

Maestría en Ciencias Biológicas
PEDECIBA BIOLOGÍA

Neuroinflamación en un modelo de
trasplante intraespinal de células gliales
aberrantes que sobre-expresan la
hSOD1^{G93A}

Tesis de Maestría
Orientación Neurociencias
Lic. Sofía Ibarburu

Orientador: Dr. Luis Barbeito
Laboratorio de Neurodegeneración
Institut Pasteur de Montevideo

Índice

RESUMEN	4
AGRADECIMIENTOS	6
INTRODUCCIÓN	7
ANTECEDENTES	8
La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)	8
La toxicidad de la SOD1 mutada	10
La neuroinflamación	12
Los astrocitos	12
Las células microgliales	14
Células gliales aberrantes SOD1 ^{G93A}	14
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Animales	18
Aislamiento y cultivo de células gliales aberrantes	19
Inmunocitoquímica de células gliales aberrantes	20
Marcación fluorescente de las células gliales aberrantes	21
Cultivo de microglía neonata.	21
Diseño experimental.	22
Procedimiento para el trasplante de células	23
Análisis histológico.	23
Análisis cuantitativo de células microgliales y astrocitos.	24
Análisis del tamaño y número de motoneuronas	25
Análisis estadístico	25
Consideraciones éticas	25
RESULTADOS	26
Expresión de SOD1 en las células gliales aberrantes mantenidas en cultivo celular.	26
Viabilidad y migración de las células trasplantadas	27
Activación de la microglía y los astrocitos del hospedero	29

Activación glial a lo largo de la médula espinal.	31
Evidencias de daño a motoneuronas.	34
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIÓN	39
PERSPECTIVAS.....	40
REFERENCIAS.....	41

RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Parkinson y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) tienen una creciente incidencia en la población. Se caracterizan por su progresión ineluctable, sin que existan tratamientos que puedan detener su avance. Numerosos trabajos han ayudado a determinar la existencia de un fenómeno patogénico común a estas patologías neurodegenerativas, la neuroinflamación crónica. Lejos de ser un evento celular secundario al daño de neuronas, se reconoce que la neuroinflamación puede contribuir a la neurodegeneración. Las microglías y astrocitos son actores centrales en la neuroinflamación, adoptando una variedad de fenotipos reactivos, hipertróficos o fagocíticos. Estos a su vez, interactúan con células inflamatorias del sistema inmune incluyendo a monocitos, mastocitos y linfocitos, constituyendo un microambiente celular degenerativo. Recientemente nuestro grupo ha reportado un nuevo fenotipo glial aberrante, aislado a partir de cultivos primarios de médula espinal de un modelo de rata de ELA que sobre-expresan la enzima superóxido dismutasa-1 humana con la mutación G93A (hSOD1^{G93A}). Estas células poseen una excepcional capacidad proliferativa y neurotóxica específica para las motoneuronas. El objetivo principal de este trabajo fue determinar la capacidad pro-inflamatoria de las células aberrantes luego de su aislamiento, expansión y ulterior trasplante en la médula espinal de ratas no-transgénicas. Estas células expresan altos niveles de la hSOD1^{G93A} la que fue usada para la identificación de las células trasplantadas por inmunohistoquímica. Se procedió a trasplantar 100 mil células aberrantes marcadas con el colorante fluorescente pkh26, en los segmentos de la médula lumbar de ratas no transgénicas, y los efectos fueron evaluados a los 7 días. Se observó que las células trasplantadas se mantenían mayoritariamente en el sitio de inyección, sin infiltrar significativamente el entorno celular. Parte de las células mostraron una acumulación de hSOD1^{G93A} en forma “mal plegada”. La inyección de células aberrantes produjo una fuerte estimulación de las células gliales del hospedero, caracterizada por marcada microgliosis y astrogliosis reactiva. La microgliosis se extendió bilateralmente hasta los segmentos cervicales de la médula espinal, sugiriendo una fuerte inducción inflamatoria. Por otra parte, las

motoneuronas cercanas al sitio del trasplante se encontraban rodeadas de microglía y astrocitos reactivos y mostraron agregados de ubiquitina. En conclusión, las células gliales aberrantes que sobre-expresan la hSOD1^{G93A} tienen el potencial de inducir neuroinflamación a lo largo de la médula espinal e incipiente daño a las motoneuronas, sugiriendo un nuevo mecanismo patogénico en la ELA.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer...

...en Primer lugar a Luis por abrirme las puertas del laboratorio y permitirme formar parte de su equipo, brindándome la confianza y herramientas necesarias para el trabajo diario.

...a mis compañeros de laboratorio Emiliano, Romina y Valentina, con quienes hace más de dos años que trabajo, y me han ayudado a llevar a cabo mi maestría.

...a Natalia y Hugo del Laboratorio de Neuroinflamación y Terapia Génica del Institut Pasteur de Montevideo, quienes me ayudaron a realizar los trasplantes.

...al departamento de Histología de Facultad de Medicina, que colabora estrechamente con nuestro laboratorio, desde el aporte de animales hasta la constante transferencia de conocimientos.

...a Giselle, Nathalia y Mercedes, integrantes del tribunal, que aceptaron amablemente corregir este trabajo.

...a mis amigos y a mi familia, de quien he tenido, tengo y tendré siempre, apoyo incondicional.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas, como la Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Parkinson, y Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) tienen una creciente incidencia e implican un alto costo socioeconómico. No existen métodos para su diagnóstico temprano ni terapias curativas efectivas. Además, aún se desconocen las causas últimas por las que las diferentes poblaciones neuronales mueren en dichas patologías. Durante muchos años, el foco de estudio estuvo puesto sobre las neuronas vulnerables, olvidando su entorno celular. En los últimos años, diferentes grupos enfocaron sus esfuerzos en el microambiente celular neurodegenerativo que se genera durante la fase sintomática de las diferentes enfermedades, incluyendo células gliales y células inmunes de origen sanguíneo. Hoy en día, el componente inflamatorio de dicho microambiente celular es un concepto emergente en neurociencias.

La inflamación es una respuesta celular que desempeña un rol fundamental removiendo células o tejidos dañados y comenzando el proceso regenerativo. Sin embargo, los procesos inflamatorios crónicos pueden escapar al control fisiológico y volverse una amenaza para los organismos. Un gran avance en la neurociencia ha sido la demostración de que la inflamación crónica juega un importante papel en los procesos neurodegenerativos [3, 4]. En la neuroinflamación, la activación de las células gliales e infiltración de células inmunitarias tiene como primer objetivo la regeneración del sistema nervioso dañado [5, 6]. Sin embargo la activación prolongada de las células gliales tiene un rol preponderante en la progresión de las enfermedades neurodegenerativas, creando condiciones adversas a la supervivencia neuronal y a la homeostasis sináptica, generando vulnerabilidad en varias poblaciones de neuronas [7-9]

El presente trabajo de maestría se enmarca dentro de una nueva hipótesis sobre la patogenia y progresión de las enfermedades neurodegenerativas propuesta por nuestro grupo. Esta hipótesis predice que la progresión de la neurodegeneración, particularmente en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), está fuertemente asociada a una función deletérea de las células gliales,

mediando la toxicidad de las motoneuronas y la progresión del daño a lo largo del neuroeje. En 2011, nuestro grupo encontró que la progresión del daño estaba asociado a la emergencia de un nuevo tipo celular: las células gliales aberrantes [10]. Si bien se conoce que estas células aberrantes se originan a partir de una población de microglías activadas, aún resta por conocer y caracterizar sus propiedades pro-inflamatorias.

En este contexto, el presente trabajo de tesis tuvo por objetivo la caracterización del efecto pro-inflamatorio y neurotóxico de la glía aberrante aislada de ratas transgénicas que sobre-expresan la enzima superóxido dismutasa-1 humana con la mutación G93A (hSOD1^{G93A}), causante de casos de ELA familiar. Para este fin, utilizamos una aproximación de trasplante de células aberrantes en la médula espinal lumbar de ratas no-transgénicas.

ANTECEDENTES

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa paradigmática. Fue descrita por primera vez en 1869 por el clínico y neurobiólogo Jean-Martin Charcot [11] quien observó una “palidez de mielina” en las porciones laterales de la médula espinal por donde transcurren los axones corticoespinales. La ELA se caracteriza por una parálisis y atrofia muscular progresiva, que se da como resultado de la degeneración de motoneuronas superiores en la corteza cerebral, e inferiores en tronco encefálico y la médula espinal [2, 12] (Figura 1). Tiene una incidencia de 2:100.000 y la edad promedio de inicio es de 60 años. Aproximadamente dos tercios de los pacientes comienzan con síntomas en las extremidades, principalmente con debilidad y atrofia muscular. El resto de los pacientes comienza con la degeneración de las motoneuronas superiores, y usualmente presentan espasticidad, disartria y disfagia. La parálisis en la ELA es progresiva y se extiende a lo largo del neuroeje; la muerte de los pacientes es debida muchas veces a fallas respiratorias [2, 12].

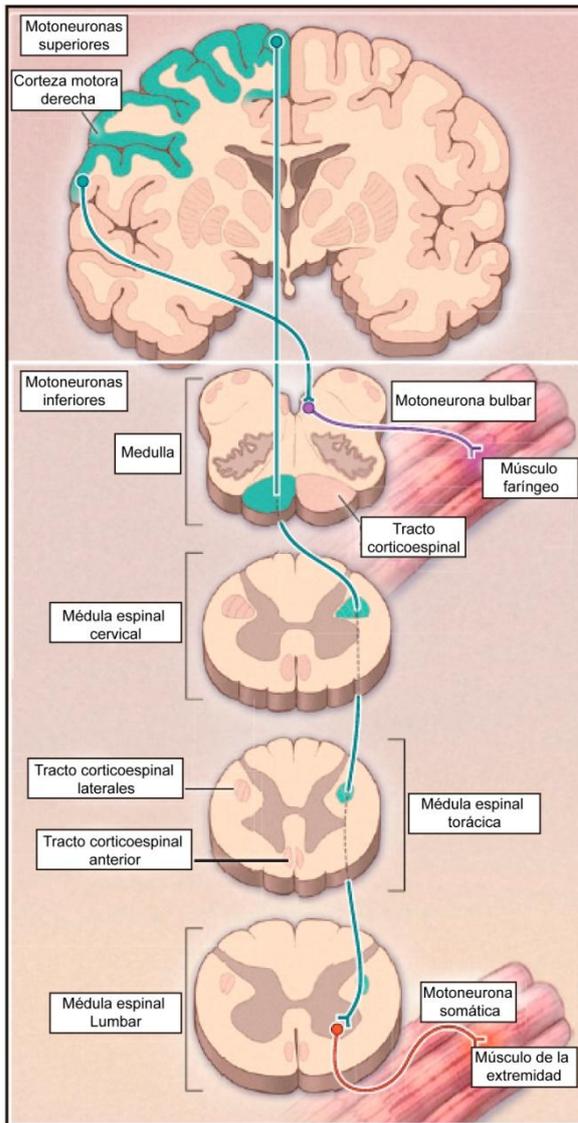


Figura 1. Sistema Motor. El sistema motor está compuesto por neuronas motoras corticoespinales (superiores) bulbares y en la corteza motora, y neuronas motoras espinales (inferiores) que inervan los músculos esqueléticos. En a ELA degeneran tanto las motoneuronas superiores como las motoneuronas inferiores y sus respectivas proyecciones axonales. *Extraído de Robert H. Brown y col., 2017, The New England Journal of Medicine [2].*

Del total de casos de ELA, el 90% son conocidos como “esporádicos” porque no presentan un componente hereditario aparente; mientras que el 10% restante se conoce como “familiares” y son aquellos casos que sí lo presentan. De los casos de ELA familiar, un 20% están asociados a más de 100 mutaciones puntuales en el gen que codifica para la Superóxido Dismutasa 1 (SOD1) [13]. Es a partir de la identificación y aislamiento de este gen que se han podido desarrollar modelos animales transgénicos -en ratones y ratas- en donde la sobreexpresión de diferentes mutaciones permite reproducir el fenotipo paralítico en animales adultos [14, 15].

Uno de los modelos ampliamente utilizados, y con el cual nuestro grupo de investigación trabaja, es el modelo de rata transgénica que expresa la

hSOD1^{G93A}. El cambio del residuo de Glicina en la posición 93 por una Alanina, genera la proteína mutante, que mantiene la actividad dismutasa [16]. Las ratas transgénicas desarrollan una enfermedad de motoneuronas, mostrando parálisis de los miembros posteriores y/o anteriores a los 6 meses de edad. A medida que progresa la patología, la masa muscular va disminuyendo hasta llegar a un estado de parálisis avanzada en que deben ser sacrificadas. La duración entre el inicio de la parálisis y la parálisis total es de aproximadamente 21 días. Los modelos murinos de ELA expresando mutaciones de la SOD1 humana han permitido realizar numerosos avances en el entendimiento de los mecanismos patogénicos que puedan estar operando, en la contribución de los diferentes tipos celulares en esta enfermedad y en el desarrollo de fármacos para la ELA [17].

