



CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

**“Estandarización de la expresión de latrofilina-3 en células de neuroblastoma para
analizar su participación en procesos neurodegenerativos”**

TESIS

Que presenta

CRISTHINA ESTEFANIA JARAMILLO ORDOÑEZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGIA CELULAR

Director de tesis:

Dr. Francisco García Sierra

Ciudad de México

Julio, 2023

Agradecimientos

El presente trabajo de tesis fue realizado en el laboratorio 25 del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) bajo la dirección del Dr. Francisco García Sierra.

Se agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca correspondiente al grado de maestría (CVU:1144015).

Al Dr. Francisco García Sierra por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por su asesoría en el desarrollo de mi proyecto de maestría.

A mis asesores Dr. Antony Boucard Jr. y Dr. Enrique Othón Hernández Gonzales por sus valiosos aportes.

A mis compañeras de laboratorio 25 y del laboratorio 54 especialmente a Fanny M. por su gran ayuda y consejos.

Dedicatoria

A mis padres, mi hermana y mi sobrina por ser mi apoyo y mi luz.

INDICE

Resumen	6
Abstract	7
1. Introducción	8
1.1. GPCRs.....	8
1.1.1. Señalización de los GPCRs.....	8
1.1.2. Clasificación de los GPCRs.....	10
1.1.3. GPCRs de adhesión.....	10
1.2. Latrofilinas.....	12
1.2.1. Ligandos endógenos.....	13
1.2.2. Papel de las latrofilinas en el desarrollo del sistema nervioso.....	15
1.2.3. Papel de las latrofilinas en las neuronas maduras.....	17
1.3. Importancia de las latrofilinas en trastornos neuropsiquiátricos.....	20
1.4. Moléculas de adhesión en enfermedades neurodegenerativas.....	21
1.4.1. La enfermedad de Alzheimer.....	22
1.4.2. Sinapsis en la enfermedad de Alzheimer.....	24
2. Justificación	26
3. Hipótesis	27
4. Objetivos	27
4.1. Objetivo General.....	27
4.2. Objetivos Específicos.....	27
5. Diseño experimental	28
6. Materiales y Métodos	29
6.1. Cultivo Celular.....	29
6.2. Transformación de bacterias competentes.....	29
6.3. Selección de colonias.....	29
6.4. Extracción de ADN por lisis alcalina.....	29
6.5. Purificación de ADNp por PEG (polietilglicol).....	30
6.6. Transfección por el método de lipofección con lipofectamina 2000.....	31
6.6.1. Transfección por el método de lipofección con lipofectamina plus.....	32
6.7. Transfección por el método de PEI.....	33
6.8. Inmunofluorescencia.....	34

6.9. Análisis estadístico.....	35
7. Resultados.....	36
7.1. Características morfológicas de las células SH-SY5Y no diferenciadas cultivadas <i>in vitro</i>	36
7.2. Características del vector de expresión de latrofilina 3.....	37
7.3. Restricción enzimática	38
7.4. Eficiencia de transfección en células de neuroblastoma SH-SY5Y no diferenciadas ...	39
7.4.1. Eficiencia de transfección por el método de lipofección	39
7.4.2. Eficiencia de transfección por el método de PEI	40
7.5. Alteración estructural del citoesqueleto de actina por la expresión de latrofilina-3 (Lphn-3-v) en células de neuroblastoma SH-SY5Y no diferenciadas.	42
7.6. La estructuración del citoesqueleto de tubulina no se altera por la expresión de latrofilina-3 (Lphn-3-v) en células de neuroblastoma no diferenciadas SHSY5Y.	52
7.7. Análisis de intensidad de fluorescencia	62
7.8. Evaluación cuantitativa de colocalización entre Lphn3-vy el citoesqueleto celular.....	64
8. Discusión.....	66
9. Conclusiones.....	66
10. Perspectivas.....	71
11. Referencias bibliográficas.....	72

Resumen

La latrofilina 3 (Lphn-3) es un receptor de adhesión acoplado a proteínas G, el cual se expresa principalmente en el cerebro y participa en diversos procesos como son la formación de las sinapsis, adhesión intercelular y en la activación de diferentes vías de señalización que promueven la remodelación del citoesqueleto de actina, entre otros. Sin embargo, su expresión anormal y mutaciones específicas en su estructura se han asociado con el establecimiento de diversos procesos neurológicos que afectan el neurodesarrollo.

Diversos estudios han utilizado modelos celulares para conocer más sobre las propiedades normales y patológicas de este receptor, empleando células no neuronales para la expresión exógena de esta molécula y sus variantes mutadas. Sin embargo, no hay modelos de células neuronales cultivadas *in vitro* que se hayan utilizado para el mismo propósito. En este estudio inicial se pretende estandarizar la expresión exógena de Lphn-3 en células de neuroblastoma cultivadas *in vitro*, para poder en un futuro evaluar el papel patológico o neuroprotector de esta molécula en algunos otros procesos neurológicos como es la enfermedad de Alzheimer.

Hasta el momento se probaron dos metodologías para la transfección de las células de neuroblastoma SH-SY5Y no diferenciadas, siendo el método de polietilenimina (PEI) el más eficiente por encima del método tradicional empleado lipofectamina. Con este alcance, hemos podido evidenciar que la sobreexpresión de Lphn-3 produce un cambio en la morfología de las células neuronales, observando por inmunofluorescencia y microscopía confocal la expresión de tres fenotipos particulares, en los cuales se pierde la geometría característica de esta línea celular. Este cambio se ve acompañado por la formación de lobulaciones en la membrana celular asociado a la remodelación del citoesqueleto de actina-F. La asociación de actina-F con Lphn-3 en la superficie celular se corroboró por análisis de colocalización y de correlación de "Pearson". Interesantemente, Lphn-3 no se asoció al citoesqueleto de tubulina, sobre todo en los fenotipos que presenta la forma fusiforme o de "huso" de estas células. Estos resultados preliminares corroboran una estrecha asociación de Lphn-3 con actina-F, ocurriendo también en células neuronales que son el contexto más específico relacionado con los padecimientos neurológicos.

Abstract

Latrophilin 3 (Lphn-3) is a G protein-coupled adhesion receptor, which is expressed mainly in the brain and participates in various processes such as synapse formation, intercellular adhesion, and the activation of different signaling pathways that promote the remodeling of the actin cytoskeleton. However, its abnormal expression and specific structure have been associated with establishing various neurological processes that result in neurodevelopment.

Various studies have used cell models to learn more about this receptor's normal and pathological properties, using non-neuronal cells for the exogenous expression of this molecule and its mutated variants. However, in vitro, cultured neuronal cell models have yet to be used for the same purpose. This initial study pretends to standardize in vitro the exogenous expression of Lphn-3 in cultured neuroblastoma cells to evaluate in the future the pathological or neuroprotective role of this molecule in some other neurological processes, such as Alzheimer's disease. So far, two methodologies were tested for the transfection of undifferentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells, with the polyethyleneimine (PEI) method being the most efficient over the traditional method using lipofectamine. With this scope, we have been able to demonstrate that the overexpression of Lphn-3 produces a change in the morphology of neuronal cells, observing by immunofluorescence and confocal microscopy the expression of three particular phenotypes, in which the characteristic geometry of SH-SY5Y cells is lost. This change is accompanied by the formation of lobulations in the cell membrane associated with remodeling the F-actin cytoskeleton. Colocalization and "Pearson" correlation analysis confirmed the association of F-actin with Lphn-3 on the cell surface. Interestingly, Lphn-3 was not associated with the tubulin cytoskeleton, especially in the phenotypes that present the fusiform- or "spindle"-shaped cells. These preliminary results corroborate a close association of Lphn-3 with F-actin, also occurring in neuronal cells that are the most specific context related to neurological disorders.

1. INTRODUCCION

1.1.GPCRs

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) son un grupo de receptores de superficie celular que reaccionan a un gran número de estímulos, incluidos a los que involucran a neurotransmisores y ciertas hormonas. Estos activan vías de transducción de señales para generar una respuesta celular ante estímulos específicos (Rosenbaum et al., 2009). Molecularmente, los GPCR presentan una estructura conservada de siete segmentos transmembranales (7TM) en forma de alfa hélice, un extremo amino terminal extracelular, y su extremo carboxilo terminal orientado intracelularmente (Hauser et al., 2017).

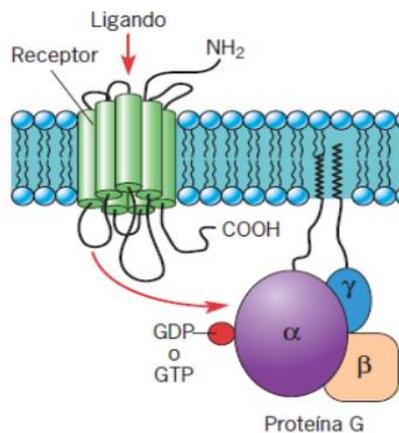


Figura 1. Estructura de receptores acoplados a proteína (GPCR). A través de cambios conformacionales, los GPCRs interactúan con proteínas G heterotriméricas.

1.1.1. Señalización de los GPCRs

Por una parte, se conoce que la señalización clásica generada por los GPCRs puede ser dependientes de proteínas G; sin embargo, en la denominada ruta independiente, ésta se produce a través de cinasas acopladas a proteínas G (GRKs) y arrestinas. En la señalización clásica, el receptor que ha sido activado interactúa con proteínas G heterotriméricas, las cuales se someten a un intercambio de GDP-GTP en la subunidad α , lo que conduce a la disociación de las subunidades α y $\beta\gamma$, y a la activación subsecuente de los efectores de señalización ubicados río abajo de la vía (Hernández-Coronado et al., 2022).

A su vez, la PKC (proteína cinasa C) y la PKA (proteína cinasa A) activadas por proteína G, fosforilan al receptor y apagan la señalización de la proteína G. Por otra parte, en la ruta independiente, la activación del receptor promueve la afinidad de las GRKs para la fosforilación de sitios de serina y treonina en su extremo citoplásmico (Hilger y Masureel, 2018). El GPCR que se encuentra fosforilado será reconocido por las arrestinas y media procesos como: desensibilización, internalización, degradación y por medio de la arrestina activar a proteínas efectoras, como cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la Src (Luttrell M y Lefkowitz J, 2002; Hilger y Masureel, 2018; Wang et al., 2018).

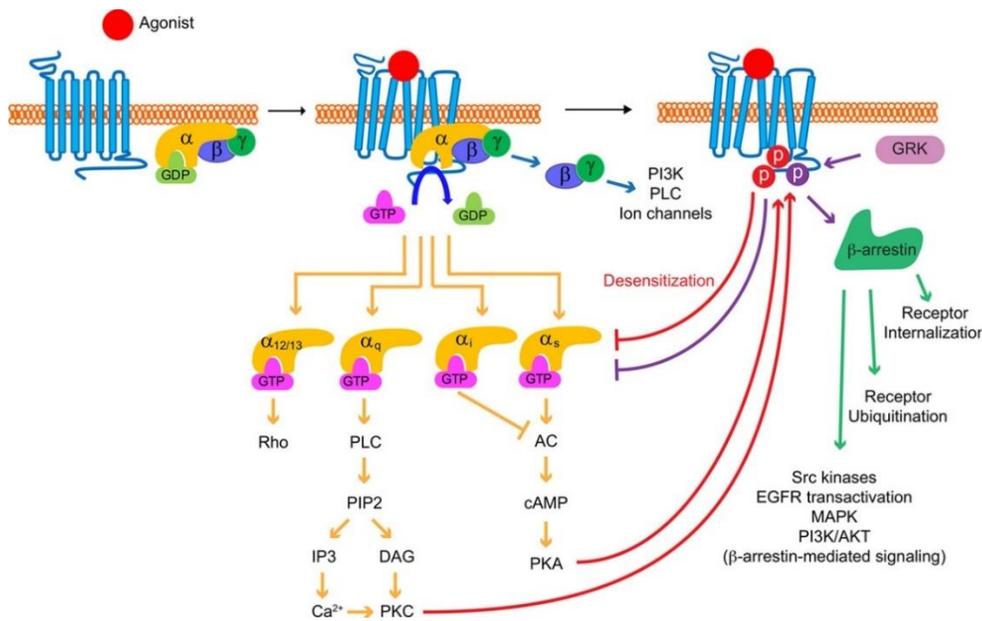


Figura 2. Esquema de señalización de GPCR. En la unión del ligando agonista, los GPCR interactúan con proteínas G heterotriméricas. En las proteínas G se da un intercambio de GDP-GTP en la subunidad α , lo que provoca la disociación de las subunidades α y $\beta\gamma$ y activación subsiguiente de los efectores de señalización consecuentes. La fosforilación del GPCR mediada por GRK (GPCR quinasa) conduce al reclutamiento de β -arrestinas, lo que da como resultado la desensibilización de la proteína G. La interacción de la β -arrestina con el receptor, también inicia la activación de la señalización mediada por β -arrestina. (Wang et al., 2018).

demostrado que los extremos amino del GPCR de adhesión se pueden unir a múltiples ligandos y activar de forma diferencial sus cascadas de señalización (Paavola y Hall, 2012)

Durante la maduración proteica, los GPCRs sufren de un escisión proteolítica en el sitio GPS de su dominio GAIN, que permite que los precursores proteicos inactivos se transformen a proteínas maduras biológicamente activas. Este corte divide al receptor en dos fragmentos uno de ellos el C-terminal (CTF), dentro del cual se encuentra los 7 dominios transmembranales y la cola citoplasmática, y el fragmento amino-terminal (NTF) donde están sus dominios de adhesión celular. (Araç et al., 2012) .

Después del corte, la secuencia de Stachel, un agonista interno ubicado en el fragmento C-terminal, activa al receptor y se lleva a cabo cambios conformacionales que promueven la disociación de NTF-CTF (Araç et al., 2012; Langenhan et al., 2016; Nazarko et al., 2018).

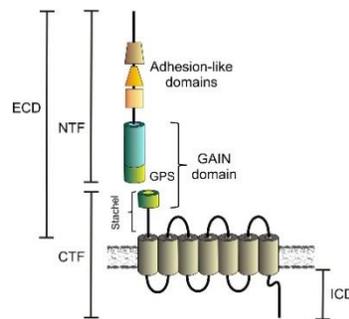


Figura 4. Estructura general de los GPCRs de adhesión. El fragmento amino terminal (NFT) está conformado por sus dominios de adhesión, seguido de un dominio GAIN, que contiene el sitio de autoproteólisis GPS. El fragmento carboxilo terminar (CTF) está conformado por su secuencia Stachel, los 7 dominios transmembranales, y su dominio intracelular (ICD). (Tomado de: Knapp et al., 2019).

Los GPCR presentan una activación constitutiva o basal que dependen de las características específicas de cada receptor y de forma general existen dos mecanismos de regulación: el agonismo ortostérico, en donde se lleva a cabo la disociación del fragmento CTF y el fragmento NTF; y la regulación alostérica, en donde no es requerida dicha disociación (Scholz et al., 2015). Los receptores de adhesión se expresan en varios órganos cumpliendo un papel fisiológico en el desarrollo, la inmunidad, en la tumorigénesis y diversas funciones neuronales (Prömel et al., 2013; Langenhan et al., 2016; Aust et al., 2016).

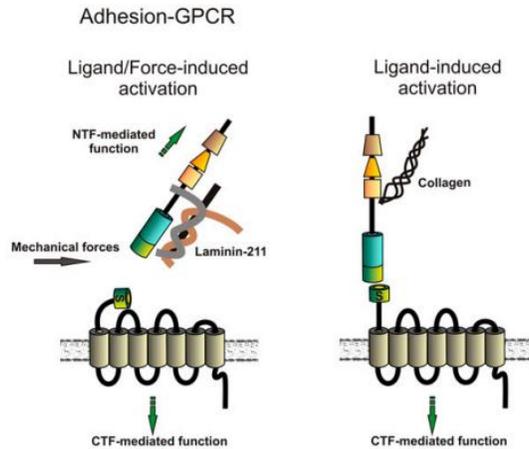


Figura 5. Mecanismos de activación de GPCRs. La activación de GPCR acopla la unión del agonista con el reclutamiento de proteína G para activar las subsecuentes vías de señalización. (Tomado de: Monk et al., 2015).

1.2. Latrofilinas

Las latrofilinas (Lphn) son una familia de GPCRs de adhesión y en mamíferos se conocen tres isoformas (1, 2 y 3) las cuales son codificadas por diferentes genes y se expresan de forma diferencial. Se conoce que la expresión de las Lphn-1 y Lphn-3 se presenta en gran medida en el sistema nervioso central (Sugita et al., 1998; Ichtchenko et al., 1999) asociada al desarrollo de trastornos neuronales como el TDAH, así como al desarrollo de cáncer en células no neuronales. Por otro lado, la Lphn-2 presenta una expresión ubicua en diversos tipos de órganos (Boucard et al., 2014) .

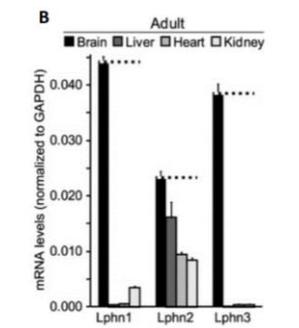


Figura 6. Distribución de las isoformas de las latrofilinas en un ratón adulto. Niveles de expresión del mRNA de las tres isoformas se encuentra principalmente en cerebro, y la isoforma 2 se puede encontrar en otros tejidos. (Boucard et al., 2014).

Todos las isoformas de la familia de las Lphn están compuestos por los siguientes dominios: (1) dos dominios de adhesión, (2) dominios de lectina y olfactomedina (seguido de una región rica en serina y treonina), (3) un dominio de unión a hormonas adyacente a un dominio (4) de inducción autoproteolítica del GPCR (GAIN) que abarca un sitio de escisión (GPS), (5) una región de siete hélices transmembranales característica de los GPCRs, y (7) un extremo C-terminal con un dominio de unión a motivos PDZ que es capaz de reclutar proteínas de andamiaje de unión a actina (Araç et al., 2012)

De manera general, las latrofilinas son relevantes para el desarrollo neuronal y las funciones cerebrales. Además, median la sinaptogénesis, y por lo tanto, la neuroplasticidad del sistema nervioso (Boucard et al., 2014).

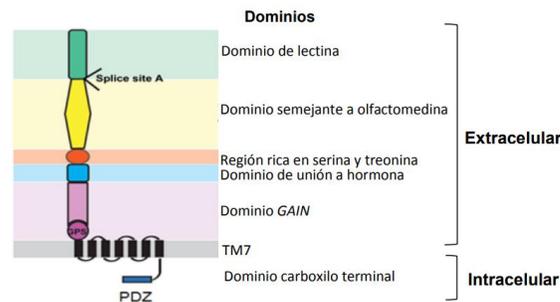


Figura 7. Modelo de la organización estructural de las latrofilinas. En su estructura general, las latrofilinas están conformadas por una subunidad extracelular que contiene los dominios de adhesión, y una subunidad intracelular que media la señalización con proteínas G (Tomado de: Ovando Zambrano, 2015).

1.2.1. Ligandos endógenos

Los dominios del extremo amino terminal de las latrofilinas les confieren la capacidad de interactuar con diferentes ligandos endógenos, que promueven la activación de diferentes procesos como la formación de adhesiones intercelulares o la activación diferencial de varias vías de señalización intracelular (Boucard et al., 2014; Boucard et al., 2012; Moreno-Salinas et al., 2019).

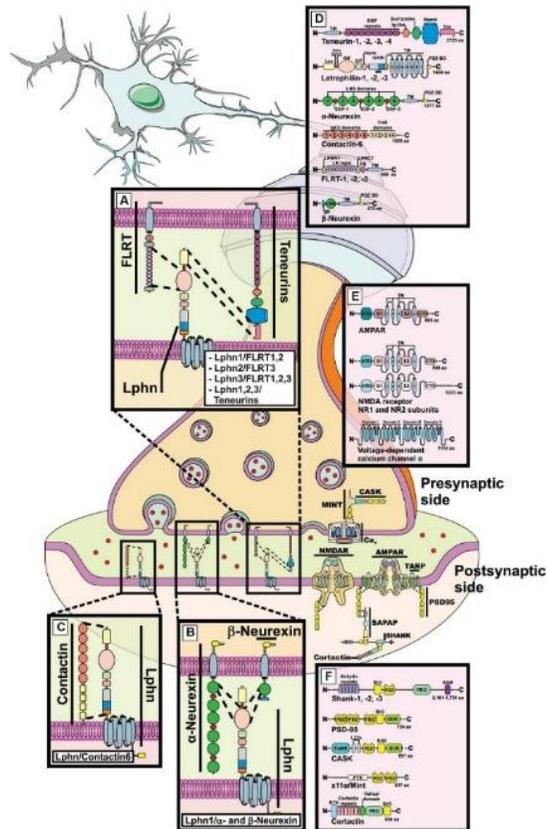


Figura 8. Interacción de latrofilina con diferentes ligandos en la sinapsis neuronal. Uniones moleculares entre las latrofilinas y sus ligandos (Figura tomada de: Moreno A. et al.,2019).

Ligandos endógenos de la latrofilina:

- **Teneurinas (Ten 1-4):** Están involucradas en el establecimiento y la formación adecuada de la sinapsis y promueven el crecimiento de neuritas y adhesión celular (Tucker y Chiquet-Ehrismann, 2006) .
- **Neurexinas (α y β):** Estabilizan la adhesión célula-célula (Boucard et al., 2012; Moreno-Salinas et al., 2019).
- **Proteínas transmembranales con repetidos ricos en lectina y fibronectina FLRT (FLRT 1-3):** Son moduladas de la adhesión celular y pueden interactuar con otras proteínas de la membrana celular y regular la expresión genica (Li et al., 2020).
- **Contactinas:** Las cuales también tienen un papel en la adhesión celular (Moreno-Salinas et al., 2019; Tropea et al., 2016).

1.2.2. Importancia de las latrofilinas en el neurodesarrollo

El desarrollo del sistema nervioso requiere que las neuronas transiten por una serie de cambios morfológicos y metabólicos para construir e integrar la red neuronal y alcanzar la madurez funcional (Schwabe et al., 2013). Uno de estos cambios corresponde al desarrollo de un cono de crecimiento, estructura altamente dinámica que detecta señales bioquímicas y estímulos de su entorno, para guiar el adecuado crecimiento del axón y encontrar un blanco celular correcto y establecer la sinapsis con otra neurona (Wang et al., 2002; Lowery y Vactor, 2009; Schwabe et al., 2013).

La motilidad y remodelación de esta estructura depende de la regulación del citoesqueleto celular, formado principalmente por filamentos de actina y microtúbulos (Kolodkin y Tessier-Lavigne, 2011; Marín et al., 2010; Sosa et al., 2013). El citoesqueleto es esencial para permitir la formación o retracción de estructuras celulares de contacto y avance, como son los filopodios y lamelipodios. La función de estas proyecciones celulares es aumentar la superficie de contacto de la célula con la matriz de adhesión para encontrar un camino de exploración y crecimiento más eficiente en el establecimiento de los contactos sinápticos. En esta labor, participan varias proteínas que se encargan directamente de la dinámica de ensamble y desensamble del citoesqueleto (Gordon-Weeks, 2004; Mortimer et al., 2008; Sosa et al., 2013).

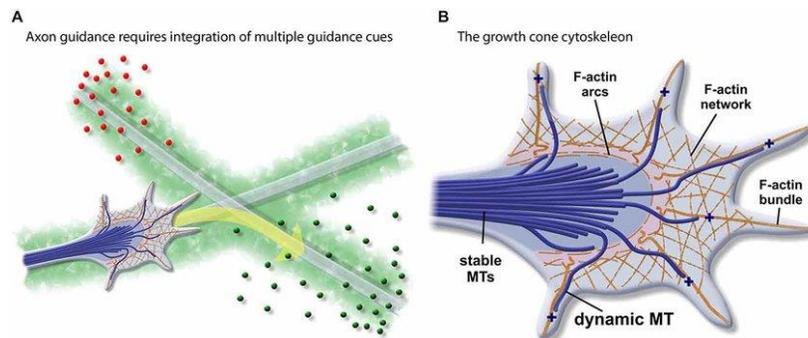


Figura 9. Cono de crecimiento. Estructura altamente dinámica cuya reestructuración depende de la regulación del citoesqueleto (Tomado de Bearce et al., 2015).

Durante el establecimiento organizacional del sistema nervioso, se ha reportado que las moléculas de adhesión celular son cruciales para la migración de las neuronas hacia las capas apropiadas de la placa cortical (Valiente y Marín, 2010; Schwabe et al., 2013) y actúan como señales guía sobre las neuritas.

Las interacciones que se dan entre las proteínas de superficie presentes en el cono de crecimiento y con sus respectivos ligandos, localizados tanto en la matriz extracelular como en las células adyacentes, son claves para conducir la migración celular y desencadenar cascadas de señalización que promueven el rearrreglo del citoesqueleto (Bonvicini et al., 2016; Lee et al., 2021; Yamada et al., 2005). De acuerdo a la literatura, las latrofilinas funcionan como moléculas que participan en la formación de los conos de crecimiento, en función de señales que establecen gradientes moleculares para que las estructuras celulares (filopodios o lamelipodios) sigan su curso (Sando y Südhof, 2021).

