

Tesis de Maestría PEDECIBA Biología Neurociencias



Marcadores moleculares específicos de células gliales aberrantes en un modelo murino de neurodegeneración



Lic. Romina Barreto Director: Dr. Luis Barbeito Lab. Neurodegeneración Institut Pasteur de Montevideo Noviembre, 2017

INDICE

INDIC	Έ	2
RESUME	EN	4
AGRADE	ECIMIENTOS	5
INTROD	UCCIÓN	5
ANTECE	DENTES	3
La EL/	A como enfermedad neurodegenerativa de las motoneuronas	3
Los	s modelos animales	1
Los	s mecanismos patogénicos de la ELA12	2
La	neuroinflamación14	4
Las	células microgliales1	7
Célula	as gliales aberrantes18	3
Uso d	le técnicas de neuroimagen para el estudio de la neuroinflamación en la ELA	C
Bioma	arcadores para la ELA22	2
HIPÓTES	SIS	3
OBJETIV	/OS23	3
Objet	ivo general23	3
Objet	ivos específicos23	3
MATERI	ALES Y MÉTODOS24	4
Anim	ales24	4
1.	Animales SOD1 ^{G93A}	5
2.	Animales CD11br Flag-eGFP-Rpl10a x SOD1 ^{G93A} (CD11br-RiboTag-SOD1 ^{G93A})2	5
3.	Animales TLR2-luc-GFP	5
Separ	ración celular mediante citometría de flujo2	7
Cultiv	vo celular de células gliales aberrantes28	3
Cultiv	o celular de células microgliales de animales adultos	C
Anális	sis de citoquinas en matrices analíticas (arrays)	C
Deter	minación de concentración de proteínas32	1
Purifi	cación peptídica de los ribosomas de ratones CD11br Flag-eGFP-Rpl10a x SOD1 ^{G93A} 32	2
Identi SO1 ^{GS}	ificación de péptidos aislados de ribosomas de ratones CD11br Flag-eGFP-Rpl10a x ^{33A} mediante espectrometría de masa	3
3.	Análisis de los resultados obtenidos mediante espectrometría de masa	4

Immunofluorescencia en células gliales aberrantes en cultivo
Immunofluorescencia en cortes de médula espinal lumbar
Microscopía confocal
Preparación de muestras para análisis por Western Blot
SDS-PAGE y Western Blott
Protocolo de inyección intracerebroventricular del medio condicionado de las células gliales aberrantes
Protocolo de adquisición y análisis de las imágenes en tiempo real
Análisis estadístico
RESULTADOS
Aislamiento de las células gliales aberrantes de la médula espinal de animales SOD1 ^{G93A} sintomáticos41
Análisis del perfil de citoquinas expresadas y liberadas por las células gliales aberrantes 43
Perfil de marcadores específicos de las células gliales aberrantes por análisis proteómico de péptidos asociados a ribosomas46
Caracterización mediante inmunocitoquímica de los marcadores de las células gliales aberrantes48
Validación de marcadores por inmunohistoquímica51
Evaluación del potencial inflamatorio del medio condicionado de las células gliales aberrantes en ratones salvajes a través de imagenología en tiempo real
Discusión61
Conclusiones
Perspectivas
Referencias

RESUMEN

En las últimas décadas las enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Parkinson y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) han aumentado su prevalencia, al punto de ser consideradas como enfermedades epidémicas con enorme impacto socioeconómico. Todas ellas se caracterizan por el carácter indolente e ineluctable de la evolución del déficit neurológico, lo que hace presumir, que mecanismos patogénicos comunes perpetúan la enfermedad y su progresión lesional. En la actualidad no existen tratamientos efectivos para prevenir, curar o detener la progresión de estas patologías. El presente trabajo de tesis ha estado dirigido a estudiar la contribución de las células gliales a la neurodegeneración, usando un modelo murino de ELA, ratones SOD1^{G93A}. La tesis se ha basado en la hipótesis de que la muerte de las motoneuronas está fuertemente influenciada por anomalías funcionales de las células gliales que conforman el microambiente celular que las rodea. Estas anomalías serían producto de una transformación fenotípica aberrante, que confiere a las células gliales efectos neurotóxicos que permiten la progresión de la degeneración hacia neuronas vecinas. El proyecto estuvo enfocado en lograr el aislamiento y la caracterización de células gliales aberrantes a partir del modelo SOD1 de ratones diseñados para trabajar con células microgliales y sus fenotipos aberrantes. Los resultados obtenidos permiten reproducir las observaciones previas del modelo de rata SOD1 y aportan una caracterización complementaria y más profunda sobre el fenotipo de las células gliales aberrante en la ELA. A partir de esta caracterización original, proponemos dos biomarcadores moleculares que podrían ser ensayados en líquido cefalorraquídeo o sangre, para ser utilizados en el diagnóstico de la ELA, y quizá, de otras enfermedades neurodegenerativas. Sumado a esto, aportamos evidencia de que la aparición de las células gliales aberrantes en la ELA es un mecanismo patogénico asociado a la sintomatología, que pueden inducir neuroinflamación y estar involucradas en la extensión del daño de las motoneuronas.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecerle a Luis por abrirme las puertas del laboratorio y permitirme formar parte de su equipo, brindándome confianza día a día y palabras de aliento en los momentos más difíciles, incentivándome a lograr siempre mis metas. Durante estos años se esforzó por que mi formación sea lo mejor posible, no sólo a nivel académico sino personal.

Especialmente quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio Emiliano, Sofía y Valentina, con quienes tengo el placer de compartir el día a día desde hace varios años.

A todo el personal del Instituto, porque siempre estuvieron dispuestos a ayudar en lo que fuera necesario y se encargan de facilitar el trabajo diario de todos.

A todos los integrantes del laboratorio de la Dra. Jasna Kriz del departamento de Psiquiatría y Neurociencias de la Universidad de Laval en Quebec. Me abrieron las puertas del laboratorio y me trataron de la mejor manera desde el primer día, ayudando a que mi pasantía en Quebec fuera exitosa. Especialmente a Jasna, Melanie y Louis-Charles que me enseñaron algunas de las técnicas que forman una parte muy importante de esta tesis. No puedo dejar de mencionar a Laurence, con quien generamos una muy linda amistad y estuvo siempre pendiente de que estuviera bien y me sintiera como en "casa".

A Pau, mamá y papá, desde que empecé mi aventura en ciencia han estado para alentarme, motivarme y decirme que yo podía. Son mi motor, mis incondicionales.

A mis amigas y amigos, gracias por tanto, por cada una de sus palabras, por su amor, tolerancia y paciencia.

A Flavio, Martina y Verónica, miembros del tribunal, por su tiempo, disposición y entusiasmo a corregir esta tesis.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, se ha realizado un enorme esfuerzo en la investigación sobre las causas y posibles tratamientos de las enfermedades neurodegenerativas incluyendo (entre otras) la Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Parkinson y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). Con el aumento progresivo de la expectativa de vida de la población, las enfermedades neurodegenerativas aumentan su prevalencia, al punto de ser consideradas como enfermedades epidémicas con enorme impacto socioeconómico. Sin embargo, el avance científico de las últimas décadas no ha sido suficiente para desarrollar tratamientos efectivos para prevenir, curar o detener la progresión de estas patologías. El fracaso podría explicarse por la complejidad inherente del sistema nervioso que desafía la comprensión en profundidad de su fisiopatología. Otra posible explicación es que la mayor parte de las investigaciones han estado concentradas en estudiar la vulnerabilidad de las diferentes poblaciones de neuronas degenerantes, sin considerar su entorno celular de células gliales (astrocitos, células microgliales y oligodendrocitos) e inflamatorias o bien factores sistémicos inmunológicos, vasculares y endócrinos que influyen en el mantenimiento del trofismo neuronal y sináptico.

El presente trabajo de tesis ha estado dirigido a estudiar la contribución de las células gliales a la neurodegeneración, usando modelos murinos de la ELA. Se ha basado en la hipótesis que la muerte de las motoneuronas está fuertemente influenciada por anomalías funcionales de las células gliales que forman su microambiente celular próximo. Estas anomalías serían producto de una transformación fenotípica o aberrante, que confiere a las células gliales efectos neurotóxicos y pro-inflamatorios que permiten la progresión de la degeneración en neuronas vecinas. La hipótesis de la "glia aberrante" en neurodegeneración ha sido apoyada experimentalmente por el aislamiento y caracterización de glias aberrantes por Díaz-Amarilla y colaboradores (Diaz-Amarilla et al., 2011) en un modelo de ELA de ratas transgénicas. Investigaciones posteriores han permitido conocer el origen de las células aberrantes a partir de microglías activadas (Trias et al., 2013). Por otra parte, se demostró que la inhibición farmacológica de la glia aberrante, utilizando inhibidores de tirosina quinasas, resulta

6

en un enlentecimiento en la progresión de la parálisis en ratas ELA (Trias et al., 2016). Estas observaciones han llevado a estudiar los fármacos que inhiben la glía aberrante en ensayos clínicos con pacientes con ELA, los que se encuentran en fase confirmatoria. En suma, el estudio y caracterización de la glía aberrante en ELA podría permitir el desarrollo de nuevos biomarcadores para el diagnóstico de la ELA así como de nuevos tratamientos farmacológicos.

Este trabajo de tesis estuvo enfocado en lograr el aislamiento y caracterización de glías aberrantes en modelos de ELA desarrollados en ratones transgénicos especialmente diseñados para trabajar con células microgliales y sus fenotipos aberrantes. Estos modelos fueron desarrollados por Jasna Kriz en la Universidad de Laval - Canadá, donde se llevó a cabo una parte de este trabajo de tesis durante una pasantía de mediana duración realizada a comienzos de 2017. Los resultados obtenidos permiten reproducir las observaciones previas del modelo de rata y aportan una caracterización complementaria y más profunda sobre el fenotipo de la glía aberrante en la ELA. A partir de esta caracterización original, proponemos una serie de biomarcadores moleculares que podrían ser ensayados en líquido cefalorraquídeo o sangre, para ser utilizados en el diagnóstico de la ELA y quizás de otras enfermedades neurodegenerativas.

ANTECEDENTES

Una enfermedad neurodegenerativa se puede definir como una condición patológica de origen hereditario o esporádico caracterizada por una falla funcional progresiva del sistema nervioso como consecuencia de la degeneración y muerte de poblaciones específicas de neuronas, las que se encuentran muchas veces interconectadas funcionalmente. Todas ellas se caracterizan por el carácter indolente e ineluctable de la evolución del déficit neurológico, lo que hace presumir mecanismos patogénicos comunes que perpetúan la enfermedad y su progresión lesional. Si bien se registran en medicina decenas de enfermedades neurodegenerativas, las que tienen mayor prevalencia son la Enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la Enfermedad de Huntington (EH) y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) (Ransohoff, 2016). Cada una de ellas tienen características clínicas y neuropatológicas específicas, en función de las determinantes genéticas y las regiones del Sistema Nervioso Central (SNC) que degeneran.

La ELA como enfermedad neurodegenerativa de las motoneuronas

La ELA fue observada clínicamente por primera vez en 1830 por Charles Bell, y en 1874 fue descripta con mayor detalle neuropatológico por Jean-Martin Charcot, mostrando la asociación entre la parálisis muscular y la atrofia esclerosante de los fascículos laterales de la médula espinal por donde descienden los axones cortico-espinales. La ELA es clínicamente heterogénea y se caracteriza por la degeneración de dos poblaciones diferentes de motoneuronas: las motoneuronas superiores, ubicadas en la corteza motora y las motoneuronas inferiores ubicadas en el tronco encefálico y médula espinal. Las motoneuronas superiores extienden sus axones descendentes por el haz cortico-espinal hasta conectar con las motoneuronas inferiores. A su vez, las motoneuronas inferiores extienden sus axones hacia los músculos esqueléticos, con los cuales establecen sinapsis neuromusculares, siendo las responsables de ejecutar los movimientos voluntarios (Figura 1). La degeneración de las motoneuronas corticoespinales se traduce clínicamente por un síndrome piramidal, caracterizado por debilidad muscular, hiperreflexia y espasticidad. La degeneración de las motoneuronas inferiores se traduce en pérdida de las unidades motoras, parálisis progresiva, atrofia muscular y eventualmente fasciculaciones (Brown and Al-Chalabi, 2017).



Figura 1. El Sistema motor. El Sistema motor está compuesto por motoneuronas cortico-espinales (superiores) y motoneuronas espinales (inferiores) que inervan los músculos esqueléticos. Tomado de Brown et al, 2017.

Tradicionalmente, la ELA ha sido considerada como un desorden puramente motor. No obstante, estudios recientes han puesto de manifiesto la participación de vías sensoriales y cerebelosas, así como también grupos neuronales de la sustancia nigra y de la capa granular del dentado del hipocampo (Machts et al., 2015). También se constatan cambios inmunológicos, neuroendócrinos y metabólicos. Por lo tanto, la ELA puede ser considerada una enfermedad de carácter sistémico, en la cual las motoneuronas tienden a ser afectadas tempranamente y de forma más severa. Si bien se han propuesto numerosas hipótesis en la ELA para explicar la pérdida de motoneuronas, los mecanismos moleculares precisos que llevan a la ELA permanecen desconocidos (Ilieva et al., 2009).

Generalmente, la ELA comienza con déficit motores de las extremidades; no obstante, un tercio de los casos presentan inicio de motoneuronas bulbares con dificultades para masticar, tragar o hablar. El diagnóstico de la enfermedad está basado principalmente en el examen clínico junto con la electromiografía, que es la técnica neurofisiológica que permite confirmar el alcance de la denervación (Hardiman et al., 2017; Phukan et al., 2012). La media de sobrevida de los pacientes diagnosticados con ELA varía de meses a años, pero el promedio es de 19 meses luego del diagnóstico y 30 meses luego del comienzo de los síntomas (Lacomblez et al., 1996; Logroscino et al., 2008). Estudios poblacionales han mostrado que la incidencia promedio mundial de la ELA varía a entre 2-3 casos cada 100.000 habitantes (Cronin et al., 2007; Logroscino et al., 2010). En Uruguay la incidencia anual de la ELA es de 1.37 cada 100.000 habitantes, esta incidencia es mayor para hombres (1.95) que para mujeres (0.84). Para ambos grupos la incidencia aumenta con la edad, con un pico entre los 65-74 años (Vazquez et al., 2008). En la mayoría de los pacientes, la causa de la enfermedad se desconoce y se clasifican como "casos esporádicos". Los casos hereditarios o familiares representan entre el 5-10% del total y están asociados a mutaciones en diferentes genes (Mathis et al., 2017). Entre las mutaciones más frecuentes que causan un fenotipo clínico típico se encuentran los genes SOD1, TARDBP, FUS, ANG y OPTN (Beleza-Meireles and Al-Chalabi, 2009; Kwiatkowski et al., 2009; Maruyama et al., 2010; Sreedharan et al., 2008; Vance et al., 2009).

Los modelos animales de ELA. Buena parte de la investigación sobre los mecanismos patogénicos han sido obtenidos en modelos murinos de la ELA, en donde la enfermedad es inducida por la expresión transgénica del gen que codifica para mutaciones de la enzima cobre/zinc superóxido dismutasa-1 (SOD1) humana, asociados a casos de ELA familiar en el ser humano (Rosen et al., 1993). Los modelos murinos de ELA basados en la expresión transgénica de mutaciones de la SOD1 (Gurney et al., 1994; Nagai et al., 2001) presentan un fenotipo motor similar al humano, con degeneración de motoneuronas, parálisis progresiva y muerte que ocurre entre 4 y 7 meses de edad (Tabla 1).

