



Pasantía de Grado

Licenciatura en Ciencias Biológicas, Profundización Neurociencias

Modulación metabólica en astrocitos por silenciamiento génico de la enzima piruvato deshidrogenasa kinasa.

Rosalía Villarino

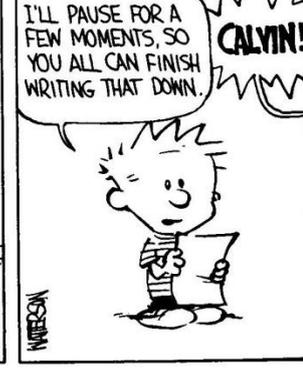
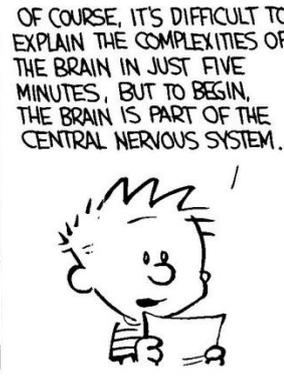
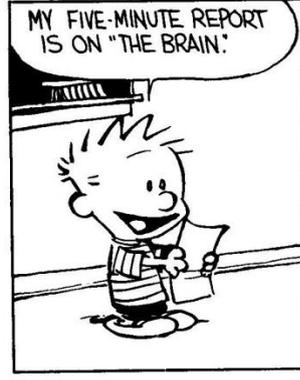
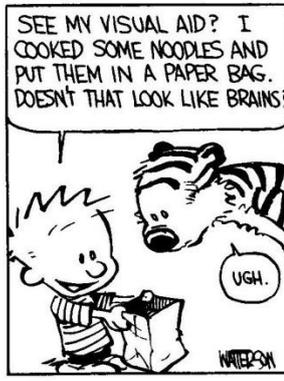
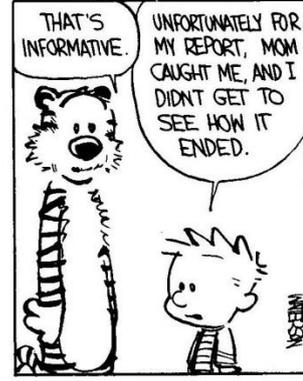
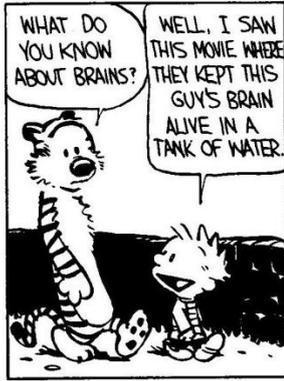
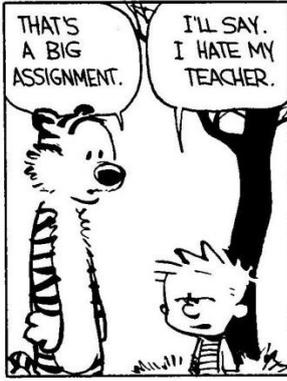
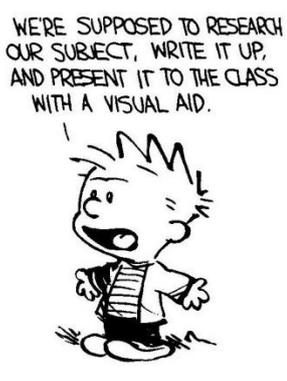
Tutor: Ernesto Miquel

Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina.

Montevideo-Uruguay

Octubre 2017





AGRADECIMIENTOS:

A Ernesto Miquel por las ganas, la dedicación y la paciencia.

A Patricia Cassina por compartir la experiencia siempre con calidez.

A Laura Martínez, Valentina Lagos, Soledad Marton, Sebastián Rodríguez, Luciana Negro y Daniela Alí por dar una mano siempre.

A Giselle Prunell y Florencia Irigoín por aceptar corregir este trabajo.

A todo el departamento de Histología y Embriología porque forman un grupo humano con el que dan ganas de encontrarse todos los días.

Por último a todos los compañeros y docentes de Facultad de Ciencias que compartieron y aportaron a este camino.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Esclerosis Lateral Amiotrófica.....	1
Astrocitos.....	3
Disfunción mitocondrial en la ELA	5
Modulación de la actividad mitocondrial como estrategia terapéutica en modelos de ELA	6
Piruvato Deshidrogenasa Kinasa como blanco para la modulación metabólica	8
Silenciamiento génico	9
HIPÓTESIS	10
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
Animales.....	10
Cultivo de astrocitos.....	11
Co-cultivos de motoneuronas – astrocitos.....	15
Tratamiento de astrocitos con silenciadores.....	17
Inmunocitoquímica	18
Western Blot.....	19
PCR cuantitativa.....	28
Procesamiento y análisis de datos	32
RESULTADOS.....	34
El tratamiento de cultivos celulares de astrocitos con siARN disminuyó la expresión del ARN mensajero para PDK2.....	34
Curso temporal del tratamiento con siARN sobre el nivel de expresión de ARN mensajero.36	
El tratamiento de astrocitos con siARN para PDK2 disminuye la actividad enzimática de PDK	38
El tratamiento de astrocitos con siARN contra PDK2 no induce alteraciones morfológicas...39	
El tratamiento de astrocitos SOD1G93A con siARN contra PDK2 disminuye su toxicidad hacia motoneuronas	38
DISCUSIÓN.....	43
Disfunción mitocondrial en astrocitos y toxicidad.....	44
CONCLUSIONES.....	45
PERSPECTIVAS.....	46
BIBLIOGRAFÍA	47

INTRODUCCIÓN

Esclerosis Lateral Amiotrófica

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es la enfermedad degenerativa más frecuente que afecta a las motoneuronas, con una incidencia que oscila entre 1 y 3 casos por cada 100.000 habitantes al año (López-Vega, Calleja, Combarros, Polo, & Berciano, 1988; Vázquez et al., 2008; Zarranz 2008). Esta degeneración de las motoneuronas se observa en la médula espinal, tronco encefálico y corteza motora (Rowland & Shneider, 2001) y aunque hay casos descritos a partir de la segunda y tercera década de vida, la mayor incidencia de la enfermedad se sitúa entre los 60 y 70 años (Amato y Russell, 2008). Los pacientes muestran síntomas progresivos de debilidad muscular, fasciculaciones, atrofia y espasticidad que conducen a la muerte entre 2 a 5 años luego del diagnóstico. Hasta el momento no existe tratamiento curativo y muy poco paliativo.

La enfermedad puede presentarse en su forma esporádica o familiar. En la primera, que comprende el 90-95% de los casos, no existe un componente hereditario conocido, mientras que las formas de ELA familiar suponen un 5-10% de los casos. En los últimos años hubo un rápido avance en el conocimiento de las causas genéticas de la ELA. Se han identificado numerosas mutaciones genéticas asociadas a las formas familiares y esporádicas de ELA. Entre las de mayor frecuencia se encuentran mutaciones en los genes: SOD1 (enzima antioxidante superóxido dismutasa-1, Cu-Zn), TARDBP (proteína de unión a TAR (trans-activation response element) en el ADN), FUS (fusionada en sarcoma, proteína de unión a ARN), UBQLN2 (Ubiquilina 2) y C9ORF72 (repeticiones hexanucleótidas en el cromosoma 9 del marco abierto de lectura 72), genes que codifican proteínas con funciones muy diversas (Chen, Sayana, Zhang, & Le, 2013). Un 20% de los casos de ELA Familiar está asociado a mutaciones en la enzima SOD1 (Rosen et al., 1993) por lo que esta enzima y sus mutaciones han sido muy estudiadas en el campo de la investigación sobre la ELA por muchos años.

La SOD1 es una enzima abundantemente expresada que convierte el superóxido a peróxido de hidrógeno y de esta manera protege a la célula contra el estrés oxidativo. Algunas hipótesis para explicar los mecanismos tóxicos de de la SOD1 mutante en la ELA incluyen disfunción mitocondrial, producción descontrolada de radicales libres, agregación proteica, desregulación de los neurofilamentos, transporte axonal defectuoso, excitotoxicidad y disfunción proteasomal (Pasinelli & Brown, 2006; Rothstein, 2009). Estas mutaciones no están asociadas a una pérdida de función dismutasa sino que existiría una ganancia de función con consecuencias neurotóxicas asociadas a una actividad redox anormal que produce estrés oxidativo y disfunción mitocondrial (Beckman, Estévez, Crow, & Barbeito, 2016; Harraz et al., 2008; Liu et al., 2004). Si bien la gran mayoría de los casos de ELA son esporádicos, el estudio de los casos de ELA familiar, su origen y el estudio durante el progreso de la enfermedad es muy importante porque nos permite el planteamiento de nuevas hipótesis etiopatogénicas extrapolables a los casos de ELA esporádicos.

Para hacer posible un mejor abordaje del estudio de la enfermedad, nuestro laboratorio cuenta con animales transgénicos (ratas y ratones) que sobre-expresan la enzima SOD1 humana con una mutación puntual asociada a ELA (sustitución de glicina por alanina en la posición 93), los cuales experimentan síntomas motores similares a la enfermedad humana, resultando de gran utilidad como modelo de experimentación (Gurney et al., 1994; Howland et al., 2002). Esta mutación es una de las numerosas mutaciones de la enzima SOD-1 asociadas al desarrollo de la enfermedad (Rosen et al., 1993). La expresión de altos niveles de la enzima SOD humana con esta mutación induce muerte neuronal que determina disfunción motora en estos animales transgénicos. Esto genera parálisis progresiva que inhabilita a los animales a incorporarse a la edad de 130-150 días de vida. .

En cuanto al tipo celular implicado en el origen de los síntomas de la enfermedad, estudios en ratones quiméricos que poseen algunos tipos celulares expresando la mutación y otros no, han demostrado que la degeneración de las motoneuronas requiere de la expresión de dicha mutación en células no neuronales, de hecho, animales en los que las células gliales no expresan la mutación en la enzima SOD presentan un retraso en el progreso de la enfermedad y una prolongación de su

supervivencia (Clement et al., 2003). Así que si bien no está aún del todo clara la etiología de la ELA, aunque las motoneuronas son las células que degeneran, no es el único tipo celular implicado en la enfermedad.

Astroцитos

Las células de la glía constituyen la mayor parte de las células del sistema nervioso. Las células gliales se clasifican, según su morfología, función y localización en: 1) microglía, las únicas células gliales de origen inmunitario, que llegan al cerebro a través de la sangre durante el desarrollo temprano; 2) astroцитos y 3) oligodendrocitos y células de Schwann, que forman capas de mielina alrededor de los axones en el sistema nervioso central y periférico, respectivamente (Guillamón-vivancos *et al.*, 2015).

Aunque desde su descripción por Ramón y Cajal y más tarde por Río-Ortega, los astroцитos se habían considerado tradicionalmente como simples células de soporte, en los últimos años se ha avanzado mucho en cuanto al conocimiento de su función.

Los astroцитos comprenden la población más numerosa de células gliales en el SNC, desempeñando funciones esenciales para el correcto funcionamiento del SNC: poseen un rol clave en el mantenimiento de la barrera hematoencefálica (Sofroniew & Vinters, 2010), en la regulación local del flujo de sangre -y así proporcionando soporte trófico, antioxidante y metabólico a las neuronas- (Allaman, Belanger, & Magistretti, 2011), en el reciclado de los neurotransmisores (Hamilton & Attwell, 2010) y en la regulación de la sinaptogénesis y la transmisión sináptica (Allen, 2014; Araque et al., 2014; Chung, Allen, & Eroglu, 2015). Además, estas células estarían implicadas también en la regulación del volumen y flujo del fluido extracelular en el SNC, eliminando los desechos del metabolismo neuronal en un sistema que se ha denominado “sistema glinfático”, operando principalmente durante la fase de sueño (Jessen, Munk, Lundgaard, & Nedergaard, 2015).

Existen numerosas evidencias de que las alteraciones de la función astrocitaria pueden contribuir al desarrollo de enfermedades del SNC, especialmente neurodegenerativas. Por un lado, la pérdida de funciones de los astroцитos podría tener efectos negativos; por otro, el proceso de reactividad astrocitaria, también llamado estado de astrogliosis reactiva, podría causar efectos perjudiciales en el SNC (Guillamón-vivancos *et al.*, 2015).

El término astrogliosis reactiva hace referencia a una serie de cambios en astrocitos que ocurren a nivel molecular, celular y funcional como respuesta a daños y enfermedades del SNC de distinto grado. Los cambios que experimentan los astrocitos reactivos varían según el grado de severidad de la lesión, son regulados por moléculas de señalización inter e intracelular y modifican la actividad astrocitaria bien mediante ganancia o pérdida de funciones, lo que puede afectar a las células circundantes (Sofroniew, 2009).

Estos astrocitos reactivos están caracterizados por una hipertrofia de los procesos celulares, sobreexpresión de las proteínas de los filamentos intermedios GFAP (proteína fibrilar ácida de la glía) y vimentina. Esto se acompaña además de una hipertrofia nuclear y una expresión alterada de muchas otras proteínas, tales como proteasas, factores de crecimiento y citoquinas (Vargas & Johnson, 2010).

Los pacientes que padecen ELA y los modelos animales de la enfermedad, muestran gran reactividad glial en torno a las motoneuronas afectadas.

Los astrocitos reactivos en la ELA muestran así una inmunoreactividad aumentada para GFAP y para la proteína de unión a calcio S100 β , y expresan marcadores inflamatorios como la ciclo-oxigenasa 2 (COX-2), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y óxido nítrico sintasa neuronal. El aumento de la inmunoreactividad para GFAP es particularmente notable en el asta ventral de la medula espinal, donde se localizan las motoneuronas. (Vargas & Johnson, 2010).

Existe evidencia de un rol protagónico de los astrocitos tanto en la inducción como en la propagación de la pérdida de motoneuronas en la ELA (Barbeito et al., 2004). De hecho, astrocitos aislados de animales transgénicos portadores de la mutación SOD1G93A inducen la muerte de motoneuronas en un modelo de co-cultivo, lo que fuertemente sugiere un rol preponderante de los astrocitos en el desarrollo de la enfermedad (Nagai, 2007; Vargas, Pehar, Cassina, Beckman, & Barbeito, 2006). Los mecanismos por los cuales estos astrocitos inducen la muerte de las motoneuronas es continuo objeto de estudio en nuestro laboratorio, donde ya se mostró, por ejemplo, que los astrocitos reactivos poseen mayor producción de óxido nítrico (NO) y NGF (factor de crecimiento nervioso), lo que induce la muerte de las motoneuronas mediante el receptor p75 (Cassina et al., 2002, 2005; Pehar et al., 2004). Además, se ha evidenciado que la disfunción mitocondrial vinculada a un estrés nitrooxidativo en los astrocitos SOD1G93A contribuye a la muerte de las

motoneuronas adyacentes, lo cual no sucede con astrocitos normales (*wild type*, WT), y además, que este tipo de daño puede ser notablemente revertido usando antioxidantes dirigidos a la mitocondria (Cassina et al., 2008; Miquel et al., 2012, 2014).