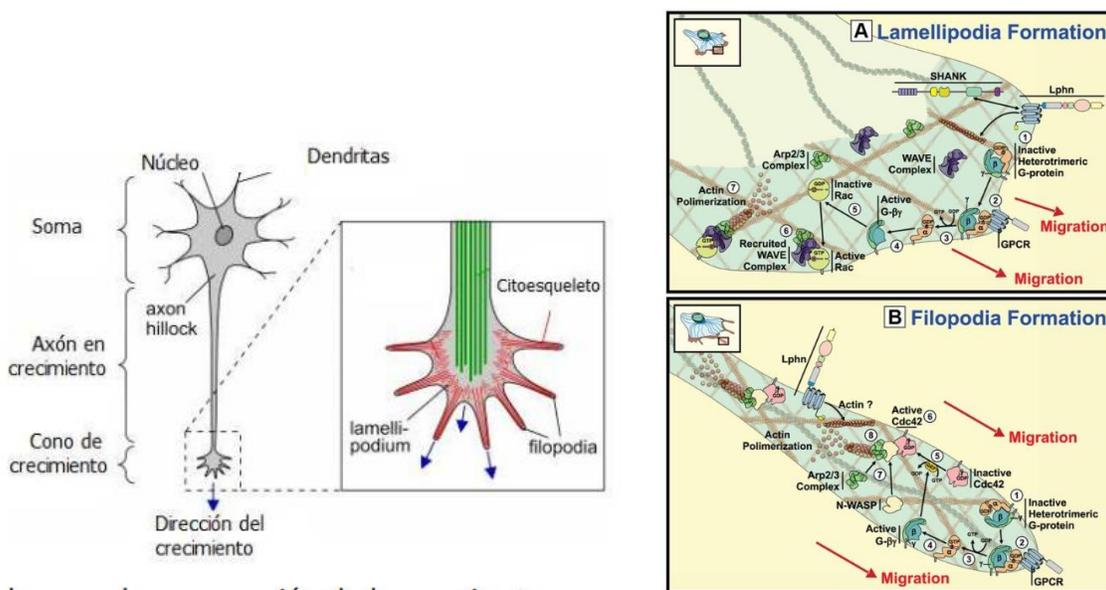


Figura 10. Representación gráfica del papel de Lphns en la formación de estructuras celulares de migración. Moléculas reguladoras del citoesqueleto de actina que participan en la formación de estructuras dinámicas (lamelipodios y filopodios) y que forman parte de las vías de señalización activadas por las Lphns (Moreno Salinas, 2019).

Así mismo, se ha reportado que, en eventos de migración neuronal, como en el desarrollo del cerebro, es necesaria la interacción Lphn/teneurina para la reestructuración del citoesqueleto de actina (Scholz et al., 2015). Un estudio demostró que los axones de neuronas hipocampales cultivadas *in-vitro* de ratones recién nacidos Lphn1 WT (*Adgrl1*^{+/+}) responden mediante un mecanismo de atracción axonal a un gradiente de variantes solubles de Lasso (variante de splicing de teneurina-2)/teneurina-2, en donde al interactuar Lasso y Lphn1 se activa $G\alpha_{q/11}$ y se dispara una cascada de señalización que estimula la liberación de calcio y la reestructuración del

citoesqueleto de actina; efecto dependiente de la expresión de Lphn-1 endógena, ya que el grupo de neuronas carentes de esta molécula es decir de ratones Lphn-1 KO (*Adgr11*^{-/-}) esta molécula no mostraron este comportamiento (Vysokov et al., 2018).

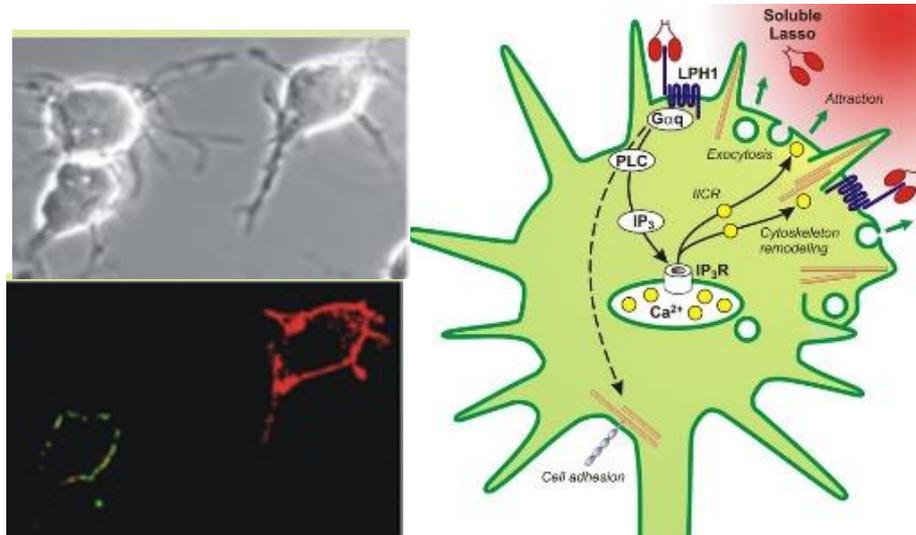


Figura 11. Mecanismo propuesto de atracción axonal por de Lasso/Ten-2 liberado. Cuando Lasso/Ten2 se une a de Lphn1 activa $G\alpha_{q/11}$ y dispara la cascada de señalización, aguas abajo de esta cascada la liberación de calcio de los depósitos intracelulares estimula la exocitosis y también puede estimular la reorganización de la actina a través de la proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII), mediando así la atracción axonal (Vysokov et al., 2018).

Por lo tanto, una desregulación en estos procesos puede provocar a una distribución y organización alterada de las neuronas durante el neurodesarrollo, así como un retraso en el establecimiento de conexiones neuronales o bien de errores en la formación de estos procesos (Bearce et al., 2015).

1.2.3. Papel de las latrofilinas en las neuronas maduras

El papel de las latrofilinas en la funcionalidad de las neuronas maduras lo cumplen a través de interacciones intermoleculares que se llevan a cabo con sus ligandos endógenos, participando en el adecuado establecimiento y acople entre los sitios presinápticos y postsinápticos que garantice su estabilidad estructural y funcional (Sando y Südhof, 2021; Südhof, 2021).

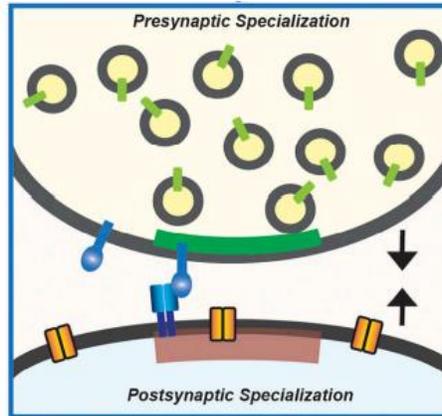


Figura 12. Esquema de la comunicación y especialización neuronal. El acople sináptico a través de moléculas de adhesión permite la comunicación entre una neurona presináptica y su correspondiente postsináptica (Südhof, 2021).

Se ha demostrado que la Lphn-3 podría desempeñar un papel relevante en el establecimiento de la sinapsis excitatoria, la cual es dependiente del ligando. En un estudio *in vitro* llevado a cabo en cultivos de neuronas de hipocampo, al interrumpir competitivamente los complejos endógenos de Lphn-3 y analizar las sinapsis glutamatérgicas por inmunofluorescencia, se encontró una marcada reducción de la densidad sináptica. Por lo tanto, se sugiere que la reducción de la disponibilidad de ligandos de Lphn-3 mediante la competencia con ecto-Lphn3-Fc impide que la sinapsis glutamatérgica se desarrolle correctamente (O'sullivan et al., 2012).

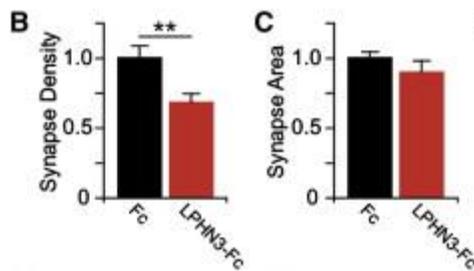


Figura 13. Gráfico de barras de la densidad y área sináptica. Interrupción competitiva de las interacciones endógenas de Lphn-3 con sus ligandos producto de ecto-LPHN3-Fc soluble agregado a cultivos de neuronas del hipocampo reduciéndose la densidad de sinapsis excitatoria. (O'Sullivan et al., 2012).

Se ha reportado también que la Lphn-3, desempeña un papel clave como molécula estabilizadora de la sinapsis neuronal que, de acuerdo con el análisis de muestras de tejido de cerebro de ratón

procesados por inmunohistoquímica, se ha encontrado que ésta regula el número de sinapsis formadas por las neuronas, donde el dominio olfactomedina de Lphn-3 es necesario para este efecto y para la unión a su ligando postsináptico (O'Sullivan et al., 2014).

Sando et al., 2019 , a través de ensayos de adhesión celular *in vitro* en células HEK 239T reportaron que Lphn-2 y Lphn-3 postsinápticas median la especificidad de la sinapsis al unirse simultáneamente a FLRT y teneurinas del lado presináptico.

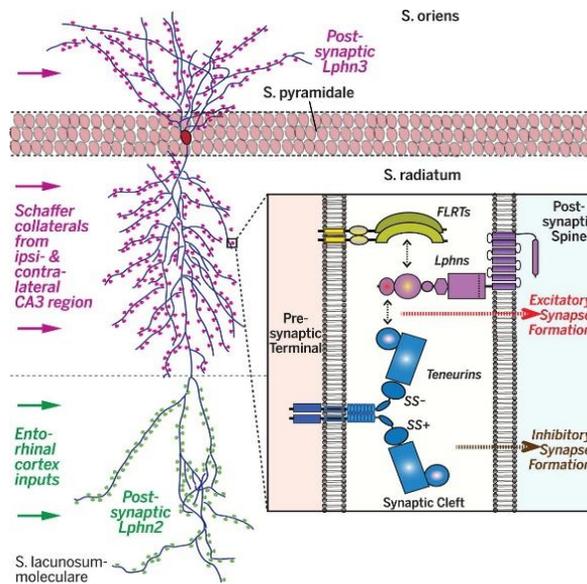


Figura 14. Latrofilina-2 y latrofilina-3 postsinápticas condicionan la especificidad sináptica. Las latrofilinas del lado postsináptico interactúan simultáneamente con FLRT y teneurinas, dos moléculas de adhesión celular ubicadas en la membrana presináptica, para establecer una adecuada entidad sináptica (Sando et al., 2019).

Por otro lado, se estudió el efecto de la expresión de las diferentes isoformas de latrofilina sobre la morfología de células embrionarios de riñón humano HEK 239T, en donde se encontró que existe un cambio morfológico de la célula, asociado a una remodelación del citoesqueleto de actina (Cruz-Ortega y Boucard, 2019); resultado que sería interesante evaluar ahora en células de origen neuronal, donde estas moléculas juegan un papel determinante en la conectividad, como se describió anteriormente.

1.3. Importancia de las latrofilinas en trastornos neuropsiquiátricos

Las latrofilinas son conocidas por su papel en la sinápsis neuronal (Boucard et al., 2013; Scholz et al., 2015), así como en la migración celular, polarización (Doyle et al., 2006).

Sin embargo, cuando éstas presentan algunas mutaciones en su secuencia, contrariamente su participación se ha asociado al desarrollo de algunas enfermedades neuropsiquiátricas tales como el trastorno por uso de sustancias (TUS), el trastorno bipolar (BD), la esquizofrenia (SCZ), la epilepsia y la microcefalia (MCP) y el trastorno del espectro autista (TEA) (Boucard et al., 2013).

Algunos polimorfismos que modifican al gen que codifica para Lphn-3, están asociados al trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) en niños y su permanencia en la edad adulta. En un estudio in vitro llevado a cabo en células embrionarias de riñón de humano HEK239, se realizó una validación funcional de las diferentes variantes de Lphn-3 relacionadas con el TDAH y que presentan mutación en la región extracelular que contiene el motivo de adhesión del receptor. Se encontró que todas las variantes probadas interrumpieron la capacidad de Lphn-3 para estabilizar la adhesión intercelular y existió un déficit en el acoplamiento de la subunidad $G\alpha_{13}$ de las proteínas G (Moreno-Salinas et al., 2019).

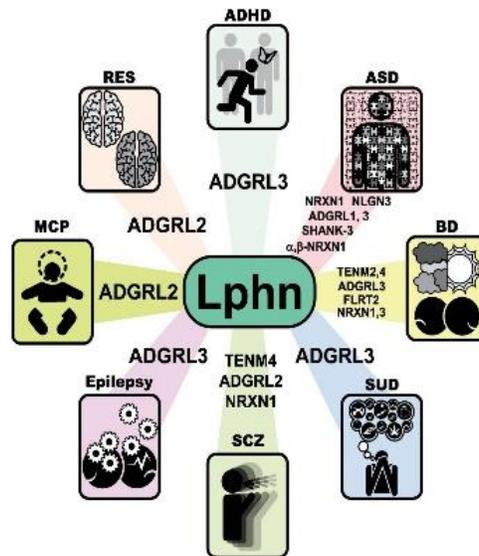


Figura 15. Redes moleculares que involucran a las latrofilinas y sus ligandos en la neuropatología humana. Trastornos neurológicos asociados con variaciones en genes de latrofilinas y algunos de sus ligandos endógenos (Tomado de: Moreno Salinas et al., 2022).

1.4. Moléculas de adhesión en enfermedades neurodegenerativas

Para el establecimiento de la sinapsis se requiere de la participación de moléculas de adhesión que proporcionan uniones especializadas entre las neuronas y forman parte integral de las funciones cerebrales. En las enfermedades neurodegenerativas existe una disrupción de la sinapsis y se conoce que la interrupción funcional y estructural de las mismas y las aberraciones en su plasticidad ocurren mucho antes de que comience el daño neuronal en este tipo de trastornos.

La expresión de las moléculas de adhesión puede ser alterada producto de agregados proteicos anormales que forman placas amiloides, marañas neurofibrilares o cuerpos de lewy; lesiones que son características de la histopatología de las enfermedades neurodegenerativas (Ross y Poirier, 2004; Lehman, 2009). Se ha encontrado niveles reducidos de proteínas sinápticas en el contenido de exosomas derivados de neuronas plasmáticas del tejido de pacientes con la Enfermedad de Alzheimer (Goetzl et al., 2018), y se ha reportado que las transcripciones de genes relacionados con el sistema nervioso como *Cntnap2*, *Vcan*, *Cntn4*, *Adgrl3* (el cual codifica para *Lphn3*) están sub-reguladas según un estudio llevado a cabo en oligodendrocitos del hipocampo de ratones infectados con priones (Slota et al., 2020).

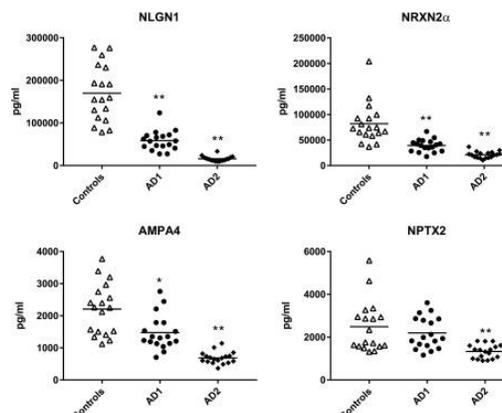


Figura 16. Cuantificación de proteínas sinápticas en exosomas de neuronas de tejido cerebral de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (post mortem). Los niveles AMPA4, NLGN1 y NRXN2 α , fueron significativamente más bajos que los de los controles emparejados en la fase preclínica 1 y 2 de demencia en comparación con el grupo control (Goetzl et al., 2018).

Sin embargo, a pesar de la relevancia de la latrofilina en el establecimiento sináptico, no se ha llevado a cabo estudios que permitan entender su papel fisiológico en la neurodegeneración.

1.4.1. La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa compleja en la que múltiples factores de diversos tipos están implicados en su establecimiento. Los síntomas clínicos de este padecimiento se deben a una muerte selectiva de ciertas poblaciones neuronales localizadas en aquellas áreas del cerebro relacionadas con las funciones cognitivas, como son el hipocampo y corteza entorrinal (López et al., 2003; Scheff et al., 2006; Furcila et al., 2018)

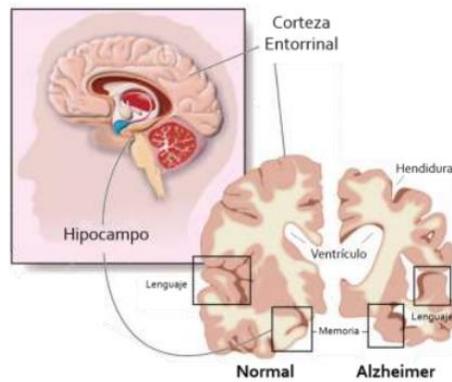


Figura 17. Degeneración y muerte neuronal en el cerebro de sujetos con la EA. Disminución de la masa cerebral producto de la muerte neuronal en zonas específicas del cerebro, en pacientes con EA en comparación con un sujeto sano (Tomado de: López-Camacho et al., 2018).

A nivel histopatológico, la EA se caracteriza por la acumulación extracelular anómala de depósitos fibrilares insolubles conocidos como placas de amiloide, conformadas por el péptido amiloide- β ($A\beta$), así como otros agregados fibrilares intracelulares llamados marañas neurofibrilares (MNFs). Estas estructuras están formadas por polímeros altamente insolubles conocidos como filamentos helicoidales apareados (FHAs) cuyo principal componente estructural es la proteína Tau (López-Camacho et al., 2017; Furcila et al., 2018).

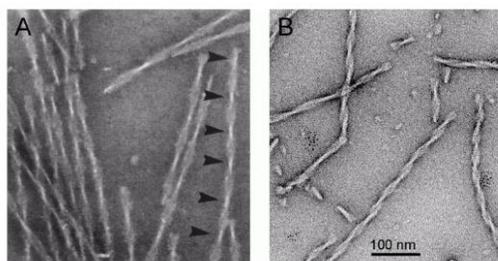


Figura 18. Filamentos helicoidales apareados. Micrografía electrónica de polímeros ensamblados *in vitro*, a partir de la proteína tau recombinante httau23 (Tomada de: Rodríguez Cruz, 2018).

La proteína Tau forma parte del grupo de proteínas estabilizadoras de los microtúbulos (MAPs), que se localizan principalmente en el axón de las neuronas diferenciadas. Sin embargo, en la EA se ha encontrado que la proteína tau puede sufrir de una serie de cambios postraduccionales, teniendo como consecuencia una pérdida de la afinidad de la molécula por el microtúbulo, provocando un deterioro de la conformación estructural de esta red de elementos del citoesqueleto y por consiguiente de los axones y sus conexiones con otras células vecinas. Adicionalmente, al disociarse del microtúbulo, la proteína tau puede autoagregarse anormalmente en la forma de FHAs y MNFs que producirán algunas otras alteraciones fisiológicas en las neuronas, llevándolas a su muerte inminente con el paso del tiempo (Kolarova et al., 2012; Braak y del Tredici, 2016; López-Camacho et al., 2017).

Por lo tanto, nuestro grupo de investigación ha estudiado a la proteína Tau y sus variantes truncadas para conocer sus propiedades de citotoxicidad; por ejemplo, la sobreexpresión de la proteína tau de 441 aminoácidos y la variante truncada en el ^{Asp421} en células de neuroblastoma, promueve la formación de anillos anormales de microtúbulos (Rodríguez-Cruz et al., 2018).

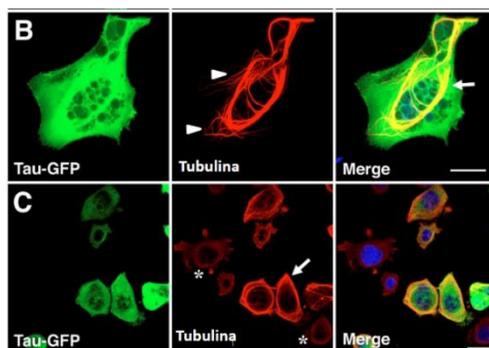


Figura 19. Anillos de tubulina provocados por la sobreexpresión de la proteína Tau. La expresión de la proteína Tau441-GFP promueve la formación de anillos de microtúbulos (Rodríguez Cruz, 2018-Trabajo de tesis).

Estos anillos anormales de microtúbulos afectan la estructuración de diversos organelos intracelulares incluyendo el núcleo y el aparato de Golgi, por lo cual se ha sugerido que indirectamente la proteína Tau puede alterar componentes membranosos, incluyendo aquellos que

forman parte de las terminales sinápticas, como producto de una alteración en la estructuración del citoesqueleto neuronal.

1.4.2. Sinapsis en la enfermedad de Alzheimer

Numerosos estudios realizados en modelos murinos y en muestras de tejido cerebral obtenidas postmortem de pacientes con EA han reportado alteraciones de la conectividad sináptica, tanto en el hipocampo como en otras regiones corticales, presentándose más vulnerabilidad en los circuitos glutamatérgicos excitatorios (Scheff et al., 2006, Kashani et al., 2008, Braak y del Tredici, 2016, Llorens-Martín et al., 2014).

Por medio de inmunohistoquímica y con anticuerpos contra ciertas moléculas de adhesión neuronal como NCAM, en este mismo tipo de muestras de tejido cerebral se encontró una disminución significativa de este marcador en diversas poblaciones de neuronas y astrocitos en la corteza frontal de las personas afectadas por EA, en comparación con las observaciones hechas en sujetos ancianos control sin un deterioro cognitivo significativo (Yew et al., 1999). En otros estudios utilizando técnicas bioquímicas para la determinación de NCAM en extractos de tejidos cerebral, Aisa et al., 2010 demostraron que los niveles de NCAM se redujeron en la corteza frontal y temporal de pacientes con EA en comparación a sujetos ancianos control (Yew et al., 1999).

La pérdida de sinapsis en la EA se ha relacionado, al menos en parte, con la toxicidad producida por la acumulación anormal del péptido amiloide- β , y se ha reportado que varias moléculas de adhesión actúan como receptores de esta molécula (Leshchyn's'ka y Sytnyk, 2016). Se ha reportado una interacción directa del péptido amiloide- β con el dominio extracelular de NCAM2, tanto *in vitro* como *in vivo* en cultivos primarios de neuronas del hipocampo de ratón normal y en el hipocampo de ratones transgénicos que sobre expresan la APP (proteína precursora del amiloide- β) (Leshchyn's'ka et al., 2015). Por otro lado, en un estudio llevado a cabo en neuronas primarias del hipocampo y corteza cerebral de rata cultivadas *in vitro*, se reportó que el dominio extracelular de la neurologina-1 se une al amiloide- β (Dinamarca et al., 2011), proponiéndose que su acumulación y asociación anómala con estos receptores podría alterar la estructura y función de la sinapsis, y por lo tanto alterar la conexión y comunicación entre las neuronas.

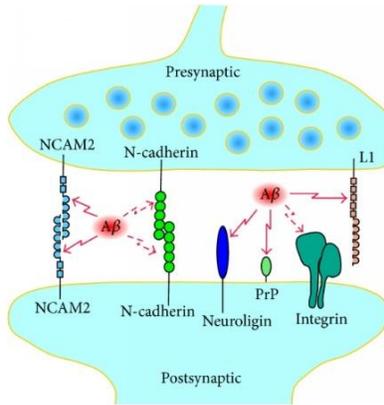


Figura 20. Moléculas de adhesión en la sinapsis que se asocian al péptido amiloide-β. Representación esquemática de una sinapsis que muestra las proteínas CAM presinápticas y postsinápticas, que se pueden unir al amiloide-β. Se ha demostrado una interacción directa del amiloide-β con NCAM2, neurologina, y L1 (Tomado de: Leshchyns'ka y Sytnyk, 2016).

Con otro tipo de abordaje, al analizar el proteoma del líquido cefalorraquídeo obtenido de pacientes con la EA, se encontró una disminución en el nivel de expresión de proteínas asociadas a la migración neuronal y adhesión celular, como A2GL, C1QB, FBLN3, C1QC, C1S, APOM, , PTPRZ y SEZ6 (Khoonsari et al., 2016).

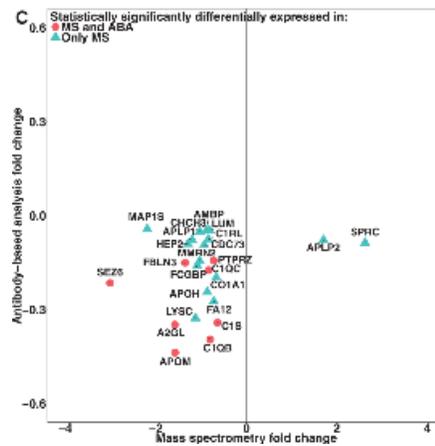


Figura 21. Disminución significativa de proteínas relacionadas con procesos de migración y adhesión celular en pacientes con EA. Gráfico de dispersión basado en análisis de proteínas totales y espectrometría de masas (Khoonsari et al., 2016).

Sin embargo, con lo que respecta a las latrofilinas como moléculas receptoras, y su posible participación en el establecimiento y/o progresión de la EA, no existen estudios suficientes que puedan encontrar una relación patológica.

2. Justificación

Los GPCRs de adhesión son receptores que participan en varios procesos celulares y desempeñan funciones críticas durante la migración neuronal, la sinaptogénesis, el crecimiento axónico y la transducción de señales.

La latrofilinas son una familia de GPCR's de adhesión que cumplen la función de contribuir en el establecimiento de conexiones precisas entre las células del sistema nervioso, basada en la interacción variada con sus distintos ligandos. Tienen un papel importante en varios trastornos neuropatológicos como el desarrollo de TDAH, pero no hay información reportada sobre la contribución de los GPCRs en distintas enfermedades neurodegenerativas, donde su expresión y distribución podría ser alterada debido a la acumulación anómala de proteínas autoagregativas como Tau y el amiloide- β que median estos procesos anormales.