Mutación	Promotor	Sobre-expresión en el SNC (<u>fold</u>)	Actividad enzimática (fold)	Comienzo de los síntomas (meses)	Sobrevida (meses)	Parálisis	Agregados proteicos	Pérdida de motoneuronas
G93A	SOD1	17	13	3	4	Sí	No hay datos	Sí
	humana							
G37R	SOD1	4-12	5-15	3.5-6	7	Sí	Acumulaciones de	Sí
	humana						SOD1 en los	
							axones	
G85R	SOD1	0.2-1	0	8	8.5	Sí	Inclusiones de	Pérdida del 40%
	humana						SOD1	de las motoneuronas
							en los astrocitos	
G86R	SOD1 de	No hay datos	0	3-4 (línea M1)	4	Sí	No aplica	Sí
	ratón							

Tabla 1. Modelos de ratón SOD1 más utilizados para el estudio de la ELA. Tomado de Philips y Rothstein 2015

La SOD1 es una proteína abundante y se expresa en todas las células. Su función normal es catalizar la conversión del radical superóxido a peróxido de hidrógeno. Las mutaciones en la SOD1 corresponden solamente a un 20% de los casos familiares de la ELA. Se han descrito más de 100 mutaciones puntuales en el gen SOD1. Se considera que las numerosas mutaciones de la SOD1 generan especies proteicas con un plegado anormal, lo que lleva a una ganancia de función, sin pérdida de la actividad dismutasa. Se han señalado variados mecanismos patogénicos de las mutaciones SOD1 a nivel celular, incluyendo una actividad redox anormal que produce estrés oxidativo (Beckman et al., 2001), disfunción mitocondrial y estrés de retículo (Liu et al., 2004) y alteraciones en la homeostasis proteica (Julien, 2001).

En pacientes con ELA, se han observado cambios conformacionales en la SOD1 similares a los casos mutantes de SOD1, lo que sugiere que la SOD1 normal modificada puede contribuir al mecanismo patogénico de la enfermedad. Por tanto, es probable que los hallazgos en ELA familiar (modelos animales y pacientes humanos) sean relevantes para estudios en ELA esporádica (Da Cruz et al., 2017). La mayoría de los modelos transgénicos utilizan el promotor SOD1 para imitar la expresión normal de la SOD1. Sin embargo, modelos utilizando promotores neuronales (Jaarsma et al., 2008) o astrocíticos (Gong et al., 2000) específicos han sido creados y sirvieron para entender la naturaleza "sin autonomía celular" de la ELA (Clement et al., 2003; Ilieva et al., 2009). Esto significa que el fenotipo motor del transgen no se explica solamente por su expresión en las motoneuronas afectadas sino también por un efecto indirecto resultante de su expresión en células gliales (astrocitos, células microgliales y oligodendrocitos) (Philips and Rothstein, 2014). Por tanto, se considera que la toxicidad de las mutaciones SOD1 se explican por efectos patológicos de la mutación en diferentes tipos celulares y luego en cambios profundos en las interacciones celulares.

Los mecanismos patogénicos de la ELA aún no han sido del todo comprendidos, pero investigaciones recientes han determinado algunos mecanismos fundamentales que incluyen la excitotoxicidad inducida por glutamato, disfunción mitocondrial, alteraciones en el procesamiento del ARN y la formación de agregados proteicos producto de defectos en la homeostasis celular de proteínas incluyendo el sistema ubiquitina-proteosoma (Figura 2). Casi todos estos mecanismos patogénicos son comunes para otras enfermedades neurodegenerativas, aunque las neuronas y circuitos afectados sean diferentes.

La excitotoxicidad inducida por glutamato ha sido implicada en la patogénesis de la ELA (Heath and Shaw, 2002; Watkins and Evans, 1981). El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC, y se une a los receptores ionotrópicos N-Metilα-amino-3-hidroxi-5-metil-4-D-Aspartato (NMDA) V а receptores ácido isoxazolpropiónico (AMPA) en la membrana post-sináptica. Una activación excesiva de estos receptores post-sinápticos (por el glutamato) pueden iniciar la neurodegeneración (Meldrum and Garthwaite, 1990; Regan et al., 1995). La excitotoxicidad inducida por glutamato puede también resultar en la generación de radicales libres, que pueden causar neurodegeneración al dañar organelos intracelulares y aumentar los mediadores pro-inflamatorios (Hensley et al., 2006; Maher and Davis, 1996).

12

Cambios en la morfología de las mitocondrias han sido observados en pacientes y en ratones SOD1, y se ha demostrado que la función mitocondrial está afectada en la ELA (Magrane et al., 2014; Vande Velde et al., 2011). Además, el daño oxidativo en las



Figura 2. Fisiopatología de la ELA. Mutaciones en varios genes han sido implicadas en la ELA y llevan al daño neuronal a través de varios mecanismos patogénicos, aunque estos mecanismos están a menudo conectados. El gen SOD1 es el más estudiado y se lo ha conectado a muchos mecanismos fisiopatológicos. Las alteraciones en el metabolismo del ARN y el deterioro de la homeostasis de proteínas han sido factores predominantes que vinculan múltiples genes causantes de la ELA con el daño neuronal. La disfunción mitocondrial puede surgir de mutaciones en la CHCHD10 y de deficiencias en la segunda cadena respiratoria que surgen asociadas a agregados proteicos generados en presencia de otras mutaciones asociadas a la ELA. Ambos casos llevan a un incremento en el estrés oxidativo. Otros mecanismos de la ELA pueden alterar directamente el funcionamiento neuronal como la exportación nuclear, el mal funcionamiento en la reparación del ADN y la desregulación del transporte vesicular, así como también la disfunción de las células gliales. Tomado de Hardiman, O. et al 2017

proteínas mitocondriales lleva a defectos en las funciones de la cadena respiratoria que han sido observados en pacientes con ELA y en ratones SOD1 (Parone et al., 2013).

Las inclusiones de ubiquitina y los agregados intracelulares de SOD1 son características patológicas frecuentes de los casos de ELA, así como en los modelos animales de ELA, sugiriendo errores en la degradación de la SOD1. Las proteínas que no se pliegan

correctamente o son modificadas de manera incorrecta luego de la traducción deberían ser degradadas en el sistema ubiquitina-proteosoma. Sin embargo, si no son degradadas, comienzan a agregarse formas ubiquitinizadas de estas proteínas en el cuerpo celular. Estas acumulaciones de proteínas mal plegadas mostraron ser citotóxicas (Julien, 2001).

Las alteraciones en el procesamiento del ARN son parte central de la ELA. En las neuronas el ARN mensajero (ARNm) puede ser transportado para permitir la traducción de proteínas en los axones, cuando esto no sucede de forma correcta se puede producir la degeneración selectiva de las neuronas. El descubrimiento de las mutaciones TDP43 y FUS ha permitido identificar el rol crucial del ARN en la patología. Los mutantes de TDP43 y FUS se acumulan en forma anómala en el citoplasma, y se supone que esto ocasiona el mal procesamiento de los ARNs blancos (Amlie-Wolf et al., 2015; Zhou et al., 2014). Además, más de un tercio del transcriptoma está alterado en modelos de TDP-43 de ELA (Arnold et al., 2013), y la desregulación de la expresión génica también ha sido observada en las modelos de C9orf72, SOD1 y FUS (Walsh et al., 2015), incluyendo cambios en la transcripción, en el "splicing" alternativo del ARNm, el transporte axonal de ARNm y la biogénesis de microARNs (Ratti and Buratti, 2016).

La neuroinflamación es un término acuñado para describir los procesos celulares y moleculares que acompañan la activación de las células microgliales, de los astrocitos y la infiltración de células periféricas inmunitarias. Una característica común de la ELA y otras enfermedades neurodegenerativas es la aparición de una reacción neuroinflamatoria en los sitios de degeneración. Hasta hace poco tiempo la neuroinflamación se consideraba como un evento celular secundario al daño o muerte de neuronas, en un intento de limitar el daño celular y promover la regeneración del SNC. Sin embargo, existe evidencia suficiente para suponer que determinadas formas de respuestas inflamatorias también pueden provocar neurodegeneración en forma activa, generando vías de activación auto-mantenidas en el tiempo que agravan y aceleran el proceso de muerte neuronal. En el caso de la ELA, el conocimiento de la contribución de la microglía, los astrocitos y células inmunes provenientes del torrente sanguíneo a la degeneración de las motoneuronas ha resultado en pruebas clínicas de

14

drogas dirigidas a los procesos inflamatorios en pacientes con ELA (Philips and Robberecht, 2011).

Los astrocitos son el tipo celular más abundante del SNC (Volterra and Meldolesi, 2005). Tienen características fenotípicas y citoarquitectónicas únicas que los hace actores fundamentales en la fisiología del SNC, apoyando el trofismo neuronal, las formación y función de la sinapsis, la conexión neurovascular, la mielinización y los procesos regenerativos (Volterra and Meldolesi, 2005). Se caracterizan por la expresión de la proteína ácida fiblilar glial (GFAP por sus siglas del inglés Glial Fibrillary Acidic Protein), una de las proteínas que forman los filamentos intermedios. Los cambios en la expresión de GFAP son usados, generalmente, como un indicador de la activación astrocitaria (Anderson et al., 2014). Si bien pueden presentar varias morfologías estructurales, la mayoría de los astrocitos presenta una forma de estrella con múltiples procesos originados en el soma. Presentan procesos vasculares que envuelven capilares del SNC permitiendo la regulación de la glucosa y la homeostasis del agua, procesos perisinápticos se mantienen y regulan las sinapsis a través de múltiples mecanismos que incluyen la recaptación de neurotransmisores, la liberación de gliotransmisores, la regulación de la homeostasis del K⁺ extracelular, y la producción local de factores tróficos e inflamatorios (Volterra and Meldolesi, 2005). La eliminación sináptica del glutamato ocurre primariamente a través del transportador de glutamato 1 (GLT-1 por sus siglas en inglés Glutamate Transporter 1), un transportador de alta afinidad dependiente de calcio que se expresa exclusivamente en los astrocitos (Chaudhry et al., 1995; Williams et al., 2005). Los astrocitos operan a través de redes funcionales que tienen lugar gracias a las uniones de tipo "gap" (Bushong et al., 2004; Giaume et al., 1991). Estas conectan el citoplasma de los astrocitos entre sí formando un sincicio funcional permitiendo la comunicación intracelular de iones, glucosa y pequeñas moléculas incluyendo segundos mensajeros.

Finalmente, en condiciones de daño o de enfermedad los astrocitos se vuelven "reactivos", es decir, sufren cambios profundos en su morfología y fisiología que les permiten afrontar el proceso de daño y reparación. En el caso de la ELA, la transformación fenotípica que sufren los hace neurotóxicos para motoneuronas (Cassina et al., 2005; Cassina et al., 2002). Esto llevó a postular la hipótesis que los que

15

los astrocitos contribuyen a la muerte de motoneuronas en la ELA. En condiciones de co-cultivo la toxicidad es mediada, por lo menos en parte, por el aumento en la producción de NGF y NO por los astrocitos activados (Pehar et al., 2004; Pehar et al., 2007). Estudios más recientes demostraron que los astrocitos que expresan la mutación SOD1^{G93A} ejercen toxicidad sobre motoneuronas, sin necesidad de ser estimulados por mediadores inflamatorios (Pehar et al., 2006; Vargas et al., 2006). Esta actividad tóxica para motoneuronas es sorprendente ya que los astrocitos se caracterizan en general por producir condiciones neurotróficas. Los astrocitos que expresan la mutación SOD1^{G93A} muestran una producción aumentada de NO (Vargas et al., 2006) y de otras especies reactivas como superóxido y peroxinitrito (Cassina et al., 2008). Estas especies parecen contribuir a regular la respiración mitocondrial. De hecho, los astrocitos SOD1^{G93A} presentan una reducción importante en la respiración mitocondrial y una pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Cassina et al., 2008). En este estudio, se demostró además una asociación entre la disfunción mitocondrial y la toxicidad de los astrocitos, por cuanto la toxicidad pudo ser revertida por antioxidantes mitocondriales que normalizan la toxicidad mitocondrial. La toxicidad de los astrocitos transgénicos fue replicada también por otros autores utilizando diversas aproximaciones experimentales, demostrando además que la toxicidad es específica para las motoneuronas (Di Giorgio et al., 2008; Di Giorgio et al., 2007; Marchetto et al., 2008; Nagai et al., 2007) y es mediada por factores secretados (Di Giorgio et al., 2008; Nagai et al., 2007).

Recientemente se ha demostrado que los astrocitos humanos derivados de la médula espinal de pacientes con ELA familiar y esporádica comparten una toxicidad sin autonomía celular en modelo de co-cultivo, que resulta en la muerte selectiva de las motoneuronas (Haidet-Phillips et al., 2011). Los mismos exhiben una sobre-expresión de genes inflamatorios en co-cultivo con motoneuronas y al igual que lo observado para los modelos murinos, dicha toxicidad específica es mediada por factores secretados. Este hallazgo sugiere que la toxicidad de los astrocitos es independiente de mutaciones de la SOD1, lo que sugiere que el fenotipo astrocitario está asociado al entorno neurodegenerativo y no necesariamente a la expresión de una mutación deletérea. En cerebros de pacientes con ELA, se observa una astrogliosis reactiva, tanto en la sustancia gris como en la sustancia blanca, caracterizada por la presencia de astrocitos hipertróficos con menos cantidad de procesos, que sobre-expresan la GFAP y disminuyen la cantidad de transportadores de glutamato de alta afinidad (GLT-1) (Bruijn et al., 1997; Gowing et al., 2008; Kushner et al., 1991; Nagy et al., 1994). En modelos animales se observa reactividad astrocitaria en la médula espinal, que puede variar dependiendo del modelo de estudio (Levine et al., 1999). Gracias al uso de técnicas de imagen en tiempo real, el sistema de luciferasa y animales modificados genéticamente se descubrió que la reactividad astrocitaria se vuelve más intensa a medida que progresa la patología (Keller et al., 2009).

Las células microgliales tienen un origen mesodérmico y son las principales células inmunocompetentes del SNC. En condiciones normales cumplen una función de vigilancia inmunológica y participan en procesos de modulación neuroinmune. En respuesta al daño, las células microgliales responden mediante respuestas adaptativas muy diversas. Por ejemplo, se reconoce un fenotipo pro-inflamatorio y fagocítico (fenotipo M1) caracterizado por la secreción del Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α), Interleuquina 1 beta (IL-1 β), Interferón gama (IFN- γ), óxido nítrico (NO) y radical superóxido. Estos factores actúan limitando la invasión de patógenos y eliminando células anormales en el entorno celular. En el otro extremo, otras microglías pueden tener un fenotipo anti-inflamatorio y pro-regenerativo (fenotipo M2) caracterizado por la producción local de mediadores anti-inflamatorios como por ejemplo la Interleuguina 4 (IL-4), Interleuquina 10 (IL-10) y el Factor de Crecimiento Insulínico (IGF-1). Las células microgliales actúan en conjunto con linfocitos (células T) e interactúan con los astrocitos para mediar la respuesta inflamatoria (Luo and Chen, 2012). Las microglías expresan receptores de quemoquinas y también sus agonistas, que contribuyen a regular las respuestas inflamatorias (Ramesh et al., 2013). Tanto en los pacientes con ELA como en los modelos animales, existe una clara reacción microglial caracterizada por la aumento en la expresión de algunos marcadores microgliales típicos como CD11b e Iba-1, así como marcadores asociados a la presentación de antígenos (CD11c), la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y CD68 (Alexianu et al., 2001; Henkel et al., 2004; Turner et al., 2004). Los modelos animales SOD1 presentan una fuerte reactividad y proliferación de microglías en el asta ventral de la medula espinal, conocida como microgliosis.

En la médula espinal de ratones SOD1 mutantes y pacientes con ELA se observa una marcada sobre-regulación de las quemoquinas y del Factor Estimulante de Colonias-1 (CSF1) (Elliott, 2001). Estos factores pueden contribuir a la elevada proliferación y activación de la microglía. El tratamiento de ratones SOD1 mutantes con CSF1, el cual aumenta la proliferación microglial y la expresión de citoquinas pro-inflamatorias fagocíticas, exacerba la enfermedad. La sobre-expresión de la SOD1 mutante parece hacer a la microglía más neurotóxica que la microglía normal o no transgénica (Boillee et al., 2006). Muchos estudios han reportado expresión aberrante de un rango de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1 β y el TNF α mediante el cultivo de microglía que expresan la SOD1 mutante (Weydt et al., 2004).