La toxicidad de la SOD1 mutada en motoneuronas ha sido bien estudiada durante más de 20 años, sin embargo, aún se desconocen los mecanismos últimos por los que las mutaciones de SOD1 confieren una toxicidad de motoneuronas. Centenares de publicaciones han mostrado los efectos tóxicos celulares de las mutaciones de SOD1, incluyendo estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad, alteración del transporte axonal, estrés de retículo endoplasmático, aumento de señales inflamatorias, entre otros [12, 18]. Los efectos tóxicos observados sugieren una “ganancia de función” de la proteína, más que a una pérdida de la actividad enzimática intrínseca de superóxido dismutasa [19]. Se ha observado que una proporción de los mutantes de la SOD1 no se pliegan correctamente, implicando una acumulación de la SOD1 con plegado anormal, lo que contribuye a la toxicidad celular [18]. Las formas mal plegadas de la SOD1 forman inclusiones citoplasmáticas ubiquitinizadas que se encuentran tempranamente en la enfermedad y aumentan a medida que esta progresa. Estos cúmulos inhiben la maquinaria de proteosomas, disminuyen la actividad de chaperonas, y desregulan la función de organelos incluyendo Golgi, retículo endoplasmático y mitocondrias [18] (Figura 2a). A su vez, estudios recientes muestran que los agregados de esta proteína se pueden propagar de una célula a otra en sistemas de cultivo e incluso se pueden transmitir de una manera priónica al ser inoculadas en animales [20-22] (Figura 2b). Se destaca la importancia de la hipótesis emergente de una

transmisión priónica de la ELA a través de la SOD1, pues podría aplicarse a todos los casos de ELA esporádica, sin necesidad que existan mutaciones.

Teniendo en cuenta que la SOD1 mutada se expresa en diferentes tipos celulares, y no sólo en la motoneurona, se anticipa que el daño no está restringido a las mismas. La evidencia experimental en modelos murinos y en pacientes con ELA, ha demostrado que además de la vulnerabilidad primaria de las motoneuronas, otros tipos celulares contribuyen activamente a la

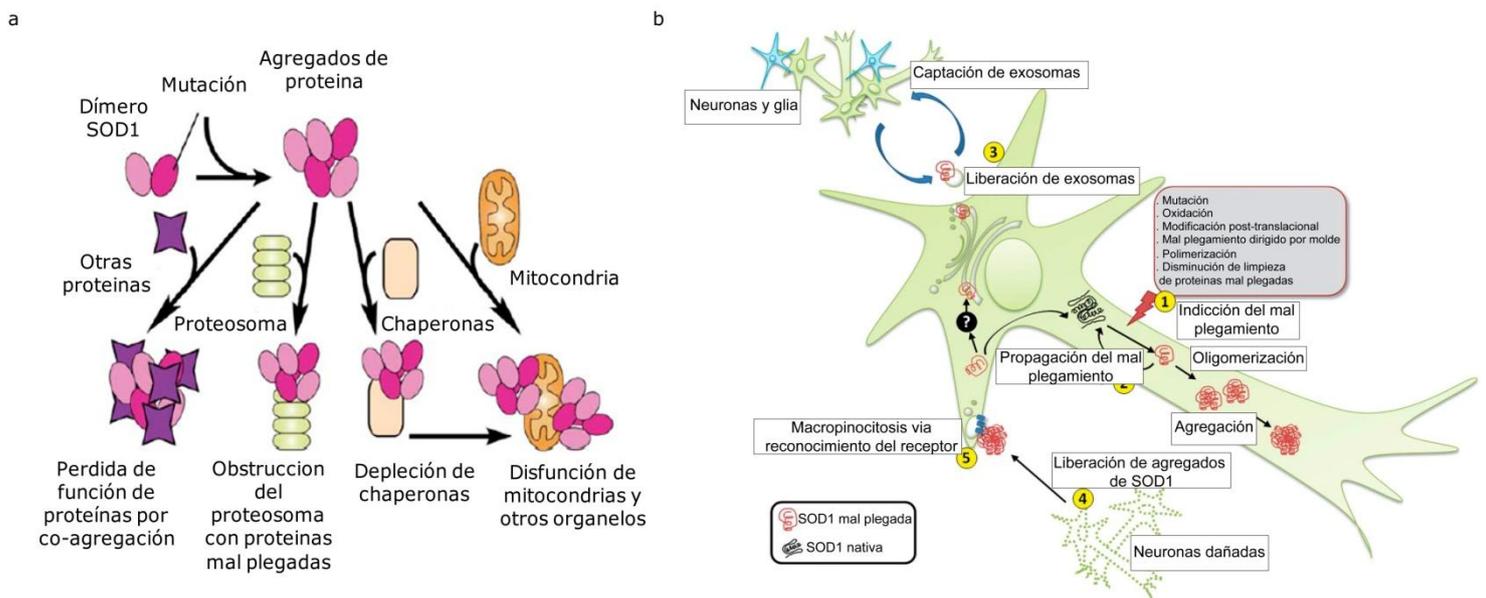


Figura 2. Mecanismos de toxicidad en la ELA mediados por agregados de la SOD1 (a). La maquinaria celular que podría verse afectada por la SOD1 mutada mal plegada incluye: i) co-agregación de componentes citoplasmáticos esenciales; ii) obstrucción del proteosoma, inhibiendo por lo tanto la degradación de diferentes proteínas celulares; iii) saturación de las chaperonas citoplasmáticas que catalizan el plegamiento esencial de las proteínas; y iv) daño de mitocondrias por agregación sobre la superficie citoplasmática y/o el transporte dentro del espacio transmembrana de la mitocondria. *Modificado de Severine Boillee y col., 2006, Neuron* (Boillee, Vande Velde et al. 2006).

Propagación y transmisión de la SOD1 mal plegada (b). El mal plegamiento de la SOD1 puede ser inducido por factores estresores dentro y fuera de la célula (1). La proteína mal plegada puede servir de molde para inducir varios ciclos de mal plegamiento convirtiendo a la SOD1 nativa en moléculas con isoformas patológicas, las cuales pueden formar oligómeros y agregados (2). Probablemente durante los estadios iniciales de la enfermedad, la SOD1 mal plegada también se acumule en el sistema RE-Golgi por un mecanismo desconocido (círculo negro), donde puede entrar en la vía de secreción mediada por vesículas, incorporándose sobre la membrana de los exosomas y saliendo de la célula por secreción (3), pudiendo ser captadas por células vecinas. Alternativamente, durante los estadios finales de la enfermedad, donde las neuronas están dañadas y mueren, grandes agregados de proteínas conteniendo la SOD1 mal plegada son liberados (4) pudiendo ser captados por células vecinas vía macropinocitosis (5) *Modificado de Leslie I Grad y col., 2014, Prion* (Grad, Pokrishevsky et al. 2014).

patología. Este mecanismo es conocido como toxicidad "sin autonomía celular" de las mutaciones de la SOD1 [18, 23, 24]. Por ejemplo, se demostró que la expresión de la SOD1 humana mutada únicamente en las motoneuronas no es suficiente para desarrollar la enfermedad [25, 26]. Por otro lado, el silenciamiento genético de la SOD1 mutante en los astrocitos enlentece la progresión de la enfermedad durante la fase de parálisis, pero no tenía efecto en el tiempo de inicio de los síntomas [27]. Resultados similares fueron reportados cuando la expresión de la SOD1 fue silenciada en la microglia [28] o en ambos [29].

La neuroinflamación se define como una respuesta inmune innata del Sistema Nervioso Central (SNC) frente a estímulos nocivos como patógenos, residuos metabólicos tóxicos o estrés crónico leve, que aparecen como consecuencia de un trauma, infecciones o enfermedades neurodegenerativas. Hasta hace poco tiempo la neuroinflamación se consideraba como un evento celular secundario al daño o muerte de neuronas, que se daba para limitarlo y promover la regeneración del SNC. Sin embargo, actualmente se reconoce que en determinadas condiciones esta respuesta puede volverse crónica y provocar activamente la neurodegeneración [8]. Los principales agentes involucrados en la neuroinflamación son las células gliales, pero es importante tener en cuenta que estas interactúan con otras células inflamatorias del sistema inmune incluyendo monocitos, mastocitos y linfocitos. La respuesta neuroinflamatoria ha recibido atención en los últimos años, ya que puede ser un potencial blanco para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Los astrocitos representan la población celular más numerosa dentro del SNC, y cumplen numerosas tareas críticas en el mantenimiento y el buen funcionamiento del sistema nervioso. Estos se encargan de suministrar metabolitos a las neuronas [30]; de regular el fluido de sangre y la barrera hematoencefálica [31]; de modular la excitabilidad neuronal y actividad sináptica a través del control de los niveles extracelulares de iones, neurotransmisores y fluidos [32-34]. A su vez, cuando ocurre un daño en el SNC, los astrocitos responden aumentando su proliferación y mostrando un fenotipo reactivo que se caracteriza por hipertrofia del cuerpo celular y su

núcleo, y por el desarrollo de procesos finos y largos, con un alto contenido de proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Además, los astrocitos reactivos expresan una gran variedad de marcadores como proteínas de citoesqueleto, moléculas de superficie y de matriz, proteasas, inhibidores de proteasas y numerosos factores de crecimiento y citoquinas [35, 36]. En las enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson y ELA se observa una astrocitosis de este tipo, contribuyendo a la patogénesis de la enfermedad[37].

En pacientes con ELA, se ha visto que los astrocitos reactivos muestran un aumento en la inmunoreactividad por GFAP y la proteína de unión al calcio S100 β [38]. Además expresan marcadores inflamatorios como ciclooxigenasa 2 (COX-2) [39], óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) [40, 41]. Un patrón similar de cambios en los astrocitos se ha descrito en los modelos animales de ELA, incluyendo a los modelos murinos que sobre-expresan la SOD1 humana con diferentes mutaciones. Existen numerosos trabajos que muestran que los astrocitos transgénicos que sobre-expresan la SOD1 humana mutada son capaces de inducir daño a las motoneuronas. Algunos de los mecanismos mediante los cuales los astrocitos ejercen su toxicidad son: i) toxicidad mediada por NGF liberado por los astrocitos [42, 43]; ii) disfunción mitocondrial asociada al estrés nitro-oxidativo observado en astrocitos SOD1^{G93A}, lo que promueve la muerte de las motoneuronas circundantes [44, 45]; iii) aumento de los niveles extracelulares de glutamato como consecuencia de la disminución en la expresión del transportador de glutamato GLT-1 [46-48].

La contribución que tienen los astrocitos también ha sido investigada en estudios de trasplante. En un trabajo realizado por Lepore y col 2008 [49] se muestra que el trasplante de precursores gliales, que no portan la mutación de SOD1, en la médula espinal cervical de ratas transgénicas SOD1^{G93A}, protege a las motoneuronas. Esta protección llevó al aumento significativo en la supervivencia de los animales, confirmando que el disfuncionamiento de los astrocitos confiere vulnerabilidad a las motoneuronas.

Las células microgliales son poblaciones especializadas de macrófagos que se encuentran en el SNC. Se originan a partir de progenitores generados en los tejidos hematopoyéticos y entran al SNC, durante el desarrollo, a través de vasos sanguíneos, los ventrículos o las meninges [50, 51]. Estudios de imagenología *in vitro* e *in vivo*, han mostrado que la microglía es altamente dinámica, incluso cuando el cerebro se encuentra en condiciones fisiológicas normales [52-55]. Estas células se mueven constantemente para monitorear el parénquima cerebral, y pueden responder rápidamente a daños patológicos aumentando su proliferación, fagocitosis y liberando neurotransmisores, citoquinas proinflamatorias y especies reactivas del oxígeno, así como citoquinas antiinflamatorias y factores neurotróficos. [55, 56]. Por lo tanto las células microgliales tienen la capacidad de afectar la sobrevivencia de las neuronas.

En la ELA, la activación microglial es un componente principal en la patología, y ha sido ampliamente documentada en tejido post-mortem de pacientes. En modelos animales de ELA, existe una activación temprana de estas células a nivel del asta ventral de la médula espinal, en donde residen las motoneuronas inferiores [57, 58]. Otros han reportado el aumento de algunos marcadores de superficie durante la progresión de la patología. Estos son: Iba1 que está asociado a las funciones de migración y fagocitosis [59]; MHC de clase II (MHCII) que transforma a la microglía en una célula presentadora de antígeno [60]; y CD68 un marcador típico de fagocitosis, que en ELA ya se ve aumentado en la fase pre-clínica de la enfermedad [61]. En cuanto a los mecanismos mediante los cuales estas células ejercen toxicidad, se han descrito inducción de daño neuronal mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β [62], reducción de la expresión y liberación de factores tróficos [63], entre otros.

Células gliales aberrantes SOD1^{G93A}. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio mostraron que la rápida progresión de la parálisis en ratas transgénicas que sobre-expresan la hSOD1^{G93A}, coincide con la aparición de una subpoblación de células gliales con fenotipo aberrante [10]. Estas células tienen un fenotipo astrocitario pero derivan de microglía [64]. Expresan

marcadores astrocitarios y microgliales, tienen una alta tasa proliferativa y son excepcionalmente tóxicos para motoneuronas *in vitro*. Además proliferan activamente durante la fase sintomática de la enfermedad y se encuentran rodeando a las motoneuronas. Como estas células están asociadas a la progresión de la parálisis en las ratas hSOD1^{G93A}, posiblemente estén asociadas a las reacciones inflamatorias dañinas del microambiente que rodea a la motoneurona en el asta ventral de la médula espinal [1]. Como se muestra en la Figura 3, durante la progresión de la enfermedad, diferentes tipos celulares se acumulan alrededor de la motoneurona. Las células gliales aberrantes podrían facilitar la generación de este microambiente neurodegenerativo que promueve la rápida progresión del daño a segmentos adyacentes del neuroeje [1]. En este contexto las células gliales aberrantes podrían ser un potencial blanco para el desarrollo de terapias que puedan enlentecer la progresión de la enfermedad.

