



Universidad de la República  
Licenciatura en Biología Humana

---

Informe de pasantía de grado

**Estudio de los mecanismos moleculares  
involucrados en la Degeneración Walleriana  
mediante diferentes aproximaciones  
experimentales**

Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

**Estudiante:** María Natalia Bobba

**Tutor:** Dra. Cecilia Scorza

**Orientador de Pasantía:** Dr. Aldo Calliari

**Co-orientador de Pasantía:** Dr. Carlos Escande

Noviembre, 2013

Estudio de los mecanismos moleculares involucrados  
en la Degeneración Walleriana mediante diferentes  
aproximaciones experimentales

# Agradecimientos

---

*Al Dr. Aldo Calliari, con quien aprendí lo necesario para llevar adelante este proyecto y me acompañó durante todo este proceso con paciencia y dedicación.*

*Al Dr. Carlos Escande, por la ayuda brindada a la distancia, en todas sus formas.*

*A la Dra. Cecilia Scorza, por acompañarme como tutora de la licenciatura, siempre atenta y dispuesta a que las cosas salieran y bien.*

*A los integrantes de Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente estable, con quienes compartí espacio de trabajo durante estos años y supieron dar una mano cuando así era necesario. En especial al Dr. José Roberto Sotelo-Silveira, quien me invitó a integrarme al laboratorio y colaboró de varias formas para poder llevar a cabo este proyecto.*

*A los compañeros y amigos de facultad, con los que compartimos prácticos y algún que otro teórico, por estar siempre en la vuelta.*

*A mis padres y mi hermano, por el apoyo incondicional.*

*A los amigos de siempre, en especial a Magui, Ana, Pablo y Flo, por estar ahí.*

# Índice

---

<b>1. Resumen</b> .....	6
<b>2. Introducción</b> .....	7
2.1. Relevancia de la degeneración axonal.....	7
2.2. La Degeneración Walleriana como modelo de degeneración axonal .....	7
2.2.1. Caracterización de la Degeneración Walleriana .....	7
2.2.2. Consecuencias de la Degeneración Walleriana.....	8
2.3. Herramientas farmacológicas y moleculares para el estudio de la Degeneración Walleriana ....	9
2.3.1. Sobre las causas y mecanismos de la degeneración axonal .....	9
2.3.2. Neuroprotección mediada por resveratrol.....	10
2.3.2.1. Efectos del resveratrol .....	10
2.3.2.2. Resveratrol y SIRT1.....	11
2.3.3. Neuroprotección mediada por Wld <sup>s</sup> .....	12
2.3.3.1. El fenotipo <i>wld<sup>s</sup></i> .....	12
2.3.3.2. La proteína Wld <sup>s</sup> y el replanteo sobre la degeneración axonal .....	13
2.3.3.3. La participación de cada dominio.....	14
2.3.3.4. La identificación de interacciones <i>proteína-Wld<sup>s</sup></i> para entender su función .....	16
2.4. Expectativas de esta pasantía .....	17
<b>3. Objetivos</b> .....	18
3.1. Objetivo general.....	18
3.2. Objetivos específicos .....	18
<b>4. Materiales y Métodos</b> .....	19
4.1. Estudio del efecto del resveratrol en la Degeneración Walleriana.....	19
4.1.1. Cultivo de explantos de ganglios de la raíz dorsal (DRG).....	19
4.1.2. Tratamientos farmacológicos.....	19
4.1.3. Cuantificación de la degeneración axonal in vitro .....	19
4.1.4. Estadística.....	20

4.2. Expresión y purificación de la proteína Wlds en HEK-293.....	20
4.2.1. Caracterización del plásmido.....	20
4.2.2. Producción del plásmido .....	20
4.2.3. Transfección de células HEK-293.....	21
4.2.4. Ensayos de inmunofluorescencia .....	22
4.2.5. Inmunoprecipitaciones.....	22
4.2.6. Western Blots .....	23
<b>5. Resultados y discusión .....</b>	<b>24</b>
5.1. Estudio del efecto del resveratrol en la Degeneración Walleriana.....	24
5.1.1. Cuantificación de la degeneración axonal .....	24
5.1.2. Evaluación del efecto neuroprotector del resveratrol .....	26
5.1.3. Participación de SIRT1 en el efecto neuroprotector ejercido por resveratrol.....	29
5.2. Expresión y purificación de la proteína Wld <sup>s</sup> en un sistema eucariota: primera etapa en el estudio de su efecto neuroprotector.....	31
5.2.1. Caracterización y producción del vector plasmídico .....	31
5.2.2. Transfección de células HEK-293 con el vector producido .....	33
5.2.3. Aislamiento de Wld <sup>s</sup> y sus proteínas asociadas mediante Inmunoprecipitación.....	35
<b>6. Conclusiones y perspectivas.....</b>	<b>39</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>40</b>
<b>Anexo 1 .....</b>	<b>48</b>
Artículo: “Resveratrol delays Wallerian Degeneration in a NAD <sup>+</sup> and DBC1 dependent manner” ....	48
<b>Anexo 2 .....</b>	<b>49</b>
Secuenciación de la región codificante para Wld <sup>s</sup> contenida en el vector utilizado .....	49
<b>Abreviaturas y siglas utilizadas.....</b>	<b>50</b>

# 1. Resumen

---

La degeneración axonal corresponde a la etapa inicial de varias enfermedades neurodegenerativas frecuentes, pero las causas y el mecanismo por los cuales un axón degenera es aún motivo de discusión. Ante ello, la Degeneración Walleriana (DW), proceso de degeneración rápida y progresiva que sufre la porción distal de un axón cuando es seccionado y separado del soma neuronal, representa un modelo útil para su estudio. A su vez, las condiciones experimentales de las que se reporta un efecto neuroprotector, constituyen un abordaje válido para estudio de las bases moleculares de este tipo de procesos degenerativos así como para la búsqueda de posibles estrategias terapéuticas.

En este trabajo se hace referencia a dos de estas condiciones neuroprotectoras. Una de ellas es el tratamiento con resveratrol, polifenol que ejerce un efecto favorable en varias situaciones neuropatológicas, pero que sobre la DW se han registrado resultados dispares. Utilizando un modelo *in vitro* de DW, se procedió a reevaluar los efectos del resveratrol en el curso de la degeneración axonal, observando una neuroprotección en la que parece tener participación la desacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup>, SIRT1. La otra condición experimental abordada implica a Wld<sup>s</sup>, una proteína quimérica surgida por un rearrreglo genómico fortuito, cuya expresión determina un enlentecimiento del proceso de DW. Su estudio ha conducido a reconsiderar a la degeneración axonal como un mecanismo activo de autodestrucción intrínseco del axón, pero su mecanismo de acción aún se desconoce. Como al día de la fecha no se han descrito vías metabólicas que tengan en Wld<sup>s</sup> un efector o un blanco, en esta pasantía se llevaron a cabo los pasos iniciales para identificar interactores de Wld<sup>s</sup> que podrían estar involucrados en el mecanismo de neuroprotección descrito. Los resultados obtenidos muestran que ambos efectos neuroprotectores, aparentemente independientes, podrían de hecho compartir los mecanismos subyacentes.

**Palabras clave:** Degeneración Walleriana, neuroprotección, resveratrol, SIRT1, Wld<sup>s</sup>

## 2. Introducción

---

### 2.1. Relevancia de la degeneración axonal

Los axones son estructuras neuronales complejas cuyo mantenimiento es fundamental para el normal funcionamiento del sistema nervioso. Dicho mantenimiento no sólo requiere el estímulo trófico del soma, sino también el de la célula adaxonal -célula de Schwann u oligodendrocito, según se trate de sistema nervioso periférico (SNP) o sistema nervioso central (SNC), respectivamente-. El desbalance de tales procesos puede implicar el inicio de un proceso degenerativo; de hecho, la degeneración axonal es el mayor cambio morfológico observado en muchas de las neuropatías centrales y periféricas, y corresponde a la etapa inicial de muerte neuronal observada en enfermedades neurodegenerativas frecuentes, como son la enfermedad de Parkinson (Raff et al., 2002), Alzheimer (Stokin et al., 2005) y Esclerosis Amiotrófica Lateral (Fischer et al., 2004). A su vez, la correlación de la degeneración axonal con síntomas clínicos como el declive cognitivo, colocan a este proceso como un componente importante de tales enfermedades y también un blanco terapéutico para combatirlos.

### 2.2. La Degeneración Walleriana como modelo de degeneración axonal

#### 2.2.1. Caracterización de la Degeneración Walleriana

La Degeneración Walleriana (DW), descrita en primera instancia por Augustus Waller (1850), puede definirse como el proceso de degeneración rápida y progresiva que sufre la porción distal de un axón cuando es seccionado y separado del soma neuronal. Sin embargo, también puede observarse en axones sometidos a otro tipo de agresión, como traumatismos, alteraciones metabólicas o tóxicas, procesos inflamatorios y síndromes hereditarios (Coleman & Perry, 2002).

En términos generales, la DW puede ser descrita como un proceso rápido y asincrónico que avanza de manera progresiva y que puede transcurrir tanto en dirección anterógrada como retrógrada, dependiendo del tipo de lesión (Beirowski et al., 2005). Comienza con una *Fase de Latencia* de 36 a 44 horas, en la cual el evento degenerativo más temprano es la pérdida de la conexión del terminal axonal con su órgano blanco (Miledi & Slater, 1970; Conforti et al., 2007a); a partir de las 8 a 24 horas comienzan a formarse los llamados “*beads*” -distenciones localizadas del axolema- (George et al., 1995; Sievers et al., 2003; Zhai et al., 2003). No obstante, la morfología general del axón se mantiene; este permanece continuo y aún puede conducir potenciales de acción evocados (Lunn et al., 1989; Moldovan et al., 2009). Esta etapa es luego sucedida por una repentina *Fase de Fragmentación* (Lubinska 1977; Beirowski et al., 2005) en la que el citoesqueleto

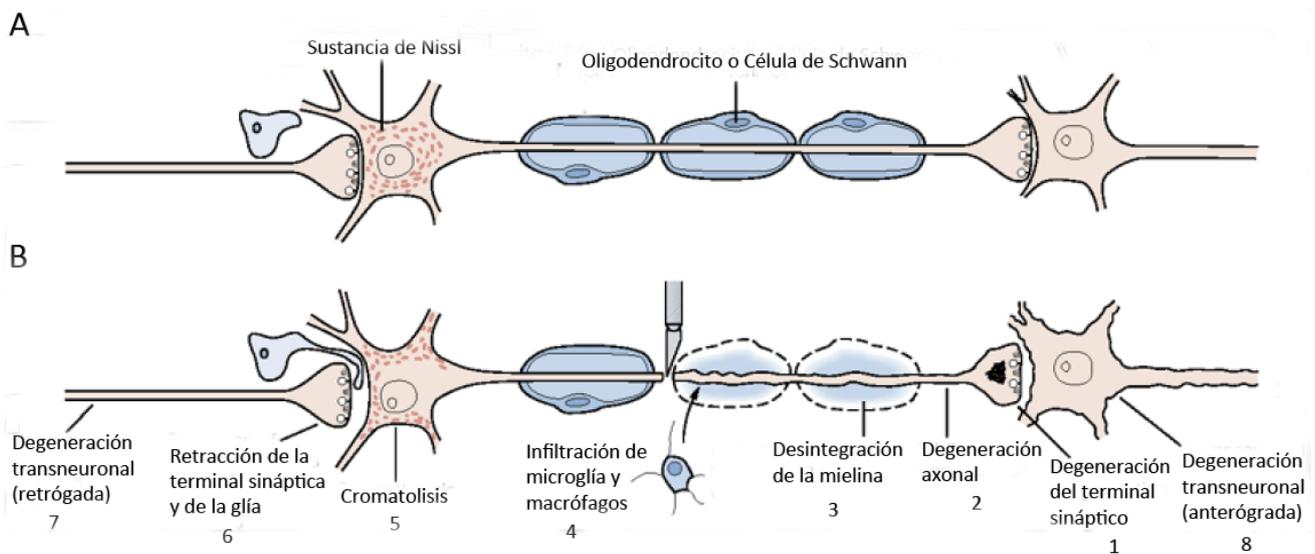
del axón se desorganiza por el desensamble de microtúbulos, neurofilamentos y otros de sus componentes. En este procesos intervienen calpaínas (proteasas moduladas por calcio) y otros mecanismos dependientes del Sistema Ubiquitin-Proteasoma (UPS), y es conocido como *Desintegración Granular del Citoesqueleto*. Posteriormente ocurre la desintegración del axón, originando restos de mielina que luego células de la glía y macrófagos se encargan de remover (Vargas & Barres 2007).

A pesar de este patrón general, numerosos estudios sobre DW han mostrado que su evolución espacio-temporal varía con muchos factores experimentales, como lo son los animales de laboratorio utilizados y la edad de los mismos, el lugar neuroanatómico de estudio (SNC vs. SNP), el tipo de fibra analizada (e.g. miélnica vs. amielínica; axones gruesos vs. delgados), el tipo de lesión (sección, aplastamiento, ligadura, intoxicación etc.), el largo de la porción distal remanente del axón y factores ambientales como la temperatura (Beirowski et al., 2005).

### **2.2.2. Consecuencias de la Degeneración Walleriana**

La Degeneración Walleriana que sufre un axón tiene numerosas consecuencias que van más allá de su propia estructura. En muchos casos la neurona sufre una serie de cambios conocidos como *Reacción Cromatolítica*, en la que el cuerpo celular se hincha, el núcleo se desplaza a una posición excéntrica y el retículo endoplásmico rugoso se fragmenta. La cromatolisis es acompañada por alteraciones metabólicas como un aumento general de síntesis de ARN y proteínas y un cambio en la expresión génica. Esto puede ser revertido si se logra una regeneración exitosa del axón -con previa remoción de la porción distal “libre” de este-, de otro modo, la neurona eventualmente muere (Kandel et al., 2000).

Las modificaciones recién mencionadas pueden conducir a que las neuronas vecinas que hacen sinapsis con la neurona lesionada también se vean afectadas. Con frecuencia, las terminales sinápticas que hacen contacto con somas o dendritas de neuronas cromatolíticas se retraen y son remplazadas por procesos de células gliales, en un proceso conocido como *Stripping Sináptico*. Además, cuando el blanco postsináptico del axón lesionado es una neurona, la pérdida de dicha terminal sináptica puede provocar que esta se atrofie y hasta incluso muera. Como resultado de estos efectos transinápticos, la DW puede provocar un proceso degenerativo que se propagará a lo largo del circuito neuronal tanto en dirección anterógrada como retrógrada, con cambios que no solo tienen repercusiones a nivel de las células neuronales sino también de las células de la glía (Kandel et al., 2000). En la Figura 1 se muestra un esquema del proceso de Degeneración Walleriana (*modificado de*: Kandel et al., 2000)



**Figura 1. Proceso de Degeneración Walleriana y sus efectos transneuronales.** A. Neurona sana con sus interconexiones intactas y funcionales. B. Neurona a la que se le induce Degeneración Walleriana. Del (1) al (8) se muestran los acontecimientos más relevantes en orden temporal.

Estudios recientes han demostrado que varias axonopatías siguen un mecanismo de tipo Walleriano, entre ellas, enfermedades motoneuronales, neuropatías periféricas y de daño por tóxicos (Alvarez et al., 2008; Ferri et al., 2003; Wang et al., 2002), así como también en afecciones del SNC, como Enfermedad de Parkinson, Esclerosis Múltiple y Distrofia Axonal del Fascículo Gracilis (Kaneko et al., 2006; Mi et al., 2005; Sajadi et al., 2004). En conjunto, dichas evidencias colocan a la Degeneración Walleriana como un modelo útil para entender y potencialmente tratar la degeneración axonal en diversos contextos, sea de traumatismo o de enfermedad.

## 2.3. Herramientas farmacológicas y moleculares para el estudio de la Degeneración Walleriana

### 2.3.1. Sobre las causas y mecanismos de la degeneración axonal

La causa última por la cual un axón lesionado degenera ha sido, y es actualmente, motivo de discusión. Pueden distinguirse dos grandes hipótesis; una de ellas coloca al bloqueo del transporte axonal como el principal desencadenante y la otra al ingreso de sustancias desde el medio extracelular, haciendo particular énfasis en el flujo entrante de calcio.

En cuanto al bloqueo del transporte axonal, se propone que este impediría que el segmento distal del axón seccionado sea abastecido de ciertos factores imprescindibles para su supervivencia, o

por la incapacidad de remover sustancias dañinas allí formadas (Hafezparast et al., 2003; Chevalier-Larsen & Holzbaur, 2006). Quienes apoyan esta hipótesis argumentan que esto explicaría la *Fase Latente* inicial y el hecho de que esta es aún más larga cuando se trabaja con temperaturas bajas o cuando se inhibe la actividad del proteosoma (Tsao et al., 1999; Zhai Q et al., 2003; Macinnis & Campenot, 2005).

