



Pasantía de Grado

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Orientación en Neurociencias

Facultad de Ciencias - Universidad de la República (UdelaR)

Mielinización del SNC en animales en desarrollo en un modelo de Acidemia Glutárica tipo I (GA-I)

Estudiante: Bach. Valentín Cópola

Tutor: Dra. Silvia Olivera Bravo

Departamento de Neurobiología Celular y Molecular (NBCM)

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

Montevideo, Diciembre de 2011

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del tribunal, Giselle Prunelle y Alejandra kun, por la rápida devolución de este trabajo y por las correcciones que creyeron pertinentes para mejorarlo.

A Silvia Olivera por haber aceptado ser mi tutora. Mucho de lo que aprendí se lo debo a ella. Gracias por enseñarme a trabajar en un laboratorio y por las discusiones que tuvimos para mejorar este trabajo.

A Luis Barbeito por abrirme las puertas del laboratorio, por haber colaborado con ideas para mejorar el trabajo y por las palabras de apoyo.

A Pablo, Emiliano, Eugenia, María Noel y a Mariana por generar un excelente ambiente de trabajo y por la ayuda prestada.

Amigos y compañeros de facultad que hicieron que la carrera fuera muy disfrutable.

A mi familia por el apoyo incondicional que recibí de cada uno de ellos durante todos estos años de estudio y trabajo. Sin duda no estaría en esta situación de no ser por ellos.

A mi novia, Paula Lado, porque ella fue más que una compañera en este camino, durante el cual tuvimos el apoyo mutuo.

ÍNDICE

	Página
Resumen	4
Introducción	5
Acidemia glutárica tipo I	5
Deficiencias funcionales de la Glutaril-CoA deshidrogenasa y su rol en la generación de la patología de GA-I	6
Características patológicas de GA-I	7
Celulas gliales	7
Oligodendrocitos	8
Mielina.....	8
Mielinización.....	11
Astrocitos y Reacción Astrocitaria	11
Relación Astrocitos-Mielina.....	13
Modelo animal de GA-I	14
Hipótesis de trabajo	15
Objetivos	16
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos.....	16
Estrategia Experimental	17
Materiales y Métodos	18
Modelo experimental de GA-I	18
Análisis del desempeño locomotor mediante Footprint	18
Perfusión de animales y análisis morfométrico	19
Obtención de sesiones de cerebro	20
Visualización de mielina mediante Tinción de Sudán.....	20
Inmunohistoquímica.....	21
Western blot	22
Obtención de muestras para Western blot	22
Cuantificación de proteínas.....	23
Western blot.....	23
Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida	24
Transferencia.....	25
Bloqueo de la membrana e incubación de anticuerpos	26
Revelado	26
Análisis de datos	27
Resultados	28
Acción del GA sobre el desarrollo de animales.....	28
Efectos del GA sobre la locomoción	29
Análisis de los cerebros por Morfometría	30
Efectos del GA sobre la mielinización	31
Inmunolocalización de proteínas mielínicas y astrocitarias.....	34
Evaluación de la expresión de proteínas mielínicas en cuerpo estriado	35
Efectos del GA sobre la mielinización del cuerpo calloso	36
Resumen de los Resultados	38
Discusión	39
Perspectivas	46
Bibliografía	47

RESUMEN

Las células gliales están afectadas en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas y dada su relación con las neuronas, podrían condicionar el comienzo y/o la progresión de la neurodegeneración. En estas patologías, la astroglia reactiva proporciona soporte trófico y defensas antioxidantes, pero también puede cambiar su perfil de expresión génica adoptando un fenotipo tóxico para otras poblaciones celulares. La acidemia glutárica tipo I (GA-I) es una enfermedad neurodegenerativa que afecta particularmente el SNC y es resultante de una deficiencia funcional de la glutaril-CoA deshidrogenasa (GCDH) que conduce a una acumulación de ácido glutárico (GA del inglés *glutaric acid*). Los pacientes portadores de esta enfermedad presentan un desarrollo normal aparente desde el nacimiento hasta los primeros 18 meses de vida, donde comienzan crisis encefalopáticas intercurrentes que dañan el estriado y la corteza, conduciendo generalmente a la muerte temprana de los pacientes. En nuestro modelo de GA-I, los astrocitos son primariamente afectados y participarían de la neurotoxicidad y de las alteraciones en la mielinización reportadas en esta patología. En el presente trabajo se pretendió evaluar como el ácido glutárico (GA) afecta la mielinización en animales en desarrollo y la producción de proteínas mielínicas, y correlacionar estos datos con la astrogliosis reportada previamente por el grupo, y evaluar el desempeño locomotor en estos animales. En ratas inyectadas con una sola dosis de concentraciones fisiopatológicas de ácido glutárico (GA) en el primer día de vida, se observó como este metabolito presente en la enfermedad afecta el crecimiento de los animales, generando diferencias significativas de peso a edades avanzadas, así como deficiencias locomotoras en estos. Observamos que existe una disminución del eje transversal cerebral a nivel del cuerpo estriado. Se encontró afectada la mielinización en esta estructura y el cuerpo calloso, y una disminución de proteínas mielínicas. Pudimos observar una reacción astrocitaria similar a la descrita previamente por el grupo, la cual precedió y acompañó las alteraciones en la mielinización, indicando que los astrocitos pueden estar cumpliendo un papel preponderante en la patogenia.

INTRODUCCIÓN

Acidemia glutárica I

La acidemia glutárica tipo I (**GA-I**, del inglés *Glutaric Acidemia Type I*; McKusick#231670) es una enfermedad neurometabólica típica de la niñez temprana (Kurul y cols., 2004; Zinnanti, y cols., 2007; Keyser y cols., 2008) descrita por primera vez en 1975 por Goodman y colaboradores (Goodman y col, 1975). Los pacientes de GA-I presentan macrocefalia de origen prenatal y un desarrollo normal aparente durante los primeros 18-36 meses de vida. En ese tiempo, sufren crisis encefalopáticas intercurrentes (en un contexto infeccioso) que dañan significativamente los núcleos caudado y putamen (Goodman y cols, 1975; Soffer y cols, 1991, de Luis y cols, 2007), ocasionando alteraciones permanentes del tono muscular (disonía e hipotonía), desórdenes motores (disquinesia y ataxia), alteraciones posturales (choroatetosis), irritabilidad y letargia (Prats Viñas, 2001; Barreiro y cols., 2004; Freudenberg y cols., 2004; Funk y cols., 2005; Gordon y cols., 2006; Cerisola y cols., 2009). En algunos casos, se describe además retardo del desarrollo cognitivo (Soffer y cols., 1992; Funk y cols., 2005). Los hallazgos neurorradiológicos más habituales son el ensanchamiento de las cisuras de Silvio (denominado signo de “las alas de murciélago”), la pérdida de volumen frontotemporal, ventriculomegalia, hematomas subdurales, retraso en la mielinización, desmielinización y lesiones de los ganglios basales (de Luis y cols, 2007).

A la fecha, GA-I no tiene tratamiento médico curativo. Los pacientes presintomáticos, diagnosticados luego de su nacimiento por niveles elevados de glutarilcarnitina, ácido glutárico (**GA**, del inglés *Glutaric Acid*) y 3-hidroxi glutárico (**3-OHGA**, del inglés 3-Hydroxyglutaric Acid) mediante espectrometría de masa en tandem, son tratados con dieta pobre en lisina y triptófano y suplementación de riboflavina y carnitina (Gordon y cols., 2006). El diagnóstico de esta enfermedad en pacientes sintomáticos se establece a través de la detección de un aumento en la cantidad de GA, 3-OHGA y ácido glutacónico en orina o demostrando la falta de actividad de la enzima GCDH (del inglés, *Glutaryl Co-A Dehydrogenase*) en cultivo de fibroblastos (de Luis y cols, 2007).

Defectos funcionales de la Glutaril-CoA deshidrogenasa como generadores de la patología de GA-I

GA-I es un desorden del catabolismo de lisina, hidroxilisina y triptófano causado por deficiencia funcional de la enzima de la matriz mitocondrial glutaril-CoA deshidrogenasa (GCDH, EC. 1.3.99.7). GCDH, codificada por un gen nuclear ubicado en el locus 19p13.2, pertenece al grupo de las acil-CoA deshidrogenasas, una familia de 9 flavoenzimas que metaboliza los ácidos grasos y algunos aminoácidos (Fu y cols., 2004). La GCDH es la única acil-CoA deshidrogenasa que además de la reacción de deshidrogenación típica del grupo, cataliza la descarboxilación de la glutaril-CoA a crotonil-CoA y CO₂ (Sauer 2007). En GA-I, ésta enzima presenta numerosas mutaciones y/o truncamientos (más de 150 reportados a la fecha) que

parecen tener frecuencias y distribuciones regionales (Greenberg y cols, 2002; Zschocke y cols, 2000). R402W parece ser la mutación más frecuente en poblaciones europeas y E414K reportada en pacientes europeos es muy rara en poblaciones americanas. En poblaciones cerradas de USA, se observan dos mutaciones prevalentes A421V y IVS1+5 G > T (Biery y cols, 1996;

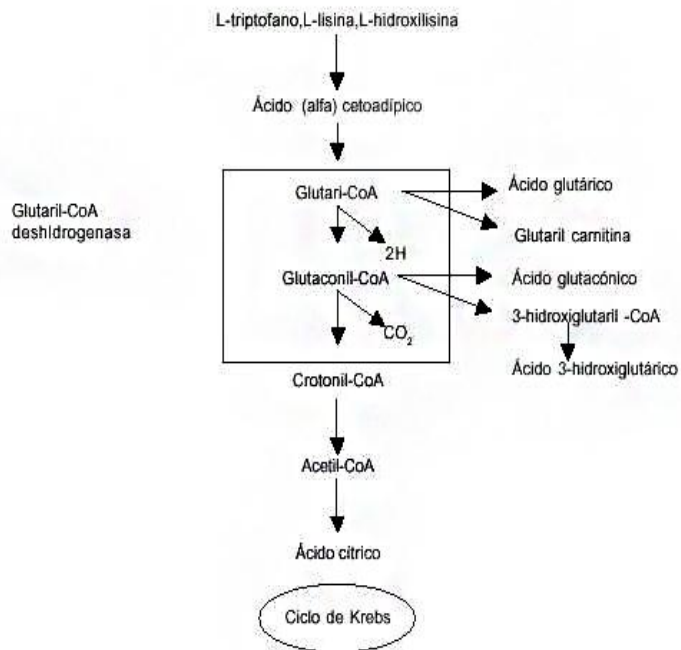


Figura 1: Catabolismo de los aminoácidos afectados en GA-I. Tomado de Barreiro et al, Rev Med Uruguay 2004; 20:221-227

Fu y cols, 2004; Gordon y cols, 2006). Estas mutaciones bloquean generalmente la actividad descarboxilasa de la GCDH, inhibiendo la conversión de la glutaril-CoA a crotonil-CoA y ocasionando la acumulación de GA, 3-OHGA y ácido glutacónico (Keyser y cols. 2008), según se muestra en la figura 1.

Características patológicas de GA-I

Estudios anátomo-patológicos han destacado que las características principales de GA-I parecen ser la degeneración bilateral aguda del estriado y de la corteza en forma crónica (Soffer y cols., 1991; Sijens y cols., 2006). Se describen cambios espongiiformes en la sustancia blanca que se reportan como una mielinopatía esponjosa debido a la acumulación de fluidos intramielínicamente (Soffer y cols., 1991). Los estudios clínicos y radiológicos muestran distintos grados de afectación en la mielina, los que son atribuidos a alteraciones en la maduración, diferenciación y/o apoptosis de las células productoras de mielina (Funk y cols., 2005; Gordon y cols., 2006).

In vitro, se ha demostrado que concentraciones muy altas de GA y 3-OHGA, superiores a las fisiopatológicas, inician una cascada apoptótica en la línea celular de oligodendrocitos inmaduros OLN-93 (Gerstner y cols., 2005). Los autores proponen, que éste podría ser un mecanismo que podría contribuir a las alteraciones reportadas en la sustancia blanca de pacientes con GA-I. Sin embargo, se desconocen las causas que provocan las alteraciones en la mielina tanto en pacientes como en modelos experimentales de GA-I.

Célula gliales

Existen dos clases principales de células dentro del SNC: neuronas y glías, cuya diferencia fundamental radica en que las neuronas son células eléctricamente excitables y las células gliales no. Dentro del grupo de células gliales, las más características son del SNC son astrocitos, oligodendrocitos y microglia.

Este trabajo pretende estudiar la mielinización en un modelo de GA-I y las influencias de una posible disfunción astrocitaria sobre la misma, por lo cual voy a focalizar la atención de este trabajo en dos de estos tipos de células gliales: astrocitos y oligodendrocitos.

Oligodendrocitos

Los oligodendrocitos son las células mielinizantes del SNC. Un único oligodendrocito puede presentar hasta 40 ramificaciones (Baumann & Pham-Dinh, 2001), cada una de las cuales envuelve un segmento de un axón. En la mielinogénesis temprana, los oligodendrocitos elaboran procesos muy ramificados que contactan y envuelven axones, formando la vaina de mielina, siendo ésta una membrana necesaria para envainar los axones, aislándolos eléctricamente y promoviendo una propagación rápida del potencial de acción mediante conducción saltatoria. El importante rol que cumplen los oligodendrocitos dentro del SNC depende del establecimiento de contactos con las neuronas y de la conversación con estas. La función de mielinización, por parte del oligodendrocito, depende ampliamente del citoesqueleto de los microtúbulos y microfilamentos pero no de los filamentos intermedios del oligodendrocito (Lee y cols., 2005).

A pesar de que la mielinización es la función más importante y estudiada de los oligodendrocitos, la interacción de estas células mielinizantes con las neuronas conduce a la localización de los nodos y paranodos. Provocando que únicamente en los nodos de Ranvier se deposite la mayor cantidad de canales de Na^+ sensibles al voltaje, posibilitando la propagación del impulso nervioso de manera saltatoria (Rasband y cols., 2005, Schafer & Rasband, 2006).

Además de estas características funcionales, se ha descubierto que estas células liberan factores tróficos que afectarían el desarrollo y el mantenimiento de las neuronas (Du y cols, 2002). Para la biogénesis de la mielina que va a rodear los axones es necesario que las células gliales se asocien con los axones en el momento adecuado del desarrollo, para garantizar la entrega de los componentes de la mielina recién sintetizados (Sherman & Brophy, 2005, Simons & Trajkovic, 2006).