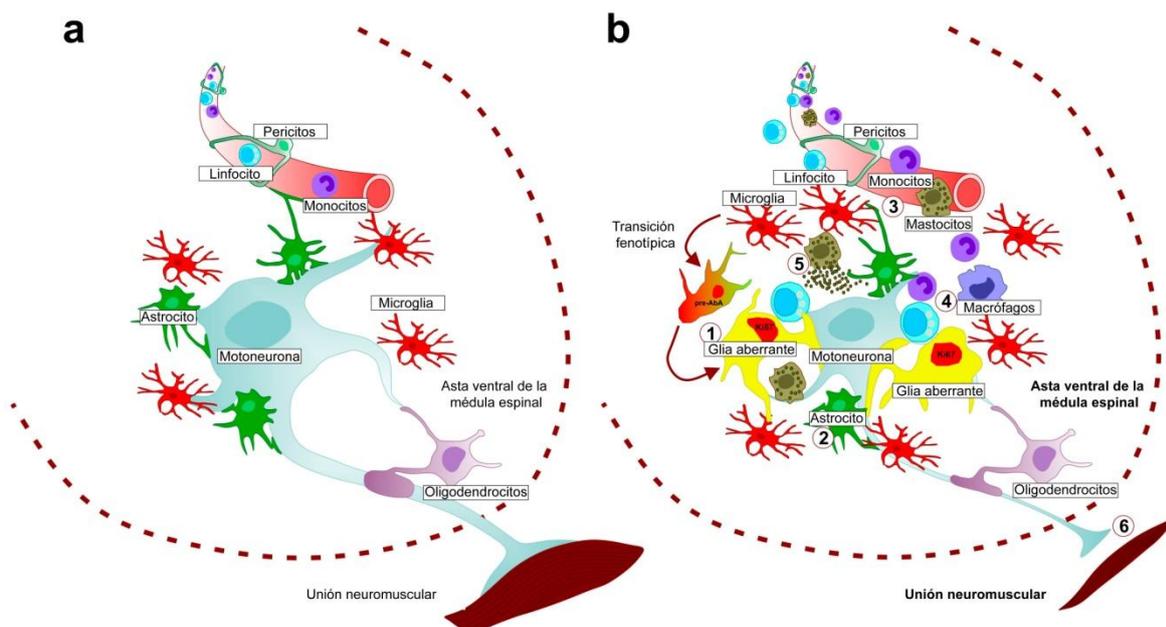


Figura 3. Representación esquemática del microambiente celular neuroinflamatorio que se forma rodeando a las motoneuronas en la enfermedad de ELA. En a se muestra la constitución normal de microambiente celular que rodea a las motoneuronas en el asta ventral de la médula espinal. b Durante la progresión de la ELA, diferentes tipos de células se acumulan rodeando a las motoneuronas dañadas. Una característica es la aparición de células gliales aberrantes que derivan de la microglia activada. Además los astrocitos proliferan y se vuelven reactivos. La barrera hematoencefálica se vuelve más permeable permitiendo la entrada de diferentes tipos celulares incluyendo monocitos, linfocitos y mastocitos. Modificado de Trias y col., 2017, *Neurosci Lett* [1].

Las células gliales aberrantes pueden ser aisladas en cultivos celulares primarios de la medula espinal de ratas transgénicas hSOD1^{G93A} que muestran parálisis avanzada. Estos cultivos generan un alto número de microglías que proliferan activamente y que luego de algunos días dan lugar a una monocapa confluyente de células aplanadas con fenotipo astrocitario. En la médula espinal de ratas hSOD1^{G93A} las glías aberrantes se localizan rodeando a las motoneuronas en degeneración, y pueden ser identificadas por la expresión simultánea de marcadores astrocitarios (GFAP y S100β) y microgliales (Iba1, CD11b y CD63). La inhibición farmacológica de estas células en ratas transgénicas hSOD1^{G93A} con el inhibidor de tirosina quinasas masitinib, resultó en una sobrevida significativa de los animales, incluso cuando el tratamiento comenzó luego del inicio de la parálisis [65].

Para poder entender aún más el rol patogénico de esta población de células gliales aberrantes en la progresión de la enfermedad, nos propusimos aislar estas células de la medula espinal de ratas transgénicas hSOD1^{G93A} y trasplantarlas en la médula espinal de ratas no transgénicas de la misma colonia. Esto nos permitiría determinar si estas células gliales aberrantes son capaces de inducir neuroinflamación en el hospedero, así como daño a motoneuronas.

HIPÓTESIS

En el contexto del conocimiento actual, predecimos que las células gliales aberrantes que expresan mutaciones de la SOD1 humana poseen una actividad pro-inflamatoria intrínseca y ejercen una influencia neurotóxica para motoneuronas. Un mecanismo propuesto es que las células gliales aberrantes secretan factores solubles que contribuyen en forma autócrina y parácrina a la neuroinflamación, activando células gliales en el entorno celular. Por tanto, el trasplante de estas células en la medula espinal de ratas no transgénicas debería ser capaz de generar una respuesta neuroinflamatoria en el hospedero.

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo fue determinar el potencial neuroinflamatorio y neurotóxico que tienen las células gliales aberrantes aisladas de la médula espinal de ratas transgénicas hSOD1^{G93A} *in vivo*.

Objetivos específicos

1. Caracterizar el trasplante de células gliales aberrantes hSOD1^{G93A} en la médula espinal de animales no transgénicos, evaluando su capacidad proliferativa y migratoria.
2. Determinar la actividad neuroinflamatoria de las células gliales aberrantes sobre células microgliales y astrocitarias del hospedero.
3. Determinar el efecto de las células gliales aberrantes sobre la viabilidad de las motoneuronas espinales del hospedero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron animales provenientes de la colonia transgénica de ratas que sobre-expresan la hSOD1^{G93A}. Las ratas transgénicas Sprague Dawley hSOD1^{G93A} L26H, originalmente desarrolladas por Howland *et. al.* [15], fueron adquiridas en Taconic Farms Inc. y mantenidas en la Unidad de Reactivos Biológicos de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina, UdelaR. Se utilizaron ratas transgénicas heterocigotas. Estos animales se obtienen de la cruce de machos hSOD1^{G93A} heterocigotas con hembras no transgénicas. La progenie resultante está constituida por 50% animales transgénicos y 50% no transgénicos. Los cultivos de células gliales aberrantes se realizaron a partir de hembras transgénicas hSOD1^{G93A} sintomáticas. Los trasplantes de células aberrantes fueron realizados en hembras no transgénicas hermanas de las hembras de las cuales fueron realizados los cultivos. De este modo se utilizaron animales singénicos, de forma de evitar el rechazo del trasplante.

Para determinar cuáles crías portaban el gen se realizó el genotipado de las camadas utilizando como método la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico extraído de la cola de los animales a las tres semanas de haber nacido. Utilizando un bisturí estéril se corta aproximadamente 0,5 cm de la cola de cada una de las ratas, y la porción de tejido se coloca en un microtubo conteniendo 300 µl de *buffer* de digestión de colas (TDB: 50 mM Tris pH 8; 50 mM EDTA; 0,5% SDS). Luego se agrega a cada tubo 185 µl de TDB + 15 µl de Proteínasa K (New England BioLabs Inc. #P8102S), y se incuban los tubos a 65°C durante 15 minutos para inactivar las ADNasas. A continuación se incuban a 50°C durante 8 hs para disgregar de forma adecuada el tejido. Una vez realizada la digestión, los tubos se incuban a 95°C durante 15 minutos para inactivar la Proteínasa K y evitar que posteriormente degrade la Taq. polimerasa. Para realizar la PCR se utiliza 1µl de una dilución 1:20 en H₂O del producto de la digestión. En la tabla 1 se detalla la composición de la mezcla de cada reacción de PCR, y en la tabla 2 se detallan las temperaturas y el tiempo establecido para cada uno de los

pasos de los ciclos. Los cebadores utilizados fueron *Forward*. 3' GTC GCA TCA GCC CTA ATC CA 5' y *Reverse*. 3' CAC CAG TGT GCG GCC AAT GA 5'

Tabla 1. En la siguiente tabla se detallan los componentes y la concentración de cada uno de ellos, en la mezcla de cada PCR.

Stock	Concentración final	Volumen (μ l)
H ₂ O para PCR	-	14,5
PCR buffer (Perkin Elmer) 10X	1X	2
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	1,2
dNTP's 5 mM (Invitrogen)	0,2 mM	0,8
Cebadores 10 μ M	0,2 μ M	0,4
Taq Polimerasa 5 U/ μ L	0,25 U/ μ L	1
Volumen Final	-	19

Tabla 2. Temperaturas y tiempo establecido para cada uno de los pasos de los ciclos de la PCR. Los pasos de desnaturalización, unión al cebador y elongación se repiten 35 veces

Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo (min)	Objetivo
95	2	Activacion de la Taq pol
95	0,5	Desnaturalizacion de ADN
60	0,5	Unión del cebador
72	0,5	Elongación
72	5	Completar amplicones de ADN de simple hebra

Aislamiento y cultivo de células gliales aberrantes

Las células gliales aberrantes fueron obtenidas de la médula espinal de ratas transgénicas SOD1^{G93A} con parálisis avanzada, de acuerdo a los procedimientos descritos por Días-Amarilla *et. al.* 2011 [10]. Los pasos que se siguen para aislar estas células en cultivo son los siguientes:

1. Se anestesia al animal con Ketamina (90 mg/kg) - Xilacina (10 mg/Kg), y una vez se encuentra en anestesia profunda se sacrifica por decapitación.

2. Se disecciona la médula espinal, se coloca en PBS 1X pH 7.4 y se remueven las meninges.
3. La médula espinal se coloca en medio de cultivo [DMEM 10% (vol/vol) FBS, Hepes (3.6 g/L), penicilina (100 IU/ml), estreptomycin (100 µg/ml)], se rebanan, y se disocian con tripsina 0,25% en PBS 1X pH 7.4 a 37°C durante 15 minutos.
4. Se detiene la tripsinización añadiendo DMEM 10% (vol/vol) FBS, Hepes (3.6 g/L), penicilina (100 IU/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y se realiza disgregación mecánica por pipeteo repetido.
5. El extracto resultante se pasa por una malla de 80 µm para eliminar restos del tejido, se centrifuga y el pellet se re-suspende en medio de cultivo DMEM 10% (vol/vol) FBS, Hepes (3.6 g/L), penicilina (100 IU/ml), estreptomycin (100 µg/ml).
6. Se plaquea en botellas de cultivo de 25 cm².

El medio de cultivo se remueve a las 72 hs y luego se sigue reemplazando cada 48 hs. Antes de ser trasplantadas en la médula espinal las células fueron mantenidas en cultivo durante al menos 20 pasajes, realizados cada 7 días.

Inmunocitoquímica de células gliales aberrantes

Se realizó inmunocitoquímica de las células gliales aberrantes pasaje 20 con anticuerpos que reconocen la SOD1 humana en su conformación nativa o la SOD1 humana mal plegada. Para ello se realizaron los siguientes pasos:

1. Se fijaron las células utilizando metanol frío durante 5 minutos y luego se lavó 3 veces con PBS 1X pH 7.4.
2. Se realizó el bloqueo, para evitar unión inespecífica de los anticuerpos, incubando a las células fijadas con seroalbúmina bovina (BSA) 5% en PBS 1X pH 7.4 durante 1 h a temperatura ambiente.
3. Las células se incubaron, durante toda la noche a 4°C, con anticuerpos que reconocen la SOD1 humana nativa (conejo, 1/500) o la forma mal plegada de la SOD1 humana (ratón MEDIMABS MM-0070, 1/200), diluidos en BSA 1% en PBS 1X pH 7.4.

4. Se lavaron las células 3 veces con PBS 1X pH7.4, y se incubaron con anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón conjugados a Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 546 (Thermo Fisher Scientific, 1/1000) durante 2 hs a temperatura ambiente en BSA 1% en PBS 1X pH 7.4.

Las imágenes fueron adquiridas utilizando el microscopio confocal ZEISS LSM 800. Se realizaron z-stacks con los objetivos 25x y 63x. Luego estas fueron procesadas con el software Zen (black edition) y analizadas con el software imageJ.

La microscopía confocal es una técnica de observación microscópica que ha tenido un gran éxito debido a las numerosas ventajas que ofrece. Se pueden mencionar: i) Mayor resolución [66]; ii) Mayor contraste. Debido a que se elimina la luz procedente de las zonas fuera de foco; iii) Posibilidad de tomar imágenes a diferente profundidad lo que permite obtener información tridimensional de la muestra; iv) Reconstrucción 3D. A partir de las secciones ópticas es posible aplicar técnicas de reconstrucción 3D que nos permitan visualizar las estructuras.

Marcación fluorescente de las células gliales aberrantes

Antes de ser trasplantadas en la médula espinal, las células gliales aberrantes fueron marcadas *in vitro* con el trazador pkh26 (Sigma) de acuerdo a las instrucciones del producto. Las células fueron incubadas en suspensión con el marcador pkh26 durante 5 minutos a 37°C. Su incorporación a la membrana plasmática fue detenida agregando suero fetal bovino (FBS) durante 1 minuto. Las células fueron visualizadas con el microscopio de epifluorescencia a los 2, 4 y 7 días de haber sido marcadas, para asegurar la permanencia del marcador.

Cultivo de microglía neonata.