Respecto al ingreso de sustancias desde medio extracelular, se plantea que la lesión del axón provocaría la disrupción de estructuras que le dan soporte -como células de Schwann, matriz extracelular, perineuro y vasos sanguíneos- y que el axoplasma se encuentre totalmente expuesto al ambiente iónico externo. Se hace especial énfasis en la difusión de calcio hacia el interior del axón y la activación de calpaínas, con una consecuente degeneración de proteínas axoplásmicas y de membrana, que entonces conduciría a una progresiva permeabilización y degeneración del axón (Schlaepfer, 1974; George et al., 1995; Tsao et al., 1999).

Al día de hoy existen controversias sobre cuestiones fundamentales del proceso de Degeneración Walleriana, y a pesar de que ha sido investigado desde hace más de 150 años, aún no se ha desarrollado un modelo completo que logre explicar su naturaleza bifásica, qué es lo que sustenta la *Fase Latente*, qué dispara la *Fase de Fragmentación* o cuáles son los mecanismos implicados en la degeneración.

### **2.3.2. Neuroprotección mediada por resveratrol**

#### **2.3.2.1. Efectos del resveratrol**

Ante una situación como la recién descrita, los tratamientos farmacológicos que ejercen un efecto neuroprotector en el proceso degenerativo representan un abordaje útil para estudiar las bases del mismo, así como también para la búsqueda de posibles estrategias para su tratamiento.

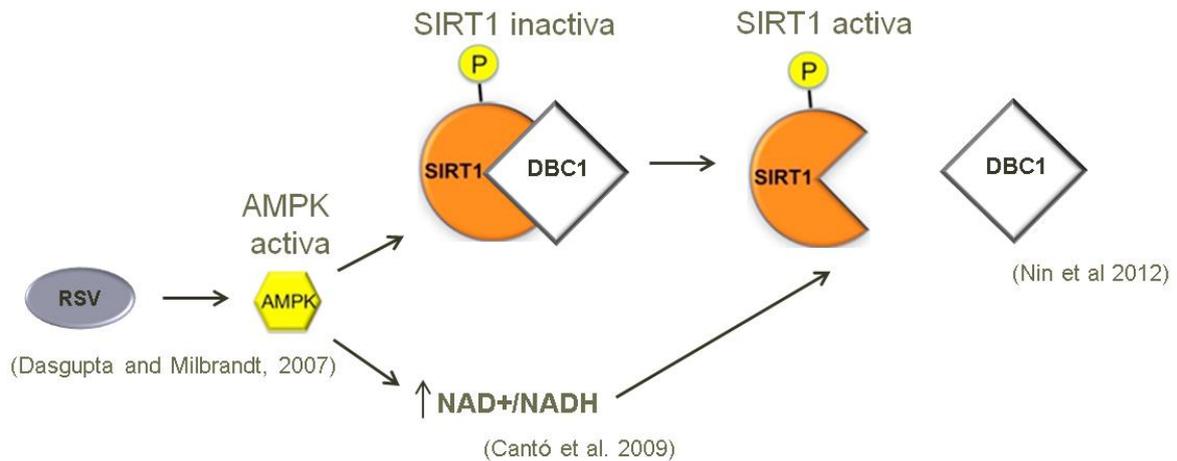
Dentro de una amplia gama de fármacos neuroprotectores en esta pasantía se destaca al resveratrol (3,4,5' trihidroxistilbeno; RSV), un polifenol producido por el metabolismo secundario de numerosos vegetales (Baur & Sinclair, 2006). Este ejerce una amplia gama de respuestas fisiológicas y retrasa el inicio de enfermedades asociadas con el envejecimiento, exhibiendo efectos favorables en diferentes tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y autoinmunes (Baur & Sinclair, 2006; Fulda & Debatin, 2006). En cuanto a la neuroprotección, el RSV ha mostrado ejercer tal efecto en situaciones patológicas como isquemia cerebral y enfermedades degenerativas (Zhang et al., 2010); no obstante, en el caso de Degeneración Walleriana los resultados son contradictorios, reportándose un efecto tanto neuroprotector, como nulo o incluso deletéreo (Araki et al., 2004; Conforti et al., 2007b; Suzuki & Koike 2007).

### 2.3.2.2. Resveratrol y SIRT1

Los mecanismos moleculares mediante los que el RSV produce los efectos antes mencionados son actualmente motivo de discusión. Recurrentemente se ha destacado la posible participación de SIRT1, uno de los 7 miembros de la familia de sirtuínas presentes en mamíferos. SIRT1 es una desacetilasa de proteínas dependiente del dinucleótido de adenina y nicotinamida ( $\text{NAD}^+$ ), que regula la acetilación de histonas (Imai et al., 2000; Vaquero et al., 2004) así como otras proteínas, entre ellas, PGC1 $\alpha$  (Rodgers et al., 2005), p53 (Vaziri et al., 2001), los factores de transcripción FOXO (Nakae et al., 2006), Nf $\kappa$ B (Yeung et al., 2004), Ku 70 (Cohen et al., 2004), y MyoD (Fulco et al., 2003). En suma, SIRT1 participa en una amplia gama de procesos fisiológicos, que van desde la diferenciación celular, el control del ciclo celular, la resistencia al estrés, la senescencia y la apoptosis, así como también influye en los ciclos circadianos y el metabolismo de la glucosa y las grasas (Nakahata et al., 2008; Kim et al., 2008a).

La relación entre RSV y SIRT1 tomó relevancia a partir de observar que varios de los efectos producidos por el tratamiento con RSV son similares a aquellos producidos por la activación de SIRT1. Dicha asociación se vio alentada por evidencias experimentales que sugerían que el RSV induce la activación de SIRT1 en forma directa *in vitro* (Howitz et al., 2003) y sus efectos *in vivo* parecen ser SIRT1-dependientes (Boily et al., 2009; Price et al. 2012).

No obstante, el mecanismo de activación de SIRT1 mediado por RSV es un tema controversial. A pesar de lo que se propuso inicialmente (Howitz et al., 2003), la activación no implicaría una interacción directa del polifenol con la enzima (Borra et al., 2005; Beher et al., 2009, Pacholec et al., 2010). En 2012, Nin et al. proponen que la activación de SIRT1 mediada por RSV involucraría la disociación de SIRT1 de la proteína *Deleted in Breast Cancer 1* (DBC1), de un modo dependiente de *AMP activated protein kinase* (AMPK). Dasgupta y Millbrand (2007) fueron los primeros en proponer a AMPK como blanco indirecto de RSV, lo cual fue sucedido por varios trabajos en los que se planteaba a SIRT1 y AMPK como los que formaban el eje principal de las acciones metabólicas del RSV (Park et al., 2007; Fullerton & Steinberg, 2010; Lin et al., 2010; Ruderman et al., 2010), destacándose el de Um et al. (2010), en el que se muestra como ratones *Knock Out* (KO) para la subunidad catalítica de AMPK son resistentes a los efectos metabólicos del RSV. Por otro lado, DBC1 había sido reportada como un regulador endógeno de SIRT1 que, a través de un dominio cierre de leucina, se asociaba al dominio catalítico de esta inhibiendo su actividad enzimática (Kim et al. 2008b; Zhao et al., 2008). Lo que entonces se propuso fue que el RSV inducía la fosforilación y consecuente activación de AMPK, y que dicha activación induciría de algún modo la fosforilación de SIRT1, provocando la disociación del complejo SIRT1/DBC1 (Nin et al., 2012). En otro trabajo se planteó que la activación de AMPK induciría la disociación del complejo mediante un aumento en la relación  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  (Cantó et al., 2009). La Figura 2 muestra un esquema de lo anterior mencionado.



**Figura 2. Posibles mecanismos de activación de SIRT1 mediante resveratrol.** Se muestran dos de las hipótesis que involucran a AMPK y DBC1.

A nivel del sistema nervioso, SIRT1 ha mostrado ejercer efectos beneficiosos en una amplia gama de condiciones neurodegenerativas, enlenteciendo el inicio de alteraciones específicas o modulando el curso temporal de condiciones neuropatológicas en modelos animales de enfermedad de Alzheimer, Esclerosis Amiotrófica Lateral, Huntington, Parkinson, Esclerosis Múltiple, y otros (Zhang et al., 2011). De este modo, se posiciona como un candidato a verse involucrado en los mecanismos de neuroprotección y alrededor del cual establecer la búsqueda de posibles terapias.

Dado que la influencia del resveratrol en el curso de la degeneración axonal y la posible participación de SIRT1 es aún un tema controversial, resulta necesario llevar a cabo nuevos estudios para clarificar este asunto. Parte de esta pasantía se concentra en ello, mediante la utilización de un modelo in vitro de Degeneración Walleriana basado en cultivos de ganglio de raíz dorsal.

### 2.3.3. Neuroprotección mediada por *Wld<sup>s</sup>*

#### 2.3.3.1. El fenotipo *wld<sup>s</sup>*

Otro de los abordajes para el estudio de la Degeneración Walleriana surgió a partir del descubrimiento de una cepa de ratón C57BL mutante, en la cual la DW progresa de manera mucho más lenta (Lunn et al., 1989). Los ratones de esta cepa mutante, a la cual se le llamó C57BL/*wld<sup>s</sup>* -Wallerian Degeneration Slow-, son indistinguibles de los ratones *Wild Type* (WT), excepto por su peculiar fenotipo degenerante y consecuente con ello, por un retraso en la regeneración axonal (Brown et al., 1994).

Los axones derivados de esta cepa presentan varias diferencias en el patrón topográfico y morfológico de la DW con respecto al de los axones WT. La más evidente es que el progreso de la degeneración es alrededor de 10 veces más lenta, con una velocidad estimada de 2.2 mm/día en nervios periféricos. De este modo, aún después de 15 días de ser seccionados, la fragmentación de los axones todavía es mayormente incompleta (Lunn et al., 1989; Ribchester et al., 1995; Mack et al., 2001; Beirowski et al., 2005) e incluso mantienen la capacidad de conducir potenciales de acción (Tsao et al., 1999). Por otro lado, la degeneración en estos axones siempre transcurre en dirección anterógrada, cualquiera haya sido el tipo de lesión. La *Fase Latente* es más duradera y el proceso en general es más sincrónico; no existe un límite claro que separe las regiones degeneradas de las intactas, sino más bien un gradiente de degeneración a lo largo del axón (Beirowski et al., 2005).

### 2.3.3.2. La proteína Wld<sup>s</sup> y el replanteo sobre la degeneración axonal

El fenotipo recién descrito es semidominante y se hereda a través de un solo locus (Perry et al., 1990b), el cual surgió por un rearrreglo genómico espontáneo en el cromosoma 4 de ratón (Lyon et al., 1993); se trata de una triplicación en tándem de 85 kb cuya secuencia codifica para una proteína quimérica que no está presente en el ratón WT: Wld<sup>s</sup>.

La secuencia total de Wld<sup>s</sup> consta de 373 aminoácidos; los 70 aminoácidos N-Terminales (N70) corresponden a la región N-terminal de Ube4b (*Ubiquitination factor E4B* o *Ufd2a*) -desde el codón de inicio, un 6% de su secuencia total-; los 285 aminoácidos C-Terminales corresponden a la secuencia completa de NMNAT-1 (*Nicotinamide Nucleotide Adenylyltransferase 1*); y entre ambos existe una región única de 18 aminoácidos, generada por la transcripción del UTR 5' de la secuencia de NMNAT-1 (Coleman et al., 1998). La Figura 3 muestra un esquema de dicha secuencia (*modificado de Coleman et al., 2010*).



**Figura 3. Esquema de la secuencia de Wld<sup>s</sup>.** N70: 70 aminoácidos N-Terminales de Wld<sup>s</sup>, que corresponden a la región N-terminal de Ube4b. Wld<sup>s</sup>18: región de 18 aminoácidos generada por la transcripción del UTR 5' de la secuencia de NMNAT-1. Nmnat1: 285 aminoácidos C-Terminales de Wld<sup>s</sup> que corresponden a la secuencia completa de NMNAT-1.

La relevancia de la proteína Wld<sup>s</sup> en el enlentecimiento de la DW queda evidenciada por el hecho de que axones WT a los que se le induce su expresión y son seccionados, reproducen el fenotipo característico de los axones derivados de las cepas mutantes *wld<sup>s</sup>* (Mack et al., 2001; Araki et al., 2004). Tal efecto ha sido descrito en ratones, ratas, moscas y modelos de cultivo de células (Wang et al., 2001; Araki et al., 2004; Adalbert et al., 2005; Hoopfer et al., 2006; Macdonald et al., 2006;). Se ha observado que la mutación también protege a axones del SNC en varios modelos animales de enfermedades neurodegenerativas humanas (Ferri et al., 2003; Gillingwater et al., 2004 y 2006; Sajadi et al., 2004; Fischer et al. 2005). Además, a diferencia de otras mutaciones que también influyen en el proceso de DW, el enlentecimiento de la DW en mutantes *wld<sup>s</sup>* es intrínseco de los axones y no debido a una respuesta de los macrófagos (Perry et al., 1990a), o de la glía (Glass et al., 1993).

En conjunto, estos datos sugieren que los axones probablemente compartan mecanismos similares de degeneración, más allá de su origen y localización; y que no se trataría, como se creía inicialmente, de degeneración causada por el bloqueo del transporte axonal y la privación del abastecimiento de factores imprescindibles para la supervivencia (Zhai Q et al., 2003; Macinnis & Campenot, 2005), ni tampoco únicamente por el ingreso de sustancias desde el medio externo mediante el sitio de lesión (Schlaepfer, 1974; George et al., 1995; Tsao et al., 1999). Al contrario, invita a pensar en la existencia de un mecanismo activo de autodestrucción intrínseco del axón (Buckmaster et al., 1995; Raff et al., 2002; Tsao et al., 1999). Esta condición de proceso activo promovió la idea de que el mecanismo subyacente a la DW quizás compartiera algunos principios con la apoptosis (Perry et al., 1990a; Buckmaster et al., 1995; Raff et al., 2002); sin embargo, existe evidencia que sugiere lo contrario, principalmente, porque no requiere síntesis de proteínas (Gilley & Coleman, 2010), ni parecen estar involucrada la activación de caspasas ni de cisteín-proteasas (Finn et al., 2000). Ante ello, la DW resulta un proceso cuyas bases moleculares aún no están del todo comprendidas.

### **2.3.3.3. La participación de cada dominio**

El rearreglo genómico de los C57BL/*wld<sup>s</sup>* retiene los genes endógenos de NMNAT-1 y Ube4b, y las proteínas codificadas por estos se expresan en niveles normales, descartando una pérdida de función (Gillingwater et al., 2002; Conforti et al., 2007b). Al contrario, se propone que probablemente la presencia de Wld<sup>s</sup> implique una ganancia de función, aunque aún se desconoce si se trata de una función totalmente nueva o si en realidad fortalece o imita la de una proteína endógena.

Al tratarse de una proteína fusión, una de las mayores discusiones recae sobre la participación de cada dominio en el efecto neuroprotector. Ube4b es un factor de ubiquitinación responsable del ensamblaje secuencial de moléculas de ubiquitina (Hatakeyama et al., 2001); no obstante, los 70 aminoácidos expresados en la proteína Wld<sup>s</sup> solo representan un 6% de su secuencia total y carecen de la actividad para multiubiquitinación (Mack et al., 2001; Coleman & Perry 2002). Se ha propuesto que la fracción de Ube4b podría contribuir mediante una inhibición dominante negativa del Ube4b endógeno y una consecuente disrupción del UPS -importante para la regulación de la degeneración del axón- (Zhai et al., 2003; Macinnis & Campenot, 2005); o alternatively, que podría influir en la localización de Wld<sup>s</sup>, dirigiendo la síntesis de NAD<sup>+</sup> llevada a cabo por la NMNAT-1 o de maquinaria del UPS con las que podría asociarse (Beirowski et al., 2009; Avery et al., 2009).

A pesar de esto, la sobreexpresión individual del N70 *in vitro* ha mostrado no ejercer un efecto neuroprotector (Araki et al., 2004; Wang et al., 2005), lo cual condujo mayor atención a NMNAT-1. Esta es una enzima de localización nuclear, responsable del último paso en la vía de biosíntesis del NAD<sup>+</sup>, para lo cual utiliza mononucleótido de nicotinamida (NMN) como sustrato (Magni et al., 2004). NMNAT-1 también puede catalizar la formación de ácido nicotínico adenina dinucleótido (NaAD) a partir de ácido nicotínicomononucleótido (NaMN) (Magni et al., 2004), aunque esta reacción parece tener menor relevancia a nivel celular. En la proteína Wld<sup>s</sup>, su secuencia y actividad están intactas (Coleman et al., 1998), y se ha propuesto que podría actuar como una chaperona (Zhai et al., 2006 y 2008) o mediante su actividad biosintética de NAD<sup>+</sup> (Araki et al., 2004; Wang et al., 2005). No obstante, experimentos donde NMNAT-1 fue sobreexpresada condujeron a resultados controversiales: mientras *in vitro* sí ejerce un efecto neuroprotector, aunque con un grado significativamente menor que Wld<sup>s</sup> (Araki et al., 2004; Wang et al., 2005; Sasaki et al., 2009), *in vivo* mostró no hacerlo (Conforti et al., 2007a; Yahata et al., 2009).

