, nuestro próximo objetivo fue investigar la posible modulación de E2 o P4 hacia cortactina, a través de una vía dependiente de Rac1 y PAK1, y si la misma regula la formación de ED.

Cuando las neuronas corticales fueron tratadas 20 min con pulsos de E2 o P4, se observó que ambas hormonas incrementaron significativamente la fosforilación de Rac1<sup>S71</sup> y PAK1<sup>T423</sup>, fenómeno que fue impedido tras bloquear y/o inhibir la actividad de ambas con Rac1 DN e IPA-3, respectivamente (Figura 24 A-C). Los tratamientos con E2 o P4 incrementaron significativamente la fosforilación y redistribución de p-cortactina<sup>Y466</sup> hacia los sitios de

formación de las espinas (flechas blancas Figura 24 D), esto fue impedido tras expresar un constructo no fosforilable para cortactina (Cortactina<sup>3YF</sup>)(Figura 24 D-E). Además, al analizar la formación de ED observamos que el aumento producido por las hormonas E2 y P4 es impedido tras el bloqueo de la actividad de Rac1, la inhibición de PAK1 y tras expresar Cortactina 3YF (Figura 24 F-G).

*Estos resultados resaltan el rol de cortactina como un regulador esencial y complementario en la formación de ED, inducidos por E2 y P4 junto con la participación de Rac1 y su quinasa efectora PAK1 en este fenómeno.*



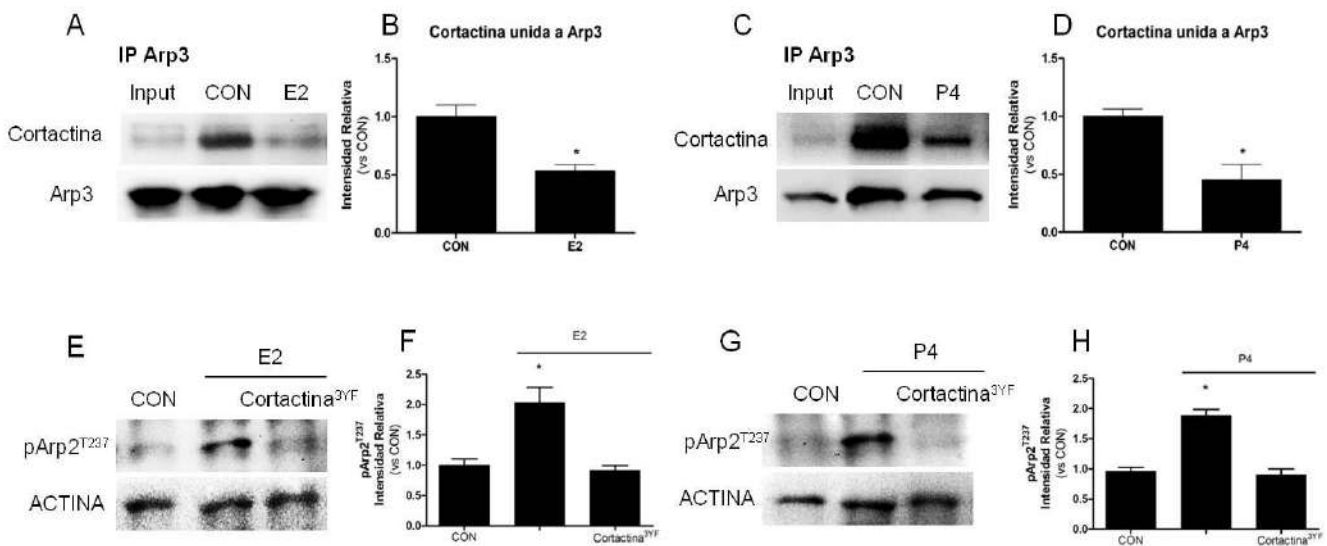
**Figura 24. E2 y P4 promueven la formación de espinas dendríticas mediante una vía de señalización dependiente de Rac1/PAK1/cortactina en neuronas corticales.** Las células fueron transfectadas con el constructo Rac1DN durante 48 h. La actividad de PAK1 se inhibió con IPA-3 (10  $\mu$ M) que fue añadido al medio de cultivo 1 h antes de los tratamientos con E2 y/o P4. Los niveles de fosforilación de Rac1<sup>S71</sup> y PAK1<sup>T423</sup> se analizaron con Western blot. El análisis de la densidad dendrítica mediado por cortactina, fue evaluado mediante la transfección de un constructo no fosforilable (Cortactina<sup>3YF</sup>). **A-C.** Blots representativos muestran un incremento en los niveles de fosforilación de las proteínas Rac1<sup>S71</sup> y PAK1<sup>T423</sup>, tras los tratamientos con E2 y P4. Este efecto se vio impedido tras interferir la actividad de Rac1 y PAK1. **Análisis estadístico de western blot.** Los gráficos corresponden a la cuantificación de los inmunoblots mediante densidad óptica de las bandas. Las bandas de pRac1<sup>S71</sup> (B) fueron normalizadas con las bandas de actina y las de pPAK1<sup>T423</sup> (C) con PAK1. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control (CON) utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis y Dunn considerando estadísticamente significativo \*P<0,05. Las barras representan la media  $\pm$  DE. (Cada blot se realizó por duplicado a partir de 3 experimentos independientes). **D-E.** Microfotografías representativas de segmentos de dendritas de 5  $\mu$ m de longitud. Las flechas blancas muestran un incremento en la localización de p-Cortactina<sup>Y466</sup> en las ED y en la base de las mismas luego de que las células fueran tratadas con E2 y P4. Los filamentos de actina fueron teñidos con Faloidina conjugada con Texas Red (TRPh) para visualizar el eje dendrítico y las ED y poder marcar su contorno utilizando la función de selección libre y marcar contorno del programa Image J, (NIH, MD, USA). La interferencia de Cortactina, en neuronas que expresaron la mutante no fosforilable de Cortactina (Cortactin 3YF), impidió la redistribución de p-Cortactina<sup>Y466</sup> hacia los sitios de formación dendrítica junto con la formación de las mismas. El gráfico muestra el valor medio  $\pm$  DE de la intensidad de pixeles de neuronas positivas para p-Cortactina<sup>Y466</sup>/AlexaFluor488 (20-30 neuronas de 3 experimentos independientes fueron analizados por condición) \*p<0,05 vs. control (ANOVA seguido del test de Bonferroni). **F-G.** Análisis de la densidad de ED. Este fenómeno, impulsado por E2 y/o P4, fue impedido tras la inhibición con Rac1DN, IPA-3 y Cortactin3YF. **Análisis estadístico de IF.** Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control (CON) utilizando el test ANOVA seguido del test de Bonferroni, considerando estadísticamente significativo \*P<0,05. El gráfico muestra el valor medio  $\pm$  DE del número de ED presentes en 10  $\mu$ m de dendrita (20-30 neuronas de 3 experimentos independientes fueron analizados por condición).

#### **4.3.2 E2 y P4 promueven la fosforilación de Cortactina y Arp2 y una disrupción de la interacción de Cortactina con Arp3**

Estudios previos han reportado que cortactina regula la activación del complejo Arp2/3, mediante su interacción con la subunidad Arp3, a través de su dominio N terminal (NtA) [119]. Teniendo en cuenta dichos resultados, nuestro próximo punto fue evaluar la interacción entre Cortactina y el complejo Arp2/3 (subunidad Arp3), a través de ensayo de inmunoprecipitación. Se observó, en condiciones basales (Control), una marcada interacción entre cortactina con la subunidad Arp3 (Figura 25 A-D). El tratamiento individual con cada hormona, E2 (Figura 25 A-B) y P4 (Figura 25 C-D), redujo notablemente la interacción entre la cortactina y Arp3 (Figura 25 A-D). Previamente se ha reportado que la fosforilación de ciertas proteínas activadas por estímulos externos, causan un impedimento estérico en la conformación de los complejos impidiendo las interacciones entre las proteínas [120, 121]. Por lo tanto para explicar ésta disrupción, evaluamos si ambas hormonas podrían estar disociando la interacción al

incrementar los niveles de fosforilación del complejo Arp2/3. Por ello, realizamos tratamientos rápidos con E2 y/o P4 (20 min) y observamos que los pulsos con ambas hormonas incrementan los niveles de fosforilación en la subunidad Arp2 del complejo (Figura 25 E-H). Además este incremento fue impedido cuando las células fueron transfectadas con la mutante no fosforilable de cortactina, indicando que la fosforilación específica de cortactina, inducida por E2 y/o P4, es fundamental para la regulación de la fosforilación y activación del complejo Arp2/3.

*Estos resultados sugieren que cortactina interactúa con Arp3 en condiciones basales y que la estimulación con las hormonas E2 y P4 podrían disociar esta interacción al promover la fosforilación del complejo Arp2/3.*