La microglía neonata se aisló de animales no transgénicos de 1 día de vida, provenientes de la misma colonia de donde se aislaron las células gliales aberrantes. En primer lugar se realizaron cultivos mixtos de glia preparados a partir de la médula espinal de neonatos de 1 día de edad de acuerdo a lo

descrito por Saneto y De Vellis 1987 con algunas modificaciones [67]. Brevemente, las médulas espinales fueron disociadas en 0,25% de tripsina durante 30 minutos a 37°C. Las células fueron colectadas por centrifugación, filtradas por una malla de 80 µm, y plaqueadas en placas de petri de 35 mm, a una densidad de 2×10^4 células/cm² y mantenidas en DMEM/10% (vol/vol) FBS, Hepes (3.6 g/L), penicilina (100 IU/mL), y estreptomycin (100 µg/ml)). Una vez alcanzada la confluencia, las placas fueron agitadas a 100 rpm durante 1 h a 37°C. El medio se colectó, se colocó en un tubo cónico y se centrifugó a 2500 g durante 5 minutos a 4°C. De esta manera se aislaron las células microgliales de acuerdo a lo descrito por Mingwei *et al.* 2010 [68]. El pellet de microglia se re-suspendió en medio de cultivo DMEM / FBS al 10% (vol/vol), Hepes (3,6 g/l), penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml), y se plaqueó en botellas de cultivo de 25 cm².

Diseño experimental.

El trasplante de las células gliales aberrantes fue llevado a cabo en hembras no transgénicas de la colonia hSOD1^{G93A} de la cual se obtuvieron las células gliales aberrantes. El objetivo de hacer esto fue minimizar la probabilidad de rechazo de las células trasplantadas. En una primera instancia los animales se dividieron en 2 grupos conformados por 5 animales cada uno. Uno de los grupos recibió las células gliales aberrantes y el otro el vehículo en el cual fueron inyectadas las células gliales. En una segunda instancia se realizó el control celular de las células gliales aberrantes. Para ello los animales se dividieron en 3 grupos conformados por 5 animales cada uno. Uno de los grupos recibió las células gliales aberrantes, el segundo recibió microglía neonata no transgénica como control celular y el tercero recibió el vehículo en el cual fueron inyectadas las células gliales. Las células fueron inyectadas a nivel lumbar de la médula espinal con ayuda de un estereotáxico. A los siete días de realizado el trasplante los animales fueron anestesiados con Ketamina (90 mg/Kg) - Xilacina (10 mg/Kg) y perfundidos transcardíacamente con citrato de sodio 0,1 M en PBS 1X pH 7.4 y paraformaldehído (PFA) 4%. Se disecaron la médula espinal, cerebro y raíces, y se post-fijaron por inmersión en PFA 4% 24hs. Durante estos siete días los animales fueron evaluados para detectar síntomas que pudiesen estar asociados a la pérdida de motoneuronas.

Procedimiento para el trasplante de células.

Todos los trasplantes se realizaron en la médula espinal de ratas no transgénicas mediante laminectomía. La misma se realizó bajo condiciones apropiadas de asepsia y anestesia utilizando Ketamina (90 mg/Kg) - Xilacina (10 mg/Kg). Los animales anestesiados fueron sujetos y se les practicó una laminectomía en la parte dorsal de la médula espinal a nivel de la vertebra L1, que corresponde al segmento de la médula espinal lumbar L3-L5. Para ello se realizó una incisión longitudinal en la piel y los músculos, desde la región torácica a la sacra logrando acceder a la región lumbar. Utilizando una micropipeta de vidrio estabilizada con un micromanipulador unido a una bomba de infusión (Quintessential Stereotaxic Nanoinjector, Stoelting CO. Wood Dale, IL, USA), se inyectaron 3µl de una suspensión conteniendo 100.000 células gliales aberrantes o microglía neonata a una velocidad de inyección de 0.4 µl/minuto. Volúmenes iguales de medio de cultivo fueron inyectados como control de vehículo. Una vez que las inyecciones fueron realizadas, los planos musculares y cutáneos fueron suturados y la herida desinfectada. Los animales fueron mantenidos en un ambiente termoestable hasta su completa recuperación.

Análisis histológico.

La médula espinal disecada fue puesta en sacarosa y luego congelada para ser seccionada con el criostato Leica en cortes de 20 µm de espesor. La inmunohistoquímica se realizó de la siguiente manera:

1. Los tejidos se permeabilizaron y bloquearon con BSA 5% –Triton X-100 0,5% en PBS 1X pH 7.4. durante 1 h a temperatura ambiente. Para los anticuerpos Iba1, CD68 y MHCII se realizó, previo a la permeabilización y bloqueo, el reclutamiento antigénico en buffer citrato de sodio 10 mM pH 6 durante 5 minutos a 95°C.
2. Los cortes se incubaron durante la noche con los diferentes anticuerpos (tabla 3), en una solución de BSA 1%- Tritón X-100 0,5% en PBS 1X pH 7.4.

3. Luego de varios lavados con PBS 1X pH 7.4, las secciones fueron incubadas con los anticuerpos secundarios conjugados a: Alexa Fluor 488, 546 o 633 (Thermo Fisher Scientific, 1/1000) durante 2 hs a temperatura ambiente.

Tabla 3. En la siguiente tabla se enlistan los distintos anticuerpos utilizados para el análisis histológico, y las diluciones a las que estos fueron utilizados.

Anticuerpo	Código	Dilución	Reconocen
rabbit anti-SOD1 humana	-	1:500	
mouse anti-SOD1 humana “mal plegada”	MEDIMABS MM-0070	1:200	
rabbit anti-GFAP	SG9269	1:400	Astroцитos
mouse anti-Nestina	2Q178	1:200	Filamentos Intermedios del SNC
mouse anti-S100 β	S2532	1:400	Astroцитos
rabbit anti-Iba1	Wako/MABN92	1:300	Microglia
mouse anti-CD68	ab31630	1:300	Microglia
mouse anti-MHCII	ab23990	1:200	Microglia
rabbit anti-Ki67	ab16667	1:300	Proliferación
Prueba de Nissl 546	B34650	1:200	Motoneuronas
DAPI	B34650	1:2000	Núcleos
rabbit anti-Ubiquitina	05-1307	1:100	

Las imágenes fueron adquiridas utilizando el microscopio confocal ZEISS LSM 800. Se realizaron z-stacks de los cortes de médula con los objetivos 25x y 63x. Luego estas fueron procesadas con el software Zen (black edition) y analizadas con el software imageJ.

Análisis cuantitativo de células microgliales y astroцитos.

El conteo de células Iba1+ y GFAP+ se llevó a cabo contando las respectivas células en el asta ventral de la médula espinal lumbar y cervical de los animales inyectados. El conteo se llevó a cabo manualmente en al menos 8 secciones histológicas de 20 μ m, por animal (n=5). Para realizar el conteo se

utilizó la herramienta “cell counter” del software imageJ. Los valores fueron normalizados respecto al vehículo.

Análisis del tamaño y número de motoneuronas.

El análisis del tamaño y número de motoneuronas se basó en un acercamiento estereológico descrito por Trias, *et. al.* 2016 [65]. En primer lugar se cuantificó el número de motoneuronas, marcadas con Nissl, en la sustancia gris de la médula espinal lumbar. Para ello se utilizó la herramienta “cell counter” del software imageJ. Luego se determinó el tamaño promedio del soma de cada motoneurona utilizando como referencia el eje más largo. Esto último se realizó con la herramienta “straight” del software imageJ. Para ambos casos el análisis se hizo manualmente en no menos de 8 secciones de 20 μm por animal (n=4).

Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se realizaron con el software Past3. Test de dos muestras (t-student) fue realizado entre grupos. Todos los resultados fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media (SEM), considerando $p < 0.01$ estadísticamente significativo.

Consideraciones éticas

Todos los estudios en animales fueron realizados en estricta conformidad con los requerimientos de la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de Facultad de Medicina, UdelaR; y bajo las actuales normas éticas de regulación de la Ley Uruguaya N ° 18.611 para experimentación animal, que sigue a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud (USA).

RESULTADOS

Expresión de SOD1 en las células gliales aberrantes mantenidas en cultivo celular. Las células gliales aberrantes fueron aisladas de la médula espinal de ratas transgénicas SOD1^{G93A} con parálisis avanzada, y se mantuvieron en cultivo durante 20 pasajes. En este estadio no sufren senescencia replicativa y mantienen su capacidad de proliferación [10]. Al expresar el gen SOD1^{G93A} humano estas células pueden ser marcadas con anticuerpos que reconocen específicamente la SOD1 humana. Dado que la SOD1 mutada muchas veces se pliega de una manera incorrecta se usaron dos anticuerpos, uno que reconoce la SOD1 nativa y otro que reconoce la mal plegada. Como se observa en la Figura 4, las células en cultivo expresan la hSOD1 nativa, pero una parte de ellas expresa la hSOD1 mal plegada o ambas, sugiriendo un trastorno en el procesamiento de proteínas.

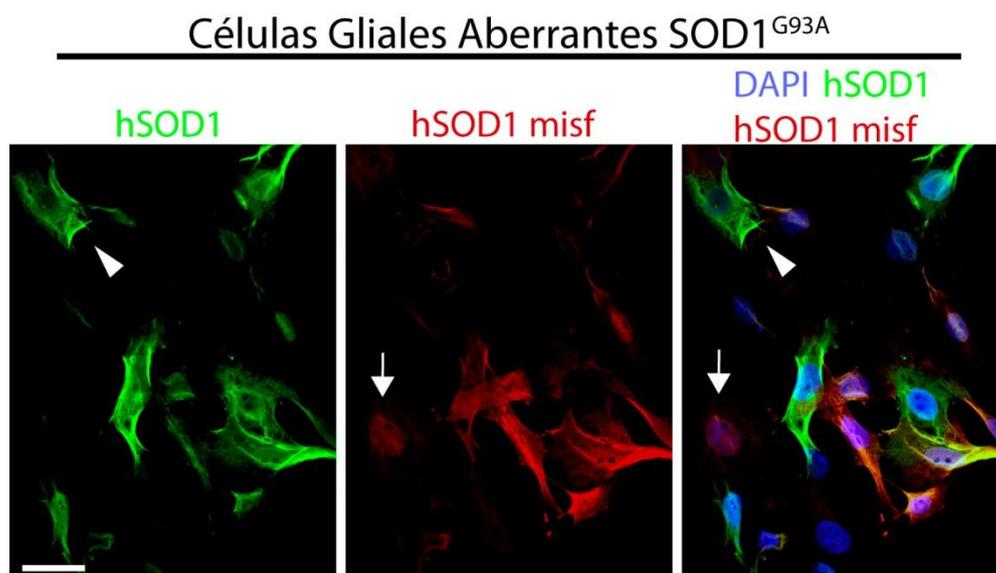


Figura 4. Imagen de microscopia confocal de AbAs pasaje 20. Las células gliales aberrantes pasaje 20 fueron inmunomarcadas con anticuerpos que reconocen la SOD1 humana bien plegada y la SOD1 humana mal plegada. En verde se marcan las células que presentan la SOD1 humana bien plegada (hSOD1), y en rojo las que presentan la SOD1 mal plegada (hSOD1 misf). Como se ve en la figura existen células que presentan sólo la hSOD1, otras que presentan sólo la hSOD1 misf, y otras que presentan ambos tipos. Escala: 50 μ m

Previo a ser trasplantadas, las células fueron marcadas con pkh26 (un intercalante de membrana fluorescente) para facilitar su rastreo una vez se

encontraban en la médula. En nuestros experimentos el marcador pkh26 fue retenido por la mayoría de las células (Figura 5). Sin embargo a los 7 días in vitro, luego de varios ciclos de proliferación, el número de células pkh26+ fue decayendo, sugiriendo que el marcador pkh26 no es incorporado a las células hijas luego de algunos ciclos de mitosis.