Disfunción mitocondrial en la ELA

Las mitocondrias son organelos que tienen como función principal la producción de energía en forma de ATP a través del proceso de fosforilación oxidativa. Además, regulan gran número de vías de señalización y juegan un rol importante en la homeostasis del calcio y el control de la muerte celular programada. Son varias las líneas de evidencia que implican una disfunción mitocondrial en la patogénesis de la ELA, tanto a nivel neuronal como de células gliales (Ferraiuolo et al., 2011). En esta enfermedad, las motoneuronas que degeneran en la médula espinal muestran una morfología mitocondrial, bioenergética y dinámica de transporte de calcio anormal, incluso antes del comienzo de la disminución de fuerzas, lo que sugiere que están activamente involucradas en la patogénesis de la enfermedad (Bacman, Bradley, & Moraes, 2006; Cassina et al., 2008; Hervias, Beal, & Manfredi, 2006; Magrane & Manfredi, 2009; Shi, Gal, Kwinter, Liu, & Zhu, 2010). Mitocondrias vacuoladas dentro de las motoneuronas han sido extensamente descritas en los modelos animales transgénicos para la enzima SOD-1 (Kawamata & Manfredi, 2010). Anormalidades similares han sido observadas en casos esporádicos de ELA humanos, resaltando aspectos comunes entre casos de ELA esporádicos y familiares (Dupuis et al., 2004; Manfredi & Xu, 2005). Además, al momento del comienzo de los síntomas, la respiración mitocondrial y la síntesis de ATP son deficientes en el cerebro y la médula espinal de ratones transgénicos SOD-1 (Jung, Higgins, & Xu, 2002; Kirkinezos et al., 2005; Mattiazzi et al., 2002).

Asimismo, los astrocitos aislados de los modelos animales de ELA muestran una reducida capacidad mitocondrial para la síntesis de ATP acoplada a una elevada producción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, como peróxido de hidrógeno, superóxido, óxido nítrico y peroxinitrito (Vargas et al., 2006). Sorprendentemente, estas alteraciones

en la función mitocondrial de los astrocitos SOD1G93A estarían íntimamente asociadas a su actividad neurotóxica ya el tratamiento con antioxidantes dirigidos a la mitocondria revierte la toxicidad hacia las motoneuronas en cocultivo (Cassina et al., 2008). Notablemente, estas características no están limitadas a los astrocitos SOD1G93A, ya que el tratamiento de astrocitos normales con inhibidores de la actividad mitocondrial es suficiente para provocar cambios fenotípicos neurotóxicos que reducen la supervivencia de las motoneuronas (Cassina et al., 2008).

Modulación de la actividad mitocondrial como estrategia terapéutica en modelos de ELA

Recientemente, como estrategia para restaurar la función mitocondrial de astrocitos extraídos del modelo SODG93A, Miquel y colaboradores utilizaron el organohaluro dicloroacetato (DCA)(Miquel et al., 2012). La estimulación de la función mitocondrial es debida a la capacidad del DCA para inhibir selectivamente la piruvato deshidrogenasa kinasa (PDK), enzima que fosforila (e inactiva) el complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH), encargada de catalizar la oxidación de piruvato a Acetil-CoA (Stacpoole, 1989).

PDH es un complejo enzimático clave en la regulación en la oxidación de la glucosa, mediando la decarboxilación oxidativa de piruvato, que convierte a este último en Acetil-CoA y CO₂, y reduce NAD⁺ a NADH (Jha et al., 2015).

El piruvato es el producto final de la glucólisis. Bajo condiciones aeróbicas, el piruvato principalmente entra en la mitocondria, dónde es transformado

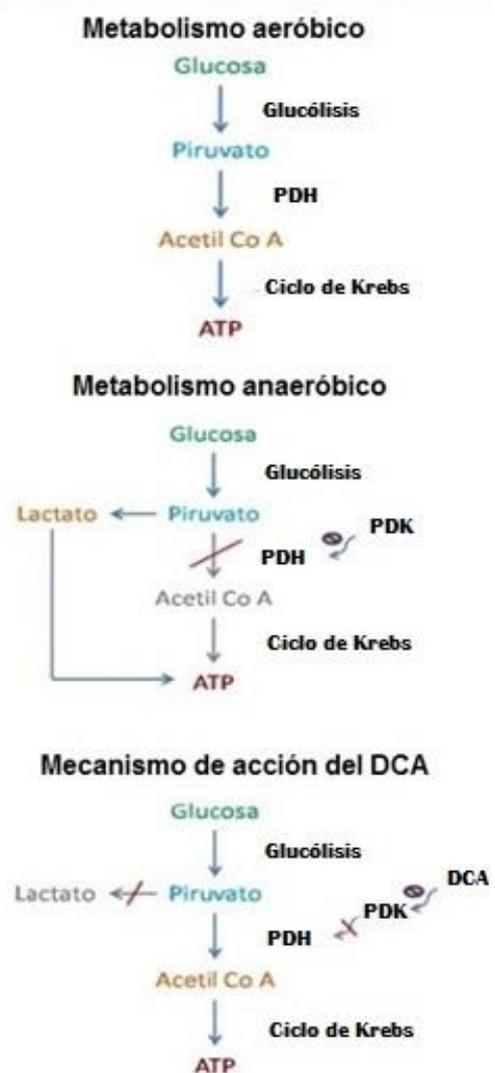


Figura 1: Mecanismo de acción del DCA

a Acetil-CoA, produciendo NADH y CO₂. Subsecuentemente, el Acetil-CoA entra al ciclo de Krebs donde sirve de sustrato para la producción de energía en forma de ATP mediante el proceso de fosforilación oxidativa. La producción de Acetil-CoA a partir de piruvato es catalizada por el complejo enzima-coenzima PDH. La actividad de la PDH se encuentra bajo el control de la PDK, que fosforila a la PDH suprimiendo la catálisis del piruvato en Acetil-CoA.

Bajo condiciones anaeróbicas, la producción de ATP mediante la conversión de glucosa en piruvato es asegurada por una continua producción de NAD, resultante de la conversión de piruvato en lactato, conversión catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa 5 (LDH5). Este proceso ocurre en forma exclusivamente citosólica, independientemente de las mitocondrias, proceso conocido como glicólisis anaerobia (Bittar, Charnay, Pellerin, Bouras, & Magistretti, 1996; Broer et al., 1997; Itoh et al., 2003; Pierre & Pellerin, 2005) (Figura 1).

Fosforilación oxidativa y glicólisis anaerobia son los procesos generadores de energía que normalmente funcionan en las células del organismo. Sin embargo, se ha descrito que en ciertas situaciones las células pueden adoptar un tercer mecanismo, denominado glicólisis aerobia (Vander Heiden, 2009). Se ha descrito principalmente para células con alta capacidad proliferativa, como es el caso de las células cancerosas. Estas células presentan un metabolismo altamente glicolítico con liberación de lactato, independientemente de la presencia o no de oxígeno. Esta adaptación metabólica en células con alta capacidad proliferativa fue descrita por Otto Warburg en la década de 1930 y es conocida como “efecto Warburg”.

Además de poseer una menor actividad mitocondrial que los astrocitos no transgénicos, los astrocitos SOD1G93A presentan una mayor tasa proliferativa (Gandelman, Peluffo, Beckman, Cassina, & Barbeito, 2010) y, la hipótesis de nuestro laboratorio es que en estas células ocurre un efecto Warburg, el cual de alguna manera está asociado a otros cambios que conducen a un fenotipo neurotóxico.

El DCA fue entonces administrado a astrocitos SODG93A para estimular la actividad mitocondrial como había sido reportado previamente en células tumorales (Bonnet et al., 2007), pudiéndose observar una recuperación de la función mitocondrial, disminución de la proliferación y una pérdida de la actividad neurotóxica en cocultivo con motoneuronas (Miquel et al., 2012). Además, la administración de DCA a ratones SOD1G93A condujo a un aumento significativo en la supervivencia, además de retardo en la

pérdida de fuerza de los animales. Esta mejora en las funciones se asoció con una recuperación de la función mitocondrial medida en la médula espinal y el músculo (Miquel et al., 2012).

Al momento de leer estos resultados debemos tener en cuenta que la diferencia entre los ensayos *in vitro* y los ensayos *in vivo* es que la administración sistémica de DCA afecta potencialmente a todas las células del organismo, no solo a los astrocitos. No se puede dilucidar si los efectos positivos son consecuencia de cambios a nivel astrocitario, o el resultado del conjunto de efectos sobre otros tipos celulares. De hecho, se han reportado efectos nocivos del DCA sobre las neuronas (Calcutt et al., 2009). Por lo tanto es de interés desarrollar herramientas que permitan la modulación metabólica de los astrocitos SOD1G93A *in vivo* sin alterar el metabolismo de otros tipos celulares.

Piruvato Deshidrogenasa Kinasa como blanco para la modulación metabólica

Las varias isoformas de PDK (1-4) son el único blanco conocido del DCA y PDK exclusivamente fosforila, y por lo tanto inactiva, el complejo de la PDH (Deuse et al., 2014). Las isoformas de PDK poseen una expresión diferencial dependiendo del tejido y del tipo celular. Los astrocitos tienen niveles mucho más elevados de PDK2 y de PDK4 que las motoneuronas; mientras que éstas expresan niveles más significativos de PDK1. No así ocurre con PDK3, donde no se observan diferencias significativas entre motoneuronas y astrocitos (Halim et al., 2010).

Aprovechando esta expresión diferencial, es que surge el interés de desarrollar una técnica que permita inhibir la expresión de las isoformas de PDK presentes fundamentalmente en astrocitos. Ya se cuenta con modelos animales *knock out* para la enzima PDK2, PDK4 y doble *knock out* para ambas (Nam Ho Jeung, Yasmeen Rahimi, Pengfei Wu & Harris, 2015). Si bien estos modelos son perfectamente viables cuentan con las desventajas de que debido a que se produce la inactivación de forma prenatal pueden producirse efectos compensatorios de otros genes, y además, el gen inactivado afecta a todos los tipos celulares del organismo. En el caso del silenciamiento a través de ARN interferente, existe la posibilidad de afectar únicamente los tipos celulares de interés.

Silenciamiento génico

La interferencia por ARN es una vía fundamental en la regulación de la expresión génica de células eucariotas mediante la cual un ARN pequeño interferente (siARN) conteniendo una secuencia específica es capaz de localizar y mediar el clivaje un ARN mensajero complementario (Whitehead Kathryn A., 2009). En condiciones normales, este mecanismo está desencadenado por la presencia de largas piezas de ARN doble hebra, que son clivadas en los fragmentos conocidos como siARN, de aproximadamente unos 21-23 pares de bases, por la enzima DICER (Bernstein, Caudy, Hammond, & Hannon, 2001). En un contexto de laboratorio, para inducir el silenciamiento el siARN puede ser producido sintéticamente y luego directamente introducido a la célula, evitando entonces el accionar de la enzima DICER. Una vez que el siARN está presente en el citoplasma de la célula, es incorporado a un complejo proteico llamado RISC (en inglés, RNA induced silencing complex) (Rand, Ginalski, Grishin, & Wang, 2004). La proteína Argonauta 2, contenida en este complejo RISC, separa esta doble hebra, quedándose sólo con la hebra antisentido, mientras que la hebra sentido es degradada. Este complejo RISC, ahora activado, es guiado a el ARN mensajero complementario a esta hebra antisentido y lo degrada (Ameres, Martinez, & Schroeder, 2017). Luego, este complejo RISC puede continuar y destruir otros ARNm, propagando el silenciamiento génico. Eventualmente, estos siARNs son degradados en la célula luego de un cierto tiempo, lo que hace necesaria una nueva administración para lograr un efecto sostenido en el tiempo.

Por lo tanto, una alternativa para inhibir la expresión de las isoformas de PDK de mayor expresión en astrocitos es la utilización de siARN para el silenciamiento de esas isoformas, con el objetivo de inhibir su expresión. Esta estrategia de silenciamiento ha sido previamente utilizada en modelos animales para la ELA (ratones SOD1^{G93A}) (Zundert & Brown, 2016), pero no para modular el metabolismo, como en el presente trabajo. Y, si bien se ha utilizado el silenciamiento de la enzima PDK2, este se ha realizado en otros modelos (Sutendra et al., 2013). Por consiguiente, no existen datos previos que utilicen esta estrategia como forma de modular la actividad mitocondrial de astrocitos en un modelo de ELA, por lo que es dentro de este tema que se enmarcó este proyecto de trabajo de grado.

HIPÓTESIS

La modulación metabólica de los astrocitos SODG93A para revertir el posible efecto Warburg mediante el silenciamiento génico de la isoforma astrocitaria de PDK permitirá reducir el fenotipo neurotóxico.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los cambios morfológicos y funcionales inducidos por la inhibición de la expresión génica de la enzima PDK2 en astrocitos en cultivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Optimizar el silenciamiento génico de PDK2 en cultivos de astrocitos
- 2- Evaluar cambios morfológicos y funcionales inducidos por la falta de expresión de PDK2.
- 3- Investigar el efecto del silenciamiento de PDK2 en la toxicidad de astrocitos SODG93A para motoneuronas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Para la obtención de células para realizar los cultivos primarios de astrocitos se emplearon neonatos de ratas de 1 o 2 días de vida y para los de motoneuronas embriones en estadio 15 (E15). Las células control se obtuvieron de animales de la cepa Wistar mientras que los animales transgénicos que expresan la mutación SOD1G93A son de la cepa Sprague-Dawley NTac:SD-TgN(SOD1G93A)L26H (Howland et al., 2002) obtenidas de Taconic. Ambas cepas son criadas en la Unidad de Reactivos Biológicos de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina. Las madres permanecieron en cajas separadas con agua y alimento *ad libitum*, en régimen de temperatura y luz controlada. En el caso de los animales SOD1G93A, el transgen se mantuvo en hemicigosis mediante cruzamiento de machos transgénicos y hembras no transgénicas. Las camadas fueron

genotipadas mediante PCR utilizando cebadores contra SOD1 humana a partir de ADN aislado de biopsias de cola de los animales como fue descrito previamente (Vargas et al., 2005). La figura 2 muestra una imagen representativa del resultado de este genotipado. Se siguieron las normas de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República (CHEA) en el manejo de los animales y en el desarrollo experimental en base al protocolo de experimentación número 070153-000528-14.

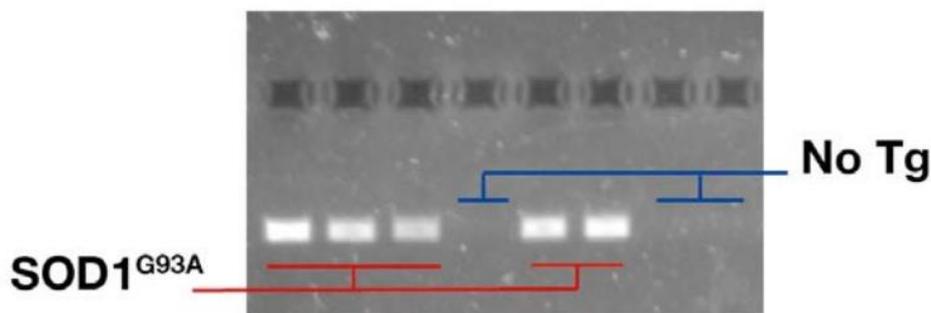


Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa y posterior tinción con bromuro de etidio. Se corrieron los productos de PCR amplificados a partir de ADN genómico con cebadores para SOD1G93A. En las muestras provenientes de animales SOD1G93A se observa una banda de aproximadamente unos 160 pb.

Cultivo de astrocitos

Se realizaron cultivos celulares con el fin de obtener el material biológico para realizar los experimentos. Estos cultivos celulares comprenden un conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, conservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. El cultivo primario de células se establece a partir de un tejido u órgano y en general comprende los siguientes pasos: 1) disección del tejido que contiene las células de interés; 2) disociación del tejido sin dañar las células; y 3) cultivo de las células disociadas en el sustrato y medio adecuados (Freshney, 2000). El protocolo para cultivo celular de astrocitos que fue empleado se ha descrito por Saneto y De Vellis (1987) con algunas modificaciones (Cassina et al., 2002) y consiste en una disgregación mecánica y química del tejido, proliferación y

enriquecimiento de astrocitos descartando otros tipos de células gliales y su posterior plaqueo.

Los cultivos de astrocitos se obtuvieron a partir de neonatos de rata de 1 o 2 días de vida. Antes del cultivo, se realizó la esterilización de los instrumentos a utilizar en la disección bajo radiación ultravioleta (de ahora en más UV) en la campana de flujo laminar por 30 minutos. Previamente al UV los instrumentos fueron lavados con alcohol 75%.

