



PEDECIBA BIOLOGÍA
Sub-área Biología Celular y Molecular
TESIS DE MAESTRÍA



“MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE ASTROCITOS CON FENOTIPO ABERRANTE”

LIC. NICOLÁS GABRIEL OTERO DAMIANOVICH

Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular
Instituto de investigaciones Biológicas Clemente Estable

Orientador: Dra. Silvia Olivera Bravo

Co-orientador: Dr. Mauricio Cabrera

TRIBUNAL

Dra. Alejandra Kun

Dra. Giselle Prunell

Dra. Carolina Echeverry

Abril 2019

AGRADECIMIENTOS

Al tribunal por aceptar corregir esta tesis.

A mis tutores por haber orientado este trabajo.

A los compañeros del laboratorio y del Instituto.

A mis padres y amigos, por el apoyo constante e incondicional.

RESUMEN

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por el desarrollo de parálisis muscular progresiva resultante de la muerte selectiva de motoneuronas corticales y espinales. Aunque la etiología es desconocida, desde hace un tiempo se conoce que la ELA es una enfermedad “no autónoma – celular” donde la muerte de las motoneuronas ocurre cuando más de un tipo celular ha sido dañado. Por otra parte, las investigaciones recientes muestran que algunos fenotipos astrocitarios parecen estar implicados en la muerte neuronal que se observa durante la fase sintomática de las enfermedades neurodegenerativas, ya sea por la pérdida de las funciones homeostáticas o por la ganancia de funciones neurotóxicas. Nuestro grupo trabaja con astrocitos altamente neurotóxicos aislados de la médula espinal de ratas sintomáticas del modelo experimental de ELA SOD1G93A. Estas células, denominadas AbAs desde su obtención, presentan rasgos de células inmaduras, baja expresión de marcadores de astrocitos maduros, alta proliferación y el mayor potencial citotóxico para motoneuronas descrito hasta el momento. Como además, las AbAs han sido obtenidas durante la etapa de mayor muerte neuronal y su número crece exponencialmente con el transcurso de la enfermedad, hemos planteado que la modulación del fenotipo AbA, ya sea disminuyendo su número o induciendo un fenotipo de astrocito maduro, podría ser neuroprotector. Para validar esta hipótesis, expusimos cultivos de astrocitos obtenidos de animales salvajes y de AbAs a distintos fármacos que modulan vías de señalización implicadas en: i- la diferenciación de astrocitos para inducir un fenotipo astrocitario más diferenciado que potencialmente resulte en efectos neuroprotectores, ii- la modulación de la vía de las pentosas fosfato para intentar controlar la sobrevivencia o restaurar la funcionalidad mitocondrial de las AbAs; iii- el aumento del estrés de retículo endoplasmático para producir la muerte de las AbAs; iv- la detención de las células en fase G1/S para modular su proliferación y v- la inducción de la vía apoptótica en forma selectiva respecto de astrocitos normales. Nuestros resultados indican que las células AbAs presentan un fenotipo escasamente modulable hacia una mayor diferenciación y que en las condiciones experimentales empleadas, las AbAs fueron resistentes al aumento del estrés de retículo endoplasmático, a la detención del ciclo celular y a restaurar la función mitocondrial al intentar bloquear la vía de las pentosas fosfato. Sin embargo, las AbA fueron vulnerables a un inductor de apoptosis (violaceína) a dosis menores que las que afectaron la funcionalidad y sobrevivencia de astrocitos normales y de células de glioma de rata, lo que permitiría un abordaje selectivo dirigido hacia las AbAs. En resumen, nuestros estudios indican que la modulación selectiva del número de células AbAs empleando Violaceína es una herramienta que de operar in vivo podría colaborar con el retardo de la muerte de motoneuronas observada en el modelo experimental de ELA SOD1G93A.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Resumen..... | 2 |
| Abreviaturas | 5 |
| Introducción | 7 |
| Astrocitos | 7 |
| Biología | 7 |
| Papel de los astrocitos en la fisiología del SNC | 8 |
| Papel de los astrocitos en la patología del SNC: reactividad astrocitaria-astroglisis | 12 |
| Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) | 14 |
| Modelos animales y mecanismos autónomos no celulares en la ELA..... | 16 |
| Contribución de los fenotipos gliales aberrantes a la patogénesis de la ELA | 17 |
| Principales características de las AbAs | 18 |
| Mecanismos que podrían vincular a las AbAs con la patogénesis de la ELA | 20 |
| Hipótesis..... | 23 |
| Objetivos | 23 |
| Objetivo general | 23 |
| Objetivos específicos | 23 |
| Abordaje metodológico..... | 23 |
| Selección de compuestos | 24 |
| Materiales y métodos | 25 |
| Materiales | 25 |
| Animales..... | 26 |
| Genotipado de ratas neonatas mediante PCR..... | 26 |
| Cultivos celulares..... | 29 |
| Cultivo primario de astrocitos..... | 29 |
| Cultivo de AbAs o de animales adultos..... | 29 |
| Criopreservación y revitalización de la línea celular de glioma de rata C6..... | 30 |
| Mantenimiento de los cultivos celulares | 30 |
| Recuento y evaluación de viabilidad celular | 30 |
| Tratamiento farmacológico de los distintos cultivos celulares | 31 |
| Análisis de Citotoxicidad mediante Sulforodamina B..... | 31 |
| Funcionalidad mitocondrial..... | 32 |
| Análisis estadístico de las lecturas en placas | 33 |
| Inmunocitoquímica..... | 33 |