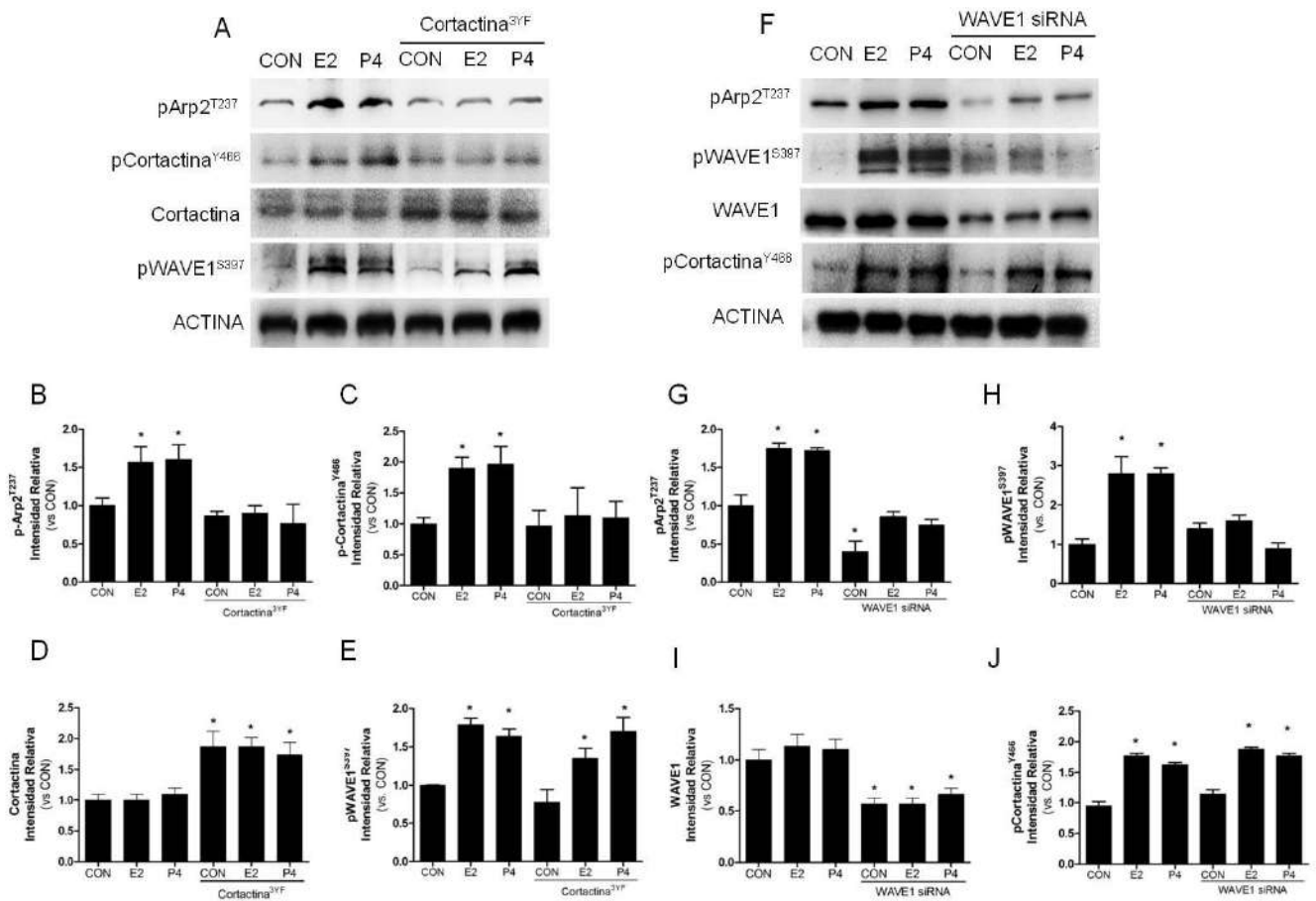


**Figura 25. E2 y P4 regulan la conformación del complejo Arp2/3 y su interacción con cortactina. A-D.** Ensayo de inmunoprecipitación entre Cortactina y Arp3. Los homogenatos inmunoprecipitados con Arp3 fueron analizados por Western blot y revelados contra Cortactina tras los tratamientos hormonales. Tanto el tratamiento con E2 y con P4 ocasionaron una disminución en la interacción de Cortactina con la subunidad Arp3. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control (CON) utilizando el test t de Student considerando estadísticamente significativo \*P<0,05. Las barras representan la media  $\pm$  DE. (Cada blot se realizó por duplicado a partir de 3 experimentos independientes). **E-H.** Análisis de la fosforilación del complejo Arp2/3 tras el estímulo con E2 o P4. Ambas hormonas ocasionaron un aumento de la fosforilación regulatoria de Arp2. **Análisis estadístico Wb:** Los gráficos corresponden a la cuantificación de los inmunoblots mediante densidad óptica de las bandas. Las bandas de pArp2<sup>T237</sup> (F, H) fueron normalizadas con las bandas de actina. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control (CON) utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis y Dunn considerando estadísticamente significativo \*P<0,05. Las barras representan la media  $\pm$  DE. (Cada blot se realizó por duplicado a partir de 3 experimentos independientes).

#### **4.3.3 E2 y P4 regulan la fosforilación de Arp2 dependiente de WAVE1 y Cortactina**

Recientemente se ha reportado que las subunidades principales del complejo Arp2/3, Arp2 y Arp3 son blanco de modificaciones post-traduccionales, necesarias para regular la nucleación actínica [122]. La fosforilación específica de Arp2 en T<sup>237</sup> es clave para promover tal evento. Por lo tanto, nos propusimos evaluar el paso final de la vía de señalización hacia la formación de ED modulada por ambas hormonas, a través del estudio de los niveles de fosforilación de nuestras tres proteínas blanco hacia la ramificación actínica, Cortactina<sup>Y466</sup>, WAVE1<sup>S397</sup> y Arp2<sup>T237</sup>. Mediante ensayos de western blot se observó que tratamientos rápidos con E2 y/o P4 incrementaron los niveles de fosforilación de Cortactin<sup>Y466</sup>, WAVE1<sup>S397</sup> y Arp2<sup>T237</sup> (Figura 26 A y F). La transfección del constructo no fosforilable de cortactina, *Cortactin 3YF* impidió la fosforilación tanto de cortactina como de Arp2, mientras que la fosforilación de WAVE1 no fue afectada (Figura 26 A-E). Mientras que el silenciamiento de WAVE1 con su siRNA específico, bloqueó la fosforilación de WAVE1 junto a la subunidad de Arp2, sin afectar los niveles de cortactina (Figura 26 F-J).

*Estos resultados indican que los reguladores actínicos, cortactina y WAVE1, actúan de forma independiente pero complementaria hacia el complejo Arp2/3, condicionando la fosforilación de Arp2.*



**Figura 26. Control de Cortactina y WAVE1 sobre la fosforilación de Arp2.** Neuronas corticales fueron transfectadas con el mutante Cortactina<sup>3YF</sup> y un siRNA vs. WAVE1 durante 48hs. Los niveles de p-Cortactina<sup>Y466</sup>, p-WAVE1<sup>S397</sup> y Arp2<sup>T237</sup> fueron analizados por Western blot. Los blots representativos demuestran un incremento de la fosforilación de las tres proteínas tras los tratamientos con E2 y P4. **A-E.** La expresión de Cortactina<sup>3YF</sup> evitó la fosforilación de Arp2<sup>T237</sup> (B) y cortactina<sup>Y466</sup> (C) inducida por las hormonas. La expresión de cortactina total se incrementó significativamente luego de expresar el mutante Cortactina<sup>3YF</sup> (D), mientras que la fosforilación de WAVE1<sup>S397</sup> no se vio afectada (E). **F-J.** El silenciamiento de WAVE1 con su siRNA evitó la fosforilación de Arp2<sup>T237</sup> (G) y de WAVE1<sup>S397</sup> (H) inducidas por las hormonas. La expresión de WAVE1 total disminuyó significativamente en los tratamientos con su siRNA (I) y no afectó la fosforilación de cortactina<sup>Y466</sup> (J). **Análisis estadístico de western blot.** Los gráficos corresponden a la cuantificación de los inmunoblots mediante densidad óptica de las bandas. Las bandas de pArp2<sup>T237</sup> (B, G), pCortactina<sup>Y466</sup> (C, J), Cortactina (D), p-WAVE1<sup>S397</sup> (E, H), y WAVE1 (I) fueron normalizadas con las bandas de actina correspondientes. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control (CON) utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis y Dunn considerando estadísticamente significativo \*P<0,05. Las barras representan la media ± DE. (Cada blot se realizó por duplicado a partir de 3 experimentos independientes).

Teniendo en cuenta nuestros resultados expuestos, es importante destacar el rol preponderante de ambas hormonas hacia el delicado y preciso mecanismo de control mediado por Cortactina-WAVE1/Complejo Arp2/3, claves en la formación dendrítica, formación sináptica y plasticidad neuronal, resultando determinantes para el buen funcionamiento del sistema nervioso central.

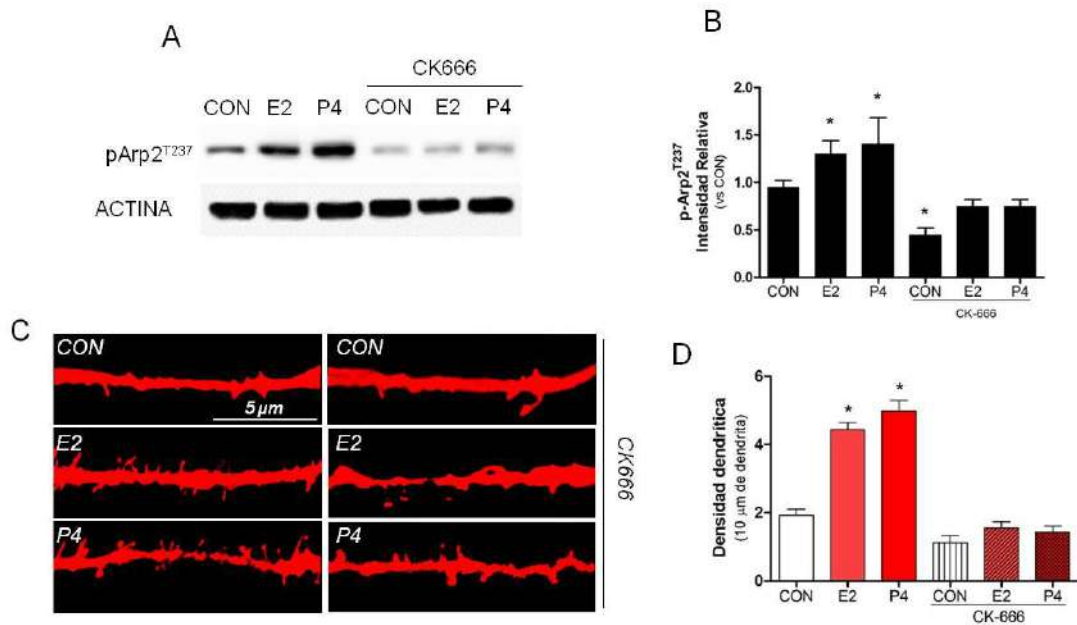
#### **4.3.4 E2 y P4 impulsan la formación de ED a través del complejo Arp2/3**

En el paso final de la vía de señalización estudiada encontramos a Arp2, una de las subunidades del complejo Arp2/3 que puede ser fosforilado en treonina (T) 237. Se ha reportado que dicha regulación es necesaria para iniciar la nucleación actínica [122]. Para evaluar el rol específico de Arp2/3 en neuronas de corteza utilizamos su inhibidor específico CK-666. Los tratamientos con esta droga evitaron de manera significativa tanto la fosforilación de Arp2<sup>T237</sup> (Fig. 27 A-B) como la formación de ED (Fig. 27 C-D) durante la administración de E2 y P4.

*Estos resultados sugieren que la fosforilación de Arp2 es necesaria para la formación de ED mediada por E2 y P4 en neuronas de corteza.*

#### **4.3.5 Las hormonas E2 y P4 inducen la formación de ED a través de WAVE1/Complejo Arp2/3 vía sus receptores**

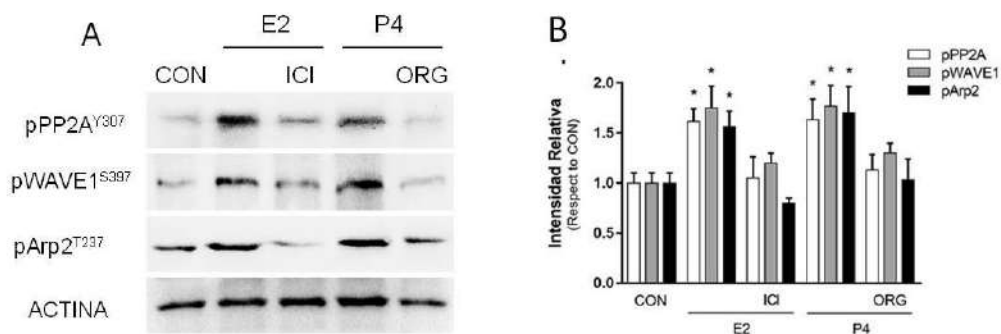
Por último para confirmar si la fosforilación de PP2A, WAVE1 y de Arp2 están mediadas por los receptores de 17-β-estradiol (ER) y progesterona (PR), tratamos a las neuronas con sus respectivos antagonistas ICI 182,780 (100 nM) y ORG 31710 (1 μM) por 1 h antes de los tratamientos con las hormonas.