Recientemente se ha reportado que la sobreexpresión de las distintas isoformas de latrofilina produce cambios morfológicos en la línea celular embrionaria de riñón HEK293T (Cruz-Ortega y Boucard, 2019), que están asociados a una reestructuración del citoesqueleto de actina, sin embargo es importante estudiar si estas moléculas son capaces de generar estas alteraciones en la estructuración integral del citoesqueleto de tubulina y actina, y por lo tanto, en la morfología normal de las células neuronales

En función de esto y como primer paso, es importante estandarizar metodológicamente la sobreexpresión de Lphn-3 en células de neuroblastoma SH-SY5Y, para contar con un modelo neuronal *in vitro*, que nos permita a futuro evaluar los efectos de estas moléculas sobre la anatomía funcional de la neurona y su asociación con otras proteínas autoagregativas que juegan un papel importante en las enfermedades neurodegenerativas.

3. Hipótesis

Se ha reportado que las latrofilinas como receptores involucrados en diversas funciones celulares, producen cambios en la organización del citoesqueleto de actina en células no neuronales, y debido a que estas moléculas son importantes en el establecimiento de la comunicación sináptica en el sistema nervioso, podremos suponer que la sobreexpresión de Lphn-3 en células neuronales cultivadas *in vitro* podría altera de manera integral la estructuración del citoesqueleto de actina y tubulina produciendo alteración morfológica y funcional de esta células.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

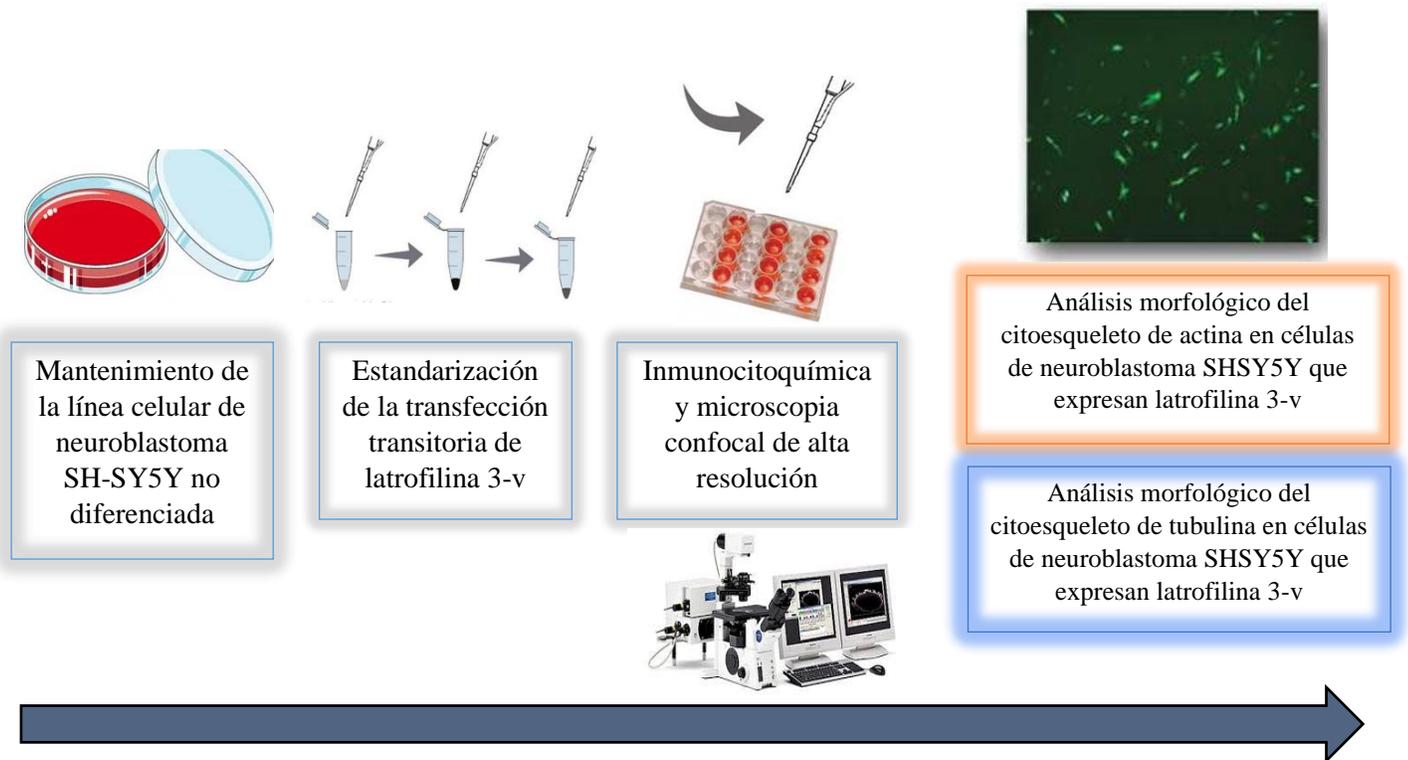
- Estandarizar la expresión de latrofilina-3 en células de neuroblastoma SH-SY5Y no diferenciadas para estudiar sus posibles efectos sobre la estructuración del citoesqueleto neuronal.

4.2. Objetivos Específicos

- Sobreexpresar transitoriamente a latrofilina-3 en células de neuroblastoma SH-SY5Y comparando el método de polietilenimina (PEI) y la técnica de lipofección.
- Evaluar los efectos de la sobreexpresión transitoria de latrofilina-3 sobre el citoesqueleto de actina y de tubulina en la línea celular SH-SY5Y no diferenciada.

5. Diseño experimental

Como sistema experimental se utilizará la línea celular de neuroblastoma SHSY5Y no diferenciada.



6. Materiales y Métodos

6.1. Cultivo Celular

Se trabajó con la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y no diferenciada (American Type Culture Collection ATCC, VA, USA), la cual se cultivó en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 a 4.5 g/L de glucosa (DMEM F-12) (Invitrogen, CA, USA), suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Invitrogen) al 5 %, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 mg/mL, y se mantuvo bajo incubación a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95% de humedad relativa. Los subcultivos se disgregaron con Tripsina-EDTA al 0.25 % y se realizó un conteo celular con la ayuda de una cámara de Neubauer

Las células se sembraron en una proporción de 1:10 en una caja Petri p100 y mantenerse por un máximo de 26 pases. Se recambió el medio de cultivo cada tres días impidiendo su diferenciación.

6.2. Transformación de bacterias competentes

Las bacterias competentes se transformaron con 1 µl de los plásmidos correspondientes, dejándose en reposo por 30 minutos, para realizar posteriormente un shock térmico a 42°C por 30 segundos. Después de esto las bacterias se colocaron en hielo y transcurridos 5 minutos se colocaron 450 µl de medio SOC, para incubarse a 37°C en agitación constante a 200 rpm durante una hora. Las bacterias se plaquearon adicionando 100 µl del tubo con las células transformadas y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

6.3. Selección de colonias

Se seleccionaron colonias aisladas y se colocaron en tubos de ensayos con 2ml de medio LB suplementado con el antibiótico ampicilina (100 µg/ml). Se incubó a 37°C en agitación constante a 2000 rpm durante 8 horas, y se transfirió a un matraz con 100 ml de medio LB. Se incubó a 37°C en agitación a 2000 rpm durante 16 horas, para realizar después la extracción del ADNp.

6.4. Extracción de ADN por lisis alcalina

Las suspensiones bacterianas fueron centrifugadas a 7500 rpm por 15 min a 4°C. La pastilla obtenida se resuspendió en 3 ml de solución de lisis I fría, 450 µl de solución de lisozima (4°C)

y 6 ml de solución II a temperatura ambiente (TA). Posteriormente se adicionaron 6 ml de cloroformo, 3 ml de solución III fría (4°C) y se centrifugó a 5000 rpm por 12 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a tubos que contenían isopropanol y se centrifugo por 12 minutos a 5000 rpm 4°C y la pastilla obtenida se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 500 µl de buffer TE.

6.5. Purificación de ADNp por polietilglicol (PEG)

Al ADNp, se le agrego LiCl 5M, y se centrifugo a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se colocó isopropanol, dejando incubar por 10 min a TA. A continuación, se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min a 4°C, y se lavó la pastilla con etanol (70%) y se disgrego en 500 µl de Buffer TE + RNasa.

Posteriormente se incubó a 22°C por 30 min, y posteriormente se adiciono 500 µl de PEG al 13%. A continuación, los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm y la pastilla se resuspendió en 500 µl de Buffer TE, donde se adicionaron 500 µl de fenol/cloroformo, se centrifugo a 13,000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a otro tubo que contenía 120 µl de acetato de amonio (10M) y 2 volúmenes de etanol absoluto. Por último, se centrifugó a 13,000 rpm por 12 min a 4°C y la pastilla fue lavada con etanol (70%)y se disolvió en buffer TE.

Tabla 1. Soluciones

Solución	Componentes	Características
Solución de lisis I	50 mM de glucosa, 10 mM, EDTA ,25 mM Tris-HCl, pH 8.0, en agua miliQ. Esterilizar en autoclave	Extracción de ADN plasmídico (4°C)
Solución de lisis II	1% de SDS, 0.2 N de NaOH; en agua miliQ	Extracción de ADN plasmídico (4°C)
Solución de lisis III	3 M de KCH3CO2, 11.5 % de ácido acético; en agua miliQ.	Extracción de ADN plasmídico (4°C)
Polietilenglicol	1.6 M de NaCl,13 % de polietilenglicol; en agua miliQ	4 °C; protegido de la luz Purificación de ADN plasmídico
Polietilenimina (PEI)	Polietilenimina de cadena lineal	4 °C; en esterilidad protegido de la luz. No

	1 mg/ml esterilizado por filtración. Polysciences, Cat. No. 23966-1.	almacenar por más de 3 meses. Transfección
RNasa A Invitrogen™ UltraPure™ RNase A (20mg/mL), Powder Ref: 12091039	RNAasa 20 µg/mL en agua miliQ	4 °C / Purificación de ADN plasmídico
Lisozima	10 mg/mL de lisozima en Tris-HCl 10 10 mM pH 8.0	4 °C / Purificación de ADN plasmídico

6.6. Transfección por el método de lipofección con lipofectamina 2000

Las células SH-SY5Y se cultivaron en cubreobjetos recubiertos de colágena tipo-I derivada de piel de ternera (0.01mg/ml; SIGMA-ALDRICH) durante 24 horas en una caja de 24 pozos y a 37 °C. Y a una confluencia aproximada del 70-80 % de células, se transfectó independientemente con los plásmidos que codifican para Lphn-3v, m-venus y pCMV

Para la transfección se preparó un complejo de ADN: Lipofectamina 2000 (1:2) (Invitrogen), a dos concentraciones distintas para cada cubreobjeto de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 2. Mezcla de transfección con lipofectamina 2000 para cada cubreobjeto

	Mezcla A	Mezcla B
Optimen	100 ul	100 ul
ADNp	0,5 ug	-
Lipofectamina 2000	-	1 ul
Optimen	100 ul	100 ul
ADNp	1,3 ug	-
Lipofectamina 2000	-	2,6 ul

Posteriormente, el ADN se mezcló con la Lipofectamina 2000, se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente (TA) y el complejo se adiciono a las células previamente incubadas con

200 µl de Optimen. Se incubo a 37°C en una atmosfera de CO₂ al 5%, probando las siguientes condiciones:

Tabla 3. Condiciones de transfección probadas con el método de lipofeccion- lipofectamina 2000.

Concentración de ADNp (ug)	0,5	0,5	1,3
Tiempo de incubación con el complejo (ADN: Lipofectamina 2000)	4 horas	6 horas	16 horas
Inmunofluorescencia	48 horas pos-transfección	24 horas pos-transfección 48 horas pos-transfección	48 horas pos-transfección
	-----	-----	-----

Transcurrido el tiempo respectivo, de acuerdo con cada condición probada, se retiró la mezcla y se colocó medio fresco DMEM-F12 al 5 % de SFB, dejando incubar las células al tiempo especificado (Tabla 3) a 37°C, para que finalmente se fijaran las células y se analizaran por inmunofluorescencia.

Siguiendo el mismo protocolo, una vez agregado el complejo ADN/Lipofectamina 2000, las células se incubaron por 16 horas a 37°C en una atmosfera de CO₂ al 5%. Luego se retiró la mezcla y se adicionó medio DMEM-F12 al 10% de SFB, y se incubo las células por 48 horas a 37°C, para posteriormente ser analizadas por inmunofluorescencia.

6.6.1. Transfección por el método de lipofeccion con lipofectamina plus.

Las células SHSY5Y fueron cultivadas en cubreobjetos siguiendo el método previamente descrito. Una vez que las células llegaron a una confluencia aproximada a 70-80%, se transfectaron independientemente con los plásmidos que codifican para Lphn3-vy m-venus.

Para la transfección se preparó un complejo de ADN: Lipofectamina plus (1:3) (Invitrogen) de la siguiente manera:

Tabla 4. Mezcla de transfección con lipofectamina 2000 para cada cubreobjeto.

	Mezcla A	Mezcla B
Optimen	25 ul	25 ul

ADNp	0,5 ug	-
Lipofectamina	-	1 ul
Plus	4 ul	-

Se mezcló el ADN con la Lipofectamina plus, se dejó reposar por 15 minutos a temperatura ambiente y se agregó a las células previamente incubadas con 250 µl de Optimen. Se incubó por 4 y 6 horas de manera independiente a 37°C en una atmosfera de CO₂ al 5%. Después de retirar el complejo se agregó medio DMEM-F12 al 5 % de SFB, y se incubo a las células por 48 horas a 37°C, para posteriormente fijarse y analizarse por inmunofluorescencia.

6.7. Transfección por el método de PEI

Las células SH-SY5Y se cultivaron en cubreobjetos recubiertos de colágena tipo-I derivada de piel de ternera (0.01mg/ml; SIGMA-ALDRICH) durante 24 horas en una caja de 24 pozos y a 37 °C. Y a una confluencia aproximada del 70-80 % de celulas, se transfectó independientemente con los plásmidos que codifican para Lphn-3-v, m-venus y pCMV.

El complejo de transfección se preparó en un tubo eppendorf, mezclándose el ADNp a diferentes concentraciones, polietilenimina lineal PM 25 000 (PEI) y medio basal DMEM F12 (Tabla 5). La mezcla se agitó en vórtex durante 30 segundos y luego se mantuvo durante 30 minutos a TA y en oscuridad, completándose el complejo al adicionar 125 µl de medio basal. El complejo ADN/PEI se agregó gota a gota sobre las células, las cuales fueron incubadas durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se completó el volumen con 250 µl medio DMEM F12 al 20% de SFB sin antibiótico.

Tabla 5. Complejo de transfección

ADNp (ug)	PEI (1:3) (ul)	DMEM F12 (ul)	Vol. final por pozo
1.3	4	120	500 ul
1,8	5.4	117	500 ul
2	7.5	115	500 ul
4	12	109	500 ul

El complejo se dejó mezclar a diferentes tiempos (Tabla 6) de manera independiente y posteriormente fue reemplazado agregando 500 μ l de medio DMEM F12 al 10% de SFB con antibióticos, hasta alcanzar 48 horas post-transfección. Finalmente se probó una condición adicional dejando al complejo por 48 horas.

Tabla 6. Tiempo de incubación del complejo de transfección en células SH-SY5Y

Complejo (ADNp-PEI- medio de cultivo DMEM F12)	Tiempo de incubación
	4 horas con reemplazo de medio de cultivo.
	19 horas con reemplazo de medio de cultivo.
	48 horas con reemplazo de medio de cultivo.

6.8. Inmunofluorescencia

A las 48 horas de transfección, las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4 % en PBS 1X a TA por 15 minutos. Se realizó un lavado con PBS 1x durante 5 min y se permeabilizó con PBS-tritón al 1% durante 10 minutos en agitación constante y se realizó un lavado final con PBS 1X.

Para visualizar el citoesqueleto de actina, las células se tiñeron durante 1 hora con faloidina-rodaminada (Invitrogen R415) diluida en PBS 1X (1:500). Las células se lavaron con PBS 1X y por último se tiñeron con Hoechst-33258, un colorante fluorescente con una afinidad por el ADN, a una dilución de 1:5000 en PBS 1X. Se lavaron 2 veces con PBS 1X y las células se montaron en portaobjetos con medio Vectashield neutro (VECTOR H-1000) para mantenerse en mejores condiciones ópticas al analizarse bajo microscopía de luz.

Para observar el citoesqueleto de tubulina, las células se fijaron y se permeabilizaron como se describió anteriormente y se incubaron con solución de bloqueo (gelatina 0.5 %, SFB 1.5 % en PBS 1X) por 1 hora a TA, realizándose al término un lavado con PBS 1X. Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente por 1 hora. Y se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS 1X en agitación constante, para posteriormente incubar las células con el respectivo anticuerpo secundario diluido en PBS 1X (1:200) por un período de 1 hora en oscuridad.

Las células se lavaron 3 veces con PBS 1X, y por último se tiñeron con Hoechst a una dilución de 1:50 000 en PBS 1X durante tres minutos y se realizaron dos lavados con PBS 1X y se colocaron en portaobjetos con medio de montaje Vectashield (VECTOR H-1000) para ser observadas en el microscopio

Tabla 7. Anticuerpos y colorantes

Anticuerpo	Epítotope	Hospedero	Procedimiento	Dilución	Tiempo	Referencia
α -Tubulin monoclonal	α -Tubulin	Raton-IgG	IC	1: 1000	1h	Santa Cruz

Organelo	Marcador fluorescense	Excitación/emisión (nm)	Procedimiento	Dilución	Tiempo	Referencia
Núcleo	Hoesch-33258	350-461	FL	1: 30 000	3 min	Invitrogen Molecular Probes, CA, USA
Citoesqueleto de actina filamentosa	Faloidina-rodamina	540-565	FL	1:500	1h	Invitrogen Molecular Probes, CA, USA

IC: Inmunocitoquímica, FL: Fluorescencia.

6.9. Análisis estadístico

Se empleó la prueba de ANOVA de una vía con pos-análisis de Tukey, mediante el programa GraphPad 6.01. Se tomó un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo y el código utilizado para la determinar la significancia es:

Símbolo	Significado
*	$p \leq 0.05$
**	$p \leq 0.01$
***	$p \leq 0.001$
****	$p \leq 0.0001$

7. Resultados

7.1. Características morfológicas de las células SH-SY5Y no diferenciadas cultivadas *in vitro*

Las células SH-SY5Y utilizadas en este estudio, en su condición no diferenciada, presentan una morfología característica en forma de huso; son fusiformes y alargadas en su mayoría, pero también existen en menor proporción fenotipos más poliédricos, que varían dependiendo del avance de su maduración en cultivo. Esta forma fusiforme se puede apreciar en la Figura 21, que representa imágenes colectadas por microscopía confocal, utilizando marcadores fluorescentes para la identificación del núcleo celular (Hoechst), el citoesqueleto de actina (Faloidina-Rodamina) (panel A, Figura 21), e inmunodetección para el citoesqueleto de tubulina (ratón monoclonal anti-tubulina) (panel B, Figura 21). Estas células han sido utilizadas por nuestro laboratorio para la caracterización de los efectos que se producen sobre su morfología cuando se expresan diversas proteínas que participan o no, en algunos procesos neurodegenerativos. En este estudio, particularmente nos interesamos en evaluar varios parámetros morfológicos de estas células de neuroblastoma, cuando expresan a una proteína de una familia de proteínas muy importantes dentro de la fisiología y patología del sistema nervioso, conocidas como latrofilinas.

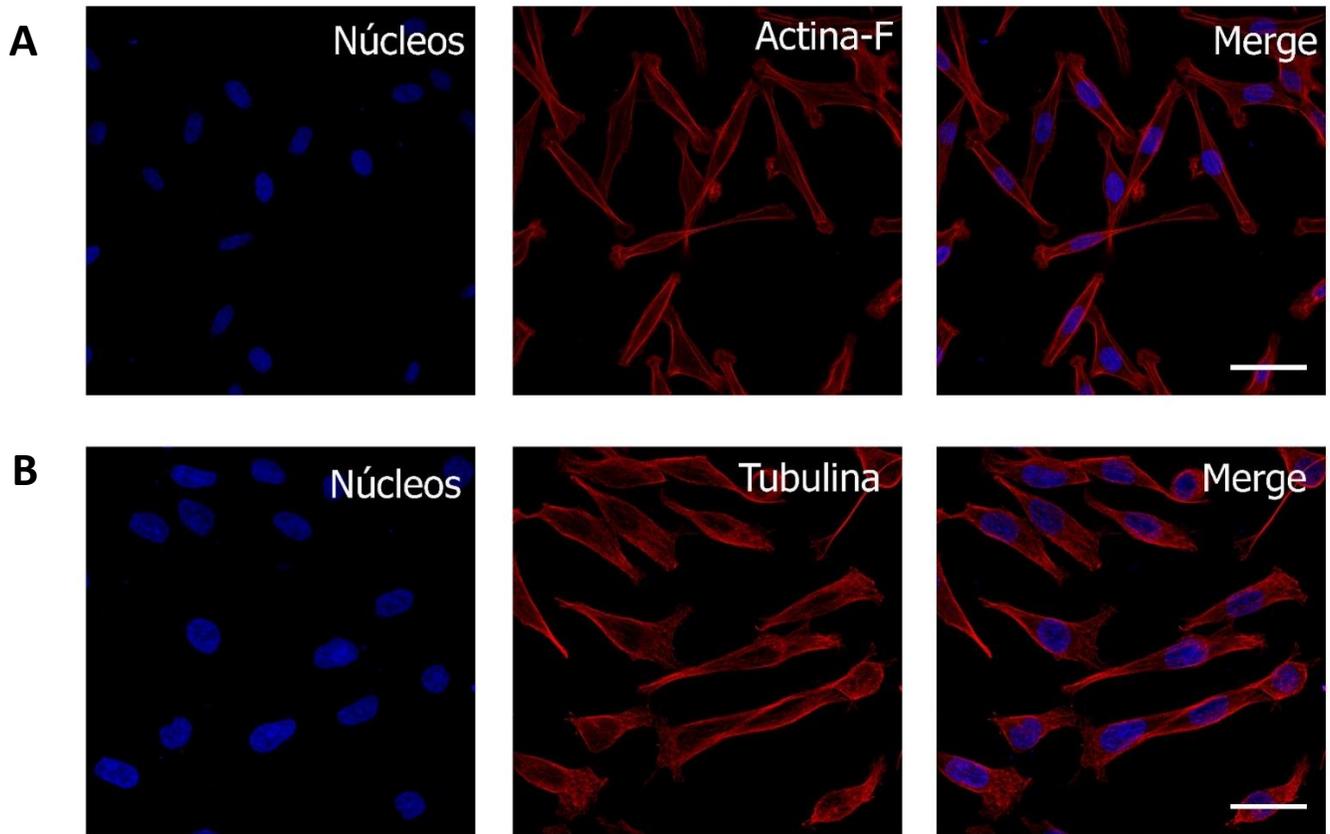


Figura 21. Morfología de células de neuroblastoma no diferenciadas SH-SY5Y. Por inmunofluorescencia y microscopía confocal, las células presentan una morfología en forma de "huso", fusiformes o poliédricas, tal y como se muestra en el canal rojo que define el citoesqueleto de actina detectado con faloidina-rodamina (A). (B) El citoesqueleto de tubulina fue revelado por el inmunomarcaje con un anticuerpo monoclonal anti α -tubulina. Las barras representan 30 μm y 20 μm .

7.2. Características del vector de expresión de latrofilina 3

Para caracterizar la expresión de latrofilina-3 (Lphn3-v) en células neuronales se utilizó un plásmido que contiene la secuencia de Lphn-3, la cual tiene acopladas una etiqueta verde fluorescente m-venus y una etiqueta HA (hemaglutinina) en la primera asa transmembranal en el fragmento del carboxilo terminal (CTF), así como una etiqueta flag al final del fragmento amino terminal (Figura 22).

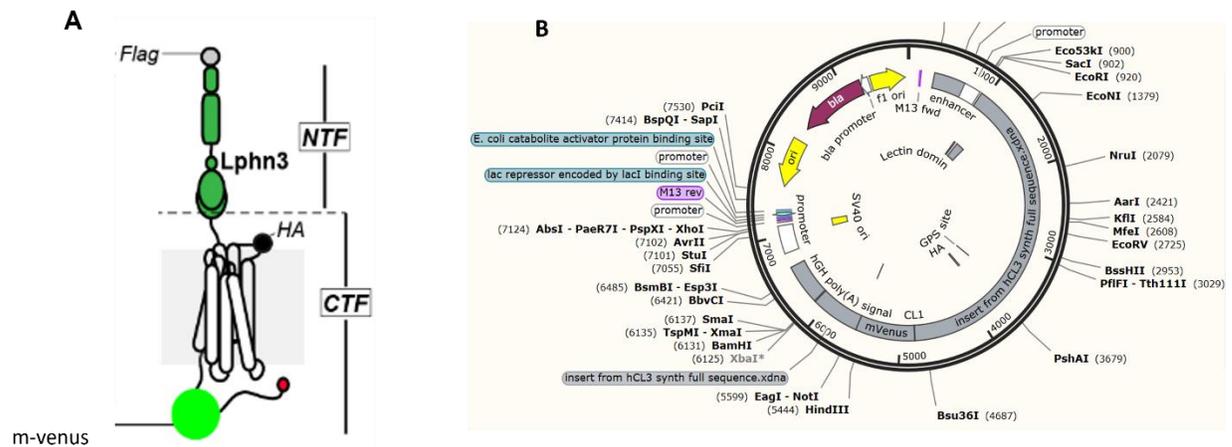


Figura 22. Molécula de adhesión latrofilina-3 (Lphn3-v). **A)** representación gráfica de Lphn3-v acoplada con tres etiquetas en la fracción carboxilo y amino terminal. **B)** mapa del vector que codifica para Lphn3-v conformado por 9808 pb. (Tomado de Cruz-Ortega, 2022).