Mielina

La vaina de mielina se encuentra formada por la extensión de la membrana plasmática del oligodendrocito o de la célula de Schwann que envuelve los axones de las neuronas del sistema nervioso central (SNC) y del sistema nervioso periférico (SNP) respectivamente. Esta estructura está constituida por lípidos (aproximadamente 70% de su peso seco) y por proteínas (aprox. 30% de su peso seco) (Larocca & Rodríguez-Gabin, 2002), donde los lípidos son los encargados de la propiedad aisladora y las proteínas están encargadas de estabilizar la vaina de mielina (proteínas de la mielina compacta), y de mantener la comunicación oligodendrocito-neurona (mielina laxa). Las proteínas mielínicas del SNC son en su mayoría específicas de la mielina, y se encuentran presentes en diferentes proporciones, siendo las más abundantes la proteína proteolipídica (PLP, del inglés *Proteolipid Protein*) y la proteína básica de la mielina (MBP, del inglés *Myelin Basic Protein*) (Larocca & Rodríguez-Gabin, 2002). Dentro de las proteínas que se encuentran en baja proporción encontramos varios tipos: glicoproteína asociada a mielina (MAG, del inglés *Myelin-Associated Glycoprotein*), 2',3'-nucleotido-cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNPasa, del inglés *2', 3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase*), glicoproteína de mielina del oligodendrocito (MOG, del inglés *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*), moléculas de adhesión y componentes de la señalización intracelular entre otras (Baumann & Pham-Dinh, 2001; Larocca & Rodríguez-Gabin, 2002). Ahora nos adentraremos un poco en 2 de estas proteínas, MAG y CNPasa.

MAG es una glicoproteína presente principalmente en la región internodal, localizándose en la región peri-axonal participando en la comunicación celular entre el oligodendrocito y la neurona (Fulton y cols., 2009), siendo su expresión específica de células formadoras de mielina (oligodendrocitos y células de Schwann, en el SNC y SNP respectivamente). MAG se encuentra presente desde el comienzo de la mielinización siendo una de las primeras proteínas de la membrana glial en expresarse, y es una de las encargadas de la formación y del mantenimiento de la vaina de mielina (Biffiger y cols., 2000). El mRNA de MAG presenta splicing alternativo, conduciendo a la formación de 2 isoformas de esta proteína: S-MAG (short-MAG) y L-MAG (large-MAG) (Baumann &

Pham Dinh, 2001). Dentro del SNC, L-MAG es la isoforma predominante en el comienzo de la mielinización, mientras que la isoforma S-MAG incrementa sus niveles con la maduración, encontrándose niveles aproximadamente iguales en adultos. El dominio extracelular de MAG participa en el reconocimiento y la adhesión a la membrana axonal, motivo por el cual se postula que MAG puede interactuar con proteínas de la membrana axonal, promoviendo la mielinización (Quarles, 2007). Sumado a lo anterior se ha demostrado que MAG es una proteína encargada de inhibir el crecimiento del axón (Vinson y cols., 2001, Venkatesh y cols., 2007). Para desencadenar señales transmembrana, MAG interactúa con diferentes clases de receptores ubicados en la membrana axonal, como gangliósidos y miembros de la familia del receptor Nogo (NgR, del inglés Nogo Receptor). Se postula que MAG interactúa con NgR, el cual está en contacto con Lingo-1 y p75^{NTR} para transducir una señal que resulta en la activación de RhoA y la inhibición del crecimiento axónico (Schnaar & López, 2009). Por otro lado, la interacción de MAG con gangliósidos de la membrana axonal también puede activar la vía RhoA (a través de los mismos componentes o componentes aún no definidos), puede conducir a la estabilidad del axón y modular las estructuras del axón y del nodo de Ranvier, así como proteger las neuronas frente a la toxicidad aguda (Schnaar & López, 2009, Mehta y cols., 2010). Por otra parte, se ha demostrado que el dominio intracelular de MAG, participa en la activación de Fyn, una proteína tirosin-quinasa implicada en la transducción de señales que dan comienzo a la mielinogénesis (Umemori y cols, 1994). Más aún, ha sido demostrado que la diferenciación morfológica del oligodendrocito es dependiente de la activación de Fyn (Osterhout y cols, 1999).

Animales knock out (KO) para MAG presentan pérdida de axones en el CNS y SNP sugiriendo que esta proteína tiene un rol en el mantenimiento de la integridad axonal. A partir de estos datos, recientemente se ha propuesto que MAG desempeña la función de prevenir la degeneración del axón (Nguyen y cols., 2010).

CNPasa es una proteína esencial para la sobrevivencia del axón pero no para el ensamblaje de la mielina. Esta se expresa tempranamente en el desarrollo del oligodendrocito, y se localiza en el cuerpo celular y los procesos celulares. Posee dos isoformas CNP1 y CNP2, expresándose CNP1 en células progenitoras de oligodendrocitos y ambas isoformas en oligodendrocitos en diferenciación. Según varios estudios CNPasa cumple una función importante en la regulación del crecimiento de los procesos

oligodendrogiales, los cuales parecen depender, al menos en parte, del rol que cumple como regulador de la dinámica del citoesqueleto (Lee y cols., 2005, Fulton y cols., 2009).

En los animales KO para esta proteína, los axones se hinchan y neurodegeneran, conduciendo a hidrocefalia y a una muerte prematura (Kaiser y cols.,1998). Los animales mutantes para esta proteína, presentan un agrupamiento normal de los canales de sodio nodales y proteína de adhesión paranodal sin embargo, con la edad estas agrupaciones aparecen progresivamente desorganizadas (Lappe y cols., 2003). Estos cambios ocurren previo a una degeneración axonal e invasión microglial (Xie y cols., 2010), apoyando la hipótesis de que CNP es una de las proteínas sensoras de alteraciones en la mielina. Se ha sugerido que la CNPasa es requerida para mantener la integridad de los paranodos, y que la señalización axo-glial interrumpida en este sitio conlleva a una progresiva degeneración axonal (Rasband 2005, Glia).

Mielinización

Este proceso requiere de una excepcional capacidad del oligodendrocito para sintetizar membranas en un tiempo y lugar específico. Consiste en la formación de una membrana con una composición y una interacción específica entre lípidos y proteínas que permite la compactación de membrana y la formación de las líneas densas e intraperiódicas de la mielina. Por lo tanto la mielinización requiere de la activación de enzimas del metabolismo lipídico necesarias para la formación de los lípidos, así como de la síntesis y transporte de proteínas específicas que componen la mielina (Baumann & Pham-Dinh, 2001). Ha sido demostrado que aplicando TTX se bloquea la iniciación de la mielinización y que la a-toxina de escorpión (que induce actividad eléctrica repetitiva) tiene el efecto opuesto (Demerens y cols., 1996) indicando que la actividad eléctrica de las neuronas es importante para la mielinización.

Recientemente se ha descubierto que la liberación de glutamato de neuronas del ganglio dorsal en cultivos promueve la inducción de la mielina al estimular la formación de dominios de señalización enriquecidos en colesterol entre el oligo y el axón, e incrementa la síntesis local de las principales proteínas de la vaina de mielina mediante una señalización a través de Fyn. De esta manera se propone que la actividad neural y el

“cross-talk” entre el oligodendrocito-axón pueden estar involucrados en promover mielinización. (Wake y cols., 2011).

Astrocitos y Reacción Astrocitaria

Los astrocitos son células encargadas de llevar a cabo múltiples funciones vitales para la neurona, dentro de las cuales se incluyen soporte trófico y metabólico. Existe evidencia de que los astrocitos son esenciales para la formación y función de sinapsis en formación mediante la liberación de moléculas como la trombospondina (Sofroniew & Vinters 2010). Estas células también juegan un rol importante al remover neurotransmisores de la hendidura sináptica, proceso fundamental para el correcto funcionamiento de la sinapsis química. Mediante este mecanismo remueven el exceso de glutamato liberado por las neuronas, evitando la exitotoxicidad mediada por este neurotransmisor. Los astrocitos además son células encargadas de mantener y regular la barrera hemato-encefálica (mediante la liberación de ácido araquidónico, óxido nítrico y prostaglandinas) así como de mantener la homeostasis iónica (canales de K^+) y osmótica (aquaporina 4) del ambiente extracelular (Jessen 2004, Maragakis & Rothstein 2006, Sofroniew & Vinters 2010).

La astrogliosis reactiva es la respuesta de los astrocitos frente a una injuria de cualquier índole que sufre el SNC, sea esta una enfermedad neurodegenerativa, infección, trauma o isquemia (Pekny & Nilsson, 2005, Sofroniew & Vinters 2010). De todas maneras es importante recalcar que ésta no es una respuesta todo o nada, sino que involucra un cambio continuo en la expresión génica de estas células, perdiendo la regulación de sus funciones normales, ocasionando un cambio a nivel celular y a consecuencia de esto, con las células vecinas. Por lo cual es común encontrar diferentes tipos de astrogliosis reactiva (Sofroniew & Vinters 2010).

No resulta extraño que en los últimos años el estudio de las células gliales haya obtenido un papel relevante en las enfermedades neurodegenerativas debido a las múltiples y complejas funciones que cumplen y su estrecha relación en los procesos neurodegenerativos. Se cree que los astrocitos reactivos tienen un rol en la fase de

curación luego de la injuria en el SNC mediante monitoreo y control del contenido iónico y molecular en el espacio extracelular (Shipper 1998). Se hipotetiza que la astroglia activa puede beneficiar neuronas dañadas participando en varios procesos biológicos importantes como regulación de la neurotransmisión, reparación de la matriz extracelular, control de la barrera hemato-encefálica y soporte trófico a células dañadas (Chen & Swanson 2003, Maragakis & Rothstein 2006, Sofroniew & Vinters 2010). Por otro lado, los astrocitos pueden perder su función normal o ganar funciones anormales que juegan un rol primario en la progresión de las enfermedades al cambiar su perfil de expresión génica y adoptar un fenotipo reactivo, llegando a secretar moléculas dañinas que afectan la supervivencia neuronal (Barbeito y cols., 2004, Sofroniew & Vinters 2010).

Relación Astrocitos-Mielina

A pesar de que no existe consenso sobre cuál es el factor principal ni cuáles son los actores principales en el inicio del proceso de la mielinización, se ha demostrado que los astrocitos podrían estar controlando el comienzo de la mielinización al promover la adhesión del oligodendrocito con el axón. (Meyer-Franke y cols., 1999). También ha sido estudiado el rol que juega el astrocito en la mielinización ya que el ATP liberado por los axones debido a su actividad eléctrica induce a los astrocitos a liberar el factor inhibidor de leucemia (LIF, del inglés *leukimia inhibitor factor*) el cual tiene una acción parácrina estimulando la mielinización de los oligodendrocitos en estadios tardíos del desarrollo. Sin embargo altos niveles de LIF tienen un efecto perjudicial sobre la mielinización, inhibiendo este proceso en lugar de estimularlo (Ishibashi y cols., 2006). Es importante destacar que el astrocito puede estar implicado en la mielinización gracias a la relación que guarda con los oligodendrocitos por medio de uniones gap heterotípicas formadas por conexinas 43 (astrocito) y 47 (oligodendrocito) (Bugiani y cols., 2006, Orthmann-Murphy y cols., 2007).

También existe evidencia experimental que muestra que los astrocitos están implicados en la alteración de la mielinización (van derKnaap et al., 2006), particularmente en la patogenia de varias de las leucodistrofias más importantes. La enfermedad de Alexander, una enfermedad neurodegenerativa poco frecuente y de

pronóstico mortal debido a alteraciones generales en la mielina entre otros, se debe a mutaciones en la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, del inglés *Glial Fibrillary Acidic Protein*) que forma agregados anormales en las llamadas fibras de Rosenthal. En la enfermedad de Canavan, la cual parte de su sintomatología es similar a la de GA-I (macrocefalia, retardo sicomotor, vacuolización espongiiforme de la mielina), algunos metabolitos astrocitarios participarían en el aumento de la presión osmótica y en el hinchamiento agudo y posterior alteración estructural de la mielina (Baslow & Guilfoyle, 2009).

Modelo animal de GA-I

Los ratones *knock out* (KO) para la enzima GCDH poseen las características bioquímicas de los pacientes afectados por GA-I como la producción de GA y 3-OHGA y presentan una mielinopatía espongiiforme equivalente a la mostrada por los pacientes. Sin embargo, a diferencia de ellos, los ratones KO no presentan daño estriatal agudo o sensibilidad a la encefalopatía aguda inducida por citoquinas inflamatorias (Koeller y cols., 2002; 2004). Los animales *gcdh*^{-/-} no presentan muerte neuronal a menos que se les provea de una dieta rica en lisina. Este daño neuronal es dependiente del tiempo durante el cual se mantiene la dieta y de la edad que tienen los animales al momento en el cual se les provee de esa dieta. Observaron que luego de tres días de dieta rica en lisina no hay muerte neuronal significativa, pero sí una astrocitosis reactiva, mientras que luego de seis semanas de dieta se observa una astrocitosis reactiva mayor y una muerte neuronal significativa. Esto corrobora la ausencia de muerte neuronal primaria como efecto del GA, y refuerza la idea de que el primer efecto es el daño de las células gliales. (Zinnanti y cols., 2006).

En el laboratorio se ha desarrollado un modelo de GA-I inyectando directamente en la cisterna magna de ratas recién nacidas, concentraciones fisiopatológicas de GA a pH 7,4. En este modelo, la población neuronal no es afectada en forma aguda y se describe a los astrocitos como blancos tempranos proliferando y exhibiendo marcadores de inmadurez. Estos astrocitos inmaduros parecen alterar el soporte trófico que brindan a

neuronas y oligodendrocitos, y podrían participar en la neurodegeneración descrita en GA-I (Olivera y cols., 2008, 2011).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Debido a los efectos que sufren los pacientes de GA-I, y que el GA es el ácido secretado en mayor cantidad en esta enfermedad, es posible pensar que la administración temprana de GA (en roedores) en concentraciones que simulen una crisis es suficiente para producir efectos sistémicos y alterar el desarrollo general de los animales. Por otra parte, debido a que el cuerpo estriado es una de las regiones más afectadas en esta patología, es probable que su afectación repercuta sobre el desarrollo, aprendizaje de habilidades motoras y sobre el desempeño motor debido a las funciones modulatorias en el movimiento voluntario. Como además el estriado es una región altamente mielinizada, es probable que la sustancia blanca de esta estructura se afecte tempranamente, lo que ha sido descrito en pacientes y luego sugerido por los resultados obtenidos en el ratón knock out para la GCDH, es posible plantear la siguiente hipótesis:

La administración temprana de GA actúa sobre la oligodendroglía, directa o indirectamente por disfunción astrocitaria, influyendo sobre el desarrollo y la mielinización.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Conocer si una única exposición perinatal a GA daña el cerebro en grado suficiente para producir alteraciones significativas en el crecimiento, desempeño motor y/o estado de la mielina. Correlacionar nuestros resultados con los reportados en otros modelos experimentales de GA-I.