Detalladamente, una vez que los neonatos fueron trasladados al cuarto de cultivo se sacrificaron mediante decapitación con tijera. En el caso de los cultivos de astrocitos de corteza, se disecó el cerebro. En el caso de los cultivos de astrocitos de médula espinal, se disecaron las columnas vertebrales y luego la médula espinal, retirándose en ambos casos las meninges. Luego, tanto las médulas como las cortezas se pasaron a una placa p35 con DMEM para realizarles cortes limpios con un bisturí en varios pedazos de aproximadamente 1 mm³. Estos pedazos se pasaron a un tubo Eppendorf de 5 ml (el equivalente a una corteza o a dos médulas por tubo, según correspondiera). Se retiró el sobrenadante, y se lavaron con PBS. Se colocó entonces PBS + tripsina 2,5% + ADNasa 1mg/ml. El tratamiento con tripsina cliva las proteínas de la matriz extracelular y la superficie celular, incluyendo receptores de membrana y canales iónicos, no afectando significativamente la viabilidad celular. La ADNasa es una endonucleasa que permite la ruptura del ADN libre procedente de las células lisadas, disminuyendo la formación de agregados celulares durante el proceso de disgregación.

Se incubó esta mezcla a 37°C por 25 min y luego se cortó la reacción con DMEM + 10% FBS (suero fetal bovino) (el suero del medio de cultivo inhibe la tripsina). El tejido se disgregó con ayuda de una pipeta p1000 y el sobrenadante resultante se pasó por una rejilla de 80µm colectándose en un tubo Falcon de 50 ml. Esto se centrifugó a 300 g durante 15 minutos. Luego, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de DMEM + 10% FBS. Se contaron las células con cámara de Neubauer y se plaquearon las células obtenidas de corteza a una densidad de 4,5 x 10⁶ células por botella de 75 cm² en 15 ml de DMEM + 10% FBS. En el caso de las células obtenidas de médula el plaqueo fue a una densidad de 1,5 x 10⁶ células por botella de 25 cm².

El cultivo celular fue mantenido en estufa a 37°C, en una atmósfera saturada en agua con 5% de CO₂.

Una vez culminados estos pasos se procedió al enriquecimiento del cultivo en astrocitos. Se realizó el primer cambio de medio (DMEM + 10% FBS) a las 72 horas, y luego cada 48 horas hasta que las células llegaron a confluencia, es decir, a cubrir la totalidad de la superficie de la botella, aproximadamente a los 7 días. Posteriormente, las botellas se agitaron por 48 horas en un agitador orbital, protegidas de la luz, para lograr desprender la microglía y la oligodendroglía. Pasadas las 48 horas, se retiraron del agitador, y se procedió a golpearlas con firmeza para terminar de despegar las células que no fueran astrocitos. Se lavó la monocapa de células con PBS y se le volvió a agregar DMEM + 10% FBS junto con arabinósido de citosina (ara-C) 10 µM por 48 hs para deshacerse de aquellas células con capacidad proliferante que no hayan sido eliminadas por agitación. Cabe destacar que el ara-C, inhibidor de la síntesis de ADN, es tóxico para las células proliferantes, de forma tal que no afecta a los astrocitos en monocapa, quienes no proliferan por la propia inhibición que les imprime el contacto célula-célula en confluencia. A las 48 horas se lavó la citosina con PBS y se le agregó medio (DMEM + 10% FBS). Así, el cultivo se encontraba enriquecido en un 95% de astrocitos, y estaba pronto para plaquear en su sustrato definitivo (placas de Petri de 35 mm, placas de 24 pocillos o placas Labtek de 4 pocillos para microscopía confocal) y así realizar los experimentos. En la figura 3 se muestra una secuencia de microfotografías tomadas a los 2, 5, 7, 9, 12 y 14 días in vitro post-cultivo.

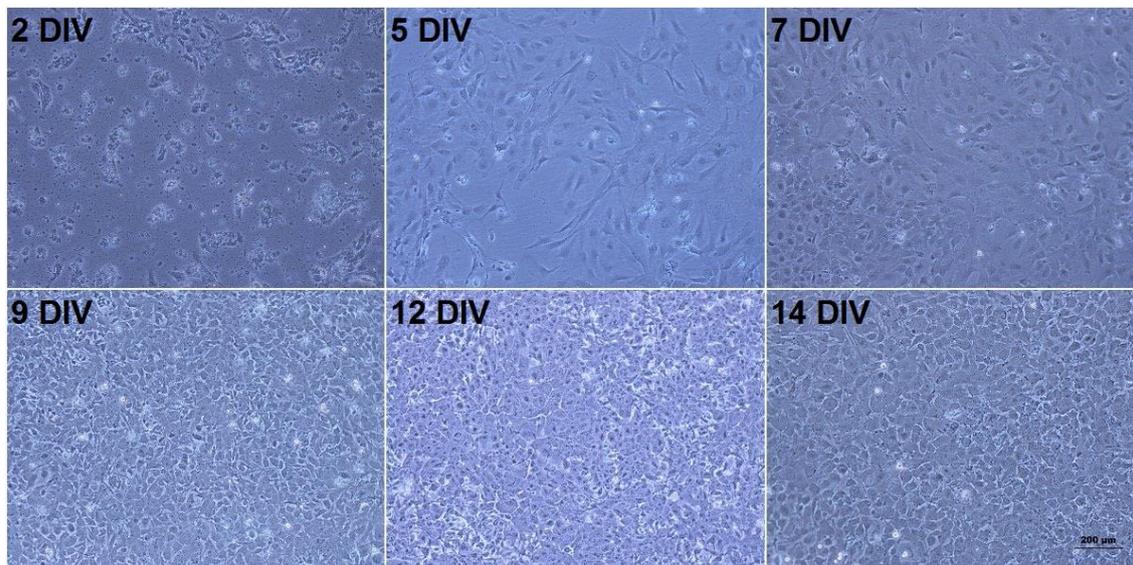


Figura 3: Secuencia de microfotografías de la monocapa de astrocitos a los 2, 5, 7, 9, 12 y 14 días de cultivo *in vitro*. 20x.

Plaqueo:

Para plaquear, una vez que el cultivo se encontraba enriquecido en astrocitos, se les retiró el medio a las botellas dónde se encontraban, se lavó la monocapa con PBS, se colocaron 2 ml de solución de tripsinización y se incubaron estas botellas 5 minutos a 37 °C. Esta solución es útil para despegar la monocapa que se encuentra adherida a la superficie de la botella. Luego, se detuvo la reacción con DMEM + 10% FBS. Con una pipeta de 10 ml se terminó de disgregar la monocapa mecánicamente, y se colocó el medio más las células en un tubo Falcon de 50 ml, para centrifugar 10 minutos a 300 g. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de DMEM + 10% FBS. Finalmente, se contaron las células en cámara de Neubauer y se plaquearon 170.000 células por placa de 35 mm o 40.000 por pocillo de las placas de 24 pocillos o Lab-tek. Luego de plaqueadas las células, se mantuvieron con cambio de medio cada 48 horas hasta que alcanzaran el nivel de confluencia deseado para los experimentos. A las 48 horas se realizó el primer cambio de medio y las células quedaron prontas para tratar.

Soluciones:

- Buffer Fosfato Salino (PBS) 5x, 1L, pH= 7,4: 40g NaCl, 1 g de KCl, 5,72g de Na_2HPO_4 y 1 g de KH_2PO_4 en agua destilada.
- Medio Esencial Dulbecco Modificado (DMEM) 1L, pH= 7,4: 13,37g de DMEM, 1,2g de NaHCO_3 , 3.7545g de HEPES, Penicilina 100U/ml, Estreptomicina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en agua ultrapura.
- Suero fetal bovino (FBS, Gibco)
- Tripsina (Gibco)
- Arabinósido de citosina (ara-C, SIGMA)
- ADNasa I 1mg/ml (SIGMA)
- Solución de tripsinización (500 μl de EDTA, 400 μl de PBS, 100 μl de Tripsina)

Co-cultivos de motoneuronas – astrocitos

Los cultivos de motoneuronas espinales se obtuvieron a partir de embriones de 15 días de desarrollo de rata Wistar. En esta etapa del desarrollo las motoneuronas espinales expresan marcadores de superficie que permitirán su aislamiento y la población glial está más reducida que luego del nacimiento, facilitando la purificación. Brevemente, luego de sacrificar a la rata preñada por dislocación cervical se disecó el útero con los embriones, el cual se transportó en medio de cultivo a la cámara de flujo laminar. Allí, se extrajeron los embriones, se lavaron con PBS y bajo lupa se disecó la médula espinal, se retiraron las meninges y se aisló la zona correspondiente a las astas ventrales, donde se encuentran las motoneuronas. Se cortó entonces el tejido medular en pequeños trozos (1mm^2 aprox.), se pasaron a un tubo Falcon de 15 ml y se lavaron con PBS. Se incubó luego con 1 ml de PBS + 20 μl de tripsina 0,05%, durante 15 minutos a 37°C , con agitación frecuente. Se retiró el sobrenadante y se agregó medio L15 + 0,1 ml de albúmina bovina (BSA) 4% + 0,1 ml de ADNasa 1000 U/ml. Se agitó vigorosamente unos 3 minutos. Luego, el

sobrenadante con las células ya disgregadas se pasó a otro tubo Falcon de 15 ml y se repitió la operación anterior para el pellet que había quedado en el primer tubo, sumando disgregación con pipeta. Una vez que todas las médulas se disgregaron, se llevaron a un volumen final de 10 ml de L15c y en el fondo del tubo se cargó un colchón de 1 ml de BSA. Esto se centrifugó 10 minutos a 300 g para luego retirar el sobrenadante y re-suspender en 1 ml de L15c + 20 µl de ADNasa. Se agregaron 2 ml más de L15c y se dividió en dos tubos Falcon para agregar una solución de OPTIPREP, solución de alta densidad que permite purificar poblaciones celulares de una densidad determinada, (1:10 en L15, 2 ml por tubo en el fondo de cada tubo). Estos tubos se centrifugaron 15 minutos a 800g.

Una vez realizados estos pasos se procedió a la inmunoselección, una purificación de las poblaciones celulares de interés mediante inmunoafinidad. En la médula espinal de la rata en la etapa del desarrollo en la que se obtuvieron los cultivos el receptor de neurotrofinas de baja afinidad p75^{NTR} se expresa exclusivamente en motoneuronas (Raoul *et al.* 2000). Utilizando anticuerpos contra este receptor purificamos la población de motoneuronas de la preparación. Este proceso se realizó en una placa de Petri bacteriológica (de plástico sin tratar, donde la mayoría de las células eucariotas no se adhieren) a la que el día anterior se le habían agregado 20 ml de Tris-HCl 0,05M, pH: 9,5 y 30 µl de anticuerpo de cabra anti-Fc de ratón (CAPPEL). A esta placa que denominaremos *panning*, se la colocó en la heladera hasta el día siguiente. El día del cultivo en la mañana se lavó este *panning* con PBS (3 x 4 ml) y se le agregaron 7 ml de anticuerpo IgG192 + 5 ml de PBS. El IgG192 es un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce al receptor de neurotrofina de baja afinidad p75^{NTR}. Luego, una vez llegado el momento de la inmunoselección, se volvió a lavar el *panning* (3 x 4 ml) y se le agregaron 15 ml de L15. Una vez terminada la centrifugación en OPTIPREP, se colectó la banda más turbia (dónde se encontraban las células) y se agregó al *panning*, dónde se dejó reposar por 40 min a TA. Una vez transcurrido ese tiempo se verificó al microscopio si las células se habían adherido a la placa y luego de descartar las células no adheridas se agregaron 4 ml más de IgG192, y se golpeó la placa para lograr desprender la mayor cantidad de células posibles. El contenido de la placa entonces se pasó a un tubo de 15 ml y se repitió la operación para no dejar células en la placa de *panning*.

Seguidamente, se completó el volumen del tubo a 10 ml con L15c y se cargó una segunda vez un colchón de 1 ml BSA en el fondo del tubo, para luego centrifugar 10 min a 300g. Finalizada la centrifugación, se retiró el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 0,5 ml de L15c. Estas motoneuronas purificadas se contaron en cámara de Neubauer para plaquear 3000 células por pocillo en una placa multiwell de 24 pocillos.

Dos días previos al cultivo de motoneuronas, astrocitos de médula espinal plaqueados en MW de 24 pocillos fueron tratadas con los siARN ya mencionados. Al momento de plaquear, antes de agregar las motoneuronas, la monocapa de astrocitos fue lavada con L15c para retirar restos del tratamiento con silenciadores y sobre éstos se plaquearon las motoneuronas. Los co-cultivos de astrocitos y motoneuronas se mantuvieron 48 h en L15c, luego de lo cual fueron fijados para realizar inmunohistoquímica.

Soluciones:

- Tris-HCl 0,05M, pH: 9,5
- Medio Leibovitz- L15- Gibco
- L15c: para 40 ml: 36,12 ml de L15, 0,4 ml de Glucosa 2M, 0,4 ml de ATB 100x, 8 µl de progesterona 2×10^{-2} M, 1,24 ml de IPCS (Insulina, putrescina, con albúmina, selenito de sodio), 1 ml de NaHCO₃ 7,5% y 0,8 ml de suero de caballo 2%.
- BSA 4% en L15

Tratamiento de astrocitos con siARN

Los ensayos de silenciamiento génico se realizaron utilizando siARN pre-diseñados y validados (Silencer® *Select Pre-Designed & Validated siRNA*, Ambion), específicos para los genes de interés y el organismo utilizado (rata).

Cultivos de astrocitos con un 80% de confluencia fueron transfectados con los siARN utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este reactivo contiene subunidades lipídicas que pueden formar liposomas en un ambiente acuoso, los cuales encierran el siARN para que de esta manera pueda pasar al interior celular. Para efectuar el tratamiento, primero se realizó un cambio de medio agregando 4/5 de la cantidad de medio (DMEM + 10% FBS) total que llevan las células en el soporte utilizado. El restante 1/5 del volumen fue completado por una combinación en partes iguales de las siguientes preparaciones: A: Mezcla 1:50 de Lipofectamina 2000 y medio OPTIMEM; B: Mezcla 0,4:50 de siARN 50 uM y OPTIMEM. Se incubaron partes iguales de ambas preparaciones juntas por 15 minutos a temperatura ambiente y luego se completó el volumen restante de 1/5 a las células. Los tratamientos realizados a lo largo del presente trabajo fueron los siguientes: tratamiento control sin siARN (solo con Lipofectamina), tratamiento con siARN NC (Control Negativo sin un blanco específico), tratamiento con siARN contra PDK1, y tratamiento con siARN contra PDK2.

Soluciones:

- Lipofectamina 2000 - Invitrogen
- Optimem - Gibco
- siARNs 50 uM - Ambion

Inmunocitoquímica

Luego de 48 h de establecidos los cocultivos astrocito-motoneuronas, estos se fijaron y se realizó inmunocitoquímica anti- β III tubulina (marcador neuronal) para facilitar la visualización de las neuronas sobre la monocapa de astrocitos y luego contar el número de neuronas supervivientes con morfología característica mediante microscopía de luz.

Esta técnica permite la identificación mediante anticuerpos de antígenos específicos como en este caso la β III tubulina, elemento de los microtúbulos encontrado casi exclusivamente en neuronas. Los anticuerpos o inmunoglobulinas, aunque se unan con alta especificidad a la molécula que queremos detectar, no son visibles con el microscopio por lo que se deben conjugar a otras moléculas que generen una señal visible. En este caso, el anticuerpo secundario que se utilizó se encontraba ligado a biotina, por lo que luego se agregó estreptavidina, una proteína formada por cuatro subunidades idénticas que se pueden unir cada una a una biotina. Esta estreptavidina se encontraba conjugada a peroxidasa, por lo que en el revelado se utilizó peróxido de hidrógeno y DAB (diaminobencidina). El peróxido de hidrógeno es el sustrato de la peroxidasa. En esta reacción se libera agua y oxígeno, el cual oxida sustancias como la DAB transformándola en un precipitado marrón e insoluble. Este color se visualiza fácilmente con el microscopio óptico convencional.