7.3. Restricción enzimática

Con el objetivo de corroborar la integridad del plásmido en cuestión y asegurarse que contuviera el inserto de la etiqueta verde fluorescente m-venus como marcador fluorescente relevante para el análisis en este trabajo, se realizó una restricción enzimática de este vector. Por un lado, el plásmido de Lphn3-v se restringió con la enzima Hind III, generando un fragmento de 9808 pb que corresponde al número total de pares de bases que tiene el vector, y por otro, con las enzimas BamHI y SacI, que generaron fragmentos de 5229 pb y 4579 pb respectivamente (Figura 23, panel b). Este resultado coincidió con el patrón de corte realizado *in silico* (Figura 23, panel a).

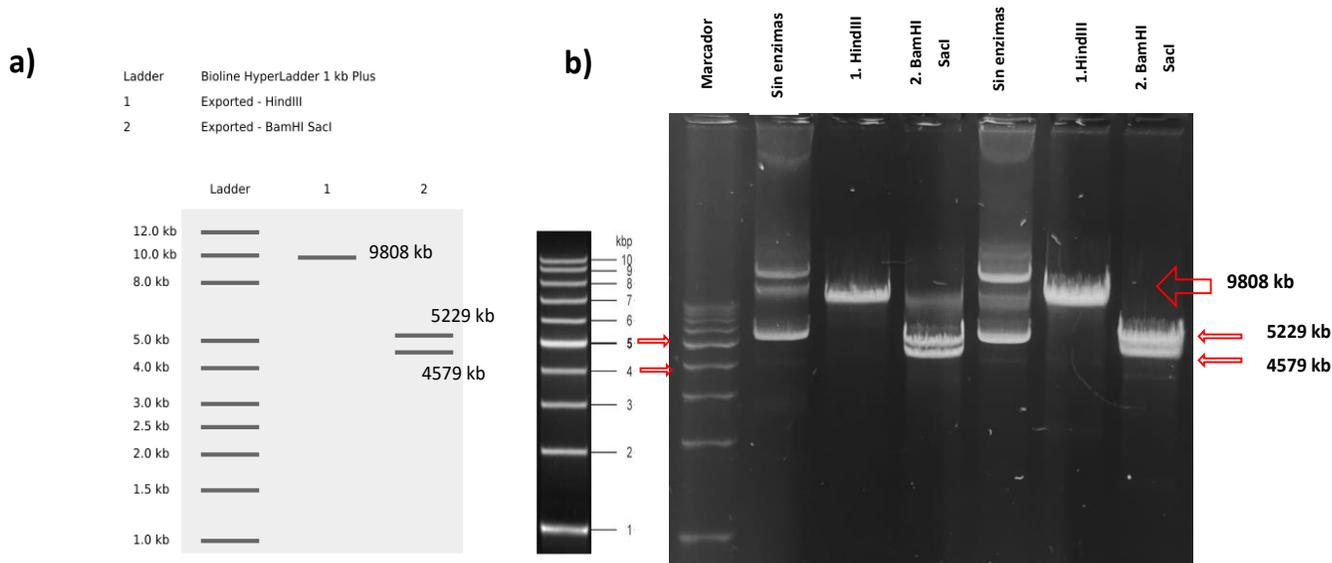


Figura 23. Restricción enzimática de Lphn3-v. A) Patrón de corte in silico de Lphn3-v con enzimas de restricción. B) Restricción enzimática de dos muestras independientes de Lphn3-v en un gel de agarosa al 1%, en donde se observa que los fragmentos generados con las respectivas enzimas (Hind III, BamHI y SacI) corresponden al patrón de corte.

7.4. Eficiencia de transfección en células de neuroblastoma SH-SY5Y no diferenciadas

7.4.1. Eficiencia de transfección por el método de lipofección

Siguiendo el método utilizado por nuestro laboratorio para la transfección de plásmidos codificantes para diversas proteínas en células de origen neuronal, inicialmente se empleó el método de lipofectamina, utilizando las diversas variantes de la casa comercial (Termo Fisher scientific), como Lipofectamina-2000 y Lipofectamina-plus. Para proteínas conocidas, la eficiencia de transfección normalmente la determinamos bajo el microscopio, a través del conteo directo de células que expresan al marcador fluorescente de interés con respecto al total de células en el campo, visualizadas por tinción nuclear o por tinción del citoesqueleto. Para el análisis cuantitativo se toman varios campos (10 campos) de al menos 3 experimentos independientes. No obstante, bajo este método utilizando las lipofectaminas, la transfección del plásmido codificante para Lphn3-v fue muy escasa, y aún después de haber realizado diversas modificaciones en cuanto a la concentración y tiempos de incubación de los diversos componentes de la mezcla de transfección, no se obtuvieron resultados significativos.

Debido a esto y después de varios intentos se decidió utilizar el método de PEI, que normalmente es utilizado para la expresión de latrophilina-3 en células no neuronales que presentan menos susceptibilidad (Boucard et al, 2019).

7.4.2. Eficiencia de transfección por el método de PEI

Utilizando el método de PEI y después de 48 horas de transfección, se obtuvo una eficiencia variable, que dependió de la concentración de plásmido utilizado. En general, ésta alcanzó un 17% como promedio de las diversas concentraciones analizadas (Tabla 7). Es notorio observar que en la concentración más elevada de plásmido (4 μg) se obtuvo una notoria eficiencia de transfección de la proteína venus (control de expresión de la etiqueta fluorescente, únicamente) (alrededor del 65%); sin embargo, a esta concentración la eficiencia de transfección de Lphn3-venus (v) fue poco significativa. A una concentración de 2 μg de ADN plasmídico, se alcanzó como máximo un 18% de eficiencia de transfección para la variante Lphn-3-v, y este valor fue muy cercano para las concentraciones menores a 2 μg , sin diferencias significativas estadísticamente. Por lo tanto, se utilizó 1,3 μg de concentración para el resto de los experimentos de transfección en el presente estudio.

Tabla 8. Porcentaje de transfección a diferentes concentraciones de ADNp de Lphn3-v

ADN (μg)	Lphn3-v	m-venus
1.3	16.35 \pm 2.62	26.91 \pm 1.13
1.8	17.68 \pm 0.75	29 \pm 2.73
2	18.84 \pm 1.11	33.2 \pm 1.10
4	2.6 \pm 0.89	65.6 \pm 5.17

Como grupo control, otra población de células se transfectaron con pCMV y m-venus como etiqueta verde fluorescente (Figura 24).

En la figura 24 se observan las imágenes panorámicas representativas de las células SH-SY5Y no diferenciadas expresando al plásmido vacío (panel A), la etiqueta m-venus (v) (panel b) y a la Lphn3-v(panel c) de manera independiente, bajo el método de PEI y contratiñendo para el

citoesqueleto de actina con faloidina rodaminada. La tinción nuclear con Hoescht se incluye en el canal merge. Nótese la localización citoplásmica de Lphn3-v (panel C) en comparación a la distribución citoplásmica y nuclear de m-venus (panel B). Esto nos indica que la expresión de Lphn3-ves específica con la distribución esperada.

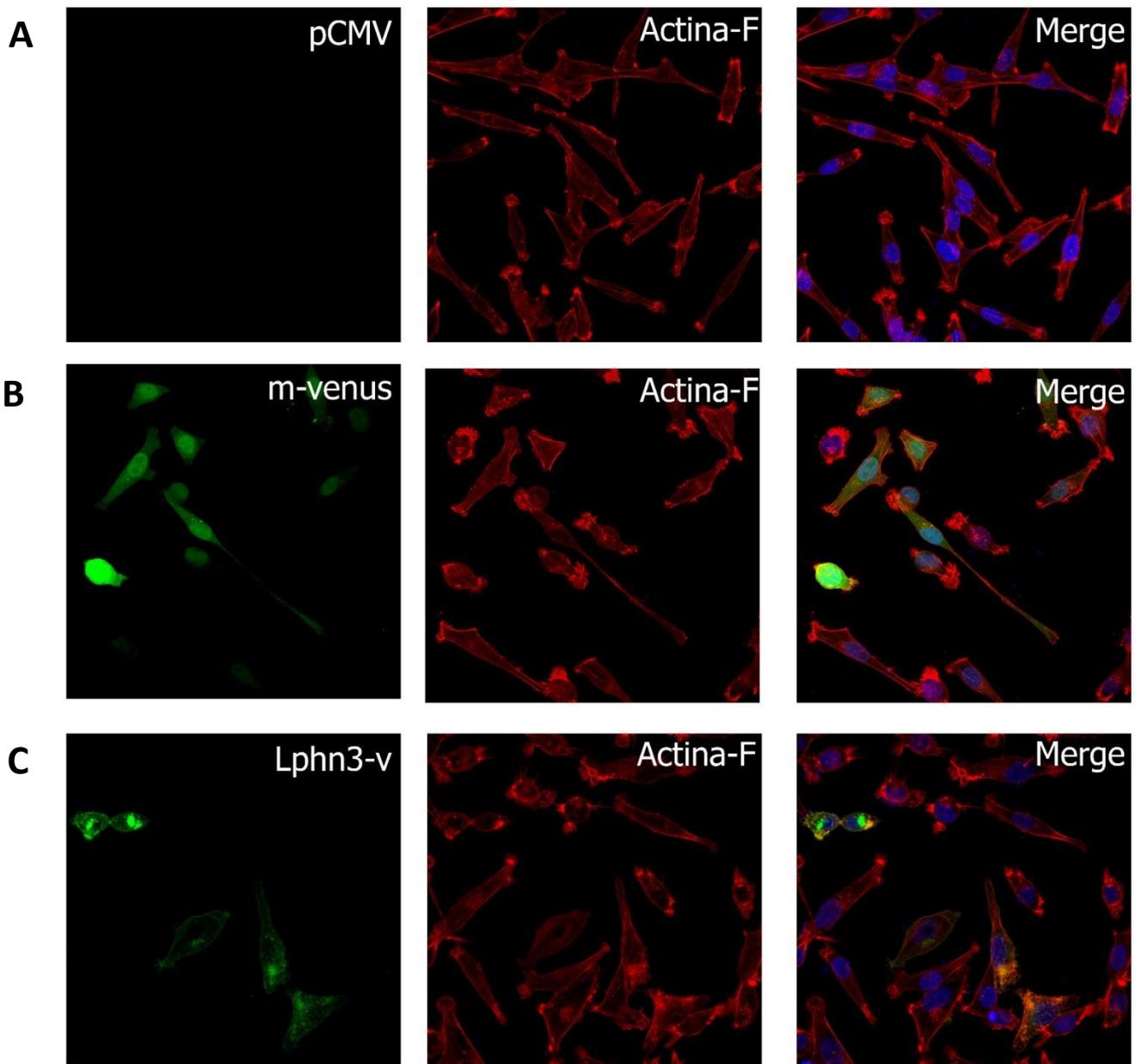


Figura 24. Transfección de células SH-SY5Y por el método de PEI. (A) Células transfectadas con pCMV y (B) m-venus como control y (C) Lphn3-v en el canal verde. El citoesqueleto de

actina es reconocido por faloidina-rodamina (rojo) y hoechst como colorante nuclear (azul). La barra representa 20 μm .

7.5. Alteración estructural del citoesqueleto de actina por la expresión de latrofilina-3 (Lphn-3-v) en células de neuroblastoma SH-SY5Y no diferenciadas.

Previamente se reportó que la sobreexpresión de Lphn3-v en células HEK 239T induce un cambio morfológico, produciendo un redondeamiento celular (Cruz-Ortega y Boucard, 2022) con alteraciones en el tamaño y volumen nuclear, asociándose estos cambios a una remodelación del citoesqueleto de actina. Por lo tanto, en función de este antecedente en el presente trabajo, se analizó la morfología de las células SH-SY5Y que fueron transfectadas transitoriamente con Lphn3-v, para poder corroborar si estos cambios ocurren también en células de origen neuronal.

Como se observa en la Figura 25, las células SH-SY5Y control que se transfectaron independientemente con el plásmido vacío (pCMV) y con un plásmido codificando solo para la etiqueta fluorescente m-venus, se procesaron para inmunofluorescencia y microscopia confocal. El citoesqueleto de actina-F teñido con faloidina rodaminada y el componente nuclear teñido con Hoechst, permanecen inalterados bajo las condiciones control. Las células mantienen su morfología característica en forma de huso (Figura 25), tipo poliédricas o piramidales (no mostradas), con una actina cortical bien definida (flechas), presencia de actina filamentosa formando fibras de estrés y manteniendo la geometría normal de la célula. En los frentes de crecimiento en posición más anterógrada al soma celular (cabeza de flecha en panel A) se observaron otros dominios de actina bien estructurada. La expresión de la etiqueta verde fluorescente m-venus se presenta como un patrón difuso, distribuyéndose tanto en el citoplasma como en el compartimento nuclear (Figura 25, panel B).

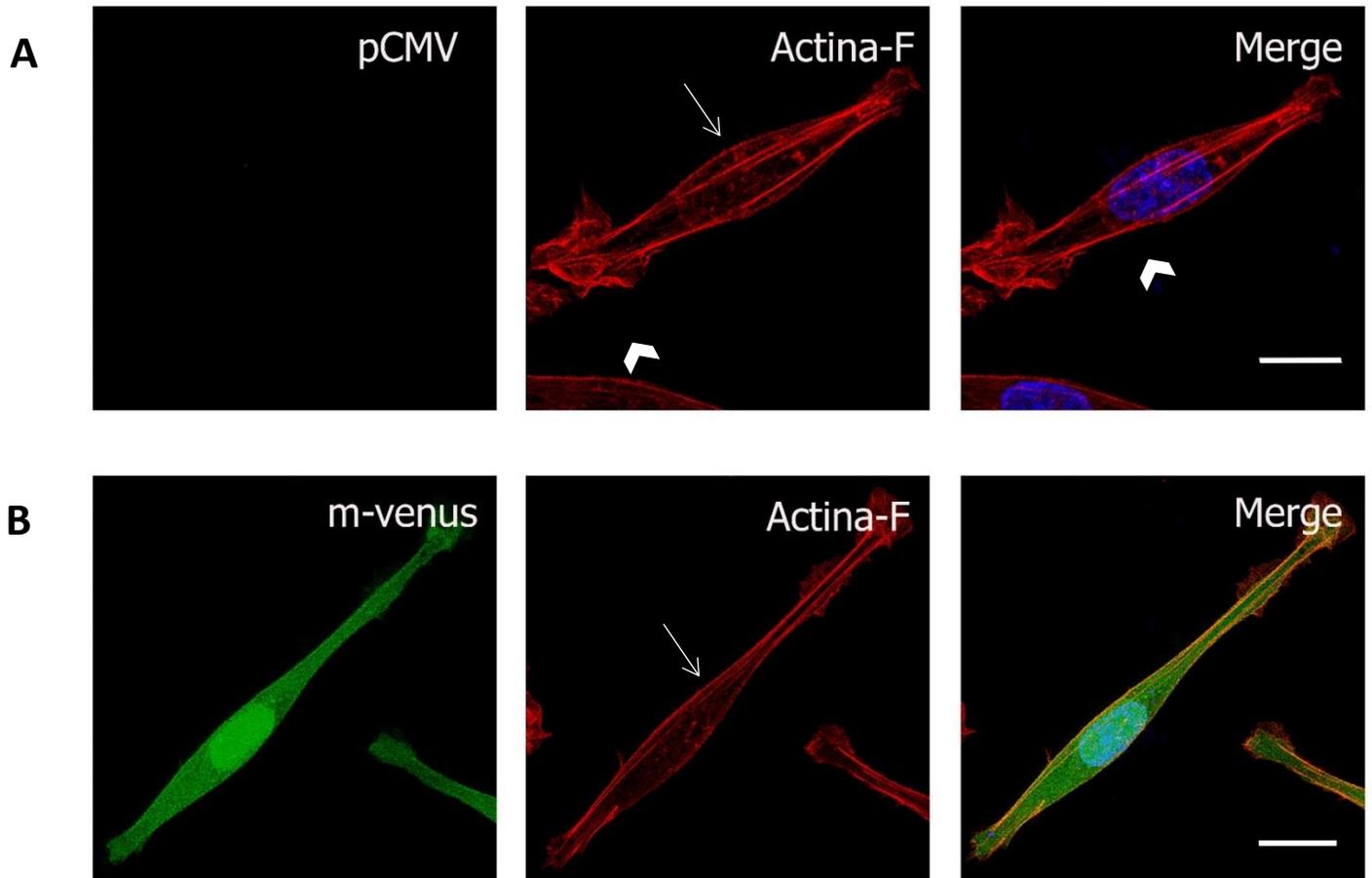


Figura 25. Morfología característica de células SH-SY5Y transfectadas con PEI. A) Células transfectadas con el vector vacío pCMV. B) Células transfectadas con una etiqueta verde fluorescente m-venus. Las células fueron identificadas con faloidina-rodaminada (rojo) el cual reconoce el citoesqueleto ensamblado de actina. Se observa la actina cortical (flechas) y los extremos de crecimiento (punta de flecha). La barra representa 10 μ m.

Cuando se expresó la proteína Lphn3-v (Figura 26), las células presentaron diversos cambios morfológicos que resultaron en tres fenotipos celulares: células aún con forma de huso (flecha), células amorfas (cabeza de flecha) y células redondeadas (asterisco).

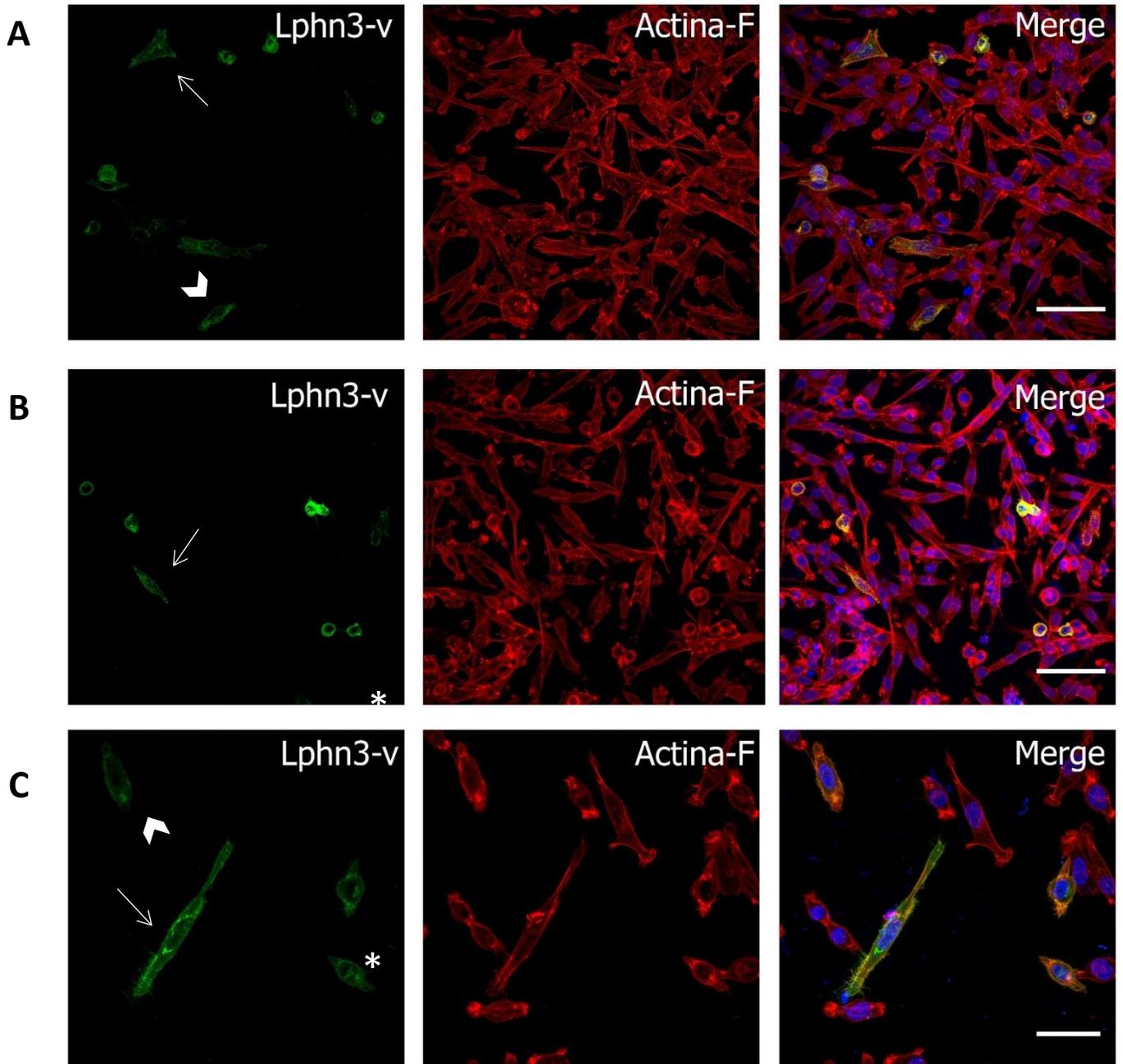


Figura 26. Transfección de Lphn3-v en células SH-SY5Y por el método de PEI. La expresión de Lphn3-v induce cambios morfológicos, presentando diferentes perfiles celulares categorizados en tres grupos: células redondeadas (asterisco), intermedias (punta de flecha) y aquellas que mantienen su morfología característica fusiforme o poliédrica (flecha). Las barras representan 40 μm y 20 μm

Aproximadamente, el 17% de la población de células transfectadas presentó una morfología fusiforme o piramidal (Tabla 8), las cuales mantienen su morfología típica conservando la integridad de sus núcleos, una actina-F cortical bien definida y ensamblada en forma continua (Figura 27). La expresión de Lphn3-v presentó un patrón granular difuso con pequeñas acumulaciones en el espacio citoplasmático y una predominante distribución en la membrana celular (cabeza de flecha en Figura 27). Cuando se realizaron ampliificaciones de sectores particulares de la superficie cortical de las células (recuadros en Figura 27), se observó más claramente una asociación entre el citoesqueleto cortical de actina y Lphn3-v distribuida sobre la misma superficie membranal (flechas en canal de colocalización).

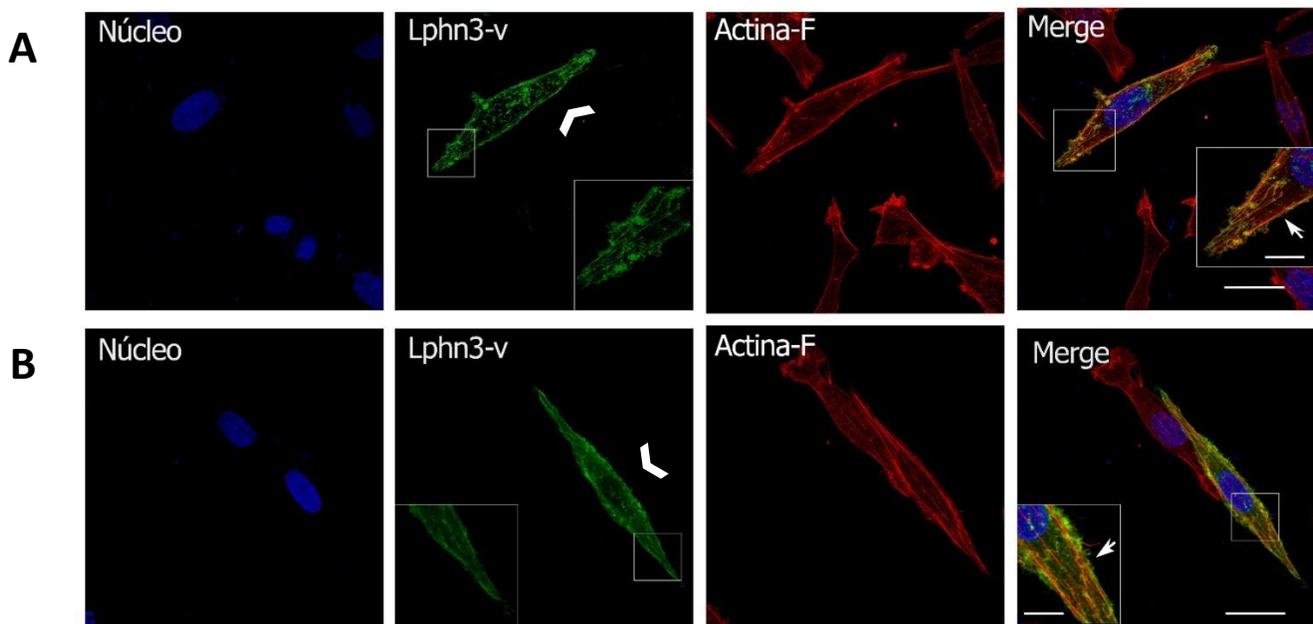


Figura 27. Una población celular que expresa a Lphn3-v mantiene su morfología característica. La expresión de Lphn3-v es granular difusa (verde), el citoesqueleto de actina es cortical y existe una aparente colocalización entre estos dos componentes (flechas). La barra representa 15 μm y 6 μm .

Cuando se analizó a mayor aumento la expresión de Lphn3-v en este fenotipo celular y se incluyó un canal de óptica de Nomarski para poder visualizar mejor algunos otros componentes subcelulares, además de que se aprecia más claramente la colocalización entre actina-F y Lphn3-v cortical (panel D en figura 28), también se detectaron protrusiones citoplásmicas finas o lobulaciones (blebs) sobre la superficie cortical de algunas células (flechas en panel C, figura

28), las cuales se reportaron previamente en líneas no neuronales (Cruz-Ortega y Boucard, 2019).