**Figura 27. Regulación del Complejo Arp2/3, paso final hacia la formación de ED inducida por E2 y P4.** Neuronas de corteza fueron expuestas por 20 min a 10 nM de E2 y P4 en presencia o ausencia de CK-666 (4 μM). **A-B.** Los niveles de p-Arp2<sup>T237</sup> fueron analizados mediante Wb. **Análisis estadístico de western blot.** El gráfico corresponden a la cuantificación del inmunoblot mediante densidad óptica de las bandas. Las bandas de p-Arp2<sup>T237</sup> (B) fueron normalizadas con las bandas de actina. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control (CON) utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis y Dunn considerando estadísticamente significativo \*P<0,05. Las barras representan la media ± DE. (Cada blot se realizó por duplicado a partir de 3 experimentos independientes). **C-D.** Análisis de la densidad dendrítica. Las células se marcaron con TxRdPh para visualizar los filamentos de actina. La escala corresponde a una longitud de 5 μm. **Análisis estadístico de IF.** Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control (CON) utilizando el test ANOVA seguido del test de Bonferroni, considerando estadísticamente significativo \*P<0,05. El gráfico muestra el valor medio ± DE del número de ED presentes en 10 μm de dendrita (20-30 neuronas de 3 experimentos independientes fueron analizados por condición).

Como resultado obtuvimos que el bloqueo de los receptores evitaron por completo la fosforilación de PP2A, WAVE1 y de Arp2 dependientes de E2 y P4 (Figura 28 A-B).

*Estos resultados sugieren que E2 y P4 regulan la fosforilación de éstas proteínas vía ER y PR en las vías estudiadas.*





**Figura 28. ER y PR median la fosforilación de PP2A, WAVE1 y Arp2 en la formación de ED dependiente de E2 y P4. A-B.** Las neuronas fueron expuestas por 1 h a los agonistas ICI 182,780 (ER) y ORG 31710 (PR) previo a los tratamientos con las hormonas y a continuación se analizaron los niveles de fosforilación de PP2A, WAVE1 y Arp2. **Análisis estadístico de western blot.** El gráfico corresponde a la cuantificación del inmunoblot mediante densidad óptica de las bandas. Las bandas de p-PP2A<sup>Y307</sup>, p-WAVE1<sup>S307</sup> y p-Arp2<sup>T237</sup> fueron normalizadas con las bandas de actina. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control (CON) utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis y Dunn considerando estadísticamente significativo \*P<0,05. Las barras representan la media ± DE. (Cada blot se realizó por duplicado a partir de 3 experimentos independientes).

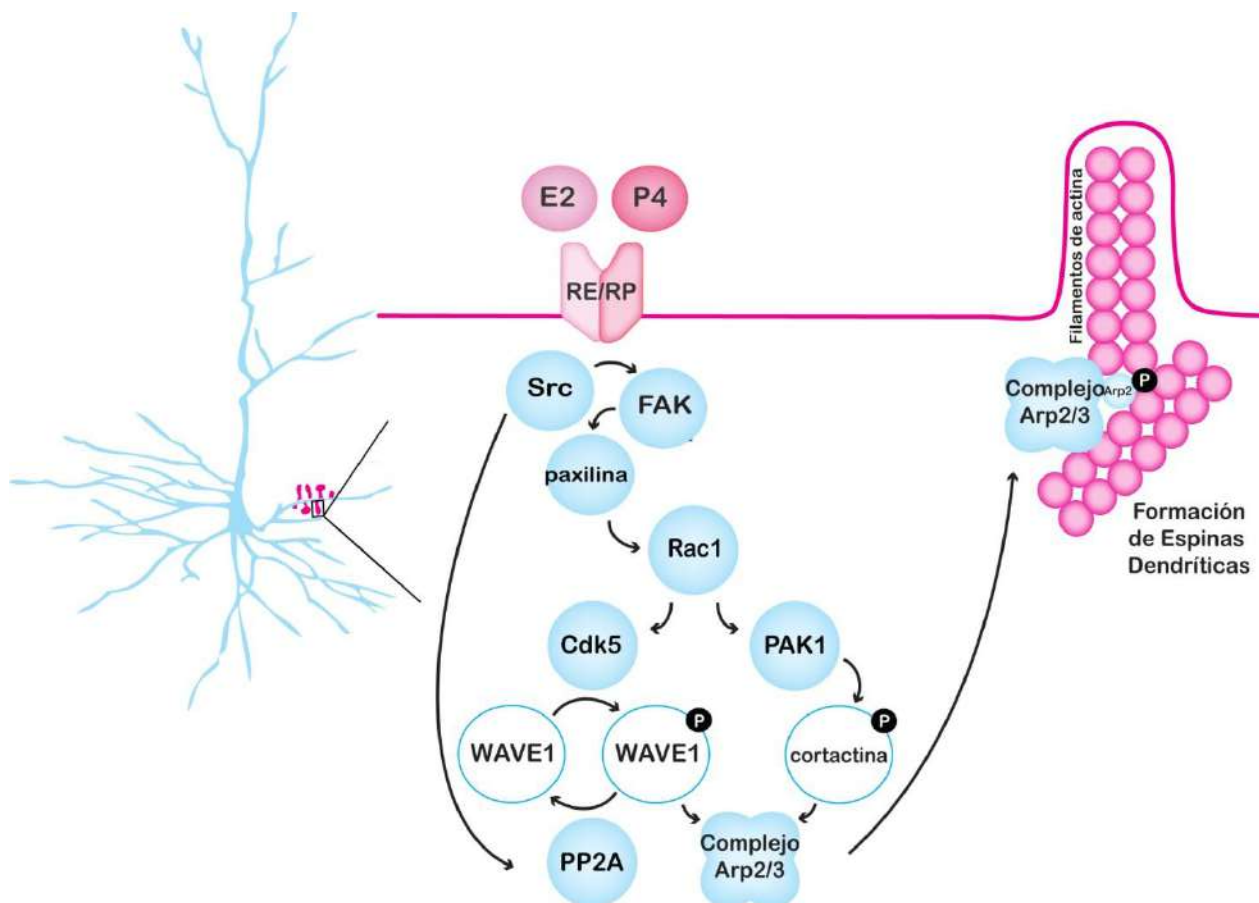
## CAPÍTULO 5

### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

#### 5.1 DISCUSIÓN

En los últimos años el estudio de la formación de espinas dendríticas (ED) ha suscitado mucho interés. La razón de ello radica en el papel que juegan estas estructuras en el establecimiento de circuitos neuronales que posibilitan la adquisición de memoria, aprendizaje y cognición [123]. Durante la formación de ED, las neuronas de regiones cerebrales cognitivas, como la corteza y el hipocampo, dependen del citoesqueleto de actina. La maquinaria actínica puede ser activada mediante señales externas que impulsan una respuesta rápida que culmina con la adición o eliminación de ED. Esto permite un adecuado “cableado” de los circuitos neuronales del sistema nervioso central [124]. Si bien se ha demostrado previamente que los esteroides sexuales modifican la densidad de ED, y actúan como importantes reguladores de la morfología neuronal, el mecanismo molecular preciso de este proceso, aún permanece sin dilucidar. Teniendo en cuenta que muchas vías de señalización que convergen en el remodelamiento del citoesqueleto de actina, son activadas por E2 y P4 en diversos contextos celulares [9], en este trabajo de investigación evaluamos si estas hormonas regulan la morfología neuronal a través de la reorganización del citoesqueleto actínico, específicamente en el control de la formación de ED en neuronas corticales de rata. Para ello, estudiamos los mecanismos de fosforilación de WAVE1, cortactina y del complejo Arp2/3, tres reguladores fundamentales de la polimerización actínica.

Los resultados más relevantes de este trabajo indican que hay una señalización por parte de E2 y P4 sobre los reguladores actínicos cortactina/WAVE1 y el Complejo Arp2/3, que tiene como resultado una rápida modificación de la morfología de la membrana incrementando la densidad de ED. Esto sucede a través de dos vías de señalización (Figura 29). Una de ellas mediada por los receptores ER-PR/Src/FAK/paxilina. Luego, tras la fosforilación de paxilina, la GPTasa Rac1 (pivote central en estas vías) y Cdk5 conducen a la fosforilación de WAVE1<sup>S397</sup> y la formación de ED. Por otro lado E2 y P4, mediante sus receptores estimulan la vía ER-PR/Src/FAK/paxilina/Rac1/PAK1/cortactina, que lleva a la fosforilación de Cortactina y su redistribución a los sitios donde se forman las ED.



**Figura 29.** Esquema ilustrativo representando la vía de señalización impulsadas por E2 y P4 en la formación de espinas dendríticas.

#### *E2 y P4 sobre la formación de ED*

El rol de los esteroides en el SNC, en particular de E2 y P4, ha sido foco de numerosas investigaciones durante los últimos 15-20 años, debido a la habilidad de los mismos para regular la plasticidad sináptica [15]. Varios estudios han reportado que la densidad de ED en neuronas piramidales de la corteza cerebral fluctúa con la variación de los niveles de hormonas sexuales, incrementándose cuando los niveles de estradiol aumentan [26]. En las fases de marcada fluctuación hormonal, como sucede en la pubertad, ciclos reproductivos de la mujer, embarazo y menopausia, tanto estradiol como progesterona ejercen cambios morfológicos en las dendritas, sinapsis e incluso alteran la concentración de neurotransmisores [9]. A pesar de que los efectos de E2 sobre la formación de ED en el SNC han sido más estudiados que los de P4, existen estudios que evalúan el rol solamente de ésta hormona en la formación de ED y concluyen que P4, al igual que E2, tiene un rol significativo en promover la formación de ED [11, 125, 126].

E2 y P4 son hormonas esteroideas cuya función principal radicó por muchos años en regular exclusivamente la expresión de genes del eje reproductivo hipotálamo-hipófisis-gónadas [127]. Sin embargo, desde hace 20 años el conocimiento de sus acciones en otros tejidos y áreas del cerebro comenzó a expandirse luego de la determinación de la expresión de los receptores de E2 y P4 en diversas áreas del SNC [128-130]. Los receptores clásicos de E2, alfa ( $ER\alpha$ ) y beta ( $ER\beta$ ); y el receptor de progesterona (PR), pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares de hormonas esteroideas. Los mismos actúan además, en el citoplasma y en la membrana plasmática, ejerciendo las llamadas vías no canónicas de E2 y P4, que incluyen la regulación rápida (no genómica) de vías de señalización implicadas en una variedad de procesos, incluida la reorganización del citoesqueleto de actina [131].

A partir de estos estudios se estableció que E2 y P4 ejercen funciones no solamente referidas al desarrollo sexual, sino también implicadas en el desarrollo de circuitos neuronales, neuroprotección, sinaptogénesis, aprendizaje, memoria y regulación de la morfología neuronal [132]. En esta tesis se evaluó el efecto de ambas hormonas en la formación de ED, proceso clave en la plasticidad neuronal.

Determinamos que E2 y P4 incrementan la fosforilación de proteínas clave del citoesqueleto actínico y el número de ED, con una intensidad similar. Esta modificación en la morfología de las dendritas producido, por ambas hormonas, es de vital importancia. La formación de nuevas ED en respuesta a señales externas se considera la base de los procesos de plasticidad estructural [133]. Una vez que se forman nuevas ED, esto posibilita la formación de nuevas sinapsis [133]. Tales fenómenos son la base de la formación de memoria a largo plazo, y por lo tanto constituye un aspecto vital del aprendizaje y la memoria [134].

Para el desarrollo de este trabajo partimos del antecedente previo que determinó que E2 y P4, a través de sus receptores, producen la fosforilación/activación de Src y FAK, mediante las subunidades de proteína G,  $G\alpha 1$  y  $G\beta 1$  [17, 18], desencadenando una señalización en dirección a los reguladores actínicos. Con el fin de profundizar los efectos de las hormonas en la formación de ED, evaluamos si las fosforilaciones de PP2A, WAVE1 y Arp2 fueron mediadas por los receptores, resultados que a la fecha no han sido reportados por otros grupos de investigación.