Brevemente se describen los pasos realizados en la inmunocitoquímica: las células se fijaron con 4% paraformaldehído+ 0,1% glutaraldehído en PBS por 15 minutos sobre hielo, se lavaron con PBS (3 x 5 min) y se inactivó la peroxidasa endógena con PBS + 2% H_2O_2 , 15 min a TA. Luego se permeabilizó: PBS + 0,2% tritón X-100, 30 min TA. Seguidamente, se bloquearon con 0,1% Tritón, 10% suero de cabra y 2% BSA en PBS por 1 hora a TA. Se incubaron entonces con el anticuerpo primario policlonal de conejo anti- β III tubulina (1:3000, en PBS + 0,2% tritón X-100) toda la noche a 4°C. Al otro día se lavaron nuevamente las células con PBS (3 x 5 min) y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a biotina (1:500, en PBS + 0,2% tritón), 1 h, TA. Se lavó nuevamente con PBS (3 x 5 min) y se incubó con streptavidina-conjugada a peroxidasa (1:250 en PBS 0,1% tritón, Jackson) 1 h a TA. Se realizó un último lavado con PBS (3 x 5 min) y se reveló con diaminobenzidina (DAB). Se controló al microscopio y se frenó la reacción con H_2O .

Para la cuantificación de supervivencia neuronal, se realizó el conteo de aquellas motoneuronas que poseyeran al menos una prolongación con un largo superior a 4 diámetros del soma.

Soluciones:

- DAB (diaminobenzidina): cada 10 ml de PBS, 100 μ l DAB (100x) + 20 μ l de H₂O₂ 30%

Anticuerpos:

- Primario: Anti- β III tubulina policlonal de conejo (ABCAM)
- Secundario: Anti- conejo biotinilado policlonal de cabra (JACKSON)

Inmunofluorescencia contra GFAP

La inmunofluorescencia, como todos los inmunoensayos, aprovecha la capacidad que tienen los anticuerpos para unirse con alta especificidad a una determinada molécula blanco; pero se diferencia de otras técnicas inmunoquímicas en que aquí la marca unida al anticuerpo es una molécula fluorescente. En este caso se utilizó un anticuerpo anti-GFAP conjugado al fluoróforo Cy3. El anticuerpo marcado se incubó con un preparado biológico y luego se expone la muestra así tratada a una fuente de luz de onda determinada, de acuerdo al fluoróforo utilizado. La excitación con esta luz provoca en el fluoróforo un fenómeno de fluorescencia que implica la emisión de luz a una longitud de onda más larga (por ejemplo, iluminación con luz azul usualmente provoca emisión de fluorescencia verde con los fluoróforos más utilizados). Esta luz emitida puede ser observada por medio de un microscopio de fluorescencia. Esta técnica puede ser utilizada en combinación con otras técnicas de coloración fluorescente que no hagan uso de anticuerpos, como por ejemplo DAPI para marcar ADN (núcleo).

Brevemente, para la realización de la inmunofluorescencia astrocitos de corteza cerebral en placas Labtek fueron tratados en duplicado con los siARN y controles correspondientes, de acuerdo a lo detallado previamente. 48 horas después, se descartó el medio de las placas y se fijaron con PFA 4% por 15 minutos sobre hielo. Se lavó con PBS y se incubaron 15 minutos a T.A. con una solución de Tritón x-100 al 0,1% en

PBS. Se retiró esta solución y se incubaron 45 min a T.A. con solución de bloqueo; pasados estos minutos se incubaron toda la noche a 4°C con una dilución 1:400 en solución bloqueante del anticuerpo monoclonal anti GFAP acoplado a Cy3. Al otro día se lavaron con PBS y se incubaron con DAPI 15 minutos T.A. a una dilución de 1:5000. Pasado este tiempo se lavaron las placas con PBS y se fijaron con glicerol al 80% y se colocó un cubreobjetos que se selló con esmalte. Estos preparados se observaron en el microscopio confocal.

Soluciones:

- Solución de bloqueo (2% BSA, 0,1% Tritón x-100 en PBS).

Anticuerpos:

- Primario: Anti-GFAP monoclonal de ratón (SIGMA-ALDRICH)

Western Blot

El Western Blot es una técnica que permite la detección de una única proteína dentro de una mezcla compleja, hecho que posibilita abordajes de tipo cualitativo y semi-cuantitativo (Shewry y Fido, 1998).

Consta de cinco pasos básicos: 1) separación de las proteínas de la muestra por electroforesis en gel desnaturizante (SDS-PAGE); 2) transferencia de las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa o PVDF (polivinildenedifluoride); 3) bloqueo de los sitios libres de la membrana; 4) incubación de la membrana con los anticuerpos específicos para la proteína de interés; 5) detección y revelado.

En este trabajo, astrocitos de corteza cerebral en placas de Petri de 35 mm (p35) fueron tratados en duplicado con los siARN correspondientes y 48 horas después se prepararon los lisados celulares para la detección de proteínas por la técnica de western blot: Se retiró el medio de las placas, se lavaron con PBS, se agregaron 80 µl de buffer de lisis (50mM NaCl, 50 mM HEPES, mezcla de inhibidores de proteasas CØmplete (Roche), 1% Tritón X-100) y se levantó la monocapa utilizando un rastrillo de plástico

(*cell scraper*). Se trabajó sobre hielo para evitar la degradación de las proteínas debido a la acción de las proteasas. Una vez desprendida la monocapa se aspiró con pipeta el buffer de lisis y se hirvió por 5 minutos. Se centrifugó muy brevemente para quitar restos no solubles y se recogió el sobrenadante. Se guardó entonces a -20°C para posteriormente cuantificar y realizar el ensayo de Western Blot.

Antes de realizar el ensayo todas las muestras deben estar en igual concentración de proteínas. Para esto, y por su alta sensibilidad, la cuantificación de proteínas en el presente trabajo se realizó utilizando el método de ácido bicinconínico (BCA, por sus siglas en inglés), utilizando una curva de estándar de seroalbúmina bovina (BSA). El principio de esta técnica es la formación de un complejo Cu^{2+} -proteína en condiciones alcalinas, seguido de la reducción del átomo de Cu^{2+} a Cu^{+} . La cantidad de cobre reducido es proporcional a la cantidad de proteína presente. Los aminoácidos cisteína, cistina, triptófano y tirosina, así como el propio enlace peptídico son capaces de reducir el Cu^{2+} a Cu^{+} . El BCA forma un complejo azul-violeta con el Cu^{+} que permite monitorear la reducción de Cu^{2+} por las proteínas midiendo a una longitud de onda de 562nm.

Cuantificación de proteínas:

En una placa de 96 pocillos, que se puede usar para espectrofotometría, se prepararon por duplicado estándares de concentraciones decrecientes conocidas de la proteína BSA (seroalbúmina bovina); también se hizo un pocillo por duplicado del blanco, en este caso, Buffer de lisis. En los pocillos subsiguientes se colocaron, por duplicado, 10 μl de las muestras que se obtuvieron del proceso de extracción de proteínas.

Una vez que están en la placa los estándares de BSA y las muestras a medir, se agregaron 200 μl de una mezcla 50:1 de de BCA/ CuSO_4 a todos los pocillos. Se incubó por 30 minutos a 37°C y se midió absorbancia a 562 nm. Una vez que se tuvieron los resultados de la absorbancia, se graficaron las concentraciones conocidas del estándar de BSA vs la absorbancia, y en esa gráfica se extrapolaron las medidas de absorbancia de las muestras con el fin de obtener la concentración de las mismas.

Ensayo de Western Blot:

Luego de determinar la concentración de proteínas, se prepararon las muestras para la realización del ensayo. Se adicionó buffer de carga 5x de forma que la concentración final en la muestra de proteínas fuera 1x y se las sometió a una incubación a 95°C durante 5 minutos. Las muestras a correr se prepararon de manera de tener todas la misma concentración. Para esto, se tomó la misma cantidad de μg de cada muestra y se diluyeron todas las muestras en buffer de lisis hasta igualar el volumen de la muestra menos concentrada.

Soluciones:

-Buffer de carga (5x): 3g SDS, 1.0M Tris, 5ml glicerol, 2 μg azul bromofenol, 104 μl /ml β -mercaptoetanol.

El primer paso de este ensayo consistió en la separación de las muestras de proteínas por electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Una electroforesis es discontinua cuando hay dos tipos de geles, un gel concentrador (stacking) de poros grandes, y un gel separador (resolving), de poros pequeños. La electroforesis desnaturalizante separa las proteínas en base a su peso molecular a medida que migran a través de un gel sometido a un campo eléctrico. Para que la separación por peso molecular tenga lugar, las proteínas deben sufrir la pérdida de su estructura cuaternaria, terciaria y secundaria, evitando así la influencia de la conformación tridimensional durante la migración. Los complejos SDS (Dodecil sulfato de sodio)-proteína adoptarán una forma única desplegada y un valor carga/masa constante y por lo tanto se separarán de acuerdo a su tamaño cuando migran desde el cátodo al ánodo a una velocidad relacionada por su peso molecular. El SDS es un detergente de carga negativa. Se une a las proteínas y les confiere dicha carga. Esta unión se da en una proporción constante, cada gramo de proteína se une a 1,4 g de SDS, sea cual sea la proteína.

a. Preparación de los geles: Como se mencionó, se utilizó un sistema de electroforesis discontinua que emplea dos geles, un gel separador (donde

procede la separación de proteínas, “resolving gel”) y un gel concentrador (permite que la entrada de las proteínas al gel separador sea ordenada y compacta, “stacking gel”). El gel concentrador presenta un bajo porcentaje de acrilamida, por lo tanto, mayor tamaño de poro y un pH ligeramente ácido. El gel separador que ocupa la mayor parte de la placa, presenta un tamaño de poro adecuado para la separación de las proteínas en función de su peso molecular y un pH básico. Se preparó un gel separador con 12% de acrilamida.

Brevemente, para la realización de los geles, se combinan todos los componentes de gel separador y se mezclan bien. Se preparan unos 10 ml por gel para un molde de 1.5 mm de espesor. Se vierte la preparación en el molde con un pipeta, por uno de los extremos hasta aproximadamente 1 cm por debajo del peine que se coloca para moldear los pocillos. Luego se esperan unos 10 min para la polimerización completa de gel separador, evitando su desecación cubriéndolo con butanol 0,1% y a continuación, se retira el butanol, se añaden y mezclan los componentes del gel concentrador y se colocan en el molde con cuidado por unos de los extremos. Finalmente se coloca el peine y se espera aproximadamente 15 min hasta que gelifique.

Soluciones:

-Gel separador “resolving gel” 12% (1 gel): 3,4 ml H₂O MiliQ, 4 ml mezcla Acrilamida 30% (acrilamida-bisacrilamida, 30:1), 2.5 ml Tris 1.5M (pH= 8.8), 100 µl SDS 10%, 100 µl APS (persulfato de amonio) 10%, 10 µl TEMED (N, N, N, N'-tetrametilnediamina).

-Gel concentrador “stacking gel” 4% (1 gel): 2.75 ml H₂O MiliQ, 650 µl mezcla Acrilamida 30%, 500 µl Tris 1.0M (pH= 6.8), 40 µl SDS 10%, 40 µl APS 10%, 4 µl TEMED.

Se colocan los geles en el soporte para electroforesis y se cierra el circuito con buffer de corrida, para luego proceder a colocar las muestras en los pocillos. Además, se carga un marcador de peso molecular que servirá

para estimar el tamaño de la proteína de interés. Se conecta a la fuente y se comienza a correr las muestras a 80-90 V hasta que alcanzan el *resolving* gel. Una vez entran en este gel se aumenta el voltaje a 110-120 V.

Tras la separación electroforética por peso molecular, las proteínas deben ser transferidas desde el gel de poliacrilamida a la membrana. Este método se basa en la movilidad electroforética de las proteínas cargadas negativamente e implica un íntimo contacto entre el gel y la membrana. Bajo un campo eléctrico, las proteínas migran fuera del gel hacia la superficie de la membrana donde quedan fuertemente adheridas de forma tal que la membrana resultante es una copia exacta del patrón de proteínas en el gel.

El procedimiento se inicia apilando sucesivamente sobre una esponja plana papel de filtro empapado en buffer de transferencia, el gel, la membrana en contacto directo con el gel, más papel de filtro y finalmente una esponja plana. Este "sándwich" se coloca entre dos capas de plástico perforado y se introduce en una cuba en el que se encuentra una solución salina (buffer de transferencia) y dos electrodos planos (diseñados para conseguir un campo uniforme en toda la superficie de gel). Se dispone de forma que el gel quede hacia el cátodo y la membrana hacia el ánodo. Dado que la carga neta de las proteínas en el caso de los geles de SDS-PAGE es negativa, debida a la carga del SDS, las proteínas viajarán hacia el ánodo y se unirán por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas a la membrana. El proceso provoca un fuerte aumento de la temperatura de la solución por lo que se refrigeró el sistema.

En el protocolo realizado, se utilizaron membranas de nitrocelulosa que tienen una gran capacidad de unir a proteínas de forma inespecífica (es decir, se adhieren todas las proteínas con idéntica afinidad). Se armó el "sándwich" sumergido en el buffer de transferencia en el siguiente orden: Esponja (polo positivo) → 2 papeles de filtro → membrana de nitrocelulosa → gel → 2 papeles de filtro → Esponja (polo negativo). Se quitaron las burbujas de aire, especialmente las que se formaron entre la membrana y el gel. Se colocó el "sándwich" en el dispositivo de electrotransferencia vertical con buffer de transferencia y se tomaron las precauciones de refrigeración mencionadas anteriormente. La

transferencia se realizó a 300 mA y voltaje libre; el tiempo aproximado fue de 90 min. Tras la transferencia se tiñó la membrana en forma reversible para comprobar la eficacia de procedimiento con rojo Ponceau, que es un reactivo comúnmente utilizado para la tinción de proteínas en una membrana, aunque su sensibilidad no es demasiado alta (Kurien y Scofield, 2009).

Soluciones:

-Buffer de corrida (1L, 5x, pH= 8,3): 15,1 g de Tris base, 94 g de glicina y 5 g de SDS en agua destilada.

-Buffer de transferencia (2L, pH= 8,3): 6.06 g Tris base, 28.53 g glicina, 421 ml etanol 95%, en agua destilada.

-Rojo Ponceau1x: 0.2% Rojo Ponceau, 3% ácido tricloroacético, 3% ácido sulfosalicilico.

-PBS

-0,1% de Tween-20 en PBS (PBS-T): 100ml PBS 10x, 900ml agua destilada, 1ml Tween.

- Marcador de peso Molecular (Fermentas pageruler prestained protein ladder).

Realizada la transferencia, se procedió a bloquear los sitios de la membrana que habían quedado libres de proteínas. Ello impide que en pasos futuros, otras proteínas, como por ejemplo los anticuerpos empleados para la detección del antígeno de interés, se unan en forma inespecífica a la membrana. En la actualidad se utiliza una amplia variedad de soluciones de bloqueo, desde leche descremada y suero, hasta soluciones de proteínas altamente purificadas como la BSA. Las soluciones de bloqueo permiten incrementar la sensibilidad del ensayo reduciendo la interferencia por ruido de fondo (Kurien y Scofield, 2006). Para bloquear la membrana, se incubó 30 min a temperatura ambiente y agitación suave,

con BSA 5% en PBS-T. Posteriormente, se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios toda la noche a 4°C en agitación continua. Los anticuerpos utilizados fueron: anticuerpo de ratón anti-PDH y de conejo anti-P-PDH (PDH fosforilada en la serina 293, la serina que se encuentra más cercana al sitio activo). Ambos 1:800 en solución de bloqueo, de Abcam.