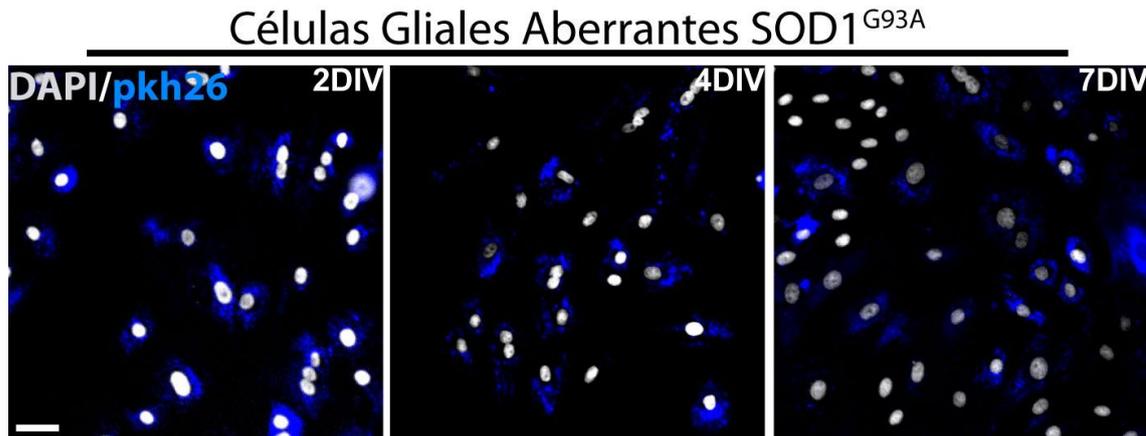
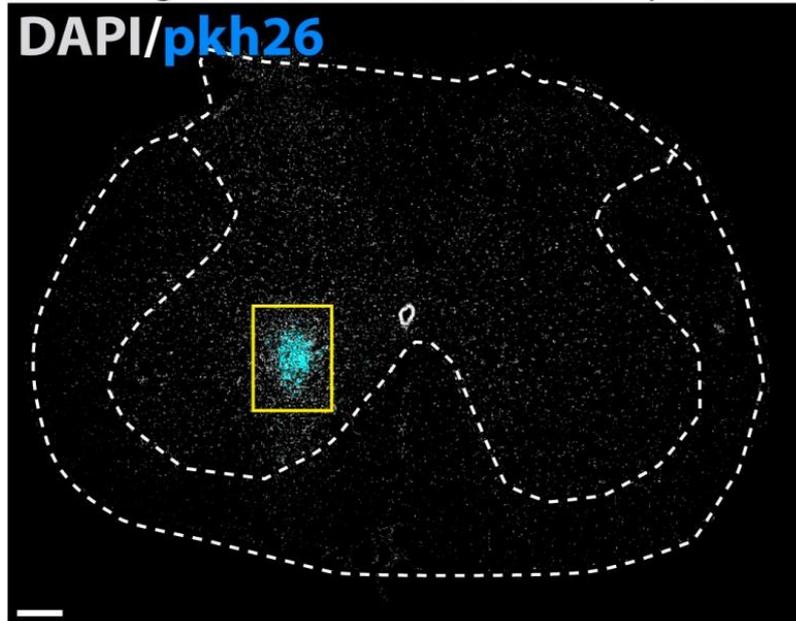


Figura 5. Células gliales aberrantes con pkh26. Las células gliales aberrantes del pasaje 20 fueron marcadas con el intercalador fluorescente de membrana pkh26 (azul) y mantenidas en cultivo por 7 días. Como se puede observar, luego de 7 días en cultivo, el número de células marcadas con pkh26 se redujo significativamente con una proporción de células que pierden la marca fluorescente. Escala: 50 μ m

Viabilidad y migración de las células trasplantadas. A los siete días de realizado el trasplante en la médula espinal lumbar, las células fueron detectadas en la región medial del asta ventral como un cúmulo de células que permaneció en el sitio de inyección (Figura 6a). No se observó una migración o infiltración significativa de las células en el tejido circundante. Al igual que lo observado en las células en cultivo, las células trasplantadas mostraron tres subpoblaciones definidas por su inmunoreactividad para la SOD1 humana nativa y/o mal plegada (Figura 6b).

a Células gliales aberrantes SOD1^{G93A} trasplantadas



b

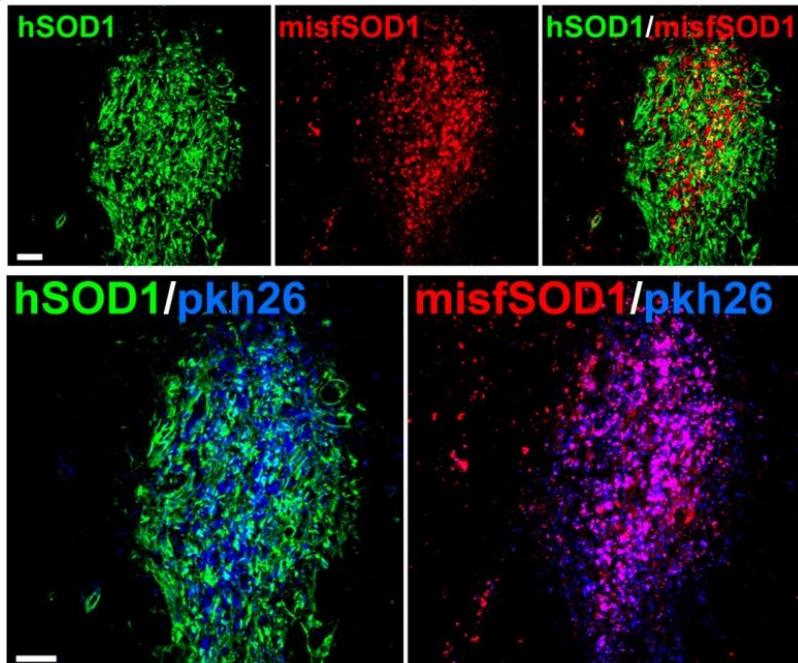


Figura 6. Caracterización de las células gliales aberrantes luego del trasplante espinal. Imagen confocal representativa de la localización de las células gliales aberrantes a los 7 días de ser trasplantadas. Las células fueron detectadas en la región medial del asta ventral como un cúmulo de células bien delimitado (pkh26, recuadro amarillo). **b.** Imagen confocal representativa de los cúmulos de células mostrando la expresión de la SOD1 bien plegada (hSOD1) y mal plegada (hSOD1 misf). En los paneles inferiores se puede ver que las células pkh26+ se encuentran en el centro del cúmulo de células, y expresan la hSOD1 misf, y no la hSOD1. Escala: a. 200µm; b. y c. 50 µm

Una población de células gliales aberrantes, ubicadas en el centro del cúmulo, llevaba el marcador pkh26 y eran inmunoreactivas exclusivamente para la SOD1 humana mal plegada (Figura 6b), sugiriendo que la SOD1 mal plegada se acumula en una subpoblación de células senescentes originalmente trasplantadas. Sorprendentemente, como se muestra más adelante, las células gliales aberrantes no presentaron inmunoreactividad para GFAP, S100 β , o Iba1, lo que confirma una aberración fenotípica significativa.

Activación de la microglía y los astrocitos del hospedero. A los siete días de realizado el trasplante, las células gliales aberrantes se encontraron rodeadas de células microgliales (Figura 7a). La microgliosis mostró un gradiente característico, siendo muy marcada en los alrededores de las células trasplantadas y disminuyendo progresivamente en los segmentos más alejados de la médula espinal. Para determinar si esta activación era específicamente inducida por las células gliales aberrantes, se realizaron los siguientes controles: i) trasplante de microglia neonata no transgénica y ii) medio de cultivo sin suero en condiciones similares a las que se hicieron los trasplantes de células gliales aberrantes. Como se muestra en la figura 7a, en ninguna de las condiciones controles se observó una microgliosis comparable a la observada con el trasplante de las células gliales aberrantes. A su vez también se observó una subpoblación de microglia/macrófagos con aspecto fagocítico, e inmunoreactivos para CD68 y MHCII infiltrando principalmente los cúmulos de células gliales aberrantes (Figura 7b), algunas de estas colocalizando con las células pkh26+.

Marcadores de microglia/macrófagos

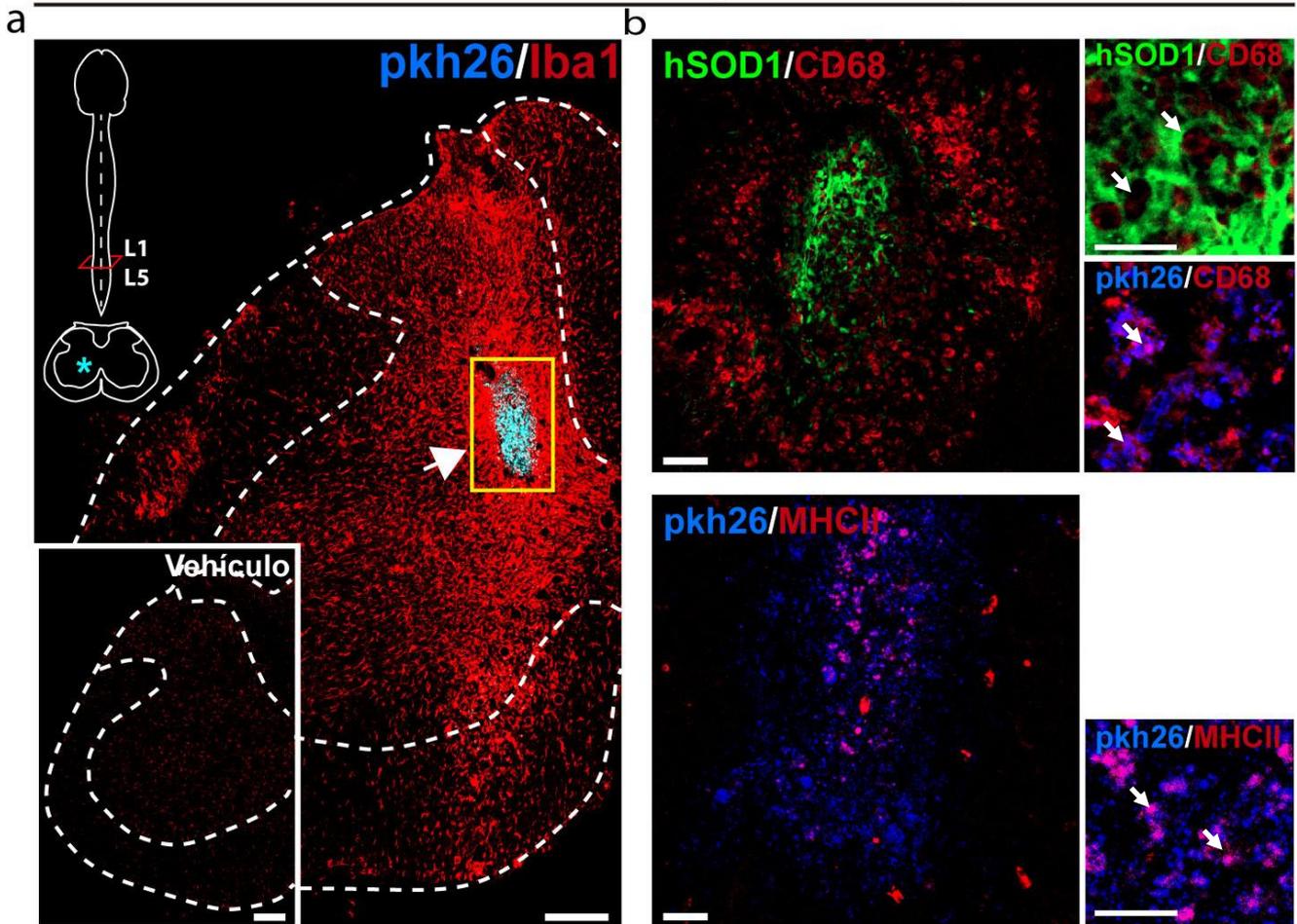


Figura 7. Caracterización de la microgliosis en el sitio de trasplante de células gliales aberrantes a. Imagen confocal representativa de la microgliosis producida por las células gliales aberrantes en el asta ventral y dorsal de la médula espinal. La flecha indica el cúmulo de células gliales aberrantes trasplantadas. La imagen inferior izquierda muestra la microgliosis inducida por la inyección de medio de cultivo libre de suero. **b.** Imágenes representativas de las células gliales aberrantes (hSOD1 o pkh26) interactuando con la microglia del hospedero expresando CD68 y MHCII. Los paneles de la derecha muestran, a mayor aumento, la cercanía de los diferentes marcadores. Escala: **a.** 200 μm ; **b.** 50 μm (imágenes a la izquierda) y 20 μm (imágenes a la derecha)

Además, las células gliales aberrantes trasplantadas se encontraron rodeadas de astrocitos reactivos GFAP+. Una característica de estos es que presentaron largos procesos que rodeaban y delimitaban el cúmulo de células trasplantadas, sin penetrar en él. Los astrocitos reactivos GFAP+ también expresaban S100 β y Nestina (Figura 8).

Marcadores astrocitarios

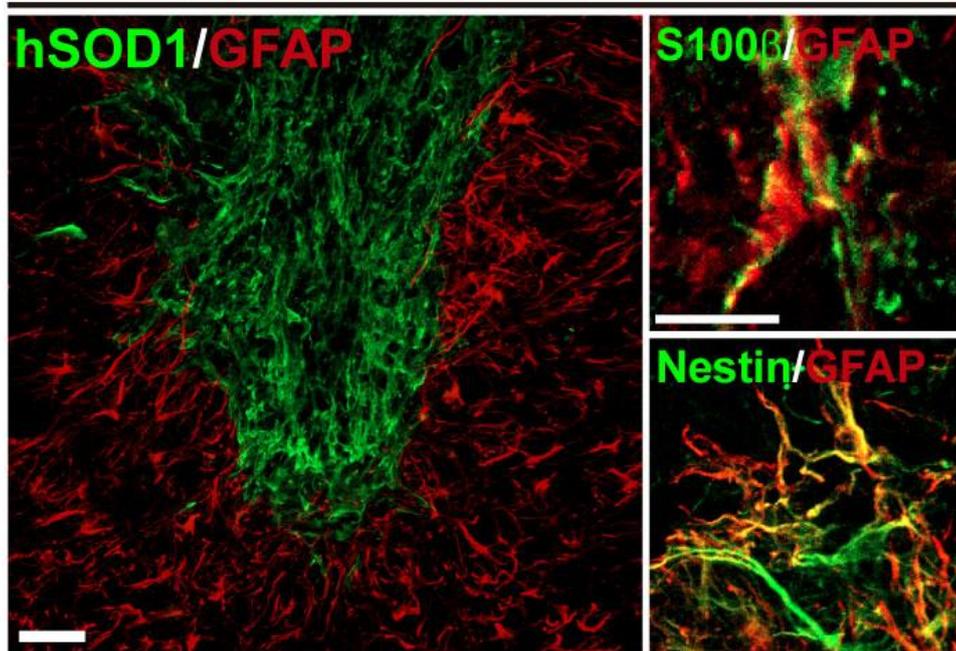


Figura 8. Caracterización de la astrogliosis en el sitio de trasplante de células gliales aberrantes. En el panel de la izquierda se muestra una imagen confocal representativa de las células gliales aberrantes (hSOD1) rodeado de astroglia GFAP+ del hospedero. Los paneles de la derecha muestran, a mayor aumento, la colocalización de los marcadores astrocitarios GFAP/S100 β , y GFAP/nestina. Escala: 50 μ m (imagen a la izquierda) y 20 μ m (imágenes a la derecha)

Activación glial a lo largo de la médula espinal. Luego de analizar la reactividad glial que producían las células gliales aberrantes en el sitio de inyección, fuimos a ver lo que ocurría en los segmentos adyacentes así como en los más distales a nivel cervical.