Células gliales aberrantes

Se desconoce si la toxicidad observada para motoneuronas en la ELA es mediada por la población de astrocitos y microglías presentes, o por un subtipo o fenotipo específico de los mismos. Dado que los astrocitos y microglías que expresan formas mutantes de la SOD1 son más propensos a entrar en un estado inflamatorio activado y meta-estable, podría resultar que una subpoblación de estas células sufra una transición fenotípica deletérea para la supervivencia de las motoneuronas. En 2011, nuestro grupo de investigación aisló una población de glías con fenotipo "aberrante" denominados células AbAs de la médula espinal de ratas paralíticas expresando la mutación SOD1^{G93A} (Diaz-Amarilla et al., 2011). Las células AbAs se caracterizan por una alta tasa de proliferación, ausencia de senescencia replicativa y por ejercer alta toxicidad sobre motoneuronas, sugiriendo que contribuyen a la muerte de motoneuronas. Las glias aberrantes, se observan solamente en la médula espinal de ratas SOD1^{G93A} que desarrollan signos de parálisis, sugiriendo una participación activa en la inducción de la degeneración de motoneuronas. Se distinguen por la expresión simultánea de marcadores astrocitarios y microgliales y por expresar marcadores de proliferación celular (Figura 3). Una investigación llevada a cabo por Trias et al. demostró que las células AbAs pueden ser obtenidas luego de aislar las células microgliales CD11b+ de la médula espinal de los animales SOD1^{G93A} sintomáticos, sugiriendo que las mismas derivan de microglías activadas (Trias et al., 2013). Durante el periodo de transformación de células microgliales a las células AbAs, los marcadores típicos de la microglía desaparecen dando lugar a los marcadores típicos astrocitarios como GFAP y S100β, sugiriendo la aparición de un fenotipo aberrante (Trias et al., 2013).



Figura 3.Transicion fenotípica de las células gliales aberrantes in vitro e in vivo. A. Cultivos de células microgliales [7 días in vitro (DIV)] obtenidos mediante separación celular utilizando el marcador CD11b de la médula espinal de animales sintomáticos **B.** Imágenes representativas de GFAP (rojo), Iba1 (verde) y CD163 (verde) en la médula espinal de animales transgénicos asintomáticos y sintomáticos SOD1^{G93A}. Las flechas señalan las células gliales aberrantes y las líneas punteadas indican los cuerpos de las motoneuronas, los astrocitos (GFAP+) y las células microgliales (Iba1+), en los animales asintomáticos son claramente diferentes, a diferencia de las células Iba1+ y CD163+ en los animales sintomáticos que son GFAP+. Tomado y modificado de Trias et al, 2013.

La aparición de las células gliales aberrantes en la ELA probablemente dependa de las interacciones específicas entre las neuronas dañadas y células gliales e inmunes. Cuando la función neuronal es perturbada por la expresión de la SOD1 mutante u otro agente tóxico, las células gliales pueden proliferar y adoptar un fenotipo reactivo adaptativo al daño, reacción que eventualmente podría prevenir la neurodegeneración. Sin embargo, cuando la respuesta de activación glial es anormal o muy intensa o prolongada, aparecen fenotipos gliales aberrantes que pueden explicar la progresión acelerada de la muerte neuronal luego del comienzo de la parálisis.

Trias et al, 2017 (Trias et al., 2017) plantean un microambiente neurodegenerativo en el cual las células gliales aberrantes podrían actuar junto con otros nuevos tipos celulares (Figura 4). En este contexto, el descubrimiento de las células gliales aberrantes en el modelo de rata SOD1^{G93A} abre nuevos caminos al descubrimiento de biomarcadores y de nuevos tratamientos de la ELA.



Figura 4. Células gliales aberrantes y su microambiente neurodegenerativo celular. A. Composición normal del microambiente celular que rodea a las motoneuronas en el asta ventral de la médula espinal. B. Durante la progresión de la ELA se acumulan diferentes tipos celulares alrededor de las motoneuronas. La característica distintiva es la aparición de las células gliales aberrantes a partir de la microglia. 1. Células gliales aberrantes; 2. Atrocitos; 3. Microglía; 4. Macrófagos; 5. Mastocitos. Tomado de Trias, et al 2017 (Trias et al., 2017).

A pesar de los avances realizados en el concepto de glía aberrante en la ELA, estas células no han podido ser aisladas en otros modelos de transgénicos de ELA expresando mutaciones de la SOD1 o en casos humanos. Por tanto, sería importante comprobar la emergencia de glía aberrante en otras especies.

Uso de técnicas de neuroimagen para el estudio de la neuroinflamación en la ELA

En los últimos años los avances en ingeniería genética han permitido la creación de nuevos modelos animales modificados genéticamente. Algunas de estas modificaciones están dirigidas a expresar proteínas capaces de generar bioluminiscencia en poblaciones celulares específicas (Keller et al., 2009; Lalancette-Hebert et al., 2009). La bioluminiscencia es una forma natural de quimioluminiscencia donde la energía es liberada por una reacción química en forma de emisión de luz. En la actualidad, secuencias de ADN codificando para luciferasas de luciérnagas (Fluc de sus siglas en

inglés Firefly luciferase) se usan fusionados a uno o más genes de interés. Estas enzimas pueden generar luz visible en presencia de la enzima-sustrato adecuada, en nuestro caso D-luciferina, oxígeno y ATP como fuente de energía. En esta reacción química, la Dluciferina es convertida a oxiluciferina y parte de la energía química de esta reacción es convertida a luz visible (Figura 5). A diferencia de los insectos, ciertas bacterias y algunos organismos marinos, los mamíferos modificados genéticamente no producen luciferina. Por lo que, antes de cada sesión de imagen, el sustrato debe ser inyectado a los ratones. La D-luciferina no es tóxica, y después de la inyección intraperitoneal, se distribuye en todos los tejidos incluyendo el SNC. Sin embargo, es necesario obtener concentraciones estables de D-luciferina en el cerebro para evitar imágenes bioluminiscentes con ruido y artefactos. Por lo que, luego de la inyección del sustrato, se esperaran entre 18 y 20 min para que la señal bioluminiscente sea estable. La D-luciferina es una molécula pequeña generada por organismos bioluminiscentes. Difunde fácilmente a través de las membranas, incluyendo la barrera hemato-encefálica, y debido a su tamaño, la activación del sistema inmune parece improbable. Es una molécula sensible a la luz, al oxígeno y a la humedad, por lo que evitar estas condiciones es importante. Esta bioluminiscencia puede ser medida y cuantificada en animales vivos luego de suministrar a los animales los sustratos adecuados para generar luminiscencia. La luz así generada puede ser adquirida utilizando una cámara de alta sensibilidad y resolución refrigerada (CCD). Este equipo, sumado a los ratones modificados genéticamente, representa una herramienta analítica excepcional para el entendimiento de las patologías del SNC y puede ser usados para monitorear células en tiempo real, así como para evaluaciones farmacocinéticas y evaluar respuestas a drogas (Cordeau and Kriz, 2012).



Figura 5: Representación esquemática de la detección de la fuente bioluminiscente en el cerebro de un ratón vivo. En presencia de ATP y Mg2+, la luciferina se va a unir a la luciferasa. Posteriormente, la liberación de pirofosfato (PPi) después de la creación de AMP generará adenilato de luciferilo. Este adenilato se oxidará a una forma molecular inestable después de varias etapas intermedias. Para alcanzar la estabilidad molecular, un fotón de la luz será lanzado y capturado por la cámara CCD. Tomado de Cordeau and Kriz 2012.

Biomarcadores para la ELA

Los marcadores biológicos (biomarcadores) son variables biológicas que pueden ser medidas en forma objetiva, y que sirven como indicadores específicos de una patología o infección. Los biomarcadores suelen ser usados para el diagnóstico o para definir tipos de tratamientos específicos para las enfermedades. En la ELA, hay una necesidad de desarrollar biomarcadores que faciliten el diagnóstico temprano de la enfermedad o que puedan indicar tratamientos adecuados y específicos para las diferentes formas clínicas de la enfermedad. La secuenciación del ADN genómico es de utilidad para detectar nuevas formas familiares de ELA, pero carece de valor terapéutico. Alternativamente, los biomarcadores de inflamación aparecen como los más promisorios, pues podrían permitir tratamientos específicos (Turner et al., 2013).

En la actualizad se analizan biomarcadores moleculares específicos tanto en suero como en líquido cefalorraquídeo, para diferentes patologías como el cáncer (Ludwig and Weinstein, 2005) y los infartos cerebrales (Maas and Furie, 2009).

HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis predice que las células gliales aberrantes no solo se encuentran en el modelo de rata expresando SOD1^{G93A} sino también en ratones expresando la misma mutación. Por tanto, la identificación y caracterización de las células gliales aberrantes en ratones genéticamente modificados para seleccionar las microglías y sus formas aberrantes y/o el aislamiento de ribosomas, debería permitir una caracterización proteómica de las mismas, así como de sus efectos pro-inflamatorios. Por fin, dicha caracterización molecular de la glía aberrante de ratón podría permitir la identificación de nuevos mediadores patogénicos con potencial utilidad como biomarcadores.

OBJETIVOS

Objetivo general

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados anteriormente, el **objetivo** de este trabajo fue la identificación de las células gliales aberrantes en el modelo de ratón ELA, especialmente diseñado para el aislamiento y caracterización de microglías y sus formas aberrantes. Como las glías aberrantes contribuyen a la progresión de la parálisis y la neuroinflamación, la caracterización de la expresión de proteínas y del perfil de secreción de citoquinas podría llevar a identificar biomarcadores específicos con potencial uso en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la ELA.

Objetivos específicos

- Caracterización de las células gliales aberrantes en la médula espinal de ratones SOD1^{G93A}.
- Identificación de potenciales biomarcadores de las células gliales aberrantes CD11b+ mediante proteómica en ratones CD11br Flag-eGFP-Rp10a xSOD1^{G93A}.
- Evaluación del potencial inflamatorio de las células gliales aberrantes en ratones salvajes a través de imágenes en tiempo real.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 3 tipos de ratones para este trabajo: 1-SOD1^{G93A}, 2-CD11br Flag-eGFP-Rpl10a x SOD1^{G93A} (CD11br-RiboTag-SOD1^{G93A}) y 3-TLR2-luc-GFP (Figura 6). Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por la comisión de ética y cuidado animal de la Universidad de Laval y en conformidad con La Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación del Consejo Canadiense para el Cuidado de Animales (Protocolos: 2014-096-03 y 2014-096-04). Todos los experimentos fueron realizados en "Le Centre de recherche de l'Institut universitaire en santé mentale de Québec", Québec, Canadá. Los animales recibieron acceso *ad libitum* a alimentos y agua; fueron alojados con material de anidación y refugios, y mantenidos en habitaciones con control de temperatura y ciclos de luz / oscuridad.



Figura 6. Representación esquemática del diseño experimental y los modelos utilizados para este trabajo.

1. Animales SOD1^{G93A}

Se utilizaron ratones que sobre-expresan la SOD1^{G93A} humana (B6SJL-TgN_[SOD1-G93A]_1Gur) que fueron comprados en Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) y genotipados siguiendo sus protocolos. Para confirmar el número de copias del gen SOD1^{G93A} humano se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR por sus siglas del inglés Polymerase Chain Reaction), usando el ADN genómico de la cola de los animales. Se utilizó el gen Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa para la normalización. Los pares de primers fueron diseñados con el software GeneTool 2.0 (Biotools, Edmonton, AB), y su especificidad fue verificada por blast en la base de datos GenBank. Se utilizaron condiciones de ciclado estándar.

Se seleccionaron los siguientes grupos experimentales:

- animales no transgénicos
- animales SOD1^{G93A} de 100 días
- animales SOD1^{G93A} de 135 días
- animales SOD1^{G93A} de 158 días.

2. Animales CD11br Flag-eGFP-Rpl10a x SOD1^{G93A} (CD11br-RiboTag-SOD1^{G93A})

Para aislar los ribosomas de las células CD11b+ de la médula espinal para posterior análisis proteómico se utilizaron los CD11br Flag-eGFP-Rp10a xSOD1^{G93A} como se detalla en la Figura 7. Estos animales fueron generados previamente por Boutej (Boutej, et al 2016 – en revisión).



Figura 7. Representación esquemática del diseño de los animales CD11br Flag-eGFP-Rp10a. A. Diseño genético utilizado para la generación de los animales CD11br Flag-eGFP-Rp10a. B. Diseño experimental utilizado para el análisis proteómico de los ribosomas de las células CD11b de la médula espinal de los animales. Tomada y modificada de Boutej, et al 2016 (en revisión)

El ratón se obtiene por la expresión transgénica de la construcción detallada en la Figura 7. El ratón resultante CD11br Flag-eGFP-Rpl10a fue cruzado con el ratón SOD1^{G93A}. La presencia de CD11br Flag-eGFP-Rpl10a y de hSOD1 G93A fue evaluada mediante PCR. Se mantuvieron los ratones heterocigotos para los dos genes: CD11br-RiboTag-SOD1^{G93A}.

3. Animales TLR2-luc-GFP

Se utilizaron ratones reporteros transgénicos TLR2-luc-GFP para visualizar la activación de las células microgliales TLR2 (Figura 8), como se describió previamente en Lalancette-Hebert et al., 2009 (Lalancette-Hebert et al., 2009). Los animales transgénicos fueron identificados mediante PCR por la detección del transgen de la luciferasa con los siguientes primers: 50-CAG-CAG-GAT-GCT-CTC-CAG-TTC-30 y 50-GGC-GCA-GTA-GGC-AAG-GTG-GT-30; el genotipado fue realizado como se describe previamente (Lalancette-Hebert et al., 2009). Se utilizaron 5 animales por grupo experimental:

- 1- inyectados con medio condicionado de las células gliales aberrantes
- 2- inyectados con medio de cultivo (DMEM).



Figura 8. Representación esquemática de la construcción utilizada para la generación del ratón transgénico TLR2-Luc-GFP. El promotor de TLR2 fue insertado en un vector recombinante que contenía los genes reporteros luciferasa y la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea coerulescens*. Ambos genes se ubicaron en los extremos de la secuencia reguladora IRES. La señal de poliadenilación (SV40) fue localizada corriente abajo de los genes reporteros. Los oligonucleótidos K3 y K4 fueron usados para amplificar específicamente el ADNc de la luciferasa. Tomado y modificado de Lalancette-Hébert et al, 2009.

Separación celular mediante citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite el análisis de múltiples parámetros celulares al mismo tiempo de manera rápida y objetiva. Además de las capacidades analíticas, algunos citómetros de flujo permiten separar las poblaciones de células analizadas. La separación celular por citometría de flujo o "Cell Sorting" es el proceso de separación física de partículas en base a la expresión diferencial de uno o varios parámetros. Las separaciones de células o poblaciones celulares homogéneas se realizan con el objetivo de llevar a cabo posteriormente ensayos bioquímicos, moleculares o de diferenciación celular de poblaciones de interés, y requieren de la utilización de sofisticados aparatos de citometría de flujo, denominados "*Cell Sorters*". Existen varios modos de separación que se ajustan en función de cuales sean los requisitos de cada separación (Orfao and Ruiz-Arguelles, 1996).

En nuestro trabajo, la adquisición de los datos del citómetro de flujo fue realizada en un citómetro de flujo FACStar plus, bajo la dirección del personal técnico del "Le Centre de recherche de l'Institut universitaire en santé mentale de Québec" - Canadá.

Se seleccionaron los siguientes grupos experimentales:

- animales no transgénicos
- animales SOD1^{G93A} de 100 días (inicio de los síntomas),
- animales SOD1^{G93A} de 135 días (parálisis avanzada),
- animales SOD1^{G93A} de 158 días (parálisis terminal).

Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de ketamina/xilacina (100/10 mg/kg) y luego perfundidos transcardíacamente con HBSS 1X (Thermo Fischer) frío para remover toda la sangre de los tejidos. Se disecaron las médulas espinales y se seleccionó la parte lumbar y se la mantuvo a 4°C en 1X HBSS. El tejido fue luego disociado mecánicamente y cuando estuvo lo suficientemente disociado se filtró en una malla de 70 µm [Becton Dickinson (BD)] para obtener una suspensión celular sin agregados. Para aislar la fracción celular mononuclear, la suspensión celular fue cargada en un tri-gradiente de Percoll de 30-37-70% (GE Healthcare) y centrifugada durante 40 min a 300 g a 4°C. Después de la centrifugación, las células mononucleadas de la interfase de Percoll entre 37-70% fueron removidas. Esto se logra ya que se forma un halo blanco en el lugar donde se encuentran las células. Luego se realizaron 3 lavados en HBSS 1X. Las células fueron incubadas con CD11b conjugado con aloficocianina (APC) (BD). Posteriormente las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo FACStar plus (BD). Las células fueron seleccionadas usando las herramientas de dispersión lateral y hacia delante para eliminar las células inviables y seleccionar únicamente las células viables CD11b+. Las células fueron plaqueadas en placas de cultivo p35 (Falcon) y plaqueadas en DMEM/10% (V/V) SFB, HEPES (3.6 g/L), penicilina (100 IU/mL) y estreptomicina (100 μ g/mL). Se mantuvieron las células en una estufa a 37°C y 5% de CO₂. Se cambió el medio de cultivo cada 48 h.