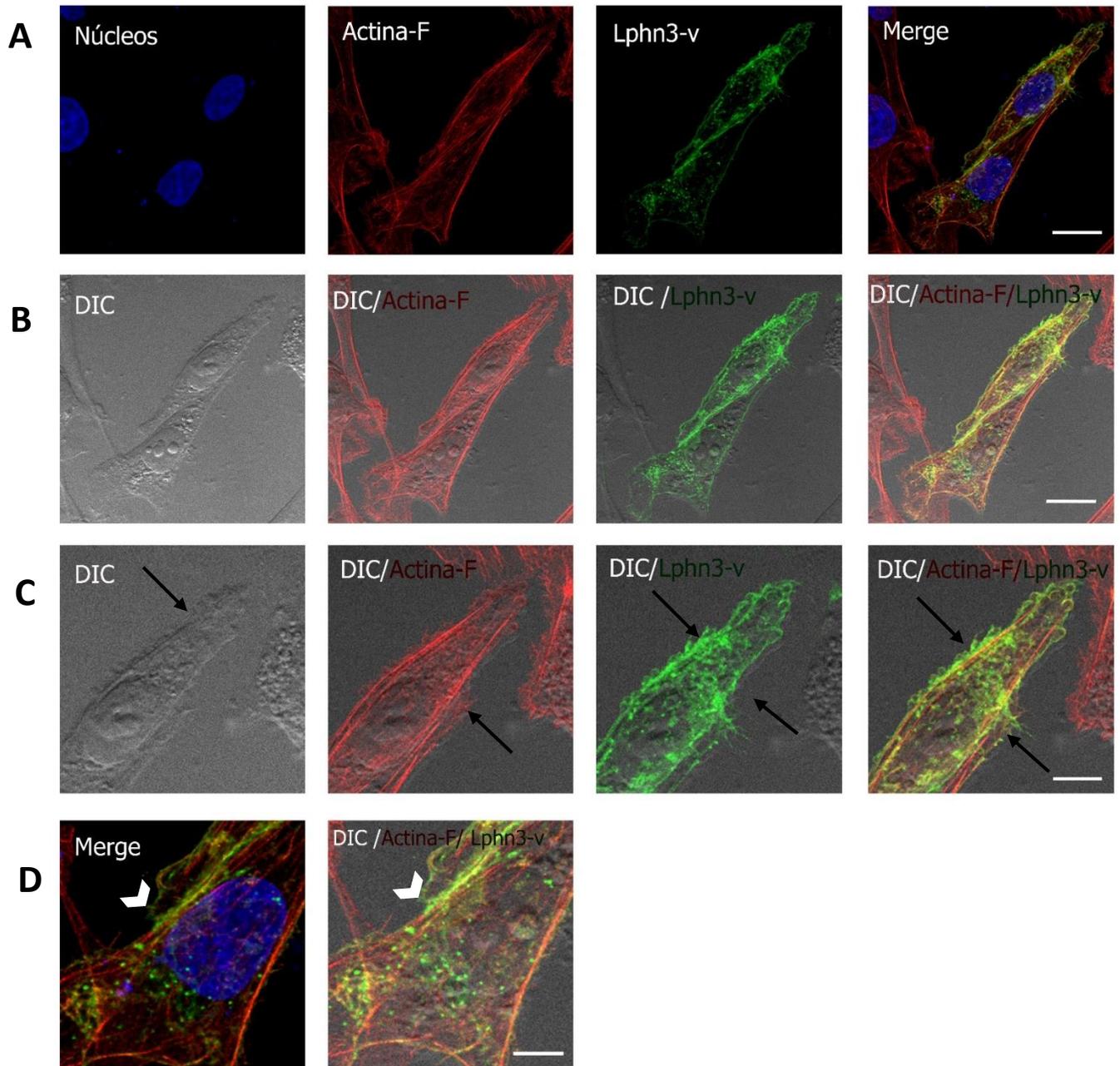


Figura 28. La expresión de Lphn3-v induce un cambio morfológico en células SH-SY5Y. A) Proyección máxima de imágenes colectadas mediante microscopia confocal y B) Células que expresan a Lphn3-v observadas con microscopia de contraste de interferencia diferencial o Nomarski (DIC). C) La expresión de Lphn3-v induce la formación de blebs en la membrana celular (flechas). D) Lphn3-v colocaliza con la actina cortical (punta de flecha). Las barras representan 12 μm y 5 μm .

La definición más precisa de colocación entre Lphn3-v y el citoesqueleto de actina, se realizó por análisis de secciones ópticas de las células presentadas en la Figura 28, y se observó de manera más evidente como Lphn3-v se distribuye principalmente en la membrana celular (panel A y B, figura 29), y a pesar de presentar una distribución en el espacio citoplasmático, esta se encuentra predominantemente colocalizando con la actina cortical en la membrana celular (punta de flechas en Figura 29, panel C).

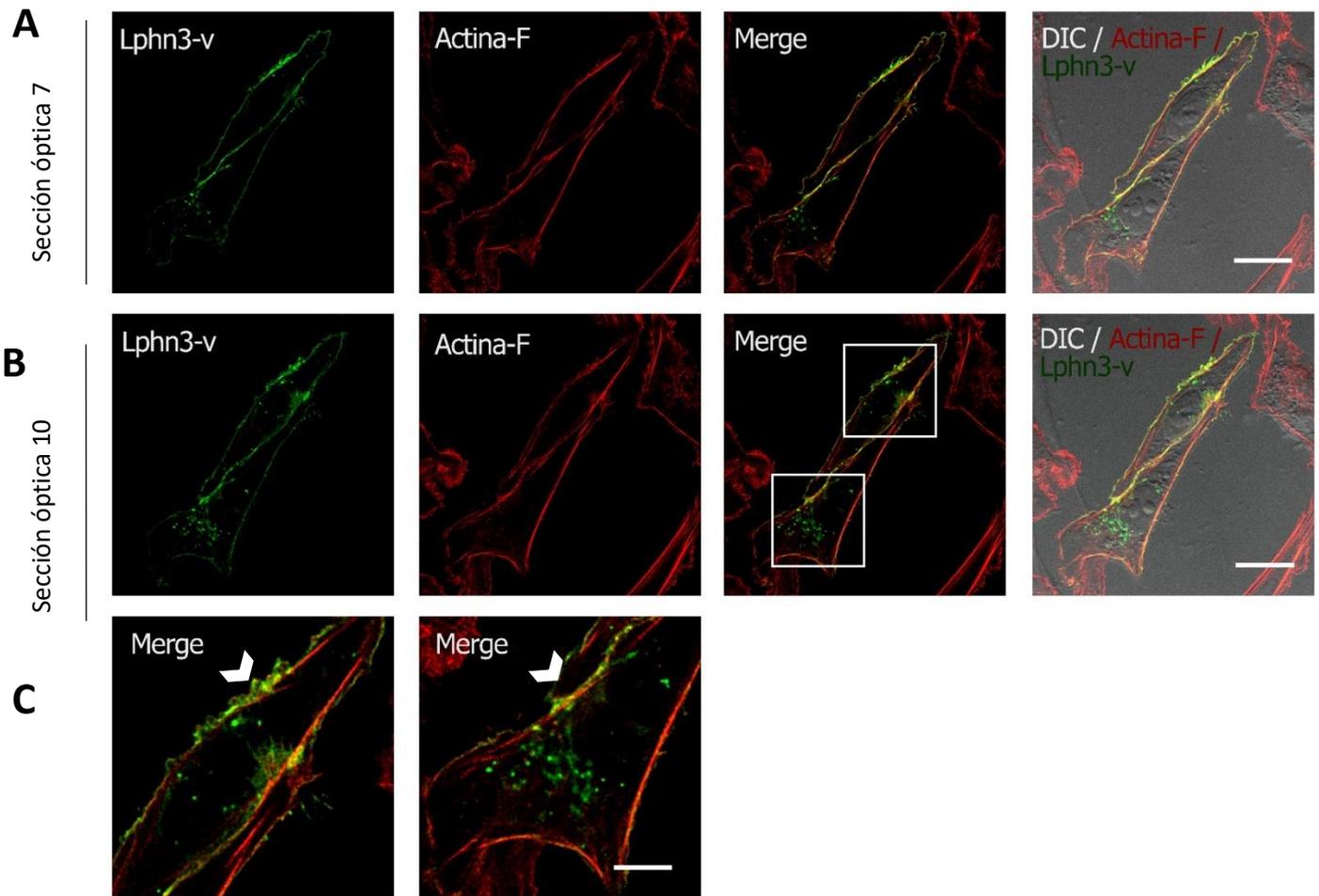


Figura 29. La expresión de Lphn3-v induce un cambio morfológico en células SH-SY5Y. A) y B) Seccionamiento óptico representativo de células que expresan a Lphn3-v la cual se distribuye principalmente en la membrana C) y colocaliza con la actina-f cortical (punta de flecha) sin colocalización aparente en el espacio citoplasmático. Las barras representan 12 μm y 5 μm .

El 28% de células que expresaron a Lphn3-v, se categorizaron como células ovals –amorfos, ya que perdieron su geometría fusiforme y presentaron lobulaciones membranales más evidentes, sobre todo en las zonas más distales al soma y que de manera normal formarían los frentes de crecimiento celular (paneles A y B en Figura 30). En este tipo de poblaciones celulares se conserva la integridad de sus núcleos sin embargo, el cambio morfológico es más visible, disminuyendo su forma geométrica producto de la reestructuración del citoesqueleto. La actina cortical pierde su continuidad, pero sigue siendo filamentosa ya que es positiva para la detección con faloidina rodaminada (flechas). No obstante, esta forma continua de actina-F ahora se reestructura en asociación a lobulaciones membranales, localizadas en algunos sectores de la célula (punta de flecha). A mayor aumento y bajo seccionamiento óptico de estas células, se observa más claramente a Lphn3-v en la membrana celular y en asociación al citoesqueleto de actina (Paneles C y D en Figura 30).

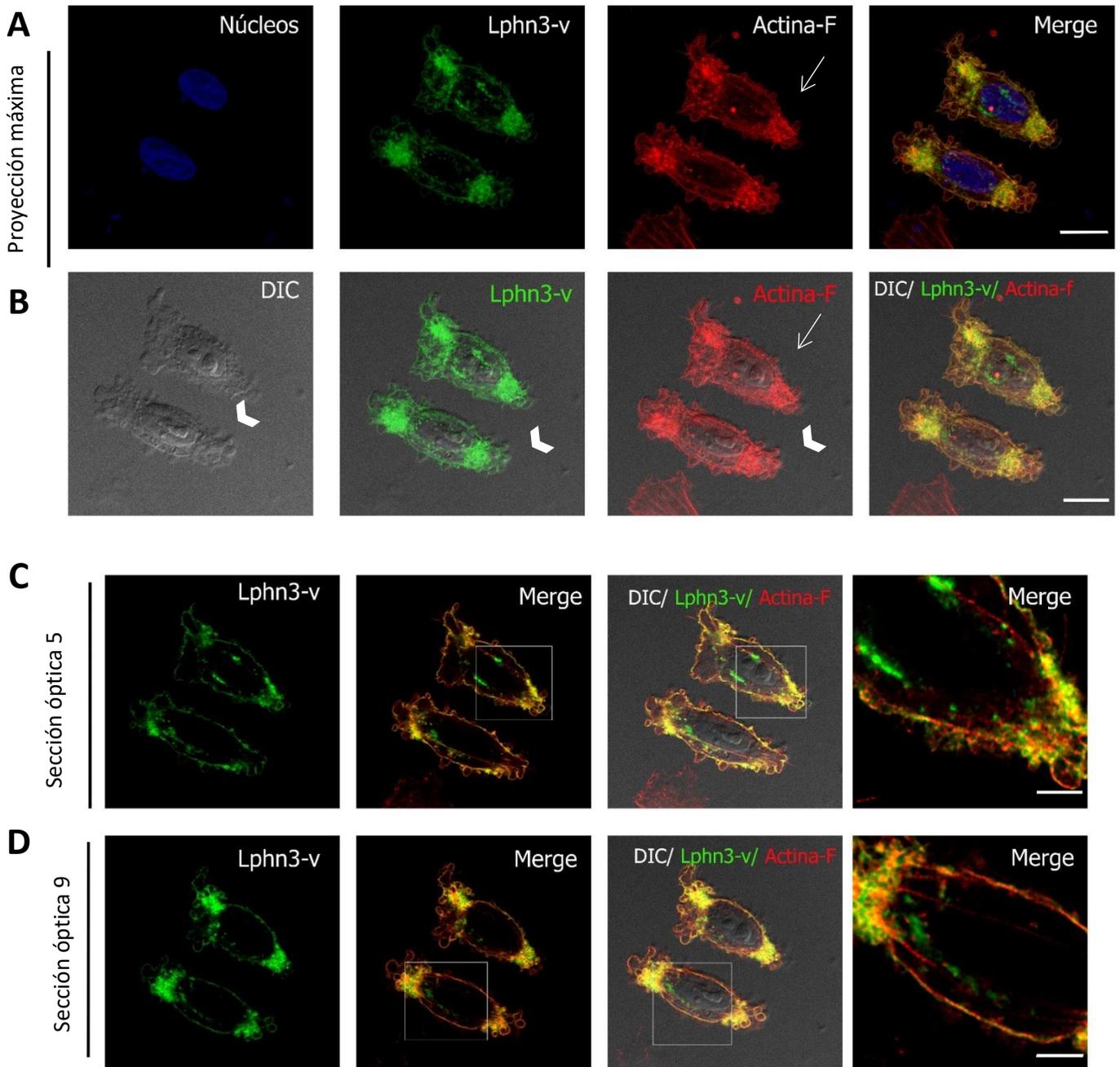


Figura 30. Una población de células SH-SY5Y que expresa a Lphn3-v pierden su geometría establecida. A) Proyección máxima de células que fueron transfectadas con Lphn3-v observadas por microscopia confocal. B) Células que expresan a Lphn3-v observadas con microscopia de contraste de interferencia diferencial o Nomarski (DIC) en donde la atina cortical pierde su continuidad (flechas) y la presencia de blebs (punta de flechas). C y D) Seccionamiento óptico representativo de células que expresan a Lphn3-v la cual se distribuye principalmente en la membrana celular colocalizando con la actina. Las barras representan 10 μm y 4 μm .

El 55% de la población de células transfectadas presentó una morfología redondeada, como fue reportado en otras células de origen no neuronal (Ortega y Boucard, 2019) con la completa pérdida de la geometría en forma de huso de estas células, efecto que podría ser generalizado independientemente del contexto celular.

En estas células se observa una compactación del núcleo, disminución del área citoplásmica e incremento de lobulaciones alrededor de toda la superficie celular (panel A y B en Figura 31). Bajo el análisis de secciones ópticas y a mayor amplificación, se determinó claramente como Lphn3-v se distribuye en la membrana celular y en asociación cercana al citoesqueleto de actina (paneles C y D en Figura 31). Por lo tanto, estos resultados sugieren que Lphn3-v induce la remodelación del citoesqueleto de actina y provoca el redondeamiento de las células SH-SY5Y (Figura 31).

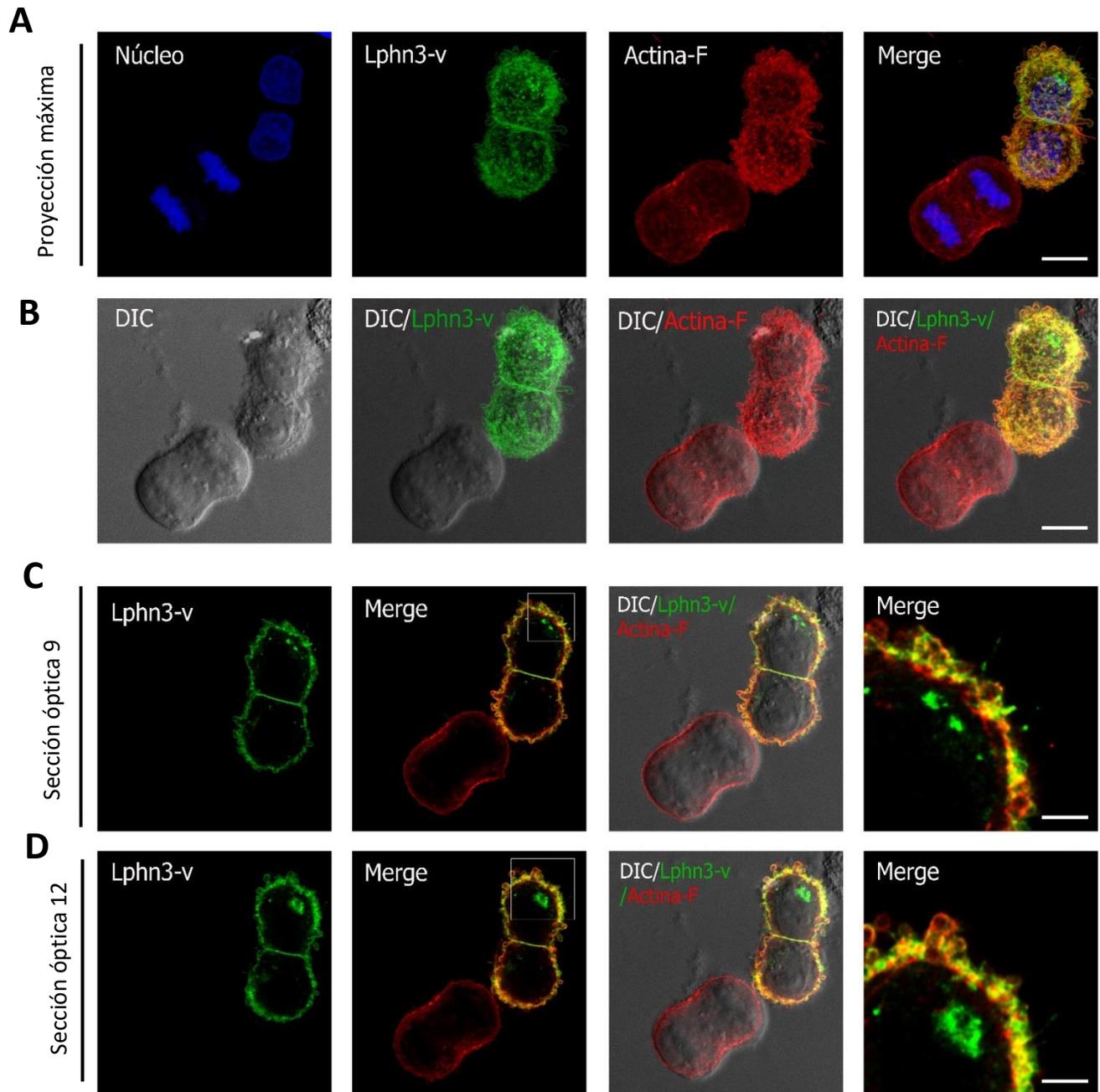


Figura 31. La expresión de Lphn3-v provoca el redondeamiento en una población de células SH-SHY5Y. A) Proyección máxima de células que fueron transfectadas con Lphn3-v observadas por microscopia confocal. B) Células que expresan a Lphn3-v observadas con microscopia de contraste de interferencia diferencial o Nomarski (DIC). C y D) Seccionamiento óptico representativo de células que expresan a Lphn3-v la cual se distribuye principalmente en la membrana celular colocalizando con la actina. Las barras representan 10 μm y 2 μm .

El análisis cuantitativo de la proporción de células expresando cada fenotipo específico reveló que son significativamente diferentes entre ellos bajo la prueba de Anova de una vía con análisis posterior de Tukey (Tabla 8).

Tabla 9. Porcentaje de los diferentes perfiles morfológicos de células SH-SY5Y que expresan a Lphn3-v.

Morfología	Porcentaje
Redondeada	55.18 ± 1.65
Amorfas	28.12 ± 1.70
FusiPira/Poli	17.40 ± 2.89

Fusi/Pira/Poli: Fusiforme/Piramidal/Polihédrica

7.6. La estructuración del citoesqueleto de tubulina no se altera por la expresión de latrofilina-3 (Lphn-3-v) en células de neuroblastoma no diferenciadas SHSY5Y.

Para poder tener información más integral sobre las alteraciones que sufre el citoesqueleto en células de neuroblastoma SH-SY5Y que expresan a Lphn3-v, un grupo de células se procesó por inmunofluorescencia para evaluar la estructuración del citoesqueleto de Tubulina. De la misma manera, como grupos control se incluyeron células transfectadas con el plásmido vacío (pCMV) y células que solo expresaron a la proteína m-venus (Paneles A y B en Figura 32). En estos grupos y en células que expresaron a Lphn3-v, el citoesqueleto de tubulina se evaluó con un anticuerpo monoclonal anti α -Tubulina.

En el canal rojo de la Figura 32 se observa al citoesqueleto de tubulina, el cual presenta de manera general una distribución radial y más homogénea a lo largo del citoplasma (paneles A y B). Cuando se expresó a Lphn3-v (panel C), esta proteína se distribuyó sobre la superficie celular, como ya se había mencionado, pero no presentó una asociación aparente con el citoesqueleto de Tubulina, el cual permanece con un aspecto normal sin evidente cambio morfológico (flechas en panel C). No obstante, en varios ejemplos de células se observó una localización yuxtannuclear de Lphn3-v que posiblemente sí podría asociarse a estos elementos tubulares que emergen de la zona centrosomal (cabeza de flecha en panel C, Figura 32).

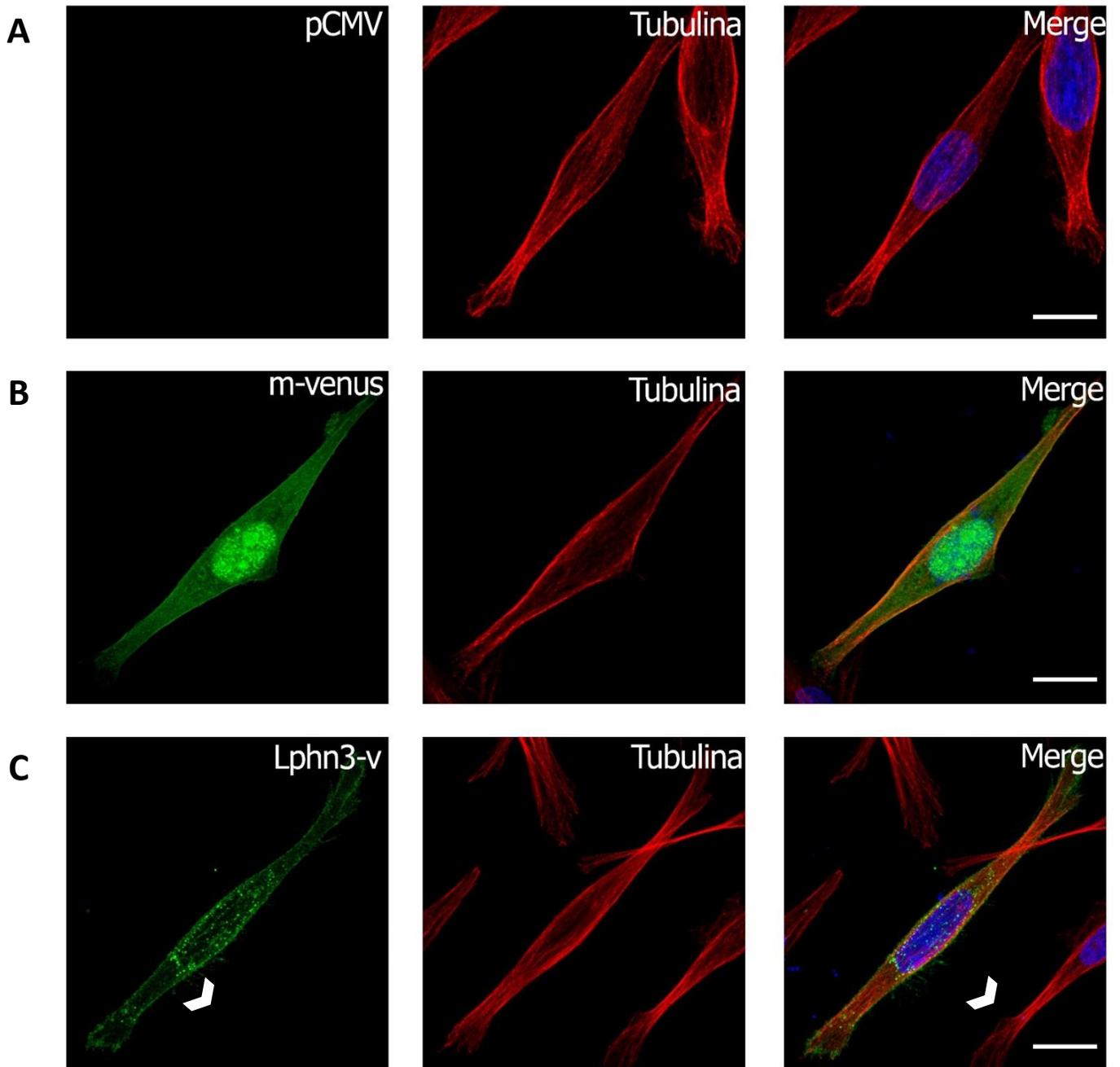


Figura 32. Citoesqueleto de tubulina en células de neuroblastoma SH-SY5Y. A) Células transfectadas con el vector vacío pCMV. B) Células transfectadas con la etiqueta verde fluorescente m-venus. C) Células transfectadas con Lphn3-v. El citoesqueleto de tubulina fue detectado con un anticuerpo monoclonal anti α -Tubulina. La barra representa 10 μ m

En aquellas poblaciones celulares que están perdiendo su geometría fusiforme y presentan un aspecto más poliédrico, la distribución radial y estructuración fibrilar de la tubulina a lo largo de todo el citoplasma también se mantiene inalterable (panel A y B, Figura 33). Es fácil comparar el aspecto de este citoesqueleto en células que no fueron transfectadas (vistas por DIC e inmunotinción para tubulina) en el mismo campo de observación (panel B), con aquellas que sí expresan a Lphn3-v, sin cambios distinguibles en este organelo fibrilar. De la misma manera, en el canal merge no se observa una colocalización evidente y por lo tanto esto comprueba que Lphn3-v no se asocia al citoesqueleto de tubulina. En la Figura 33 se aprecia como Lphn3-v se distribuye a lo largo de la membrana celular presentando acumulaciones en los extremos de crecimiento (punta de flecha en el panel B en Figura 33), y en imágenes a mayor aumento se observan las típicas lobulaciones en la membrana en donde se encuentra la Lphn3-v, pero que no son sitio de localización de los microtúbulos (flechas en panel C y D en Figura 33).