Al día siguiente se lavaron los anticuerpos primarios con PBS-T (4 lavados de 5 min c/u), y se incubó la membrana a la oscuridad con anticuerpos secundarios 1 hora a temperatura ambiente. Se utilizaron anticuerpos secundarios de emisión en infrarrojo: anticuerpo de cabra anti-Fc de ratón que emite a 680 nm (Goat Anti mouse IRDye 680 RD, LI-COR, presentado con falso color rojo en nuestras imágenes) y anticuerpo de cabra anti-Fc de conejo que emite a 800 nm (Goat anti rabbit IRDye 800 CW, LI-COR, presentado en verde), ambos a una dilución 1:15000 en PBS. La utilización de dos anticuerpos secundarios que emiten fluorescencia en distintas longitudes de onda permite la evaluación simultánea de dos proteínas de interés que presenten un mismo peso molecular en western blot, una ventaja respecto a los métodos tradicionales de revelado con quimioluminiscencia. Pasados los 60 minutos se lavó la membrana con PBS-T y se revelaron las membranas evaluando la fluorescencia por medio del sistema Odyssey (LI-COR) de detección infrarroja.

Como control del experimento se realizó, en la misma membrana, una segunda incubación con anticuerpos contra una proteína de expresión constitutiva. Si bien se realizó una cuantificación de proteínas previo al ensayo, se doble verifica mediante esta segunda incubación que las diferencias de concentración de la proteína de interés en las diferentes muestras son debidas a los tratamientos y no a una diferencia en la cantidad de proteína total cargada en los pocillos.

Para esto, primero se retiraron los anticuerpos adheridos a la membrana, proceso conocido como "*stripping*", el cual se puede basar en calor, pH o presencia de agentes reductores. Para ello, incubamos las membranas en un buffer de *stripping* de pH ácido (glicina 0,2 M; SDS 0,1%; Tween-20 1%, pH 2.2), 3 veces por 5 minutos, seguido de 2 lavados de 10 min con PBS y 2 lavados de 5 minutos con PBS-T. A continuación se volvió a incubar la membrana en solución de bloqueo por 30 min. Se incubó entonces la

membrana con un anticuerpo primario de conejo contra Tubulina (proteína globular componente esencial de los microtúbulos de expresión constitutiva en las células), 1:3000 en PBS-T, 2 horas a temperatura ambiente. Pasadas las 2 horas y lavados con PBS-T, se incubó 1 hora a temperatura ambiente con el mismo secundario anti-conejo descrito previamente. Finalmente se lavó la membrana y reveló utilizando el sistema de captura Odyssey.

Anticuerpos primarios:

- Policlonal de conejo contra la subunidad alfa-E1 (fosforilada en S293) de la Piruvato Deshidrogenasa - ABCAM
- Monoclonal de ratón contra la subunidad alfa-E1 de la Piruvato Deshidrogenasa – ABCAM
- Policlonal de conejo contra la subunidad alfa de tubulina - Sigma-Aldrich

Anticuerpos secundarios:

- IgG Cabra anti-ratón (680 rojo) – 0,5 mg/ml – LICOR
- IgG Cabra anti-conejo (800 verde) – 0,5 mg/ml – LICOR

PCR cuantitativa

La técnica de PCR en Tiempo Real o cuantitativa es una técnica de alta sensibilidad y especificidad para la detección de ARN mensajero, siendo hoy en día ampliamente utilizada en laboratorios de investigación y clínicos. En la PCR en tiempo real los procesos de amplificación y visualización se producen de manera simultánea en un único tubo cerrado, a diferencia de la PCR convencional donde es necesario visualizar los productos amplificados en geles, comúnmente de agarosa o acrilamida (Bustin 2004). Además, se minimizan los tiempos asociados a la manipulación y posibles contaminaciones. Esta característica facilita a su

vez los procesos de automatización y la capacidad de analizar un mayor número de muestras (Dorak 2007). Por cada ciclo de PCR en Tiempo Real se puede detectar la amplificación del ADN de interés mediante la fluorescencia generada por el uso de agentes intercalantes o sondas específicas. Finalmente, mediante el uso de un software se realiza el análisis de los productos amplificados utilizándose curvas de desnaturalización.

Los agentes intercalantes como Syber Green (utilizado en el presente trabajo) se unen fuertemente al surco menor de la hélice de ADN emitiendo a 525 nm. De esta forma el aumento de fluorescencia se debe al incremento del ADN amplificado. El uso de Sybr Green se asocia a costos reducidos y fácil optimización del ensayo.

Tratamiento y extracción de ARN:

Astrocitos de corteza cerebral en placas de Petri de 35 mm (p35) fueron tratados en duplicado con los siARN y controles correspondientes, de acuerdo a lo detallado previamente. 24 o 48 horas después se procedió a la extracción de ARN: Se retiró el medio de las placas, se realizó un lavado con PBS frío y se agregaron 350µl /placa de reactivo TRIzol. Se levantó la monocapa con rastrillo de células, se disgregaron los restos celulares pipeteando y se recogió la muestra en un tubo Eppendorf que se guardó a -20°C hasta el momento de proseguir con el protocolo.

Soluciones:

- Reactivo TRIzol - Ambion

Las muestras en TRIzol, se sometieron a una serie de pasos con el fin de aislar el ARN. Detalladamente, se agregaron 70 µl de cloroformo a cada tubo, se agitó utilizando un vortex y se dejó reposar. Se centrifugaron las muestras 15 minutos a 12000 g, a una temperatura de 4°C. De esa centrifugación se obtuvieron 3 fases de las cuales la fase superior acuosa se pasó a un tubo Eppendorf donde se agregó 1 µl de acrilamida lineal Ambion (5mg/ml). Luego se agregaron 174 µl de isopropanol (0,5 ml por cada ml original de reactivo TRIzol), que luego de mezclar se dejó reposar

15 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifugaron las muestras 15 minutos a 12000 g, a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 300 µl de etanol 75%. Se volvió a centrifugar las muestras, 10 minutos a 12000 g, 4°C. Se descartó bien el sobrenadante y una vez que el pellet estuvo bien seco (sin trazas de alcohol) se resuspendió en 21,5 µl de H₂O libre de RNAsas.

Estas muestras se colocaron 30 minutos en hielo, luego 5 minutos a 65°C y por último se agregó 1 µl por tubo de inhibidor de RNAsas (RNAsin – stock 20 U/µl).

Continuando con el tratamiento del ARN lo que siguió fue una digestión con ADNasa para eliminar restos de ADN, donde se agregó a cada tubo 1 µl de ADNsa y 2,5 µl del buffer de esta ADNasa. Esta mezcla se incubó 30 minutos a 37°C y se le agregaron 2,5 µl del inhibidor de la ADNasa por 2 minutos, a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron las muestras 1,5 minutos a 10000 g, a una temperatura de 4°C, y se transfirió el sobrenadante a otro tubo.

Evaluación de la calidad y la cantidad del ARN total:

Evaluación de la calidad

Las reacciones de retrotranscripción de ARN pueden variar considerablemente en función de la integridad y la pureza del ARN de partida. El ARN no debe estar degradado ni contaminado con proteínas o ADN. La pureza e integridad del ARN se estimó mediante una espectrofotometría y una electroforesis en gel de agarosa 1,5%.

– Espectrofotometría: Mediante el espectrofotómetro de amplio espectro (220-270nm) NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific), se evaluó la pureza del ARN midiendo la relación existente entre la absorbancia a 260 y a 280 nm. Este valor debe estar comprendido entre 1,8 a 2, lo que indicaría que el ARN está libre de impurezas. Si el valor es menor que 1,8 significaría que el ARN tiene algún contaminante (proteínas, fenol, etc). Cuanto más bajo sea este valor, más contaminada estará la muestra.

– Electroforesis: Se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1,5% para evaluar la integridad del ARN extraído.

Un ARN intacto debe tener una banda fuerte de ARNr 28s y 18s. Más concretamente, la banda del ARNr 28s debe ser aproximadamente el doble de intensa que la banda de ARNr 18s (Figura 4). Esta proporción 2:1 (28s:18s) es un buen indicador de que el ARN está intacto. EL ARN parcialmente degradado tendrá un aspecto manchado sin bandas fuertes, o sin guardar la proporción 2:1. El ARN que se encuentre totalmente degradado aparecerá como una mancha de muy bajo peso molecular.

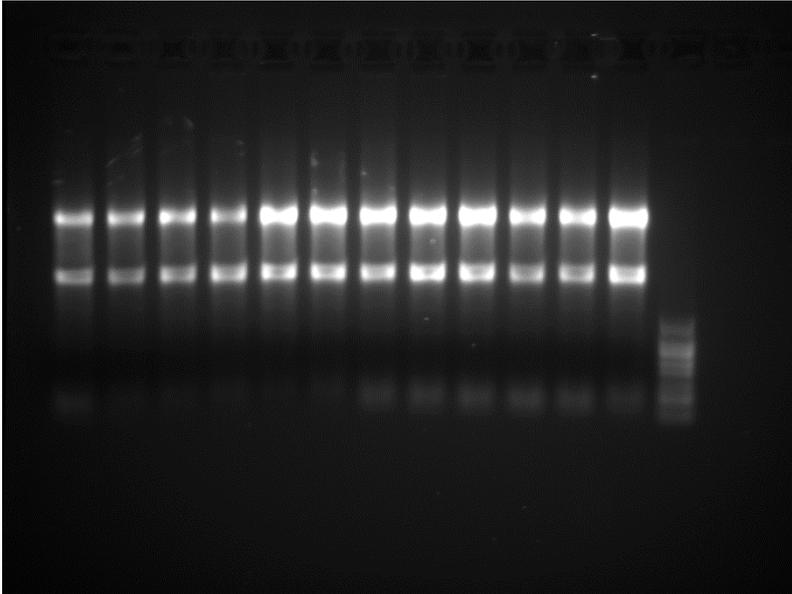


Figura 4: Prueba de calidad de ARN purificado mediante electroforesis en gel agarosa teñido con bromuro de etidio.

Cuantificación y retrotranscripción

Para obtener resultados reproducibles y comparables en el análisis de expresión génica, es necesario utilizar una cantidad fija de ARN en todos los experimentos.

La cuantificación del ARN se basa en medidas de absorbancia mediante espectrofotometría, utilizando el rango de luz ultravioleta (UV).

La cantidad de ARN de partida recomendada para obtener una cantidad óptima de ADNc (500 ng a 2 mg) es de 50 a 500 ng, siendo la cantidad mínima 25 ng. La cuantificación de la cantidad de ARN obtenido tras la purificación, se realizó también en el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000, a partir de 1µl de muestra.

Cuantificamos el ARN con el mismo fin que para el ensayo de Western Blot se cuantificaron las proteínas: para que los resultados del ensayo (en este caso de PCR cuantitativo) se deban exclusivamente a los efectos de los tratamientos y no a que se partió de diferentes cantidades de la muestra.

Con los resultados de la cuantificación se realizó la retrotranscripción del ARN, colocando ARN y H₂O de manera de contar con mismas concentraciones y mismos volúmenes finales en todas las muestras.

Para la retrotranscripción se utilizó por muestra: 1 µl de OligoDT 100 uM, 1 µl de dNTPs 10 mM, 1 µL de enzima Biotools High Retrotranscriptase, 2 µl de Buffer de la enzima 10x, 2 µl de DTT 100 mM, 1 µl de inhibidor de ARNasas, 0,6 µl de Mg y 1,4 µl de H₂O. Esta mezcla se incubó a 37°C por 50 minutos y a 70°C por 15 minutos.

PCR cuantitativa

Una vez ya obtenido el ADNc (ADN copia) se realizó la PCR. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica por la cual una única molécula de ADN sirve como molde para amplificación. Y una variante de este método es la PCR *real time* (o cuantitativa), que permite la cuantificación de un ADNc específico. Esta técnica ha sido sumamente utilizada para evaluar los niveles de ARN mensajero en un tipo celular dado. Los genes *housekeeping* o de referencia son genes de expresión constitutiva que se espera no cambien con los tratamientos (Nelson and Cox 2004) y son utilizados para normalizar los datos. Uno de los genes de referencia mejor conocido, y usado en el presente trabajo, es el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Se realizaron triplicados de todas las muestras (que a su vez eran duplicados de cada tratamiento) y se utilizaron cebadores para amplificar el ADNc de GAPDH (ARNm de expresión constitutiva) y de PDK2 (ARNm de interés).

Para la detección en tiempo real de la amplificación mediante PCR cuantitativa se pueden utilizar distintos tipos de métodos de detección, todos basados en la emisión de fluorescencia. Existen varios métodos que utilizan sondas específicas para el producto de amplificación deseado (por ejemplo, las sondas Taqman), las cuales aumentan la especificidad de la técnica aunque no permiten evaluar si además del producto deseado se

están amplificando otros productos en forma inespecífica. Por otro lado, el método más sencillo para la detección de la cantidad de ADN presente luego de cada ciclo de amplificación en la PCR cuantitativa es la utilización de agentes intercalantes que emiten fluorescencia en presencia de ADN doble hebra. El más utilizado para estas técnicas es el SYBR Green. Con este agente se detecta todo el ADN doble hebra presente en la reacción de amplificación, sea el producto de interés o un producto inespecífico, pero permite la detección de tales productos inespecíficos mediante la realización de curvas de desnaturalización (curvas de *melting*), en las que se pueden observar picos correspondientes a la disminución de fluorescencia al desnaturalizarse cada producto amplificado.

Para las reacciones de PCR se realizaron las siguientes mezclas en un volumen final de 10 μ L: 1 μ l del ADN copia (ADNc) correspondiente, 5 μ l de master mix 2x Quantimix easy kit de Biotools (contiene SYBR Green, Taq ADN polimerasa, dNTPs y MgCl₂), 0,25 μ l de mezcla de primers GAPDH/PDK2 10 uM, y 3,75 μ l de H₂O.

Los cebadores (*primers*) utilizados fueron:

- PDK2 (*directo*): TCAGCTAGGGGCCTTCTCTT
- PDK2 (*reverso*): CCGTACCCCAGGGGATAGAT
- GAPDH (*directo*): CACTGAGCATCTCCCTCACAA
- GAPDH (*reverso*): TGGTATTCGAGAGAAGGGAGG

La PCR cuantitativa se realizó en un termociclador Corbett ROTOR-GENE 6000. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 10 min de desnaturalización a 95 °C, 40 ciclos de amplificación compuestos por 3 pasos (15 s de desnaturalización a 95°C; 30 s de hibridación de primers a 56°C; y 30 s de extensión a 72°C), seguido de calentamiento gradual para realizar curva de *melting*.

Los resultados de la amplificación se analizaron utilizando el software Rotor-Gene 6000. El umbral (*threshold*) de amplificación fue establecido manualmente, de acuerdo a la región de las curvas de amplificación en las que se observó amplificación exponencial. Los ciclos umbrales (Ct) de cada muestra fueron exportados a una planilla de Excel para su análisis. Para la evaluación de los niveles de expresión del gen de interés se realizó una cuantificación relativa utilizando el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Este método es uno de los más utilizados para obtener

cuantificaciones rápidas de muchos genes. La cuantificación relativa por este método se sustenta en la comparación entre el nivel de expresión del gen a estudiar en las diferentes situaciones versus la expresión de este mismo gen en una situación control. Posteriormente este valor se compara con la diferencia de los niveles de expresión del gen de referencia de las mismas muestras. El método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ expresa entonces la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del control tal y como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{ratio} = 2^{-[\Delta Ct \text{ gen diana} - \Delta Ct \text{ gen de referencia}]} \rightarrow \text{ratio} = 2^{-[\Delta\Delta Ct]}$$

Procesamiento y análisis de datos

Cada experimento se repitió por lo menos 3 veces en forma independiente. Las comparaciones entre las medias se hicieron por análisis de varianza (ANOVA) seguido de análisis por el test de Tukey para comparaciones entre múltiples grupos. Las diferencias se declararon significativas si $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Graphpad Prism 5.0.