Cultivo celular de células gliales aberrantes

Las células gliales aberrantes fueron obtenidas de la médula espinal de ratones SOD1^{G93A} de 100, 135 y 158 días (Figura 9). Se utilizaron animales no transgénicos de la misma edad como controles. Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de ketamina/xilacina (100/10 mg/kg). Luego se realizó una perfusión intracardíaca con 30 mL de solución salina (0.9% de NaCl). Posteriormente se disecó la médula espinal rápidamente, se removieron las meninges y se seleccionó la parte lumbar de la médula espinal. Se realizó la disgregación mecánica de la médula espinal lumbar hasta obtener fragmentos menores a 1 mm y posteriormente se incubaron las muestras con 0.25% de tripsina (INVITROGEN) en un buffer libre de calcio por 15 min a

37°C. Se centrifugó la muestra por 1 min a 120 g. Luego se descartó el sobrenadante y se adicionó DMEM/10% (V/V) en presencia de SFB y 50 µg/mL de DNasal para detener la tripsinización. Nuevamente se realizó una disgregación mecánica con una micropipeta P1000. Se centrifugó la muestra durante 10 min a 120 g, se descartó el sobrenadante nuevamente y se resuspendió el pellet en DMEM/10% (V/V) SFB, HEPES (3.6 g/L), penicilina (100 IU/mL) y estreptomicina (100 µg/mL). Se filtró el homogenizado con una malla de 70 µm para eliminar los restos de tejido. Se volvió a centrifugar durante 10 min a 120 g. Se descartó el sobrenadante, se homogenizó el pellet en DMEM/10% (V/V) SFB, HEPES (3.6 g/L), penicilina (100 IU/mL) y estreptomicina (100 µg/mL). Se filtró el nDMEM/10% (V/V) SFB, HEPES (3.6 g/L), penicilina (100 IU/mL) y estreptomicina (100 µg/mL) y estreptomicina (100 µg/mL) y se plaquearon las células en una placa p35. Se mantuvieron las células en una estufa a 37°C y 5% de CO₂. Se cambió el medio de cultivo cada 48 h.



Figura 9. Representación esquemática del protocolo de cultivo de las células gliales aberrantes. Se esquematiza brevemente el protocolo de obtención de células gliales aberrantes de la médula espinal de animales transgénicos sintomáticos SOD1^{G93A}.

Cultivo celular de células microgliales de animales adultos

Las células microgliales fueron obtenidas de la médula espinal de ratones no transgénicos de 150 días. Para lograr la cantidad de células suficiente para posteriores análisis se utilizaron al menos 6 ratones por experimento. Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de ketamina/xilacina (100/10 mg/kg). Luego se realizó una perfusión intracardíaca con 30 mL de solución salina (0.9% de NaCl). Posteriormente se disecó la médula espinal rápidamente y se removieron las meninges. Se realizó disgregación mecánica de la médula espinal hasta obtener fragmentos menores a 1 mm y posteriormente se incubaron las muestras con 0.25% de tripsina (INVITROGEN) en un buffer libre de calcio por 15 min a 37°C. Se centrifugó la muestra por 1 min a 120 g. Luego se retiró el sobrenadante y se adicionó DMEM/10% (V/V) en presencia SFB y 50 µg/mL de DNasal para detener la tripsinización. Nuevamente se realizó una disgregación mecánica con una micropipeta P1000. Se centrifugó la muestra durante 10 min a 120 g, se descartó el sobrenadante nuevamente y se resuspendió el pellet en DMEM/10% (V/V) SFB, HEPES (3.6 g/L), penicilina (100 IU/mL) y estreptomicina $(100 \,\mu\text{g/mL})$. Se pasó el homogenizado a través de una malla de 70 μm para eliminar los restos de tejido. Se volvió a centrifugar durante 10 min a 120 g. Se descartó el sobrenadante, se homogenizó el pellet en DMEM/10% (V/V) SFB, HEPES (3.6 g/L), penicilina (100 IU/mL) y estreptomicina (100 µg/mL) y se plaquearon las células en una placa p35. Se mantuvieron las células en una estufa a 37°C y 5% de CO₂. Se cambió el medio de cultivo cada 48 h.

Análisis de citoquinas en matrices analíticas (arrays)

El análisis de expresión de citoquinas inflamatorias fue realizado en células gliales aberrantes y células microgliales de animales adultos con un kit de análisis de anticuerpos ("arrays") (RaybioMouse inflammation antibody array 1.1; catalog #AAM-INF-1L; RayBiotech). Los lisados de proteínas fueron obtenidos por la homogenización de las células gliales aberrantes (3-5 ratones) y las células microgliales adultas obtenidas de animales no transgénicos (6-8 ratones) en 250 μl de buffer de lisis (incluido en el kit RayBiotech) con una mezcla de inhibidor de proteasas (Roche).

Las muestras fueron diluidas en buffer de bloqueo con una concentración final de proteínas de 250 µg. Las muestras para cada grupo fueron agrupadas e incubadas con la membrana de "array" a 4°C durante la noche. Después de los lavados las membranas fueron incubadas con los anticuerpos conjugados a biotina a 4°C durante la noche. Las membranas fueron luego procesadas de acuerdo al protocolo de RayBiotech, y fueron expuestas a película de rayos X (Biomax light film; #1788207; Kodak) y analizadas por el software ImageJ.

Determinación de concentración de proteínas

Se cuantificaron las proteínas mediante la técnica colorimétrica del ácido bicinconínico (BCA - SIGMA) de las siguientes muestras:

- 1. Homogeneizado de las células gliales aberrantes,
- 2. Homogeneizado de las células microgliales de animales adultos
- 3. Médula espinal lumbar de animales
 - a. No transgénicos
 - b. SOD1^{G93A} de 50 días
 - c. SOD1^{G93A} de 135 días
 - d. SOD1^{G93A} de 158 días

Los ensayos colorimétricos involucran la adición de una sustancia química que es capaz de reaccionar con determinados residuos aminoacídicos. El principio de la técnica de BCA se basa en la formación de un complejo Cu²⁺-proteína en condiciones alcalinas, con la consiguiente reducción del átomo de Cu²⁺ a Cu⁺. La cantidad de Cu⁺ reducido es proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra. El resultado de esta reacción es el cambio de color en la solución, que es cuantificado mediante la medida de absorbancia a 562 nm. Para determinar la concentración de proteínas totales de la muestra a analizar, se interpolan los resultados de absorbancia a una curva de calibración construida utilizando una proteína estándar, en este caso, albúmina sérica

bovina (BSA: bovine seric albumin), cuya concentración es conocida. En todos los pocillos que contienen muestra con las proteínas a cuantificar (se siembran dos pocillos por muestra para luego promediar los resultados) se agregar 150 μL del reactivo BCA +CuSO4 (50 partes de BCA por cada parte de CuSO4). Se deja incubando durante 30 minutos a 37°C y luego se realiza la lectura.

Purificación peptídica de los ribosomas de ratones CD11br Flag-eGFP-Rpl10a x SOD1^{G93A}

Para aislar los ribosomas de las células microgliales CD11b+ de la médula espinal de los ratones, se usó un protocolo similar al que describieron previamente Heintz y colaboradores (Boutej et al, 2016 en revisión) como se muestra en la Figura 6. Los ratones CD11b-RiboTag-SOD1^{G93A} de 158 días y sus respectivos controles fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de ketamina/xilacina (100/10 mg/kg).

- La médula espinal (de 3 ratones por grupo experimental) fue disecada rápidamente y sumergida en buffer de disección (1X HBSS, 2.5 mM HEPES KOH pH 7.4 35 mM glucosa, 4 mM NAHCO₃, 100 μg/mL de cicloheximida y 1 tableta/10 mL de coctel de inhibidores de proteasas libre de EDTA) para remover la mayor cantidad posible de sangre y mantener el tejido vivo.
- Las médulas espinales de las diferentes condiciones fueron agrupadas y luego lisadas con un homogenizador motorizado en buffer de lisis (20 mM HEPES KOH pH 7.4, 140 nM KCl, 12 mM MgCl₂, 0.5 mM DDT, 10 U/mL Rnasie, 10 U/mL Superasie, 100 mg/mL cicloheximida y 1 tableta/10 mL de coctel de inhibidores de proteasas libre de EDTA).
- Los lisados se centrifugaron a 4°C a 2000 g por 10 min. 1/9 volumen de NP-40 10% libre de RNAsa y 1/9 volumen de DHPC (Thermo Fischer) fueron agregados al sobrenadante e incubados a 4°C por 30 min en un agitador.
- Se centrifugaron las muestras a 20000 g por 10 min a 4°C.
- Se agregaron las perlas de agarosa anti-Flag M2 al sobrenadante, se incubaron en un agitador durante la noche a 4°C.

- Se colectaron las perlas por centrifugación y se lavaron tres veces en buffer de lavado con alto contenido de sal (20 mM HEPES KOH ph7.4, 165 mM KCl, 12 mM MgCl₂, 1% V/V NP-40 libre de RNAsa, 0.5 mM DTT, 10 μg/mL de cicloheximida y 1 tableta/10 mL de coctel de inhibidor de proteasas libre de EDTA).
- Después de la última centrifugación, el pellet de perlas fue resuspendido en buffer de elusión (10 mM HEPES KOH ph 7.4, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM EDTA, y 1 tableta/10 mL de coctel de inhibidores de proteasas libre de EDTA) e incubado a temperatura ambiente durante 30 min en agitador.
- La elusión se colectó después de una centrifugación de 850 g por 16 min a temperatura ambiente y se mantuvo a -80°C para posterior análisis.

Identificación de péptidos aislados de ribosomas de ratones CD11br FlageGFP-Rpl10a x SO1^{G93A} mediante espectrometría de masa

Las muestras fueron analizadas mediante la técnica de espectrometría de masa por la Plataforma de Proteómica de Easter Quebec Genomic Center, CHU de Quebec, Canadá. Los resultados fueron analizados en colaboración con Louis-Charles Béland y Melanie Lalancette-Hebert.

La espectrometría de masa (MS por sus siglas en inglés Mass Spectometry) es una técnica analítica que ioniza especies químicas y las clasifica basándose en su relación masa/carga. La MS es usada para el análisis de diferentes compuestos incluyendo péptidos y proteínas y se aplica tanto a muestras puras como a mezclas complejas.

1. Preparación de las muestras obtenidas de la purificación peptídica mencionada anteriormente

- Se concentraron las muestras en columnas Amicon desalinizadoras de 3 kDa (Millipore), luego se realizaron 3 lavados con bicarbonato de amonio 50 mM
- II. La misma cantidad de proteína (calculada por el ensayo colorimétrico de Bradford) fue solubilizada en buffer de desnaturalización (Bicarbonato de amonio 50 mM pH 8, deoxicolato de sodio 1%, 30 μL volumen final)
- III. Las proteínas fueron calentadas a 95°C por 5 min
- IV. Los puentes disulfuro fueron reducidos con 1 μg de DDT a 37°C por 30 min
- V. Los enlaces alquilados con 5 µg de yodoacetamida a 37°C, en la oscuridad por 30 min

- VI. Se agregó 1 µg de tripsina y se incubó durante la noche a 37°C. La tripsinización se detuvo mediante la acidificación de la muestra a un pH menor a 2.5 con una solución compuesta por 30 µg de ACN 3%, TFA 0.1%, ácido acético 0.5%
- VII. El precipitado del deoxicolato de sodio fue eliminado con una incubación a temperatura ambiente por 10 min y posterior centrifugación a temperatura ambiente a 16000 g por 5 min
- VIII. El sobrenadante fue desalado en un filtro Empore C18
- IX. Los péptidos fueron eluídos en 80% ACN, 0.1% TFA y secados mediante vacío de velocidad

2. Análisis de las muestras por triplicado en nano LC/MSMS

Los experimentos fueron realizados por técnicos del servicio de la Plataforma de Proteómica de Easter Quebec Genomic Center, CHU de Quebec-Canadá, con un sistema de cromatografía Dionex UltiMate3000 nano RSLC (Thermo Fisher Scientific/Dionex SoftronGmbH, Germering, Germany) conectado a un espectrómetro de masas de fusión Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) equipado con una fuente de iones nano electrospray.

- Las muestras fueron re suspendidas en 2% acetronitrilo, 0.05% ácido trifluoroacético y analizadas por triplicado en nano LC/MSMS.
- ii. Para cada inyección se inyectaron 750 ng de péptido.
- iii. Se separaron los péptidos mediante fase inversa en línea (RP) en una cromatografía líquida de "nano escala" (nano LC) y se analizó por espectrometría de masa electrospray (ESI MS/MS).

Los experimentos fueron realizados con un sistema de cromatografía Dionex UltiMate3000 nano RSLC (Thermo Fisher Scientific/Dionex SoftronGmbH, Germering, Germany) conectado a un espectrómetro de masa de fusión Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) equipado con una fuente de iones nano electrospray.

3. Análisis de los resultados obtenidos mediante espectrometría de masa

La búsqueda de bases de datos y los espectros de cuantificación libre de etiquetas (Arike and Peil, 2014) se realizaron en una base de datos de proteínas de ratón (UniprotKB – taxonomía Mus musculus – 84675 secuencias) usando el módulo Andromeda del software MaxQuant v 1.5.0.2538.

Para la validación de las proteínas, un máximo de falsos descubrimientos fue seteado en 1% y el nivel de proteínas usado se basó en una búsqueda de objetivo/señuelo.

También se utilizó el software MaxQuant para la cuantificación libre de etiquetas. La opción "*match between runs*" fue usada con un valor de 20 min como ventana de tiempo de alineamiento y 3 min como ventana de tiempo de encuentro. Solo se utilizaron péptidos únicos para la cuantificación. Los valores de intensidad de LFQ (valores

normalizados) extraídos de MaxQuant para cada proteína, en cada replicado de muestra, fueron usados para calcular la relación entre dos muestras para comparar el valor p en un test de la t de Student. Una proteína se consideró cuantificable solo si las dos muestras comparables estaban presentes. Una proteína se consideró como variable si la diferencia entre las dos muestras comparadas era mayor que 1.2 y el valor p asociado menor a 0.05.

Immunofluorescencia en células gliales aberrantes en cultivo

Las células gliales aberrantes (pasaje 5) obtenidas de ratones SOD1^{G93A} de 135 y 158 días fueron fijadas por PFA 4% durante 20 min a temperatura ambiente. Luego se realizaron 3 lavados con PBS 1X durante 10 min cada uno, y posteriormente se realizó la permeabilización en Tritón X-100 (Sigma) 0.1% en PBS 1X por 20 min a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados rápidos con PBS 1X, y se bloqueó con BSA (Sigma) 5% en PBS 1X. Los anticuerpos primarios utilizados se detallan en la Tabla 2. Los anticuerpos primarios se incubaron durante la noche a 4°C en una solución de BSA 5% en PBS-Tritón X-100 0.1%. Se realizaron tres lavados de 10 min con PBS 1X, y se incubó con los anticuerpos secundarios conjugados a Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 543, Alexa Fluor 633 y DAPI (Invitrogen) durante 2 h a temperatura ambiente. Las células fueron montadas en glicerol 50%.

Immunofluorescencia en cortes de médula espinal lumbar

Los ratones SOD1^{G93A} de 50, 135 y 158 días y sus respectivos controles fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de ketamina/xilacina (100/10 mg/kg). Fueron perfundidos transcardíacamente con 30 mL de solución salina (0.9% NaCl) y 60 mL de paraformaldehído al 4% (PFA). La médula espinal fue disecada y post-fijada durante la noche en PFA 4% a 4°C. Posteriormente se equilibró el tejido en sacarosa 30% por 24 h. Se realizaron cortes de 30 µm de espesor en criostato Leica a -20°C, las secciones fueron colectadas en PBS 1X para la inmunohistoquímica. Los cortes fueron permeabilizados durante 20 min a temperatura ambiente con Tritón X-100 0.3% en PBS,

se realizaron tres lavados con PBS 1X, y se bloqueó con BSA 5% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios utilizados se detallan en la Tabla 2. Los anticuerpos primarios se incubaron durante la noche a 4°C en una solución de BSA 5% en PBS-Tritón X-100 0.1%. Se realizaron tres lavados de 10 min con PBS 1X, y se incubó con DAPI (Invitrogen) y los anticuerpos secundarios conjugados a Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 543, Alexa Fluor 633 durante 2 h a temperatura ambiente. Las secciones de médula espinal con inmunotinción fueron montadas sobre portaobjetos (DELTALAB) con Mowiol (24 g de Glicerol, 9,6 g Mowiol, 48 mL Tris HCL 0,2 M pH 8,5 para un volumen final de 250 mL).