En primer lugar observamos lo que ocurría en los segmentos adyacentes al sitio de inyección. Para ello contabilizamos el número de células microgliales Iba1+ y astrogliales GFAP+ en las astas ventrales de la médula espinal lumbar. Como se muestra en las figuras 9 y 10, el trasplante de células gliales aberrantes, pero no el de microglia neonata o de vehículo, indujo una microgliosis y astrogliosis marcada. El número de microglia Iba1+ aumentó un 80% respecto al vehículo, mientras que el número de astrocitos GFAP+ se vio aumentado en un 40%. Esto se observó tanto para el lado ipsilateral al sitio de inyección como para el contralateral.

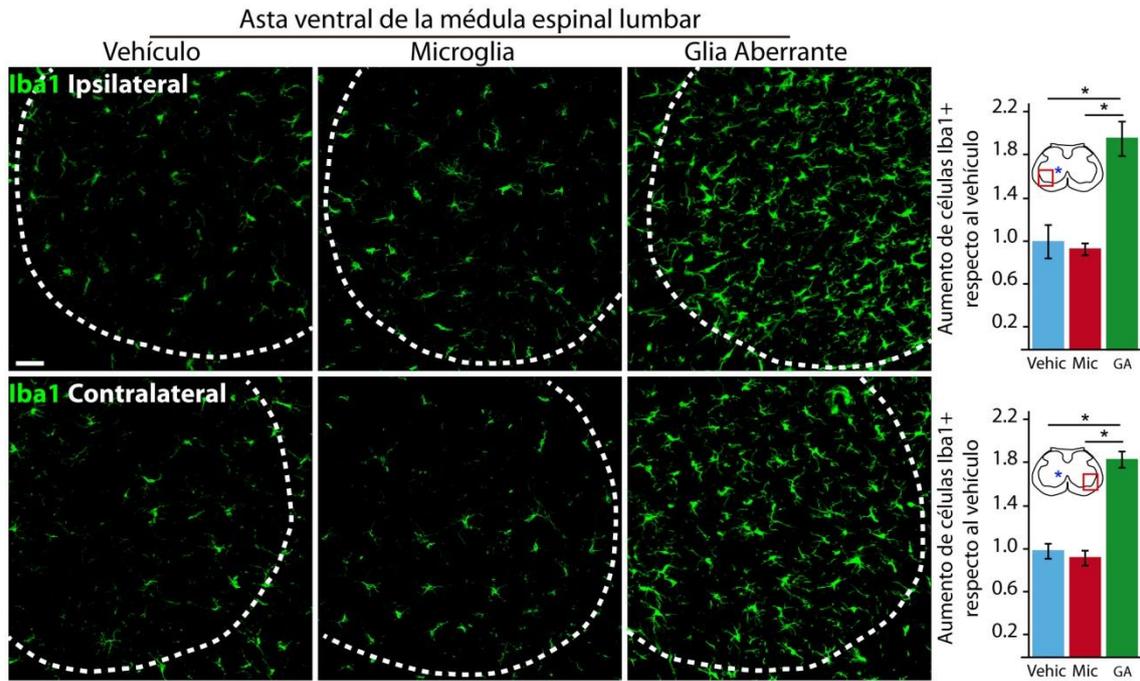


Figura 9. El trasplante de células gliales aberrantes genera microgliosis en la médula espinal lumbar. A los siete días de realizado el trasplante de las células gliales aberrantes, de la microglia neonata o del vehículo, se estudió la microgliosis inducida en los segmentos adyacentes al sitio del trasplante. La línea blanca punteada delimita la sustancia gris y blanca. Imágenes de microscopia confocal representativas que muestran la microglia Iba1+ en las astas ventrales ipsilaterales (paneles superiores) y contralaterales (paneles inferiores) al sitio de inyección. Los gráficos a la derecha muestran la cuantificación del número de células Iba1+ en las diferentes condiciones experimentales: Vehículo (Vehic), Microglia (Mic) y Glia Aberrante (GA), expresados como el aumento de células Iba1+ respecto al vehículo. Los datos se muestran como la media \pm error estándar de la media, * $p < 0.01$ fue considerado significativo. Escala: 50 μ m.

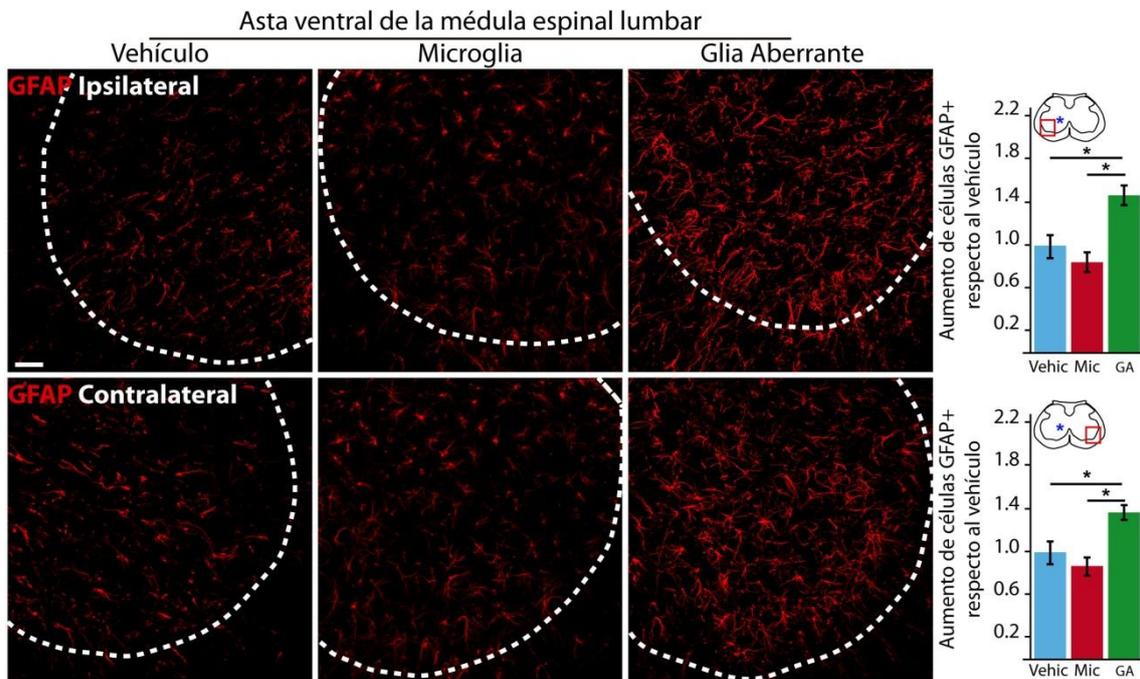


Figura 10. El trasplante de células gliales aberrantes genera astrogliosis en la médula espinal lumbar. A los siete días de realizado el trasplante de las células gliales aberrantes, de la microglia neonata o del vehículo, se estudió la astrogliosis inducida en los segmentos adyacentes al sitio del trasplante. La línea blanca punteada delimita la sustancia gris y blanca. Imágenes de microscopía confocal representativas que muestran los astrocitos GFAP+ en las astas ventrales ipsilaterales (paneles superiores) y contralaterales (paneles inferiores) al sitio de inyección. Los gráficos a la derecha muestran la cuantificación del número de células GFAP+ en las diferentes condiciones experimentales: Vehículo (Vehic), Microglia (Mic) y Glia Aberrante (GA), expresados como el aumento de células GFAP+ respecto al vehículo. Los datos se muestran como la media \pm error estándar de la media, * $p < 0.01$ fue considerado significativo. Escala: 50 μ m.

En segundo lugar analizamos si las células gliales aberrantes trasplantadas en la médula espinal lumbar, eran capaces de inducir gliosis en niveles cervicales. En comparación a los controles, las células gliales aberrantes indujeron un aumento significativo de las microglías Iba1+ en las astas ventrales de la médula espinal cervical, tanto del lado ipsilateral como contralateral al sitio de inyección (Figura 11a). El aumento fue de un 80% en el lado ipsilateral y de un 10% en el contralateral. En relación a los controles, el aumento del número de astrocitos GFAP+ en la médula espinal cervical, fue de un 20% y se observó solo del lado ipsilateral al sitio de inyección (Figura 11b).

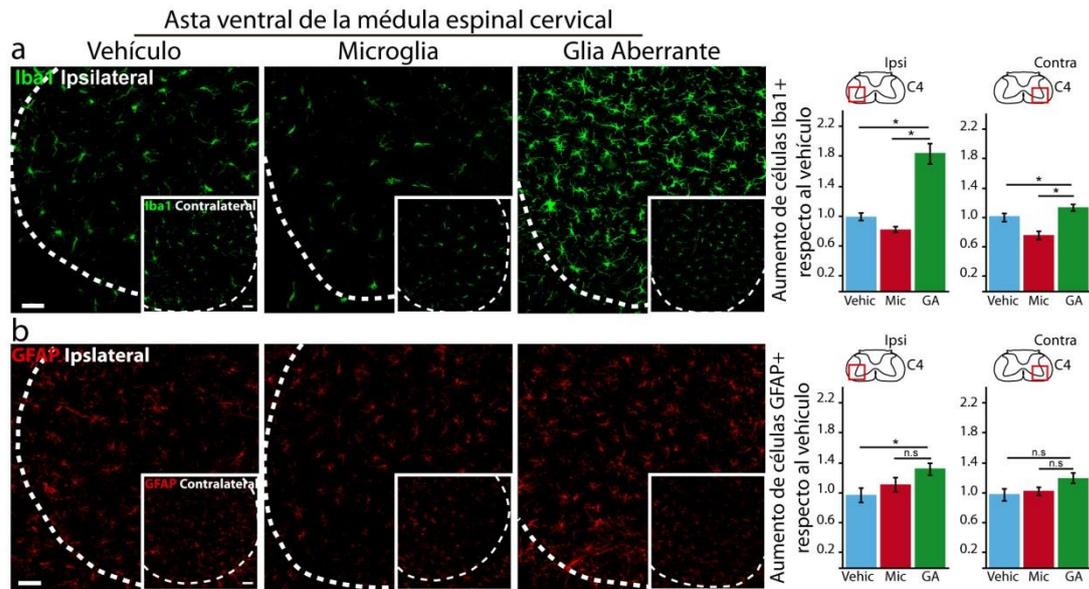


Figura 11. El trasplante de células gliales aberrantes induce gliosis en los niveles cervicales de la médula espinal. A los siete días de realizados los trasplantes en la médula espinal lumbar, se estudió la microgliosis y astrogliosis en los segmentos cervicales de la médula espinal. La línea blanca punteada delimita la sustancia gris y blanca. **a.** Imagen representativa mostrando la microglia Iba1⁺ en las astas ventrales ipsilateral y contralateral de la médula espinal cervical. Las gráficas a la derecha muestran la cuantificación de las células Iba1⁺ en las diferentes condiciones experimentales: Vehículo (Vehic), Microglia (Mic) y Glia Aberrante (GA), expresado como el aumento de células Iba1⁺ respecto al vehículo. **b.** Imagen representativa mostrando los astrocitos GFAP⁺ en las astas ventrales ipsilateral y contralateral de la médula espinal cervical. Las gráficas a la derecha muestran la cuantificación de las células GFAP⁺ en las diferentes condiciones experimentales, expresado como el aumento de células GFAP⁺ respecto al vehículo. Los datos se muestran como la media \pm el error estándar de la media. * $p < 0.01$ fue considerado significativo. Escala : 50 μ m.

Evidencias de daño a motoneuronas. Como las células gliales aberrantes en cultivo secretan factores solubles que producen la muerte de motoneuronas [10], investigamos si el trasplante de estas células era capaz de inducir daño a las motoneuronas adyacentes al sitio de inyección. En una primera aproximación se cuantificó el número y tamaño de las motoneuronas, y no se observaron cambios respecto a los controles (Figura 12). A pesar de ello, las motoneuronas se encontraban rodeadas de microglia y astrocitos (Figura 13a), algunos de ellos mostrando una proliferación activa evidenciada por la expresión de Ki67 (Figura 13b).