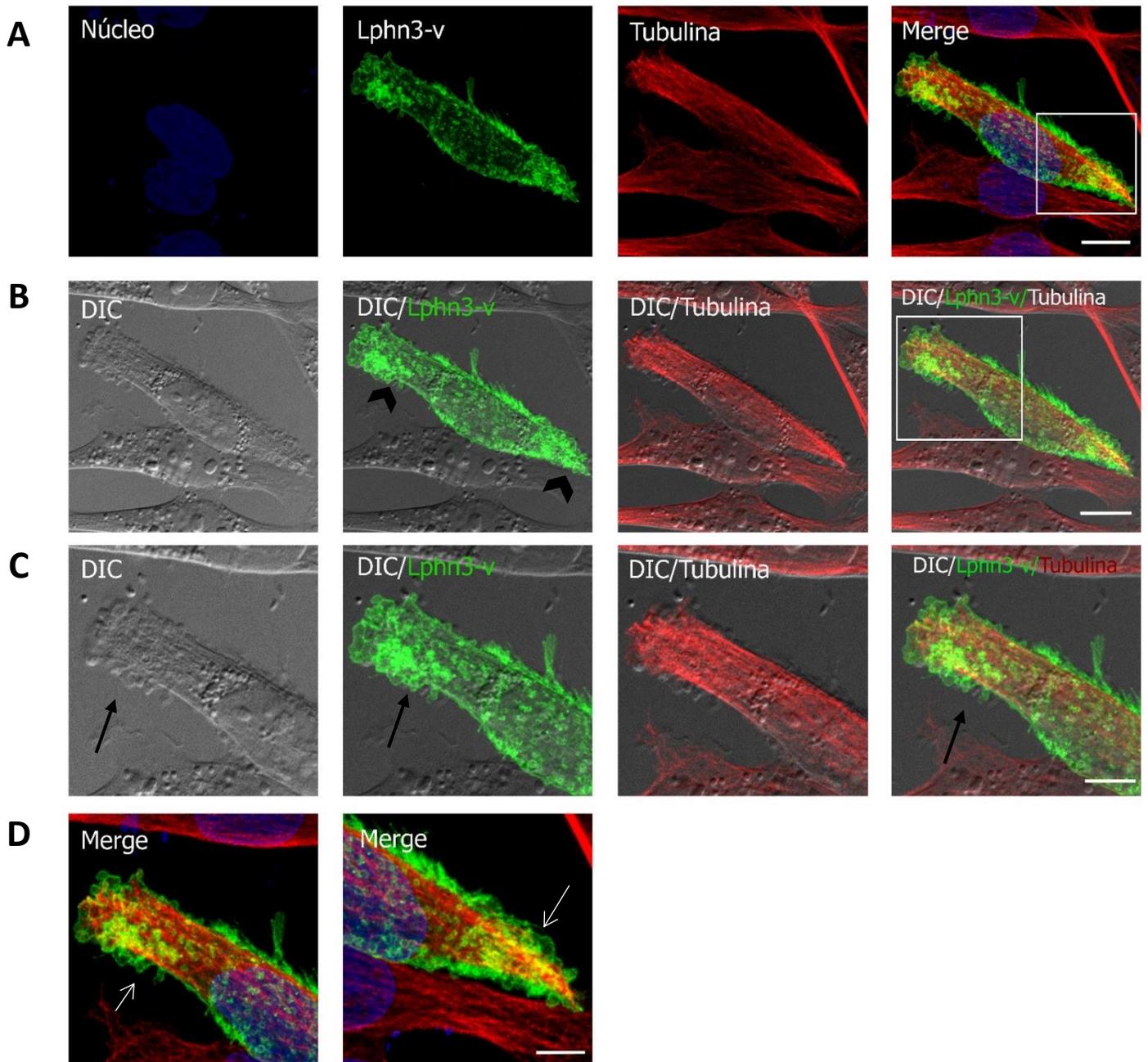


Figura 33. El cambio morfológico que induce la expresión de Lphn3-v en células SH-SY5Y no altera la estructuración del citoesqueleto de tubulina. A) Proyección máxima de imágenes colectadas mediante microscopia confocal y B) Células que expresan a Lphn3-v observadas con microscopia de contraste de interferencia diferencial o Nomarski (DIC) C) La expresión de Lphn3-v induce la formación de blebs en la membrana celular (flechas). D) Lphn3-v y el citoesqueleto de tubulina aparentemente no están colocalizando. Las barras representan 12 μm y 5 μm . La barra representa 10 μm y 4 μm .

En el análisis de secciones ópticas de las células presentadas en la figura 33 se evidencia la distribución de Lphn3-v principalmente en la membrana citoplasmática y en menor medida en el espacio citoplásmico (panel A y B en Figura 34). A mayor aumento y en seccionamiento óptico se observa más claramente como Lphn3-v y la tubulina se encuentran en diferentes dominios de localización y por lo tanto en ausencia de colocalización (flechas en panel C, Figura 34).

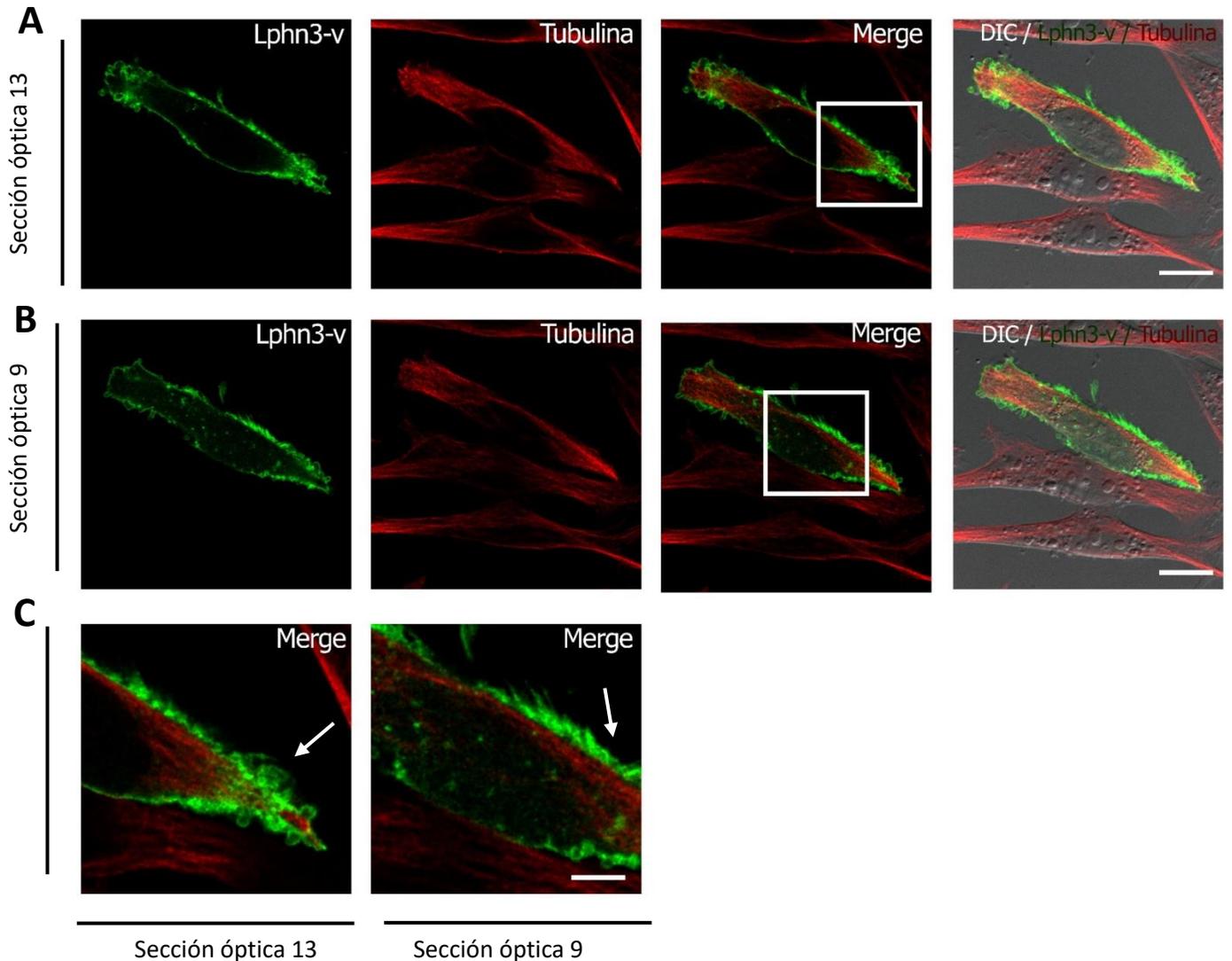


Figura 34. El cambio morfológico que induce la expresión de Lphn3-v en células SH-SY5Y no altera la estructuración del citoesqueleto de tubulina. A y B) Seccionamiento óptico representativo de células que expresan a Lphn3-v la cual se distribuye principalmente en la membrana y en menor medida en el espacio citoplásmico C) No hay colocalización aparente entre Lphn3-v y el citoesqueleto de tubulina (punta de flecha). Las barras representan 10 μm y 4 μm .

Por otro lado, en la población de células transfectadas que presentan una morfología redondeada (Figura 35) se observó que la estructuración radial de la tubulina se perdió y ahora la mayor poza de tubulina se concentra en forma pericéntrica en la célula, comúnmente rodeando la envoltura nuclear (flechas en panel A y B, Figura 35). La gran ventaja del análisis de secciones ópticas es que permitió observar claramente la predominante distribución membranal de Lphn3-v, independiente a la localización del citoesqueleto de tubulina (panel C y D, Figura 35).

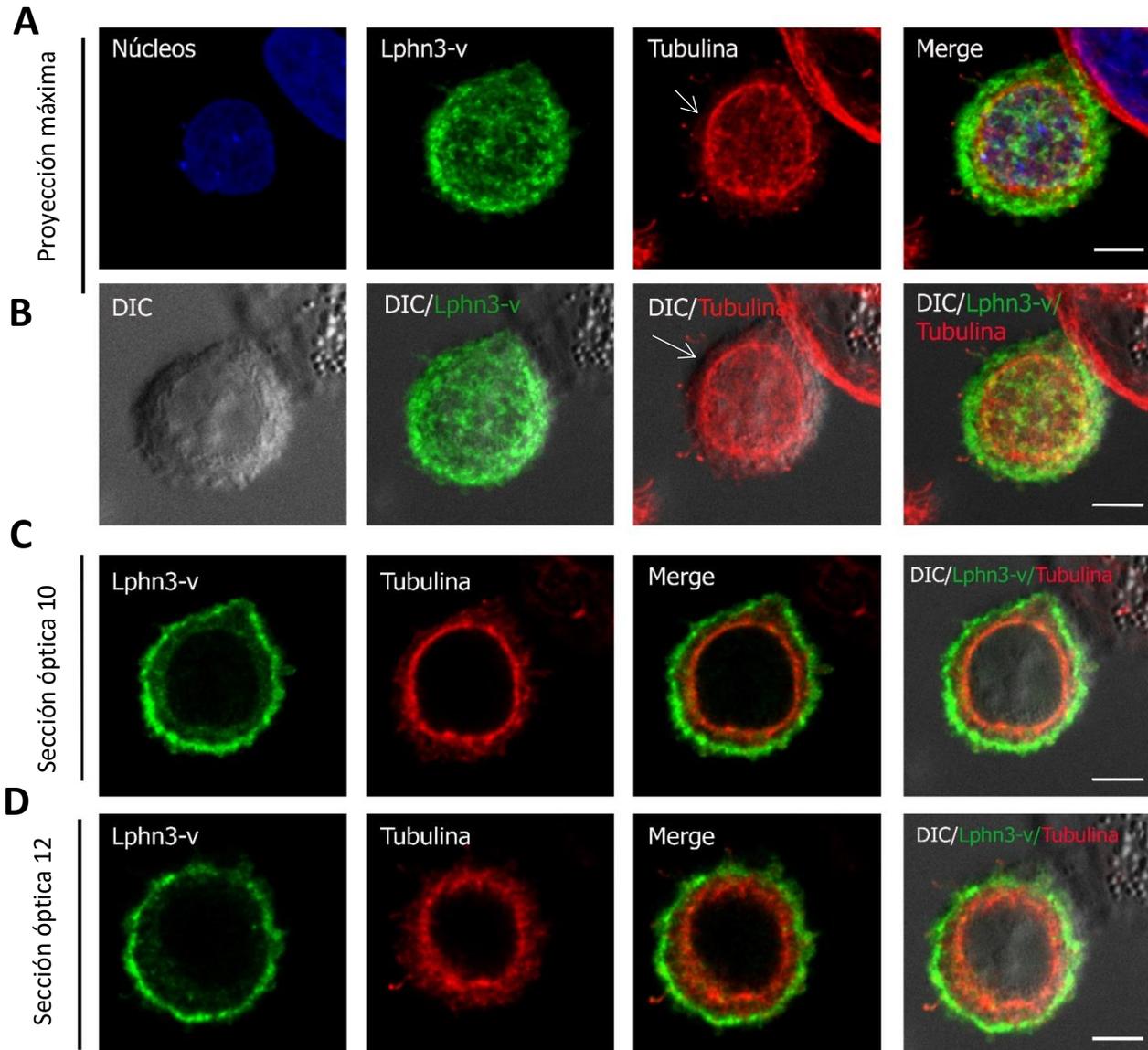


Figura 35. La expresión de Lphn3-v provoca el redondeamiento en una población de células SH-SH5Y. A) Proyección máxima de células que fueron transfectadas con Lphn3-v observadas por microscopía confocal. **B)** Células que expresan a Lphn3-v observadas con

microscopía de contraste de interferencia diferencial o Nomarski (DIC). **C y D**) Seccionamiento óptico representativo de células que expresan a Lphn3-v la cual se distribuye principalmente en la membrana celular sin colocación aparente con el citoesqueleto de tubulina. Las barras representan 5 μ m.

Para poder tener un panorama integral de los cambios descritos previamente, y aprovechando las ventajas del marcaje múltiple, ahora se evaluaron las células simultáneamente para la distribución de Lphn3-vy los dos tipos de citoesqueleto (Figuras 36 y 37). En células que presentaron una marca más abundante de expresión de Lphn3-v, además de ver su localización sobre la superficie cortical, cierta señal citoplásmica podría estar asociada a la distribución de los microtúbulos (panel A y B en Figura 36). No obstante, aún en esta situación, en las células de morfología fusiforme no hay cambios en la distribución del citoesqueleto de tubulina.

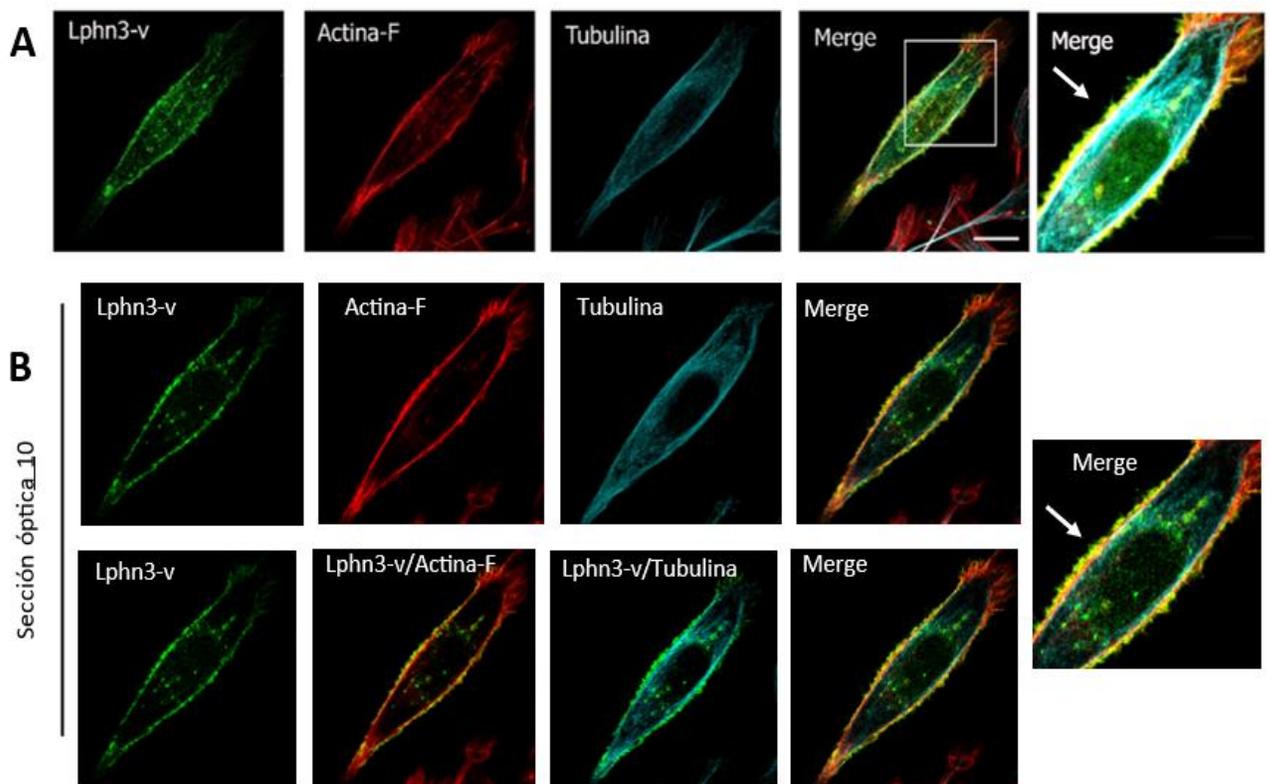
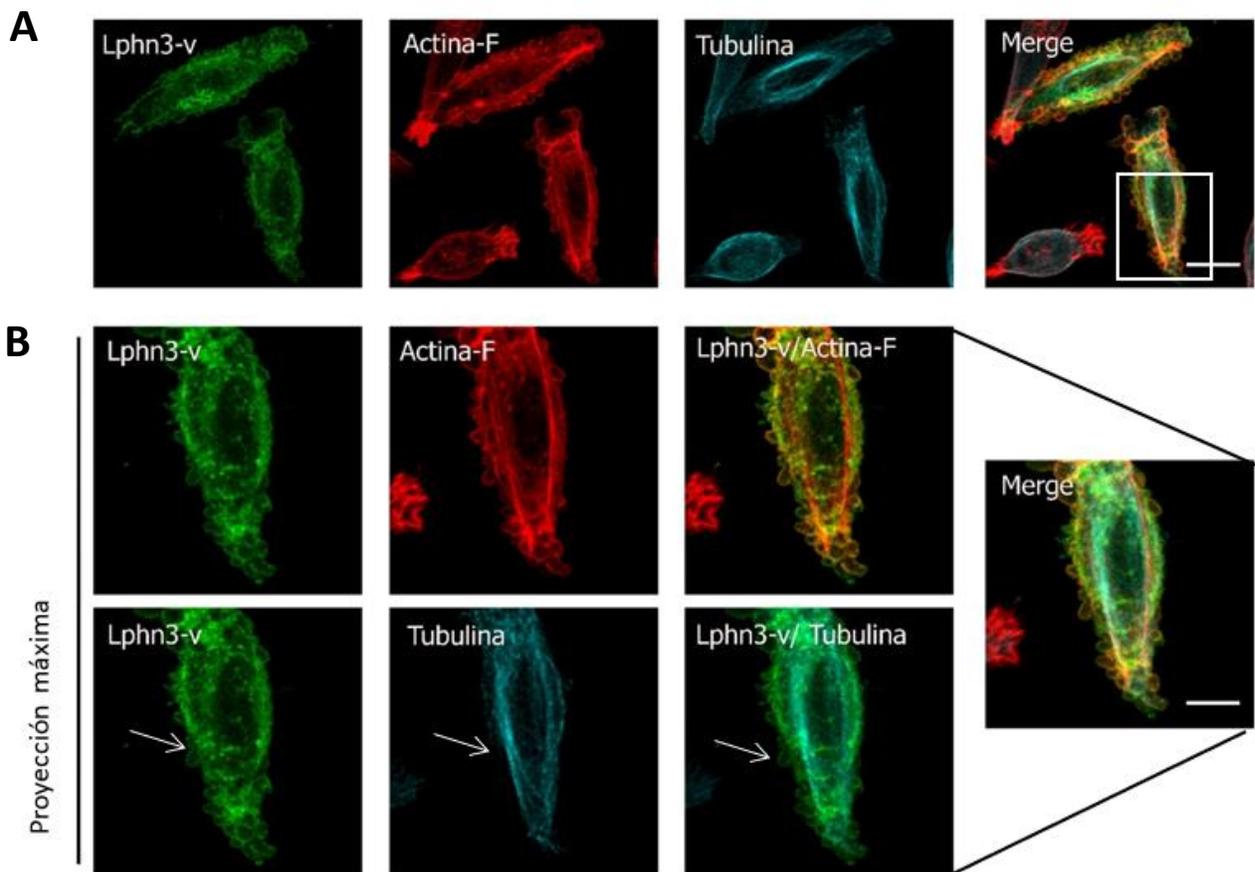


Figura 36. La latrofilina tiene una colocación aparente con el citoesqueleto de actina y no con el citoesqueleto de tubulina. A) Proyección máxima de células que fueron transfectadas con Lphn3-v observadas por microscopía confocal. B) Proyección máxima de células a mayor aumento que expresan a Lphn3-v en donde se evidencia una colocación entre el citoesqueleto de actina y Lphn3-v principalmente en la membrana celular (flechas).

En células categorizadas como amorfas con afectación intermedia y donde es más evidente la presencia de lobulaciones membranales, se corrobora como en estas estructuras se presenta una interacción entre actina-F y Lphn3-v, y no a los microtúbulos de localización menos cortical (flechas en proyección máxima en Figura 37). Estas distribuciones son más claramente observables en el seccionamiento óptico de las células en el panel C.



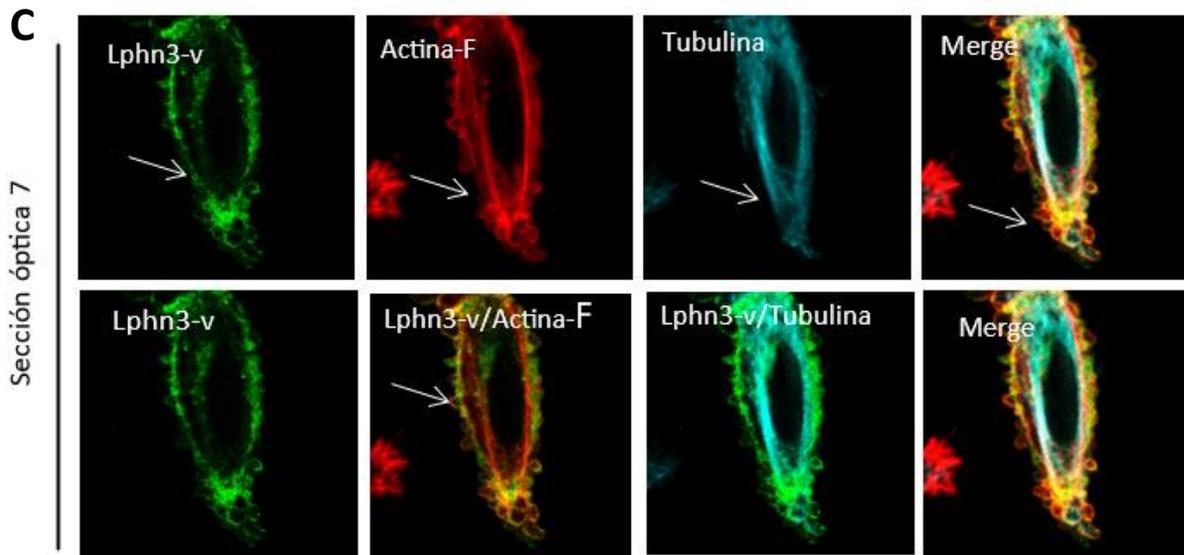


Figura 37. La Lphn3-v induce la remodelación del citoesqueleto de actina y la formación de blebs. **A)** Células que se transfectaron con el plásmido codificante para Lphn3-v (canal verde) y que se inmunodetectaron con un anticuerpo monoclonal anti α -Tubulina (canal rojo). **B)** Las células que expresaron Lphn3-v (verde) fueron doblemente marcadas para el citoesqueleto de actina-F (canal rojo) y el citoesqueleto de tubulina (cian). **C)** Sección óptica representativa de una célula que expresa a Lphn3-v con aparente colocalización con la actina cortical (amarillo). Las barras representan 10 μ m y 5 μ m.

En la Figura 38, que representa a la población de células que presentaron mayor afectación morfológica, se observa más claramente como el citoesqueleto de Tubulina (en canal cyan) es afectado, teniendo ahora una distribución más pericéntrica y no radial. En este tipo de células más afectadas morfológicamente, aunque la ausencia de colocalización entre Tubulina y Lphn3-v es la observación común, no podemos descartar que existan algunos dominios subcelulares en donde estas proteínas pudieran tener cierta asociación. En el panel B y C correspondiente a una sola sección óptica, se puede observar más claramente esta situación, adicionalmente a la contundente y estrecha colocalización entre actina-F y Lphn3-v (punta de flecha).