RESULTADOS

El tratamiento de cultivos celulares de astrocitos con siARN disminuyó la expresión del ARN mensajero para PDK2

Para evaluar el silenciamiento génico de PDK2 se realizaron 4 tratamientos: siARN contra PDK2, la isoforma de PDK de interés en este trabajo; siARN contra PDK1, una isoforma de PDK de baja expresión en astrocitos y mayor en neuronas; siARN control negativo (NC), sin un

blanco específico; y astrocitos tratados únicamente con el vehículo (control).

Para determinar las condiciones óptimas para el silenciamiento génico, se ensayaron 2 concentraciones de siARN (40 uM y 80 uM) y se aisló el ARN total de las células tratadas 24 h luego de la transfección, luego de lo cual se realizó la retrotranscripción a ADN copia y PCR cuantitativa en tiempo real para evaluar los niveles relativos de expresión del ARNm de PDK2.

Se observó una disminución significativa en los niveles de expresión del ARN mensajero para PDK2 cuando los cultivos fueron tratados con siARN para PDK2 y no se observaron cambios significativos en los tratamientos control (figura 5 A, B) ni en el tratamiento con siARN contra PDK1. Por lo tanto podemos afirmar que el silenciamiento de PDK2 con los siARN dirigidos a esta isoforma fueron altamente específicos para esta isoforma.

En la figura 5A se observa el retardo en el aumento de la fluorescencia durante la PCR cuantitativa correspondiente al ARN mensajero para PDK2 en los tratamientos de silenciamiento contra ese mensajero, comparado con los cultivos donde el silenciamiento fue con siARN NC, PDK1 y controles. También se observa el patrón de fluorescencia cuando se utilizaron primers contra GAPDH, el gen de referencia. En la PCR cuantitativa un retraso en los ciclos de amplificación se corresponde con una menor concentración inicial de las secuencias molde. La cuantificación relativa de los niveles de expresión de ARNm de PDK2 en las distintas muestras se presenta en la figura 5B.

No observamos diferencias significativas en los niveles de ARNm de PDK2 en las células tratadas con las diferentes concentraciones de siARN contra PDK2. Ambas concentraciones demostraron una efectiva disminución de la expresión del ARNm blanco, por lo que para los ensayos siguientes utilizamos la menor de éstas (Figura 5B).

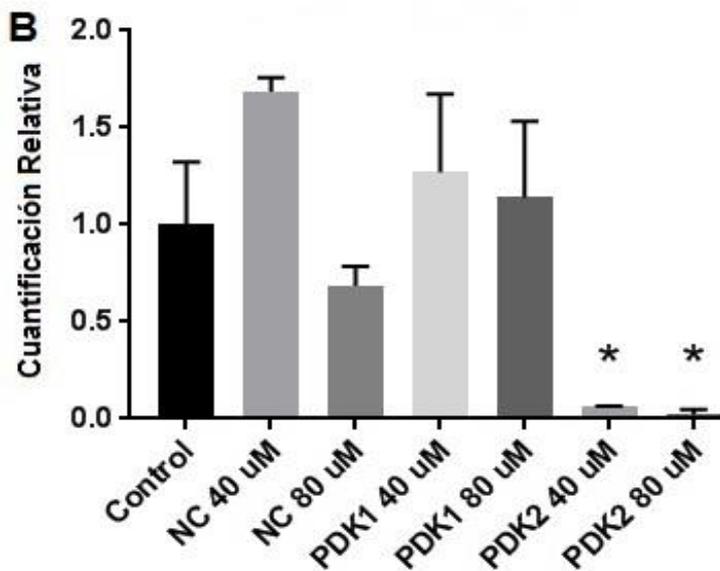
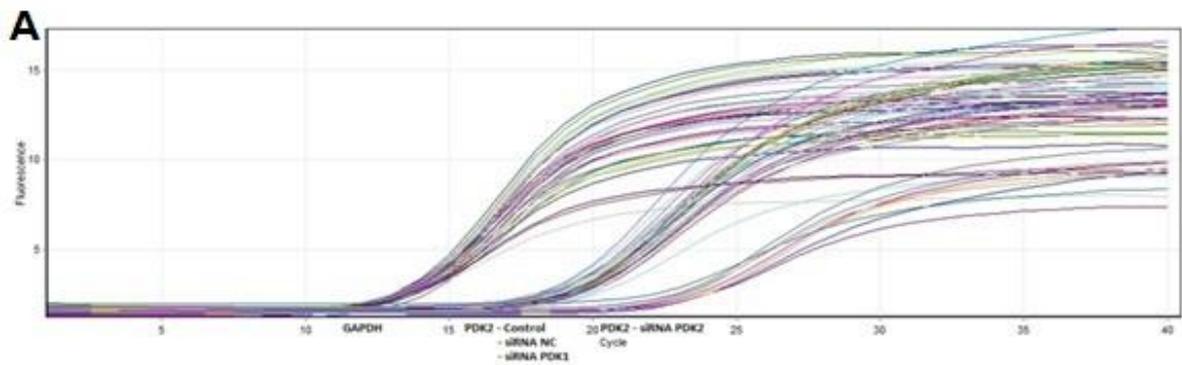


Figura 5: A) Gráfico que muestra la cantidad de ARN mensajero (tanto de PDK2 como de GAPDH) presente en cada muestra medido a través de la emisión de fluorescencia del compuesto orgánico SYBR Green. Se evidencia una concentración notablemente menor de ARNm para PDK2 cuando los cultivos fueron tratados con siARN para este ARNm. B) Nivel relativo de expresión de ARN mensajero de cultivos celulares de astrocitos sin tratar (Control), tratados con un siARN sin un complementario específico (NC), tratados con siARN para PDK1 y con siARN para PDK2. Todos los tratamientos se realizaron a una concentración de 40 y 80 μ M. Los datos se presentan en relación al grupo no tratado de astrocitos WT y todos ellos corresponden a la media \pm SEM (error estándar de la media) de 3 experimentos independientes. Se consideraron significativas las diferencias cuando $*p < 0,05$.

Curso temporal del tratamiento con siARN sobre el nivel de expresión de ARN mensajero

Se evaluó el curso temporal del tratamiento con los distintos siARN sobre el nivel de silenciamiento. Para esto se realizó la extracción de ARN a diferentes tiempos (24 y 48 horas) luego del tratamiento con los distintos siARN, para establecer el momento de mayor efecto silenciador. La extracción a las 24 horas post-silenciamiento mostró efectos significativos del silenciamiento de PDK2 respecto de los controles establecidos (Figura 6). La extracción a las 48 horas post-silenciamiento mostró una clara

tendencia a la disminución del mensajero para PDK2, que no llega a la significación estadística (Figura 7). Por lo tanto, los efectos del siARN sobre la expresión de ARNm de PDK2 fueron óptimos a las 24 h del tratamiento.

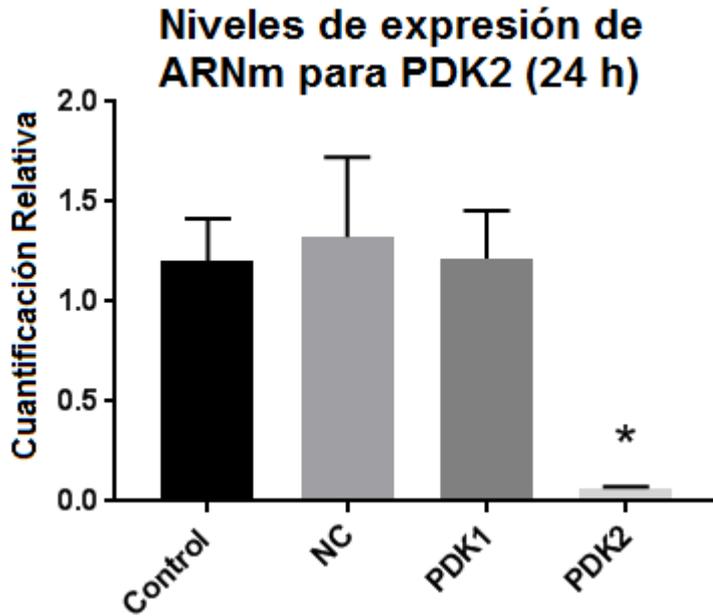


Figura 6: Expresión de ARN mensajero extraído 24 horas post-silenciamiento de cultivos celulares de astrocitos sin tratar (Control), tratados con un siARN sin un complementario específico (NC), tratados con siARN para PDK1 y con siARN para PDK2. Los datos se presentan en relación al grupo no tratado de astrocitos WT y todos ellos corresponden a la media \pm SEM (error estándar de la media) de 3 experimentos independientes. Se consideraron significativas las diferencias cuando $*p < 0,05$.

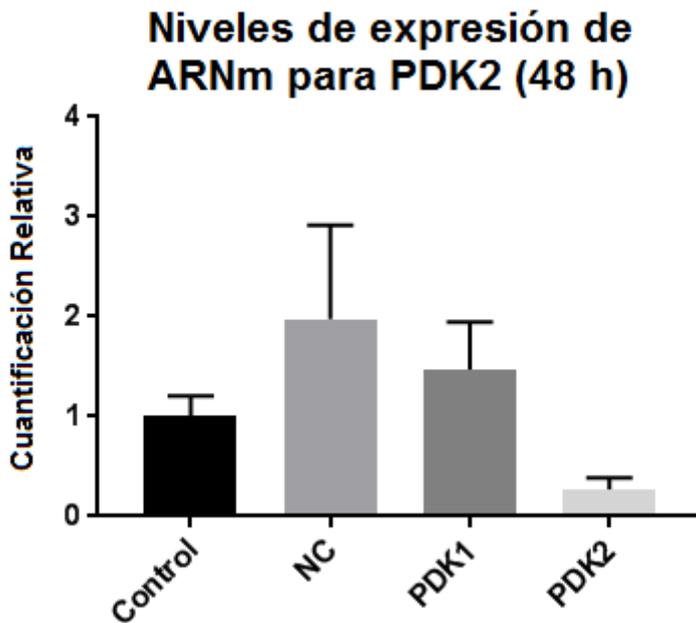


Figura 7: Expresión de ARN mensajero extraído 48 horas post-silenciamiento de cultivos celulares de astrocitos sin tratar (Control), tratados con un siARN sin un complementario específico (NC), tratados con siARN para PDK1 y con siARN para PDK2. Los datos se presentan en relación al grupo no tratado de astrocitos WT y todos ellos corresponden a la media \pm SEM (error estándar de la media) de 3 experimentos independientes. Se consideraron significativas las diferencias cuando $*p < 0,05$.

El tratamiento de astrocitos con siARN para PDK2 disminuye la actividad enzimática de PDK

Una vez comprobado el silenciamiento mediante el nivel de expresión del mensajero para PDK2, se realizaron ensayos para evaluar el efecto del tratamiento sobre la actividad piruvato deshidrogenasa kinasa en los astrocitos. Con este objetivo realizamos ensayos de Western Blot para detectar el nivel de fosforilación del complejo PDH.

Como se hizo referencia cuando se presentó el mecanismo de acción de PDK, la PDH es fosforilada (PDH-P) por medio de la acción de la enzima PDK. Por lo tanto, la detección de PDH-P en relación a la PDH total (PDH-T) es una manera de medir indirectamente la efectividad del silenciamiento de PDK.

Astrocitos de corteza cerebral fueron tratados como se detalló previamente con siARN para PDK2, PDK1, siARN NC o vehículo. Como esperábamos que los efectos de los siARN sobre la expresión proteica y actividad enzimática fueran más tardíos que los efectos sobre la expresión de ARNm, se lisaron las células y se extrajeron proteínas a las 48 h del inicio del tratamiento correspondiente.

El tratamiento de astrocitos con siARN contra PDK2 disminuyó significativamente el nivel de fosforilación de PDH respecto a la PDH total presente en el lisado celular (figura 8). No hubo cambios en el nivel de fosforilación cuando se trató con siARN contra PDK1. Podemos afirmar entonces que la incubación con siARN contra PDK2 disminuyó la actividad PDK en los astrocitos, manteniendo una mayor proporción de la PDH en su estado activo, no fosforilado.

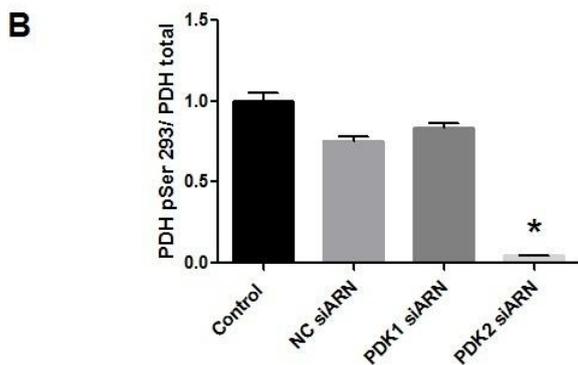
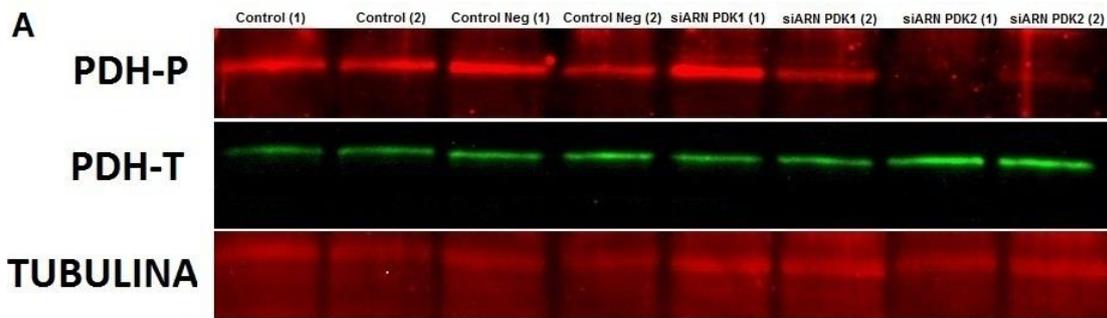


Figura 8: A) Inmuno réplicas de proteínas de astrocitos tratados con siARN contra PDK2, siARN contra PDK1, siARN NC y controles. Se utilizaron anticuerpos contra PDH fosforilada (PDH-P), PDH total (PDH-T) y tubulina como control de carga. La imagen fue tomada con un escáner Li-COR Odyssey de detección infrarroja. B) Expresión de PDH fosforilada con respecto a la total. Los datos se presentan en relación al grupo no tratado de astrocitos control y todos ellos corresponden a la media \pm SEM (error estándar de la media) de 3 experimentos independientes. Se consideraron significativas las diferencias cuando $*p < 0,05$.

El tratamiento de astrocitos con siARN contra PDK2 no induce alteraciones morfológicas

Los astrocitos responden a distintos tipos de injuria adoptando un “fenotipo reactivo”, caracterizado entre otras cosas por el aumento en la expresión de GFAP y cambios en la distribución del citoesqueleto, con desarrollo de prolongaciones gruesas y largas.

Se realizó una inmunofluorescencia contra GFAP en cultivos de astrocitos tratados con siARN. Como se puede observar en la figura 9, la morfología astrocitaria se mantuvo constante bajo las 4 situaciones (control, tratamiento con siARN NC, tratamiento con siARN PDK1 y tratamiento con siARN PDK2). Por lo tanto concluimos que el tratamiento con silenciadores no indujo cambios morfológicos compatibles con reactividad glial.