Objetivos específicos:

- Evaluar los efectos del GA sobre algunas características morfométricas e histológicas cerebrales durante el desarrollo y correlacionarlas con la actividad locomotora en roedores.
- Evaluar los efectos del GA en ratas sobre: la progresión de la mielinización estriatal durante el desarrollo y correlacionarla con la inmunoreactividad, los niveles de expresión de algunas proteínas asociadas a la mielina y con la respuesta astrocitaria desencadenada por GA.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos planteados se planificaron y realizaron las siguientes actividades:

1. Administración de GA en concentraciones fisiopatológicas o PBS a ratas dentro de las 24 hs de nacidas.
2. Estudio de los efectos de GA sobre el peso corporal y diferentes características morfométricas del cerebro durante los primeros 60 días de vida.
3. Estudio del desempeño locomotor de los animales tratados con GA y controles mediante footprint; y análisis de una posible correlación con los resultados obtenidos en el punto 2.
4. Evaluación la progresión de la mielinización estriatal durante el desarrollo empleando la técnica de histoquímica Sudán III en animales inyectados con GA y PBS (Controles).
5. Estudio de los efectos de GA sobre la distribución y los niveles de expresión de algunas proteínas asociadas a mielina mediante inmunohistoquímica y western blot.
6. Correlacionar la mielinización y la respuesta astrocitaria previamente reportada en el modelo empleado, empleando inmunohistoquímica para marcadores de proteínas asociadas a mielina y marcadores astrocitarios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo experimental de GA-I

Se inyectaron 5 nacimientos completos de ratas de la cepa Sprague Dawley (SP) del bioterio del IIBCE dentro de las 24 horas de vida con PBS (control) o GA (1 μ l/gr de peso, 0,75mM en PBS; pH=7,4) en la cisterna magna (IV ventrículo). Las crías fueron retornadas a la madre y se dejaron sobrevivir hasta 14, 21, 30, 45 y 60 d posteriores a la inyección. A estas edades, se tomaron medidas del peso de los animales para conocer la posible existencia de cambios en el crecimiento evidenciados por esta variable entre animales controles e inyectados.

Análisis del desempeño locomotor mediante Footprint

Para el estudio de la posible existencia de una deficiencia locomotora se empleó el test de footprint. Este test es utilizado para evaluar coordinación motora y balance de los animales. Esta elección fue debido a la eficacia que posee para observar defectos asociados a prueba de compuestos, lesión y envejecimiento, además de ser una técnica económica, fácil de configurar y llevar a cabo, permitiendo de esta manera que el operador influya lo menos posible sobre la conducta del animal (Carter y cols., 1999).

La prueba de footprint examina la marcha de un animal permitiendo evaluar anomalías locomotoras de los animales mediante el análisis de las huellas de las patas delanteras y

traseras. La toma de muestras se hace cubriendo de pintura no tóxica las extremidades

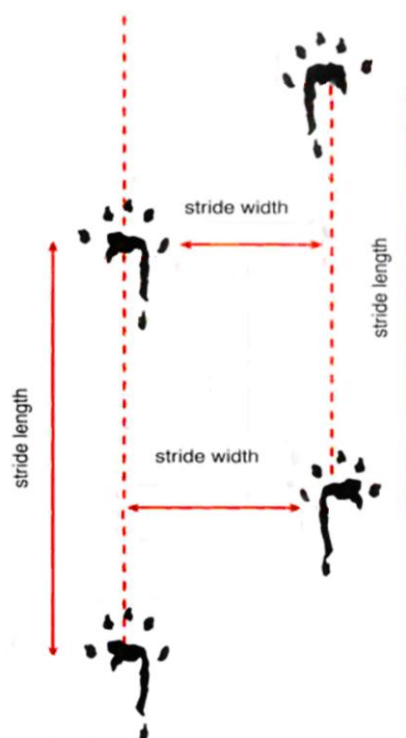


Figura 2: Esquema de las medidas tomadas para el análisis de footprint. Tomado y modificado de: "The Laboratory Rat", Academic Press, 2000

del animal (con pintura de un color para las patas delanteras y otro para las patas traseras). Los datos son utilizados cuando el animal es capaz de marchar a través de la pista en línea recta dando al menos 4 pisadas ininterrumpidas (Carter y cols., 1999; Pallier y cols., 2009). Las dimensiones utilizadas para la construcción de la pista fueron de 100 cm de longitud por 12 cm de ancho, con paredes altas de 40 cm aproximadamente. Se sometieron a este test animales controles e inyectados con GA de todas las edades mencionadas anteriormente. Previo a la realización del test, se le permitió al animal durante 5 minutos la exploración del ambiente para su reconocimiento (Pallier y cols., 2009). Luego se retiró a los animales del dispositivo y se les pintó la planta de las patas con pintura. Inmediatamente se colocó a los animales en un extremo de la pista, permitiendo que el animal marchara sobre el papel blanco que cubría la base de la pista. La marcha del animal a través del papel blanco deja una serie de huellas de diferente color (uno para las patas delanteras y otro para las patas traseras), similar a las observadas en la Figura 2. El papel fue luego removido y el patrón de huellas analizado. La longitud de los pasos y el ancho de las pisadas (distancia entre marcas izquierda y derecha) tanto para las patas delanteras como para las traseras fue analizado, y se graficaron las distancias medidas en función de la edad para animales control e inyectados con GA.

Perfusión de animales y análisis morfométrico

Previo a la perfusión intracardiaca, los animales fueron anestesiados intraperitonealmente. Una vez que el animal entró en plano anestésico, se procedió a colocarlo en posición decúbito supino sobre la mesa de perfusión, se realizó una incisión abdominal por debajo del reborde costal, se seccionó el diafragma y se cortaron las costillas retirando el peto esternocostal, exponiendo así el corazón. Se cortó la aurícula derecha para que fluyera la sangre y los líquidos perfundidos; en el ventrículo izquierdo se inyectó con bomba peristáltica solución de lavado primero (NaCl 0,9%; 0,4% citrato de sodio; 0,2% nitrito de sodio) y solución de fijación después (paraformaldehído 4% en buffer fosfato 0,1M pH=7,4). Luego de la fijación, se procedió a la disección del cerebro.

Brevemente: el cráneo fue expuesto y se realizaron dos cortes, uno transversal a nivel de las orbitas oculares y uno longitudinal por la línea media. Los huesos fueron levantados y las meninges retiradas evitando la estrangulación de los tejidos. Una vez disecado, se tomaron tres medidas del cerebro de cada animal perfundido: 1) la longitud del eje antero posterior del encéfalo (desde los bulbos olfatorios hasta el cerebelo), 2) el ancho máximo en la base del encéfalo y 3) el ancho del encéfalo en el primer tercio del eje antero posterior, a nivel del cuerpo estriado, tal como se ilustra en la Figura 3. Para realizar este análisis se utilizó como instrumento de medición un calibre de precisión (Cartabón). Una vez realizadas las mediciones, los cerebros se mantuvieron en solución de fijación (postfijación por inmersión) durante 24 h a 4°C, luego se cambiaron a PBS y se mantuvieron a 4°C hasta el sesionado y posterior análisis.

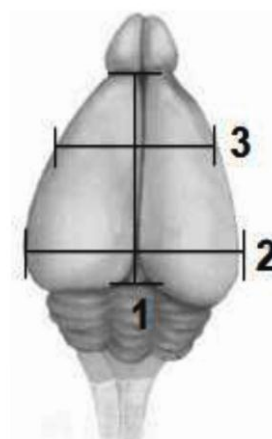


Figura 3: Esquema explicativo indicando las medidas tomadas de los cerebros de animales GA y

Obtención de sesiones de cerebro

Cada cerebro fijado y disecado fue sesionado en cortes transversales de 50 μm en vibrátomo (Leica VT1000) a nivel del cuerpo estriado. Para realizar los cortes, la base del cerebro se pegó a una base metálica que se posicionó horizontalmente. Los cortes se realizaron a velocidad y frecuencia medias. Las sesiones se recibieron en una cubeta llena con buffer fosfato de sodio (BPNa, 0,1M pH=7,4), y se almacenaron en PBS (0,01M; pH=7,4) a 4°C hasta su procesamiento para histología o inmunohistoquímica.

Visualización de mielina mediante Tinción de Sudán

Esta técnica permite la visualización de lípidos, incluyendo los fosfolípidos, las grasas neutras y los esteroides de la mielina en cortes de cerebro y médula. Se cree que el colorante, insoluble en agua, se distribuye preferencialmente en los lípidos y los colorea

en variados tonos de marrón o negro dependiendo de la concentración y el tiempo de exposición. Los cortes de vibrátomo fueron permeabilizados con Tritón-PBS 0.3 % durante 20 minutos a temperatura ambiente en agitación, luego fueron deshidratados durante 2 minutos en alcohol 70% y se incubaron con solución de SUDAN III a 45°C por 30min. Las sesiones fueron monitoreadas macroscópicamente hasta observar el grado de impregnación deseado, utilizando como referencia el cuerpo calloso. Una vez conseguida la tinción deseada, las sesiones se lavaron con alcohol 70° hasta diferenciar, luego con agua destilada y finalmente se montaron con glicerol 50%. Luego de montados los cortes, éstos fueron almacenados a 4°C hasta su observación por microscopía de luz transmitida en un microscopio invertido (Olympus IX-81), equipado con una cámara DP70 Olympus. Para cada edad, se midió el área total mielinizada en las fotografías de secciones equivalentes de estriado de animales controles e inyectados y se realizó el análisis de datos posteriormente.

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica combina técnicas anatómicas, inmunológicas y bioquímicas, permitiendo así localizar componentes tisulares y celulares definidos mediante el empleo de anticuerpos específicos. Esta técnica tiene sus orígenes en la década de los 40, cuando AH Coons y sus colegas publicaron un artículo describiendo la identificación de un antígeno en un tejido usando un protocolo de inmunofluorescencia directa (Coons y cols., 1941). La inmunohistoquímica permitió una caracterización molecular específica que ha contribuido a una comprensión más profunda de la diversidad celular. Debido a esto, la técnica ha ganado gran terreno en el campo de la investigación, permitiendo comprobar la existencia y la localización celular de proteínas (antígenos) en sesiones de tejidos mediante el uso de anticuerpos. La alta especificidad en el reconocimiento y la interacción antígeno-anticuerpo hace de esta práctica una herramienta poderosa y fiable para la detección de proteínas específicas. Los anticuerpos específicos pueden estar marcados para su detección (inmunotinción directa) o bien pueden ser reconocidos por anti-anticuerpos los cuales deben estar marcados con isótopos radioactivos, conjugados a enzimas o conjugados a un fluoróforo (inmunotinción

indirecta). Se puede realizar la detección simultánea de distintos anticuerpos que han sido conjugados a fluoróforos diferentes que emiten a longitudes de onda (colores) diferentes. Brevemente, la técnica empleada fue la siguiente:

Los cortes de vibrátomo mantenidos a 4°C en PBS, fueron lavados en PBS durante 5 minutos. Se permeabilizaron en PBS-Tritón 0,1% durante 15 minutos en agitación. Se bloqueó la unión inespecífica utilizando alta carga proteica (PBS-BSA 5%) durante 30 minutos en agitación. Luego, los cortes se incubaron en PBS-Tritón 0,1% a 4°C en cámara húmeda toda la noche con anticuerpo primario anti-MAG (1:250, Zymed) y con anti-S100β (marcador astrocitario inmaduro, 1:500, Sigma). Al día siguiente se lavaron los tejidos en PBS durante 10 minutos tres veces. Los cortes se incubaron con diluciones (1:500-1:1000) de los anti-anticuerpos correspondientes conjugados a fluoróforos distintos (cabra anti-ratón Alexa Fluor 488 y cabra anti-conejo Alexa Fluor 546, Invitrogen). Se volvió a lavar 3 veces por 5 minutos y se montó en glicerol 30% con 1 µg/ml DAPI (diaminofenilindol) para visualizar núcleos. Los cortes se visualizaron en un microscopio confocal Olympus FV300 y las imágenes de controles e inyectados con GA fueron obtenidos con la misma potencia de laser y con el mismo nivel de fotomultiplicador.

WESTERN BLOT

Obtención de muestras para Western blot

Los animales fueron sacrificados sin anestesia por decapitación. Una vez sacrificados, se procedió a extraer los ganglios basales y a colocarlos en tubos eppendorf conteniendo buffer de lisis para tejidos (4mM EDTA, inhibidores de proteasas: AEBSF 2mM, Aprotinin 0,3mM, Bestatin 130mM, EDTA 1mM, E-64 14mM, Leupeptin 1mM -, 100ml PBS 1X), donde se almacenaron a -20°C. Estas muestras fueron sonicadas en hielo y llevadas a la centrifuga a 12.000xg durante 10 minutos a 4°C. Se determinó la concentraciones de proteínas en el sobrenadante postmitocondrial según el protocolo de cuantificación siguiente.

Cuantificación de proteínas

El método del ácido bicinconínico (BCA) depende de la conversión de Cu^{2+} a Cu^+ bajo condiciones alcalinas. El Cu^+ es detectado al reaccionar con el BCA, desarrollando un color púrpura con una absorbancia máxima a 562 nm. Ya que la producción de Cu^+ en este ensayo es una función de la concentración de proteína y del tiempo de incubación, la cantidad de proteínas de muestras desconocidas puede ser determinada por espectrofotometría a través de la comparación con proteínas estándares de concentración conocida, en nuestro caso nuestra proteína estándar fue albumina sérica bovina (BSA). En una placa de 96 pocillos se colocaron distintas diluciones de BSA (0 a 2 mg/ml) para realizar una curva de calibración, un blanco (buffer de lisis) y las muestras a determinar, todas por duplicado. Sobre cada una de estas se adicionó solución BCA: sulfato cúprico (50:1), en una relación 8:1 respecto del volumen de muestra. Se dejó el multi-well en estufa a 37°C durante 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se realizó la lectura de la absorbancia en un lector de microplacas (Varioskan Multimode Flash Reader, Thermo Scientific). Una vez cuantificada la cantidad de proteína, a las muestras se les adicionó buffer de carga 5X (15% SDS, 0.3M Tris pH=6.8, 25% glicerol, 1.5M β -mercaptoetanol, 0.01% azul bromofenol) que contiene agentes para la desnaturalización y preservación de las proteínas. El volumen de buffer de carga que se adicionó fue el equivalente al volumen para que llegara a una concentración final 1X, y luego se las sometió a desnaturalización por calor (95°C) durante 5 minutos.

Western blot

Esta es una técnica utilizada rutinariamente en laboratorios de medicina y biología, que permite el estudio de la expresión de proteínas de una muestra biológica, permitiendo examinar la cantidad de proteínas en una muestra y comparar los niveles de proteínas entre varios grupos. Para esto las proteínas son previamente separadas por electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), basada en su tamaño. El gel es una matriz polimérica formada por puentes cruzados usada para

separar las moléculas. Una vez polimerizado el gel, las muestras son cargadas en los pocillos del gel, donde cada uno de estos representa un carril donde se corre una muestra. En la electroforesis se aplica una corriente eléctrica a través del gel para permitir que las proteínas migren a través de la matriz.

Para que las proteínas migren de acuerdo a su peso molecular, ellas deben ser primero desnaturizadas y cargadas negativamente, para lograr esto, las proteínas son expuestas al dodecil sulfato de sodio (SDS). La cantidad de SDS unida a la proteína es relativa al tamaño de la misma, y las proteínas tienen una carga similar entre ellas, en relación a la masa de la proteína. Una vez que se corren las muestras, estas van a quedar divididas en bandas separadas sobre la base de los tamaños de las proteínas.

Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida

Para la separación de proteínas por electroforesis se construyeron 2 minigeles de poliacrilamida 12%. Los geles están formados en realidad por dos geles de distinto grado de entrecruzamiento: gel *separador*, del cual se preparan 25 ml para 2 geles (8,3 ml H₂O miliQ; 10 ml acrilamida; 6,3 ml Tris 1,5M pH 8,8; 0,25 ml SDS 10%; 0,25 ml APS 10%; 0,01 ml TEMED) y gel *concentrador* (5,5 ml H₂O miliQ; 1,3 ml acrilamida; 1,0 ml Tris 1,0M pH 6,8; 0,08 ml SDS 10%; 0,08 ml APS 10%; 0,008 ml TEMED) del que se preparan 8 ml para 2 geles. La función del gel concentrador es concentrar las proteínas de la muestra y permitir que su entrada en el gel *separador* ocurra, para todas ellas, en el mismo momento. Esto dará como resultado que todas las proteínas se separen únicamente por sus diferencias de tamaño y no por el momento en el que entraron al gel separador, que es donde ocurrirá el tamiz molecular.

Los geles se colocaron en el soporte dentro de la cuba de electroforesis (BioRad) y se añadió buffer de corrida (3,03 g Tris; 14,42 g glicina; 1,0 g SDS; 1000ml H₂O_{dest}; pH= 8,4) para cerrar el circuito. Utilizando pipeta Hamilton, se sembró en un pocillo 5µl de marcador de peso molecular (Fermentas SM0441) con un rango aproximado de entre 20 y 120 KDa, en los restantes pocillos se cargó un volumen determinado para 30 µg de proteína total de las muestras a analizar, mientras que los pocillos que quedaron vacíos

se cargaron con igual volumen de buffer de carga 1X. La corrida electroforética se realizó a 50mA y se dejó el voltaje libre. El tiempo total de corrida fue de aproximadamente 3 horas y 30 minutos, momento en el cual se evidencia que el frente de corrida del gel alcanzó una distancia aproximada de 0,3 cm del borde inferior del minigel.

Transferencia

Para que las proteínas sean accesibles a la detección por anticuerpos, deben ser transferidas desde el gel de poliacrilamida hacia una membrana de nitrocelulosa o de PVDF (polyvinylidene fluoride). Ya que la membrana de PVDF es hidrofóbica y va a estar sumergida en una solución acuosa, es necesario sumergir la membrana en metanol 100% durante 2 minutos para que pueda aceptar adecuadamente las proteínas.

En la transferencia de proteínas se utiliza el mismo principio de la electroforesis, pero en este caso la corriente eléctrica es aplicada en paralelo a la posición del gel y así las proteínas migran fuera del gel, hacia la membrana. El "sándwich" para la transferencia se armó sumergido en buffer de transferencia (3,03 g Tris; 14,4 g glicina; 200ml MetOH; 800ml H₂O_{dest}) apilando los componentes del mismo en el siguiente orden (del polo negativo o cátodo al positivo o ánodo): esponja, 3 hojas de papel de filtro, gel, membrana, 3 hojas de papel de filtro y otra esponja. Las proteínas se desplazan hacia el polo positivo y quedan adheridas a la membrana. Las burbujas atrapadas en el "sándwich" se retiraron utilizando un rodillo, debido a que estas no permiten el pasaje de corriente eléctrica, impidiendo la transferencia en el lugar donde se alojen. El "sándwich" se coloca en el dispositivo de electrotransferencia vertical en la cuba de transferencia, sumergido en buffer de transferencia. Como este proceso lleva a un calentamiento de la solución, el dispositivo fue refrigerado recirculando el buffer con agitador magnético. La transferencia se llevó a cabo a 300mA y con voltaje libre. Bajo estas condiciones el proceso lleva 75 minutos. Una vez terminada la transferencia, se retira la membrana y se sumerge en rojo Ponceau (0,2% rojo Ponceau y 3% ácido tricloroacético en H₂O_{dest}) durante 5 minutos para visualizar y comprobar la transferencia de las proteínas desde el gel hacia la membrana. Este colorante tiñe de forma inespecífica todas las proteínas de la muestra, y puede ser retirado de la

membrana al lavarse con TBS-Tween 0,1%. Luego de este paso se procede con el bloqueo de la membrana y la incubación con los anticuerpos primarios.

Bloqueo de la membrana e incubación de anticuerpos

El bloqueo de la membrana es un paso importante en un Western Blot para reducir la unión inespecífica a su superficie de los anticuerpos que van a ser utilizados para la detección de la proteína de interés, evitando así falsos positivos. Esto se logra sumergiendo la membrana en una solución de leche descremada o en BSA (albúmina de suero bovino) 5% en TBS-Tween 0,1% dependiendo del anticuerpo que se utilice. El bloqueo se llevó a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación suave. Una vez transcurrido este tiempo se incubó la membrana con anticuerpos monoclonales de conejo anti-MAG (1:2000, Zymed), anti-CNPasa (1:1000, Millipore) y de ratón anti- α -actina (1:4.000, Sigma) en agitación a 4°C toda la noche.

Luego de la incubación con los anticuerpos específicos, se procedió a lavar las membranas con TBS-Tween 0,1% (3 x 10 minutos). Una vez concluida la etapa de lavados se incubó durante 1 hora con los respectivos anti-anticuerpos: anti-IgG conejo-HRP (1:4.000, Millipore) y anti-IgG ratón-HRP (1:4.000, Millipore), también incubados en leche descremada 5%. Una vez concluido el tiempo de incubación se repitieron los lavados (3 x 10 minutos) con TBS-Tween 0,1% y se procedió al revelado.

Revelado

Para el revelado de las proteínas presentes en la membrana, se empleó el sistema ECL (Pierce ECL 32106, Thermo Scientific) debido a su alta sensibilidad y fácil manipulación, además este sistema posee la capacidad de generar un excelente contraste entre las señales generadas. Para el revelado se utilizaron anti-anticuerpos conjugados a la enzima HRP (peroxidasa de rábano). La reacción quimio luminiscente ocurre cuando la energía de una reacción química se emite en forma de luz. Se emplea la peroxidasa de

rábano para catalizar la oxidación del luminol (reactivo ECL de detección 2) en presencia de H_2O_2 (reactivo ECL de detección 1). Después de la oxidación, el luminol se encuentra en estado excitado, y pasa a una situación basal, emitiendo luz. Al producirse la reacción sobre una membrana en contacto con una película autorradiográfica o film sensible, se obtiene una impresión debido a que la luz emitida impresiona los granos de plata del film.

La membrana se incubó en cuarto oscuro con ambas soluciones del ECL durante 2 minutos y se envolvió con papel film. Se puso en contacto con una placa autorradiográfica (AGFA) dentro de un cassette durante 10 minutos y se reveló con revelador y fijador comerciales.

Análisis de datos

Se realizaron al menos 3 experimentos separados con 3-5 animales por cada condición y se analizaron 3 cortes de c/u de los animales sacrificados a cada una de las edades mencionadas anteriormente. Se realizaron comparaciones entre animales controles y sus hermanos inyectados con GA.

Se empleó la prueba de Shapiro & Wilks para comprobar una distribución normal de los datos obtenidos experimentalmente. Se aplicó la prueba t-Student para contrastar hipótesis sobre medias. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0.10$.

RESULTADOS

Acción del GA sobre el peso corporal de los animales

El seguimiento del peso de los animales permitió constatar que el desarrollo general de los animales inyectados con GA no fue afectado significativamente. Sin embargo, se observó una diferencia de peso corporal de los animales tratados con GA frente a los tratados con PBS que comienza a ser estadísticamente significativa a los 60 días después de inyectados (figura 4).

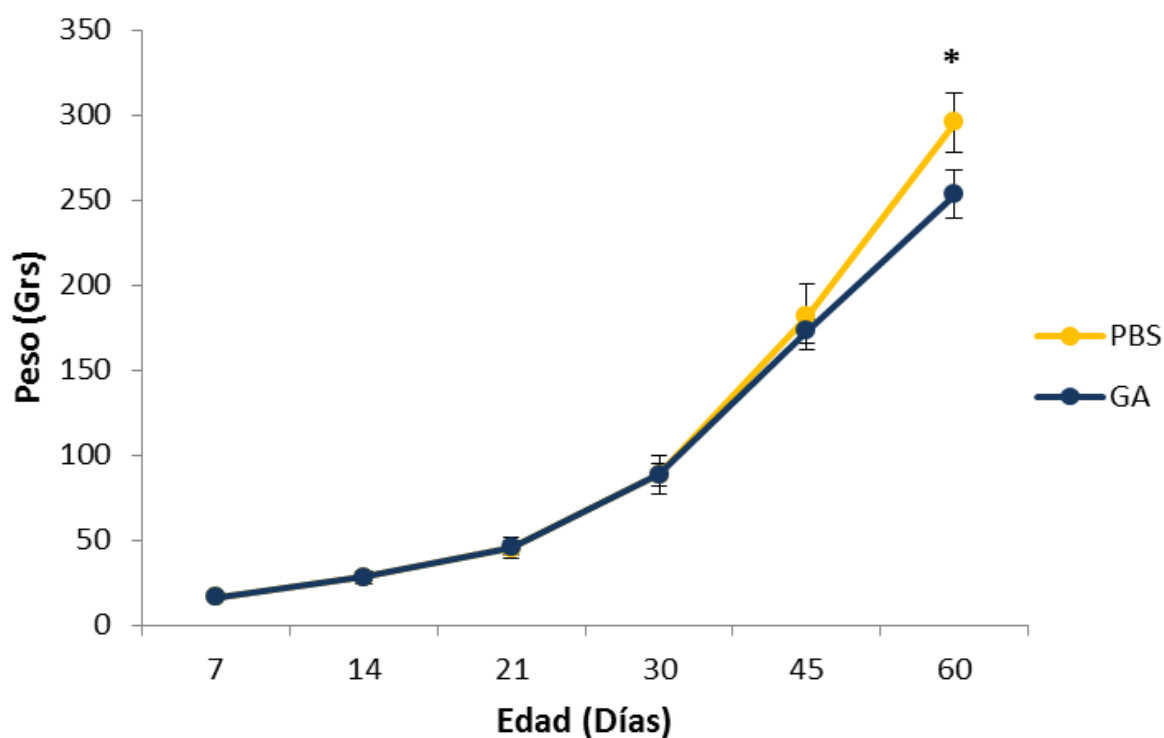


Figura 4: Evolución del peso de los animales inyectados con GA y controles. Mediciones del peso de los animales a los 7, 14, 21, 30, 45 y 60 días después de la inyección intracerebral de GA (línea azul) o PBS (línea amarilla). Las diferencias comienzan a notarse pasando los 30-45 días pero solo se vuelven significativas (* $p < 0,05$) a los 60 días. Se analizaron 9-12 animales por cada situación.

Efectos del GA sobre la locomoción

El test de footprint se realizó en ambos grupos de animales a las edades descritas previamente utilizando igual número de controles e inyectados con GA (14 días n=5, 21 días n=4, 30 días n=3, 45 días n=4, 60 días n=3). Cada animal realizó el test completo y luego de éste se sacrificó uno perteneciente al grupo GA y otro perteneciente al grupo Control para realizar los estudios siguientes. Este test reveló anomalías en la marcha locomotora de animales inyectados con GA en comparación con el grupo control, las cuales fueron significativamente estadísticas a partir de los 45 días de vida. En el primer grupo se observó que tanto en miembros anteriores como posteriores, la separación entre los miembros aumenta significativamente a partir de 45 días, siendo esa diferencia aún mayor a los 60 días de vida, como se puede observar en la figura 5A y 5B.

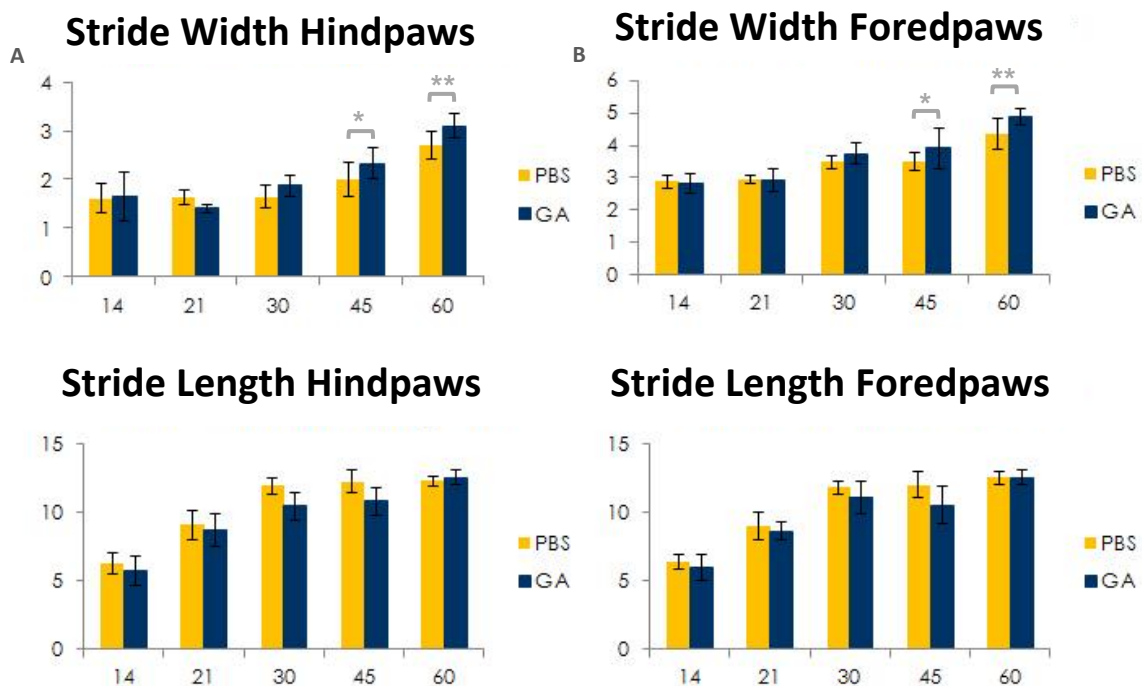


Figura 5: Análisis de footprint de los animales inyectados con GA y controles. Se observan las distancias correspondientes entre ambos miembros anteriores (A) y posteriores (B), y la longitud de las pisadas de las extremidades anteriores (C) y de las extremidades posteriores (D). Las diferencias significativas están indicadas (* p<0,10; ** p<0,05).

Del análisis comparativo en la longitud de las pisadas entre ambos grupos se desprende que a pesar de existir una tendencia que indica diferencias en la longitud de los pasos en los primeros estadios de vida analizados, siendo esta mayor en el grupo control, estas no son estadísticamente significativas (Figura 5 C y D). La longitud de las pisadas en ambos grupos se hacen equivalentes a edades más avanzadas.