Antiquama	Origan	Marea Dil	uatán
Anticuerpo	Origen	Marca Dill	lcion
lba1	Rabbit	WAKO 1:5	00
GFAP	Rabbit	DAKO- Z0384 1:1	0000
\$100β	Mouse	Sigma 1:5	00
Gal-3	Rat	Abcam – Ab76245 1:5	00
ChAT	Rabbit	Abcam 1:3	00
Rootletina	Mouse	Santa Cruz- SC- 1:3	00
		374056	
STK38	Mouse	Abcam – ab125131 1:3	00
Hspb1	Mouse	Cell Sign – 2442S 1:3	00
Gal-3	Rat	Generado por el 1:5	00
		laboratorio del	
		Prof. Jean-Pierre	
		Julien	

Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados. Se detallan los distintos anticuerpos utilizados en el trabajo y sus respectivas diluciones.

Microscopía confocal

La microscopía confocal moderna mantiene los elementos esenciales del diseño original: la abertura "pinhole" y la iluminación punto por punto de la muestra. Los avances en óptica y electrónica han traído mejoras en la velocidad, la calidad de imagen, la generación y el almacenamiento de las imágenes. Actualmente existen varios tipos de diseños de microscopios confocales. La mayoría de las imágenes generadas por éstos se
da reflejando la luz fuera de la muestra o mediante la estimulación de la fluorescencia de colorantes (fluoróforos) aplicados a la muestra. En aplicaciones biológicas generalmente se usa la estimulación de la fluorescencia. La microscopía confocal ofrece una mayor resolución (0.14µm en el horizontal y 0.23µm en el vertical) (Wilson, 2011), mayor contraste, y la posibilidad de hacer reconstrucciones 3D.

Preparación de muestras para análisis por Western Blot

Los ratones SOD1^{G93A} de 50, 135 y 158 días y sus respectivos controles fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de ketamina/xilacina (100/10 mg/kg). Fueron perfundidos transcardíacamente con 30 mL de solución salina (0.9% NaCl). La zona lumbar de la médula espinal fue disecada sumergida en buffer de lisis. Se sonicaron las muestras a 4°C utilizando un sonicador hasta obtener una solución homogénea. Luego de haber determinado la concentración de las proteínas mediante la técnica de BCA, las mismas fueron mezcladas con el buffer de carga 5X (15% SDS, 0.3 M Tris pH 6.8, 25 % Glicerol, 1.5 M β-mercaptoetanol, 0.01 % Bromophenol Blue), de forma que la concentración final del buffer fue 1X. Posteriormente se incubaron durante 5 min a una temperatura de 95°C, para lograr su desnaturalización. Se guardaron las muestras a -20°C hasta su sembrado en el gel.

SDS-PAGE y Western Blot

Las proteínas se separaron según su peso molecular mediante SDS-PAGE siguiendo el protocolo convencional, utilizando un gel concentrador al 6% (p/v) y un gel separador de 12% de acrilamida/bus-acrilamida. Se utilizó el sistema de electroforesis de BioRad. Se utilizó buffer Tris-Glicina (250 mM Tris, 1.92 M Glicina, 1% SDS) para la electroforesis. El voltaje aplicado fue de 75 V durante 15 min y 100 V hasta que el frente de corrida visualizado por la banda de azul de bromofenol llegó a la parte inferior del gel. El peso molecular de las muestras se estimó por comparación con un estándar de peso molecular (Page Ruler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific). Para el Western Blot las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (0.45 μ M, Thermo Scientific, USA) a 300 mA durante 1:45 h en buffer de transferencia (Buffer de electroforesis + 20%

de etanol). Las membranas se bloquearon durante 1 h en buffer de bloqueo (5% BSA, 0.1% Tween-20 en TBS, pH 7.4) con subsiguiente incubación del anticuerpo primario diluido en buffer de bloqueo toda la noche a 4°C. Luego de realizar 3 lavados con TBS + 0.1% Tween (TBS-T) por 10 min cada uno, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario Goat anti-rabbit IgG (H+L) conjugado a peroxidasa (1:5000; Abcam, USA), o Goat anti-mouse IgG1 conjugado a peroxidasa (1:10.000, Abcam, USA) durante 1 h. Posteriormente se realizaron 3 lavados con TBS-T por 10 min cada uno y se reveló con quimioluminiscencia. Las membranas se incubaron 1 min con solución ECL (Vivo Science, Argentina) y se expusieron con HyperfilmsTM (Amersham, GE Healthcare, USA) varias veces utilizando HypercassetteTM (Amersham, GE Healthcare, USA). Los films se revelaron con soluciones de revelado y fijado de Química MediQ (Uruguay). Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-Galactina, anti-STK38, anti-Hspb1, anti-GFAP, anti- α Tubulina.

Protocolo de inyección intracerebroventricular del medio condicionado de las células gliales aberrantes

Las cirugías fueron llevadas a cabo por Geneviève Soucy. La adquisición de imágenes y posterior análisis de las mismas fue realizado en colaboración con Louis-Charles Béland y Melanie Lalancette-Hebert.

Ratones TLR2-luc-GFP de 12 semanas de edad de ambos sexos fueron anestesiados con 2% de isofluorano en 100% de oxígeno a una velocidad de flujo de 1.5 L/min y ubicados en un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments).

Los animales recibieron una inyección de medio condicionado (sin suero) de las células gliales aberrantes 5DIV (10μ I) o DMEM (10μ I) en la región parietal derecha del cerebro. Las coordenadas para la inyección estereotáxica fueron las siguientes: -1.0 mm anteroposterior, -1.5 mm laterar (derecho) y -2.00 mm dorsoventral al bregma.

Las inyecciones se realizaron usando una cánula de acero inoxidable de calibre 33 (Plastics One) conectada a una jeringa Hamilton de 25 mL. Un volumen de 10 μ L fue inyectado con una velocidad de 1 μ L por min usando una bomba de microinyección (modelo A-99; Razek Scientific Instruments).

Posterior a la inyección se esperaron 5 min antes de retirar la cánula. Los animales fueron escaneados longitudinalmente por bioluminiscencia in vivo cada 24 h por una semana.

Protocolo de adquisición e imagenología in vivo

Las imágenes fueron colectadas usando una cámara de alta sensibilidad (CCD) con longitudes de onda que oscilan entre los 300 y los 600 nm. Los tiempos de exposición fueron de 1 min. Se usó el sistema de imagen IVIS[®]200 (CaliperLS, Alameda, CA, USA).

- i. 20 min antes de la sesión de imagen, los ratones recibieron la inyección intraperitoneal del sustrato de luciferasa, la D-luciferina (10 μ L/g) en el cuadrante izquierdo inferior del abdomen usando una jeringa de 1 mL.
- ii. 15 min después los ratones fueron anestesiados con 2% isofluorano en 100%
 oxígeno a una velocidad de 2 L/min y colocados en el equipo de imagen.

La emisión de bioluminiscencia fue normalizada y se mostró en unidades físicas de radiancia superficial (fotones/s/cm²). La salida de la luz se cuantifica mediante la determinación del número total de fotones emitidos por segundo, usando el software de adquisición e imágenes Living Image 2.5 (CaliperLS). Las medidas de las regiones de interés de las imágenes se usan para convertir la radiancia superficial (fotones/s/cm²) a la fuente de flujo, o el total de los fotones expresados en fotones/segundo (f/s).

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el software Past3. Test de dos muestras (test de la t de Student) fue realizado entre grupos. Para los análisis de 3 o más grupos experimentales se utilizó el test Kruskal-Wallis seguido del estadístico Dunns. Todos los resultados fueron expresados como la media ± el error estándar de la media (SEM), considerando las diferencias del p valor <0.01 estadísticamente significativas.

RESULTADOS

Aislamiento de las células gliales aberrantes de la médula espinal de animales SOD1^{G93A} sintomáticos

Un objetivo de este proyecto fue el aislamiento de las células gliales aberrantes en el modelo SOD1^{G93A} de ratón. Para identificar estos marcadores, se aislaron las células CD11b+ de la médula espinal lumbar de animales SOD1^{G93A} mediante la técnica de separación celular (cell sorting). Se utilizaron animales no transgénicos y fueron comparados con animales SOD1^{G93A} en diferentes estadios de la parálisis:

- 100 días (inicio de los síntomas),
- 135 días (parálisis avanzada),
- 158 días (parálisis terminal).

Como se observa en la Figura 10, el cultivo de estas células dio como resultado la obtención de numerosas células gliales con fenotipo aberrante previamente descrito, siendo la primera vez que se logra este hito en el modelo de ratón SOD1^{G93A}. En comparación, no se obtuvieron células gliales con capacidad proliferativa de animales no transgénicos de las mismas edades. Las células aisladas de los diferentes estadios de la patología mostraron diferencias en el tiempo de transición de un fenotipo microglial a un fenotipo aberrante. Las células de los animales de 100 días mostraron una transición más rápida, mientras que los animales de 135 y 158 días mostraron una transición más lenta conforme el animal se encontraba más sintomático. Sumado a esto se observó que las células gliales aberrantes obtenidas de los animales de 158 días mostraron un fenotipo celular con muchas vacuolas, indicando un fenotipo fagocítico. Una vez trasformadas, las células forman monocapas aplanadas similares al fenotipo de astrocitos en cultivo previamente descrito en la rata (Diaz-Amarilla et al., 2011). Además, presentaron una alta tasa proliferativa y pudieron ser mantenidas en cultivo por sucesivos pasajes sin que pierdan la capacidad de replicación, sugiriendo la pérdida de senescencia replicativa. Las tres condiciones utilizadas para la obtención de las células gliales aberrantes (animales SOD1^{G93A} de 100, 135 y 158 días) mostraron un fenotipo celular similar al descrito anteriormente por Díaz-Amarilla et al (2011), y Trias et al (2013), y mostraron una velocidad de transición mucho mayor (3-5 días) a la

observada en el modelo de rata (10-15 días) en lograr un fenotipo aberrante.



Figura 10: Cultivos de células gliales aberrantes aisladas de médula espinal lumbar de ratón SOD1^{G93A} en diferentes estadios de la patología. Se aislaron las células microgliales de la médula espinal lumbar de ratones SOD1^{G93A} de 100, 135 y 158 días. A. Se muestran imágenes representativas de los cultivos celulares luego de 3 y 5 días in vitro (DIV). Se observa como las células sufren una transformación. Comienzan siendo células con fenotipo típico microglial y luego de 3 DIV comienzan a mostrar un fenotipo más parecido a las células gliales aberrantes descritas en el modelo de rata. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio de campo claro. B. Cuantificación de la transformación de células gliales aberrantes respecto al total de células. Los datos se muestran como la media \pm error estándar de la media, *p < 0.01 fue considerado significativo (*p < 0.01, **p < 0.001 y ***p < 0.0001). Escala: 10 µm

Análisis del perfil de citoquinas expresadas y liberadas por las células gliales aberrantes

Teniendo en cuenta que las células gliales aberrantes aparecen cuando comienzan los síntomas de la patología, son células potencialmente tóxicas para las motoneuronas y contribuyen a la neuroinflamación, se procedió a analizar el perfil de las citoquinas expresadas y secretadas al medio de cultivo. Analizamos cuatro condiciones diferentes:

- Homogeneizado de las células gliales aberrantes,
- Medio condicionado de las células gliales aberrantes,
- Homogeneizado de microglía adulta de animales no transgénicos,
- Medio condicionado de la microglía adulta de animales no transgénicos.

Las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17 y el INF- Υ , así como los receptores TNFRI, TNFRII, mostraron un aumento significativo en el homogeneizado de células gliales aberrantes respecto las células microgliales adultas de animales no transgénicos (Figura 11). En comparación, en el medio condicionado sólo se observó un



aumento significativo de IL-1 β y la IL-6, mientras que TNF- α , INF-Y, TNFRI y TNFRII estaban disminuidos con respecto al control. En paralelo, se observó un aumento

Figura 11. Análisis de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en las células gliales aberrantes, células microgliales adultas de animales no transgénicas y sus medios condicionados. Cuantificación de la expresión de las citoquinas realizadas mediante el uso de un kit de array de anticuerpos. Se grafica la expresión de las citoquinas expresada en función de la densidad integrada normalizada en: homogeneizado de células gliales aberrantes (Glía aberrante), Células microgliales de animales no transgénicos adultos (Microglia WT) y medio condicionado de células gliales aberrantes (MC Glía aberrante) y medio condicionado de Células microgliales de animales no transgénicos adultos (MC Microglia WT). Se utilizararon al menos 5 animales por grupo experimental. Los datos se muestran como la media \pm error estándar de la media, *p < 0.01 fue considerado significativo. (*p < 0.01, **p < 0.001 y ***p < 0.001)



Figura 12. Análisis de la expresión de citoquinas anti-inflamatorias en las células gliales aberrantes, células microgliales adultas de animales no transgénicas y sus medios condicionados. Cuantificación de la expresión de las citoquinas realizadas mediante el uso de un kit de array de anticuerpos. Se grafica la expresión de las citoquinas expresada en función de la densidad integrada normalizada en: homogeneizado de células gliales aberrantes (Glía aberrante), Células microgliales de animales no transgénicos adultos (Microglia WT) y medio condicionado de células gliales aberrantes (MC Glía aberrante) y medio condicionado de Células microgliales de animales no transgénicos adultos (MC Microglia WT). Se utilizaron al menos 5 animales por grupo experimental. Los datos se muestran como la media \pm error estándar de la media, *p < 0.01 fue considerado significativo. (*p < 0.01, **p < 0.001 y ***p < 0.0001)

significativo de la expresión de las citoquinas anti-inflamatorias IL-4, IL-10, IL-13 y los factores de crecimiento M-CSF y GM-CSF, G-CSF en las células gliales aberrantes respecto a las células microgliales adultas no transgénicas (Figura 12). Al analizar el medio condicionado encontramos un aumento significativo en los niveles de IL-4 y la IL-10. Los factores de crecimiento que promueven la microgliosis (M-CSF y G-CSF) mostraron una disminución significativa en las células gliales aberrantes.

Perfil de marcadores específicos de las células gliales aberrantes por análisis proteómico de péptidos asociados a ribosomas

Como las células gliales aberrantes son obtenidas de las células CD11b+ aisladas de la médula espinal lumbar, se utilizó el ratón transgénico RiboTag-CD11br-SOD1^{G93A} para aislar las subunidades ribosomales de las células CD11b de la médula espinal, y luego se analizaron estas muestras por espectrometría de masa. Gracias a estas técnicas pudimos determinar las proteínas mayoritarias que estaban siendo traducidas en tiempo real en estas células. Los resultados obtenidos luego del análisis proteómico mostraron grandes diferencias (aumento y disminución) de las proteínas expresadas en los animales SOD1^{G93A} sintomáticos respecto a animales no transgénicos. Como uno de los objetivos de este proyecto fue identificar posibles biomarcadores moleculares para la patología ELA, se seleccionaron para su caracterización las 9 proteínas que mostraban el mayor nivel de expresión de acuerdo al siguiente orden (Figura 13).

- Rootletina está aumentada 110 veces en los animales SOD1^{G93A} respecto a los controles no transgénicos. Esta proteína es codificada por el gen CROCC, forma parte de la estructura de la raíz ciliar, y junto con las proteínas CEP68 y CEP250 intervienen en el proceso de cohesión del centrosoma antes de la mitosis (Graser et al., 2007). No se la ha relacionado hasta el día de hoy a ninguna patología neurodegenerativa.
- GFAP (Glial fibrilary acidic protein) presenta un aumento aproximado 25 veces mayor en los animales SOD1^{G93A} respecto a los controles. Este aumento es sumamente interesante, ya que esta proteína también se encontró aumentada en las células gliales aberrantes en el modelo SOD1^{G93A} de rata.