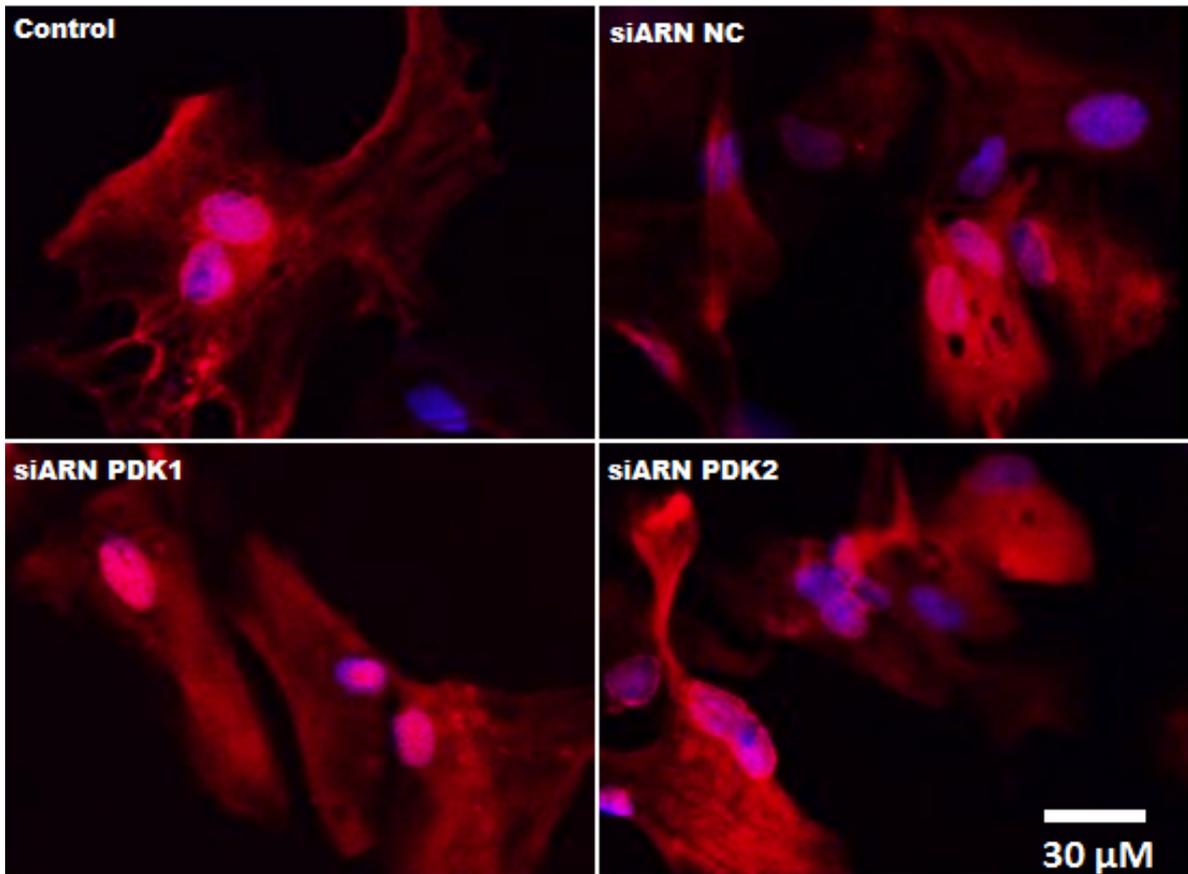


Figura 9: Microfotografías de astrocitos inmunoreactivos para GFAP. Los astrocitos fueron previamente tratados con un tratamiento control, con siARN NC, con siARN para PDK1 y con siARN para PDK2.

El tratamiento de astrocitos SOD1G93A con siARN contra PDK2 disminuye su toxicidad hacia motoneuronas

Una vez que optimizamos las condiciones de silenciamiento de PDK2 en astrocitos utilizando siARN, nos propusimos evaluar su efecto sobre el fenotipo neurotóxico de astrocitos aislados de un modelo animal de esclerosis lateral amiotrófica, las ratas que expresan el gen mutado SOD1G93A. Los astrocitos SOD1G93A inducen la muerte de motoneuronas en condiciones de co-cultivo. Para evaluar el efecto del silenciamiento de PDK2 en astrocitos SOD1G93A sobre su actividad neurotóxica se realizaron ensayos de co-cultivo entre astrocitos y motoneuronas. Se aislaron astrocitos de médula espinal de animales no transgénicos y SOD1G93A, los cuales fueron tratados con siARN contra PDK2 y controles como se detalló previamente. Luego de 24 h de tratamiento se plaquearon motoneuronas espinales sobre las monocapas de astrocitos, y 48 h después se cuantificó la supervivencia neuronal.

En concordancia con lo previamente demostrado por nuestro grupo, el cultivo de motoneuronas sobre monocapas de astrocitos SOD1G93A disminuyó la supervivencia de las mismas en aproximadamente un 50%, comparado a las motoneuronas cultivadas sobre astrocitos no transgénicos. Por otro lado, observamos una diferencia significativa en la supervivencia de motoneuronas cultivadas sobre las monocapas que previamente habían sido tratadas con los siARN para PDK2, llegando a niveles de supervivencia que se aproximan los obtenidos para motoneuronas cultivadas sobre astrocitos no transgénicos (Figura 10).

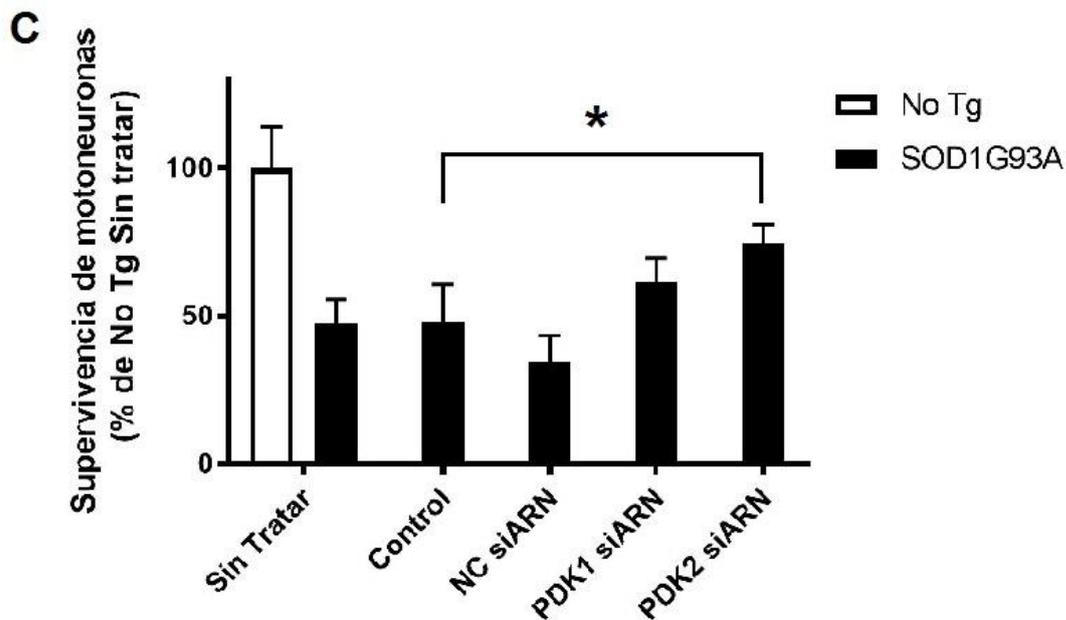
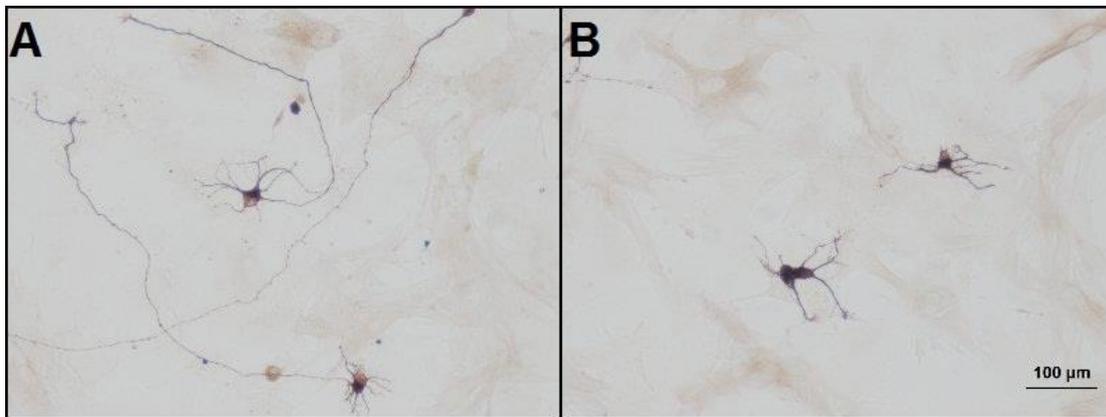


Figura 10: Cocultivo de motoneuronas y astrocitos luego de la inmunocitoquímica anti β III tubulina. Solo aquellas neuronas cuyas prolongaciones superaron el tamaño de 4 somas fueron tomadas en cuenta para los datos de supervivencia. En A se observan motoneuronas cultivadas sobre una monocapa de astrocitos WT, mientras que en B se observan motoneuronas cultivadas sobre una monocapa de astrocitos SOD1G93A. C, Datos derivados del conteo de motoneuronas. Se observa el número de motoneuronas sobre una monocapa de astrocitos No Tg sin tratar y luego el número de motoneuronas cultivadas sobre una monocapa de astrocitos SOD1G93A a la cual le fueron realizados tratamientos con diferentes siARN y controles. El cocultivo fue realizado 48 horas luego de los respectivos tratamientos a los astrocitos. El conteo fue realizado como se describe en la sección Materiales y Métodos. Se consideró 100% al número de motoneuronas que sobrevivieron sobre los astrocitos no transgénicos. Todos los datos corresponden a la media \pm SEM (error estándar de la media) de 3 experimentos independientes. Se consideraron significativas las diferencias cuando $*p < 0,05$.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo evaluamos la posibilidad de silenciar la expresión de PDK2 como estrategia para disminuir la toxicidad mediada por astrocitos hacia motoneuronas.

La expresión de la enzima SOD1 mutada en astrocitos determina efectos tóxicos hacia las motoneuronas. Estos astrocitos extraídos de los modelos animales portadores de enzima mutada, muestran una reducida capacidad mitocondrial para la síntesis de ATP, produciendo altos niveles de óxido nítrico, superóxido y peroxinitrito (Vargas et al., 2006), efectos que estarían asociados a su actividad neurotóxica ya que ambos aspectos pueden ser revertidos utilizando antioxidantes dirigidos a la mitocondria o compuestos que estimulen la actividad respiratoria mitocondrial (Cassina et al., 2008; Miquel et al., 2012, 2014). Específicamente, la administración de DCA permitió observar una recuperación de la función mitocondrial, disminución de la proliferación y una pérdida de la actividad neurotóxica en cocultivo con motoneuronas (Miquel et al., 2012). Las estrategias utilizadas en estos modelos para la restauración del metabolismo mitocondrial han sido exitosas en revertir la toxicidad astrocitaria hacia motoneuronas *in vitro* pero sus beneficios en modelos de ELA *in vivo* han resultado más modestos. Una de las posibles causas de esto podría ser la falta de especificidad de tipo celular que han presentado esos tratamientos *in vivo*. Nuestro grupo de investigación se propuso trabajar con una estrategia que permita mayor especificidad en la recuperación del metabolismo mitocondrial, dirigiéndolo únicamente a los astrocitos, sin afectar a otros tipos celulares. Para ello utilizamos la particularidad de la expresión de diferentes isoformas de PDKs en astrocitos y en neuronas

Como una primera aproximación a esa estrategia, en este trabajo se realizó la puesta a punto la técnica de silenciamiento con siARN de la expresión de PDK2 en cultivos celulares de astrocitos. Se verificó el efectivo silenciamiento de esta enzima, tanto a nivel del ARNm como de la actividad enzimática, además de descartar posibles daños celulares por la naturaleza de la técnica. Finalmente, se demostró que la inhibición de la expresión de PDK2 en astrocitos SOD1G93A *in vitro* fue capaz de disminuir la muerte neuronal inducida por este tipo celular. Estos resultados

refuerzan la importancia de la modulación metabólica para revertir el fenotipo neurotóxico de astrocitos y brindan soporte a la idea de continuar la línea de investigación con ensayos de silenciamiento de PDK2 *in vivo* en modelos animales de ELA. Además permiten proponer a la isoforma 2 de la PDK como blanco terapéutico para la ELA.

Este trabajo se ha centrado en el silenciamiento génico de la isoforma 2 de la enzima PDK en astrocitos. Existen varias isoformas de PDK (PDK1-4), cuya expresión varía dependiendo del tejido y del tipo celular. En el caso del sistema nervioso y los tipos celulares que nos interesan para este trabajo, las motoneuronas expresan únicamente PDK1 y PDK3, mientras que los astrocitos tienen altos niveles de expresión de PDK2 y PDK4 (Halim et al., 2010). De estas isoformas, PDK2 es la de mayores niveles de expresión y por eso fue seleccionada como blanco de este estudio. Sin embargo, no se debe descartar la importancia de PDK4, ya que recientemente se ha demostrado que su expresión está sujeta a grandes variaciones de acuerdo a las condiciones fisiológicas (Jeoung, 2015). En trabajos futuros podría explorarse el co-silenciamiento de ambas isoformas de PDK.

Disfunción mitocondrial en astrocitos y toxicidad

La estrategia experimental realizada en este trabajo se basa en la inhibición de la fosforilación de PDH mediante la disminución de la expresión de su kinasa específica PDK, lo cual aumentaría el aporte de sustratos a la fosforilación oxidativa y en consecuencia mejoraría la actividad mitocondrial. Nuestro grupo ha demostrado que estrategias similares aplicadas en cultivo a los astrocitos SOD1G93A resultaron eficaces en restablecer la función mitocondrial de los astrocitos y que la disfunción mitocondrial de estos astrocitos está íntimamente vinculada a su fenotipo neurotóxico (Cassina 2008, Miquel 2012, Miquel 2014). Esto implica que la disfunción mitocondrial en los astrocitos SOD1G93A es reversible y podría ser un blanco potencial para modular la evolución de la enfermedad.

A pesar de los resultados alentadores, aún resta aclarar cómo es que la estimulación de la actividad mitocondrial atenúa el la actividad neurotóxica de los astrocitos inducida por la expresión de SOD1 mutada. Las mitocondrias representan un sitio específico de acumulación de SOD1 mutada, donde induce daño mitocondrial, aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno y disfunción metabólica (Cassina et al., 2008; Kawamata and Manfredi, 2010). El consecuente estrés oxidativo en las mitocondrias de los astrocitos o el desbalance energético podría determinar la transformación de éstos a un fenotiponeurotóxico (Cassina et al., 2002; Vargas, Johnson, Sirkis, Messing, & Johnson, 2010). Se han propuesto numerosos mecanismos que podrían mediar la toxicidad de los astrocitos hacia las motoneuronas, como la disminución de la expresión de transportadores de glutamato y consecuente excitotoxicidad (Rothstein, 2009), liberación de NGF que actúe a través del receptor p75 en las motoneuronas (Pehar et al., 2004) o el daño nitrooxidativo por producción de óxido nítrico y peroxinitrito (Cassina et al., 2002), pero aún no se detectado el mecanismo concreto.

CONCLUSIONES

Luego de realizado el presente trabajo se deja constancia de la efectividad de la técnica utilizada para la realización del silenciamiento *in vitro* de la enzima PDK2, medido a través de técnicas de PCRc y Western Blot. Además de lograr el efecto deseado, no se observaron indicadores de estrés celular por efecto de la técnica utilizada para el silenciamiento. Todos estos pasos fueron realizados en astrocitos de animales WT. Por último, pero no menos importante, se obtuvo un aumento en la supervivencia de motoneuronas cultivadas sobre astrocitos TG que previamente habían sido tratados con siARN para PDK2, reforzando la hipótesis de nuestro grupo de trabajo que propone que en la degeneración de motoneuronas en la ELA estaría jugando un papel preponderante el funcionamiento del metabolismo mitocondrial de los astrocitos.