Teniendo en cuenta que E2 induce la expresión de PR, separar los efectos de progesterona de los estrógenos resulta difícil. Razón por la cual, a la fecha pocos son los estudios que abordan los efectos de progesterona sobre distintos procesos neurológicos. Es importante considerar el efecto de ambas por separado, teniendo en cuenta que no siempre actúan de la misma

manera. Contamos con el antecedente previo de nuestro grupo, donde se demostró que un tratamiento combinado incrementa la densidad dendrítica de la misma forma que el tratamiento con las hormonas por separado [17, 18]. En este caso, el efecto de ambas fue similar (nunca se obtuvo una diferencia significativa entre ambos tratamientos, en todos los experimentos realizados). Teniendo en cuenta esto, sugerimos que cada una ejerce su efecto a través de su receptor específico, de manera independiente, activando las mismas vías de señalización para modificar la densidad dendrítica en cuestión de pocos minutos. Se ha reportado que tanto ER como PR poseen dominios de unión a Src [135, 136], quinasa integradora de señales clave en este estudio. Pudiendo ser ésta proteína el punto de partida donde ambas señales convergen.

Varios estudios han investigado el rol de diferentes morfologías de ED y las han asociado con propiedades funcionales [137]. En este trabajo hemos observado que los tratamientos con E2 y P4 incrementan el número de ED finas (*thin spines*) en cuestión de minutos, mientras que el número de las espinas fungiformes y pequeñas permanece sin cambios. Las espinas finas tienen entre 1 y 2  $\mu\text{m}$  de largo y son altamente dinámicas, pueden retraerse o expandirse al cabo de minutos de ser estimuladas [138]. Debido a esto, este tipo de espinas son consideradas un fenotipo transitorio, y un buen sustrato para transformarse en espinas maduras luego de incrementar los inputs sinápticos [138, 139]. Además al evaluar la expresión de los marcadores pre y pos sinápticos, Sinaptofisina y PSD-95 respectivamente, se observó que ambas hormonas inducen el incremento de Sinaptofisina y PSD-95 en las espinas, sugiriendo que podrían tener una importante implicancia en el desarrollo de sinapsis. Estos resultados concuerdan con estudios previos [140-142], que además evalúan los efectos de las hormonas sobre el desarrollo de la memoria y el aprendizaje, apoyando la hipótesis de que poseen un rol fundamental en el desarrollo cognitivo del SNC.

La expresión de los receptores de E2 y P4 en la corteza cerebral indicó nuevos sitios para la acción de estas hormonas en el corteza cerebral [143-145]. A partir de ese descubrimiento el estudio de los mecanismos por el cuales el estrógeno y la progesterona pueden regular aspectos de la cognición en la corteza comenzó su camino y ha logrado avances significativos desde entonces [144, 146, 147]. Teniendo en cuenta estos datos, existe evidencia acumulada que sugiere que E2 influye en varias formas de aprendizaje y memoria en la corteza, sin embargo los mecanismos intracelulares que regulan éstos procesos son escasos en comparación con los estudios realizados en hipocampo. Es por ello que nuestros estudios fueron realizados en neuronas obtenidas de corteza cerebral. Creemos que los mecanismos descritos en este estudio pueden ser similares a lo que suceden en el hipocampo, teniendo

en cuenta que ambas regiones del cerebro son esenciales para tipos similares de aprendizaje y memoria, y la acumulación de evidencia sugiere una conexión funcional entre los dos [148, 149]. Por ejemplo, Tuscher y colaboradores determinaron que la administración local de E2 en el hipocampo de ratas ovariectomizadas no tuvo efecto sobre la densidad de las espinas dendríticas en dicha área, pero sí aumento de la densidad de las ED basales en la corteza prefrontal media, dos horas después [150], sugiriendo que la regulación estrogénica del hipocampo influye en la morfología dendrítica de la corteza prefrontal. Además la formación de ED inducida por E2 en la corteza prefrontal media fue dependiente de la activación de las proteínas ERK y mTOR en el hipocampo dorsal [150]. Estos datos sugieren la posibilidad de que el hipocampo y la corteza prefrontal media funcionen de manera complementaria para mediar los efectos de E2 en la memoria en el hipocampo dorsal.

#### *E2 y P4 sobre vías de señalización de regulación actínica*

- *Integradores de señales y GTPasas*

La participación de Src y FAK en vías de señalización rápidas moduladas por esteroides ha sido previamente evaluada, teniendo en cuenta que son dos quinasas con mayor relevancia en el desarrollo de distintos tipos de cáncer [151, 152]. Sin embargo, el rol de ambas en la regulación de la plasticidad neuronal es un punto importante de investigación debido a que ambas están implicadas en el desarrollo de patologías neuronales [40, 153]. En este trabajo se determinó que Src y FAK son quinasas corriente arriba en la señalización de E2 y P4 hacia la formación de ED, mediadas por WAVE1 y Cortactina en neuronas corticales.

Luego de su activación, el complejo Src-FAK posee un rol fundamental como integrador de señal en los procesos de plasticidad sináptica en cultivos primarios de neuronas de corteza de ratas embrionarias y esto radica en dos hechos, uno de ellos es recibir la señal inicial a través de los receptores de E2 y P4, vía de señalización que previamente fue elucidado por nuestro laboratorio. Tras la interacción de las hormonas con sus respectivos receptores, estos provocan la activación de Src (con la consecuente activación de FAK), de manera dependiente de las pequeñas subunidades de proteínas G,  $G\alpha_1/G\beta_1$  [17, 18]. Otros trabajos además soportan esta hipótesis en neuronas de hipocampo [38, 39]. El segundo hecho es la amplia variedad de sustratos que poseen y que están vinculados a la remodelación de citoesqueleto de actina [154, 155]. En este trabajo, la inhibición de Src y FAK impidió el aumento de la densidad de ED, mediado por E2 y P4, junto con la fosforilación de FAK y paxilina. Paxilina es un punto importante de convergencia de señales que provienen de la estimulación de varias clases de receptores. Tras ser fosforilada en Y118, por Src y FAK, se crean sitios de unión corriente abajo para moléculas efectoras que regula la maquinaria actínica [156]. En este

trabajo comprobamos que el silenciamiento de paxilina con su siRNA específico impide la formación dendrítica y la fosforilación de Rac1 en neuronas de corteza. El mecanismo por el cual paxilina recluta a Rac1, queda aún por determinarse.

Rac1 es una molécula fundamental para el desarrollo de las ED. Se han reportado numerosas patologías neurológicas que implican una desregulación en la actividad de Rac1 afectando la formación de ED [44]. Entre sus proteínas efectoras evaluamos la participación de PAK1. PAK1 es reclutada y activada por Rac1 y esto regula la polimerización actínica en la formación de distintas estructuras celulares, incluida la formación de ED [56]. Se ha reportado que en líneas celulares neuronales como PC12, la activación de ésta proteína conduce a la formación de neuritas polarizadas, fenómeno que fue impedido tras la expresión de un constructo dominante negativo de Rac1 [157]. De manera similar, en nuestro trabajo la expresión de este constructo impidió la activación de PAK1, y esto disminuyó la formación de ED. Además, los autores señalan que la actividad quinasa de PAK1 no es necesaria para el desarrollo de las neuritas, tras expresar en las células un mutante dominante negativo de PAK1. Sin embargo, en este trabajo, el uso de IPA-3 (inhibidor específico de PAK1), impidió la fosforilación de activación de PAK1<sup>T423</sup> y la formación de ED dependiente de E2 y P4, indicando que la actividad quinasa de PAK1 si es necesaria para la formación de ED.

Estos resultados contribuyen a descifrar los mecanismos moleculares de estas proteínas en su rol como reguladores actínicos en procesos de plasticidad sináptica mediada por E2 y P4 en neuronas de corteza cerebral.

- *Switch quinasa/fosfatasa*

La fosforilación de proteínas es una modificación post-transduccional de las más relevantes para regular vías de señalización. En un estado basal, existe un equilibrio entre el nivel de una proteína y su forma fosforilada. Las señales extracelulares pueden regular la actividad de proteínas quinasas y fosfatasas y así alterar el balance entre una forma y otra. De esta manera, estas enzimas prenden y apagan las vías de señalización funcionando como interruptores moleculares con el fin de mantener un balance adecuado en los procesos que regulan [158]. Teniendo en cuenta esto, describimos por primera vez que E2 y P4 controlan la fosforilación de WAVE1 mediante el interruptor molecular Cdk5 quinasa/PP2A fosfatasa.

PP2A es una de las principales fosfatasas presentes en las células con importantes implicaciones para la salud humana. Las deficiencias en su actividad fosfatasa tienen severas consecuencias fisiológicas debido al desbalance en el estado de fosforilación de las proteínas, incluida ella misma [159]. Por ejemplo, tanto la inhibición como la hiperfosforilación de

PP2A<sup>Y307</sup> se han correlacionado con la hiperfosforilación de la proteína Tau presente en la enfermedad de Alzheimer [100]. Aquí describimos por primera vez que el estradiol y la progesterona incrementan rápidamente la fosforilación de PP2A<sup>Y307</sup> junto con la de WAVE1 y la formación de ED. Además, la expresión de los mutantes DN y CA de PP2A en las neuronas permitió confirmar que la fosforilación de PP2A<sup>Y307</sup> es clave para la formación de ED mediada por E2/P4. Existen otros estudios que han indagado el rol de PP2A en la formación de ED. Li, D. y colaboradores han demostrado que PP2A es necesaria para la formación de ED en neuronas del cuerpo estriado a través de la interacción de la subunidad B de PP2A con la proteína striatin-1 [160]. En neuronas de hipocampo, la interacción entre PP2A con striatin-4 incrementan el número de espinas con morfología fungiforme [101]. Finalmente, Liu X. y colaboradores han determinado que PP2A interactúa con la proteína PRG-1 en los sitios de densidad postsináptica para modular no solo la plasticidad sináptica, sino también para producir el reclutamiento de proteínas de adhesión focal tales como Src y Paxilina [43]. Aquí, hemos determinado que E2 y P4 reducen la actividad PP2A a través de la quinasa Src, lo que lleva a un aumento en la fosforilación de WAVE1 y, por lo tanto, la formación de DS. Esto concuerda con estudios previos que vinculan a PP2A con la familia de las quinasas Src [2, 3].

- *Factores promotores de la nucleación actínica*

Estudios previos han indicado que E2 incrementa el número de ED en neuronas corticales al activar vías de señalización que involucran a las proteínas MAPK, PI3K/Akt y PKC [161]. En este trabajo, utilizando inhibidores específicos y a través de ensayos de ganancia o pérdida de función, con siRNAs y/o plásmidos DN o CA, evaluamos el efecto de E2 y P4 en la formación de ED investigando a los factores promotores de la nucleación WAVE1 y Cortactina.

**WAVE1.** Esta proteína actúa como un link entre la actividad de Rac1 y la polimerización actínica, produciendo cambios morfológicos responsables de la plasticidad sináptica en neuronas del hipocampo y la corteza cerebral [162]. La regulación de la fosforilación y desfosforilación de WAVE1 se volvió de gran interés debido a la rápida y efectiva manera de regular procesos casi instantáneos como la formación de nuevas ED. En este estudio analizamos este fenómeno interfiriendo el accionar de Cdk5 y PP2A, ambas responsables de la fosforilación y desfosforilación de WAVE1, respectivamente.