- TGM-1 (Transglutaminasa-1): enzima que se encuentra en las células que forman la epidermis y se encuentra aumentada en los animales SOD1^{G93A} respecto a los controles. La TGM-1 está involucrada en la formación de la membrana celular de las células de la epidermis, forma enlaces fuertes entre las proteínas estructurales que componen la membrana, generando resistencia y estabilidad de la epidermis (Herman et al., 2009).
- Hspb-1 (Proteína de choque térmico beta 1), también se encuentra aumentada, y pertenece a la familia de proteínas pequeñas de estrés térmico (HSP20). En respuesta a estrés, Hspb-1 se transloca del citoplasma al núcleo y funcionan como chaperonas moleculares que promueven el correcto plegamiento de otras proteínas. Esta proteína juega un rol importante en la diferenciación de una gran cantidad de tipos celulares. Hspb1 ha sido reportada actuando en la modulación de la transcripción, la traducción, estados redox, sobrevida e invasión de células tumorales, senescencia y en la integridad del citoesqueleto entre otras (Arrigo and Gibert, 2013). También puede promover indirectamente el re-plegamiento o la degradación proteolítica
- La proteína STK38 también se encuentra aumentada y pertenece a la familia de serina/treonina proteína quinasas. La actividad quinasa de esta proteína está regulada por autofosforilación y fosforilación por otras quinasas. Esta proteína interviene en el ciclo celular y la apoptosis, también regula la estabilidad y la actividad transcripcional del oncogen MYC (Wen et al., 2015).
- C1qa y C1qb, dos proteínas del complemento se encontraron aumentadas. Este sistema es uno de los componentes principales de la respuesta inmune. Las proteínas C1q participan en el proceso de fagocitosis de células apoptóticas, y se sabe que la deficiencia de proteínas C1q conduce a una falla en la eliminación de células aptoptóticas causando la acumulación de cuerpos celulares apoptóticos (Galvan et al., 2012).
- MVP también se encontró aumentada. Esta proteína es una ribonucleoproteína de múltiples subunidades que puede estar implicada en el transporte núcleocitoplasma. También puede desempeñar un papel importante en múltiples procesos celulares mediante la regulación de las vías de la MAP quinasa, JAK/STAT y la fosfoinodite-3-quinasa/Ark. También interviene en la resistencia a

múltiples fármacos, y la expresión de esta proteína puede ser un marcador para varios tipos de cáncer (Park, 2012).



Figura 13: Cuantificación de la expresión de proteínas de los ribosomas de las células CD11b+ de los ratones CD11br-RiboTag-SOD1^{G93A} mediante espectrometría de masa. Se aislaron los ribosomas de las células CD11b+ de la médula espinal lumbar de los animales CD11br-RiboTag -SOD1^{G93A} de 158 días y de animales no transgénicos de la misma edad. Las muestras fueron analizadas mediante espectrometría de masa y se identificaron las proteínas que se encontraban más sobre expresadas en los ratones transgénicos SOD1^{G93A} respecto los no transgénicos. Se muestran las 9 proteínas que se encontraron más sobre expresadas y todas mostraron un aumento significativo respecto a los animales no transgénicos (línea punteada roja). Los datos se muestran como la media ± error estándar de la media, *p<0.01.

Caracterización mediante inmunocitoquímica de los marcadores de las células gliales aberrantes

Basándonos en los resultados del análisis proteómico de ribosomas aislados, procedimos a comprobar la expresión de dos proteínas altamente expresadas por inmunocitoquímica en cultivos celulares de células gliales aberrantes. La Figura 13 muestra la marcación inmunocitoquímica para la Rootletina, tanto en células gliales aberrantes obtenidas de ratones SOD1^{G93A} de 135 como de 158 días. Se observa una localización en todo el cuerpo celular. La Rootletina co-localiza con la proteína Galectina-3, un marcador de activación temprana de las células microgliales (Lalancette-Hebert et al., 2012). La tasa de proliferación de la glia aberrante Rootletina+ fue analizada por inmunocitoquímica para Ki67 (Jurikova et al., 2016). Observamos que la proliferación celular aumenta progresivamente con el estadio de la parálisis a la que fueron obtenidas, siendo mayor a los 158 días que a los 135 días (Figura 14).



Figura 14. Inmunofluorescencia de las células gliales en cultivo obtenidas de ratones SOD1^{G93A} **de 135 y 158 días.** Imágenes representativas de las células gliales aberrantes obtenidas de animales de 135 y 158 días, adquiridas con microscopio confocal. Se muestra la marcación para los anticuerpos Galectina-3, Rootletina y Ki67. Se observan células positivas para los tres marcadores. Escala: 10 μm.

La expresión de la proteína STK38 por inmunohistoquímica solo pudo comprobarse en las células gliales aberrantes obtenidas de animales de 158 días, no así a los 135 días (Figura 15). Como esta proteína interviene en el ciclo celular (Wen et al., 2015), el resultado sugiere que solo se expresa en las células que se están dividiendo activamente.



Figura 15. Inmunofluorescencia de las células gliales en cultivo obtenidas de ratones SOD1^{693A} **de 135 y 158 días. A.** Imágenes representativas de las células gliales aberrantes obtenidas de animales de 135 y 158 días, obtenidas con microscopio confocal. Se muestra la marcación para los anticuerpos Galactina-3 y STK38. Se observa que en los animales de 158 días las células son positivas para ambos marcadores, a diferencia de los animales de 135 días donde las células son positivas para Galectina-3 pero no para STK38. Escala: 10 µm.

Validación de marcadores por inmunohistoquímica

Luego de la identificación y caracterización de las células gliales aberrantes en cultivo, decidimos buscar estas células cortes de médula espinal lumbar del modelo de ratón SOD1^{G93A} en comparación con controles no transgénicos. Seleccionamos cuatro condiciones de animales:

- 1. no transgénicos,
- 2. SOD1^{G93A} 50 días (asintomáticos),
- 3. SOD1^{G93A} 135 días (parálisis avanzada),
- 4. SOD1^{G93A} 158 días (parálisis terminal).

Se analizaron cortes histológicos de médula espinal lumbar mediante inmunohistoquímica. Las imágenes fueron adquiridas en el asta ventral de la médula espinal, donde se registra la neurodegeneración del soma de las motoneuronas y su entorno neuroinflamatorio. Se analizaron al menos 3 animales para cada grupo experimental.

Como paso previo, se procedió a validar la microgliosis previamente descrita en ratones SOD1^{G93A} sintomáticos (Brites and Vaz, 2014), usando los marcadores microgliales clásicos Iba1 y Galectina-3. La Figura 16 A muestra un aumento franco en la microgliosis Iba1+ y Galectina-3+, así como un alto grado de co-localización en los animales sintomáticos. La Galectina-3 también mostró un aumento en el análisis por Western blot (Figura 16B). Seguidamente, se procedió a estudiar la interacción espacial entre motoneuronas, marcadas con el anticuerpo para colinacetiltransferasa (ChAT) y las microglías marcadas con Galectina-3. Como se había descrito previamente, se observó una disminución del número de motoneuronas ChAT+ y un aumento de las células Galectina-3+, muchas de las cuales se encuentran rodeando a las motoneuronas (Figura 17).

La Figura 18 muestra la localización de la Rootletina en células de aspecto microglial en los animales sintomáticos SOD1^{G93A}, el número de células Rootletina+ aumenta con la progresión de la parálisis. En comparación, no se observó inmunomarcación de Rootletina en la médula espinal de animales no transgénicos ni en animales SOD1^{G93A} no sintomáticos. Parte de las células Rootletina+ mostraron co-localización con el

marcador microglial Galectina-3. No fue posible detectar la Rootletina por la técnica de Western blot, posiblemente debido a que esta proteína tiene un peso molecular aproximado de 200 kDa y se transfiere incompletamente del gel a la membrana.



Figura 16. Inmunofluorescencia en secciones de médula espinal lumbar de ratones SOD1^{G93A} **de 50, 135 y 158 días y de ratones no transgénicos. A.** Imágenes representativas de secciones de médula espinal lumbar de 30 μm obtenidas de animales de 50, 135 y 158 días, así como de animales no transgénicos, adquiridas con microscopio confocal. Se muestra la marcación para los anticuerpos Galectina-3 e Iba1. Se observan células positivas para los dos marcadores. Se observa que aumenta la inmunofluorescencia de ambos marcadores conforme avanza la patología. Barra de escala: 20 μm. **B.** Western blot utilizando el anticuerpo contra Galectina-3 de los diferentes grupos experimental y su cuantificación, se observa como la expresión de la Galectina-3 aumenta conforme progresa la patología. Los datos se muestran como la media ± error estándar de la media, *p<0.01.



Figura 17. Inmunofluorescencia en secciones de médula espinal lumbar de ratones SOD1^{G93A} **de 50, 135 y 158 días y de ratones no transgénicos.** Imágenes representativas de secciones de médula espinal lumbar de 30 μm de animales de 50, 135 y 158 días así como de animales no transgénicos, adquiridas con microscopio confocal Zeiss. Se muestra la marcación para los anticuerpos Galectina-3 y ChAT. Se observan células Galectina-3 rodeando a las motoneuronas (Inset). Barra de escala: 20 μm.



Figura 18. Inmunofluorescencia en secciones de médula espinal lumbar de ratones SOD1^{G93A} **de 50, 135 y 158 días y de ratones no transgénicos. A.** Imágenes representativas de secciones de médula espinal lumbar de 30 μm obtenidas de animales de 50, 135 y 158 días así como de animales no transgénicos, adquiridas con microscopio confocal. Se muestra la marcación para los anticuerpos Galectina-3 y Rootletina. Se observan células positivas para los dos marcadores. Se observa que aumenta la inmunofluorescencia para ambos marcadores conforme aumenta la sintomatología. Barra de escala: 20 μm.



Figura 19. Inmunofluorescencia en secciones de médula espinal de ratones SOD1^{G93A} **de 50, 135 y 158 días y de ratones no transgénicos. A.** Imágenes representativas de secciones de médula espinal lumbar de 30 μm de animales de 50, 135 y 158 días así como de animales no transgénicos, adquiridas con microscopio confocal. Se muestra la marcación para los anticuerpos Galectina-3 y STK38. Se observan células positivas para los dos marcadores. Se observa que aumenta la inmunofluorescencia de ambos marcadores conforme aumenta la sintomatología. Barra de escala: 20 μm. **B.** Cuantificación de las células STK38 positivas en los diferentes grupos experimentales. **C.** Western blot utilizando el anticuerpo contra STK38 de los diferentes grupos experimentales y su cuantificación, se observa como la expresión de STK38 aumenta a medida que progresa la parálisis. Los datos se muestran como la media ± error estándar de la media, *p<0.01.



Figura 20. Inmunofluorescencia en secciones de médula espinal lumbar de ratones SOD1^{G93A} **de 50, 135 y 158 días y de ratones no transgénicos. A.** Imágenes representativas de secciones de médula espinal lumbar de 30 µm de animales de 50, 135 y 158 días así como de animales no transgénicos, adquiridas con microscopio confocal. Se muestra la marcación para los anticuerpos Galectina-3 y Hspb1. Se observan células positivas para los dos marcadores, sin embargo no se observa co-localización. Barra de escala: 20 µm. **B.** Cuantificación de las células Hspb1 positivas en los diferentes grupos experimentales. **C.** Western blot utilizando el anticuerpo contra Hspb1. Los datos se muestran como la media ± error estándar de la media, *p<0.01

La inmunohistoquímica de STK38 mostró resultados similares a la Rootletina: STK38 marca células microgliales en el asta anterior de animales sintomáticos, co-localiza en menor grado con Galectina-3 y su expresión aumenta con el grado de parálisis (Figura 19 A). La expresión de esta proteína también se verificó mediante la técnica de Western blot y se observó un aumento franco de la expresión de STK38 en la médula espinal lumbar de los animales sintomáticos de 158 días (Figura 19 B), sugiriendo una correlación con la proliferación celular.

La Figura 20 A muestra la expresión de la proteína Hsbp1 por inmunohistoquímica de la médula espinal. Se observó un bajo número de células positivas para la proteína en el grupo experimental de 135 días en los ratones SOD1^{G93A}, esta cantidad aumenta al analizar los ratones SOD1^{G93A} de 158 días. A diferencia de las otras proteínas estudiadas, Hspb-1 no mostró co-localización con las células Galectina-3. Paradójicamente, la expresión de Hspb-1 en la médula espinal lumbar se encontró disminuida en los animales SOD1^{G93A} respecto a los animales no transgénicos (Figura 20 B). Este resultado puede ser explicado por una disminución de Hspb-1 en otros tipos celulares a medida que avanza la parálisis y que atenúa el incremento registrado en el pool de células gliales aberrantes.

La expresión de GFAP se incrementó conforme aumenta la sintomatología de los animales SOD1^{G93A} (datos no mostrados). No se observó co-localización de este marcador astrocitario con la proteína Galectina-3 ni con Rootletina, STK38, Hspb-1, sugiriendo que la microglía aberrante expresa una forma particular de GFAP que no es reconocida con los anticuerpos convencionales dirigidos contra la GFAP fibrilar astrocitaria (datos no mostrados).

Evaluación del potencial inflamatorio del medio condicionado de las células gliales aberrantes en ratones salvajes a través de imagenología en tiempo real

Estudios previos de nuestro laboratorio, demuestran la actividad pro-inflamatoria de las células gliales aberrantes cuando estas células son trasplantadas en la médula espinal de animales salvajes. En el presente trabajo de tesis, estudiamos la actividad neuroinflamatoria del medio condicionado de las células gliales aberrantes, luego de su inyección intracerebroventricular. Para este fin, utilizamos un ratón transgénico TLR2-luc, que expresa la enzima luciferasa en las microglías activadas. La actividad de esta enzima puede ser estimada en animales vivos, mediante la detección de luz mediada por la luciferasa luego de la inyección del sustrato D-Luciferina.

Como se observa en la Figura 21, la emisión de luz (medida en fotones por segundo) en la región encefálica fue significativamente mayor en aquellos animales que recibieron 10 µL de medio condicionado de las células gliales aberrantes, respecto a la inyección de igual volumen de medio de cultivo DMEM sin condicionar. Las imágenes en tiempo real fueron obtenidas 24 h antes de la inyección para poder determinar la fluorescencia basal y luego de 24h y 48h de la inyección del medio condicionado (Figura 21). Luego esta fluorescencia fue disminuyendo hasta no ser significativamente mayor que el control a las 120 h post-inyección. Este resultado sugiere que el medio condicionado de las células gliales aberrantes es capaz de inducir la activación de las células microgliales que expresan TLR2 en el cerebro de animales no transgénicos.



ICV injection in TLR2-luc-GFP mice

Figura 21: Imágenes en tiempo real de la respuesta de las células TLR2 a la inyección intracerebroventricular de medio condicionado (MC) de las células gliales aberrantes y DMEM (control). A. Se muestran fotografías representativas de un ratón, tomadas en diferentes tiempos luego de la inyección, y se observa un aumento de la activación de las células TLR2. Este aumento de la activación de las células TLR2 en los animales inyectados con MC en comparación con los animales inyectados con el control a las 48 h de la inyección. Este aumento persiste hasta las 72 h posteriores a la inyección. La barra de calibración de colores que se encuentra a la derecha son fotones. El gráfico de los datos obtenidos por medida de la actividad luciferasa en el cerebro de los animales se mide en fotones/segundo (f/s). **B.** Cuantificación de la fluorescencia detectada. Los datos se muestran como la media ± error estándar de la media, *p < 0.01 fue considerado significativo.

Discusión

El objetivo de este trabajo fue la identificación y caracterización de marcadores moleculares específicos de las células gliales aberrantes en un modelo de neurodegeneración. Logramos aislar, por primera vez, células gliales aberrantes en el modelo de ratón SOD1^{G93A}. El perfil proteómico de los ribosomas CD11b de los animales transgénicos sintomáticos respecto a los controles, nos permitió identificar dos posibles marcadores moleculares para diagnóstico y pronóstico de la ELA. El uso de animales TLR2-luc nos permitió demostrar que el medio condicionado de las células gliales aberrantes es capaz de generar activación y/o proliferación microglial cuando es inyectado a nivel intracerebroventricular, por lo que estas células podrían ser consideradas como mediadores patogénicos.