Asta ventral de la médula espinal en el sitio de inyección

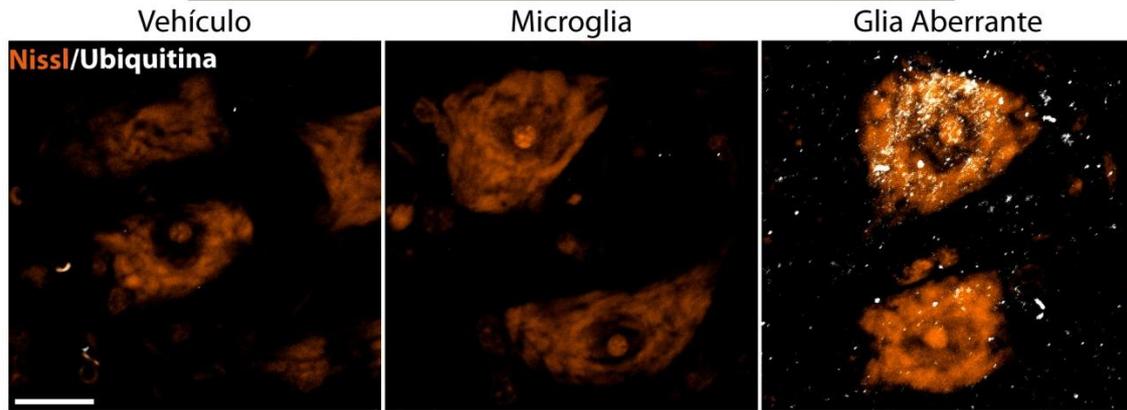


Figura 14. El trasplante de células gliales aberrantes mostró daño incipiente a motoneuronas. Imagen confocal representativa, mostrando agregados de ubiquitina dentro de los somas de las motoneuronas de los animales trasplantados con células gliales aberrantes. Escala: 20 μ m

Curiosamente, las motoneuronas en segmentos adyacentes a los trasplantes de células gliales aberrantes mostraron agregados de ubiquitina (Figura 14), una característica patológica temprana de la degeneración de motoneuronas en humanos y en modelos murinos de ELA [69, 70]. La ubiquitinización de las motoneuronas, o la gliosis exagerada asociada a las mismas, no se observó en las condiciones controles.

Asta ventral de la médula espinal en el sitio de inyección

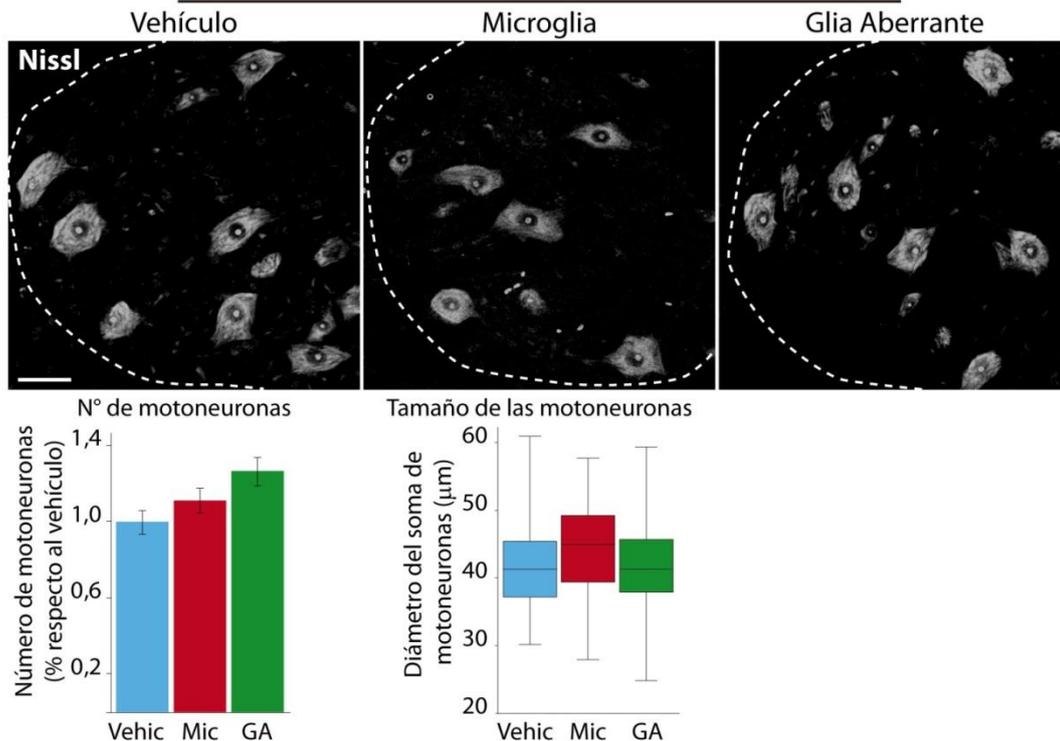


Figura 12. Número y tamaño de motoneuronas en el sitio de los trasplantes. Se analizó el número y la morfología de las motoneuronas del asta ventral a nivel de los sitios del trasplante. La figura muestra imágenes representativas de la morfología de las motoneuronas. Los gráficos debajo muestran tamaño y número de motoneuronas de los animales trasplantados con Glia Aberrante (GA), Microglia neonata (Mic) respecto al vehículo (Vehic). Las línea blanca punteada delimita la sustancia gris y blanca. Escala: 20 μ m

DISCUSIÓN

En el presente trabajo nos propusimos determinar si una subpoblación de células gliales aberrantes aisladas de ratas hSOD1^{G93A} – un modelo de ELA – era capaz de inducir neuroinflamación y toxicidad a motoneuronas. Para ello realizamos el trasplante intraespinal de las mismas en animales no transgénicos. Los animales trasplantados fueron mantenidos durante 7 días, y luego se procedió a analizar su efecto. Nuestro estudio demuestra que el trasplante de estas células induce microgliosis y astrogliosis reactiva significativa así como un daño incipiente en las motoneuronas del hospedero. Se destaca como novedoso la propagación rostral de la microgliosis, desde el sitio de inyección, a nivel lumbar, hasta los segmentos cervicales de la médula. En su conjunto, los resultados indican que las células gliales aberrantes son capaces de inducir neuroinflamación y contribuir así a la patogénesis de la ELA. Si bien en este proyecto nos enfocamos en estudiar el comportamiento de estas células a corto plazo, existe la posibilidad de que las células trasplantadas puedan continuar proliferando durante semanas o meses, llevando a un fenotipo inflamatorio o de daño motor más robusto.

El trasplante de un número relativamente pequeño de células gliales aberrantes en la médula espinal no causó un daño tisular excesivo ni déficit en la actividad motora, sugiriendo que las células tienen una toxicidad directa limitada en la médula espinal del hospedero. En estudios previos se ha mostrado que el trasplante de precursores gliales que expresan la hSOD1^{G93A} induce una respuesta neuroinflamatoria y muerte de motoneuronas [71-73]. Las células trasplantadas permanecieron agrupadas en el sitio de inyección mostrando capacidad migratoria limitada, estas mantuvieron su potencial proliferativo, y fueron capaces de atraer un número elevado de microglía/macrófagos Iba1+, CD68+ y MHCII+ al sitio de inyección y a las regiones adyacentes. El aumento en la expresión de estos marcadores es característico de la microgliosis observada en modelos murinos de ELA. La expresión de Iba1 está asociada a las funciones de migración y fagocitosis [59]; la de MHCII a la transformación de la microglía en una célula presentadora de antígeno [74]; y la de CD68 a la fagocitosis [61]. Las células gliales aberrantes también fueron capaces de

generar una reactividad astrocitaria y atraer un número elevado de astrocitos GFAP+. Este escenario sugiere que las células gliales aberrantes expresan o producen factores que promueven la proliferación y migración de la microglia, y la activación de los astrocitos. La capacidad de inducir tal respuesta fue específica de esta población celular, ya que no fue reproducida por los experimentos controles en donde se inyectó microglia de animales no-transgénicos o medio de cultivo sin células.

La observación de que las células trasplantadas tienen dos subpoblaciones de células aberrantes definidas por su inmunoreactividad para la SOD1 humana -nativa o mal plegada- es original y no ha sido reportada. La acumulación de la SOD1 humana mal plegada se limitó a aquellas células trasplantadas originalmente, indicado por la marcación con pkh26. Esto sugiere que la acumulación de la proteína mal plegada ocurre en una subpoblación de células senescentes. En este contexto, los cambios en el plegamiento de la SOD1 podrían estar asociados al estrés o daño celular, afectando a una subpoblación de las células trasplantadas. La formación de especies mal plegadas de la SOD1 por las células gliales aberrantes podría tener un rol patogénico relevante en la ELA, tanto para los casos familiares como para los esporádicos [75, 76] ya que los agregados de especies de la SOD1 pueden ser transmitidos de una célula a otra e incluso transmitirse de manera priónica al ser inoculadas en la médula espinal [20-22]. Sin embargo, el contagio de tipo priónico no se puede dar entre la proteína SOD1 humana mal plegada y la SOD1 del ratón normal [77], descartando por lo tanto la posible transmisión desde las células gliales aberrantes hacia las células del hospedero.

También observamos que el trasplante de células gliales aberrantes en la médula espinal lumbar fue capaz de inducir una respuesta microglial, que se extendió desde el sitio de inyección a nivel lumbar hasta los segmentos cervicales de la médula espinal. La magnitud de la respuesta microglial inducida por las células gliales aberrantes sugiere una actividad excepcional para inducir neuroinflamación. Aunque en el presente trabajo no nos propusimos como objetivo identificar factores inflamatorios específicos secretados por estas células, podemos especular que el factor de estimulación

de colonia (M-CSF) y la interleuquina 34 (IL-34) estarían dentro de los principales factores secretados por estas células. Estos dos factores son ligandos del receptor de tirosina quinasa CSF-1R. El CSF-1R tiene un rol central en la regulación de la supervivencia, proliferación y diferenciación de precursores hematopoyéticos, especialmente fagocitos mononucleares, como los macrófagos y los monocitos, así como para la viabilidad de las células microgliales [78]. En respuesta a CSF1 e IL34, promueven la liberación de quimioquinas pro-inflamatorias. En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio mostramos que las células gliales aberrantes presentes en animales SOD1^{G93A} sintomáticos responden al M-CSF a través del receptor de tirosina quinasa CSF-1R [65]. La inhibición farmacológica de este receptor disminuye la reactividad microglial y extiende la supervivencia de en modelos murinos de ELA [65, 79]. En apoyo a esta hipótesis, estudios previos han mostrado que la administración intraperitoneal de M-CSF en el modelo de ratón de la ELA, induce proliferación microglial, acelerando la progresión de la enfermedad. La proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) es otro factor que puede influenciar la activación microglial y que podría ser secretado por las células aberrantes. La MCP-1 está aumentada en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con ELA, expresándose principalmente en células gliales [80, 81]. Finalmente, otra proteína que podría ser secretada por estas células es la SOD1 mal plegada, activando la respuesta inmune innata. La SOD1 mal plegada podría ser secretada en vesículas extracelulares como ocurre en astrocitos transgénicos [82], iniciando por lo tanto un mecanismo patogénico adicional.

Para determinar el efecto neurotóxico de las células gliales aberrantes sobre las motoneuronas evaluamos en primer lugar si existían diferencias en el número y tamaño de las motoneuronas entre las distintas condiciones. Las cuantificaciones, realizadas en las astas ventrales de la médula espinal a la altura del sitio de inyección, no mostraron un efecto significativo. En segundo lugar, estudiamos si las motoneuronas presentaban agregados de ubiquitina. La ubiquitina es una proteína esencial para la supervivencia de las células. Aunque contribuye en varios procesos celulares, incluyendo el tráfico vesicular y la transducción de señales, se conoce principalmente por su rol en la

homeostasis de proteínas. Específicamente, la ubiquitina sirve para marcar proteínas innecesarias para las células, de modo que estas puedan ser enviadas a su degradación en el proteosoma. Luego de la transcripción y de modificaciones post-translacionales, los monómeros de ubiquitina pueden activarse y conjugarse a proteínas blanco a través de la vía enzimática E1/E2/E3. Conjugaciones múltiples de los monómeros de ubiquitina, resulta en la creación de cadenas de poliubiquitina, las que marcan a la proteína para su degradación en el proteosoma [83]. La presencia de agregados de ubiquitina en motoneuronas, es una característica temprana de la patología de motoneuronas tanto en pacientes humanos con ELA familiar o esporádica, como en modelos murinos de ELA. Estos pueden representar la acumulación de proteínas neuronales alteradas o anormales, resistentes a la degradación por esta vía [69, 70]. Estos agregados fueron observados en motoneuronas de los animales que fueron trasplantados con células gliales aberrantes. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que las células gliales aberrantes son capaces de generar un daño incipiente a las motoneuronas evidenciado por acumulación de ubiquitina. Futuras investigaciones deberán determinar si las células gliales aberrantes pueden inducir la muerte de motoneuronas si son dejadas por más tiempo.

CONCLUSIÓN

Actualmente se reconoce que la neuroinflamación puede contribuir activamente a la neurodegeneración. En el presente trabajo aportamos evidencia de que la aparición de células gliales aberrantes en la ELA es un mecanismo patogénico significativo para inducir neuroinflamación y extender el daño lesional a lo largo del neuroeje. Fármacos dirigidos contra las células gliales aberrantes, que detengan la proliferación o impidan el fenotipo pro-inflamatorio, podrían tener efecto terapéutico en la ELA. El modelo de trasplante de estas células podría tener utilidad para identificar nuevos fármacos y para estudiar nuevos mecanismos patogénicos de la ELA, incluyendo notablemente la transmisión de tipo “priónica” y la actividad proinflamatoria de la SOD1 mal plegada.

Los resultados del presente trabajo fueron publicados en la revista *Neuroimmunomodulation* [84].