**Cortactina.** Aquí describimos que cortactina interactúa con Arp3 en neuronas corticales y que E2 y P4 rompen esta interacción, provocando un aumento en la fosforilación de Arp2. En este punto hipotetizamos que la fosforilación de Arp2 puede romper la asociación entre Arp3 y cortactina, lo que produce la estabilización de los nuevos filamentos de actina. Este resultado



concuera con el trabajo de Wang y col., que describieron que la fosforilación en residuos de tirosina de cortactina puede ocasionar la ruptura entre ella y FAK, para promover la migración celular [32]. Este resultado también concuerda con nuestro trabajo previo, donde describimos que la hormona T3 causa la disociación entre FAK e integrina  $\alpha V/\beta 3$ , luego de la fosforilación de FAK y su traslocación hacia la membrana de células de cáncer de mama [33]. En este sentido, previamente Weaver y col. demostraron que cortactina compite con N-WASP por el mismo sitio de unión a Arp3 y es capaz de unirse a esta subunidad [102]. N-WASP es miembro de la familia de proteínas WASP junto con WAVE1, ambas comparten en su región C-terminal el dominio VCA necesario para la activación de Arp2/3 [82]. Aunque cortactina y N-WASP pueden unirse al complejo Arp2/3 a través de Arp3, ambas proteínas por separado regulan la nucleación actínica activándolo [102]. En este trabajo, observamos que al bloquear la activación de WAVE1 y de cortactina, la fosforilación de Arp2 es baja, pero ni la de WAVE1 o la de cortactina resultan afectadas por la inhibición de la otra proteína. Esto sugiere que, de manera independiente, ambas pueden regular al complejo Arp2/3, pero ambas son necesarias para completar totalmente la activación del complejo Arp2/3. La sobreexpresión de cortactina en interneuronas (que carecen de ED) produce la formación de ED en éstas células, esto implicaría que cortactina tiene una fuerte capacidad de nucleación actínica [163]. Para intentar explicar esto, Head y col. determinaron que la pequeña GTPasa Rac1 induce la fosforilación de cortactina y su redistribución hacia las redes de actina cortical donde regula su funcionamiento [164]. En este trabajo, observamos que la expresión de un mutante no fosforilable de cortactina impidió el incremento del número de ED, cuando las neuronas fueron tratadas con E2 o P4. Esto concuerda con estudios previos donde se ha determinado la presencia de cortactina fosforilada dentro de las ED, donde recluta importantes moduladores actínicos e incrementa la densidad dendrítica [163, 165]. También, cortactina regula la formación de ED a través de la interacción con reguladores de Rac1. Ueda y col. reportaron que cortactina interactúa con un intercambiador de guanina de Rac1 para promover la formación de ED [166].

**Complejo Arp2/3.** Previamente, habíamos determinado que E2 y P4 son capaces estimular la formación de ED [17, 18]. En este trabajo reforzamos esos resultados indagando más en la vía de señalización bajo estudio, demostrando que E2 y P4 conducen una señalización hacia la activación del complejo Arp2/3, a través de la fosforilación específica de la subunidad predominante Arp2. Ésta fosforilación es necesaria para la polimerización de la actina, aunque no suficiente, debido a que también se requiere la intervención de WAVE1 y cortactin [122].

*E2 y P4, implicancia en enfermedades neurodegenerativas.*

Las hormonas pueden producir cambios morfológicos en las ED que pueden tener marcados efectos en la función sináptica, en su plasticidad y en los patrones de conectividad de los circuitos neuronales [32]. Las alteraciones en la forma, en el tamaño y/o en el número de ED son un rasgo común de ciertas patologías cerebrales como la demencia, el autismo y la esquizofrenia. Esto sugiere que las ED podrían servir como un sustrato común de varios desordenes neuropsiquiátricos, particularmente aquellos que presentan déficits en el procesamiento de información en un contexto de bajos niveles hormonales [13]. Por ejemplo, la pérdida de esteroides sexuales relacionada con la edad constituye un factor de riesgo para el Alzheimer, tanto en hombres como en mujeres [167]. Tanto E2 como P4 ejercen importantes funciones neuroprotectoras y cognitivas [168]. Por ejemplo, en ratas ovariectomizadas la administración de E2 o de los moduladores selectivos del receptor de estrógenos, luego de una isquemia cerebral, previene la pérdida de ED en la corteza e incrementa la memoria de trabajo [169, 170]. En este trabajo, mostramos que E2/P4 modulan la actividad de importantes reguladores del citoesqueleto, controlando así la morfología y el número de ED, vitales para un correcto mantenimiento de los circuitos del SNC. Ratones knock-out para WAVE1 exhiben pérdida de memoria y aprendizaje [86]. Por otro lado, en muestras postmortem de pacientes con esquizofrenia se ha descrito una baja expresión de cortactina [171]. Además, recientemente se ha reportado que la pérdida de actividad de Arp2/3 en neuronas excitatorias de la corteza produce una plasticidad sináptica asimétrica de las ED, llevando a una pérdida progresiva de sinapsis [64]. Estos estudios sugieren que las irregularidades que convergen en la nucleación actínica mediada por el complejo Arp2/3, podrían explicar la etiología de desórdenes neurodegenerativos que afectan la cognición cuando ocurre una pérdida de estrógenos y progestágenos. Estudios clínicos sugieren que la falta o modificaciones en los niveles de estrógenos y/o progestágenos, como en mujeres post-menopáusicas, pueden estar relacionado en la progresión de enfermedades neurodegenerativas, como la demencia, Alzheimer o la enfermedad de Parkinson [12, 172-174], y actualmente existe la hipótesis de que la terapia hormonal sustitutiva a mujeres post-menopáusicas puede reducir la progresión de estas enfermedades, sin embargo no existe un consenso aún en la comunidad científica sobre este punto [175].

Aunque la edad es el mayor factor de riesgo en la enfermedad de Alzheimer, las mujeres tienen un riesgo sustancialmente mayor que los hombres en desarrollar dicha enfermedad [176]. Esta particularidad se ve reflejada tras el período menopáusico. La menopausia marca la senescencia reproductiva en las mujeres y se caracteriza por una pérdida del ciclo menstrual y alteraciones hormonales significativas, incluidos aumentos dramáticos en la secreción de

gonadotropinas y una disminución de los niveles circulantes de estrógeno y progesterona, que resultan del envejecimiento ovárico e hipotalámico [176]. En particular, este trabajo de investigación y los discutidos en esta sección, indican que las hormonas ováricas resultan ser factores tróficos importantes para las neuronas en las regiones de cerebro como el hipocampo y la corteza. Por esta razón, determinar los mecanismos puntuales por los cuales la ausencia de E2 y P4 afecta la función cerebral en el envejecimiento, permitiría comprender con más profundidad por qué las mujeres tienen un mayor riesgo de desarrollar Alzheimer que los hombres. De esta forma se podrían abordar terapias con nuevos enfoques que estudien estos hechos, tal vez con un enfoque en los mecanismos moleculares que regulan estas hormonas.

*A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se consideran los siguientes aspectos como perspectivas futuras de investigación*

A medida que las investigaciones profundizan sobre los mecanismos moleculares que subyacen a la disfunción cognitiva en enfermedades neurodegenerativas, el escenario para implementar nuevos enfoques terapéuticos crece. Estos enfoques podrían proporcionar oportunidades únicas para el desarrollo de terapias que reduzcan de manera más efectiva la disfunción cognitiva. Teniendo en cuenta que las terapias de reemplazo hormonal para restablecer los niveles de hormonas en la menopausia siguen siendo motivo de discusión por sus efectos adversos (aumento en la incidencia de cáncer de mama y endometrio), es necesario desarrollar nuevos enfoques. Los mismos podrían apuntar a la regulación de la actividad de las proteínas involucradas en los procesos de plasticidad sináptica. Por ejemplo, la modulación de los niveles de actividad de la quinasa PI3K (que regula vías de neuroprotección a nivel cerebral) tras la administración de Fasudil®, un inhibidor específico de la quinasa ROCK que fosforila a PI3K, restaura la memoria de ratas en un modelo de Alzheimer [177]. Otro ejemplo lo constituye Fingolimod® (FTY720), un modulador de receptores de esfingosina, que incrementa los niveles del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) regulando la vía de señalización de los receptores TrKB. El uso de este compuesto incrementa la plasticidad sináptica y la memoria de ratones en un modelo de la enfermedad de Huntington [178].

Estos antecedentes plantean como hipótesis que el uso de moduladores de la actividad de proteínas claves en procesos de plasticidad sináptica podrían constituir una herramienta útil para el tratamiento de ciertos desordenes neurológicos que afecten la memoria y cognición de los individuos. En este trabajo se describió que existe una regulación por parte de las hormonas E2 y P4 sobre el *switch* molecular Cdk5/PP2A que regulan la actividad de WAVE1 fundamental para la nucleación actínica y formación de ED, el cual puede ser un punto de

partida interesante considerando que la droga Fingolimod® (actualmente utilizada para el tratamiento de la esclerosis múltiple), es capaz de modular la actividad de PP2A, sin embargo los mecanismos precisos de esto aún permanecen sin dilucidar.

-

## **5.2 CONCLUSIONES**

En conclusión este trabajo resalta los mecanismos moleculares de la acción de E2 y P4 en la formación de ED a través de la regulación de vías de señalización mediadas por importantes reguladores actínicos.

- Un estímulo rápido con E2 y P4 induce la fosforilación de las proteínas Src, FAK, paxilina, Rac1, PAK1, Cdk5/PP2A-WAVE1, cortactina y Arp2, todas ellas, involucradas en la formación de ED en neuronas corticales. Dicho evento es dependiente de los receptores E2/ER y P4/PR.
- La inhibición de las quinasas Src y FAK impide la fosforilación de paxilina y la formación de ED dependiente de E2 y P4.
- El silenciamiento de paxilina con su siRNA impide la fosforilación de Rac1 y la formación de ED dependiente de E2 y P4.
- La expresión de un dominante negativo de Rac1 impide la fosforilación de PAK1 y la formación de ED dependiente de E2 y P4. La inhibición de PAK1 impide la formación de ED mediada por E2 y P4.
- La fosforilación y desfosforilación de WAVE1 en Ser397 es regulada por Cdk5 y PP2A, así como también la formación de ED dependiente de E2 y P4.
- E2 y P4 inducen la fosforilación de cortactina e incrementan su localización en las ED.
- E2 y con P4 ocasionan una disminución en la interacción de cortactina con la subunidad Arp3 e incrementan la fosforilación de Arp2, para lo cual es necesaria la fosforilación de cortactina.
- La señalización de E2 y P4 converge en la activación de Arp2/3 mediada por WAVE1, cortactina y la fosforilación de la subunidad Arp2 del complejo.