Tales diferencias, junto con resultados que muestran que el efecto neuroprotector depende del nivel de expresión de la proteína (Yahata et al., 2009), llevaron a reconsiderar la importancia de la localización de la proteína. Tanto NMNAT-1 como Wld<sup>s</sup> son principalmente nucleares (Mack et al., 2001; Magni et al., 2004), no obstante, la localización ectópica que estas presentan debido a la sobreexpresión podría estar favoreciendo la neuroprotección (Yahata et al., 2009; Beirowski et al., 2009). Además, se ha demostrado que la presencia de Wld<sup>s</sup> en axones es necesaria para ejercer su efecto neuroprotector (Cohen et al., 2012). Por otra parte, no se observó neuroprotección *in vivo* cuando la proteína sobreexpresada era una Wld<sup>s</sup> carente de la actividad catalítica de NMNAT-1 (Yahata et al., 2009; Avery et al., 2009); y consistente con la idea de la localización ectópica previamente mencionada, sí se observó efecto neuroprotector *in vivo* mediante la expresión a bajos niveles de NMNAT-2, una versión citosólica de NMNAT (Sasaki et al., 2009) o la sobreexpresión de NMNAT-3, una versión mitocondrial de la misma (Yahata et al., 2009).

Estos datos apoyan la idea de que NMNAT-1 tiene una participación crucial en la función neuroprotectora de Wld<sup>s</sup>, y en particular mediante su actividad biosintética de NAD<sup>+</sup>. No obstante, NAD<sup>+</sup> presenta un rol importante en el metabolismo bioenergético, es sustrato para la desacetilación de proteínas por sirtuínas, para la síntesis de Adenosín difosfato (ADP) cíclica y ribosa -ambos reguladores del almacenamiento interno de calcio-, para la mono y poli ADP-ribosilación de proteínas (Hassa et al. 2006, Pollak et al. 2007), y para sintetizar NADP<sup>+</sup> -cuya forma reducida tiene un papel importante en la detoxificación y la defensa oxidativa- (Pollak et al. 2007); por lo que el mecanismo mediante el cual podría ejercer la protección aún no está claro.

#### **2.3.3.4. La identificación de interacciones proteína-Wld<sup>s</sup> para entender su función**

En síntesis, puede decirse que Wld<sup>s</sup> forma parte del grupo de otras proteínas quiméricas cuya actividad es más que la suma de sus partes (Campbell et al., 1997; Fujimoto et al., 1996). No basta con la actividad individual de cada una de ellas, sino que varios dominios de la proteína podrían estar involucrados en el proceso de neuroprotección. De hecho, no solo mediante su propia actividad, sino también al interactuar con otras proteínas que podrían estar afectando su actividad, la actividad de otros dominios o incluso determinando la localización de la proteína.

Por ejemplo, se ha demostrado que aunque la sobreexpresión individual de Ube4b no produce neuroprotección (Araki et al., 2004; Wang et al., 2005), la delección del N70 de Wld<sup>s</sup> determina la supresión completa de la neuroprotección en ratones (Conforti et al., 2009) y una disminución pronunciada en *Drosophila*, hasta niveles similares a los encontrados por la sobreexpresión individual de NMNAT-1 (Avery et al., 2009). En particular, se propuso que el fragmento de 16 aminoácidos N-Terminales de Wld<sup>s</sup> que forman parte de N70 (N16) interacciona con VCP (Valosin-Containing Protein), una ATPasa de la familia AAA con un rol clave en el UPS (Dai & Li, 2001; Jarosch et al., 2002; Wang et al., 2004). Conforme a esto, el reemplazo de N16 de Wld<sup>s</sup> con un dominio de unión a VCP en ratones, conduce a una neuroprotección a nivel de la ejercida por Wld<sup>s</sup>; y por otro lado, el silenciamiento de VCP por ARN de interferencia en moscas es suficiente para suprimir la protección axonal por Wld<sup>s</sup> a niveles indistinguibles de los alcanzados por la sobreexpresión individual de NMNAT-1 (Conforti et al., 2009).

Es interesante destacar que a excepción de VCP, no se han descrito mecanismos de regulación metabólica que tengan en Wld<sup>s</sup> un efector o un blanco, ni tampoco ha habido estudios tendientes a identificar interacciones proteicas con Wld<sup>s</sup> que impliquen regulación y/o señalización metabólica. La única descrita es la interacción Wld<sup>s</sup>-VCP, dato que surge a partir de ensayos de interacción *in vitro* y utilizando Wld<sup>s</sup> expresada en bacterias, una aproximación que, si bien es válida, también pierde mucha información relativa a interacciones proteicas que ocurren en un sistema eucariota.

Esta pasantía parte la hipótesis de que deben existir más interactores de Wld<sup>s</sup> que los actualmente descritos, y que su identificación es un paso importante para entender el mecanismo por el cual esta proteína ejerce la neuroprotección. En ese sentido, se propone expresar transitoriamente Wld<sup>s</sup> en un sistema eucariota (células HEK-293) con el objetivo de recrear las interacciones Wld<sup>s</sup>-proteína en la célula y entonces luego purificar los complejos formados.

Es decir, se pretende llevar a cabo los pasos iniciales de un proyecto mayor cuyo objetivo es la identificación de proteínas potencialmente involucradas en el mecanismo de neuroprotección mediada por Wld<sup>s</sup>. Si bien la línea celular a utilizar representa un modelo relativamente alejado de la neurona, consideramos que es altamente probable que algunos interactores estén conservados, sea aquellos involucrados en el transporte de la proteína, u otros que participen en vías metabólicas que podrían estar involucradas en la neuroprotección.

#### **2.4. Expectativas de esta pasantía**

En conclusión, la Degeneración Walleriana se presenta como un modelo útil para el estudio de varios procesos patológicos que involucran a los axones, y en ese contexto, las condiciones experimentales de las que se reporta un efecto neuroprotector, sean intervenciones farmacológicas como el tratamiento con resveratrol, así como intervenciones moleculares como la expresión de la proteína Wld<sup>s</sup>, constituyen herramientas importantes que podrían colaborar en el entendimiento de algunos mecanismos subyacentes a los procesos degenerativos, así como para la búsqueda de nuevas estrategias para su tratamiento. Sus mecanismos de acción no están claros y muy probablemente encierren alguna clave funcional, ignorada hasta el presente, que ayude a comprender mejor no solo la etiopatogenia de muchas degeneraciones, sino también la fisiología axonal normal.

# 3. Objetivos

---

## 3.1. Objetivo general

Estudiar el proceso de Degeneración Walleriana como modelo para entender y potencialmente tratar la degeneración axonal en diversos contextos, sea de traumatismo o de enfermedad, considerando fenómenos de neuroprotección ya descritos como un abordaje útil para lograr un acercamiento a las bases moleculares del mismo.

## 3.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto neuroprotector del resveratrol en un modelo *in vitro* de Degeneración Walleriana y la posible participación de SIRT1 en dicho efecto.
2. Inducir la expresión de la proteína Wld<sup>s</sup> en un sistema eucariota en pos de identificar proteínas que se asocian a ella y que potencialmente estén involucradas en el efecto neuroprotector esta ejerce.

## 4. Materiales y Métodos

---

### 4.1. Estudio del efecto del resveratrol en la Degeneración Walleriana

#### 4.1.1. Cultivo de explantos de ganglios de la raíz dorsal (DRG)

Se extirpan DRG de ratones de 0 a 7 días de vida, se colectan en *Hanks' Salt Balanced Solution* (HBSS) y se los lava con medio Neurobasal (Gibco) suplementado con B27 y Glutamax (Invitrogen). Luego los ganglios son colocados en placas de 35 mm tratadas con poli-L-lisina y se mantienen durante 2 a 3 días en medio Neurobasal suplementado con B27, Glutamax, penicilina/estreptomicina (Invitrogen) y Nerve Growth Factor (NGF-2s a 50 ng/ml, Invitrogen). Una vez que los cultivos alcanzan un campo axonal de aproximadamente 2 mm de diámetro, se procede a realizar la sección de los axones mediante una hoja de bisturí quirúrgico nº 15. Los tratamientos farmacológicos se llevan a cabo previo o inmediatamente después de la sección de los axones, como se describe a continuación.

#### 4.1.2. Tratamientos farmacológicos

Los tratamientos con NAD<sup>+</sup> (Sigma) son en concentración 1 mM o 10 mM y se lo añade al medio de cultivo 24 horas antes de la sección de los axones, o en caso de especificarlo, inmediatamente después de esta. Los tratamientos con resveratrol (Enzo Life Sciences International) son en concentración 50 µM y se lo añade al medio de cultivo 4 horas previo a la sección de los axones (con reposición a las 2 horas para evitar la total depleción del fármaco), o en caso de especificarlo, inmediatamente después de esta. Los tratamientos con Suramina (Biomol International) son en concentración 100 µM y se la añade junto con el resveratrol.

#### 4.1.3. Cuantificación de la degeneración axonal in vitro

La cuantificación de la degeneración axonal se llevó a cabo mediante dos criterios alternativos: a) contando el número de axones en el campo del microscopio inmediatamente después de la sección y expresando la degeneración como el porcentaje de axones remanentes en la placa que no presentan evidencia de fragmentación; y b) expresando la degeneración como el número de beads -distenciones localizadas en el axolema- a lo largo de 100 µm de axón. El número de beads fue medido en aquellos axones que son identificables en toda su longitud (mayor a 70 µm) en los sucesivos registros. Para ambos criterios se registran medidas de degeneración correspondiendo a las 0, 12, 24 y 36 horas post-sección. Los axones fueron observados utilizando un microscopio Nikon Diaphot-300 con objetivo de contraste de fase 10 X y fotografiados con una cámara digital Micrometrix.

#### **4.1.4. Estadística**

Los valores que corresponden a la cuantificación de degeneración axonal están presentados como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Cada condición experimental comprende al menos 5 experimentos independientes (5 animales diferentes). A su vez, de cada animal se analizan al menos 10 campos axonales por condición experimental y se registraron 3 medidas de degeneración por campo. La significancia de las diferencias entre las medias fueron estudiadas mediante Test de Student de 2 colas o ANOVA de una vía. Los valores se consideran significativos cuando el p-valor es menor a 0,05.

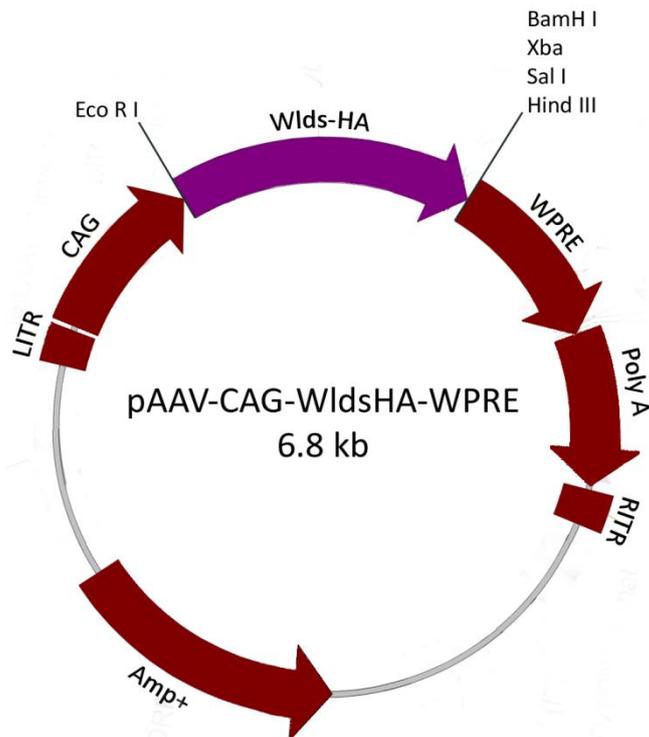
## **4.2. Expresión y purificación de la proteína Wlds en HEK-293**

### **4.2.1. Caracterización del plásmido**

El vector plasmídico que contiene la secuencia codificante para la proteína Wlds fue gentileza de Zhigang He (Division of Neuroscience, Children's Hospital, Harvard Medical School; Wang et al., 2005). La secuenciación de la región codificante contenida entre los sitios de clonado fue llevada a cabo en Mayo Clinic DNA Sequencing Core Facility, Rochester, MN, USA. Los primers (cebadores) utilizados fueron los siguientes: Forward primer: 5'AGCGCTTGTTTAATGACGGCTTG3', perteneciente a la región CAG; Reverse primer: 5'CATAGCGTAAAAGGAGCAACA3', perteneciente a la región WPRE. La alineación del fragmento secuenciado se llevó a cabo en la plataforma del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Las secuencias contra las que se alineó el fragmento secuenciado son: secuencia codificante (CDS) de Wlds (GenBank: AF260924.1), CDS de Ube4b (NCBI: NM\_022022.3) y secuencia completa de NMNAT-1 (NCBI: NM\_133435.1). La Figura 4 muestra un esquema del vector utilizado.

### **4.2.2. Producción del plásmido**

Se llevó a cabo la transformación de células competentes E.coli MAX Efficiency® Stbl2™ (Invitrogen), según las indicaciones del fabricante. Las células transformadas son plaqueadas en un medio sólido de agar con medio Luria-Bertani (LB) y ampicilina (Gibco), e incubadas 16 horas a 30 °C. Se elige una colonia entre las que crecieron en las condiciones anteriormente descritas y se la re-siembró en 200 ml de medio líquido LB con ampicilina a 30 °C durante 16 horas en agitación constante. Las bacterias son purificadas mediante centrifugación a 5000 g durante 15 minutos y conservadas a -20°C o inmediatamente procesadas. La purificación del plásmido se llevó a cabo utilizando el kit PureLink™ Hi Pure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen). Por último, se cuantifica y verifica el grado de pureza y calidad del plásmido mediante espectrofotometría y se conserva a -20°C hasta su posterior utilización.



**Figura 4. Esquema del vector plasmídico.** Wlds-HA: secuencia codificante para la proteína Wld<sup>s</sup> con tag HA (Hemaglutinina) incorporado. CAG: *CMV IE enhancer - Chicken b-actin promoter*. WPRE: *Woodchuck post-transcriptional regulatory element*. PolyA: *Human growth hormone poly-A*. LITR: *left AAV-2 inverted terminal repeat*. RITR: *right AAV-2 inverted terminal repeat*. Amp<sup>+</sup>: gen de resistencia a la ampicilina. A ambos lados de la secuencia codificante se muestran las enzimas de restricción que poseen sitios de corte en los sitios de clonado.

#### 4.2.3. Transfección de células HEK-293

Células HEK-293 son cultivadas en placas de 100 mm, mantenidas con *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (D-MEM) suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS, Gibco) al 10%, Glutamax (Invitrogen) y antibióticos (Penicilina-Estreptomicina-Neomicina, Invitrogen). Una vez que los cultivos alcanzan una confluencia del 70%-80%, se procede con el protocolo de transfección mediante Lipofectamine LTX™ Reagent (Invitrogen), según las indicaciones del fabricante: se retira el medio de cultivo de cada placa y en su lugar se añade D-MEM sin complementos; luego se agrega por goteo 400 µl de la solución de plásmido-Lipofectamine (8 µg de plásmido y 16 µl de Lipofectamine por placa) y las células son incubadas a 37°C en un incubador de CO<sub>2</sub>. Transcurridas 6 horas, el medio se reemplaza por nuevo medio D-MEM suplementado y las células vuelven a ser incubadas durante 24 horas más para que continúen expresando la proteína.

La optimización del protocolo de transfección fue llevada a cabo a partir de células HEK-293 cultivadas en placas de 35 mm. Se mantuvo constante el volumen de Lipofectamine utilizado (2 µl) y se varió la cantidad de plásmido. Fueron testeadas 8 condiciones: 0.17, 0.33, 0.5, 0.67, 1, 1.3 1.5 y 2.6 µg de plásmido. La evaluación de la eficacia de transfección se llevó a cabo mediante ensayos de inmunofluorescencia según lo descrito en la siguiente sección. Una vez obtenidos los valores del protocolo optimizado, estos fueron adaptados al volumen de las placas de 100 mm.

#### **4.2.4. Ensayos de inmunofluorescencia**

Previo a sembrar las células HEK-293 en las placas, en el interior de estas se colocan vidrios tratados con poli-L-lisina. Finalizado el protocolo de transfección y habiendo permitido que las células expresasen la proteína, los vidrios son retirados de la placa y lavados brevemente con HBSS con calcio. Luego se procede a incubarlos en paraformaldehído al 4% (v/v), a 37°C durante 15 min, para la fijación de las células. Se procede con un lavado de 5 minutos con una solución de Buffer Fosfato Salino (PBS) y Tritón al 0.05% (v/v) y luego tres lavados de 5 minutos con PBS. Posteriormente se lleva a cabo la etapa de bloqueo incubando los vidrios en una solución de PBS y FBS al 10% (v/v), durante 30 min. Luego se procede con la incubación con el anticuerpo primario anti-tag HA policlonal hecho en conejo (Invitrogen, n° de catálogo: 71-5500) en concentración 1:250, *overnight* a 4°C. Luego se procede con tres lavados de 5 minutos con PBS y posteriormente con la incubación con el anticuerpo secundario conjugado Alexa 488 anti IgG de conejo (Invitrogen, n° de catálogo: 11008) en concentración 1:3000, durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación se realizan tres lavados de 5 minutos con PBS y se procede a incubar con Hoechst (Sigma) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se realiza un lavado por inmersión en H<sub>2</sub>O mQ y por último se procede a montar los vidrios en Gold Antifade (Invitrogen). Los preparados fueron observados mediante un microscopio Invertido Olympus BX61 con un objetivo de 60 X y 1,4 de apertura numérica. Las fotografías fueron tomadas mediante una cámara digital Olympus DP70 utilizando los mismos parámetros de exposición para todas las condiciones comprobables.