PERSPECTIVAS

Nuestro trabajo de tesis ha abierto una serie de interrogantes que deberán ser explicadas en futuras investigaciones. A modo de ejemplo, mencionamos las más importantes: i) Determinar los efectos a largo plazo del trasplante intramedular de células gliales aberrantes; ii) Determinar cuáles son los mediadores pro-inflamatorios secretados así como la forma de secreción. iii) Determinar si el trasplante de células gliales aberrantes en ratas hSOD1^{G93A} pre-sintomáticas produce cambios en el tiempo de inicio de los síntomas y/o en la progresión de la parálisis; iv) Determinar la significancia del efecto patogénico de tipo “priónico” de la SOD1 mal plegada liberada por las células gliales aberrantes, como forma de propagación lesional de la neurodegeneración en ratas hSOD1^{G93A}.

REFERENCIAS

1. Trias, E., et al., *Significance of aberrant glial cell phenotypes in pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis*. *Neurosci Lett*, 2017. **636**: p. 27-31.
2. Brown, R.H. and A. Al-Chalabi, *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. *N Engl J Med*, 2017. **377**(2): p. 162-172.
3. Evans, M.C., et al., *Inflammation and neurovascular changes in amyotrophic lateral sclerosis*. *Mol Cell Neurosci*, 2013. **53**: p. 34-41.
4. Ellwardt, E. and F. Zipp, *Molecular mechanisms linking neuroinflammation and neurodegeneration in MS*. *Exp Neurol*, 2014.
5. Napoli, I. and H. Neumann, *Protective effects of microglia in multiple sclerosis*. *Exp Neurol*, 2010. **225**(1): p. 24-8.
6. Napoli, I. and H. Neumann, *Microglial clearance function in health and disease*. *Neuroscience*, 2009. **158**(3): p. 1030-8.
7. Philips, T. and W. Robberecht, *Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease*. *Lancet Neurol*, 2011. **10**(3): p. 253-63.
8. Kempuraj, D., et al., *Neuroinflammation Induces Neurodegeneration*. *J Neurol Neurosurg Spine*, 2016. **1**(1).
9. Leyns, C.E.G. and D.M. Holtzman, *Glial contributions to neurodegeneration in tauopathies*. *Mol Neurodegener*, 2017. **12**(1): p. 50.
10. Diaz-Amarilla, P., et al., *Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(44): p. 18126-31.
11. Charcot, J.M. and A. Joffroy, *Deux cas d atrophie musculaire progressive avec de lesion de la substance grise et des faisceaux antero-lateraux de la moelle espinere*. *Arch. Physiol. Neurol. Path*, 1869. **2**: p. 744-754
12. Wijesekera, L.C. and P.N. Leigh, *Amyotrophic lateral sclerosis*. *Orphanet J Rare Dis*, 2009. **4**: p. 3.
13. Rosen, D.R., *Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis*. *Nature*, 1993. **364**(6435): p. 362.
14. Gurney, M.E., *Transgenic-mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*. *N Engl J Med*, 1994. **331**(25): p. 1721-2.

15. Howland, D.S., et al., *Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1604-9.
16. Borchelt, D.R., et al., *Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(17): p. 8292-6.
17. Ludolph, A.C. and S. Jesse, *Evidence-based drug treatment in amyotrophic lateral sclerosis and upcoming clinical trials*. Ther Adv Neurol Disord, 2009. **2**(5): p. 319-26.
18. Boillee, S., C. Vande Velde, and D.W. Cleveland, *ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors*. Neuron, 2006. **52**(1): p. 39-59.
19. Shaw, P.J., *Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2005. **76**(8): p. 1046-57.
20. Ayers, J.I., et al., *Prion-like propagation of mutant SOD1 misfolding and motor neuron disease spread along neuroanatomical pathways*. Acta Neuropathol, 2016. **131**(1): p. 103-14.
21. Ayers, J.I., et al., *Experimental transmissibility of mutant SOD1 motor neuron disease*. Acta Neuropathol, 2014. **128**(6): p. 791-803.
22. Grad, L.I., S.M. Fernando, and N.R. Cashman, *From molecule to molecule and cell to cell: prion-like mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis*. Neurobiol Dis, 2015. **77**: p. 257-65.
23. Maragakis, N.J. and J.D. Rothstein, *Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease*. Nat Clin Pract Neurol, 2006. **2**(12): p. 679-89.
24. Barbeito, L.H., et al., *A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis*. Brain Res Brain Res Rev, 2004. **47**(1-3): p. 263-74.
25. Pramatarova, A., et al., *Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment*. J Neurosci, 2001. **21**(10): p. 3369-74.
26. Lino, M.M., C. Schneider, and P. Caroni, *Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease*. J Neurosci, 2002. **22**(12): p. 4825-32.
27. Yamanaka, K., et al., *Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(21): p. 7594-9.

28. Boillee, S., et al., *Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia*. Science, 2006. **312**(5778): p. 1389-92.
29. Clement, A.M., et al., *Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice*. Science, 2003. **302**(5642): p. 113-7.
30. Belanger, M., I. Allaman, and P.J. Magistretti, *Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation*. Cell Metab, 2011. **14**(6): p. 724-38.
31. Quaegebeur, A., C. Lange, and P. Carmeliet, *The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications*. Neuron, 2011. **71**(3): p. 406-24.
32. Danbolt, N.C., *Glutamate uptake*. Prog Neurobiol, 2001. **65**(1): p. 1-105.
33. Kofuji, P. and E.A. Newman, *Potassium buffering in the central nervous system*. Neuroscience, 2004. **129**(4): p. 1045-56.
34. Simard, M. and M. Nedergaard, *The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis*. Neuroscience, 2004. **129**(4): p. 877-96.
35. Dong, Y. and E.N. Benveniste, *Immune function of astrocytes*. Glia, 2001. **36**(2): p. 180-90.
36. Ridet, J.L., et al., *Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function*. Trends Neurosci, 1997. **20**(12): p. 570-7.
37. Phatnani, H. and T. Maniatis, *Astrocytes in neurodegenerative disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(6).
38. Migheli, A., et al., *S-100beta protein is upregulated in astrocytes and motor neurons in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis*. Neurosci Lett, 1999. **261**(1-2): p. 25-8.
39. Maihofner, C., et al., *Expression and localization of cyclooxygenase-1 and -2 in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis*. Eur J Neurosci, 2003. **18**(6): p. 1527-34.
40. Anneser, J.M., et al., *Glial cells of the spinal cord and subcortical white matter up-regulate neuronal nitric oxide synthase in sporadic amyotrophic lateral sclerosis*. Exp Neurol, 2001. **171**(2): p. 418-21.
41. Sasaki, S., et al., *iNOS and nitrotyrosine immunoreactivity in amyotrophic lateral sclerosis*. Neurosci Lett, 2000. **291**(1): p. 44-8.
42. Pehar, M., et al., *Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis*. J Neurochem, 2004. **89**(2): p. 464-73.

43. Cassina, P., et al., *Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis*. J Neurochem, 2005. **93**(1): p. 38-46.
44. Cassina, P., et al., *Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants*. J Neurosci, 2008. **28**(16): p. 4115-22.
45. Vargas, M.R., et al., *Transcriptional profile of primary astrocytes expressing ALS-linked mutant SOD1*. J Neurosci Res, 2008. **86**(16): p. 3515-25.
46. Rothstein, J.D., L.J. Martin, and R.W. Kuncl, *Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis*. N Engl J Med, 1992. **326**(22): p. 1464-8.
47. Rothstein, J.D., et al., *Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis*. Ann Neurol, 1995. **38**(1): p. 73-84.
48. Bruijn, L.I., et al., *ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions*. Neuron, 1997. **18**(2): p. 327-38.
49. Lepore, A.C., et al., *Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease*. Nat Neurosci, 2008. **11**(11): p. 1294-301.
50. Perry, V.H., D.A. Hume, and S. Gordon, *Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain*. Neuroscience, 1985. **15**(2): p. 313-26.
51. Cuadros, M.A. and J. Navascues, *The origin and differentiation of microglial cells during development*. Prog Neurobiol, 1998. **56**(2): p. 173-89.
52. Kreutzberg, G.W., *Microglia: a sensor for pathological events in the CNS*. Trends Neurosci, 1996. **19**(8): p. 312-8.
53. Davalos, D., et al., *ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo*. Nat Neurosci, 2005. **8**(6): p. 752-8.
54. Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, and F. Helmchen, *Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo*. Science, 2005. **308**(5726): p. 1314-8.
55. Hanisch, U.K. and H. Kettenmann, *Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain*. Nat Neurosci, 2007. **10**(11): p. 1387-94.

56. Streit, W.J., *Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS*. *Glia*, 2002. **40**(2): p. 133-9.
57. Graber, D.J., W.F. Hickey, and B.T. Harris, *Progressive changes in microglia and macrophages in spinal cord and peripheral nerve in the transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis*. *J Neuroinflammation*, 2010. **7**: p. 8.
58. Sanagi, T., et al., *Appearance of phagocytic microglia adjacent to motoneurons in spinal cord tissue from a presymptomatic transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis*. *J Neurosci Res*, 2010. **88**(12): p. 2736-46.
59. Ohsawa, K., et al., *Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia*. *J Cell Sci*, 2000. **113 (Pt 17)**: p. 3073-84.
60. Lampson, L.A., P.D. Kushner, and R.A. Sobel, *Major histocompatibility complex antigen expression in the affected tissues in amyotrophic lateral sclerosis*. *Ann Neurol*, 1990. **28**(3): p. 365-72.
61. Henkel, J.S., et al., *The chemokine MCP-1 and the dendritic and myeloid cells it attracts are increased in the mSOD1 mouse model of ALS*. *Mol Cell Neurosci*, 2006. **31**(3): p. 427-37.
62. Frakes, A.E., et al., *Microglia induce motor neuron death via the classical NF-kappaB pathway in amyotrophic lateral sclerosis*. *Neuron*, 2014. **81**(5): p. 1009-1023.
63. Henkel, J.S., et al., *Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting*. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2009. **4**(4): p. 389-98.
64. Trias, E., et al., *Phenotypic transition of microglia into astrocyte-like cells associated with disease onset in a model of inherited ALS*. *Front Cell Neurosci*, 2013. **7**: p. 274.
65. Trias, E., et al., *Post-paralysis tyrosine kinase inhibition with masitinib abrogates neuroinflammation and slows disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis*. *J Neuroinflammation*, 2016. **13**(1): p. 177.
66. Wilson, T., *Resolution and optical sectioning in the confocal microscope*. *J Microsc*, 2011. **244**(2): p. 113-21.
67. Cassina, P., et al., *Peroxyinitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis*. *J Neurosci Res*, 2002. **67**(1): p. 21-9.
68. Ni, M. and M. Aschner, *Neonatal rat primary microglia: isolation, culturing, and selected applications*. *Curr Protoc Toxicol*, 2010. **Chapter 12**: p. Unit 12 17.

69. Leigh, P.N., et al., *Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. Morphology, distribution, and specificity.* Brain, 1991. **114 (Pt 2)**: p. 775-88.
70. Huang, C., et al., *Mutant TDP-43 in motor neurons promotes the onset and progression of ALS in rats.* J Clin Invest, 2012. **122(1)**: p. 107-18.
71. Papadeas, S.T., et al., *Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) mutation induce wild-type motor neuron degeneration in vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108(43)**: p. 17803-8.
72. Haidet-Phillips, A.M., et al., *Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons.* Nat Biotechnol, 2011. **29(9)**: p. 824-8.
73. Ramirez-Jarquín, U.N., et al., *Chronic infusion of SOD1G93A astrocyte-secreted factors induces spinal motoneuron degeneration and neuromuscular dysfunction in healthy rats.* J Cell Physiol, 2017. **232(10)**: p. 2610-2615.
74. Tambuyzer, B.R., P. Ponsaerts, and E.J. Nouwen, *Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology.* J Leukoc Biol, 2009. **85(3)**: p. 352-70.
75. Kato, S., et al., *New consensus research on neuropathological aspects of familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase 1 (SOD1) gene mutations: inclusions containing SOD1 in neurons and astrocytes.* Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord, 2000. **1(3)**: p. 163-84.
76. Sheng, Y., et al., *SOD1 aggregation and ALS: role of metallation states and disulfide status.* Curr Top Med Chem, 2012. **12(22)**: p. 2560-72.
77. Grad, L.I., et al., *Intermolecular transmission of superoxide dismutase 1 misfolding in living cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108(39)**: p. 16398-403.
78. Stanley, E.R. and V. Chitu, *CSF-1 receptor signaling in myeloid cells.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6(6)**.
79. Martínez-Muriana, A., et al., *CSF1R blockade slows the progression of amyotrophic lateral sclerosis by reducing microgliosis and invasion of macrophages into peripheral nerves.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 25663.
80. Baron, P., et al., *Production of monocyte chemoattractant protein-1 in amyotrophic lateral sclerosis.* Muscle Nerve, 2005. **32(4)**: p. 541-4.
81. Wilms, H., et al., *Intrathecal synthesis of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in amyotrophic lateral sclerosis: further evidence for microglial activation in neurodegeneration.* J Neuroimmunol, 2003. **144(1-2)**: p. 139-42.

82. Basso, M., et al., *Mutant copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) induces protein secretion pathway alterations and exosome release in astrocytes: implications for disease spreading and motor neuron pathology in amyotrophic lateral sclerosis*. J Biol Chem, 2013. **288**(22): p. 15699-711.
83. Wang, J. and M.A. Maldonado, *The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases*. Cell Mol Immunol, 2006. **3**(4): p. 255-61.
84. Ibarburu, S., et al., *Focal Transplantation of Aberrant Glial Cells Carrying the SOD1^{G93A} Mutation into Rat Spinal Cord Induces Extensive Gliosis*