PERSPECTIVAS

Para continuar esta línea de investigación es de interés evaluar el efecto *in vivo* de la disminución de la expresión de PDK2 mediada por siARN exclusivamente en astrocitos en un modelo animal de ELA. Para ello, se podría recurrir a vectores virales que expresen dichos siARN. La inhibición de PDK utilizando vectores virales tiene la ventaja de permitir la expresión del siARN en un único tipo celular al poder utilizar promotores específicos, con lo que se podría lograr la inhibición de PDK únicamente en astrocitos. Con este objetivo se podrían generar vectores virales que expresen siARN contra PDK2 bajo el control del promotor de GFAP para limitar su expresión a los astrocitos. Usualmente la expresión de shARN a partir de un vector requiere promotores para la ARNpol III como el H1 o el U6, que no son específicos de tipo celular, sin embargo se han descrito sistemas que logran utilizar el promotor de GFAP para la producción de shARN (Yang & Mahato, 2011). De esta manera podríamos evaluar *in vivo* el efecto de la modulación metabólica de los astrocitos sobre la progresión de la enfermedad en un modelo de ELA, lo cual podría conducir al desarrollo de nuevas terapias efectivas para el tratamiento de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Amato A, Russell J. Neuromuscular disorders. China: McGraw Hill; 2008.
- Allaman, I., Belanger, M., & Magistretti, P. J. (2011). Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends in Neurosciences*, 34(2), 76–87.
<http://doi.org/10.1016/j.tins.2010.12.001>
- Allen, N. J. (2014). Astrocyte regulation of synaptic behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 439–463.
<http://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013053>
- Ameres, S. L., Martinez, J., & Schroeder, R. (2017). Molecular Basis for Target RNA Recognition and Cleavage by Human RISC. *Cell*, 130(1), 101–112. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.037>
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P. G., Oliet, S. H. R., Robitaille, R., & Volterra, A. (2014). Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron*, 81(4), 728–739. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.007>
- Bacman, S. R., Bradley, W. G., & Moraes, C. T. (2006). Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis: trigger or target? *Molecular Neurobiology*, 33(2), 113–131.
<http://doi.org/10.1385/MN:33:2:113>
- Barbeito, L. H., Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M. R., Peluffo, H., Viera, L., ... Beckman, J. S. (2004). A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 47(1-3), 263–274. <http://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.05.003>
- Beckman, J. S., Estévez, A. G., Crow, J. P., & Barbeito, L. (2016). Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS. *Trends in Neurosciences*, 24(11), S15–S20. [http://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01981-0](http://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01981-0)
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363–366. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/35053110>
- Bittar, P. G., Charnay, Y., Pellerin, L., Bouras, C., & Magistretti, P. J. (1996). Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral*

Blood Flow and Metabolism, 16(6), 1079–1089.

<http://doi.org/10.1097/00004647-199611000-00001>

- Bonnet, S., Archer, S. L., Allalunis-Turner, J., Haromy, A., Beaulieu, C., Thompson, R., ... Michelakis, E. D. (2007). A Mitochondria-K⁺ Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth. *Cancer Cell*, 11(1), 37–51. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.020>
- Broer, S., Rahman, B., Pellegri, G., Pellerin, L., Martin, J. L., Verleysdonk, S., ... Magistretti, P. J. (1997). Comparison of lactate transport in astroglial cells and monocarboxylate transporter 1 (MCT 1) expressing *Xenopus laevis* oocytes. Expression of two different monocarboxylate transporters in astroglial cells and neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(48), 30096–30102.
- Calcutt, N. A., Lopez, V. L., Bautista, A. D., Mizisin, L. M., Torres, B. R., Shroads, A. L., ... Stacpoole, P. W. (2009). Peripheral Neuropathy in Rats Exposed to Dichloroacetate. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 68(9), 985–993. <http://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181b40217>
- Cassina, P., Cassina, A., Pehar, M., Castellanos, R., Gandelman, M., Leo, D., ... Radi, R. (2008). Mitochondrial Dysfunction in SOD1 G93A -Bearing Astrocytes Promotes Motor Neuron Degeneration : Prevention by Mitochondrial-Targeted Antioxidants. *Neurobiology of Disease*, 28(16), 4115– 4122. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5308-07.2008>
- Cassina, P., Pehar, M., Vargas, M. R., Castellanos, R., Barbeito, A. G., Estévez, A. G., ... Barbeito, L. (2005). Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron apoptosis: Implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 93(1), 38–46. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02984.x>
- Cassina, P., Peluffo, H., Pehar, M., Martinez-Palma, L., Ressia, A., Beckman, J. S., ... Barbeito, L. (2002). Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. *Journal of Neuroscience Research*, 67(1), 21–29.
- Chen, S., Sayana, P., Zhang, X., & Le, W. (2013). Genetics of amyotrophic lateral sclerosis : an update. *Molecular Neurodegeneration*, 8(1), 1. <http://doi.org/10.1186/1750-1326-8-28>
- Chung, W.-S., Allen, N. J., & Eroglu, C. (2015, September). Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a020370>

- Clement, A. M., Nguyen, M. D., Roberts, E. A., Garcia, M. L., Boillée, S., Rule, M., ... Cleveland, D. W. (2003). Wild-Type Nonneuronal Cells Extend Survival of SOD1 Mutant Motor Neurons in ALS Mice. *Science*, 302(5642), 113–117. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/302/5642/113.abstract>
- Deuse, T., Hua, X., Wang, D., Maegdefessel, L., Heeren, J., Scheja, L., ... Schrepfer, S. (2014). Dichloroacetate prevents restenosis in preclinical animal models of vessel injury. *Nature*, 509(7502), 641–644. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature13232>
- Dupuis, L., Gonzalez de Aguilar, J.-L., Oudart, H., de Tapia, M., Barbeito, L., & Loeffler, J.-P. (2004). Mitochondria in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Trigger and a Target. *Neurodegenerative Diseases*, 1(6), 245–254. Retrieved from <http://www.karger.com/DOI/10.1159/000085063>
- Ferraiuolo, L., Kirby, J., Ferraiuolo, L., Kirby, J., Grierson, A. J., Sendtner, M., & Shaw, P. J. (2011). and Shaw , PJ . Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic ... Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, 7(11), 616–630. <http://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.152>
- Gandelman, M., Peluffo, H., Beckman, J. S., Cassina, P., & Barbeito, L. (2010). Extracellular ATP and the P2X7 receptor in astrocyte-mediated motor neuron death: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 7(1), 33. <http://doi.org/10.1186/1742-2094-7-33>
- Guillamón-vivancos, T., Gómez-pinedo, U., & Matías-guiu, J. (2015). Astrocitos en las enfermedades neurodegenerativas (I): *Neurología*, 30(2), 119–129. <http://doi.org/10.1016/j.nrl.2012.12.007>
- Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., ... et, al. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 264(5166), 1772–1775. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/264/5166/1772.abstract>
- Halim, N. D., Mcfate, T., Mohyeldin, A., Okagaki, P., Korotchkina, L. G., Patel, M. S., ... Verma, A. (2010). Phosphorylation status of pyruvate dehydrogenase distinguishes metabolic phenotypes of cultured rat brain astrocytes and neurons. *Glia*, 58(10), 1168–1176. <http://doi.org/10.1002/glia.20996>
- Hamilton, N. B., & Attwell, D. (2010). Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nature Reviews. Neuroscience*, 11(4), 227–238. <http://doi.org/10.1038/nrn2803>

- Harraz, M. M., Marden, J. J., Zhou, W., Zhang, Y., Williams, A., Sharov, V. S., ... Engelhardt, J. F. (2008). SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(2), 659–670. <http://doi.org/10.1172/JCI34060>
- Hervias, I., Beal, M. F., & Manfredi, G. (2006). Mitochondrial dysfunction and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & Nerve*, *33*(5), 598–608. <http://doi.org/10.1002/mus.20489>
- Howland, D. S., Liu, J., She, Y., Goad, B., Maragakis, N. J., Kim, B., ... Rothstein, J. D. (2002). Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99* (3), 1604–1609. <http://doi.org/10.1073/pnas.032539299>
- Itoh, Y., Esaki, T., Shimoji, K., Cook, M., Law, M. J., Kaufman, E., & Sokoloff, L. (2003). Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(8), 4879–84. <http://doi.org/10.1073/pnas.0831078100>
- Jeoung, N. H. (2015). Pyruvate Dehydrogenase Kinases: Therapeutic Targets for Diabetes and Cancers. *Diabetes & Metabolism Journal*, *39*(3), 188–97. <http://doi.org/10.4093/dmj.2015.39.3.188>
- Jessen, N. A., Munk, A. S. F., Lundgaard, I., & Nedergaard, M. (2015). The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochemical Research*, *40*(12), 2583–2599. <http://doi.org/10.1007/s11064-015-1581-6>
- Jha, M. K., Song, G. J., Lee, M. G., Jeoung, N. H., Go, Y., Harris, R. A., ... Suk, K. (2015). Metabolic connection of inflammatory pain: Pivotal role of a pyruvate dehydrogenase kinase-pyruvate dehydrogenase-lactic acid axis. *Journal of Neuroscience*, *35*(42), 14353–14369. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1910-15.2015>
- Jung, C., Higgins, C. M. J., & Xu, Z. (2002). Mitochondrial electron transport chain complex dysfunction in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, *83*(3), 535–545.
- Kawamata, H., & Manfredi, G. (2010). Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS. *Mechanisms of Ageing and Development*, *131*(7), 517–526. <http://doi.org/10.1016/j.mad.2010.05.003>
- Kirkinezos, I. G., Bacman, S. R., Hernandez, D., Oca-Cossio, J., Arias, L. J.,

- Perez-Pinzon, M. A., ... Moraes, C. T. (2005). Cytochrome c association with the inner mitochondrial membrane is impaired in the CNS of G93A-SOD1 mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(1), 164–172. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3829-04.2005>
- Liu, J., Lillo, C., Jonsson, P. A., Velde, C. Vande, Ward, C. M., Miller, T. M., ... Cleveland, D. W. (2004). Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron*, 43(1), 5–17. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.016>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <http://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- López-Vega, J. M., Calleja, J., Combarros, O., Polo, J. M., & Berciano, J. (1988). Motor neuron disease in Cantabria. *Acta Neurologica Scandinavica*, 77(1), 1–5. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1988.tb06965.x>
- Magrane, J., & Manfredi, G. (2009). Mitochondrial function, morphology, and axonal transport in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(7), 1615–1626. <http://doi.org/10.1089/ARS.2009.2604>
- Manfredi, G., & Xu, Z. (2005). Mitochondrial dysfunction and its role in motor neuron degeneration in ALS. *Mitochondrion*, 5(2), 77–87. <http://doi.org/10.1016/j.mito.2005.01.002>
- Mattiazzi, M., D'Aurelio, M., Gajewski, C. D., Martushova, K., Kiaei, M., Beal, M. F., & Manfredi, G. (2002). Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(33), 29626–29633. <http://doi.org/10.1074/jbc.M203065200>
- Miquel, E., Cassina, A., Martínez-Palma, L., Bolatto, C., Trías, E., Gandelman, M., ... Cassina, P. (2012). Modulation of astrocytic mitochondrial function by dichloroacetate improves survival and motor performance in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE*, 7(4), 1–9. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0034776>
- Miquel, E., Cassina, A., Martínez-Palma, L., Souza, J. M., Bolatto, C., Rodríguez-Bottero, S., ... Cassina, P. (2014). Neuroprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 70, 204–213.

- <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.019>
- Nagai, M. (2007). NIH Public Access, *10*(5), 615–622.
<http://doi.org/10.1038/nn1876.Astrocytes>
- Nam Ho Jeung, Yasmeen Rahimi, Pengfei Wu, W. N. P. L. and R. A., & Harris. (2015). Fasting induces ketoacidosis and hypothermia in PDHK2/PDHK4-double-knockout mice, *443*(3), 829–839.
<http://doi.org/10.1042/BJ20112197.Fasting>
- Pasinelli, P., & Brown, R. H. (2006). Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nature Reviews. Neuroscience*, *7*(9), 710–723. <http://doi.org/10.1038/nrn1971>
- Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M. R., Castellanos, R., Viera, L., Beckman, J. S., ... Barbeito, L. (2004). Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis : implications for amyotrophic lateral sclerosis, (Iii), 464–473. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02357.x>
- Pierre, K., & Pellerin, L. (2005). Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *Journal of Neurochemistry*, *94*(1), 1–14. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03168.x>
- Rand, T. A., Ginalski, K., Grishin, N. V., & Wang, X. (2004). Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(40), 14385–14389. <http://doi.org/10.1073/pnas.0405913101>
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. a, Sapp, P., Hentati, a, ... Deng, H. X. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, *362*(6415), 59–62. <http://doi.org/10.1038/362059a0>
- Rothstein, J. D. (2009). Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, *65 Suppl 1*, S3–9. <http://doi.org/10.1002/ana.21543>
- Rowland, L. P., & Shneider, N. A. (2001). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, *344*(22), 1688–1700. <http://doi.org/10.1056/NEJM200105313442207>
- Shi, P., Gal, J., Kwinter, D. M., Liu, X., & Zhu, H. (2010). Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1802*(1), 45–51. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.08.012>
- Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and

- glial scar formation. *Trends in Neurosciences*, 32(12), 638–647.
<http://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7–35.
<http://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Stacpoole, P. W. (1989). The Pharmacology of Dichloroacetate, 38(11), 1124–1144.
- Sutendra, G., Dromparis, P., Kinnaird, A., Stenson, T. H., Haromy, A., Parker, J. M. R., ... Michelakis, E. D. (2013). Mitochondrial activation by inhibition of PDKII suppresses HIF1a signaling and angiogenesis in cancer. *Oncogene*, 32(13), 1638–50.
<http://doi.org/10.1038/onc.2012.198>
- Vander Heiden, M. G. (2009). NIH Public Access, 324(5930), 1029–1033.
<http://doi.org/10.1126/science.1160809.Understanding>
- Vargas, M. R., Johnson, D. a, Sirkis, D. W., Messing, A., & Johnson, A. (2010). Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Annual Review of Neuroscience*, 28(50), 13574–13581.
<http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4099-08.2008.Nrf2>
- Vargas, M. R., & Johnson, J. a. (2010). Astroglialosis in amyotrophic lateral sclerosis: role and therapeutic potential of astrocytes. *Neurotherapeutics : The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 7(4), 471–481.
<http://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.05.012>
- Vargas, M. R., Pehar, M., Cassina, P., Beckman, J. S., & Barbeito, L. (2006). Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR-dependent motor neuron apoptosis. *Journal of Neurochemistry*, 97(3), 687–696. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03742.x>
- Vargas, M. R., Pehar, M., Cassina, P., Martínez-Palma, L., Thompson, J. A., Beckman, J. S., & Barbeito, L. (2005). Fibroblast growth factor-1 induces heme oxygenase-1 via nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) in spinal cord astrocytes: Consequences for motor neuron survival. *Journal of Biological Chemistry*, 280(27), 25571–25579. <http://doi.org/10.1074/jbc.M501920200>
- Vázquez, M. C., Ketzoián, C., Legnani, C., Rega, I., Sánchez, N., Perna, A., ... Medici, M. (2008). Incidence and Prevalence of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Uruguay: A Population-Based Study. *Neuroepidemiology*, 30(2), 105–111. Retrieved from

<http://www.karger.com/DOI/10.1159/000120023>

Whitehead Kathryn A., L. R. and A. D. G. (2009). Knocking down barriers: advances in siRNA delivery, (October), 129–138.

<http://doi.org/10.1038/nrd2742>

Yang, N., & Mahato, R. I. (2011). GFAP Promoter-Driven RNA Interference on TGF- β 1 to Treat Liver Fibrosis, 752–761.

<http://doi.org/10.1007/s11095-011-0384-y>

Zundert, B. Van, & Brown, R. H. (2016). Silencing strategies for therapy of SOD1-mediated ALS. *Neuroscience Letters*, 1–8.

<http://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.07.059>