#### **4.2.5. Inmunoprecipitaciones**

Cada inmunoprecipitación fue llevada a cabo a partir de células HEK-293 transfectadas recogidas de dos placas de 100 mm con una confluencia aproximada del 90%. Las células plaqueadas son lavadas con HBSS sin calcio y luego despegadas mecánicamente mediante una pipeta Pasteur pulida a fuego. Las células en suspensión son posteriormente centrifugadas y lavadas con HBSS sin calcio. Se realiza una nueva centrifugación y finalmente se las resuspende en buffer NTEN (Tris pH 7.4 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, NP40 0.5%) suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas (5 mg/ml, Roche), nicotinamida (50 mM, Sigma) y Tricostatina (5 mM Enzo Life Sciences International). Luego se procede a homogeneizar las células para entonces centrifugar el homogenado a 10000 rpm, durante 10 min a 4°C. Se conserva el sobrenadante, del cual se cuantifica la proteína total recuperada mediante espectrometría (Pierce™ BCA Protein Assay Kit). Las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo incubando un volumen suficiente de sobrenadante para que hubiese 1 mg de proteína total, junto con 50 µl de proteína A-G Sepharosa (Santa Cruz Biotechnology Inc.) y 5 µg anticuerpo anti-tag HA monoclonal hecho en ratón (Abcam, n° de catálogo: ab18181), durante una hora a 4°C en agitación constante. Una vez finalizada la

inmunoprecipitación, se procede centrifugar brevemente y conservar el sobrenadante; esta fracción será el *Post IP* que permite evaluar la eficacia de la inmunoprecipitación. El inmunoprecipitado es lavado con buffer NETN para desestabilizar interacciones inespecíficas. Se centrifuga brevemente y descarta el sobrenadante. Se repite lo anterior tres veces. El Post-IP e inmunoprecipitado son procesados inmediatamente como se describe a continuación.

#### **4.2.6. Western Blots**

Para confirmar la presencia de Wld<sup>s</sup> en las fracciones de los homogenados (sobrenadante y pellet), en los inmunoprecipitados y en el sobrenadante recogido luego de la inmunoprecipitación, dichas muestras son eluidas en amortiguador de carga (Tris 62,5 mM pH 6.8, 2% Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), 10% glicerol, 10%  $\beta$ -ME, 0,01% azul de bromofenol) y calentadas a 100°C durante 1 minuto. Luego son cargadas gel de poliacrilamida discontinuo (SDS-PAGE) para electroforesis desnaturizante con entrecruzamiento del 10% para el gel resolutivo y de 5% para el gel concentrador. Una vez finalizada la corrida se procede a realizar la transferencia de proteínas a una membrana de Polifluoruro de Vinilideno (PVDF). La membrana es bloqueada mediante incubación en solución de *Tris-buffered saline with Tween* (TBST) y leche en polvo descremada al 5% durante una hora. Posteriormente se procede con un lavado de 5 minutos con TBST y con la incubación con anticuerpo primario anti-*tag* HA policlonal hecho en conejo (Invitrogen, n° de catálogo: 71-5500), en concentración 1:1000, *overnight* a 4°C en agitación constante. A ello le suceden tres lavados de 5 minutos con TBST y luego la incubación con proteína A-HRP (GE Healthcare, Amersham) en concentración 1:5000 durante una hora. Luego de tres lavados de 5 minutos con TBST se procede a revelar con Novex® ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante.

Para verificar la presencia de SIRT1 en los inmunoprecipitados se llevó a cabo el *stripping* de una membrana para la cual se había confirmado la presencia de Wld<sup>s</sup>. Para ello la membrana es incubada con guanidina 7 M, durante 15 minutos agitación constante a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, se lava la membrana con abundante H<sub>2</sub>O mQ y posteriormente con TBST. A continuación se procede con el Western Blot pero utilizando como anticuerpo primario un anti-SIRT1 policlonal hecho en conejo (Abcam, n° de catálogo: ab12193).

# 5. Resultados y discusión

---

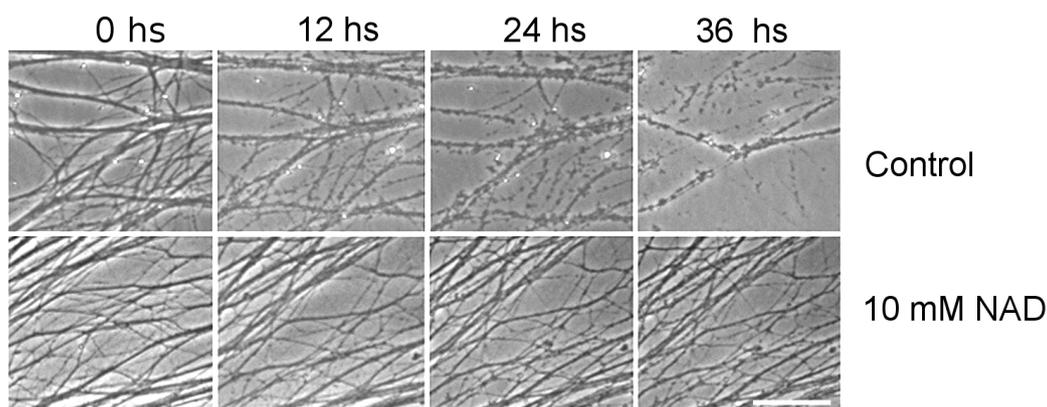
## 5.1. Estudio del efecto del resveratrol en la Degeneración Walleriana

### 5.1.1. Cuantificación de la degeneración axonal

En lo que refiere a la Degeneración Walleriana (DW), un posible efecto neuroprotector se evalúa en base a diferencias en el grado de degeneración axonal. Siendo así, resulta imprescindible especificar el método mediante el cual se cuantificará dicho parámetro y si es posible, las consideraciones que deben tenerse para con este a la hora de interpretar los resultados.

Estudios previos han demostrado que el tratamiento con NAD<sup>+</sup> a concentraciones elevadas (e.g. 5 y 20 mM) ejerce un efecto neuroprotector en modelos de DW *in vitro* (Wang et al, 2005). En esta pasantía, dicha condición fue utilizada como referencia de *efecto neuroprotector*, a partir de la cual se evaluó la precisión de los posibles métodos de cuantificación de degeneración axonal a utilizar.

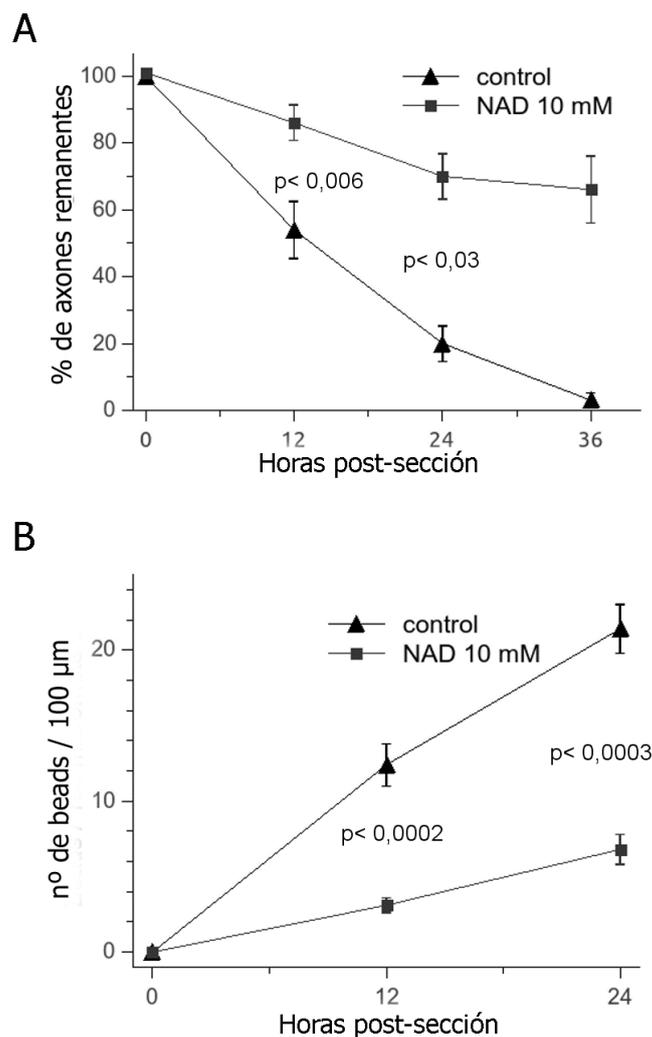
Se cultivaron ganglios de la raíz dorsal (DRG) *in vitro* y se les indujo DW, según lo descrito en *Materiales y Métodos*. La Figura 5 muestra el seguimiento temporal de la degeneración axonal de neuronas no tratadas (Control) y de neuronas tratadas con NAD<sup>+</sup> 10 mM. Para cada condición se muestra un mismo campo axonal fotografiado en los tiempos 0, 12, 24 y 36 horas post- sección de los axones.



**Figura 5. Seguimiento temporal de Degeneración Walleriana de neuronas cultivadas *in vitro*.** Se compara la degeneración en neuronas no tratadas (Control) y tratadas con NAD<sup>+</sup> 10 mM. Obsérvese el efecto neuroprotector ejercido por el tratamiento con NAD<sup>+</sup>. La barra representa 50  $\mu$ m.

En la Figura 5 es posible observar los cambios morfológicos que sufren los axones en proceso de DW, en las primeras horas post-sección. En particular, se destaca el efecto neuroprotector del tratamiento con NAD<sup>+</sup> a concentración elevada.

El grado de degeneración axonal fue medido mediante dos criterios diferentes. Uno de ellos se basa en la distinción entre “axones sanos” y “axones degenerados” según parámetros morfológicos (Araki et al, 2004; Wang et al, 2005). El otro se basa en la presencia de *beads* a lo largo de una cierta distancia del axón -distenciones locales del axolema que representan uno de los primeros signos de degeneración axonal (Kilinc et al, 2008)-. Las Figuras 6 A y B representan la cuantificación de la degeneración axonal llevada a cabo según uno y otro criterio, respectivamente.



**Figura 6. Cuantificación de la degeneración axonal según dos criterios alternativos.** **A.** Grado de degeneración axonal expresada como porcentaje de “axones sanos” remanentes post-sección respecto al número de axones pre-sección; cada punto en el gráfico representa el valor de la media de un grupo de axones representativos a diferentes tiempos. **B.** Grado de degeneración axonal de los mismos campos axonales pero en base a la presencia de *beads*; cada punto en el gráfico representa el número de *beads* presentes en 100 μm del largo de un grupo de axones representativos. Las barras en A y B representan el EEM.

Si bien se observa una clara correlación entre los resultados obtenidos por ambos criterios, el que se basa en el número de *beads* a lo largo del axón presenta ciertas ventajas. Primero, la cuantificación de *beads* permite que en un mismo “axón degenerado” puedan identificarse diferentes grados de degeneración. Esto permite diferenciar con mayor eficiencia eventos degenerativos tempranos; de hecho, en las Figuras 6 A y B se observa que las diferencias entre el grado de degeneración que presentan los axones de neuronas no tratadas y los de neuronas tratadas con NAD<sup>+</sup>, resultan más significativas -presentan un p valor menor- cuando se utiliza el criterio en base a la presencia de *beads*.

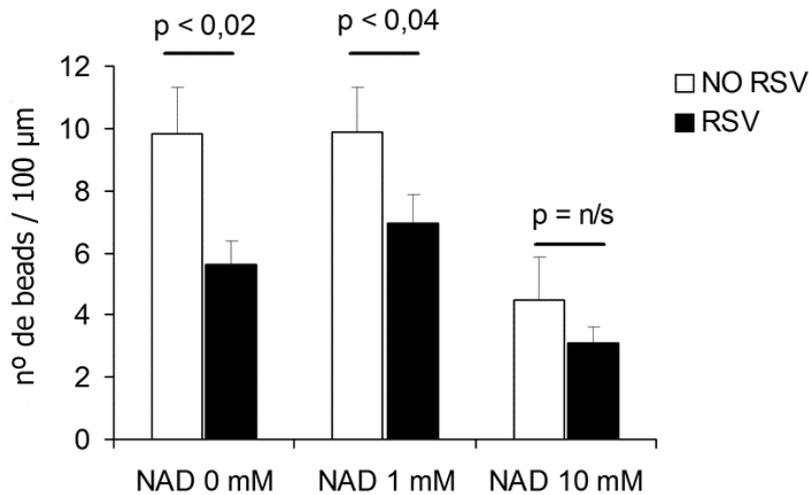
Por otro lado, la degeneración axonal suele verse influenciada por varias condiciones experimentales como los componentes del medio de cultivo, la edad de los animales a partir de los cuales se obtuvieron las neuronas o el tiempo de su cultivo *in vitro*, entre otros. Esto hace que se dificulte la comparación de resultados; no obstante, incluso si las condiciones fueran las mismas, diferencias en el criterio utilizado para evaluar la cuantificación axonal o incluso en lo que se considera como un axón “sano” o uno “degenerante”, pueden llevar a resultados contradictorios. Podría este ser el caso del efecto del resveratrol en el curso de la DW, del cual se ha reportado un efecto tanto neuroprotector, como nulo o incluso deletéreo (Araki et al., 2004; Conforti et al., 2007b; Suzuki & Koike, 2007). Ante ello, la definición de “*bead*” resulta menos ambigua y de este modo, se trata de un criterio no tan subjetivo, permitiendo una comparación más valedera de datos registrados por observadores diferentes.

### **5.1.2. Evaluación del efecto neuroprotector del resveratrol**

Dado que el efecto del resveratrol en la Degeneración Walleriana es aún un tema controversial, resulta pertinente llevar a cabo nuevos estudios sobre este asunto. Se procedió entonces a evaluar el posible efecto neuroprotector del resveratrol tomando como referencia al efecto neuroprotector ejercido por el tratamiento con NAD<sup>+</sup> a concentración elevada, registrado anteriormente.

Se trabajó con explantos de DRG cultivados *in vitro* tratados con RSV 4 horas previo a la sección de los axones, en tres condiciones: sin tratamiento con NAD<sup>+</sup>; tratamiento con NAD<sup>+</sup> 1 mM, cuyo efecto neuroprotector es controversial (Araki et al., 2004; Wang et al, 2005, Conforti et al., 2007b); y tratamiento con NAD<sup>+</sup> 10 mM, cuyo efecto neuroprotector se registró anteriormente (Wang et al, 2005; véase Figura 5). Para los detalles de cada tratamiento, véase Materiales y Métodos.

La Figura 7 muestra el grado de degeneración axonal a las 12 horas post-sección de los axones cultivados en las condiciones recién descritas, en función del número de *beads* presentes a lo largo del axón.



**Figura 7. Efecto del resveratrol en la degeneración Walleriana.** Se muestra la cuantificación de la degeneración axonal 12 horas post-sección de DRG tratados con diferentes concentraciones de NAD<sup>+</sup>: 0 mM, 1 mM y 10 mM. En cada grupo se compara la degeneración axonal observada cuando los DRG además fueron tratados con RSV 50 µM durante 4 horas previo a la sección de los axones. Las barras corresponden al EEM.

En la Figura 7 se observa cómo, en concordancia con lo descrito por Wang et al. (2005), el tratamiento con NAD<sup>+</sup> solo ejerce un efecto neuroprotector cuando es en concentración elevada. Se observa además que el tratamiento con RSV a 50 µM ejerce un efecto neuroprotector por sí mismo: tanto en neuronas que no fueron tratadas con NAD<sup>+</sup> como en aquellas tratadas con NAD<sup>+</sup> a baja concentración se observa una disminución significativa del grado de degeneración axonal.

Por otra parte, cuando los explantos fueron tratados con NAD<sup>+</sup> 10 mM y RSV, el efecto neuroprotector observado no es significativamente diferente al ejercido por el tratamiento con NAD<sup>+</sup> 10 mM solo. A pesar de que cuando se realizan ambos tratamientos se observa una cierta mejora del efecto neuroprotector del tratamiento con RSV, definir qué tipo de relación existe entre ambos tratamientos, si uno enmascara al otro o si en cambio resultan en un efecto sinérgico, requiere de otros experimentos que exceden las expectativas de esta pasantía.