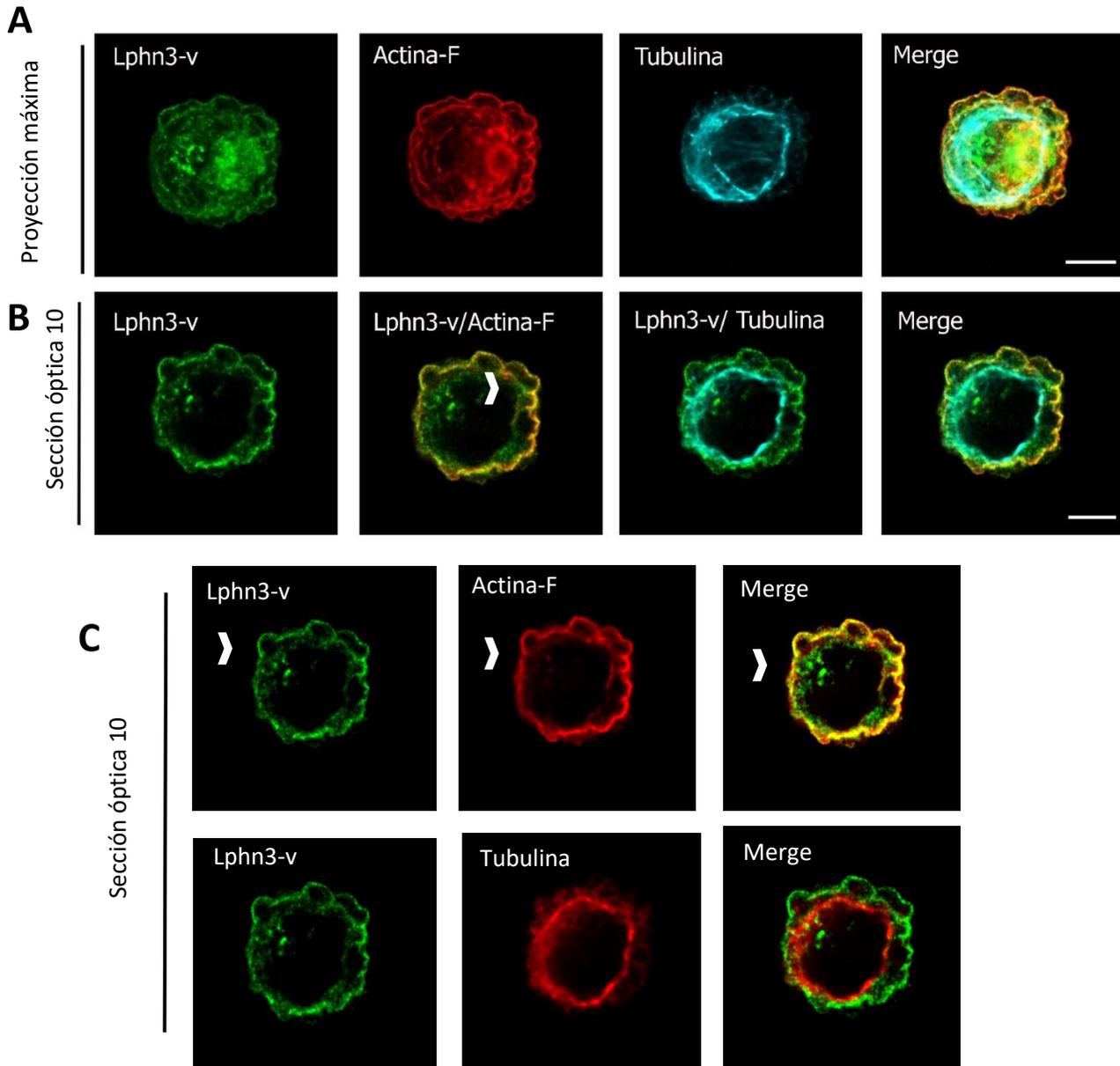


Figura 38. La expresión de Lphn3-v induce el redondeamiento celular en una población de células SH-SY5Y A). Proyección máxima de una célula redondeada que expresa a Lphn3-v. D) Sección óptica representativa de una célula que expresa a Lphn3-v con aparente colocalización con la actina cortical (amarillo y punta de flecha). Las barras representan 10 μ m, 5 μ m.

7.7. Análisis de intensidad de fluorescencia

Se realizó el análisis de intensidad de fluorescencia en los tres fenotipos celulares encontrados marcando una región de interés de manera transversal que atravesase la membrana teniendo como resultado un gráfico del espectro de fluorescencia de Lphn3-v (verde) y actina-F y tubulina (rojo) de manera independiente (Figura 41).

Y como observamos en el panel A existe una coincidencia en los picos máximos de fluorescencia entre la actina-F y la Lphn3-v confirmando así lo observado en microscopia, que la Lphn3-v presenta una asociación aparente con el citoesqueleto de actina en la membrana citoplasmática.

Caso contrario a lo observado en el panel B en donde no existe un solapamiento de los picos máximos de fluorescencia del receptor con el citoesqueleto de actina.

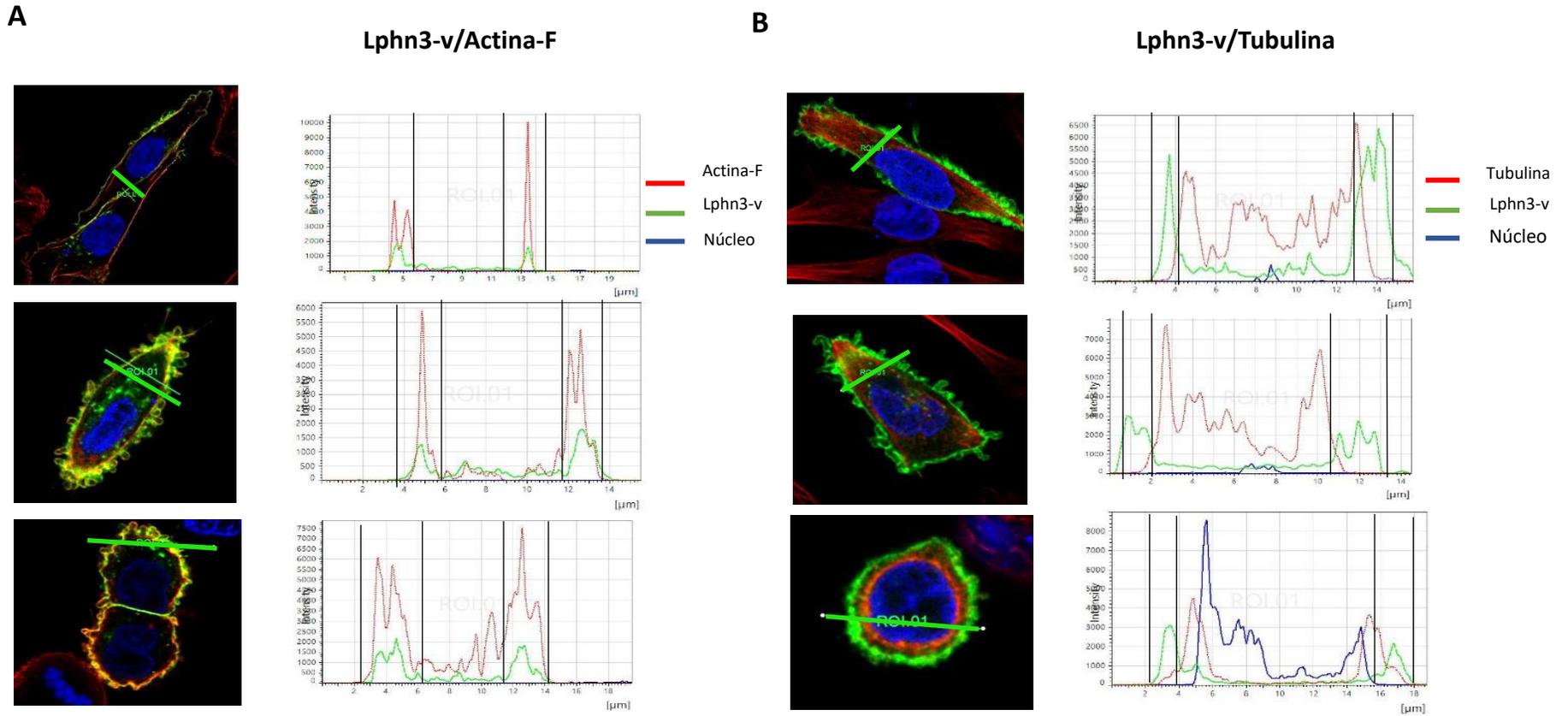


Figura 41. Espectro de fluorescencia de Lphn3-v (verde) y de actina-F y tubulina (rojo) de manera independiente en tres poblaciones celulares encontradas. (A) Existe un solapamiento en los picos máximos de fluorescencia de Lphn3-v y citoesqueleto de actina F (B) y no así con el citoesqueleto de tubulina.

7.8. Evaluación cuantitativa de colocalización entre Lphn3-v y el citoesqueleto celular

Para precisar mejor la colocalización y posible asociación entre Lphn3-v y el citoesqueleto celular en imágenes obtenidas con el microscopio confocal, las células teñidas se colectaron de manera convencional y se obtuvieron secciones ópticas de las células en el plano ecuatorial, se delimitaron regiones de interés (ROIs) en las células y se aplicó la herramienta de análisis de colocalización incluido en el software del microscopio confocal LAS-X (leica SP8 TCS-SP8), obteniendo fluorogramas de la dispersión de puntos de asociación que se validaron por análisis del coeficiente de correlación de Pearson, la herramienta de análisis de este parámetro. El valor numérico de Pearson que oscila entre -1 a +1 nos indica el nivel de correlación entre dos variables, donde más cercano sea a +1, mayor será la significancia de la asociación.

En este caso se obtuvo un valor promedio de colocalización de 0.6707 para la asociación entre Lphn3-v y actina-F, y un valor de 0.2720 para Lph3-v y los microtúbulos (panel C, Figura 42). Esto quiere decir, que tal y como lo revelaron las imágenes, existe una mayor asociación de Lphn3-v con el citoesqueleto de actina que con el de tubulina.

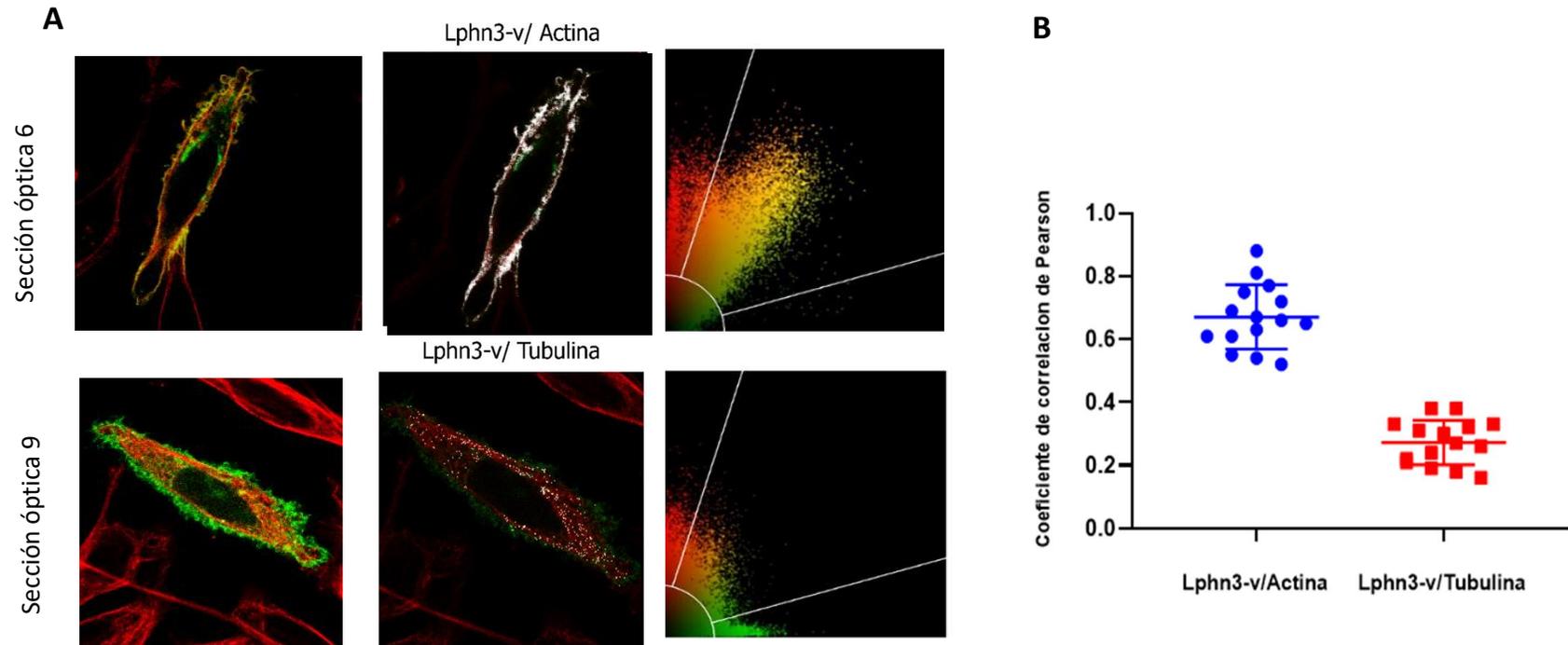


Figura 42. Análisis de colocación de Lphn3-v con Actina-F y Tubulina. **A)** Las secciones ópticas obtenidas por microscopía confocal se analizaron cuantitativamente con la herramienta de análisis de colocación incluida en el software LAS-X (leica SP8 TCS-SP8). Se muestra la señal de colocación en pseudocolor amarillo, la cual es extraída de las regiones de interés (ROIs) la cual es considerada para el análisis de Pearson. **B)** La diferencia entre los valores de Pearson para cada par de combinación se analizaron por la prueba de comparación de medias de T de student).

8. Discusión

Con la finalidad de obtener un método que permitiera la expresión de Lphn3-v en células neuronales, se evaluaron dos métodos de transfección, lográndose un 17% de transfección como promedio cuando se usó el método de PEI. Se conoce que para que se lleve a cabo una transfección exitosa el ADNp debe atravesar la membrana celular, luego las partículas deben salir del endosoma e ingresar al núcleo para que éste pueda ser transcrito y posteriormente expresado en proteína. Por lo tanto, el tipo de línea celular, el plásmido y el agente de transfección que se utilice influyen en la eficiencia de este proceso (Ghosh et al., 2000; Karra y Dahm, 2010).

Es conocido también que la eficiencia de transfección depende del tamaño del plásmido seleccionado y varía según los tipos de líneas celulares que se requiera transfectar, puesto que hay algunos tipos celulares que son más transfectables que otros. En general, se ha reportado que las líneas neuronales presentan una eficiencia de transfección que oscila entre 20-40% de éxito (Wang et al., 2018), siendo muy importante mencionar que plásmidos de tamaños considerables dificultan su internalización y en consecuencia pueden sufrir de degradación (Chong et al., 2021). Además, no siempre está claro si una baja tasa de transfección se debe a una internalización deficiente de partículas plasmídicas o al procesamiento del ADNp por parte de la célula, una vez que este haya ingresado. La falla de transfección exitosa con el método de lipofectamina, podría implicar la influencia de estos factores.

El método de transfección con PEI fue más eficiente en nuestro sistema y es importante considerar que para evadir el procesamiento degradativo total por vía endosomal, es necesario que haya un aumento de la presión osmótica dentro del lisosoma al neutralizarse el ácido nucleico por ciertos compuestos básicos diseñados para esto. En este sentido, la polietilimimina (PEI) produce un efecto de esponja de protones inducido no solo por los grupos catiónicos que lleva para condensar el ADNp, también contribuyen sus grupos básicos como aminas que integran su molécula (Ehrhardt et al., 2006), promoviendo que el endosoma se rompa y libere su carga en el citosol de la célula y posteriormente el ADNp entre en el núcleo y sea traducido (Neuhaus et al., 2016; Ulasov et al., 2011).

Estos factores podrían ser relevantes para explicar la eficiencia de transfección que se obtuvo con los diferentes métodos. No obstante, al menos para estudios morfológicos, en un típico cultivo en nuestras condiciones se pueden analizar un número considerable de células bajo este índice de transfección y obtener observaciones representativas de los parámetros a estudiar. Cabe mencionar que la representatividad de las observaciones se potenció al analizar más de cuatro experimentos de transfección.

En virtud de esto, en el presente trabajo se ha podido evidenciar que la expresión de Lphn3-v produce un cambio morfológico en las células de neuroblastoma que correlaciona con una reestructuración del citoesqueleto de actina-F, resultado que coincide con estudios previos realizados en células no neuronales (Cruz-Ortega y Boucard, 2019; Trudeau et al., 2019). Al ser un GPCR, La Lphn-3 interactúa con diversas proteínas G heterotriméricas como: $G\alpha_{13}$, $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_q$, $G\alpha_s$ y $G\alpha_{i2}$ (Araç et al., 2012; Moreno-Salinas et al., 2019), las cuales pueden activar diferentes vías de señalización participando en el cambio morfológico y en la dinámica de las estructuras celulares a través de diversos mecanismos moleculares que involucran estas vías.

Otro efecto observado en la línea celular SH-SY5Y es la formación de lobulaciones en la membrana plasmática conocidos como "blebs", los cuales estuvieron asociados con una reestructuración del citoesqueleto de actina-F, efecto que fue reportado previamente en células HEK293T sobre expresando diferentes isoformas de la latrofilina (Cruz-Ortega y Boucard, 2019). Con base en la literatura, la formación de estas estructuras está relacionada con procesos fisiológicos como la motilidad, migración, división celular, citocinesis y muerte celular (Wang et al., 2010; Aoki et al., 2016).

Se sabe que el citoesqueleto de actina también es importante para mantener contactos celulares estables, y regular la morfología celular y la dinámica de la formación de estructuras móviles como: lamelipodios, filopodios, blebs y fibras de estrés reguladas por la familia de las Rho-GTPasas (Sit y Manser, 2011), quienes actúan como interruptores moleculares en estos procesos. De la familia de Rho-GTPasas, las más estudiadas son Rac1, RhoA y Cdc42 cuya función depende de la activación de la subunidad $G\alpha_{12/13}$ (Provenzano y Keely, 2011; Wang et al., 2010).

En el contexto neuronal, se conoce que Rac 1, Cdc42, y RhoG son sumamente importantes para el establecimiento y formación de las neuritas y el proceso de axonogénesis (Linseman y Loucks, 2008). Rac 3 parece ser que tiene un rol importante en la maduración neuronal y RhoA en comunicación con la cinasa de ROCK, parece ser relevante en la inhibición o restricción del crecimiento axonal, así como en la regulación y el mantenimiento de la retracción y/o morfología redondeada de la célula, a través de la estructuración y estabilidad dinámica de los microtúbulos que ingresan al cono de crecimiento neural (Govek et al., 2011; Vásquez-Victorio et al, 2016).

Por lo tanto, es factible que en la reestructuración morfológica dependiente de Lphn-3 se involucren algunas de las mencionadas proteínas, a partir de efectores río arriba como es el acople a las distintas subunidades de las proteínas G (Mathiasen et al., 2020; Nazarko et al., 2018). Esto podría indicar, que la presencia de estos receptores en la membrana plasmática de varios tipos celulares promueve señales comunes de transducción, que se reflejan en una reestructuración generalizada del citoesqueleto de actina, modulado por elementos comunes que se asocian a la formación de estructuras lobulares a lo largo de la misma membrana plasmática. Se sabe que estas lobulaciones o "blebs" se regulan por proteínas G de la familia de RhoA (Ridley, 2015) y sería muy interesante caracterizar si el cambio estructural producido por Lphn-3 se asocia a esta cascada de señalización.

Asimismo, tal y como se publicó previamente (Cruz-Ortega y Boucard, 2019), en este trabajo evidenciamos que en células de linaje neuronal también puede existir una interacción física entre Lphn-3 y el citoesqueleto de actina en la membrana citoplasmática de la célula, efecto que no ocurre con el citoesqueleto de tubulina. Esta interacción entre latrofilina y el citoesqueleto de actina, podría llevarse por su acople entre el motivo de unión PDZ de esta molécula a proteínas de andamiaje como la familia SHANK o MAGUK quienes también presentan un dominio PDZ que les permitiría interactuar con otras proteínas como: Debrin, PICK-1, Abp-1, Abi1, Homer, Cortactina (Beresewicz, 2007; Zheng et al., 2011) y mediar así la formación de complejos moleculares entre el receptor, la actina y las GTPasas (Rac, CDC42 y RhoA) que desencadenan diferentes vías de señalización (Ikenouchi y Aoki, 2017).

Por otro lado, se conoce que los GPCRs pueden presentar diferentes mecanismos de activación y resultados previos reportan que existe una señalización constitutiva de las latrofilinas lo que

induce un aumento en la actividad de la cofilina, proteína accesoria del citoesqueleto de actina que despolimeriza a este citoesqueleto (Sermiere y Barbuk, 2011; Kang et al., 2019). Este mecanismo podría estar involucrado en los cambios en la estabilización de los filamentos de actina promoviendo su reestructuración, por lo que sería importante estudiar el nivel de fosforilación de la cofilina en este sistema. No hay que olvidar que otras proteínas que regulan la dinámica del ensamble y desensamble del citoesqueleto de actina, tales como la alfa-actinina, que permite la formación de haces de filamentos de actina, la miosina que cuando se disocia del citoesqueleto de actina altera las fuerzas contráctiles que inciden en la interfaz citoesqueleto/membrana o el complejo ARP2/3, y otras como filamina, gelsolina y talina, que es importante considerar (Cooper y Schafer, 2000; Pollard y Borisy, 2003).

En relación con los tres tipos de fenotipos celulares observados, es posible que ellos reflejen una progresión de las acciones de Lphn-3 sobre el citoesqueleto de actina en función de la cantidad de proteína expresada, así como en la temporalidad en su distribución para alcanzar la membrana plasmática y generar una señal que se traduzca en la remodelación de esta estructura filamentosa. En contraste, cuando se analizó la estructuración del citoesqueleto de tubulina bajo la expresión de Lphn-3, este elemento filamentoso no sufrió de modificaciones en su estructura, al menos en las células que menos cambios morfológicos presentaron (células en forma de "huso"). De la misma forma, por análisis de colocalización en secciones ópticas se encontró una casi ausencia de asociación entre Lphn-3 y los microtúbulos.

Aunque se conoce que el citoesqueleto es un componente estructural y funcional que se construye de matrices dinámicas de microfilamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos, aún hace falta mucha información sobre la forma por la cual estos tres elementos interactúan y más cuando se trata de una condición patológica. Se conoce que las cinasas LIMK activadas a través de las Rho-GTPasas fosforilan a la cofilina (Kang y Woo, 2019; Chen et al., 2020), lo que provoca su inhibición regulando así la dinámica de ensamblaje del citoesqueleto de actina, sin embargo, LIMK también controla la remodelación de los microtúbulos de manera independiente (Sumi et al., 2006; Chen et al., 2020).

Aún en los fenotipos de las células SH-SY5Y más afectados de forma esférica, en donde el espacio citoplásmico es más limitado, se pudo apreciar mínima colocalización entre Lphn-3 y

los microtúbulos. Este dato parece indicar, por un lado, que la selectividad de distribución cortical de Lphn-3, en contra de los haces más radiales de tubulina en el citoplasma, condicionan una baja coincidencia de distribución subcelular y por lo tanto falta de interacción. Una posible asociación se puede apreciar más cuando Lphn-3 se encuentra en el citoplasma y por lo tanto más coincidencia con la localización de los microtúbulos y posible dependencia para ser transportada a la superficie cortical.

Por otro lado, es factible que no existan dominios en la secuencia de ambas proteínas que tengan afinidad para interactuar y que, a pesar de coincidir en el mismo perímetro subcelular, no exista una asociación directa. El uso de drogas que alteren el ensamble del citoesqueleto bajo la expresión de Lphn-3, nos podría dar más información sobre su relación anatómica y funcional. En concordancia al cambio morfológico redondeado y la formación de "blebs" reportado previamente en células HEK 239T y que se encontró también en células de neuroblastoma, podríamos suponer que esto es un efecto generalizado, e independiente al contexto celular, pero es necesario analizar otros tipos y extirpes celulares para ratificar esta mencionada aseveración.

Con base en la literatura, las latrofilinas tienen una función dual como GPCRs y también como moléculas de adhesión mediando el mantenimiento y la estabilidad de la sinapsis neuronal (Prömel et al., 2013). En las enfermedades neurodegenerativas, la interrupción sináptica es el resultado de la acumulación anómala de proteínas, y que los pacientes con la enfermedad de Alzheimer existe una alteración y disminución de la densidad de espinas dendríticas estructuras de contacto ricas en actina (Dorostkar et al., 2015; Rush et al., 2018; Yu y Lu, 2012). Por lo tanto, si en esta enfermedad existe una disminución sustancial de la sinapsis producto de una transmisión sináptica anormal, sería interesante investigar cuál es el papel que pudiera tener la Lphn-3 en el mantenimiento de los contactos sináptico en las neuronas de pacientes que han desarrollado este proceso neurodegenerativo y si la acumulación anómala de estas proteínas afectan su expresión o podrían estar interactuando con esta molécula. Muchas preguntas surgen al respecto y es interesante estudiar si esta molécula tendría un papel protector o patológico en este tipo de padecimientos. El siguiente paso es buscar más evidencia básica sobre los mecanismos moleculares en los cuales podría estar involucrada Lphn-3 y saber si su participación contribuye con la mejora o en la exacerbación de procesos neurodegenerativos del tipo enfermedad de Alzheimer.