*Estos eventos no solo resaltan la importancia de una transducción de señales rápida y eficiente, sino también la intervención clave de las hormonas E2 y P4 como potentes activadores del citoesqueleto de actina en neuronas corticales permitiendo la formación de ED y por lo tanto regulando la plasticidad sináptica.*

## CAPÍTULO 6. REFERENCIAS

1. Simerly, R.B., *Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain*. Annu Rev Neurosci, 2002. **25**: p. 507-36.
2. Hojo, Y., et al., *Estrogen synthesis in the brain--role in synaptic plasticity and memory*. Mol Cell Endocrinol, 2008. **290**(1-2): p. 31-43.
3. Citri, A. and R.C. Malenka, *Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms*. Neuropsychopharmacology, 2008. **33**(1): p. 18-41.
4. Castren, E. and R. Hen, *Neuronal plasticity and antidepressant actions*. Trends Neurosci, 2013. **36**(5): p. 259-67.
5. Skaper, S.D., et al., *Synaptic Plasticity, Dementia and Alzheimer Disease*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2017. **16**(3): p. 220-233.
6. Sweatt, J.D., *Neural plasticity and behavior - sixty years of conceptual advances*. J Neurochem, 2016. **139** Suppl 2: p. 179-199.
7. Herms, J. and M.M. Dorostkar, *Dendritic Spine Pathology in Neurodegenerative Diseases*. Annu Rev Pathol, 2016. **11**: p. 221-50.
8. Mahmoud, R., S.R. Wainwright, and L.A. Galea, *Sex hormones and adult hippocampal neurogenesis: Regulation, implications, and potential mechanisms*. Front Neuroendocrinol, 2016. **41**: p. 129-52.
9. Hansberg-Pastor, V., et al., *Sex Hormones Regulate Cytoskeletal Proteins Involved in Brain Plasticity*. Front Psychiatry, 2015. **6**: p. 165.
10. Matus, A., *Actin-based plasticity in dendritic spines*. Science, 2000. **290**(5492): p. 754-8.
11. Woolley, C.S. and B.S. McEwen, *Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat*. J Comp Neurol, 1993. **336**(2): p. 293-306.
12. Sherwin, B.B. and J.F. Henry, *Brain aging modulates the neuroprotective effects of estrogen on selective aspects of cognition in women: a critical review*. Front Neuroendocrinol, 2008. **29**(1): p. 88-113.
13. Penzes, P., et al., *Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders*. Nat Neurosci, 2011. **14**(3): p. 285-93.
14. Sanchez, A.M., et al., *Actin cytoskeleton remodeling by sex steroids in neurones*. J Neuroendocrinol, 2012. **24**(1): p. 195-201.
15. Arevalo, M.A., et al., *Signaling mechanisms mediating the regulation of synaptic plasticity and memory by estradiol*. Horm Behav, 2015. **74**: p. 19-27.
16. Hering, H. and M. Sheng, *Dendritic spines: structure, dynamics and regulation*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(12): p. 880-8.
17. Sanchez, A.M., et al., *Rapid signaling of estrogen to WAVE1 and moesin controls neuronal spine formation via the actin cytoskeleton*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(8): p. 1193-202.
18. Sanchez, A.M., et al., *Effects of progesterone and medroxyprogesterone on actin remodeling and neuronal spine formation*. Mol Endocrinol, 2013. **27**(4): p. 693-702.
19. Yuste, R., *The discovery of dendritic spines by Cajal*. Front Neuroanat, 2015. **9**: p. 18.
20. van der Zee, E.A., *Synapses, spines and kinases in mammalian learning and memory, and the impact of aging*. Neurosci Biobehav Rev, 2015. **50**: p. 77-85.
21. Hotulainen, P. and C.C. Hoogenraad, *Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function*. J Cell Biol, 2010. **189**(4): p. 619-29.
22. Risher, W.C., et al., *Rapid Golgi analysis method for efficient and unbiased classification of dendritic spines*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e107591.

23. Sorra, K.E. and K.M. Harris, *Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines*. *Hippocampus*, 2000. **10**(5): p. 501-11.
24. Pollard, T.D., *Actin and Actin-Binding Proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016. **8**(8).
25. Dent, E.W., E.B. Merriam, and X. Hu, *The dynamic cytoskeleton: backbone of dendritic spine plasticity*. *Curr Opin Neurobiol*, 2011. **21**(1): p. 175-81.
26. Frankfurt, M. and V. Luine, *The evolving role of dendritic spines and memory: Interaction(s) with estradiol*. *Horm Behav*, 2015. **74**: p. 28-36.
27. Stiles, J. and T.L. Jernigan, *The basics of brain development*. *Neuropsychol Rev*, 2010. **20**(4): p. 327-48.
28. Riccomagno, M.M. and A.L. Kolodkin, *Sculpting neural circuits by axon and dendrite pruning*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2015. **31**: p. 779-805.
29. Basu, S. and R. Lamprecht, *The Role of Actin Cytoskeleton in Dendritic Spines in the Maintenance of Long-Term Memory*. *Front Mol Neurosci*, 2018. **11**: p. 143.
30. Colin, A., et al., *Triggering signaling pathways using F-actin self-organization*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 34657.
31. Korobova, F. and T. Svitkina, *Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis*. *Mol Biol Cell*, 2010. **21**(1): p. 165-76.
32. Sala, C. and M. Segal, *Dendritic spines: the locus of structural and functional plasticity*. *Physiol Rev*, 2014. **94**(1): p. 141-88.
33. Bertling, E. and P. Hotulainen, *New waves in dendritic spine actin cytoskeleton: From branches and bundles to rings, from actin binding proteins to post-translational modifications*. *Mol Cell Neurosci*, 2017. **84**: p. 77-84.
34. Steffen, A., T.E. Stradal, and K. Rottner, *Signalling Pathways Controlling Cellular Actin Organization*. *Handb Exp Pharmacol*, 2017. **235**: p. 153-178.
35. Bolognin, S., et al., *The potential role of rho GTPases in Alzheimer's disease pathogenesis*. *Mol Neurobiol*, 2014. **50**(2): p. 406-22.
36. Roskoski, R., Jr., *Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors*. *Pharmacol Res*, 2015. **94**: p. 9-25.
37. Kleinschmidt, E.G. and D.D. Schlaepfer, *Focal adhesion kinase signaling in unexpected places*. *Curr Opin Cell Biol*, 2017. **45**: p. 24-30.
38. Soma, M., et al., *Src Kinase Dependent Rapid Non-genomic Modulation of Hippocampal Spinogenesis Induced by Androgen and Estrogen*. *Front Neurosci*, 2018. **12**: p. 282.
39. Shin, M.S., et al., *Src-mediated phosphorylation of betaPix-b regulates dendritic spine morphogenesis*. *J Cell Sci*, 2019. **132**(5).
40. Armendariz, B.G., et al., *The diverse roles and multiple forms of focal adhesion kinase in brain*. *Eur J Neurosci*, 2014. **40**(11): p. 3573-90.
41. Lopez-Colome, A.M., et al., *Paxillin: a crossroad in pathological cell migration*. *J Hematol Oncol*, 2017. **10**(1): p. 50.
42. Moeller, M.L., et al., *EphB receptors regulate dendritic spine morphogenesis through the recruitment/phosphorylation of focal adhesion kinase and RhoA activation*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(3): p. 1587-98.
43. Liu, X., et al., *PRG-1 Regulates Synaptic Plasticity via Intracellular PP2A/beta1-Integrin Signaling*. *Dev Cell*, 2016. **38**(3): p. 275-90.
44. Payapilly, A. and A. Malliri, *Compartmentalisation of RAC1 signalling*. *Curr Opin Cell Biol*, 2018. **54**: p. 50-56.
45. Schwarz, J., et al., *Serine-71 phosphorylation of Rac1 modulates downstream signaling*. *PLoS One*, 2012. **7**(9): p. e44358.
46. Raynaud, F., et al., *Rho-GTPase-activating protein interacting with Cdc-42-interacting protein 4 homolog 2 (Rich2): a new Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1)*

- GTPase-activating protein that controls dendritic spine morphogenesis.* J Biol Chem, 2014. **289**(5): p. 2600-9.
47. Duffney, L.J., et al., *Shank3 deficiency induces NMDA receptor hypofunction via an actin-dependent mechanism.* J Neurosci, 2013. **33**(40): p. 15767-78.
  48. Pennucci, R., I. Gucciardi, and I. de Curtis, *Rac1 and Rac3 GTPases differently influence the morphological maturation of dendritic spines in hippocampal neurons.* PLoS One, 2019. **14**(8): p. e0220496.
  49. Shah, K. and S. Rossie, *Tale of the Good and the Bad Cdk5: Remodeling of the Actin Cytoskeleton in the Brain.* Mol Neurobiol, 2018. **55**(4): p. 3426-3438.
  50. Zukerberg, L.R., et al., *Cables links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth.* Neuron, 2000. **26**(3): p. 633-46.
  51. Kim, Y., et al., *Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology.* Nature, 2006. **442**(7104): p. 814-7.
  52. Sanchez, A.M. and T. Simoncini, *Extra-nuclear signaling of ERalpha to the actin cytoskeleton in the central nervous system.* Steroids, 2010. **75**(8-9): p. 528-32.
  53. Mita, N., et al., *Cyclin-Dependent Kinase 5 Regulates Dendritic Spine Formation and Maintenance of Cortical Neuron in the Mouse Brain.* Cereb Cortex, 2016. **26**(3): p. 967-976.
  54. Li, M.X., et al., *Role of Cdk5 in Kalirin7-Mediated Formation of Dendritic Spines.* Neurochem Res, 2019. **44**(5): p. 1243-1251.
  55. Semenova, G. and J. Chernoff, *Targeting PAK1.* Biochem Soc Trans, 2017. **45**(1): p. 79-88.
  56. Hayashi, K., T. Ohshima, and K. Mikoshiba, *Pak1 is involved in dendrite initiation as a downstream effector of Rac1 in cortical neurons.* Mol Cell Neurosci, 2002. **20**(4): p. 579-94.
  57. Soderling, S.H., et al., *A WAVE-1 and WRP signaling complex regulates spine density, synaptic plasticity, and memory.* J Neurosci, 2007. **27**(2): p. 355-65.
  58. Chen, Y., et al., *Restoring striatal WAVE-1 improves maze exploration performance of GluN1 knockdown mice.* PLoS One, 2018. **13**(10): p. e0199341.
  59. Chen, Y.K. and Y.P. Hsueh, *Cortactin-binding protein 2 modulates the mobility of cortactin and regulates dendritic spine formation and maintenance.* J Neurosci, 2012. **32**(3): p. 1043-55.
  60. Lin, Y.C., M.F. Yeckel, and A.J. Koleske, *Abl2/Arg controls dendritic spine and dendrite arbor stability via distinct cytoskeletal control pathways.* J Neurosci, 2013. **33**(5): p. 1846-57.
  61. Rotty, J.D., C. Wu, and J.E. Bear, *New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(1): p. 7-12.
  62. Chanez-Paredes, S., A. Montoya-Garcia, and M. Schnoor, *Cellular and pathophysiological consequences of Arp2/3 complex inhibition: role of inhibitory proteins and pharmacological compounds.* Cell Mol Life Sci, 2019. **76**(17): p. 3349-3361.
  63. Narayanan, A., et al., *Phosphorylation of the Arp2 subunit relieves auto-inhibitory interactions for Arp2/3 complex activation.* PLoS Comput Biol, 2011. **7**(11): p. e1002226.
  64. Kim, I.H., et al., *Disruption of Arp2/3 results in asymmetric structural plasticity of dendritic spines and progressive synaptic and behavioral abnormalities.* J Neurosci, 2013. **33**(14): p. 6081-92.
  65. Wegner, A.M., et al., *N-wasp and the arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses.* J Biol Chem, 2008. **283**(23): p. 15912-20.