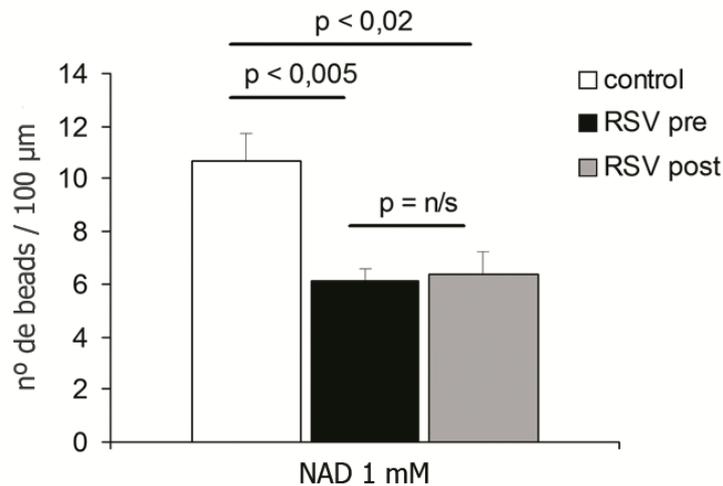
El efecto neuroprotector de RSV observado en la Figura 7 no concuerda con el efecto nulo descrito por Conforti et al. (2007b). Dicho estudio fue llevado a cabo utilizando el mismo modelo aquí planteado (neuronas de DRG cultivadas in vitro e inducción de DW por sección de axones) pero el tratamiento con RSV se realizó a concentración 100 µM y 24 horas previo de la sección de los axones. Las diferencias observadas podrían entonces deberse a las diferencias en la concentración y el tiempo del tratamiento.

En cuanto a la concentración; se ha observado que el tratamiento con RSV en concentración 100  $\mu\text{M}$  afecta la respiración mitocondrial, disminuyéndola a un 60% de la capacidad total; valor cercano al observado por tratamiento con el inhibidor de la cadena de transporte de electrones mitocondrial Oligomicina, en concentración 5  $\mu\text{M}$  (Nin et al., 2012, Material Suplementario). En particular, se ha mostrado que el RSV inhibe la actividad de la ATPsintasa (F1Fo-ATPasa) al unirse a la subunidad  $\gamma$  del complejo F1 (Zheng & Ramirez, 2000, Gledhill et al., 2007). El efecto de RSV sobre la respiración mitocondrial tiene como resultado la disminución de la relación ATP/AMP, con la consecuente la activación de AMPK, proteína clave en la respuesta al estrés celular. Sin embargo, este efecto de RSV sobre AMPK depende de la dosis administrada; cuando la concentración de RSV es menor a 10  $\mu\text{M}$ , no ocurre la activación de dicha quinasa, pero sí de otros blancos de este compuesto (Price et al., 2012). Estos datos sugieren que el efecto neuroprotector del RSV podría ser dependiente de la concentración utilizada, según si esta es o no suficiente para activar AMPK, y brinda una explicación a las diferencias encontradas entre los resultados aquí observados y los reportados por Conforti.

Sobre el tiempo del tratamiento, Suzuki & Koike (2007) observaron que el tratamiento con RSV con más de 24 horas de incubación resulta adverso. Aunque estos resultados fueron obtenidos a partir de otro modelo (neuronas granulosas de cerebelo cultivadas in vitro e inducción de DW mediante tratamiento con colchicina), son datos que sugieren una relación entre el efecto del RSV en la DW y la duración del tratamiento. Por ejemplo, los resultados observados en la Figura 7 coinciden con los reportados por Araki et al. (2004); pero esta concordancia es difícil de analizar de forma estricta si consideramos lo recién discutido. En el mencionado trabajo, se plantea que el tratamiento con RSV (10, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ) “previo a la sección de los axones” ejerce un efecto neuroprotector, pero no se especifica el tiempo de incubación, haciéndose imposible una adecuada comparación de datos.

Dado que las bases moleculares de los efectos ejercidos por resveratrol se desconocen, especificar las condiciones en las que se llevan a cabo cada tratamiento resulta imprescindible para una primera aproximación a las mismas. Las diferencias en el efecto observado según el tiempo de incubación pueden dirigir la atención a vías cuya modificación durante determinado tiempo se vuelva adversa. También surge la interrogante de si diferencias en el momento del tratamiento también influya en el efecto del resveratrol, lo cual podría sugerir si están o no involucrados cambios en la expresión génica.

Ante esta interrogante en particular, se procedió a evaluar si el efecto neuroprotector del RSV a 50  $\mu\text{M}$  también se observaba si el tratamiento era realizado después de la sección de los axones. La Figura 8 muestra el grado de degeneración axonal a las 12 horas post-sección de los axones de neuronas tratadas con  $\text{NAD}^+$  1 mM y con RSV 50  $\mu\text{M}$  previo a la sección de los axones o inmediatamente después de la misma.



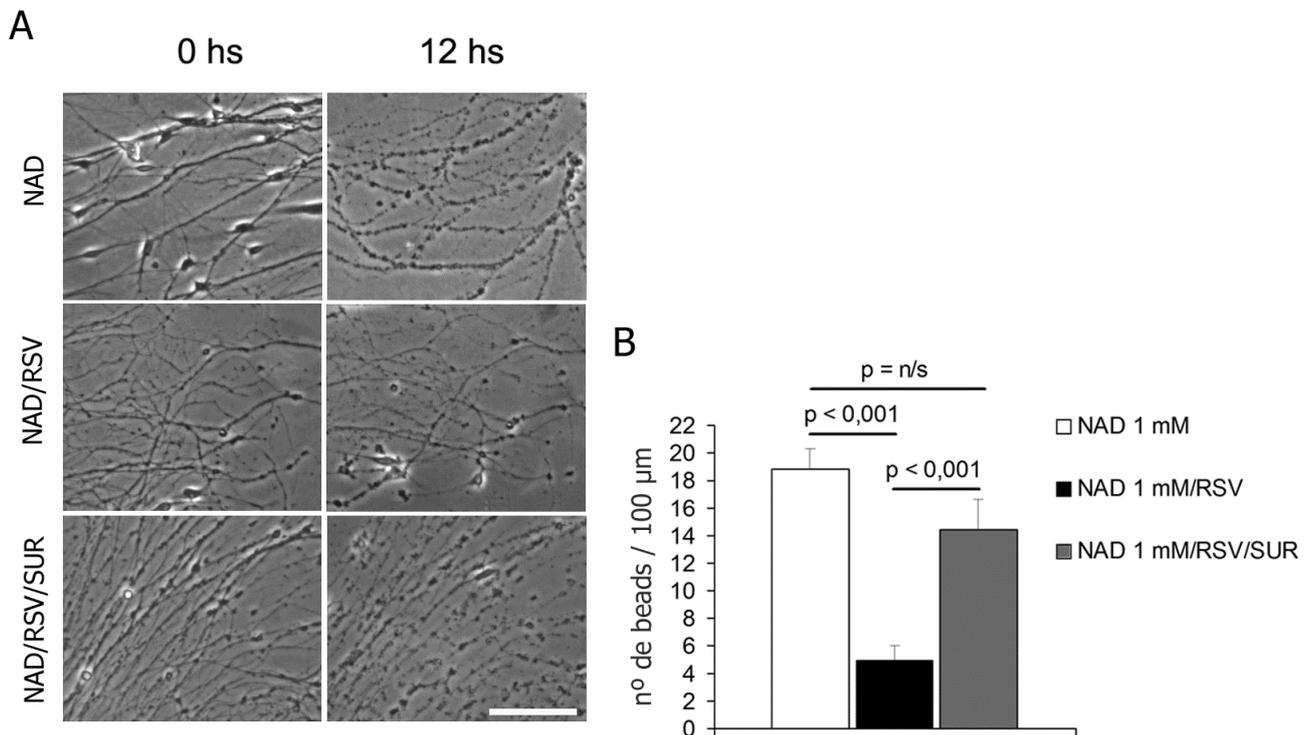
**Figura 8. Influencia del momento del tratamiento con resveratrol sobre el efecto neuroprotector observado.** Cuantificación de la degeneración axonal 12 horas post-sección de axones de neuronas tratadas con NAD<sup>+</sup> 1mM. Se evaluó el efecto del tratamiento con RSV 50 µM inmediatamente después de la sección de los axones respecto al tratamiento previo a la sección ya registrado. Las barras representan el EEM.

En la Figura 8 es posible observar cómo el efecto neuroprotector del tratamiento con RSV previo a la sección de los axones no presenta diferencias significativas del efecto del tratamiento inmediatamente después de esta. Esto sugiere que el RSV debería estar ejerciendo un efecto local, independiente de cambios en la expresión génica o de un posible efecto sobre proteínas presentes en el núcleo o soma neuronal.

### 5.1.3. Participación de SIRT1 en el efecto neuroprotector ejercido por resveratrol

Como se describió en la sección *Introducción*, entre los diversos mecanismos propuestos para explicar los efectos del resveratrol, recurrentemente se hace referencia a SIRT1, una desacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup>. Como a nivel del sistema nervioso la activación de SIRT1 ha mostrado ejercer efectos beneficiosos en una amplia gama de modelos de enfermedades neurodegenerativas (Zhang et al., 2011), representa un candidato interesante en cuanto a participar en la neuroprotección ejercida por resveratrol. Para evaluar tal hipótesis, se procedió a estudiar qué sucedía con el efecto neuroprotector de resveratrol cuando los cultivos de DRG eran simultáneamente tratados con suramina (SUR), un inhibidor de SIRT1 (Trapp et al, 2007).

La Figura 9 muestra fotografías al momento y a las 12 horas post-sección de los axones, de los tres grupos de DRG evaluados: unas tratadas solo con NAD<sup>+</sup> 1 mM, tratamiento que no ejerce neuroprotección (Wang et al., 2005, Conforti et al. 2007, véase *Figura 7*); otras con NAD<sup>+</sup> 1 mM y RSV, condición en la que previamente se registró neuroprotección (véase *Figura 7*); y otras tratadas con NAD<sup>+</sup> 1 mM, RSV y SUR. Adyacente se muestra la cuantificación del grado de degeneración axonal a las 12 horas post-sección de los axones.



**Figura 9: Participación de SIRT1 en el efecto neuroprotector de resveratrol.** A. Campos axonales fotografiados a las 0 y 12 horas post-sección de axones de neuronas tratados con NAD<sup>+</sup> 1 mM, tratados con NAD<sup>+</sup> 1 mM y RSV 50 µM y tratados con NAD<sup>+</sup> 1 mM, RSV 50 µM y suramina 100 µM. La barra corresponde a 50 µm. B. Cuantificación de la degeneración axonal 12 horas post-sección de 10 a 16 campos axonales diferentes para cada condición (de 4 a 6 animales diferentes). Las barras representan el EEM.

En la Figura 9 queda evidenciado cómo el tratamiento con suramina revierte de forma considerable el efecto neuroprotector ejercido por RSV, registrándose una degeneración axonal similar a la observada en axones de neuronas control. Esto sugiere que SIRT1 podría estar involucrada en el efecto neuroprotector que ejerce el resveratrol en la Degeneración Walleriana.

Dado que el efecto neuroprotector del resveratrol mostró tener un carácter local (véase *Figura 8*), la participación de SIRT1 entonces debería involucrar la actividad desacetilasa sobre blancos citosólicos. A pesar de que este tipo de blancos aún no han sido identificados y de que esta enzima normalmente se reporta como una proteína exclusivamente nuclear, observada principalmente en la cromatina y excluida del nucléolo (Langley et al, 2002; Sundararajan et al, 2005), es necesario destacar que SIRT1 sí ha sido observada fuera del núcleo (Aquilano et al, 2010) y en particular, nosotros logramos observarla en el citoplasma de explantos de DRG cultivados *in vitro*, tanto a nivel del soma como del axón (Calliari et al., 2013).

En este mismo trabajo encontramos que el resveratrol induce la disociación de SIRT1 de su inhibidor endógeno DBC1 en neuronas de DRG, y que el efecto neuroprotector observado puede ser recapitulado por el KO de DBC1. En esta situación, SIRT1 se encuentra constitutivamente activa (Escande et al., 2010) y pudimos observar que el tratamiento con resveratrol no tiene un efecto aditivo en la neuroprotección. En suma, estos datos nos llevan a pensar que el resveratrol podría ejercer su efecto neuroprotector mediante la activación de SIRT1 al promover la disociación de su inhibidor DBC1, y que este hecho debe ocurrir a nivel de los axones. El trabajo completo que incluye los resultados hasta aquí mostrados en este informe, junto con los recién mencionados, se encuentra en el *Anexo 1*.

## **5.2. Expresión y purificación de la proteína Wld<sup>s</sup> en un sistema eucariota: primera etapa en el estudio de su efecto neuroprotector**

### **5.2.1. Caracterización y producción del vector plasmídico**

Como se describió anteriormente, la expresión de la proteína Wld<sup>s</sup> determina un enlentecimiento de la Degeneración Walleriana. Dado que al día de la fecha no se han descrito vías de regulación metabólica que tengan en Wld<sup>s</sup> un efector o un blanco, en esta pasantía se aspiró a llevar a cabo los pasos iniciales para la identificación de interactores de Wld<sup>s</sup> que estén potencialmente involucrados en el mecanismo de neuroprotección mencionado.

La expresión de Wld<sup>s</sup> en el sistema eucariota (células HEK-293) se llevó a cabo mediante la transfección de un vector plasmídico, cortesía de Zhigang He (Division of Neuroscience, Children's Hospital, Harvard Medical School; Wang et al., 2005). Para confirmar que el plásmido contenía efectivamente la secuencia correspondiente a Wld<sup>s</sup>, se llevó a cabo la secuenciación de la región codificante ubicada entre los sitios de clonado, según lo descrito en *Materiales y Métodos*.

La región codificante resultó ser una secuencia de 1146 pares de bases. Esto coincide con el número esperado para la proteína Wld<sup>s</sup> junto al *tag*-HA que tiene añadido. De todos modos, se procedió a alinear la secuencia obtenida con la secuencia codificante (CDS) de Wld<sup>s</sup> contenida en la base de datos del GenBank. La Figura 10 muestra una porción de dicho alineamiento, así como también el alineamiento de la secuencia obtenida con la CDS de Ube4b y con la secuencia completa de Nmnat1. Se verifica que el fragmento secuenciado del vector corresponde a la secuencia de Wld<sup>s</sup>, con un porcentaje de coincidencia del 99%. A su vez, el alineamiento con las secuencias de Ube4b y Nmnat1, ambos con una coincidencia de 99%, permite identificar qué parte de la secuencia de Wld<sup>s</sup> corresponde a dichas proteínas. Tal análisis concuerda con lo descrito en la literatura (Coleman et al., 1998) y se muestra en el *Anexo 2*.

**A**

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2056 bits(1113)	0.0	1117/1119(99%)	0/1119(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGAGGAGCTGAGCGCTGACGAGATTCGACGGAGGCGCCTGGCACGACTTGCTGGTGGGA			60
Sbjct 1	ATGGAGGAGCTGAGCGCTGACGAGATTCGACGGAGGCGCCTGGCACGACTTGCTGGTGGGA			60
Query 61	CAGACCTCCCAGCCGACC	• • •	CAGAGGCCAAGCACCAACCATTCCACTCTG	1119
Sbjct 61	CAGACCTCCCAGCCGACC		CAGAGGCCAAGCACCAACCATTCCACTCTG	1119

**B**

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
385 bits(208)	4e-110	210/211(99%)	0/211(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGAGGAGCTGAGCGCTGACGAGATTCGACGGAGGCGCCTGGCACGACTTGCTGGTGGGA			60
Sbjct 1	ATGGAGGAGCTGAGCGCTGACGAGATTCGACGGAGGCGCCTGGCACGACTTGCTGGTGGGA			60
Query 61	CAGACCTCCCAGCCGACCACCCCGCT	• • •	ACCTCCCCCATAGGTGCAGCAG	211
Sbjct 61	CAGACCTCCCAGCCGACCACCCCGCT		ACCTCCCCCATAGGTGCAGCAG	211