Análisis de los cerebros por Morfometría

La medida de la longitud del eje antero posterior del encéfalo (1), del ancho máximo de la base del encéfalo (2) y el ancho del encéfalo a nivel del cuerpo estriado (3) muestra que en el cerebro de animales controles e inyectados con GA no existen diferencias significativas en ninguna de las medidas mencionadas

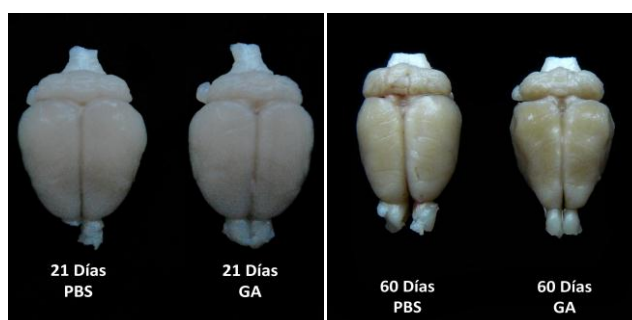


Figura 6: Diferencias morfométricas a nivel macroscópico. Cerebros de animales de (A) 21 y (B) 60 días post-nacimiento. Observe las diferencias en el ancho del encéfalo a nivel del cuerpo estriado intra-grupo e inter-grupo.

en las primeras edades analizadas (14, 21 y 30 días). Sin embargo, aunque a los 60 días no hay diferencias significativas en las medidas 1 y 2, el ancho del cerebro a nivel del estriado (medida indicada como 3) es menor en los animales inyectados con GA en relación a sus respectivos controles. En la Figura 6 se muestra un ejemplo, donde los cerebros de 21 días no presentan diferencias entre ellos, mientras que a 60 se observa una disminución evidente a nivel del estriado. A 45 días, al igual que a 60 días, se observa una diferencia apreciable macroscópicamente a nivel de los ganglios basales. Sin embargo, el grado de significación estadística es menor ($p < 0,10$) que el obtenido a los 60 días ($p < 0,05$) (figura 7).

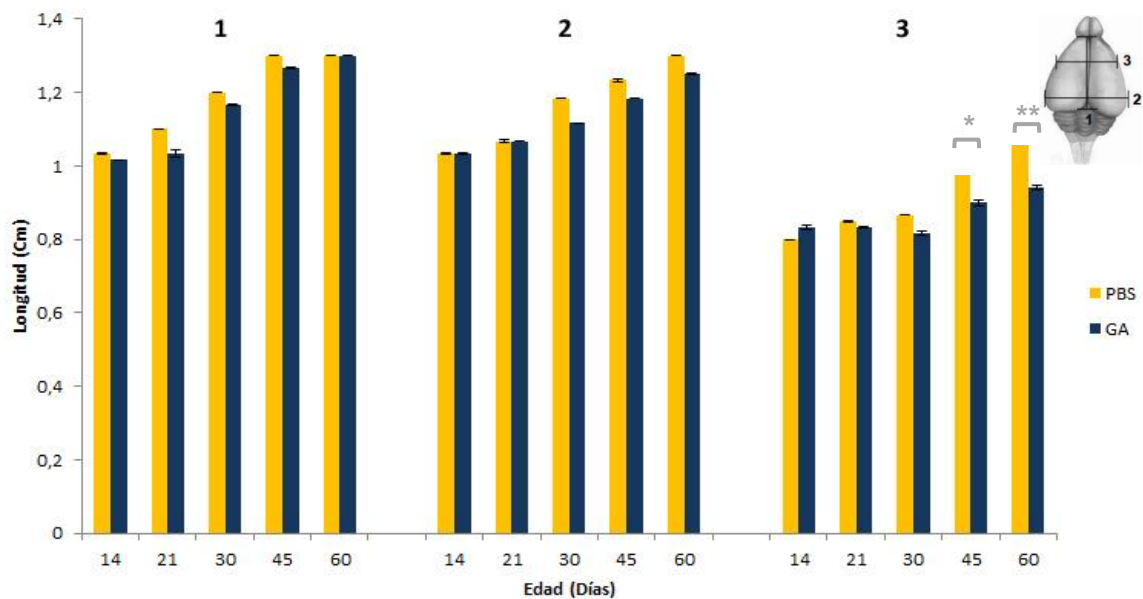
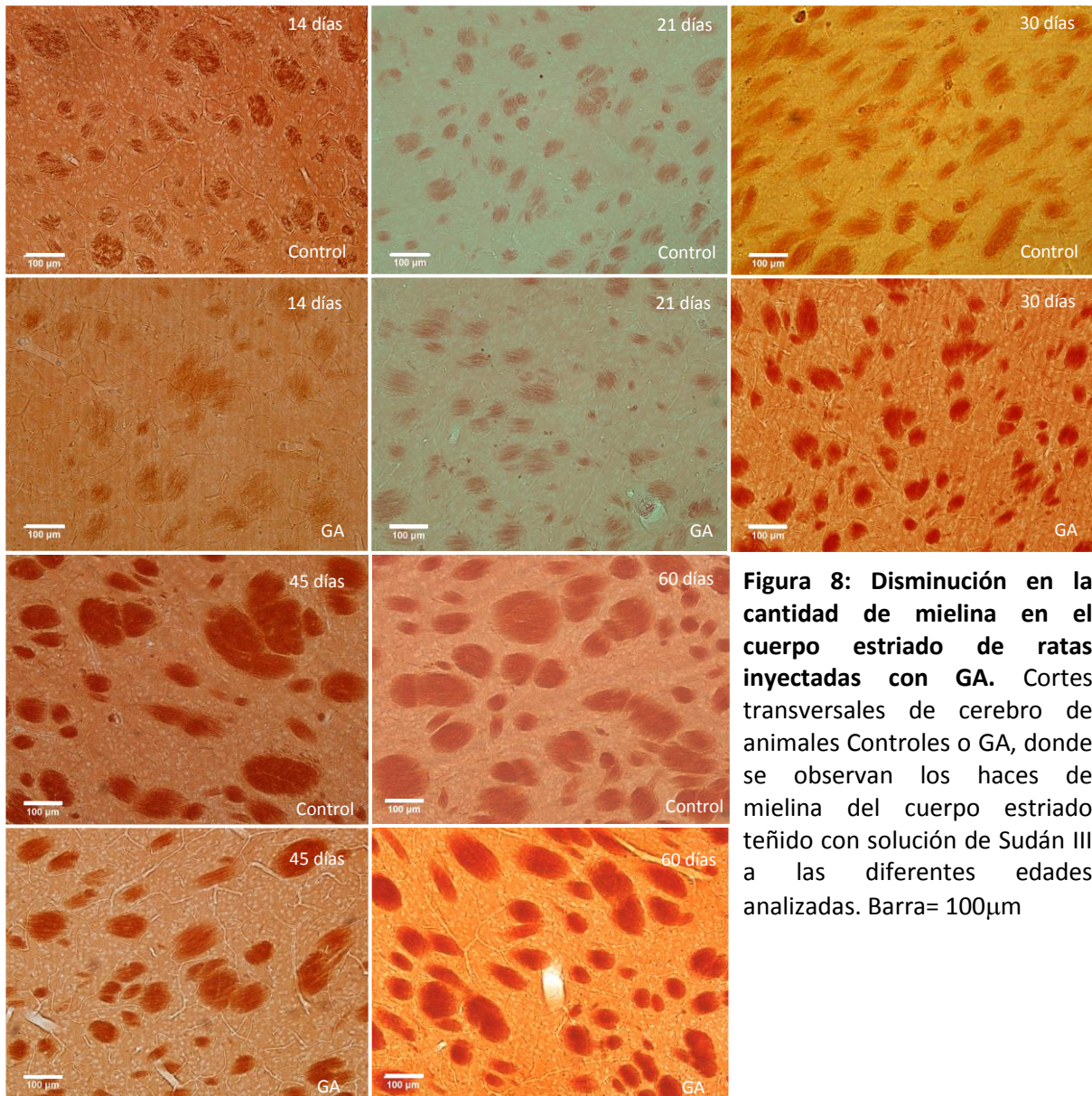


Figura 7: Análisis morfométrico de los cerebros obtenidos de animales Controles y GA. A las diferentes edades se observa como las medidas indicadas como 1 y 2 no varían significativamente, mientras que a 45 y 60 días se observan diferencias significativas de la medida 3. Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas (* $p < 0,10$; ** $p < 0,05$). Se utilizó un $N = 3$ para cada edad analizada.

Efectos del GA sobre la mielinización del cuerpo estriado

En las sesiones de cerebro teñidas con Sudán III se observó una aparente diferencia en la mielinización del cuerpo estriado de animales tratados con GA respecto a PBS. Macroscópicamente, a los 14 y 21 días, en los animales inyectados con GA, la tinción parece ser más débil que en los controles procesados simultáneamente. A los 30, 45 y 60 días, comienza a evidenciarse en los animales inyectados una tinción más compacta y una fragmentación de los haces (Figura 8). Estos aparecen más pequeños y con mayor intensidad que los controles, cuando fueron expuestos a las mismas concentraciones y tiempos

La histoquímica sugiere una fragmentación de los haces en los animales inyectados que podría traducirse en una reducción del área total mielinizada del cuerpo estriado. Esta diferencia aparece desde edades tempranas siendo mayor en animales adultos (figura 8).



Una vez obtenidas las imágenes de sudán, estas fueron analizadas utilizando el software Image J para cuantificar el área mielinizada del cuerpo estriado. A partir de los datos obtenidos, se pudo comprobar que en animales tratados con GA existe una reducción del área mielinizada estriatal frente a sus respectivos controles, y una tendencia de poseer un menor calibre y mayor desorganización de los haces de mielina. Se observa que la diferencia en la mielinización es estadísticamente significativa a partir de los 45 días de edad (figura 9). El diagrama de cajas evidencia que a todas las edades, la mediana de animales inyectados con GA es menor que la de los controles, sugiriendo

que la mielinización de animales podría verse afectada por GA desde edades tempranas, aunque la media sea significativa a partir de los 45 días.

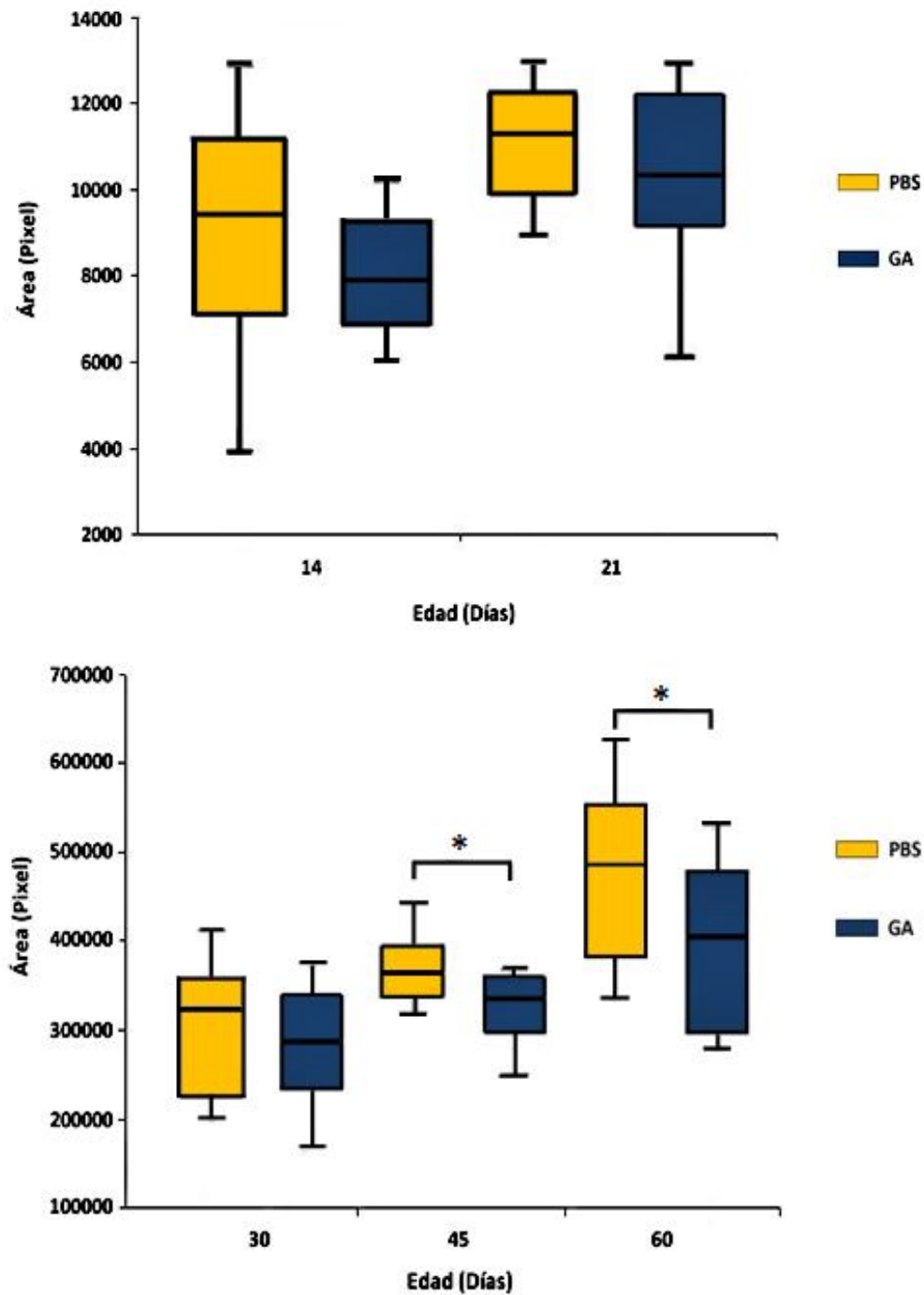


Figura 9: Cuantificación del área mielinizada en el cuerpo estriado. (A) Se observa la cuantificación del área mielinizada para animales de 14 y 21 días y (B) para 30, 45 y 60 días (B). Se observa que a partir de los 45 días de edad hay diferencia en el área mielinizada (* $p < 0,05$).