66. Datta, D., et al., *Altered Expression of ARP2/3 Complex Signaling Pathway Genes in Prefrontal Layer 3 Pyramidal Cells in Schizophrenia*. *Am J Psychiatry*, 2017. **174**(2): p. 163-171.
67. Tapial Martinez, P., P. Lopez Navajas, and D. Lietha, *FAK Structure and Regulation by Membrane Interactions and Force in Focal Adhesions*. *Biomolecules*, 2020. **10**(2).
68. Kopetz, S., A.N. Shah, and G.E. Gallick, *Src continues aging: current and future clinical directions*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(24): p. 7232-6.
69. Lv, P.C., et al., *FAK inhibitors in Cancer, a patent review*. *Expert Opin Ther Pat*, 2018. **28**(2): p. 139-145.
70. Horton, E.R., et al., *Modulation of FAK and Src adhesion signaling occurs independently of adhesion complex composition*. *J Cell Biol*, 2016. **212**(3): p. 349-64.
71. Rashid, M., et al., *Neural-specific deletion of the focal adhesion adaptor protein paxillin slows migration speed and delays cortical layer formation*. *Development*, 2017. **144**(21): p. 4002-4014.
72. Turner, C.E., et al., *Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling*. *J Cell Biol*, 1999. **145**(4): p. 851-63.
73. de Curtis, I., *Functions of Rac GTPases during neuronal development*. *Dev Neurosci*, 2008. **30**(1-3): p. 47-58.
74. Wang, J.T., et al., *Src controls neuronal migration by regulating the activity of FAK and cofilin*. *Neuroscience*, 2015. **292**: p. 90-100.
75. Monje, F.J., et al., *Focal adhesion kinase regulates neuronal growth, synaptic plasticity and hippocampus-dependent spatial learning and memory*. *Neurosignals*, 2012. **20**(1): p. 1-14.
76. Watanabe, F., et al., *Effects of FAK ablation on cerebellar foliation, Bergmann glia positioning and climbing fiber territory on Purkinje cells*. *Eur J Neurosci*, 2008. **27**(4): p. 836-54.
77. Ivankovic-Dikic, I., et al., *Pyk2 and FAK regulate neurite outgrowth induced by growth factors and integrins*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(9): p. 574-81.
78. He, Y., et al., *Src and cortactin promote lamellipodia protrusion and filopodia formation and stability in growth cones*. *Mol Biol Cell*, 2015. **26**(18): p. 3229-44.
79. Shi, Y., et al., *Focal adhesion kinase acts downstream of EphB receptors to maintain mature dendritic spines by regulating cofilin activity*. *J Neurosci*, 2009. **29**(25): p. 8129-42.
80. Takenawa, T. and S. Suetsugu, *The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(1): p. 37-48.
81. Burianek, L.E. and S.H. Soderling, *Under lock and key: spatiotemporal regulation of WASP family proteins coordinates separate dynamic cellular processes*. *Semin Cell Dev Biol*, 2013. **24**(4): p. 258-66.
82. Alekhina, O., E. Burstein, and D.D. Billadeau, *Cellular functions of WASP family proteins at a glance*. *J Cell Sci*, 2017. **130**(14): p. 2235-2241.
83. Carlisle, H.J. and M.B. Kennedy, *Spine architecture and synaptic plasticity*. *Trends Neurosci*, 2005. **28**(4): p. 182-7.
84. Ceglia, I., et al., *Signaling pathways controlling the phosphorylation state of WAVE1, a regulator of actin polymerization*. *J Neurochem*, 2010. **114**(1): p. 182-90.
85. Kurisu, S. and T. Takenawa, *The WASP and WAVE family proteins*. *Genome Biol*, 2009. **10**(6): p. 226.
86. Soderling, S.H., et al., *Loss of WAVE-1 causes sensorimotor retardation and reduced learning and memory in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(4): p. 1723-8.
87. Manning, G., et al., *The protein kinase complement of the human genome*. *Science*, 2002. **298**(5600): p. 1912-34.

88. Wang, Y. and H. Ma, *Protein kinase profiling assays: a technology review*. Drug Discov Today Technol, 2015. **18**: p. 1-8.
89. Chen, M.J., J.E. Dixon, and G. Manning, *Genomics and evolution of protein phosphatases*. Sci Signal, 2017. **10**(474).
90. Sangodkar, J., et al., *All roads lead to PP2A: exploiting the therapeutic potential of this phosphatase*. FEBS J, 2016. **283**(6): p. 1004-24.
91. Malumbres, M., *Cyclin-dependent kinases*. Genome Biol, 2014. **15**(6): p. 122.
92. Hellmich, M.R., et al., *Neuronal cdc2-like kinase: a cdc2-related protein kinase with predominantly neuronal expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(22): p. 10867-71.
93. Kawauchi, T., *Cdk5 regulates multiple cellular events in neural development, function and disease*. Dev Growth Differ, 2014. **56**(5): p. 335-48.
94. Dhavan, R. and L.H. Tsai, *A decade of CDK5*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(10): p. 749-59.
95. Shah, K. and D.K. Lahiri, *Cdk5 activity in the brain - multiple paths of regulation*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 11): p. 2391-400.
96. Fu, W.Y., et al., *Cdk5 regulates EphA4-mediated dendritic spine retraction through an ephexin1-dependent mechanism*. Nat Neurosci, 2007. **10**(1): p. 67-76.
97. Sasaki, Y., et al., *Fyn and Cdk5 mediate semaphorin-3A signaling, which is involved in regulation of dendrite orientation in cerebral cortex*. Neuron, 2002. **35**(5): p. 907-20.
98. Moorhead, G.B., et al., *Evolution of protein phosphatases in plants and animals*. Biochem J, 2009. **417**(2): p. 401-9.
99. Ruvolo, P.P., *The broken "Off" switch in cancer signaling: PP2A as a regulator of tumorigenesis, drug resistance, and immune surveillance*. BBA Clin, 2016. **6**: p. 87-99.
100. Liu, R., et al., *Phosphorylated PP2A (tyrosine 307) is associated with Alzheimer neurofibrillary pathology*. J Cell Mol Med, 2008. **12**(1): p. 241-57.
101. Lin, L., et al., *Determination of dendritic spine morphology by the striatin scaffold protein STRN4 through interaction with the phosphatase PP2A*. J Biol Chem, 2017. **292**(23): p. 9451-9464.
102. Weaver, A.M., et al., *Interaction of cortactin and N-WASp with Arp2/3 complex*. Curr Biol, 2002. **12**(15): p. 1270-8.
103. Helgeson, L.A. and B.J. Nolen, *Mechanism of synergistic activation of Arp2/3 complex by cortactin and N-WASP*. Elife, 2013. **2**: p. e00884.
104. Weaver, A.M., et al., *Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation*. Curr Biol, 2001. **11**(5): p. 370-4.
105. Weed, S.A. and J.T. Parsons, *Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly*. Oncogene, 2001. **20**(44): p. 6418-34.
106. Giretti, M.S. and T. Simoncini, *Rapid regulatory actions of sex steroids on cell movement through the actin cytoskeleton*. Steroids, 2008. **73**(9-10): p. 895-900.
107. Hlushchenko, I., M. Koskinen, and P. Hotulainen, *Dendritic spine actin dynamics in neuronal maturation and synaptic plasticity*. Cytoskeleton (Hoboken), 2016. **73**(9): p. 435-41.
108. Brewer, G.J., *Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons*. J Neurosci Methods, 1997. **71**(2): p. 143-55.
109. Kaech, S. and G. Banker, *Culturing hippocampal neurons*. Nat Protoc, 2006. **1**(5): p. 2406-15.
110. Dotti, C.G., C.A. Sullivan, and G.A. Banker, *The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture*. J Neurosci, 1988. **8**(4): p. 1454-68.
111. McFarlane, S., *Dendritic morphogenesis: building an arbor*. Mol Neurobiol, 2000. **22**(1-3): p. 1-9.
112. Spruston, N., *Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration*. Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(3): p. 206-21.

113. Horton, A.C., J.J. Yi, and M.D. Ehlers, *Cell type-specific dendritic polarity in the absence of spatially organized external cues*. Brain Cell Biol, 2006. **35**(1): p. 29-38.
114. Rodriguez, A., et al., *Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e1997.
115. Shortrede, J.E., et al., *Paxillin, a novel controller in the signaling of estrogen to FAK/N-WASP/Arp2/3 complex in breast cancer cells*. Mol Cell Endocrinol, 2016. **430**: p. 56-67.
116. Chen, J., B.L. Martin, and D.L. Brautigan, *Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation*. Science, 1992. **257**(5074): p. 1261-4.
117. Schnoor, M., T.E. Stradal, and K. Rottner, *Cortactin: Cell Functions of A Multifaceted Actin-Binding Protein*. Trends Cell Biol, 2018. **28**(2): p. 79-98.
118. Weed, S.A., Y. Du, and J.T. Parsons, *Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1*. J Cell Sci, 1998. **111 ( Pt 16)**: p. 2433-43.
119. Uruno, T., et al., *Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(3): p. 259-66.
120. Wang, W., Y. Liu, and K. Liao, *Tyrosine phosphorylation of cortactin by the FAK-Src complex at focal adhesions regulates cell motility*. BMC Cell Biol, 2011. **12**: p. 49.
121. Flamini, M.I., et al., *Thyroid Hormone Controls Breast Cancer Cell Movement via Integrin alphaV/beta3/SRC/FAK/PI3-Kinases*. Horm Cancer, 2017. **8**(1): p. 16-27.
122. LeClaire, L.L., 3rd, et al., *Phosphorylation of the Arp2/3 complex is necessary to nucleate actin filaments*. J Cell Biol, 2008. **182**(4): p. 647-54.
123. Rochefort, N.L. and A. Konnerth, *Dendritic spines: from structure to in vivo function*. EMBO Rep, 2012. **13**(8): p. 699-708.
124. Berry, K.P. and E. Nedivi, *Spine Dynamics: Are They All the Same?* Neuron, 2017. **96**(1): p. 43-55.
125. Sakamoto, H., K. Ukena, and K. Tsutsui, *Dendritic spine formation in response to progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell in rats*. Neurosci Lett, 2002. **322**(2): p. 111-5.
126. Chen, J.R., et al., *Gonadal hormones modulate the dendritic spine densities of primary cortical pyramidal neurons in adult female rat*. Cereb Cortex, 2009. **19**(11): p. 2719-27.
127. Vadakkadath Meethal, S. and C.S. Atwood, *The role of hypothalamic-pituitary-gonadal hormones in the normal structure and functioning of the brain*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(3): p. 257-70.
128. Shughrue, P.J., et al., *Comparative distribution of estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract*. Steroids, 1998. **63**(10): p. 498-504.
129. Brinton, R.D., et al., *Progesterone receptors: form and function in brain*. Front Neuroendocrinol, 2008. **29**(2): p. 313-39.
130. Toran-Allerand, C.D., *Minireview: A plethora of estrogen receptors in the brain: where will it end?* Endocrinology, 2004. **145**(3): p. 1069-74.
131. Singh, M., C. Su, and S. Ng, *Non-genomic mechanisms of progesterone action in the brain*. Front Neurosci, 2013. **7**: p. 159.
132. Murakami, G., et al., *Rapid nongenomic modulation by neurosteroids of dendritic spines in the hippocampus: Androgen, oestrogen and corticosteroid*. J Neuroendocrinol, 2018. **30**(2).
133. Maiti, P., et al., *Molecular regulation of dendritic spine dynamics and their potential impact on synaptic plasticity and neurological diseases*. Neurosci Biobehav Rev, 2015. **59**: p. 208-37.
134. Holtmaat, A. and K. Svoboda, *Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain*. Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(9): p. 647-58.
135. Lange, C.A., *Integration of progesterone receptor action with rapid signaling events in breast cancer models*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2008. **108**(3-5): p. 203-12.