**C**

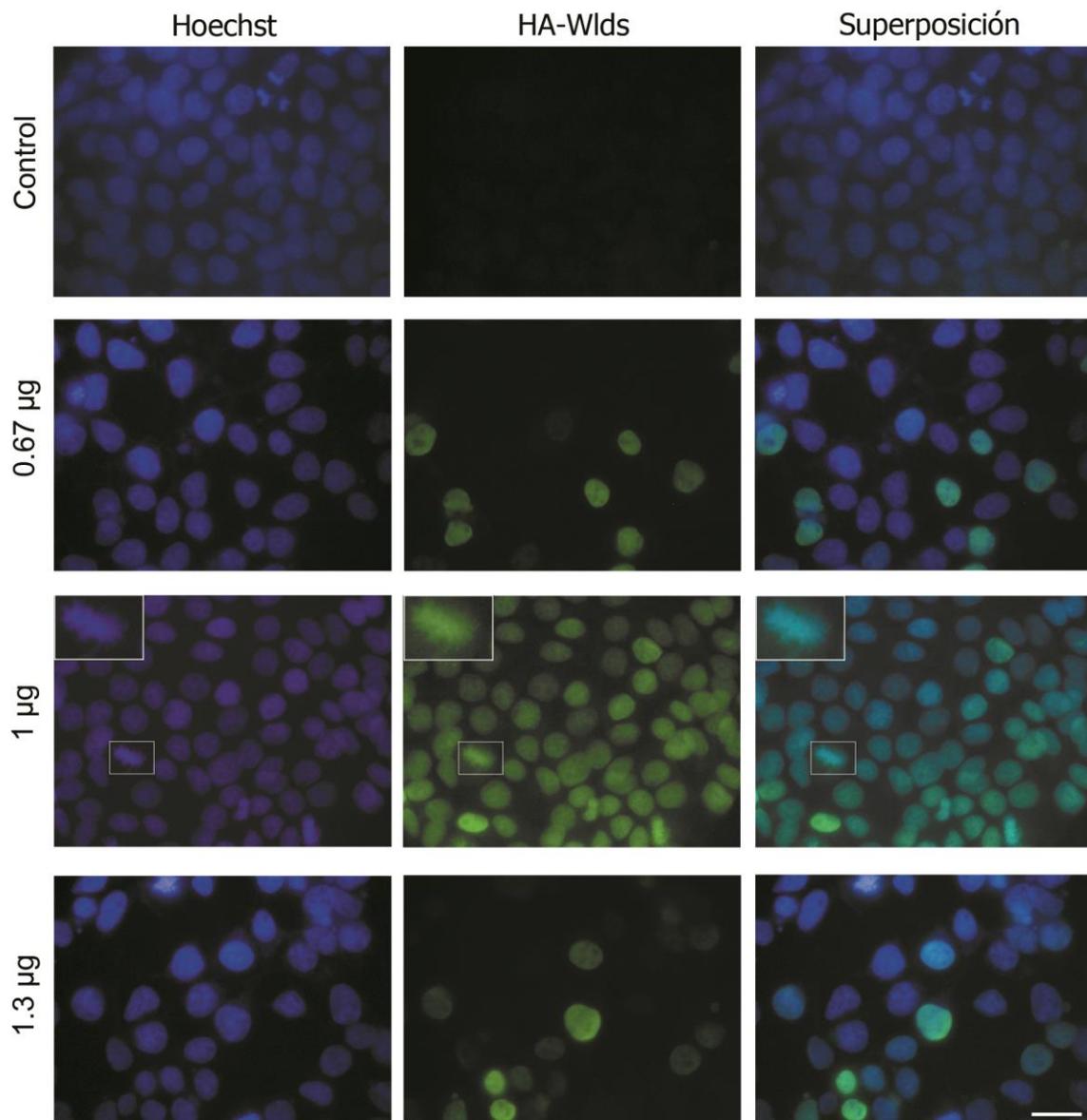
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1674 bits(906)	0.0	908/909(99%)	0/909(0%)	Plus/Plus
Query 34	GACAACATCGCTGTTCAGAGGGTTGCATGTAGGTCAACACCACCAACTTCTCCCCATGGAC			93
Sbjct 211	GACAACATCGCTGTTCAGAGGGTTGCATGTAGGTCAACACCACCAACTTCTCCCCATGGAC			270
Query 94	TCATCCAAGAAGACAGAGGTGGTTCTCCTGGCC	• • •		TCCACTCTG 942
Sbjct 271	TCATCCAAGAAGACAGAGGTGGTTCTCCTGGCC			TCCACTCTG 1119

**Figura 10: Confirmación de la secuencia de Wld<sup>S</sup> en el vector plasmídico.** Fracción de alineamientos del fragmento secuenciado con secuencias contenidas en bases de datos. A. Query: CDS de Wld<sup>S</sup> (GenBank); B. Query: CDS de Ube4b (NCBI). C. Query: Secuencia completa de Nmnat1 (NCBI). En A, B y C. Subject: Fragmento secuenciado.

Una vez confirmada la secuencia se procedió a transformar bacterias con el vector plasmídico, con el fin de obtener una cantidad suficiente para realizar los experimentos de transfección. La transformación y posterior purificación del plásmido se llevó a cabo según lo descrito en *Materiales y Métodos*. A partir de varias purificaciones, se obtuvo un total de 456 µg de plásmido con considerable pureza, mostrando un  $A_{260}/A_{280}$  de 1,96 y un  $A_{260}/A_{230}$  de 2,33.

### 5.2.2. Transfección de células HEK-293 con el vector producido

Una vez que los cultivos de HEK-293 alcanzaban una confluencia del 70%-80%, se procedía a realizar el protocolo de transfección con el vector plasmídico mediante Lipofectamine. La cantidad de plásmido necesaria para lograr una eficiencia de transfección óptima se obtuvo variando las condiciones experimentales y evaluando la eficiencia mediante ensayos de inmunofluorescencia. Fueron testeadas 8 condiciones: 0.17, 0.33, 0.5, 0.67, 1, 1.3 1.5 y 2.6  $\mu\text{g}$  de plásmido. La Figura 11 muestra campos representativos de las células transfectadas con diferentes cantidades de plásmido.



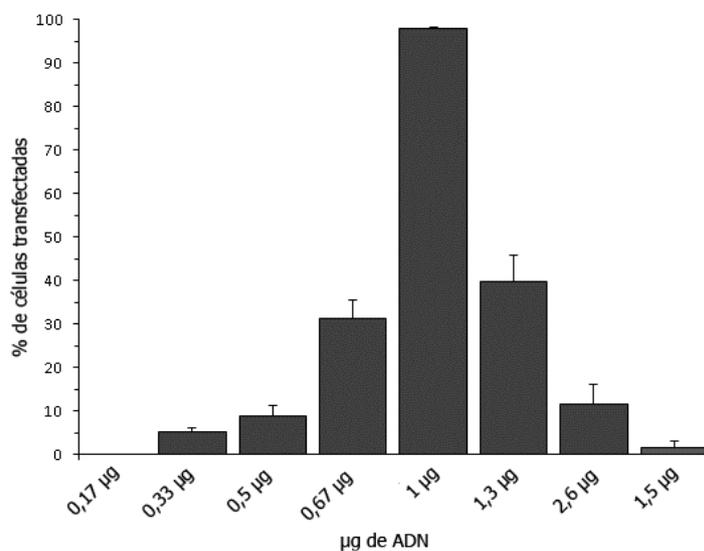
**Figura 11: Evaluación de eficacia de transfección mediante ensayos de inmunofluorescencia.** Fotografías representativas de HEK-293 transfectadas según 4 condiciones experimentales: 0  $\mu\text{g}$  de ADN (Control), 0.67  $\mu\text{g}$  de ADN, 1  $\mu\text{g}$  de ADN y 1.3  $\mu\text{g}$  de ADN. El volumen de Lipofectamine siempre fue 2  $\mu\text{l}$ . Se muestra la marcación del ADN con Hoechst (azul), la marcación de Wld<sup>s</sup> mediante un anticuerpo anti-tag HA (verde) y la superposición de estas dos últimas. El recuadro blanco señala una célula con cromosomas mitóticos y en la esquina superior izquierda se muestra su magnificación; nótese cómo la marcación de Wld<sup>s</sup> coincide con la del ADN. La barra representa 20  $\mu\text{m}$ .

Consecuente con lo descrito en la literatura, Wld<sup>s</sup> se observa principalmente en el núcleo, con una expresión muy baja en el citoplasma (Mack et al., 2001); También se observa que la proteína parece estar asociada a la cromatina, ya que en células en las que se distinguen cromosomas mitóticos, la marcación de Wld<sup>s</sup> corresponde mayormente a su forma (véase recuadro blanco en condición 1 µg de Figura 11).

La Tabla 1 muestra la eficacia de transfección para cada condición experimental y la Figura 12 muestra la representación gráfica de los datos de la tabla. Se observa que la transfección con 1 µg de ADN y 2 µl de Lipofectamine resultó la más eficiente, con un porcentaje cercano al 100%.

**Tabla 1. Cuantificación de la Eficacia de transfección.** Eficacia de transfección expresada como el porcentaje de células transfectadas respecto a las células totales. Cada dato resume el registro de 4 campos con 50 a 150 células para cada condición experimental.

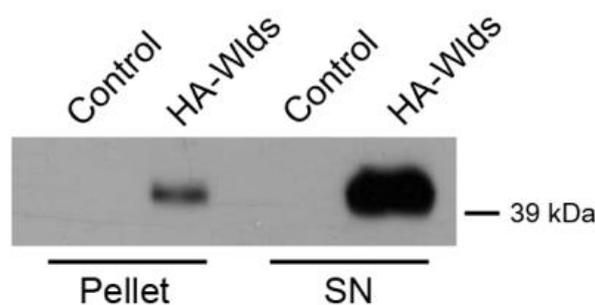
µg ADN	Porcentaje de transfección	Desvío estándar	Error estándar de la media
0.17 µg	0	0	0
0.33 µg	5,14	1,67	0,83
0.5 µg	8,93	4,67	2,34
0.67 µg	31,39	8,00	4,00
1 µg	97,87	0,88	0,44
1.3 µg	39,84	11,88	5,94
1.5 µg	11,66	8,89	4,45
2.6 µg	1,50	2,59	1,50



**Figura 12. Eficacia de transfección.** Representación gráfica de los datos de la Tabla 1. Las barras representan el EEM.

### 5.2.3. Aislamiento de Wld<sup>s</sup> y sus proteínas asociadas mediante Inmunoprecipitación

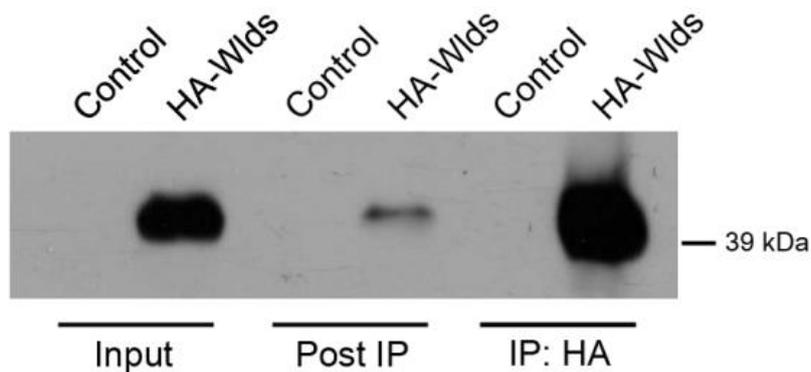
Las células transfectadas con el protocolo optimizado así como otras en las que no se incluyó plásmido en el protocolo de transfección (control) permanecían en cultivo durante 24 horas para permitir que expresaran la proteína Wld<sup>s</sup>, y luego se procedía a homogeneizarlas y centrifugarlas. Dado que la Wld<sup>s</sup> presenta mayormente una localización nuclear (Mack et al., 2001) y en particular se observó lo que podría ser una asociación al ADN (véase Figura 11), era posible una parte de ella permaneciera en el pellet del homogenado. Como las inmunoprecipitaciones se llevan a cabo a partir del sobrenadante, resultó necesario evaluar si la proteína efectivamente se hallaba presente en esta fracción o si era necesario un mayor tratamiento de los homogenados previo a la centrifugación. Se llevó a cabo un Western Blot del pellet y sobrenadante de las células, según lo descrito en *Materiales y Métodos*. El resultado se observa en la Figura 13.



**Figura 13. Presencia de Wld<sup>s</sup> en los homogenados.** Western Blot de pellet y sobrenadante (SN) de homogenados de células transfectadas con el plásmido (HA-Wlds) y sin el plásmido (control). Se utilizó como anticuerpo primario un anti-tag HA y se reveló por quimioluminiscencia.

A partir del estudio de la secuencia de Wld<sup>s</sup> y su tag-HA adyacente, el peso molecular estimado es de la proteína expresada es de 42.56 kDa. El que las bandas observadas en las fracciones de células transfectadas se encuentren cercanas a los 39 kDa, confirman que la proteína identificada mediante el anticuerpo utilizado es efectivamente Wld<sup>s</sup>. Además, el Western Blot muestra cómo parte de la proteína aún permanece en el pellet del homogenado. Esto puede ser resultado de la asociación al ADN, previamente mencionada, situación en la que la proteína no sería del todo recuperada mediante un buffer con detergente no iónico como el utilizado (véase *Materiales y Métodos*). También puede deberse a que la sobreexpresión de la proteína haya provocado su agregación y precipitación. En cualquier caso, la fracción presente en el sobrenadante parece suficiente para llevar a cabo las inmunoprecipitaciones.

Las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo con anticuerpo anti-tag HA según lo descrito en *Materiales y Métodos*. La presencia de Wld<sup>s</sup> en los inmunoprecipitados de células transfectadas fue confirmada mediante Western Blot, como muestra la Figura 14.



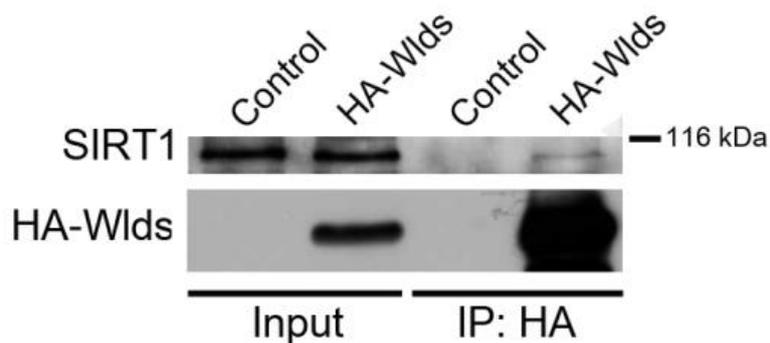
**Figura 14. Presencia de Wld<sup>S</sup> en los inmunoprecipitados.** Western Blot de células transfectadas con el plásmido (HA-Wlds) y sin el plásmido (control). Se evaluaron para ambos casos el sobrenadante de homogenado (Input), el sobrenadante recogido luego de la inmunoprecipitación (Post IP) y el inmunoprecipitado con anticuerpo anti-tag HA (IP: HA). Se utilizó como anticuerpo primario un anti-tag HA diferente al utilizado para la inmunoprecipitación para obtener una señal más limpia y evitar la presencia de bandas correspondientes a las inmunoglobulinas utilizadas para inmunoprecipitar. Se reveló por quimioluminiscencia.

En la Figura 14 se observa una banda en las muestras correspondientes a las células transfectadas cercana a 39 kDa, que representa la proteína Wld<sup>S</sup>. Se confirma la presencia de la proteína en el inmunoprecipitado. La banda tenue que aparece en el carril correspondiente al sobrenadante post inmunoprecipitación (Post IP, véase *Materiales y Métodos*) evidencia que la eficacia de la inmunoprecipitación fue buena, aunque aún puede ser mejorada.

Una vez confirmada la presencia de Wld<sup>S</sup> en los inmunoprecipitados, se puede proceder a llevar a cabo la identificación de las proteínas que co-inmunoprecipitan junto a ella. La co-inmunoprecipitación indica la asociación física de tales proteínas con Wld<sup>S</sup> y pueden tratarse de interactores potencialmente involucrados en el efecto neuroprotector que esta ejerce. La identificación de tales interactores puede realizarse mediante espectrometría de masa, experimentos que se pretende realizar en un futuro. Aunque dichos resultados quedarán por fuera de lo presentado en esta pasantía, es posible llevar a cabo una primera aproximación mediante ensayos por Western Blot contra proteínas candidatas.

Es por ejemplo el caso de SIRT1, de la cual en la primera sección de resultados de esta pasantía se mostró que podría tener una participación en el efecto neuroprotector ejercido por RSV. De hecho, esta ha sido propuesta como la responsable del fenotipo observado en las cepas mutantes *wld<sup>S</sup>* (Araki et al., 2004), y aunque esta hipótesis fue también rechazada (Wang et al., 2005), aquí se procedió a probar detectarla en los inmunoprecipitados de Wld<sup>S</sup>.

La membrana utilizada para un Western Blot como el que se muestra en la Figura 14 fue procesada de modo de retirar los anticuerpos previamente utilizados y poder realizar un nuevo Western Blot con un anticuerpo anti-SIRT1 (véase <<stripping>> en *Materiales y Métodos*). El resultado de este nuevo Western Blot se muestra en la Figura 15.



**Figura 15. Presencia de SIRT1 en los inmunoprecipitados de Wld<sup>s</sup>.** Western Blot de células transfectadas con el plásmido (HA-Wlds) y sin el plásmido (control). Se evaluaron para ambos casos el sobrenadante de homogenado (Input) y el inmunoprecipitado con anticuerpo anti-tag HA (IP: HA). Se utilizó como anticuerpo primario un anti-SIRT1 y se reveló por quimioluminiscencia.

En la Figura 15 es posible observar como en los input de muestras tanto transfectadas como control aparece una banda cercana a los 116 kDa, correspondiente a SIRT1 (cuyo peso aparente es 110 kDa). Además, esta banda también se observa en el inmunoprecipitado de las muestras que habían sido transfectadas para expresar Wld<sup>s</sup>, pero no en aquellas correspondientes a las células control. Esto indica que SIRT1 es un interactante de Wld<sup>s</sup> y dada su participación en el efecto neuroprotector que ejerce el resveratrol, podría entonces tratarse de una candidata a participar en la neuroprotección ejercida por Wld<sup>s</sup>.