Las células gliales aberrantes obtenidas de los ratones sintomáticos SOD1^{G93A} mostraron características similares a las descritas previamente en el modelo SOD1^{G93A} de rata, con una morfología aplanada, organización en monocapas similar a los astrocitos (Diaz-Amarilla et al., 2011) y con un tiempo de transformación más rápido que el observado en el modelo de rata. Las diferencias en la velocidad de la transformación de las células obtenidas a partir de diferentes estadios de la patología y su morfología, revelan que las células gliales aberrantes de los distintos estadios de la parálisis podrían representar diferentes subpoblaciones y estar condicionadas por las diferencias en los microambientes de los cuales son aisladas (Nardo et al., 2016). La identificación, por primera vez, de las células gliales aberrantes en el modelo de ratón SOD1^{G93A} permite pensar en que estas células podrían ser mediadores claves del proceso patológico por lo que podrían ser utilizadas como blancos de terapias, aumentando así las expectativas de identificarlas en un futuro en muestras de pacientes con ELA.

El perfil de expresión y liberación de citoquinas las células gliales aberrantes no permite concluir si la glía aberrante aislada pertenece a los fenotipos clásicos "M1" o "M2". Las células gliales aberrantes expresan y liberan citoquinas pro-inflamatorias que pueden inducir citotoxicidad a través de la producción de radicales libres, óxido nítrico, glutamato y factores del complemento, lo que puede ocasionar disfunción neuronal y muerte (Ramesh et al., 2013). Al mismo tiempo, la expresión de citoquinas anti-

inflamatorias inducen cascadas de señales que activan procesos anti-inflamatorios como la sobre regulación de la Arginasa 1, la inhibición de NF-κB y la producción de receptores fagocíticos (Gadani et al., 2012; Taylor et al., 2005), lo que podría mejorar la supervivencia de las neuronas y la glía. Las diferencias observadas entre la expresión y liberación de citoquinas por las células gliales aberrantes, pordía deberse a una liberación diferencial de citoquinas por parte de las células gliales aberrantes, y es probable que no todas las citoquinas analizadas sean liberadas. Sumado a esto, el hecho que las células gliales aberrantes tengan un perfil de expresión de citoquinas pro- y anti-inflamatorios, apoya el concepto de fenotipo aberrante, contribuyendo a la generación de un microambiente neuroinflamatorio complejo en los animales SOD1^{G93A} sintomáticos.

Identificamos dos proteínas que podrían ser utilizadas como marcadores de las células gliales aberrantes, la Rootletina y la STK38. Ambas proteínas están sobre-expresadas en animales SOD1^{G93A} y su expresión aumenta a medida que progresa la parálisis. Estos marcadores junto con la Galectina-3 nos permitieron identificar las células gliales aberrantes en la médula espinal lumbar de los animales sintomáticos. Como describieron previamente Trias y colaboradores (Trias et al., 2013) en el modelo de rata, las células gliales aberrantes del ratón SOD1^{G93A} también se encuentran rodeando a las motoneuronas en el asta ventral de la médula espinal y su número aumenta conforme aumenta la parálisis en los animales. Esto nos hace pensar que estas células son protagonistas y mediadores patogénicos en la sintomatología de los animales SOD1^{G93A}.

Actualmente se sabe que la función primaria de la Rootletina es formar la raicilla ciliar, que se encuentra en diversos organismos (Yang et al., 2002). La Rootletina interactúa con C-Nap1, una proteína implicada en la cohesión del centrosoma. Es fosforilada por la Nek2 quinasa, y se desplaza de los centrosomas al inicio de la mitosis. La sobre-expresión de Rootletina resulta en la formación de fibras extensivas. La depleción de Rootletina y/o C-Nap1 mediada por ARNsi, desencadena la división del centrosoma, lo que sugiere que ambas proteínas contribuyen al mantenimiento de la cohesión del centrosoma (Bahe et al., 2005). Estudios recientes en *Drosophila melanogaster* muestran que Root, (el único ortólogo de Rootletina y C-Nap1), se ensambla en raicillas de diversas

longitudes entre los diferentes tipos de neuronas sensoriales. Las neuronas portadoras de Root mutante carecen de raicillas y tienen la función sensorial dañada drásticamente (Chen et al., 2015). Esta es la primera vez que se estudia la función de la Rootletina en células nerviosas y aún no se la ha vinculado a enfermedades neurodegenerativas. Por lo mencionado anteriormente es difícil especular sobre qué rol está desempeñando esta proteína en la patogénesis de la ELA. Sin embargo, podríamos hipotetizar que la sobre-expresión de la Rootletina en las células gliales aberrantes se debe al microambiente neurodegenerativo en el cual están inmersas las células gliales aberrantes y los importantes cambios a nivel proteómico que detectamos, este sea uno de los tantos genes alterados en este fenotipo aberrante.

La autofagia juega un papel clave en el desarrollo, la oncogénesis y las enfermedades neurodegenerativas. Joffre y colaboradores describieron a la proteína quinasa STK38 como un regulador conservado de la autofagia. Demostraron que STK38 interviene en conjunto con Beclin1, un regulador clave de la autofagia (Joffre et al., 2015). Sumado a esto, los autores muestran evidencia de que STK38 y la GTPasa RalB ayudan la coordinación entre los eventos de autofagia y apoptosis cuando se induce la autofagia, por lo que proponen que la STK38 juega un rol clave en la determinación del destino celular en respuesta a condiciones autofágicas (Joffre et al., 2016). Por lo que sugerimos que la sobre-expresión de la proteína STK38 en las células gliales aberrantes puede deberse a un posible estado autofágico, evidenciado por la presencia de una importante cantidad de vacuolas en las células gliales aberrantes obtenidas de animales de 158 días. Sumado a esto, la expresión de STK38, evidenciada por las técnicas de Western blot e inmunohistoquímica, mostró un aumento significativo de la expresión en los animales sintomáticos SOD1^{G93A} de 158 días lo que apoyaría la hipótesis de autofagia evidenciada por las vacuolas en las células gliales aberrantes obtenidas de animales de 158 días.

Para determinar si las dos proteínas identificadas podrían ser utilizadas como biomarcadores se deberían realizar nuevos estudios de identificación de las mismas en el líquido cefalorraquídeo y/o en la sangre de animales transgénicos sintomáticos SOD1^{G93A} y compararlos con animales no transgénicos. Evaluar estas proteínas en los diferentes estadios de la patología nos permitiría determinar si estos potenciales

biomarcadores podrían predecir la velocidad de progresión de la patología. Como estas proteínas se encuentran sobre-expresadas en las células gliales aberrantes, células que en la actualidad están siendo blanco de terapia para el tratamiento de la ELA (Trias et al., 2016), estos biomarcadores podrían ser utilizadas para evaluar la eficacia del tratamiento. Si estas proteínas están amentadas, deberíamos además, utilizar otros modelos animales transgénicos (Turner et al., 2009) para verificar que también estén aumentadas. En el caso de no encontrar estos niveles aumentados de estas proteínas, ya sea en sangre o en líquido cefalorraquídeo, no servirían como biomarcadores y solamente podrían ser utilizados como marcadores en muestras post-mortem.

Otra de las proteínas que se encontró sobre-expresada fue GFAP, al igual que en el modelo de rata SOD1^{G93A}. Esta proteína parece expresarse en forma no fibrilar. Se están analizando anticuerpos específicos para su detección por inmunocitoquímica. La caracterización inmunocitoquímica de los otros marcadores específicos de glía aberrante se encuentra en curso y su estudio ha estado a la espera de la validación de anticuerpos específicos disponibles en el mercado

Mediante inyecciones intracerebroventriculares de medio condicionado de las células gliales aberrantes evaluamos la activación de las células TLR2 en el encéfalo de ratones TLR2-luc. Estudios previos mostraron que los receptores TLR2 están sobre-expresados en células gliales reactivas, mayoritariamente en las células microgliales, tanto en la sustancia gris (asta ventral) como en la sustancia blanca de la médula espinal de pacientes con ELA (Brites and Vaz, 2014). Nuestros resultados muestran una activación de las células TLR2 en la región encefálica de los animales inyectados con el medio condicionado de las células gliales aberrantes significativamente superior a los controles, lo que sugiere fuertemente el potencial neuroinflamatorio de estas células gliales reactivas, mayoritariamente en las células microgliales, tanto en la sustancia gris (asta ventral) como en la sustancia de la médula espinal de controles, lo que sugiere fuertemente el potencial neuroinflamatorio de estas células gliales reactivas, mayoritariamente en las células microgliales, tanto en la sustancia gris (asta ventral) como en la sustancia de la médula espinal de pacientes con ELA (Casula et al., 2011). Se cree que la activación de esta vía podía contribuir a la progresión de la neuroinflamación que resulta en la lesión de las motoneuronas, por lo que el medio condicionado de las células gliales aberrantes en el modelo de ratón SOD1^{G93A} podría

estar contribuyendo a la muerte de las motoneuronas en la médula espinal de los animales.

Conclusiones

Logramos identificar, por primera vez, células gliales aberrantes en el modelo de ratón SOD1^{G93A}. Identificamos dos marcadores moleculares específicos que podrían ser utilizados como biomarcadores para la detección y el seguimiento de la ELA. Sumado a esto aportamos evidencia de que la aparición de las células gliales aberrantes en la ELA es un mecanismo patogénico asociado a la sintomatología, que puede inducir la neuroinflamación y podrían están involucradas en la extensión del daño de las motoneuronas.

Perspectivas

Nuestro trabajo de tesis ha abierto una serie de preguntas que deberán ser explicadas en futuros experimentos. A modo de ejemplo, mencionamos las más importantes:

- i) Evaluar las proteínas STK38 y Rootletina en líquido cefalorraquídeo y sangre de animales SOD1^{G93A} de diferentes edades.
- ii) Determinar el perfil proteómico de los ribosomas de las células CD11b de animales sintomáticos de 100 y 135 días, para evaluar posibles diferencias con los animales de 158 días. Esto permitiría comprender mejor el perfil proteómico de las células CD11b que darán origen a las células gliales aberrantes.
- iii) Determinar el perfil de ARNm de las células CD11b (en animales CD11b-RiboTag-SOD1^{G93A}) de las distintas condiciones y compararlo con el perfil proteómico.
- iv) Determinar el potencial neuroinflamatorio de la inyección crónica de medio condicionado de células aberrantes en animales TLR2-luc.

Este trabajo de tesis con el resultado del análisis de STK38 y Rootletina en sangre y líquido cefalorraquídeo, y los resultados de la inyección crónica de medio condicionado de las células gliales aberrantes en animales TLR2-luc será publicado en los próximos meses en una revista internacional arbitrada.

Referencias

Alexianu, M.E., Kozovska, M., and Appel, S.H. (2001). Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. Neurology *57*, 1282-1289.

Amlie-Wolf, A., Ryvkin, P., Tong, R., Dragomir, I., Suh, E., Xu, Y., Van Deerlin, V.M., Gregory, B.D., Kwong, L.K., Trojanowski, J.Q., *et al.* (2015). Transcriptomic Changes Due to Cytoplasmic TDP-43 Expression Reveal Dysregulation of Histone Transcripts and Nuclear Chromatin. PloS one *10*, e0141836.

Anderson, M.A., Ao, Y., and Sofroniew, M.V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. Neuroscience letters *565*, 23-29.

Arike, L., and Peil, L. (2014). Spectral counting label-free proteomics. Methods in molecular biology *1156*, 213-222.

Arnold, E.S., Ling, S.C., Huelga, S.C., Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., Ditsworth, D., Kordasiewicz, H.B., McAlonis-Downes, M., Platoshyn, O., Parone, P.A., *et al.* (2013). ALS-linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult-onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *110*, E736-745.

Arrigo, A.P., and Gibert, B. (2013). Protein interactomes of three stress inducible small heat shock proteins: HspB1, HspB5 and HspB8. International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group *29*, 409-422.

Bahe, S., Stierhof, Y.D., Wilkinson, C.J., Leiss, F., and Nigg, E.A. (2005). Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion. The Journal of cell biology *171*, 27-33.

Beckman, J.S., Estevez, A.G., Crow, J.P., and Barbeito, L. (2001). Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS. Trends in neurosciences 24, S15-20.

Beleza-Meireles, A., and Al-Chalabi, A. (2009). Genetic studies of amyotrophic lateral sclerosis: controversies and perspectives. Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases *10*, 1-14.

Boillee, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kassiotis, G., Kollias, G., and Cleveland, D.W. (2006). Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. Science *312*, 1389-1392.

Brites, D., and Vaz, A.R. (2014). Microglia centered pathogenesis in ALS: insights in cell interconnectivity. Frontiers in cellular neuroscience *8*, 117.

Brown, R.H., and Al-Chalabi, A. (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis. The New England journal of medicine *377*, 162-172.

Bruijn, L.I., Becher, M.W., Lee, M.K., Anderson, K.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Sisodia, S.S., Rothstein, J.D., Borchelt, D.R., Price, D.L., *et al.* (1997). ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. Neuron *18*, 327-338.

Bushong, E.A., Martone, M.E., and Ellisman, M.H. (2004). Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience *22*, 73-86.

Cassina, P., Cassina, A., Pehar, M., Castellanos, R., Gandelman, M., de Leon, A., Robinson, K.M., Mason, R.P., Beckman, J.S., Barbeito, L., *et al.* (2008). Mitochondrial dysfunction in SOD1G93Abearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrialtargeted antioxidants. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *28*, 4115-4122. Cassina, P., Pehar, M., Vargas, M.R., Castellanos, R., Barbeito, A.G., Estevez, A.G., Thompson, J.A., Beckman, J.S., and Barbeito, L. (2005). Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. Journal of neurochemistry *93*, 38-46.

Cassina, P., Peluffo, H., Pehar, M., Martinez-Palma, L., Ressia, A., Beckman, J.S., Estevez, A.G., and Barbeito, L. (2002). Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. Journal of neuroscience research *67*, 21-29. Casula, M., Iyer, A.M., Spliet, W.G., Anink, J.J., Steentjes, K., Sta, M., Troost, D., and Aronica, E. (2011). Toll-like receptor signaling in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. Neuroscience *179*, 233-243.

Clement, A.M., Nguyen, M.D., Roberts, E.A., Garcia, M.L., Boillee, S., Rule, M., McMahon, A.P., Doucette, W., Siwek, D., Ferrante, R.J., *et al.* (2003). Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. Science *302*, 113-117.

Cordeau, P., and Kriz, J. (2012). Real-time imaging after cerebral ischemia: model systems for visualization of inflammation and neuronal repair. Methods in enzymology *506*, 117-133. Cronin, S., Hardiman, O., and Traynor, B.J. (2007). Ethnic variation in the incidence of ALS: a systematic review. Neurology *68*, 1002-1007.

Chaudhry, F.A., Lehre, K.P., van Lookeren Campagne, M., Ottersen, O.P., Danbolt, N.C., and Storm-Mathisen, J. (1995). Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. Neuron *15*, 711-720.

Chen, J.V., Kao, L.R., Jana, S.C., Sivan-Loukianova, E., Mendonca, S., Cabrera, O.A., Singh, P., Cabernard, C., Eberl, D.F., Bettencourt-Dias, M., *et al.* (2015). Rootletin organizes the ciliary rootlet to achieve neuron sensory function in Drosophila. The Journal of cell biology *211*, 435-453.

Da Cruz, S., Bui, A., Saberi, S., Lee, S.K., Stauffer, J., McAlonis-Downes, M., Schulte, D., Pizzo, D.P., Parone, P.A., Cleveland, D.W., *et al.* (2017). Misfolded SOD1 is not a primary component of sporadic ALS. Acta neuropathologica *134*, 97-111.

Di Giorgio, F.P., Boulting, G.L., Bobrowicz, S., and Eggan, K.C. (2008). Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation. Cell stem cell *3*, 637-648.

Di Giorgio, F.P., Carrasco, M.A., Siao, M.C., Maniatis, T., and Eggan, K. (2007). Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. Nature neuroscience *10*, 608-614.

Diaz-Amarilla, P., Olivera-Bravo, S., Trias, E., Cragnolini, A., Martinez-Palma, L., Cassina, P., Beckman, J., and Barbeito, L. (2011). Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *108*, 18126-18131.

Elliott, J.L. (2001). Cytokine upregulation in a murine model of familial amyotrophic lateral sclerosis. Brain research Molecular brain research *95*, 172-178.