136. Wong, C.W., et al., *Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(23): p. 14783-8.
137. Yuste, R., *Dendritic spines and distributed circuits*. Neuron, 2011. **71**(5): p. 772-81.
138. Gipson, C.D. and M.F. Olive, *Structural and functional plasticity of dendritic spines - root or result of behavior?* Genes Brain Behav, 2017. **16**(1): p. 101-117.
139. Bourne, J. and K.M. Harris, *Do thin spines learn to be mushroom spines that remember?* Curr Opin Neurobiol, 2007. **17**(3): p. 381-6.
140. Nelson, B.S., R.C. Springer, and J.M. Daniel, *Antagonism of brain insulin-like growth factor-1 receptors blocks estradiol effects on memory and levels of hippocampal synaptic proteins in ovariectomized rats*. Psychopharmacology (Berl), 2014. **231**(5): p. 899-907.
141. McCarthy, C.R., et al., *Investigating the Interactive Effects of Sex Steroid Hormones and Brain-Derived Neurotrophic Factor during Adolescence on Hippocampal NMDA Receptor Expression*. Int J Endocrinol, 2018. **2018**: p. 7231915.
142. Rivera, H.M. and C.L. Bethea, *Ovarian steroids increase PSD-95 expression and dendritic spines in the dorsal raphe of ovariectomized macaques*. Synapse, 2013. **67**(12): p. 897-908.
143. Jahagirdar, V. and C.K. Wagner, *Ontogeny of progesterone receptor expression in the subplate of fetal and neonatal rat cortex*. Cereb Cortex, 2010. **20**(5): p. 1046-52.
144. Gonzalez-Orozco, J.C. and I. Camacho-Arroyo, *Progesterone Actions During Central Nervous System Development*. Front Neurosci, 2019. **13**: p. 503.
145. Gonzalez, M., et al., *Distribution patterns of estrogen receptor alpha and beta in the human cortex and hippocampus during development and adulthood*. J Comp Neurol, 2007. **503**(6): p. 790-802.
146. Frick, K.M., et al., *Estrogenic regulation of memory consolidation: A look beyond the hippocampus, ovaries, and females*. Physiol Behav, 2018. **187**: p. 57-66.
147. Frye, C.A., C.J. Koonce, and A.A. Walf, *Progesterone, compared to medroxyprogesterone acetate, to C57BL/6, but not 5alpha-reductase mutant, mice enhances object recognition and placement memory and is associated with higher BDNF levels in the hippocampus and cortex*. Neurosci Lett, 2013. **551**: p. 53-7.
148. Hoover, W.B. and R.P. Vertes, *Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat*. Brain Struct Funct, 2007. **212**(2): p. 149-79.
149. Warburton, E.C. and M.W. Brown, *Neural circuitry for rat recognition memory*. Behav Brain Res, 2015. **285**: p. 131-9.
150. Tuscher, J.J., et al., *Estradiol-Mediated Spine Changes in the Dorsal Hippocampus and Medial Prefrontal Cortex of Ovariectomized Female Mice Depend on ERK and mTOR Activation in the Dorsal Hippocampus*. J Neurosci, 2016. **36**(5): p. 1483-9.
151. Sulzmaier, F.J., C. Jean, and D.D. Schlaepfer, *FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(9): p. 598-610.
152. Sen, B. and F.M. Johnson, *Regulation of SRC family kinases in human cancers*. J Signal Transduct, 2011. **2011**: p. 865819.
153. Ohnishi, H., et al., *Src family kinases: modulators of neurotransmitter receptor function and behavior*. Trends Neurosci, 2011. **34**(12): p. 629-37.
154. Winograd-Katz, S.E., et al., *Analysis of the signaling pathways regulating Src-dependent remodeling of the actin cytoskeleton*. Eur J Cell Biol, 2011. **90**(2-3): p. 143-56.
155. Mitra, S.K., D.A. Hanson, and D.D. Schlaepfer, *Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(1): p. 56-68.
156. Turner, C.E., *Paxillin interactions*. J Cell Sci, 2000. **113 Pt 23**: p. 4139-40.
157. Daniels, R.H., P.S. Hall, and G.M. Bokoch, *Membrane targeting of p21-activated kinase 1 (PAK1) induces neurite outgrowth from PC12 cells*. EMBO J, 1998. **17**(3): p. 754-64.

158. Gelens, L., et al., *The Importance of Kinase-Phosphatase Integration: Lessons from Mitosis*. Trends Cell Biol, 2018. **28**(1): p. 6-21.
159. Lambrecht, C., et al., *Structure, regulation, and pharmacological modulation of PP2A phosphatases*. Methods Mol Biol, 2013. **1053**: p. 283-305.
160. Li, D., et al., *Striatin-1 is a B subunit of protein phosphatase PP2A that regulates dendritic arborization and spine development in striatal neurons*. J Biol Chem, 2018. **293**(28): p. 11179-11194.
161. Hasegawa, Y., et al., *Estradiol rapidly modulates synaptic plasticity of hippocampal neurons: Involvement of kinase networks*. Brain Res, 2015. **1621**: p. 147-61.
162. Pilpel, Y. and M. Segal, *Rapid WAVE dynamics in dendritic spines of cultured hippocampal neurons is mediated by actin polymerization*. J Neurochem, 2005. **95**(5): p. 1401-10.
163. Hering, H. and M. Sheng, *Activity-dependent redistribution and essential role of cortactin in dendritic spine morphogenesis*. J Neurosci, 2003. **23**(37): p. 11759-69.
164. Head, J.A., et al., *Cortactin tyrosine phosphorylation requires Rac1 activity and association with the cortical actin cytoskeleton*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(8): p. 3216-29.
165. Iki, J., et al., *Bi-directional regulation of postsynaptic cortactin distribution by BDNF and NMDA receptor activity*. Eur J Neurosci, 2005. **22**(12): p. 2985-94.
166. Ueda, S., M. Negishi, and H. Katoh, *Rac GEF Dock4 interacts with cortactin to regulate dendritic spine formation*. Mol Biol Cell, 2013. **24**(10): p. 1602-13.
167. Pike, C.J., et al., *Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease*. Front Neuroendocrinol, 2009. **30**(2): p. 239-58.
168. Diotel, N., et al., *Steroid Transport, Local Synthesis, and Signaling within the Brain: Roles in Neurogenesis, Neuroprotection, and Sexual Behaviors*. Front Neurosci, 2018. **12**: p. 84.
169. Khan, M.M., et al., *Selective estrogen receptor modulators (SERMs) enhance neurogenesis and spine density following focal cerebral ischemia*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2015. **146**: p. 38-47.
170. Velazquez-Zamora, D.A., L.M. Garcia-Segura, and I. Gonzalez-Burgos, *Effects of selective estrogen receptor modulators on allocentric working memory performance and on dendritic spines in medial prefrontal cortex pyramidal neurons of ovariectomized rats*. Horm Behav, 2012. **61**(4): p. 512-7.
171. Bhambhani, H.P., et al., *Decreased expression of cortactin in the schizophrenia brain*. Neuroreport, 2016. **27**(3): p. 145-50.
172. Foy, M.R., *Ovarian hormones, aging and stress on hippocampal synaptic plasticity*. Neurobiol Learn Mem, 2011. **95**(2): p. 134-44.
173. Foy, M.R., et al., *Regulation of hippocampal synaptic plasticity by estrogen and progesterone*. Vitam Horm, 2010. **82**: p. 219-39.
174. Henderson, V.W., *Alzheimer's disease and other neurological disorders*. Climacteric, 2007. **10 Suppl 2**: p. 92-6.
175. Vegeto, E., V. Benedusi, and A. Maggi, *Estrogen anti-inflammatory activity in brain: A therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases*. Front Neuroendocrinol, 2008.
176. Minkin, M.J., *Menopause: Hormones, Lifestyle, and Optimizing Aging*. Obstet Gynecol Clin North Am, 2019. **46**(3): p. 501-514.
177. Kumar, M. and N. Bansal, *Fasudil hydrochloride ameliorates memory deficits in rat model of streptozotocin-induced Alzheimer's disease: Involvement of PI3-kinase, eNOS and NFkappaB*. Behav Brain Res, 2018. **351**: p. 4-16.
178. Miguez, A., et al., *Fingolimod (FTY720) enhances hippocampal synaptic plasticity and memory in Huntington's disease by preventing p75NTR up-regulation and astrocyte-mediated inflammation*. Hum Mol Genet, 2015. **24**(17): p. 4958-70.

## **CAPÍTULO 7. ANEXO**

Los resultados de ésta tesis fueron publicados recientemente en la revista Neuroendocrinology.

DOI: 10.1159/000503310

Received: 5/7/2019

Accepted: 9/11/2019

Published(online): 9/12/2019

-----  
RAPID ESTROGEN AND PROGESTERONE SIGNALING TO DENDRITIC SPINE FORMATION VIA CORTACTIN/W  
-ARP2/3 COMPLEX

Uzair I.D. Flamini M.I. Sanchez A.M.

-----  
ISSN: 0028-3835 (Print), eISSN: 1423-0194 (Online)

<https://www.karger.com/NEN>

Neuroendocrinology  
-----

Disclaimer:

Accepted, unedited article not yet assigned to an issue. The statements, opinions and data contained in this publication are solely those of the individual authors and contributors and not of the publisher and the editor(s). The publisher and the editor(s) disclaim responsibility for any injury to persons or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Copyright:

All rights reserved. No part of this publication may be translated into other languages, reproduced or utilized in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording, microcopying, or by any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher.

© 2019 S. Karger AG, Basel  
-----

Accepted manuscript

## Neuroendocrinology

<b>Manuscript:</b>	NEN-2019-5-10/R1 RESUBMISSION
<b>Title:</b>	RAPID ESTROGEN AND PROGESTERONE SIGNALING TO DENDRITIC SPINE FORMATION VIA CORTACTIN/WAVE1-ARP2/3 COMPLEX
<b>Authors(s):</b>	Ivonne Denise Uzair (Co-author), Marina Ines Flamini (Co-author), Angel Matias Sanchez (Corresponding Author)
<b>Keywords:</b>	cortactin, dendritic spines, Estradiol, Progesterone, synaptic plasticity, WAVE1
<b>Type:</b>	Research Article

Accepted manuscript



# **RAPID ESTROGEN AND PROGESTERONE SIGNALING TO DENDRITIC SPINE FORMATION VIA CORTACTIN/WAVE1-ARP2/3 COMPLEX**

Ivonne Denise Uzair, Marina Ines Flamini, Angel Matias Sanchez\* .

Laboratory of Signal Transduction and Cell Movement. Institute of Medicine and Experimental Biology of Cuyo (IMBECU). National Scientific and Technical Research Council (CONICET), Mendoza, Argentina.

**Running title:** Estrogen and progesterone control neuronal spine formation

\*Address correspondence and reprint requests to:

**Angel Matias Sanchez, Ph.D.**

Laboratory of Signal Transduction and Cell Movement. Institute of Medicine and Experimental Biology of Cuyo (IMBECU). National Scientific and Technical Research Council (CONICET).

Av. Ruiz Leal s/n. Parque Gral. San Martin CC855, 5500 Mendoza, Argentina.

Phone: 54-261-5244192/4173. Fax: +54-261-5244001

E-mail: [amsanchez@mendoza-conicet.gov.ar](mailto:amsanchez@mendoza-conicet.gov.ar)

**Keywords:** Estradiol, Progesterone, cortactin, WAVE1, dendritic spines, synaptic plasticity

This work has been supported by National Scientific and Technical Research Council (CONICET) grant PIP 2013-2015 and by the National Agency for Scientific and Technological Promotion (The Ministry of Science, Technology and Productive Innovation) PICT-2013-3230 to A.M.S.

DISCLOSURE STATEMENT: The authors have nothing to disclose.