Caracterizar la interacción entre Wld<sup>s</sup> y SIRT1 requiere de estudios detallados a nivel estructural. Sin embargo, el hecho que la actividad desacetilasa de SIRT1 sea dependiente de NAD<sup>+</sup>, conduce rápidamente a pensar que la porción de Wld<sup>s</sup> involucrada en esta interacción es la correspondiente a NMNAT-1, productora de dicho cofactor. Respecto a lo anterior, en 2009 Zhang et al. observaron la co-localización e interacción de NMNAT-1 con SIRT1 en la cromatina, sumándose a la lista de otros trabajos en los que se muestra efectivamente que la actividad de SIRT1 puede ser regulada por la acción de enzimas biosintéticas de NAD<sup>+</sup>, como NMNAT-1 (Revollo et al., 2004; van der Veer et al., 2007; Fulco et al., 2008).

Se ha sugerido que en dicha regulación podría estar involucrado un proceso de canalización de sustrato (Grubisha et al., 2005). La canalización de sustrato es la transferencia directa de cierto intermediario entre los sitios activos de dos enzimas que catalizan reacciones secuenciales, lo cual no solo disminuye el tiempo entre la producción del intermediario y su posterior utilización, sino que además previene su difusión, así como disminuye la probabilidad de que otros intermediarios, como inhibidores competitivos, actúen sobre la enzima que lo requiere como sustrato (Miles et al., 1999). De este modo, se propone que enzimas biosintéticas de NAD<sup>+</sup> pueden formar complejos con SIRT1, creando un microdominio en el que el NAD<sup>+</sup> se halla en concentración elevada y es además canalizado directamente hacia la enzima (Grubisha et al., 2005).

Una hipótesis como la anterior podría explicar el hecho que a pesar de una mayor actividad biosintética de  $\text{NAD}^+$ , los niveles de este cofactor en neuronas que expresan  $\text{Wld}^{\text{s}}$  no se ven aumentados (Mack et al., 2001; Araki et al., 2004)

Dado que  $\text{Wld}^{\text{s}}$  es principalmente nuclear (Mack et al., 2001) su asociación con SIRT1 podría estar regulando la actividad de dicha enzima en tal compartimiento, donde regula la estructura de la cromatina y la transcripción génica a través de la modificación de proteínas como histonas, factores de transcripción, así como componentes de la maquinaria transcripcional (Michan et al., 2007; Feige et al. 2008). No obstante, recientemente se ha reportado que la neuroprotección ejercida por  $\text{Wld}^{\text{s}}$  se trataría de un efecto local, ya que la ausencia de la proteína en los axones reprime completamente el efecto observado (Cohen et al., 2012). Siendo así, la participación de SIRT1 entonces debería involucrar su actividad sobre blancos citosólicos, como se habría discutido para el caso de la neuroprotección ejercida por resveratrol.

## 6. Conclusiones y perspectivas

---

Como se mencionó inicialmente, las condiciones experimentales de las que se reporta un efecto neuroprotector, sean intervenciones farmacológicas o moleculares, constituyen herramientas importantes que pueden colaborar en el entendimiento de los mecanismos subyacentes a procesos neurodegenerativos, así como para la búsqueda de posibles terapias.

Mediante un modelo *in vitro* de Degeneración Walleriana, en esta pasantía se pretendió reevaluar la influencia del tratamiento con resveratrol en el curso de la degeneración axonal, verificándose un efecto neuroprotector que sería independiente de cambios en la expresión génica o de una acción sobre proteínas presentes en el núcleo o soma neuronal. Además, se pudo constatar una posible participación de la desacetilasa de proteínas SIRT1 en la neuroprotección descrita.

Dado que el efecto neuroprotector del resveratrol mostró tener un carácter local, la participación de SIRT1 entonces debería involucrar su actividad sobre blancos citosólicos. A pesar de que este tipo de blancos aún no han sido descritos, pues SIRT1 normalmente es reportada como una enzima de localización nuclear, nosotros hemos verificado su presencia a nivel citosólico en neuronas de DRG, tanto a nivel somático como axonal. De este modo, la descripción de blancos citosólicos mediante los cuales SIRT1 podría estar afectando la degeneración axonal representa una interesante línea de investigación a seguir en el futuro.

Por otro lado, los mecanismos mediante los cuales la proteína Wld<sup>s</sup> determina un enlentecimiento en el proceso de Degeneración Walleriana siguen siendo desconocidos. Ante ello, en esta pasantía se aspiró a llevar a cabo los pasos iniciales para la identificación de interactores de dicha proteína, los cuales podrían estar involucrados en la neuroprotección descrita. Se logró expresar Wld<sup>s</sup> en un sistema eucariota con suficiente eficacia como para poder realizar ensayos de inmunoprecipitación y comprobar su presencia en los inmunoprecipitados. Además, como primera aproximación a la identificación de interactores, se observó que unos de las proteínas que co-inmunoprecipita con Wld<sup>s</sup> es SIRT1.

Establecer las implicancias que esta última tiene en la neuroprotección ejercida por Wld<sup>s</sup> y el modo en que lo hace, se plantea como un desafío muy interesante que requiere de nuevos experimentos. A pesar de que la co-inmunoprecipitación de SIRT1 con Wld<sup>s</sup> indica la asociación física de dichas proteínas, tal interacción deberá ser confirmada mediante otros métodos, como ensayos que permitan observar su co-localización y estudios por espectrometría de masa. Luego, la posible participación de SIRT1 en la neuroprotección también requiere ser evaluada. A partir de los datos registrados por Cohen et al. (2012) de que la presencia de Wld<sup>s</sup> en los axones es imprescindible para ejercer la neuroprotección, uno de las primeras aproximaciones podría ser la de evaluar qué efecto tiene la inhibición de SIRT1 a nivel axonal respecto a la neuroprotección.

Finalmente, SIRT1 parece estar involucrada en la neuroprotección ejercida por resveratrol y también podría estarlo en la ejercida por Wld<sup>s</sup>. Comprobar que efectivamente dicha enzima tiene una participación en estos dos mecanismos de neuroprotección aparentemente independientes, la colocaría como una candidata muy importante alrededor de la cual centrar nuevas estrategias terapéuticas.

## 7. Bibliografía

---

- Adalbert R, Gillingwater TH, Haley JE, Bridge K, Beirowski B, Berek L, Wagner D, Grumme D, Thomson D, Celik A, Addicks K, Ribchester RR, Coleman MP. 2005. A rat model of slow Wallerian degeneration (WldS) with improved preservation of neuromuscular synapses. *Eur. J. Neurosci* 21:271-7.
- Alvarez S, Moldovan M, Krarup C. 2008. Acute energy restriction triggers Wallerian degeneration in mouse. *Exp. Neurol* 212:166-78.
- Aquilano, K., Vigilanza, P., Baldelli, S., Pagliei, B., Rotilio, G., Ciriolo, M.R. 2010. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha (PGC-1alpha) and sirtuin 1 (SIRT1) reside in mitochondria: possible direct function in mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem* 285(28):21590-9.
- Araki T, Sasaki Y, Milbrandt J. 2004. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science* 305(5686): 1010–3.
- Avery MA, Sheehan A, Kerr KS, Wang J, Freeman MR. 2009. WldS requires Nmnat1 enzymatic activity and N16-VCP interactions to suppress Wallerian degeneration. *J. Cell Biol* 184:501-13.
- Baur JA & Sinclair DA. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5:493-506.
- Beher D, Wu J, Cumine S, Kim KW, Lu SC, Atangan L, Wang M. 2009. Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity. *Chem Biol Drug Des* 74:619-24.
- Beirowski B, Adalbert R, Wagner D, Grumme D, Addicks K, et al. 2005. The progressive nature of Wallerian degeneration in wild-type and slow Wallerian degeneration (WldS) nerves. *BMC Neurosci* 6:6.
- Beirowski B, Babetto E, Gilley J, Mazzola F, Conforti L, et al. 2009. Nonnuclear WldS determines its neuroprotective efficacy for axons and synapses in vivo. *J Neurosci* 29: 653–68.
- Boily G, He XH, Pearce B, Jardine K, McBurney MW. 2009. SirT1-null mice develop tumors at normal rates but are poorly protected by resveratrol. *Oncogene* 28(32):2882-93.
- Borra MT, Smith BC, Denu JM. 2005. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J Biol Chem* 280:17187-95.
- Brown MC, Perry VH, Hunt SP, Lapper SR. 1994. Further studies on motor and sensory nerve regeneration in mice with delayed Wallerian degeneration. *Eur. J. Neurosci* 6:420-8.
- Buckmaster EA, Perry VH, Brown MC. 1995. The rate of Wallerian degeneration in cultured neurons from wild type and C57BL/WldS mice depends on time in culture and may be extended in the presence of elevated K<sup>+</sup> levels. *Eur. J. Neurosci* 7:1596-602.
- Calliari A, Bobba N, Escande C, Chini EN. 2013. Resveratrol delays Wallerian Degeneration in a NAD<sup>+</sup> and DBC1 dependent manner. *Exp Neurol*. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.11.013.

- Campbell RK, Bergert ER, Wang Y, Morris JC, Moyle WR. 1997. Chimeric proteins can exceed the sum of their parts: implications for evolution and protein design. *Nat. Biotechnol* 15:439-43.
- Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J. 2009. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458: 1056-60.
- Chevalier-Larsen E & Holzbaur EL. 2006. Axonal transport and neurodegenerative disease. *Biochim Biophys Acta* 1762: 1094–108.
- Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe, M. de Cabo R, Sinclair DA. 2004. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science*. 16;305(5682):390-2.
- Cohen MS, Ghosh AK, Kim HJ, Jeon NL, Jaffrey SR. 2012. Chemical genetic-mediated spatial regulation of protein expression in neurons reveals an axonal function for wld(s). *ChemBiol* 19(2):179-87.
- Coleman MP, Conforti L, Buckmaster EA, Tarlton A, Ewing RM, Brown MC, Lyon MF, Perry VH. 1998. An 85-kb tandem triplication in the slow Wallerian degeneration (Wlds) mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95:9985-90.
- Coleman MP. 2001. Wallerian degeneration of injured axons and synapses is delayed by a Ube4b/Nmnat chimeric gene. *Nat Neurosci* 4:1199-206.
- Coleman MP & Perry VH. 2002. Axon pathology in neurological disease: a neglected therapeutic target. *Trends Neurosci* 25:532-7.
- Conforti L, Adalbert R, Coleman MP. 2007a. Neuronal death: Where does the end begin? *Trends Neurosci* 30:159-66.
- Conforti L, Fang G, Beirowski B, Wang MS, Sorci L, Asress S, Adalbert R, Silva A, Bridge K, Huang XP, Magni G, Glass JD, & Coleman MP. 2007b. NAD(+) and axon degeneration revisited: Nmnat1 cannot substitute for Wld(S) to delay Wallerian degeneration. *Cell death and differentiation* 14(1): 116–27.
- Conforti L, Wilbrey A, Morreale G, Janeckova L, Beirowski B, et al. 2009. WldS protein requires Nmnat activity and a short N-terminal sequence to protect axons in mice. *J. Cell Biol* 184:491-500.
- Dai RM & Li CC. 2001. Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. *Nat. Cell Biol* 3:740-4.
- Dasgupta B & Milbrandt J. 2007. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons, *Proc Natl Acad Sci USA* 104(17), 7217–22.
- Escande C, Chini CC, Nin V, Dykhouse KM, Novak CM, Levine J, van Deursen J, Gores GJ, Chen J, Lou , Chini EN. 2010. Deleted in breast cancer-1 regulates SIRT1 activity and contributes to high-fat diet-induced liver steatosis in mice. *J. Clin. Invest* 120: 545-58.
- Feige JN, Auwerx J. 2008. Transcriptional targets of sirtuins in the coordination of mammalian physiology. *Curr Opin Cell Biol* 20(3):303-9.

- Ferri A, Sanes JR, Coleman MP, Cunningham JM, Kato AC. 2003. Inhibiting axon degeneration and synapse loss attenuates apoptosis and disease progression in a mouse model of motoneuron disease. *Curr Biol* 13(8):669-73.
- Finn, J.T., M. Weil, F. Archer, R. Siman, A. Srinivasan, M.C. Raff. 2000. Evidence that Wallerian degeneration and localized axon degeneration induced by local neurotrophin deprivation do not involve caspases. *J. Neurosci* 20:1333–41.
- Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA, Glass JD. 2004. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp. Neurol* 185: 232-40.
- Fischer LR, Culver DG, Davis AA, Tennant P, Wang M, Coleman M, Asress S, Adalbert R, Alexander GM, Glass JD. 2005. The WldS gene modestly prolongs survival in the SOD1G93A fALS mouse. *Neurobiol Dis* 19(1-2):293-300.
- Fujimoto J, Shiota M, Iwahara T, Seki N, Satoh H, Mori S, and Yamamoto T. 1996. Characterization of the transforming activity of p80, a hyperphosphorylated protein in a Ki-1 lymphoma cell line with chromosomal translocation t(2;5). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4181-6.
- Fulco M, Schiltz RL, Iezzi S, King MT, Zhao P, Kashiwaya Y, Hoffman E, Veech RL, Sartorelli V. 2003. Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell*. 12(1):51-62. Errata en: *Mol Cell* 20(3):491.
- Fulco M, Cen Y, Zhao P, Hoffman EP, McBurney MW, Sauve AA, Sartorelli V. 2008. Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. *Dev Cell* 14(5):661-73.
- Fulda S & Debatin KM. 2006. Targeting inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) for diagnosis and treatment of human diseases. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 1(1):81-9. Review.
- Fullerton MD & Steinberg GR. 2010. SIRT1 takes a backseat to AMPK in the regulation of insulin sensitivity by resveratrol. *Diabetes* 59:551-3.
- George EB, Glass JD, Griffin JW. 1995. Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *J. Neurosci* 15:6445-52.
- Gilley J, Coleman MP. 2010. Endogenous Nmnat2 is an essential survival factor for maintenance of health axons. *PLoS Biol* 8(1):e1000300
- Gillingwater TH, Haley JE, Ribchester RR, Horsburgh K. 2004. Neuroprotection after transient global cerebral ischemia in Wld(s) mutant mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 24(1):62-6.
- Gillingwater TH, Thomson D, Mack TG, Soffin EM, Mattison RJ, et al. 2002. Age-dependent synapse withdrawal at axotomised neuromuscular junctions in Wld(s) mutant and Ube4b/Nmnat transgenic mice. *J. Physiol* 543:739-55.
- Gillingwater TH, Ingham CA, Parry KE, Wright AK, Haley JE, Wishart TM, Arbuthnott GW, Ribchester RR. 2006. Delayed synaptic degeneration in the CNS of Wlds mice after cortical lesion. *Brain* 129(Pt 6):1546-56.

- Glass JD, Brushart TM, George EB, Griffin JW. 1993. Prolonged survival of transected nerve fibres in C57BL/Ola mice is an intrinsic characteristic of the axon. *J. Neurocytol* 22:311-21.
- Gledhill JR, Montgomery MG, Leslie AG, Walker JE. 2007. Mechanism of inhibition of bovine F1-ATPase by resveratrol and related polyphenols. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(34):13632-7.
- Grubisha O, Smith BC, Denu JM. 2005. Small molecule regulation of Sir2 protein deacetylases. *FEBS J* 272(18):4607-16.
- Hafezparast M, Klocke R, Ruhrberg C, Marquardt A, Ahmad-Annuar A, Bowen S, Lalli G, Witherden AS, Hummerich H, Nicholson S, Morgan PJ, Oozageer R, Priestley JV, Averill S, King VR, Ball S, Peters J, Toda T, Yamamoto A, Hiraoka Y, Augustin M, Korthaus D, Wattler S, Wabnitz P, Dickneite C, Lampel S, Boehme F, Peraus G, Popp A, Rudelius M, Schlegel J, Fuchs H, Hrabe de Angelis M, Schiavo G, Shima DT, Russ AP, Stumm G, Martin JE, Fisher EM. 2003. Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science* 300: 808–12.
- Hatakeyama S, Yada M, Matsumoto M, Ishida N, Nakayama KI. 2001. U-Box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J. Biol. Chem* 276(35):33111–20.
- Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO. 2006. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: Where are we today and where are we going? *Microbiol. Mol. Biol* 70:789–829. Review.
- Hoopfer ED, McLaughlin T, Watts RJ, Schuldiner O, O'Leary DD, Luo L. 2006. Wld(s) protection distinguishes axon degeneration following injury from naturally occurring developmental pruning. *Neuron* 50:883-95.
- Howitz, KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425 (6954): 191-6.
- Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L. 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403(6771): 795-800.
- Jarosch E, Taxis C, Volkwein C, Bordallo J, Finley D, Wolf DH, and Sommer T. 2002. Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat. Cell Biol* 4:134-9
- Kandel E, Schwartz J, Jessell T. 2000. Principles of Neural Science. R R Donnelley & Sons, Inc. pp 1109-10.
- Kaneko S, Wang J, Kaneko M, Yiu G, Hurrell JM, et al. 2006. Protecting axonal degeneration by increasing nicotinamide adenine dinucleotide levels in experimental autoimmune encephalomyelitis models. *J. Neurosci* 26: 9794-804
- Kilinc, D., Gallo, G., & Barbee, K. 2008. Mechanically-induced membrane poration causes axonal beading and localized cytoskeletal damage. *Experimental neurology* 212(2): 422–30.
- Kim JE & Um SJ. 2008a. SIRT1: roles in aging and cancer. *BMB Rep* 41(11):751-6.
- Kim JE, Chen J, Lou Z. 2008b. DBC1 is a negative regulator of SIRT1. *Nature* 451:583-6.