Inmunolocalización de proteínas mielínicas y astrocitarias

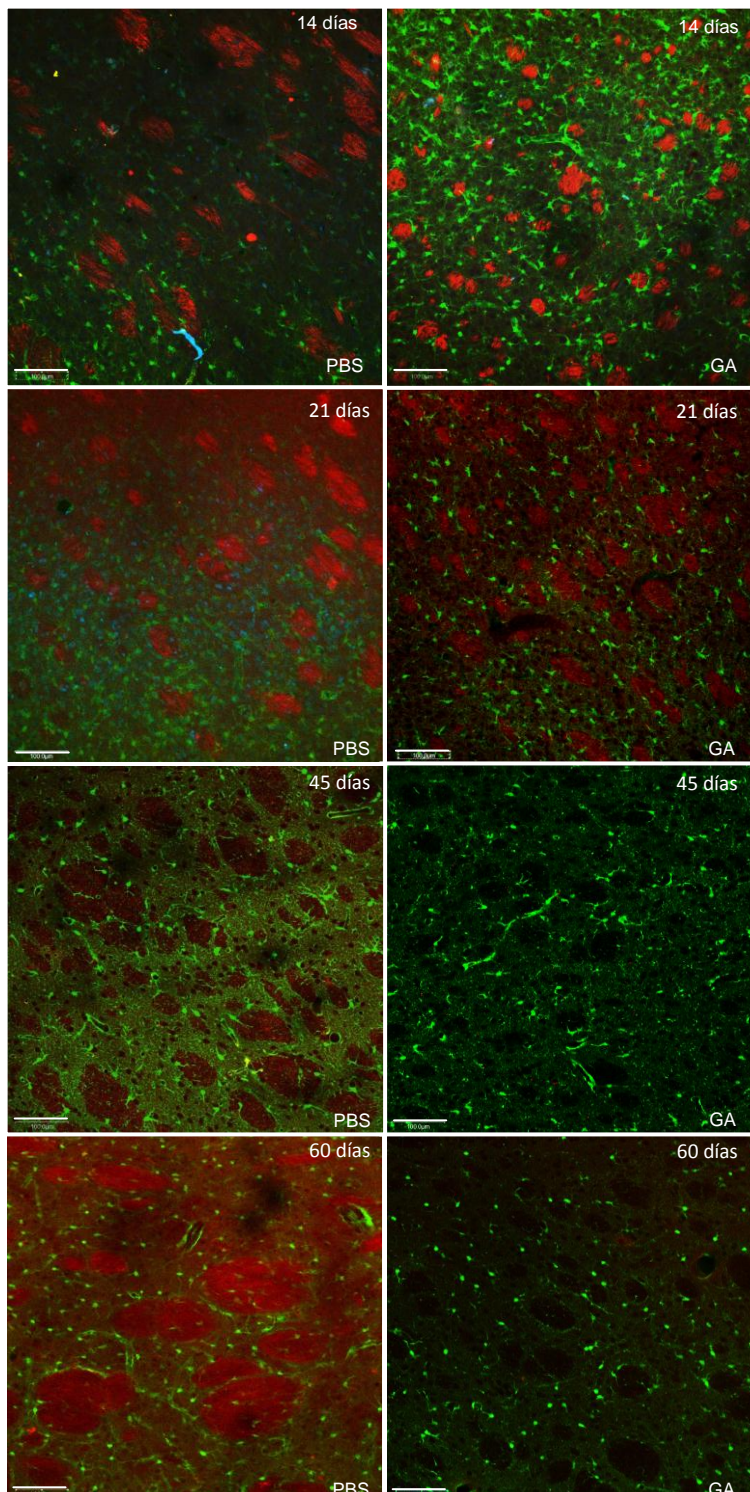


Figura 10: Reactividad astrocitaria en el cuerpo estriado. Cuerpo estriado de animales de 14, 21, 45 y 69 días de vida GA y Control, inmunomarcados contra MAG (rojo) y S100 β (verde). Barra= 100 μ m

Como los datos histoquímicos indicaban alteración en la mielina y esta está constituida por una fracción proteica importante, analizamos mediante inmunohistoquímica la expresión de MAG, ya que su ausencia o disminución se relaciona con menor calibre del axón tal como observamos anteriormente. Como la inmunofluorescencia permite además el marcado múltiple, realizamos simultáneamente la inmunotinción contra S100 β , el marcador astrocitario inmaduro que había aumentado en el modelo empleado en el laboratorio.

En la figura 10 se observa el cuerpo estriado de animales inyectados con GA o PBS, inmunomarcados para MAG (rojo) y S100 β

(verde). Se evidencia una fuerte marcación de S100 β a los 14 días, coincidente con los reportes previos donde se describe una astrocitosis inmadura luego de la inyección de GA que persiste al menos dos semanas y luego desaparece.

La inmunomarcación de MAG en los cortes fue específica para los haces mielinizados, en cada una de las edades analizadas, se observa la presencia de esta proteína en animales del grupo PBS mostrando una disposición típica. Luego de los 14 días, los animales del grupo GA muestran una desaparición progresiva de la marca para MAG, mostrando a los 45 días de vida una muy baja presencia de MAG en los haces mielinizados, mientras que a 60 días no pudo detectarse la presencia de esta proteína (Figura 10). Para saber si la desaparición de la inmunoreactividad de MAG en el estriado se correlacionaba con un menor nivel de expresión, se realizaron estudios de Western Blotting.

Evaluación de la expresión de proteínas mielínicas en cuerpo estriado

El western blot es una técnica exclusivamente cuantitativa, por lo tanto mediante este abordaje se estudiaron los niveles de expresión de MAG y CNPasa en el cuerpo estriado.

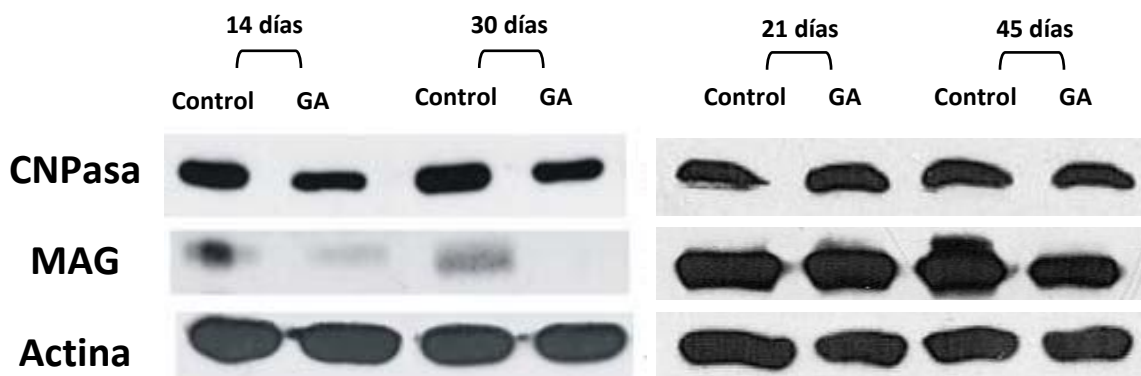


Figura 11: Cuantificación de la cantidad de proteínas mielínicas en cuerpo estriado. Western blot para proteínas de mielina (MAG y CNPasa) y actina como control de carga, de muestras de cuerpo estriado para animales GA y Control tomadas a las edades descritas.

El estudio preliminar de western blot permitió observar una reducción en la cantidad de algunas proteínas específicas de mielina (MAG y CNPasa) en animales inyectados con

GA en comparación con animales controles. La disminución de los niveles de éstas, son visibles a partir de los 14 días de vida (Figura 11).

Este resultado muestra un aparente aumento en la cantidad de proteínas MAG y CNPasa a los 21 días en animales inyectados con GA respecto a su control, observándose un resultado distinto al patrón observado en el resto de las edades analizadas. Además de observarse una mayor cantidad de MAG a los 21 que a los 30 días de vida.

Efectos del GA sobre la mielina del cuerpo calloso

Mediante histoquímica se pudo observar que no solamente está afectada la mielina de los cuerpo estriado, sino que también la mielina en el cuerpo calloso presenta un importante grado de desorden a los 60 días de vida en animales GA (figura 10). Sumado a esto se observan dilataciones entre las fibras de mielinas que parecen sugerir acumulaciones anormales como las reportadas por Xie y cols. (2010).

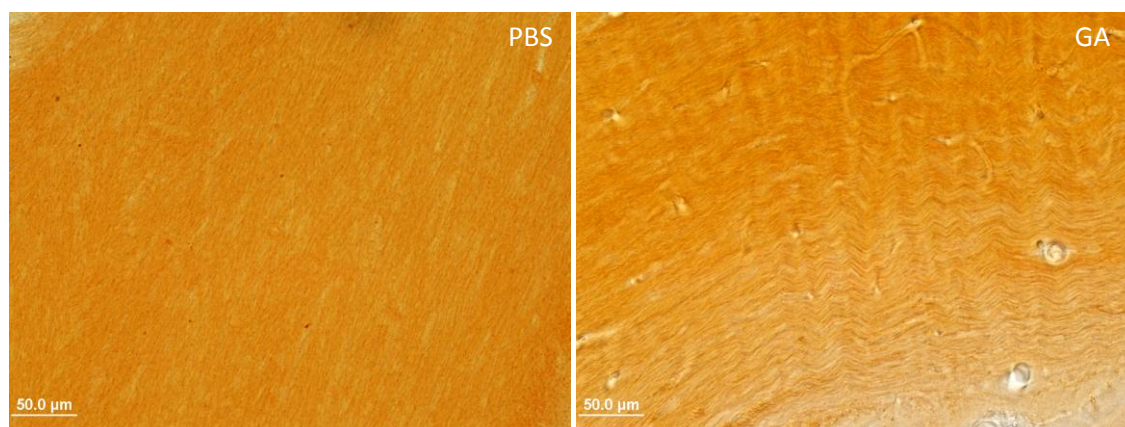


Figura 12: Histoquímica para Sudán III en el cuerpo calloso en animales de 60 días de vida. Se observa un patrón diferente de organización de la mielina en el cuerpo calloso a los 60 días de vida en animales GA.

Una vez observada la disposición de la mielina en el cuerpo calloso utilizando Sudán III, se decidió observar esta estructura mediante microscopía confocal utilizando DAPI para comprobar el ordenamiento en el cuerpo calloso. Como muestra la figura 13, el alineamiento de los núcleos con DAPI está claramente alterado a los 45 y 60 días post-

inyección en animales GA, perdiendo el alineamiento en fila característico de oligodendrocitos fasciculares. También se pudo observar que a 14 días hay un aumento importante en la reactividad para S100 β en el cuerpo calloso, la cual se pierde con el transcurso del tiempo.

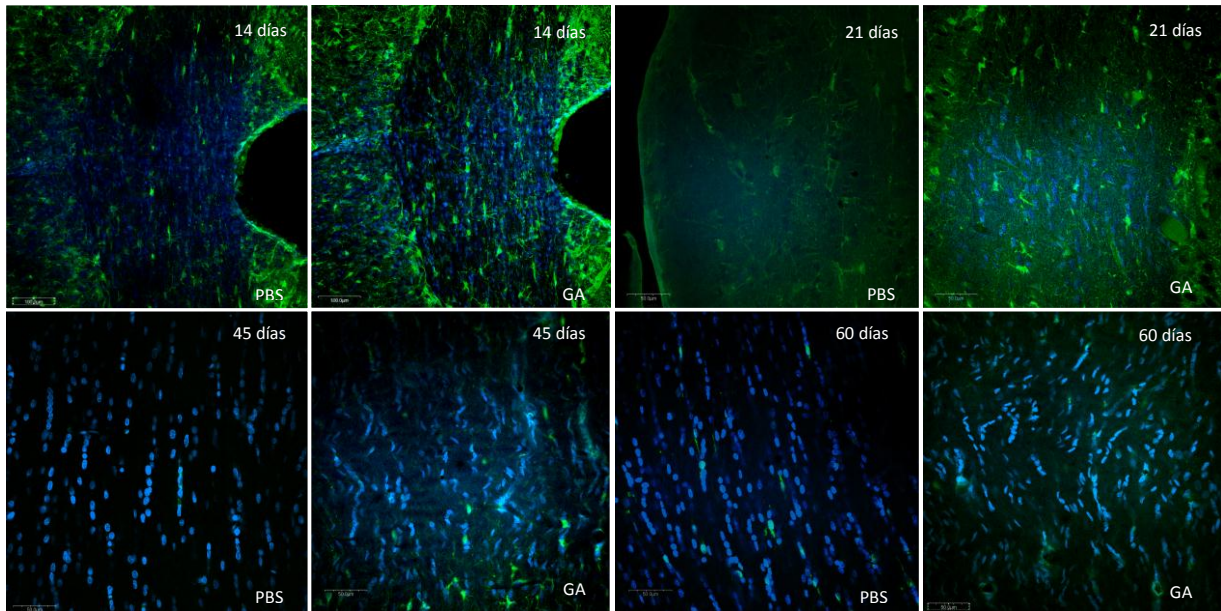


Figura 13: Organización celular en el cuerpo calloso de animales controles y GA. Inmunomarcación contra S100 β (verde) y DAPI (azul) para animales de 14, 21, 45 y 60 días de vida.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis permiten afirmar que:

-Una única administración perinatal de GA produce una disminución del peso corporal del animal a los 60 días de vida y una disminución de las dimensiones del cerebro a nivel del cuerpo estriado a partir de 45 días de vida.

-Los animales inyectados con GA presentaron características locomotoras diferentes a la de los controles. El grupo de animales GA mostró a edades tardías una separación mayor entre ambos miembros anteriores y ambos miembros posteriores.

-El área mielinizada en el cuerpo estriado es menor en animales tratados con GA respecto a sus controles a 45 y 60 días de vida.

-Mediante inmunohistoquímica se evidenció una disminución de la inmunoreactividad para MAG en el cuerpo estriado de los animales inyectados. A los 14 y 21 días se observó astrogliosis que progresivamente fue disminuyendo hasta valores normales.

-Los resultados preliminares de western blotting mostraron una tendencia en la reducción en los niveles de expresión de MAG y CNPasa. A los 21 días se observó que los resultados de los niveles de MAG y CNPasa fueron contrarios a los observados en las restantes edades analizadas y no concuerdan con los resultados de inmunohistoquímica contra MAG.

-Los animales de 45 y 60 días, presentan alteraciones significativas en el cuerpo calloso, evidenciados por alteraciones en el patrón de la mielina y en la marcación con DAPI.

DISCUSIÓN

El estudio clásico de las enfermedades neurodegenerativas se ha focalizado principalmente en utilizar los recursos existentes en estudiar a la neurona. Debido a su relación con las neuronas, las células gliales podrían condicionar el comienzo y/o progresión de la enfermedad. Debido a la El presente trabajo por lo tanto pretendió estudiar la neuropatología GA-I enfocada en las células gliales, ya que esta enfermedad neurodegenerativa tiene la particularidad que los metabolitos acumulados en la misma no son neurotóxicos en grado suficiente para matar neuronas directamente y por lo tanto estas células no son su primer blanco (Olivera y cols., 2011).

El correlato edad-peso que se realizó en este trabajo se adapta a lo descrito en animales KO para la enzima GCDH a edades tempranas, en los cuales no se encontraron diferencias en el peso o en el crecimiento de estos animales respecto a animales wild-type y $GCDH^{+/+}$ (Koeller y cols., 2002). En nuestro modelo, los animales de 60 días presentan una disminución significativa del peso corporal. Esta diferencia podría deberse a la diferencia entre los modelos. Mientras el modelo KO fundamentalmente presenta niveles de GA crónicamente elevados, el realizado en el laboratorio implica una única exposición muy alta a este ácido. Los resultados obtenidos se adaptan a lo descrito previamente en humanos afectados con GA-I, en los cuales se presenta una disminución del peso corporal drástica en los pacientes que sufren crisis y paulatina en los pacientes que no la sufren (Goodman y cols., 1975, Funk y cols. 2005). Estos datos deberían ser analizados a mayor profundidad en futuras investigaciones, ya que los animales inyectados con GA pueden presentar un mayor grado de actividad locomotor (lo cual no ha sido investigado en este trabajo) respecto del grupo control, conduciendo a que estos animales no sean capaces de ganar peso fácilmente.