Gadani, S.P., Cronk, J.C., Norris, G.T., and Kipnis, J. (2012). IL-4 in the brain: a cytokine to remember. Journal of immunology *189*, 4213-4219.

Galvan, M.D., Foreman, D.B., Zeng, E., Tan, J.C., and Bohlson, S.S. (2012). Complement component C1q regulates macrophage expression of Mer tyrosine kinase to promote clearance of apoptotic cells. Journal of immunology *188*, 3716-3723.

Giaume, C., Fromaget, C., el Aoumari, A., Cordier, J., Glowinski, J., and Gros, D. (1991). Gap junctions in cultured astrocytes: single-channel currents and characterization of channel-forming protein. Neuron *6*, 133-143.

Gong, Y.H., Parsadanian, A.S., Andreeva, A., Snider, W.D., and Elliott, J.L. (2000). Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *20*, 660-665.

Gowing, G., Philips, T., Van Wijmeersch, B., Audet, J.N., Dewil, M., Van Den Bosch, L., Billiau, A.D., Robberecht, W., and Julien, J.P. (2008). Ablation of proliferating microglia does not affect motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *28*, 10234-10244.

Graser, S., Stierhof, Y.D., and Nigg, E.A. (2007). Cep68 and Cep215 (Cdk5rap2) are required for centrosome cohesion. Journal of cell science *120*, 4321-4331.

Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., *et al.* (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. Science *264*, 1772-1775.

Haidet-Phillips, A.M., Hester, M.E., Miranda, C.J., Meyer, K., Braun, L., Frakes, A., Song, S., Likhite, S., Murtha, M.J., Foust, K.D., *et al.* (2011). Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. Nature biotechnology *29*, 824-828.

Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chio, A., Corr, E.M., Logroscino, G., Robberecht, W., Shaw, P.J., Simmons, Z., and van den Berg, L.H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. Nature reviews Disease primers *3*, 17071.

Heath, P.R., and Shaw, P.J. (2002). Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. Muscle & nerve *26*, 438-458. Henkel, J.S., Engelhardt, J.I., Siklos, L., Simpson, E.P., Kim, S.H., Pan, T., Goodman, J.C., Siddique, T., Beers, D.R., and Appel, S.H. (2004). Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. Annals of neurology *55*, 221-235.

Hensley, K., Mhatre, M., Mou, S., Pye, Q.N., Stewart, C., West, M., and Williamson, K.S. (2006). On the relation of oxidative stress to neuroinflammation: lessons learned from the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Antioxidants & redox signaling *8*, 2075-2087. Herman, M.L., Farasat, S., Steinbach, P.J., Wei, M.H., Toure, O., Fleckman, P., Blake, P., Bale, S.J., and Toro, J.R. (2009). Transglutaminase-1 gene mutations in autosomal recessive congenital ichthyosis: summary of mutations (including 23 novel) and modeling of TGase-1. Human mutation *30*, 537-547.

Ilieva, H., Polymenidou, M., and Cleveland, D.W. (2009). Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. The Journal of cell biology *187*, 761-772. Jaarsma, D., Teuling, E., Haasdijk, E.D., De Zeeuw, C.I., and Hoogenraad, C.C. (2008). Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase is sufficient to induce amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *28*, 2075-2088.

Joffre, C., Codogno, P., Fanto, M., Hergovich, A., and Camonis, J. (2016). STK38 at the crossroad between autophagy and apoptosis. Autophagy *12*, 594-595.

Joffre, C., Dupont, N., Hoa, L., Gomez, V., Pardo, R., Goncalves-Pimentel, C., Achard, P., Bettoun, A., Meunier, B., Bauvy, C., *et al.* (2015). The Pro-apoptotic STK38 Kinase Is a New Beclin1 Partner Positively Regulating Autophagy. Current biology : CB *25*, 2479-2492. Julien, J.P. (2001). Amyotrophic lateral sclerosis. unfolding the toxicity of the misfolded. Cell *104*, 581-591.

Jurikova, M., Danihel, L., Polak, S., and Varga, I. (2016). Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. Acta histochemica *118*, 544-552. Keller, A.F., Gravel, M., and Kriz, J. (2009). Live imaging of amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: disease onset is characterized by marked induction of GFAP in Schwann cells. Glia *57*, 1130-1142.

Kushner, P.D., Stephenson, D.T., and Wright, S. (1991). Reactive astrogliosis is widespread in the subcortical white matter of amyotrophic lateral sclerosis brain. Journal of neuropathology and experimental neurology *50*, 263-277.

Kwiatkowski, T.J., Jr., Bosco, D.A., Leclerc, A.L., Tamrazian, E., Vanderburg, C.R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E.J., Munsat, T., *et al.* (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. Science *323*, 1205-1208. Lacomblez, L., Bensimon, G., Leigh, P.N., Guillet, P., and Meininger, V. (1996). Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. Lancet *347*, 1425-1431.

Lalancette-Hebert, M., Phaneuf, D., Soucy, G., Weng, Y.C., and Kriz, J. (2009). Live imaging of Toll-like receptor 2 response in cerebral ischaemia reveals a role of olfactory bulb microglia as modulators of inflammation. Brain : a journal of neurology *132*, 940-954.

Lalancette-Hebert, M., Swarup, V., Beaulieu, J.M., Bohacek, I., Abdelhamid, E., Weng, Y.C., Sato, S., and Kriz, J. (2012). Galectin-3 is required for resident microglia activation and proliferation in response to ischemic injury. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *32*, 10383-10395.

Levine, J.B., Kong, J., Nadler, M., and Xu, Z. (1999). Astrocytes interact intimately with degenerating motor neurons in mouse amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Glia *28*, 215-224. Liu, J., Lillo, C.n., Jonsson, P., Vande Velde, C., Ward, C., Miller, T., Subramaniam, J., Rothstein, J., Marklund, S., Andersen, P., *et al.* (2004). Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. Neuron *43*, 5-22.

Logroscino, G., Traynor, B.J., Hardiman, O., Chio, A., Couratier, P., Mitchell, J.D., Swingler, R.J., Beghi, E., and Eurals (2008). Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry *79*, 6-11. Logroscino, G., Traynor, B.J., Hardiman, O., Chio, A., Mitchell, D., Swingler, R.J., Millul, A., Benn, E., Beghi, E., and Eurals (2010). Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry *81*, 385-390.

Ludwig, J.A., and Weinstein, J.N. (2005). Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. Nature reviews Cancer *5*, 845-856.

Luo, X.G., and Chen, S.D. (2012). The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease. Translational neurodegeneration 1, 9.

Maas, M.B., and Furie, K.L. (2009). Molecular biomarkers in stroke diagnosis and prognosis. Biomarkers in medicine *3*, 363-383.

Machts, J., Loewe, K., Kaufmann, J., Jakubiczka, S., Abdulla, S., Petri, S., Dengler, R., Heinze, H.J., Vielhaber, S., Schoenfeld, M.A., *et al.* (2015). Basal ganglia pathology in ALS is associated with neuropsychological deficits. Neurology *85*, 1301-1309.

Magrane, J., Cortez, C., Gan, W.B., and Manfredi, G. (2014). Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models. Human molecular genetics *23*, 1413-1424.

Maher, P., and Davis, J.B. (1996). The role of monoamine metabolism in oxidative glutamate toxicity. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *16*, 6394-6401.

Marchetto, M.C., Muotri, A.R., Mu, Y., Smith, A.M., Cezar, G.G., and Gage, F.H. (2008). Noncell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. Cell stem cell *3*, 649-657.

Maruyama, H., Morino, H., Ito, H., Izumi, Y., Kato, H., Watanabe, Y., Kinoshita, Y., Kamada, M., Nodera, H., Suzuki, H., *et al.* (2010). Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. Nature *465*, 223-226.

Mathis, S., Couratier, P., Julian, A., Corcia, P., and Le Masson, G. (2017). Current view and perspectives in amyotrophic lateral sclerosis. Neural regeneration research *12*, 181-184. Meldrum, B., and Garthwaite, J. (1990). Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. Trends in pharmacological sciences *11*, 379-387.

Nagai, M., Aoki, M., Miyoshi, I., Kato, M., Pasinelli, P., Kasai, N., Brown, R.H., Jr., and Itoyama, Y. (2001). Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with

amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *21*, 9246-9254.

Nagai, M., Re, D.B., Nagata, T., Chalazonitis, A., Jessell, T.M., Wichterle, H., and Przedborski, S. (2007). Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. Nature neuroscience *10*, 615-622.

Nagy, D., Kato, T., and Kushner, P.D. (1994). Reactive astrocytes are widespread in the cortical gray matter of amyotrophic lateral sclerosis. Journal of neuroscience research *38*, 336-347. Nardo, G., Trolese, M.C., Tortarolo, M., Vallarola, A., Freschi, M., Pasetto, L., Bonetto, V., and Bendotti, C. (2016). New Insights on the Mechanisms of Disease Course Variability in ALS from Mutant SOD1 Mouse Models. Brain pathology *26*, 237-247.

Orfao, A., and Ruiz-Arguelles, A. (1996). General concepts about cell sorting techniques. Clinical biochemistry *29*, 5-9.

Park, K. (2012). The role of major vault protein (MVP) in drug resistance. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society *163*, 266.

Parone, P.A., Da Cruz, S., Han, J.S., McAlonis-Downes, M., Vetto, A.P., Lee, S.K., Tseng, E., and Cleveland, D.W. (2013). Enhancing mitochondrial calcium buffering capacity reduces aggregation of misfolded SOD1 and motor neuron cell death without extending survival in mouse models of inherited amyotrophic lateral sclerosis. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *33*, 4657-4671.

Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M.R., Castellanos, R., Viera, L., Beckman, J.S., Estevez, A.G., and Barbeito, L. (2004). Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. Journal of neurochemistry *89*, 464-473.

Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M.R., Xie, Y., Beckman, J.S., Massa, S.M., Longo, F.M., and Barbeito, L. (2006). Modulation of p75-dependent motor neuron death by a small non-peptidyl mimetic of the neurotrophin loop 1 domain. The European journal of neuroscience *24*, 1575-1580.

Pehar, M., Vargas, M.R., Robinson, K.M., Cassina, P., Diaz-Amarilla, P.J., Hagen, T.M., Radi, R., Barbeito, L., and Beckman, J.S. (2007). Mitochondrial superoxide production and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 activation in p75 neurotrophin receptor-induced motor neuron apoptosis. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 27, 7777-7785.

Philips, T., and Robberecht, W. (2011). Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. The Lancet Neurology *10*, 253-263. Philips, T., and Rothstein, J.D. (2014). Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. Experimental neurology *262 Pt B*, 111-120.

Phukan, J., Elamin, M., Bede, P., Jordan, N., Gallagher, L., Byrne, S., Lynch, C., Pender, N., and Hardiman, O. (2012). The syndrome of cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry *83*, 102-108. Ramesh, G., MacLean, A.G., and Philipp, M.T. (2013). Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. Mediators of inflammation *2013*, 480739.

Ransohoff, R.M. (2016). How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. Science *353*, 777-783.

Ratti, A., and Buratti, E. (2016). Physiological functions and pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS proteins. Journal of neurochemistry *138 Suppl 1*, 95-111.

Regan, R.F., Panter, S.S., Witz, A., Tilly, J.L., and Giffard, R.G. (1995). Ultrastructure of excitotoxic neuronal death in murine cortical culture. Brain research *705*, 188-198.

Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X., *et al.* (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature *362*, 59-62.
Sreedharan, J., Blair, I.P., Tripathi, V.B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J.C., Williams, K.L., Buratti, E., *et al.* (2008). TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Science *319*, 1668-1672.

Taylor, P.R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H.H., Brown, G.D., and Gordon, S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. Annual review of immunology *23*, 901-944. Trias, E., Diaz-Amarilla, P., Olivera-Bravo, S., Isasi, E., Drechsel, D.A., Lopez, N., Bradford, C.S., Ireton, K.E., Beckman, J.S., and Barbeito, L. (2013). Phenotypic transition of microglia into astrocyte-like cells associated with disease onset in a model of inherited ALS. Frontiers in cellular neuroscience *7*, 274.

Trias, E., Ibarburu, S., Barreto-Nunez, R., Babdor, J., Maciel, T.T., Guillo, M., Gros, L., Dubreuil, P., Diaz-Amarilla, P., Cassina, P., *et al.* (2016). Post-paralysis tyrosine kinase inhibition with masitinib abrogates neuroinflammation and slows disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. Journal of neuroinflammation *13*, 177.

Trias, E., Ibarburu, S., Barreto-Nunez, R., and Barbeito, L. (2017). Significance of aberrant glial cell phenotypes in pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis. Neuroscience letters *636*, 27-31.

Turner, M.R., Bowser, R., Bruijn, L., Dupuis, L., Ludolph, A., McGrath, M., Manfredi, G., Maragakis, N., Miller, R.G., Pullman, S.L., *et al.* (2013). Mechanisms, models and biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration *14 Suppl 1*, 19-32.

Turner, M.R., Cagnin, A., Turkheimer, F.E., Miller, C.C., Shaw, C.E., Brooks, D.J., Leigh, P.N., and Banati, R.B. (2004). Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. Neurobiology of disease *15*, 601-609.

Turner, M.R., Kiernan, M.C., Leigh, P.N., and Talbot, K. (2009). Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. The Lancet Neurology *8*, 94-109.

Vance, C., Rogelj, B., Hortobagyi, T., De Vos, K.J., Nishimura, A.L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., *et al.* (2009). Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. Science *323*, 1208-1211.

Vande Velde, C., McDonald, K.K., Boukhedimi, Y., McAlonis-Downes, M., Lobsiger, C.S., Bel Hadj, S., Zandona, A., Julien, J.P., Shah, S.B., and Cleveland, D.W. (2011). Misfolded SOD1 associated with motor neuron mitochondria alters mitochondrial shape and distribution prior to clinical onset. PloS one *6*, e22031.

Vargas, M.R., Pehar, M., Cassina, P., Beckman, J.S., and Barbeito, L. (2006). Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR-dependent motor neuron apoptosis. Journal of neurochemistry *97*, 687-696.

Vazquez, M.C., Ketzoian, C., Legnani, C., Rega, I., Sanchez, N., Perna, A., Penela, M., Aguirrezabal, X., Druet-Cabanac, M., and Medici, M. (2008). Incidence and prevalence of amyotrophic lateral sclerosis in Uruguay: a population-based study. Neuroepidemiology *30*, 105-111.

Volterra, A., and Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. Nature reviews Neuroscience *6*, 626-640.

Walsh, M.J., Cooper-Knock, J., Dodd, J.E., Stopford, M.J., Mihaylov, S.R., Kirby, J., Shaw, P.J., and Hautbergue, G.M. (2015). Invited review: decoding the pathophysiological mechanisms that underlie RNA dysregulation in neurodegenerative disorders: a review of the current state of the art. Neuropathology and applied neurobiology *41*, 109-134.

Watkins, J.C., and Evans, R.H. (1981). Excitatory amino acid transmitters. Annual review of pharmacology and toxicology 21, 165-204.

Wen, M., Ma, X., Cheng, H., Jiang, W., Xu, X., Zhang, Y., Zhang, Y., Guo, Z., Yu, Y., Xu, H., *et al.* (2015). Stk38 protein kinase preferentially inhibits TLR9-activated inflammatory responses by promoting MEKK2 ubiquitination in macrophages. Nature communications *6*, 7167.

Weydt, P., Yuen, E.C., Ransom, B.R., and Moller, T. (2004). Increased cytotoxic potential of microglia from ALS-transgenic mice. Glia *48*, 179-182.

Wilson, T. (2011). Resolution and optical sectioning in the confocal microscope. Journal of microscopy 244, 113-121.

Williams, S.M., Sullivan, R.K., Scott, H.L., Finkelstein, D.I., Colditz, P.B., Lingwood, B.E., Dodd, P.R., and Pow, D.V. (2005). Glial glutamate transporter expression patterns in brains from multiple mammalian species. Glia *49*, 520-541.

Yang, J., Liu, X., Yue, G., Adamian, M., Bulgakov, O., and Li, T. (2002). Rootletin, a novel coiledcoil protein, is a structural component of the ciliary rootlet. The Journal of cell biology *159*, 431-440.

Zhou, Y., Liu, S., Ozturk, A., and Hicks, G.G. (2014). FUS-regulated RNA metabolism and DNA damage repair: Implications for amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia pathogenesis. Rare diseases *2*, e29515.