9. Conclusiones

- Con base a los resultados obtenidos, se concluye que el método de PEI es más eficiente para transfectar el plásmido codificante para Lphn-3-v, que por uso de la técnica de lipofección.
- Según lo evaluado por microscopia confocal, se concluye que la sobreexpresión de Lphn-3 en células neuronales también produce un cambio morfológico asociado a una reestructuración del citoesqueleto de actina, y por lo tanto posiblemente este sea un efecto generalizado e independiente al contexto celular.
- Con base al análisis cuantitativo de inmunotición y al coeficiente de correlación de Pearson, concluimos que existe una mayor asociación entre la Lphn-3 con el citoesqueleto de actina, en comparación al encontrado con el citoesqueleto de tubulina.

10. Perspectivas

- Es importante probar otras metodologías de transfección con el objetivo de aumentar su eficiencia para de esta manera precisar mejor los resultados observados. Así mismo, evaluar la expresión exógena de Lphn-3 en otras líneas celulares para corroborar si sus efectos hasta hora descritos son un mecanismo generalizado de cualquier tipo celular.
- Realizar co-transfecciones de Lphn-3 con otras proteínas involucradas en procesos neurodegenerativos y así poder estudiar posibles relaciones patológicas o funcionales entre ellas.
- Tratar a las células de neuroblastoma con oligómeros del amiloide beta para caracterizar posibles efectos anormales que este péptido podría ejercer sobre la función de esta molécula.

11. Referencias bibliográficas:

- Aisa, B., Gil-Bea, F. J., Solas, M., García-Alloza, M., Chen, C. P., Lai, M. K., Francis, P. T., & Ramírez, M. J. (2010). Altered NCAM expression associated with the cholinergic system in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(2), 659–668. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1398>
- Aoki, K., Maeda, F., Nagasako, T., Mochizuki, Y., Uchida, S., Ikenouchi, J., & Pollard, T. D. (2016). A RhoA and Rnd3 cycle regulates actin reassembly during membrane blebbing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(13), E1863–E1871. https://doi.org/10.1073/PNAS.1600968113/SUPPL_FILE/PNAS.1600968113.SM08.MP4
- Araç, D., Boucard, A. A., Bolliger, M. F., Nguyen, J., Soltis, S. M., Südhof, T. C., & Brunger, A. T. (2012). A novel evolutionarily conserved domain of cell-adhesion GPCRs mediates autoproteolysis. *EMBO Journal*, 31(6), 1364–1378. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.26>
- Aseervatham, J. (n.d.). biology Cytoskeletal Remodeling in Cancer. <https://doi.org/10.3390/biology9110385>
- Aust, G., Zhu, D., van Meir, E. G., & Xu, L. (2016). Adhesion GPCRs in tumorigenesis. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 234, 369–396. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41523-9_17/TABLES/1
- Bearce, E. A., Erdogan, B., & Lowery, L. A. (2015). TIPsy tour guides: How microtubule plus-end tracking proteins (+TIPS) facilitate axon guidance. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(JUNE). <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00241>.
- Berezewicz, M. (2007). Proteínas andamiaje (MAGUK, Shank y Homer) en densidad postsináptica en el sistema nervioso central. *Postepy biochemii*, 53 (2), 188-197.
- Bjarnadóttir, T. K., Fredriksson, R., Höglund, P. J., Gloriam, D. E., Lagerström, M. C., & Schiöth, H. B. (2004). The human and mouse repertoire of the adhesion family of G-protein-coupled receptors. *Genomics*, 84(1), 23–33. <https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2003.12.004>
- Bonvicini, C., Faraone, S. v, & Scassellati, C. (2016). Attention-deficit hyperactivity disorder in adults: A systematic review and meta-analysis of genetic, pharmacogenetic and biochemical studies. *Molecular Psychiatry*, 21, 872–884. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.74>

- Boucard, A. A., Ko, J., & Südhof, T. C. (2012). High Affinity Neurexin Binding to Cell Adhesion G-protein-coupled Receptor C1RL1/Latrophilin-1 Produces an Intercellular Adhesion Complex *. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 9399–9413. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.318659>
- Boucard, A. A., Maxeiner, S., & Südhof, T. C. (2013). Latrophilins Function as Heterophilic Cell-adhesion Molecules by Binding to Teneurins REGULATION BY ALTERNATIVE SPLICING *. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 387–402. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.504779>
- Braak, H., & del Tredici, K. (2016). Potential pathways of abnormal tau and α -synuclein dissemination in sporadic Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023630>
- Chen, B., Lin, W., Qi, W., Li, S., Hong, Z., & Zhao, H. (2020). Cofilin inhibition by Limk1 reduces rod formation and cell apoptosis after ischemic stroke. *Neuroscience*, 444, 64-75.
- Chong, Z. X., Keong Yeap, S., Yong, W., Corresp, H., & Ho, W. Y. (n.d.). Transfection types, methods, and strategies: A technical review.
- Cooper, J. A., & Schafer, D. A. (2000). Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Current opinion in cell biology*, 12(1), 97-103.
- Cruz-Ortega, J. S., & Boucard, A. A. (2019). Actin cytoskeleton remodeling defines a distinct cellular function for adhesion G protein-coupled receptors ADGRL/latrophilins 1, 2 and 3. <https://doi.org/10.1242/bio.039826>
- Dinamarca, M. C., Weinstein, D., Monasterio, O., & Inestrosa, N. C. (2011). The synaptic protein neuroligin-1 interacts with the amyloid β -peptide. is there a role in Alzheimer's disease? *Biochemistry*, 50(38), 8127–8137. <https://doi.org/10.1021/bi201246t>
- Dorostkar, M. M., Zou, · Chengyu, Blazquez-Llorca, L., & Herms, J. (2015). Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: problems and opportunities. *Acta Neuropathologica*, 130, 1–19. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1449-5>
- Doyle, S. E., Scholz, M. J., Greer, K. A., Hubbard, A. D., Darnell, D. K., Antin, P. B., Klewer, S. E., & Runyan, R. B. (2006). Latrophilin-2 is a novel component of the epithelial-mesenchymal

- transition within the atrioventricular canal of the embryonic chicken heart. *Developmental Dynamics*, 235(12), 3213–3221. <https://doi.org/10.1002/DVDY.20973>
- Ehrhardt, C., Schmolke, M., Matzke, A., Knoblauch, A., Will, C., Wixler, V., & Ludwig, S. (2006). Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent. *Signal Transduction*, 6(3), 179–184. <https://doi.org/10.1002/SITA.200500073>
- Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L. G., & Schiöth, H. B. (2003). The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralagon Groups, and Fingerprints. *Molecular Pharmacology*, 63(6), 1256–1272. <https://doi.org/10.1124/MOL.63.6.1256>
- Furcila, D., Defelipe, J., & Alonso-Nanclares, L. (2018). A Study of Amyloid-and Phosphotau in Plaques and Neurons in the Hippocampus of Alzheimer's Disease Patients. *Journal of Alzheimer's Disease*, 64, 417–435. <https://doi.org/10.3233/JAD-180173>
- Ghosh, C., Song, W., & Lahiri, D. K. (2000a). Efficient ADN transfection in neuronal and astrocytic cell lines. *Molecular Biology Reports*, 27, 113–121.
- Goetzl, E. J., Abner, E. L., Jicha, G. A., Kapogiannis, D., & Schwartz, J. B. (2018). Declining levels of functionally specialized synaptic proteins in plasma neuronal exosomes with progression of Alzheimer's disease. *The FASEB JOURNAL*, 32(2), 888. <https://doi.org/10.1096/fj.201700731R>
- Gordon-Weeks, P. R. (2004). Microtubules and Growth Cone Function. *J Neurobiol*, 58, 70–83. <https://doi.org/10.1002/neu.10266>
- Govek, E.-E., Hatten, M. E., & Aelst, L. Van. (2011). The Role of Rho GTPase Proteins in CNS Neuronal Migration. *Develop Neurobiol*, 71, 528–553. <https://doi.org/10.1002/dneu.20850>
- Harmar, A. J. (2001). Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biology*, 2(12), 1–10. <https://doi.org/10.1186/GB-2001-2-12-REVIEWS3013/FIGURES/4>
- Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H. B., & Gloriam, D. E. (2017). Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.178>

- Hernández-Coronado, C. G., Guzmán, A., González-Aretia, D., Medina-Moctezuma, Z. B., Gutiérrez, C. G., & Rosales-Torres, A. Ma. (2022). Receptores acoplados a proteínas G (GPCR): activación, señalización y regulación. *Revista Mexicana de Endocrinología, Metabolismo y Nutrición*, 9(3). <https://doi.org/10.24875/rme.21000052>
- Hilger, D., & Masureel, M. (2018). Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature Structural & Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41594-017-0011-7>
- Ichtchenko, K., Bittner, M. A., Krasnoperov, V., Little, A. R., Chepurny, O., Holz, R. W., & Petrenko, A. G. (1999). A novel ubiquitously expressed α -latrotoxin receptor is a member of the CIRL family of G-protein-coupled receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 274(9), 5491–5498. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.9.5491>
- Ikenouchi, J., & Aoki, K. (2017). Membrane bleb: A seesaw game of two small GTPases. *Small GTPases*, 8(2), 85–89. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1199266>
- Kang, D. E., & Woo, J. A. (2019). Cofilin, a master node regulating cytoskeletal pathogenesis in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 72(s1), S131-S144.
- Karra, D., & Dahm, R. (2010). Transfection Techniques for Neuronal Cells. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0183-10.2010>
- Kashani, A., Lopicard, E., Poirel, O., Videau, C., David, J. P., Fallet-Bianco, C., Simon, A., Delacourte, A., Giros, B., Epelbaum, J., Betancur, C., & Mestikawy, S. el. (2008). Loss of VGLUT1 and VGLUT2 in the prefrontal cortex is correlated with cognitive decline in Alzheimer disease. *Neurobiology of Aging*, 29, 1619–1630. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.010>
- Khoonsari, E., Häggmark, A., Lonnberg, M., Mikus, M., Kilander, L., Lannfelt, L., Bergquist, J., Ingelsson, M., Nilsson, P., Kultima, K., & Shevchenko, G. (2016). Analysis of the Cerebrospinal Fluid Proteome in Alzheimer's Disease. *PLOS ONE*, 11(3), e0150672. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0150672>
- Kolarova, M., García-Sierra, F., Bartos, A., Ricny, J., & Ripova, D. (2012). Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012, 13. <https://doi.org/10.1155/2012/731526>

- Kolodkin, A. L., & Tessier-Lavigne, M. (2011). Cite this article as. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3, 2023. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001727>
- Langenhan, T., Piao, X., & Monk, K. R. (2016). Adhesion G protein-coupled receptors in nervous system development and disease. *Nature Reviews Neuroscience* 2016 17:9, 17(9), 550–561. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.86>
- Lee, C. S., Cho, H. J., Lee, J. W., Son, H. J., Chai, J., & Kim, H. S. (2021). Adhesion GPCR Latrophilin-2 Specifies Cardiac Lineage Commitment through CDK5, Src, and P38MAPK. *Stem Cell Reports*, 16(4), 868–882. <https://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2021.03.003>
- Lehman, N. L. (s/f). The ubiquitin proteasome system in neuropathology. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0560-x>
- Leshchyns'ka, I., & Sytnyk, V. (2016). Synaptic Cell Adhesion Molecules in Alzheimer's Disease. <https://doi.org/10.1155/2016/6427537>
- Leshchyns'ka, I., Liew, H. T., Shepherd, C., Halliday, G. M., Stevens, C. H., Ke, Y. D., Ittner, L. M., & Sytnyk, V. (2015). A β -dependent reduction of NCAM2-mediated synaptic adhesion contributes to synapse loss in Alzheimer's disease. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms9836>
- Li, J., Xie, Y., Cornelius, S., Jiang, X., Sando, R., Kordon, S. P., Pan, M., Leon, K., Südhof, T. C., Zhao, M., & Araç, D. (2020). Alternative splicing controls teneurin-latrophilin interaction and synapse specificity by a shape-shifting mechanism. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16029-7>
- Linseman, D. A., & Loucks, F. A. (2008). Diverse roles of Rho family GTPases in neuronal development, survival, and death. *Frontiers in Bioscience*, 13, 657.
- Llorens-Martín, M., Blazquez-Llorca, L., Benavides-Piccione, R., Rabano, A., Hernandez, F., Avila, J., DeFelipe, J., Hof, P. R., & Aurelio Freire, M. M. (2014). Selective alterations of neurons and circuits related to early memory loss in Alzheimer's disease. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00038>

- Lopez, O. L., Becker, J. T., Sweet, R. A., Klunk, W., Kaufer, D. I., Saxton, J., Habeych, M., & DeKosky, S. T. (2003). Psychiatric Symptoms Vary With the Severity of Dementia in Probable Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 15, 346–353.
- López-Camacho Y, Guzman-Hernandez N, Hernandez V, Diaz Munoz E, Garcia-Sierra F, & Basurto-Islas. (2017). Investigación y terapias en la enfermedad de Alzheimer basadas en beta amiloide y tau. *Arch Neurocienc*, 22(2), 72–77. <https://www.medigraphic.com/pdfs/arcneu/ane-2017/ane172g.pdf>
- Lowery, L. A., & Vactor, D. van. (2009). The trip of the tip: Understanding the growth cone machinery. En *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 10, Número 5, pp. 332–343). <https://doi.org/10.1038/nrm2679>
- Luttrell M y Lefkowitz J. (2002). The role of β -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. En *Journal of Cell Science* 115(3), -: Vol. 115 (3) (pp. 455–465). https://cob.silverchair-cdn.com/cob/content_public/journal/jcs/115/3/10.1242_jcs.115.3.455/1/455.pdf?
- Marín, O., Valiente, M., Ge, X., & Tsai, L.-H. (2010). Guiding Neuronal Cell Migrations. 2(a), 1834. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001834>
- Mathiasen, S., Palmisano, T., Perry, N. A., Stoveken, H. M., Vizurraga, A., McEwen, D. P., Okashah, N., Langenhan, T., Inoue, A., Lambert, N. A., Tall, G. G., & Javitch, J. A. (n.d.). G12/13 is activated by acute tethered agonist exposure in the adhesion GPCR ADGRL3. *Nature Chemical Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0617-7>
- Moon, S. Y., & Zheng, Y. (n.d.). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. Retrieved June 2, 2023, from <http://ticb.trends.com>
- Moreno-Salinas, A. L., Avila-Zozaya, M., Ugalde-Silva, P., Hernández-Guzmán, D. A., Missirlis, F., & Boucard, A. A. (2019). Latrophilins: A neuro-centric view of an evolutionary conserved adhesion g protein-coupled receptor subfamily. *Frontiers in Neuroscience*, 13(JUL). <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00700>

- Mortimer, D., Fothergill, T., Pujic, Z., Richards, L. J., & Goodhill, G. J. (2008). Growth cone chemotaxis. En *Trends in Neurosciences* (Vol. 31, Número 2, pp. 90–98). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.11.008>
- Nazarko, O., Kibrom, A., Winkler, J., Leon, K., Stoveken, H., Salzman, G., Merdas, K., Lu, Y., Narkhede, P., Tall, G., Prömel, S., & Araç, D. (2018). A Comprehensive Mutagenesis Screen of the Adhesion GPCR Latrophilin-1/ADGRL1. *iScience*, 3, 264–278. <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2018.04.019>
- Neuhaus, B., Tosun, B., Rotan, O., Frede, A., Westendorf, A. M., & Epple, M. (2016). Nanoparticles as transfection agents: a comprehensive study with ten different cell lines. <https://doi.org/10.1039/c5ra25333k>
- O'sullivan, M. L., de Wit, J., Savas, J. N., Comoletti, D., Otto-Hitt, S., Yates Iii, J. R., & Ghosh, A. (2012). Postsynaptic FLRT proteins are endogenous ligands for the black widow spider venom receptor Latrophilin and regulate excitatory synapse development. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.01.018>
- O'Sullivan, M. L., Martini, F., von Daake, S., Comoletti, D., & Ghosh, A. (2014). LPHN-3, a presynaptic adhesion-GPCR implicated in ADHD, regulates the strength of neocortical layer 2/3 synaptic input to layer 5. *Neural Development*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-9-7/>
- Paavola, K. J., & Hall, R. A. (2012). Adhesion G protein-coupled receptors: Signaling, pharmacology, and mechanisms of activation. En *Molecular Pharmacology* (Vol. 82, Número 5, pp. 777–783).
- Pollard, T. D., & Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112(4), 453–465.
- Prömel, S., Langenhan, T., & Araç, D. (2013). Matching structure with function: The GAIN domain of Adhesion-GPCR and PKD1-like proteins. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(8), 470–478. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2013.06.002>
- Provenzano, P. P., & Keely, P. J. (2011). Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and Rho GTPase signaling. *Journal of Cell Science*, 124(8), 1195–1205. <https://doi.org/10.1242/JCS.067009>

- Ridley, A. J. (2015). Rho GTPase signalling in cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 36, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.08.005>
- Rodríguez-Cruz, F., Torres-Cruz, F. M., Monroy-Ramírez, H. C., Escobar-Herrera, J., Basurto-Islas, G., Avila, J., & García-Sierra, F. (2018). Fragmentation of the Golgi Apparatus in Neuroblastoma Cells Is Associated with Tau-Induced Ring-Shaped Microtubule Bundles. *Journal of Alzheimer's Disease*, 65(4), 1185–1207. <https://doi.org/10.3233/JAD-180547>
- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F., & Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. En *Nature* (Vol. 459, Número 7245, pp. 356–363). <https://doi.org/10.1038/nature08144>
- Ross, C. A., & Poirier, M. A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Medicine*, 10(7), S10. <https://doi.org/10.1038/nm1066>
- Rush, T., Martinez-Hernandez, J., Dollmeyer, M., Frandemiche, M. L., Borel, E., Boisseau, S., Jacquier-Sarlin, M., & Buisson, A. (2018). Synaptotoxicity in Alzheimer's Disease Involved a Dysregulation of Actin Cytoskeleton Dynamics through Cofilin 1 Phosphorylation. *Journal of Neuroscience*, 38(48), 10349–10361. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1409-18.2018>
- Sando, R., & Südhof, T. C. (2021). Latrophilin gpcr signaling mediates synapse formation. *eLife*, 10. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.65717>
- Sando, R., Jiang, X., & Südhof, T. C. (2019). Latrophilin GPCRs direct synapse specificity by coincident binding of FLRTs and teneurins. *Science*, 363(6429). <https://doi.org/10.1126/science.aav7969>
- Sarmiere, P. D., & Bamberg, J. R. (2004). Regulation of the neuronal actin cytoskeleton by ADF/cofilin. *Journal of neurobiology*, 58(1), 103-117.
- Scheff, S. W., Price, D. A., Schmitt, F. A., & Mufson, E. J. (2006). Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging*, 27, 1372–1384. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.012>

- Schiöth, H. B., & Fredriksson, R. (2005). The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *General and Comparative Endocrinology*, 142(1–2), 94–101. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2004.12.018>
- Scholz, N., Gehring, J., Guan, C., Ljaschenko, D., Fischer, R., Lakshmanan, V., Kittel, R. J., & Langenhan, T. (2015). The Adhesion GPCR Latrophilin/CIRL Shapes Mechanosensation. *Cell Reports*, 11(6), 866–874. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2015.04.008>
- Schwabe, T., Neuert, H., & Clandinin, T. R. (2013). XA network of cadherin-mediated interactions polarizes growth cones to determine targeting specificity. *Cell*, 154(2), 351. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.06.011>
- Sit, S. T., & Manser, E. (2011). Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 124(5), 679–683. <https://doi.org/10.1242/JCS.064964>
- Slota, J. A., Sajesh, B. v, Frost, K. F., Medina, S. J., & Booth, S. A. (2020). Dysregulation of neuroprotective astrocytes, a spectrum of microglial activation states, and altered hippocampal neurogenesis are revealed by single-cell RNA sequencing in prion disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 10, 161. <https://doi.org/10.1186/s40478-022-01450-4>
- Sosa, L. J., Bergman, J., Estrada-Bernal, A., Glorioso, T. J., Kittelson, J. M., & Pfenninger, K. H. (2013). Amyloid Precursor Protein Is an Autonomous Growth Cone Adhesion Molecule Engaged in Contact Guidance. *PLOS ONE*, 8(5), e64521. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0064521>
- Südhof, T. C. (2021). The cell biology of synapse formation. <https://doi.org/10.1083/jcb.202103052>
- Sugita, S., Ichtchenko, K., Khvotchev, M., & Sü, T. C. (1998). Latrotoxin Receptor CIRL/Latrophilin 1 (CL1) Defines an Unusual Family of Ubiquitous G-protein-linked Receptors G-PROTEIN COUPLING NOT REQUIRED FOR TRIGGERING EXOCYTOSIS*. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32715>
- Sumi, T., Hashigasako, A., Matsumoto, K., & Nakamura, T. (2006). Different activity regulation and subcellular localization of LIMK1 and LIMK2 during cell cycle transition. *Experimental cell research*, 312(7), 1021-1030.

- Sumi, T., Hashigasako, A., Matsumoto, K., & Nakamura, T. (2006). Different activity regulation and subcellular localization of LIMK1 and LIMK2 during cell cycle transition. *Experimental cell research*, 312(7), 1021-1030.
- Tropea, D., Schmeisser, M. J., Guhathakurta, S., Zuko, A., Oguro-Ando, A., Post, H., R E Taggenbrock, R. L., van Dijk, R. E., Maarten Altelaar, A. F., R Heck, A. J., Petrenko, A. G., van der Zwaag, B., Shimoda, Y., Jeroen Pasterkamp, R., & Peter Burbach, J. H. (2016). Association of Cell Adhesion Molecules Contactin-6 and Latrophilin-1 Regulates Neuronal Apoptosis. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00143>
- Trudeau, V. L., Mosca, T., Lovejoy, D. A., Husí, M., & Barsyte-Lovejoy, D. (2019). Teneurin C-Terminal Associated Peptide (TCAP)-1 and Latrophilin Interaction in HEK293 Cells: Evidence for Modulation of Intercellular Adhesion. *Frontiers in Endocrinology* | [Www.Frontiersin.Org](http://www.frontiersin.org), 10, 22. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00022>
- Tucker, R. P., & Chiquet-Ehrismann, R. (2006). Teneurins: A conserved family of transmembrane proteins involved in intercellular signaling during development. *Developmental Biology*, 290(2), 237–245. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2005.11.038>
- Ulasov, A. V., Khramtsov, Y. V., Trusov, G. A., Rosenkranz, A. A., Sverdlov, E. D., & Sobolev, A. S. (2011). Properties of PEI-based Polyplex Nanoparticles That Correlate With Their Transfection Efficacy. *Molecular Therapy*, 19(1), 103–112. <https://doi.org/10.1038/MT.2010.233>
- Valiente, M., & Marín, O. (2010). Neuronal migration mechanisms in development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 20(1), 68–78. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2009.12.003>
- Vazquez-Victorio, G., Gonzalez-Espinosa, C., Espinosa-Riquer, Z. P., & Macias-Silva, M. (2016). GPCRs and actin–cytoskeleton dynamics. In *Methods in cell biology* (Vol. 132, pp. 165-188). Academic Press.
- Vázquez-Victorio, G., González-Espinosa, C., Espinosa-Riquer, ZP, & Macias-Silva, M. (2016). GPCR y dinámica actina-citoesqueleto. En *Methods in cell biology* (Vol. 132, págs. 165-188). Prensa Académica.

- Vysokov, N. v., Silva, J. P., Lelianova, V. G., Suckling, J., Cassidy, J., Blackburn, J. K., Yankova, N., Djamgoz, M. B. A., Kozlov, S. v., Tonevitsky, A. G., & Ushkaryov, Y. A. (2018). Proteolytically released lasso/teneurin-2 induces axonal attraction by interacting with latrophilin-1 on axonal growth cones. *eLife*, 7. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.37935>
- Wang, B., Yang, Z., Brisson, B. K., Feng, H., Zhang, Z., Welch, E. M., Peltz, S. W., Barton, E. R., Brown, R. H., & Sweeney, H. L. (2010). Membrane blebbing as an assessment of functional rescue of dysferlin-deficient human myotubes via nonsense suppression. *Journal of Applied Physiology*, 109(3), 901–905. https://doi.org/10.1152/JAPPLPHYSIOL.01366.2009/SUPPL_FILE/VIDEO1.MOV
- Wang, J., Gareri, C., & Rockman, H. A. (2018). G-protein-coupled receptors in heart disease. *Circulation Research*, 123(6), 716–735. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.311403/FORMAT/EPUB>
- Wang, T., Larcher, L. M., Ma, L., & Veedu, R. N. (n.d.). molecules Systematic Screening of Commonly Used Commercial Transfection Reagents towards Efficient Transfection of Single-Stranded Oligonucleotides. <https://doi.org/10.3390/molecules23102564>
- Yamada, T., Sakisaka, T., Hisata, S., Baba, T., & Takai, Y. (2005). RA-RhoGAP, Rap-activated Rho GTPase-activating Protein Implicated in Neurite Outgrowth through Rho * □ S. *Journal of Biological Chemistry*, 280(38), 33026–33034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504587200>
- Yew, D. T., Li, W. P., Webb, S. E., Lai, H. W. L., & Zhang, L. (1999). Neurotransmitters, peptides, and neural cell adhesion molecules in the cortices of normal elderly humans and alzheimer patients: a comparison.
- Yu, W., & Lu, B. (2012). Synapses and Dendritic Spines as Pathogenic Targets in Alzheimer's Disease. *Neural Plasticity*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/247150>
- Zheng, C. Y., Seabold, G. K., Horak, M., & Petralia, R. S. (2011). MAGUKs, synaptic development, and synaptic plasticity. *The Neuroscientist*, 17(5), 493-512.