Respecto al desempeño locomotor analizado mediante footprint, éste resultó ser un método simple y efectivo para caracterizar la marcha locomotora primaria. Debido a la importancia del cuerpo estriado en la regulación de los movimientos, el propósito de este ensayo era analizar si la afectación del estriado que había sido reportada

previamente en las ratas inyectadas con GA podría alterar el patrón locomotor de estos animales. Las alteraciones en la locomoción de los animales inyectados con GA se presentó como una mayor distancia entre ambas extremidades posteriores y anteriores, respecto a sus hermanos controles. Esta diferencia puede interpretarse como una solución que encuentran estos animales frente a un problema de estabilidad en la locomoción. Al aumentar la distancia entre las extremidades, logran obtener una mayor base para sustentar el peso del cuerpo y poder caminar sin perder el equilibrio durante la marcha. Las alteraciones que detectamos podrían reproducir al menos en parte los problemas locomotores (disonía, ataxia) que se presentan como una de las características de esta patología (Prats Viñas, 2001; Barreiro y cols., 2004; Freudenberg y cols., 2004; Funk y cols., 2005; Gordon y cols., 2006; Cerisola y cols., 2009). El acortamiento en la longitud de las pisadas así como una mayor separación entre los miembros son resultado de una estrategia para compensar la inestabilidad postural (Pallier y cols., 2009).

Continuando con el estudio de los efectos de GA, los resultados obtenidos del análisis morfométrico del cerebro mostraron que si bien a 60 días no hay diferencias significativas de las medidas 1 y 2 (longitud y ancho de la base del encéfalo), hay una diferencia significativa a nivel del cuerpo estriado. Se observa una disminución del ancho del cerebro a este nivel en los animales inyectados con GA en relación a sus respectivos controles, sugiriendo la posibilidad de una lesión o un retraso en el desarrollo a nivel del cuerpo estriado, que podría evidenciar en nuestro modelo la vulnerabilidad que estas estructuras presentan en la enfermedad (Soffer y cols., 1991). A partir de este análisis, los estudios realizados se focalizaron en el cuerpo estriado. Este resultado junto con el obtenido para el correlato edad-peso y el de footprint sugieren que GA puede estar mediando una acción leve que tal vez se evidencia con el transcurso del tiempo.

Por otra parte, los problemas locomotores en animales inyectados con GA podrían ser efecto de los problemas observados en la mielinización o a la afectación de neuronas del cuerpo estriado con el transcurso de la edad. En cuanto a la vulnerabilidad de la mielinización, existen numerosos reportes que muestran que un daño perinatal afecta la diferenciación y maduración de oligodendrocitos, repercutiendo posteriormente en la

mielinización (Pons-Vázquez y cols., 2011). Por otra parte, como el cuerpo estriado se comunica directamente con los ganglios basales y estos con la corteza motora, modulando los movimientos voluntarios, la astrogliosis temprana por un lado y la neurodegeneración retardada por otro, observada en nuestro modelo (Olivera y cols. 2008, 2011) podrían estar repercutiendo negativamente sobre las señales que las neuronas estriatales envían a las neuronas de los ganglios basales, influyendo sobre el control que estas tienen sobre las neuronas motoras de la corteza afectando la locomoción de estos animales. Además, la sintomatología locomotora observada en los animales inyectados con GA, podría deberse a la alteración de otras estructuras cerebrales importantes que podrían ser afectadas posteriormente al estriado.

La tinción de Sudán resultó ser un abordaje sencillo para observar el daño ocasionado por el GA sobre la mielina. Por medio de esta tinción se observó que los haces de mielina en el cuerpo estriado de animales tratados con GA parecen ser de menor calibre y parecen tener una mayor desorganización frente al grupo control y que el área total mielinizada en esta estructura es menor. Esta técnica que permite visualizar mielina por una reacción inespecífica de mayor afinidad a lípidos solo permite observar alteraciones macroscópicas de la mielina como un todo. Sin embargo, como la mielina está constituida por un porcentaje significativo de proteínas y las alteraciones proteicas se describen en numerosas enfermedades desmielinizantes (Edgar & Nave, 2009, Bradl & Lassmann, 2010), procedimos a analizar mediante inmunohistoquímica y western blot la localización y expresión de MAG y de CNPasa. Aunque son proteínas minoritarias, alteraciones en la expresión de MAG se asocian a menor calibre de axones (lo que podría explicar la disminución del tamaño de los haces) y CNPasa es una de las proteínas que presenta alteraciones más tempranas frente a daño en la mielina (Bradl & Lassmann, 2010).

En los animales controles, MAG se expresó en los haces y mostro una inmunoreactividad similar a la reportada en la literatura. En los animales inyectados, la inmunoreactividad para MAG fue decreciendo hasta ser prácticamente indetectable a partir de los 45 días de vida. Resultados obtenidos en el laboratorio y no presentados en este trabajo muestran que en animales GA esta proteína se encuentra preferentemente

localizada en los somas celulares, lo que da cuenta de una posible disfunción del tráfico intracelular de esta proteína hacia las vainas de mielina.

Los resultados de WB sugieren que hay una disminución de las proteínas mielínicas (MAG y CNPasa) en animales GA respecto de sus controles, excepto a los 21 días de vida. Seguramente esto se deba a un error en el rótulo de las muestras debido a que en animales de 14, 30 y 45 días de vida parece haber una disminución en la cantidad de estas proteínas en animales GA, lo cual es apoyado por inmunohistoquímica (en el caso de MAG). En favor del argumento de un error en las muestras de 21 días, los resultados de inmunofluorescencia avalan una pérdida de expresión de MAG a esta edad. De todos modos, dada las diferencias entre los anticuerpos y las diferencias evidentes entre los geles presentados, se están preparando nuevas muestras para realizar corridas con todas las condiciones de una sola vez. Hasta no tener dichos resultados, se cree que es mejor no profundizar en estos resultados.

Sin embargo, la importancia de la MAG refuerza la necesidad de determinar los niveles de esta proteína mediante western blot. Además de ser una proteína estructural de la mielina, el dominio intracelular de MAG se encuentra en contacto con los microtúbulos (Kursula y cols., 2001, Klein y cols., 2002) y Fyn (Umemori y cols, 1994, 1999), un miembro perteneciente a la familia quinasa Src, involucrado en la mielinización del SNC (Sperber y cols., 2001). Una señal intracelular disparada por MAG provoca un aumento en la fosforilación de Fyn, que conduce a una alta expresión de MBP (Umemori y cols, 1999). Debido a que la expresión de MAG o aún más posible, su transporte o su translocación hacia la vaina de mielina se encuentra afectada, la falta de activación de Fyn vía MAG no permite la mielinización en el momento indicado, traduciéndose en una dismielinización o hipomielinización. Recientemente se ha descrito que MAG desempeña otro papel importante en su relación con la neurona, adjudicándosele un rol protector para neuronas sometidas a insultos (Nguyen y cols. 2009). Por lo tanto, una reducción de MAG podría ser uno de los mecanismos involucrados en la degeneración neuronal en la GA-I.

Por otra parte, la co-inmunomarcación de MAG y anti-S100 β de las sesiones de cerebro mostró, en las primeras edades analizadas, la presencia de una reacción astrocitaria importante tanto en cuerpo calloso como en cuerpo estriado. S100 β es considerado un marcador de astrocitos inmaduros y como se observa a 14 días, es la primera reacción más significativa que ha sido determinada, que desencadena la inyección de GA. Estos resultados son coherentes con los reportados previamente por el grupo. Además, la secreción de S100 β por astrocitos y oligodendrocitos puede ser sobre-regulada bajo condiciones patológicas (Steiner y cols., 2011), a tal punto que en una injuria cerebral aguda se estudia actualmente los niveles de S100 β como marcadores de daño (Brozzi y cols., 2009). Por lo tanto concentraciones elevadas de S100 β son consideradas como marcadores gliales asociados a astrocitos u oligodendrocitos comprometidos en su viabilidad, gracias a su capacidad para activar células como la microglia, pertenecientes al sistema de inmunidad innata (Steiner y cols., 2011) y de amplificar las cascadas astrocitarias a través de una señalización autocrina (Brozzi y cols., 2009).

Como nuestros resultados mostraban que los animales inyectados con GA tenían un desarrollo y un desempeño aparentemente normal hasta los 45 días aproximadamente, sugiriendo un proceso acumulativo, analizamos si a estas edades o posteriores otras estructuras cerebrales estaban afectadas. El daño que presenta la mielina no se restringe únicamente al cuerpo estriado, también se extiende al cuerpo calloso a partir de los 45 días de edad. Esta estructura parece haber perdido su patrón normal de fibras paralelas empaquetadas estrechamente, observándose una alteración en la disposición y organización de la mielina, lo cual ha sido reportado como una infiltración de metabolitos, alteraciones en el proceso secretorio de los oligos o también células inmunes dentro del cuerpo calloso (Xie y cols., 2010). La aparición de signos macroscópicos de alteración en el cuerpo calloso coinciden temporalmente con las anomalías en la marcha y en el peso de los animales inyectados con GA. Estos datos pueden sugerir que las alteraciones ocasionadas por un problema en el cuerpo estriado pueden ser compensadas, pero al momento en el cual el cuerpo calloso se ve afectado, comienzan a visualizarse problemas funcionales sistémicos.

Del conjunto de los datos mostrados, podemos sugerir que nuestro modelo de GAI es capaz de reproducir algunas características propias de la enfermedad, como el daño bilateral del cuerpo estriado y problemas de mielinización y locomotores similares a los pacientes. Como fue discutido anteriormente, este modelo también es capaz de afectar el desarrollo de los animales, característica presente en pacientes de GAI y ausentes en los animales del modelo *knock out* (Koeller y cols., 2002, Funk y cols., 2005). Como ya fue comentado, el modelo KO no experimenta muerte neuronal en presencia de niveles crónicamente altos de GA a menos que los animales sean alimentados con una dieta rica en lisina (Zinnanti y cols., 2006).

En concreto, nosotros decidimos buscar alternativas a los modelos existentes porque ninguno de ellos permite el estudio de las células gliales y el modelo KO, que sería un buen punto de partida, no está disponible comercialmente. Como desventajas de nuestro modelo, destacamos la variabilidad en el proceso de inyección (manual) lo que ocasiona una variabilidad de respuestas significativa que obliga a manejar un número importante de animales para lograr significación estadística. Estamos trabajando para que el modelo empleado permita mayor reproducibilidad y una mayor fidelidad con respecto a las características patológicas observadas en humanos. Sin embargo, pese a sus limitaciones, permite un estudio sencillo de la participación y afectación de las células gliales en la patología en estudio. Por otra parte, creemos que es un modelo adecuado para el estudio de mecanismos subyacentes a las alteraciones de la mielina.

Para cada patología existen diferentes modelos para su estudio. Creo que es necesario que las ventajas y desventajas de cada modelo sean entendidas y consideradas previo al estudio de la una determinada patología con el fin de utilizar el modelo más apropiado para poder responder así a preguntas particulares. En particular, deseamos estudiar si las alteraciones reportadas en este trabajo son debidas a un retardo en la maduración de los oligodendrocitos ya que observaciones previas parecen indicar que no hay una reducción en el número de estas células.

Finalmente, en cuanto a la GAI, a pesar del esfuerzo en el diagnóstico y en el tratamiento con una dieta pobre en los aminoácidos mencionados, no hay tratamiento

curativo. Por lo tanto, es necesario avanzar en el conocimiento de la enfermedad y focalizar esfuerzos en el desarrollo de técnicas diagnósticas y terapéuticas.

Por otra parte, entender como es afectada la mielina en distintas condiciones de daño excede el campo de estudio de GAI y enfermedades neurodegenerativas, extendiéndose a todas las patologías con alteraciones en la mielina, donde el conocimiento del oligodendrocito y su relación con las demás poblaciones celulares del SNC podría conducir al desarrollo de nuevos diagnósticos o tratamientos.

PERSPECTIVAS

-Aumentar el número de animales para cada condición (se utilizaron 5 nacimientos, tal vez utilizar 10 para disminuir la incidencia de cada animal en el valor final) y disminuir las desviaciones estadísticas.

-Analizar los datos de peso y actividad locomotora ya que estos podrían estar relacionados conduciendo a que estos animales no sean capaces de ganar peso fácilmente.

-Realizar el análisis morfométrico más detalladamente empleando cortes seriados y un programa de reconstrucción 3D para cuantificar los daños e identificar las estructuras dañadas.

-Estandarizar las condiciones del western blot para obtener resultados comparables entre las distintas condiciones y corridas, complementando estos resultados con estudios de real time PCR.

-Estudiar los efectos de GA in vitro sobre poblaciones enriquecidas de oligodendrocitos y sus precursores para estudiar si tiene efectos sobre la diferenciación o la capacidad mielinizante.

-Perfeccionar el modelo y utilizarlo para conocer los mecanismos operantes en la disfunción de las células gliales y de otros tipos celulares involucrados.

BIBLIOGRAFÍA

Barbeito, L.H; Pehar, M; Cassina, P; Vargas, M.R; Peluffo, H; Viera, L; Estévez, A.G; Beckman, J.S., 2004. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Rev* 47: 263-274.

Barreiro, A., Rey, A., González, G., Lemes, A., Galiana, A., Peluffo, L., 2004. Aciduria glutárica tipo I. Descripción del primer caso clínico nacional. *Rev Med Uruguay* 20: 221-227.

Baslow, M.H., Guilfoyle D.N., 2009. Are astrocytes the missing link between lack of brain aspartoacylase activity and the spongiform leukodystrophy in Canavan disease? *Neurochem Res* 34(9):1523-34.

Baumann, N; Pham-Dinh, D, 2001. *Physiol Rev* 81: 871-927.

Biery, B.J., Stein, D.E., Morton, D.H., Goodman, S.I., 1996 Gene structure and mutations of glutaryl-coenzyme A dehydrogenase: impaired association of enzyme subunits that is due to an A421V substitution causes glutaric acidemia type I in the Amish. *Am J Hum Genet* 59(5):1006-11.

Biffiger, K., Bartsch, S., Montag, D., Aguzzi, A., Schachner, M., Bartsch, U., 2000. Severe Hypomyelination of the Murine CNS in the Absence of Myelin-Associated Glycoprotein and Fyn Tyrosine Kinase. *J Neurosci* 20(19): 7430-7437.

Bradl, M., Lassmann, H., 2010. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:37-53

Brozzi, F., Arcuri, C., Giambanco, I., Donato, R., 2009. S100 β Protein Regulates Astrocyte Shape and Migration via Interaction with Src Kinase: Implications for

Astrocyte Development, Activation, and Tumor Growth. *J Biol Chem.* 284(13):8797-8811.

Bugiani, M., Al Shahwan, S., Lamantea, E., Bizzi, A., Bakhsh, E., Moroni, I., Balestrini, M.R., Uziel, G., Zeviani, M., 2006. GJA12 mutations in children with recessive hypomyelinating leukoencephalopathy. *Neurol* 67(2):273-279.