- Langley, E., Pearson, M., Faretta, M., Bauer, U.M., Frye, R.A., Minucci, S., Pelicci, P.G., Kouzarides, T. 2002. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J.* 21(10):2383-96
- Langley, E., Pearson, M., Faretta, M., Bauer, U.M., Frye, R.A., Minucci, S., Pelicci, P.G., Kouzarides, T. 2002. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J.* 21(10):2383-96
- Lin JN, Lin VC, Rau KM, Shieh PC, Kuo DH, Shieh JC, Chen WJ, Tsai SC, Way TD. 2010. Resveratrol modulates tumor cell proliferation and protein translation via SIRT1-dependent AMPK activation. *J Agric Food Chem* 58:1584-92.
- Lubinska L. 1977. Early course of Wallerian degeneration in myelinated fibres of the rat phrenic nerve. *Brain Res* 130:47-63.
- Lunn ER, Perry VH, Brown MC, Rosen H, Gordon S. 1989. Absence of Wallerian degeneration does not hinder regeneration in peripheral nerve. *Eur. J. Neurosci* 1:27-33.
- Lyon MF, Ogunkolade BW, Brown MC, Atherton DJ, Perry VH. 1993. A gene affecting Wallerian nerve degeneration maps distally on mouse chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:9717-20.
- Macdonald JM, Beach MG, Porpiglia E, Sheehan AE, Watts RJ, Freeman MR. 2006. The Drosophilacell corpse engulfment receptor draper mediates glial clearance of severed axons. *Neuron.* 50:869-81.
- MacInnis BL & Campenot RB. 2005. Regulation of Wallerian degeneration and nerve growth factor withdrawal-induced pruning of axons of sympathetic neurons by the proteasome and the MEK/Erk pathway. *Mol Cell Neurosci.* 28:430-9.
- Mack TG, Reiner M, Beirowski B, Mi W, Emanuelli M, Wagner D, Thomson D, Gillingwater T, Court F, Conforti L, Fernando FS, Tarlton A, Andressen C, Addicks K, Magni G, Ribchester RR, Perry VH, Coleman MP. 2001. Wallerian degeneration of injured axons and synapses is delayed by a Ube4b/Nmnat chimeric gene. *Nat Neurosci* 4:1199-206.
- Magni G, Amici A, Emanuelli M, Orsomando G, Raffaelli N, Ruggieri S. 2004. Structure and function of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase. *Curr. Med. Chem* 11:873-85.
- Mi W, Beirowski B, Gillingwater TH, Adalbert R, Wagner D, et al. 2005. The slow Wallerian degeneration gene, WldS, inhibits axonal spheroid pathology in gracile axonal dystrophy mice. *Brain.* 128:405-16.
- Michan S, Sinclair D. 2007. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J* 404(1):1-13.
- Miledi R & Slater CR. 1970. On the degeneration of rat neuromuscular junctions after nerve section. *J. Physiol.* 207:507-28.
- Miles EW, Rhee S, Davies DR. 1999. The molecular basis of substrate channeling. *J Biol Chem* 274(18):12193-6.

- Moldovan M, Alvarez S, Krarup C. 2009. Motor axon excitability during Wallerian degeneration. *Brain*. 132:511-23.
- Nakae J, Cao Y, Daitoku H, Fukamizu A, Ogawa W, Yano Y, Hayashi Y. 2006. The LXXLL motif of murine forkhead transcription factor FoxO1 mediates Sirt1-dependent transcriptional activity. *J ClinInvest* 116(9):2473-83.
- Nakahata Y, Kaluzova M, Grimaldi B, Sahar S, Hirayama J, Chen D, Guarente LP, Sassone-Corsi P. 2008. The NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell* 134(2):329-40.
- Nin V, Escande C, Chini CC, Giri S, Camacho-Pereira J, Matalonga J, Lou Z, Chini EN. 2012. Role of deleted in breast cancer 1 (DBC1) protein in SIRT1 deacetylase activation induced by protein kinase A and AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 287(28):23489-501.
- Pacholec, M.B., J. E. Chrnyk, B. Cunningham, D. Flynn, D. Garofalo, R. S. Griffith, D. Griffor, M. Loulakis, P. Pabst, B. Qiu, X. Stockman, B. Thanabal, V. Varghese, A. Ward, J. Withka, J. Ahn, K. 2010. SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *J Biol Chem* 285(11): 8340-51.
- Park CE, Kim MJ, Lee JH, Min BI, Bae H, Choe W, Kim SS, Ha J. 2007. Resveratrol stimulates glucose transport in C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase. *Exp Mol Med* 39:222-9.
- Perry VH, Brown MC, Lunn ER, Tree P, Gordon S. 1990a. Evidence that very slow Wallerian degeneration in C57BL/Ola mice is an intrinsic property of the peripheral nerve. *Eur. J. Neurosci* 2:802-8.
- Perry VH, Lunn ER, Brown MC, Cahusac S, Gordon S. 1990b. Evidence that the rate of Wallerian degeneration is controlled by a single autosomal dominant gene. *Eur. J. Neurosci* 2:408-13.
- Pollak N, Dolle C, Ziegler M. 2007. The power to reduce: pyridine nucleotides—small molecules with a multitude of functions. *Biochem. J* 402:205–18
- Price NL, Gomes AP, Ling AJ, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, Agarwal B, Ye L, Ramadori G, Teodoro JS, Hubbard BP, Varela AT, Davis JG, Varamini B, Hafner A, Moaddel R, Rolo AP, Coppari R, Palmeira CM, de Cabo R, Baur JA, Sinclair DA. 2012. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab* 15(5):675-90.
- Raff MC, Whitmore AV, Finn JT. 2002. Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science* 296:868-71.
- Revollo JR, Grimm AA, Imai S. 2004. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J Biol Chem* 279(49):50754-63.
- Ribchester RR, Tsao JW, Barry JA, Asgari-Jirhandeh N, Perry VH, Brown MC. 1995. Persistence of neuromuscular junctions after axotomy in mice with slow Wallerian degeneration (C57BL/WldS). *Eur J Neurosci*. 7:1641-50.

- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434:113-8.
- Ruderman NB, Julia Xu X, Nelson L, Cacicedo JM, Saha AK, Lan F, Ido Y. 2010. AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298:E751-60.
- Sajadi A, Schneider BL, Aebischer P. 2004. Wld(s)-mediated protection of dopaminergic fibers in an animal model of parkinson disease. *Curr. Biol* 14:326-30.
- Sasaki Y, Vohra BP, Baloh RH, Milbrandt J. 2009. Transgenic mice expressing the Nmnat1 protein manifest robust delay in axonal degeneration in vivo. *J. Neurosci* 29:6526-34
- Schlaepfer WW. 1974. Calcium-induced degeneration of axoplasm in isolated segments of rat peripheral nerve. *Brain Res* 69:203-15.
- Sievers C, Platt N, Perry VH, Coleman MP, Conforti L. 2003. Neurites undergoing Wallerian degeneration show an apoptotic-like process with Annexin V positive staining and loss of mitochondrial membrane potential. *Neurosci. Res* 46:161-9.
- Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, Brusch RG, Rockenstein E, Mount SL, Raman R, Davies P, Masliah E, Williams DS, Goldstein LS. 2005. Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* 307:1282-8.
- Sundararajan, R., Chen, G., Mukherjee, C., White, E. 2005. Caspase-dependent processing activates the proapoptotic activity of deleted in breast cancer-1 during tumor necrosis factor-alpha-mediated death signaling. *Oncogene* 24(31):4908-20.
- Suzuki K, Koike T. 2007. Resveratrol abolishes resistance to axonal degeneration in slow Wallerian degeneration (WldS) mice: activation of SIRT2, an NAD-dependent tubulin deacetylase. *BiochemBiophys Res Commun.* 359(3): 665-71.
- Tsao JW, George EB, Griffin JW. 1999. Temperature modulation reveals three distinct stages of Wallerian degeneration. *J. Neurosci* 19:4718-26
- Trapp, J, Meier R, Hongwiset D, Kassack MU, Sippl W, Jung M. 2007 Structure-activity studies on suramin analogues as inhibitors of NAD+-dependent histone deacetylases (sirtuins). *Chem Med Chem* 2(10):1419-31.
- Um JH, Park SJ, Kang H, Yang S, Foretz M, McBurney MW, Kim MK, Viollet B, Chung JH. 2010. AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. *Diabetes* 59:554-63.
- van der Veer E, Ho C, O'Neil C, Barbosa N, Scott R, Cregan SP, Pickering JG. 2007. Extension of human cell lifespan by nicotinamide phosphoribosyltransferase. *J Biol Chem* 282(15):10841-5.
- Vaquero A, Scher M, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. 2004. Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Cell* 16(1):93-105.
- Vargas ME & Barres BA. 2007. Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annu. Rev. Neurosci* 30:153-79.

- Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L & Weinberg RA. 2001. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD- dependent p53 deacetylase. *Cell* 107:149-59.
- Waller A. 1850. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Philos. Trans. R. Soc. London* 140:423-9.
- Wang J, Zhai Q, Chen Y, Lin E, Gu W, et al. 2005. A local mechanism mediates NAD-dependent protection of axon degeneration. *J. Cell Biol* 170:349-55.
- Wang MS, Fang G, Culver DG, Davis AA, Rich MM, Glass JD. 2001. The WldS protein protects against axonal degeneration: a model of gene therapy for peripheral neuropathy. *Ann. Neurol.* 50:773-9.
- Wang MS, Davis AA, Culver DG, Glass JD. 2002. WldS mice are resistant to paclitaxel (taxol) neuropathy. *Ann. Neurol* 52:442-7.
- Wang Q, Song C, and Li CC. 2004. Molecular perspectives on p97-VCP: progress in understanding its structure and diverse biological functions. *J. Struct. Biol* 146:44-57.
- Yahata N, Yuasa S, Araki T. 2009. Nicotinamide mononucleotide adenyltransferase expression in mitochondrial matrix delays Wallerian degeneration. *J. Neurosci* 29:6276–84.
- Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW. 2004. Modulation of NFkB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase *EMBO J.* 16;23(12):2369-80.
- Zhai Q, Wang J, Kim A, Liu Q, Watts R, et al. 2003. Involvement of the ubiquitin-proteasome system in the early stages of Wallerian degeneration. *Neuron* 39:217-25.
- Zhai RG, Cao Y, Hiesinger PR, Zhou Y, Mehta SQ, Schulze KL, et al. 2006. *Drosophila* NMNAT maintains neural integrity independent of its NAD synthesis activity. *PLoS Biol* 4:416.
- Zhai RG, Zhang F, Hiesinger PR, Cao Y, Haueter CM, Bellen HJ. 2008. NAD synthase NMNAT acts as a chaperone to protect against neurodegeneration. *Nature* 452:887-91.
- Zhang F, Liu J, Shi JS. 2010. Anti-inflammatory activities of resveratrol in the brain: role of resveratrol in microglial activation. *Eur J Pharmacol* 636(1-3):1-7. Review.
- Zhang F, Wang S, Gan L, Vosler PS, Gao Y, Zigmond MJ, Chen J. 2011. Protective effects and mechanisms of sirtuins in the nervous system. *Prog Neurobiol* 95(3):373-95.
- Zhang J & Ramirez VD. 2000. Inhibition of mitochondrial proton F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *Br J Pharmacol* 130(5):1115-23
- Zhang T, Berrocal JG, Frizzell KM, Gamble MJ, DuMond ME, Krishnakumar R, Yang T, Sauve AA, Kraus WL. 2009. Enzymes in the NAD<sup>+</sup> salvage pathway regulate SIRT1 activity at target gene promoters. *J Biol Chem* 284(30):20408-17.
- Zhao W, Kruse JP, Tang Y, Jung SY, Qin J, Gu W. 2008. Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1. *Nature* 451:587-90.

# Anexo 1

---

**Artículo: “Resveratrol delays Wallerian Degeneration in a NAD<sup>+</sup> and DBC1 dependent manner”**

## Anexo 2

---

### Secuenciación de la región codificante para Wld<sup>s</sup> contenida en el vector utilizado

En la Figura 1 se muestra la secuencia completa de la región codificante para Wld<sup>s</sup> contenida en el vector plasmídico utilizado para llevar a cabo las transfecciones. Como se describe en la literatura (Coleman et al., 1998), se distinguen tres regiones en la proteína: una región que corresponden a la región N-terminal de Ube4b y codifica para los 70 aminoácidos N-Terminales de Wld<sup>s</sup>; una región que corresponde al UTR 5' de la secuencia de NMNAT-1 y codifica para 18 aminoácidos de Wld<sup>s</sup> (Wld18); y la secuencia completa de NMNAT-1, que codifican para los 285 aminoácidos C-Terminales de Wld<sup>s</sup>.

```
5' ATGGAGGAGCTGAGCGCTGACGAGATTCGACGGAGGCGCCTGGCACGACTTGCTGGTGGACAGACCTCCAG  
CCGACCACCCCGCTTACATCTCCCCAGAGGGAGAACCCTCCGGGACCTCCAATAGCTGCATCAGCCCCAGGGCCCT  
CCCAGAGTCTTGGTCTCAATGTCCACAACATGACCCCAGCTACCTCCCCCATAGGTGCAGCAGACAACATCGCTGT  
CAGAGGGTTGCATGTAGGTCAACACCACCAACTTCTCCCCATGGACTCATCCAAGAAGACAGAGGTGGTTCTCCTG  
GCCTGTGGCTCTTTAACCCCATCACCAACATGCACCTCAGGCTGTTGAGCTGGCCAAGGACTATATGCATGCTAC  
AGGAAAATACAGTGTTATCAAAGGCATTATCTCACCGGTCGGTGATGCGTACAAGAAGAAAGGGCTCATCCAGC  
TCACCACCGAATCATCATGGCAGAAGTTCACCAAGAACTCACACTGGGTGGAAGTGGATACGTGGGAAAGTCT  
TCAGAAGGAGTGGGTGGAGACTGTGAAGGTGCTCAGATACCATCAGGAGAAGCTGGCAACTGGCAGCTGCAGTT  
ACCCACAAAGCTCACCTGCACTGGAAAAGCCTGGGCGGAAGAGGAAGTGGGCTGATCAAAAGCAAGATTCTAGC  
CCACAGAAGCCCCAAGAGCCCAAACCAACAGGTGTGCCAAGGTGAAATTGCTGTGTGGGGCAGATTTACTGGA  
GTCCTTCAGCGTGCCCAACTTGTGGAAGATGGAGGACATCACGCAAATCGTGGCCAACCTTGGGCTCATCTGTATC  
ACTCGGGCTGGCAGTGACGCTCAGAAATTCATCTACGAGTCCGATGTGCTGTGGAGACATCAGAGCAACATCCAC  
CTGGTGAACGAGTGGATCACCAATGACATCTCGTCCACCAAGATCCGGAGGGCGCTCAGGAGGGGCCAGAGCAT  
CCGCTACTTGGTACCGGACCTGGTCCAAGAGTACATTGAGAAGCATGAGCTGTACAACACGGAGAGCGAAGGCA  
GGAATGCTGGGGTACCCTGGCTCCTCTGCAGAGGAACGCCGCAGAGGCCAAGCACAACCATTCCACTCTGTATC  
CATATGACGTCCAGACTCTGCC3'
```

**Figura 1. Región codificante para Wld<sup>s</sup>.** Se distinguen la región correspondiente a Ube4b (rojo), a Wld18 (naranja) y a NMNAT-1 (verde). En negrita y subrayado se destacan los codones de iniciación de Ube4b y NMNAT-1.

# Abreviaturas y siglas utilizadas

---

ADN\_ Ácido desoxirribonucleico

AMPK\_ *AMP activated protein kinase*

ARN\_ Ácido ribonucleico

CDS\_ Secuencia Codificante

DBC1\_ *Deleted in Breast Cancer 1*

DRG\_ Ganglios de la Raíz Dorsal

DW\_ Degeneración Walleriana

EEM\_ Error Estándar de la Media

HA\_ Hemaglutinina

KO\_ *Knock Out*

N16\_ Fragmento de 16 aminoácidos N-Terminales de Wld<sup>s</sup> que forman parte de N70

N70\_ 70 aminoácidos N-Terminales de Wld<sup>s</sup>, corresponde a la porción de Ube4b

NAD<sup>+</sup>/H\_ Dinucleótido de Adenina y Nicotinamida oxidado / reducido

NCBI\_ *National Center for Biotechnology Information*

NMNAT-1\_ *Nicotinamide Nucleotide Adenylyltransferase 1*

RSV\_ Resveratrol

SIRT1\_ *Silent mating type regulation 2 homolog*

SNC\_ Sistema Nervioso Central

SNP\_ Sistema Nervioso Periférico

SUR\_ Suramina

Ube4b\_ *Ubiquitination factor E4B*

UPS\_ Sistema Ubiquitin-Proteasoma

VCP\_ *Valosin-Containing Protein*

Wld<sup>s</sup> / Wld<sup>s</sup> \_ *Wallerian Degeneration Slow* (gen / proteína)

WT\_ *Wild Type*