Carter, R.J., Lione, L.A., Humby, T., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G.P., Dunnett, S.B., Morton, A.J., 1999. Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation, *J Neurosci* 19: 3248–3257.

Cerisola, A., Campistol, J., Pérez-Dueñas, B., Poo P., Pineda, M., García-Cazorla, A., Sanmartí, F.X., Ribes, A., Vilaseca, M.A., 2009. Seizures Versus Dystonia in Encephalopathic Crisis of Glutaric Aciduria Type I. *Pediatr Neurol* 40: 426-431.

Chen, Y., Swanson, R., 2003. *J Cereb Blood Flow & Metab.* 23: 137-149.

Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N., 1941. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med* 47: 200-202.

Crawley J.N., What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. 2da edición. John Wiley & Sons Inc. 2007.

Demerens, C., Stankof, B., Logak, M., Anglade, P., Allinquant, B., Couraud, F., Zalc, B., Lubetzki, C., 1996. Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci*) 93: 9887-9892.

Du, Y; Dreyfus, C.F; 2002. Oligodendrocytes as Providers of Growth Factors. *J Neurosci Res* 68: 647-654.

Edgar, J.M., Nave, K-A., The role of CNS glia in preserving axon function. *Curr Opin Neurobiol* 19:1-7.

Freudenberg, F., Lukacs, Z., Ullrich, K., 2004. 3-Hydroxyglutaric acid fails to affect the viability of primary neuronal rat cells. *Neurobiol Dis* 16: 581–584.

Fu, Z., Wang, M., Paschke, R., Rao S., Frerman, F.E., Kim, J.P., 2004. Crystal Structures of Human Glutaryl-CoA Dehydrogenase with and without an Alternate Substrate: Structural Bases of Dehydrogenation and Decarboxylation. *Biochem* 43: 9674–9684.

Fujita, N., April, K., Dupree, J., Nakayasu, H., Bartsch, U., Schachner, M., Maeda, N., Suzuki, K., Suzuki, K., Popko, B., 1998. The Cytoplasmic Domain of the Large Myelin-Associated Glycoprotein Isoform Is Needed for Proper CNS But Not Peripheral Nervous System Myelination. *J Neurosci* 18(6):1970-1978.

Fulton, D., Paez, P.M., Campagnioni, A.T., 2009. The multiple roles of myelin protein genes during the development of the oligodendrocyte. *ASN Neuro* 2(1): 25-37.

Funk, C.B., Prasad, A.N., Frosk, P., Sauer, S., Kolker, S., Greenberg, C.R., Del Bigio, M.R., 2005. Neuropathological, biochemical and molecular findings in a glutaric academia type 1 cohort. *Brain* 128: 711–722.

Gerstner, B., Gratopp, A., Marcinkowski, M., Sifringer, M., Obladen, M., Bührer, C., 2005. Glutaric acid and its metabolites cause apoptosis in immature oligodendrocytes: a novel mechanism of white matter degeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 57(6):771-776.

Goodman, S.I., Markey, S.P., Moe, P.G., Miles, B.S., Teng, C.C., 1975. Glutaric aciduria: a “new” disorder of amino acid metabolism. *Biochem Med* 12: 12-21.

Gordon, N., 2006. Glutaric aciduria types I and II. *Brain & Dev* 28: 136–140.

Greenberg, C.R., Prasad A.N., Dilling, L.A., Thompson, J.R., Haworth, J.C., Martin, B., Wood-Steiman, P., Seargeant, L.E., Seifert, B., Booth, F.A., Prasad, C., 2002. Outcome of the first 3-years of a DNA-based neonatal screening program for glutaric acidemia type 1 in Manitoba and northwestern Ontario, Canada. *Mol Genet Metab* 75(1):70-8.

Ishibashi, T., Dakin, K.A., Stevens, B., Lee, P.R., Kozlov, S.V., Stewart, C.L., Fields, R.D., 2006. Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron* 49(6):823-832.

Jessen, K.R., 2004. Glial Cells. *The Int J of Bioch & Cell Biol* 36: 1861-67.

Kaiser GL, Wenger P, Rouiller D., 1998. Clinical, gross morphological and neurochemical follow-up in normal, hydrocephalic and hydrocephalic-shunted rats. *Eur J Pediatr Surg.* 8(5):258-61.

Keyser, B., Glatzel, M., Stellmer, F., Kortmann, B., Lukacs, Z., Kölker, S., Sauer, S.W., Muschol, N., Herdering, W., Thiem, J., Goodman, S.I., Koeller, D.M., Ullrich, K., Braulke, T., Mühlhausen, C., 2008. Transport and distribution of 3-hydroxyglutaric acid before and during induced encephalopathic crises in a mouse model of glutaric aciduria type. *Biochim et Biophys Acta* 1782: 385–390.

Klein, C., Krämer, E.A., Cardine, A.M., Schraven, B., Brandt, R., Trotter, J., 2002. Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of Fyn kinase with the cytoskeletal protein Tau. *J Neurosci* 22(3): 698-707.

Koeller, D.M., Woontner, M., Crnic, L.S., Kleinschmidt-DeMasters, B., Stephens, J., Hunt, E.L., Goodman, S.I., 2002. Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I. *Hum Mol Genet* 11: 347–357.

Koeller, D.M., Sauer, S., Wajner, M., de Mello, C.F., Goodman, S.I., Woontner, M., Mühlhausen, C., Okun, J.G., Kölker, S., 2004. Animal models for glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 27(6):813-818.

Kursula, P., Lehto, V.P., Heape, A.M., 2001. The small myelin-associated glycoprotein binds to tubulin and microtubules. *Mol. Brain. Res* 87:22-30

Kurul, S., Cakmakci, H., Dırık, E., 2004. Glutaric Aciduria Type 1: Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Findings. *Pediatric Neurol* 31: 228-231.

Lappe-Siefke, C., Goebbels, S. Gravel, M., Nicksch, E., Lee, J., Braun, P.E., Griffiths, I.R., Nave, K.A., 2003. Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Gen* 33:366-374.

Larocca, J.N. & Rodríguez A.G., 2002. Myelin Biogenesis: Vesicle Transport in Oligodendrocytes. *Neurochem Res* 27(11): 1313-1329.

Lee, J., Gravel, M., Zhang, R., Thibault, P., Braun, P.E., 2005. Process outgrowth in oligodendrocytes is mediated by CNP, a novel microtubule assembly myelin protein. *Cell* 170(4):661-673.

de Luis, E., Larrache, J., García-Eulate, R., García, J.N., Zubieta, J.L., 2007. Hallazgos neurorradiológicos de la Acidosis Glutárica tipo I. *Rev Med Univ Navarra* 51(3):9-12.

Maragakis, N., Rothstein, J., 2006. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2:679-689.

Mehta, N.R., Nguyen, T., Bullen Jr, J.W., Griffin, J.W. Schnaar, R.L., 2010. Myelin-associated glycoprotein (MAG) protects neurons from acute toxicity using a ganglioside-dependent mechanism. *ACS Chem Neurosci* 1(3):215-222.

Meyer-Franke, A., Shen, S., Barres, B.A., 1999. Astrocyte induce oligodendrocyte processes to align with and adhere to axons. *Mol Cell Neurosci* 14: 385-397.

Mühlhausen, C., Ott, N., Chalajour, F., Tilki, D., Freudenberg, F., Shahhossini, M., Thiem, J., Ullrich, K., Braulke, T., Ergün, S., 2006. Endothelial Effects of 3-Hydroxyglutaric Acid: Implications for Glutaric Aciduria Type I. *Pediatr Res* 59(2): 196-202.

Nguyen, T., Mehta, N.R., Conant, K., Kim, K.J., Jones, M., Calabresi, A., Melli, G., Hoke, A., Schnaar, R.L., Ming, G.L., Song, H., Keswani, S.C., Griffin, J.W., 2010. Axonal protective effects of myelin associated glycoprotein. *J Neurosci* 29(3): 630-637.

Olivera, S., Fernandez, A., Latini, A., Rosillo, J.C., Casanova, G., Wajner, M., Cassina, P., Barbeito, L., 2008. Astrocytic proliferation and mitochondrial dysfunction induced by accumulated glutaric acidemia I (GAI) metabolites: possible implications for GAI pathogenesis. *Neurobiol Dis* 32(3):528-534.

Olivera, S., Fernández, A., Sarlabós, M.N., Rosillo, J.C., Casanova, G., Jiménez, M., Barbeito, L., 2011. Neonatal Astrocyte Damage Is Sufficient to Trigger Progressive Striatal Degeneration in a Rat Model of Glutaric Acidemia-I. *PLoS One* 6(6):1-10.

Orthmann-Murphy, J.L., Freidin, M., Fischer, E., Scherer, S.S., Abrams, C.K., 2007. Two Distinct Heterotypic Channels Mediate Gap Junction Coupling between Astrocyte and Oligodendrocyte Connexins. *J Neurosci* 27(51):13949-13957.

Osterhout, D.J., Wolven, A., Wolf, R.M., Resh, M.D., Chao, M.V., 1999. Morphological differentiation of oligodendrocytes requires activation of Fyn tyrosine kinase. *J Cell Biol* 145(6):1209-18.

Pallier, P.N., Drew, C.J.G., Morton, A.J., 2009. The detection and measurement of locomotor deficits in a transgenic mouse model of Huntington's disease are task- and

protocol-dependent: Influence of non-motor factors on locomotor function. *Brain Res Bull* 78: 347–355.

Pekny, M., Nilsson, M., 2005. Astrocytes activation and reactive gliosis. *Glia* 50: 427-434.

Pons-Vázquez, S., Gallego-Pinazo, R., Galbis-Estrada, C., Zanon-Moreno, V., García-Medina, J.J., Vila-Bou, V., Sanz-Solana, Pedro., Pinazo-Durán, M.D., 2011. Combined Pre- and Postnatal Ethanol Exposure in Rats Disturbs the Myelination of Optic Axons. *Alcohol and Alcoholism* 46(5)514-522.

Prats Viñas, J.M., 2001. Aciduria glutárica tipo I: una academia orgánica sin acidosis y con graves trastornos del movimiento. *Neurol* 16: 337-341.

Quarles, R.H., 2007. Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond. *J Neurochem* 100(6):1431-1448.

Rasband, M.N., Tayler, J., Kaga, Y., Yang, Y., Lappe-Siefke, C., Nave, K.A., Bansal, R., 2005. CNP is required for maintenance of axon-glia interactions at nodes of Ranvier in the CNS. *Glia* 50:86–90.

Sauer, S., 2007. Biochemistry and bioenergetics of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 30(5): 673-680.

Schafer, D.P. & Rasband, M.N., 2006. Glial regulation of the axonal membrane at nodes of Ranvier. *Curr Opin Neurobiol* 16: 508-514.

Schnaar, R.L., López, P.H.H., 2010. Myelin-associated glycoprotein and its axonal receptors. *J Neurosci Res* 87(15):3267-3276.

Sherman, D.L., & Brophy, P.J., 2005 Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 6: 683-690.

Shipper, H.M., 1998. *Astrocytes in Brain Aging and Neurodegeneration*. RG Landes Company, Austin, Texas.

Sijens, P.E., Smit, G.P.A., Meiners, L.C., Oudkerk, M., van Spronsen, F.J., 2006. Cerebral 1H MR spectroscopy revealing white matter NAA decreases in glutaric aciduria type I. *Mol Gen and Metab* 88: 285–289.

Simons, M., Trajkovic K., 2006. Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J Cell Sci* 119:4381-4389.

Soffer, D., Amir, N., N. Elpeleg O.N., Gomori J.M., Shalev, R.S., Gottschalk-Sabag, S., 1992. Striatal degeneration and spongy myelinopathy in glutaric academia. *J Neurol Sci* 107: 199-204.

Sofroniew, M.V., Vinters, H.V., 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119: 7-35.

Sperber, B.R., Boyle-Walsh, E.A., Engleka, M.J., Gadue, P., Peterson, A.C., Stein, P.L., Scherer, S.S., McMorris, F.A., 2001. A unique role for Fyn in CNS myelination. *J Neurosci* 21(6): 2039-2047.

Steiner, J., Bernhard, B., Schroeter, M.L., Bernstein, H.G., 2011. S100 β protein in neurodegenerative disorders. *Clin Chem Lab Med* 49(3): 409-424.

Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L., 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med* 338:278–285.

Uhlenberg, B., Schuelke, M., Rüschemdorf, F., Ruf, N., Kaindl, A.M., Henneke, M., Thiele, H., Stoltenburg-Didinger, G., Aksu, F., Topaloglu, H., Nürnberg, P., Hübner, C., Weschke, B., Gärtner, J., 2004. Mutations in the gene encoding gap junction protein

alpha 12 (connexin 46.6) cause Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Am J Hum Genet* 75:251–260.

Umemori, H., Sato, S., Yagi, T., Aizawa, S., Yamamoto, T., 1994. Initial events of myelination involve Fyn tyrosine kinase signalling. *Nature* 10;367(6463):572-6.

van derKnaap et al., 2006. *Lancet Neurol* 5(5):413-23.

Venkatesh, K., Chivatakarn, O., Sheu, S.S., Giger, R.J., 2007. Molecular dissection of the myelin-associated glycoprotein receptor complex reveals cell type-specific mechanisms for neurite outgrowth inhibition. *J Cell Biol* 177:393–399.

Vinson, M., Strijbos, P.J., Rowles, A., Facci, L., Moore, S.E., Simmons, D.L., Walsh, F.S., 2001. Myelin-associated glycoprotein interacts with ganglioside GT1b: A mechanism for neurite outgrowth inhibition. *J Biol Chem* 276:20280–20285.

Wake, H., Lee, P.R., Fields, R.D., 2011. Control of local protein synthesis and initial events in myelination by action potentials. *Science* 333:1647-1651.

Xie, M., Tobin, J.E., Budde, M.D., Chen, C.I., Trinkaus, K., Cross, A.H., 2010. Rostro-Caudal Analysis of Corpus Callosum Demyelination and Axon Damage Across Disease Stages Refines Diffusion Tensor Imaging Correlations with Pathological Features. *J Neuropathol Exp Neurol* 69(7): 704–716.

Zschocke, J., Quak, E., Guldberg, P., Hoffmann, G.F., 2000. Mutation analysis in glutaric aciduria type I. *J Med Gen* 37: 177-181.

Zinnanti, W.J., Lazovic, J., Wolpert, E.B., Antonetti, D.A., Smith, M.B., Connor, J.R., Woontner, M., Goodman, S.I., Cheng, K.C., 2006. A diet-induced mouse model of glutaric aciduria type I. *Brain* 129: 899-910.

Zinnanti, W.J., Lazovic, J., Housman, C., LaNoue, K., O'Callaghan, J.P., Simpson, I., Wootner, M., Goodman, S.I., Connor, J.R., Jacobs, R.E., Cheng, K.C., 2007. Mechanism of age-dependent susceptibility and novel treatment strategy in glutaric academia type I. *J Clin Invest* 117: 3258–3270.