| | |
|---|----|
| Análisis de imágenes..... | 34 |
| Análisis semicuantitativo de los niveles de ARN mensajero por PCR en tiempo real (qPCR) . | 34 |
| Determinación de la concentración y pureza del ARN | 34 |
| Síntesis del ADN copia (ADNc) | 35 |
| Cuantificación relativa por PCR en tiempo real | 35 |
| Elección y diseño de los cebadores | 35 |
| Amplificación por PCR en tiempo real | 36 |
| Especificidad del producto de PCR | 36 |
| Método de cuantificación | 36 |
| Resultados | 37 |
| Efectos de distintos compuestos sobre cultivos de astrocitos de animales No Tg | 37 |
| Efectos en la sobrevivencia y funcionalidad mitocondrial..... | 37 |
| Efectos en la expresión de marcadores de estirpe, estrés de RE y fosfoCREB | 37 |
| Efectos sobre el citoesqueleto de actina | 38 |
| Comparación inicial de las AbAs de bajo y alto pasaje | 40 |
| Estudio de los efectos de diversos compuestos sobre AbAs y células C6..... | 42 |
| Efectos en la sobrevivencia | 42 |
| Efectos en la funcionalidad mitocondrial | 44 |
| Efectos en la expresión de marcadores de estirpe, ER estrés y fosfoCREB | 45 |
| Efectos de la Violaceína en función del tipo de cultivo | 47 |
| Efectos sobre el citoesqueleto de actina y de marcadores de estrés de ER..... | 50 |
| Discusión | 52 |
| Conclusiones..... | 54 |
| Perspectivas..... | 55 |
| Referencias bibliográficas | 55 |

ABREVIATURAS

6AN - 6-Aminonicotinamida

AbA- Astrocito Aberrante

AgNO₃ – Nitrato de Plata

AMPc/cAMP - Adenosín Trifosfato cíclico

ANOVA – Análisis de la varianza

AQP4 – Acuaporina 4

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATF4 – Factor activador de transcripción 4

ATF6 α – Factor activador de transcripción 6 α

ATP – Adenosín trifosfato

β Act- Beta Actina

BDNF - Factor neurotrófico derivado del cerebro

BHE – Barrera hemato encefálica

BiP – Proteína inmunoglobulina de unión

BSA - Seroalbumina bovina

Bv – Vaso sanguíneo

C9ORF72 –marco abierto de lectura 72 del cromosoma 9

CDC7 – Ciclina 7 del ciclo celular

CNTF - Factor Neurotrófico Ciliar

CREB – Elemento de unión en respuesta al AMPc

CT-1 - Cardiotrofina 1

Cx43 – Conexina 43

DMEM - Medio Dulbecco's Modificado por Eagle

DMSO – Dimetilsulfóxido

dNTPs – Doinucleósido trifosfato

EDTA - Ácido etilendiaminetetracético

ELA – Esclerosis Lateral Amiotrófica

Fase G1 – Fase Gap 1 del ciclo celular

Fase S – Fase de síntesis del ciclo celular

FBS – Suero Fetal Bovino

Fsk – Forskolina

FUS/TLS – Proteína fusionada en sarcoma/Translocada en Sarcoma

G4C2 – Repetidos de 4 Guaninas y 2 Citosinas

GABA - Ácido γ -aminobutírico

GFAP – Proteína ácida fibrilar glial

GFP – Proteína verde fluorescente

GLT-1 – Transportador de Glutamato 1

GLUT4 – Transportador de Glucosa 4

GNTK – Buffer de genotipado + proteinasa K

GRP78/BiP – Proteína regulada por glucosa de 78 kDa/Proteína de unión a inmunoglobulina

GS – Glutamina Sintetasa

HA – Ácido acético

HEPES – Ácido 4- (2-hidroxietil) -1 piperazineetanosulfónico

hSOD1 – Superóxido dismutasa 1 humana
iCDC7 – inhibidor de la ciclina del ciclo celular 7
IL-6 – Interleuquina 6
IP₃ - Inositol trifosfato
iPDE7 – Inhibidor de la fosfodiesterasa 7
JAK-STAT – Quinasa Janus- Transductor de señal y activador de la transcripción de proteínas
LC3B – Proteína 1A/1B de cadena liviana 3B asociada a microtúbulos
LIF – Factor inhibidor de leucocitos
LPS - Lipopolisacárido
MET – Microscopía electrónica de transmisión
MGV – *Mean Gray Value*
MTT - Bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio
NAD(P)H - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PBS - Buffer Fosfato salino
PDE7 – Fosfodiesterasa 7
PFA - Paraformaldehído
RAN (Péptidos) – Secuencias repetidas capaces de moverse
RE – Retículo Endoplásmico
S100 β - Proteína de unión al calcio β
SD – Desviación estándar
SDS - Dodecilsulfato sódico
SNC – Sistema Nervioso Central
SNARE - Receptores de proteínas de fijación soluble de NSF
SOD1 – Superóxido Dismutasa 1
SOD1G37R – Superóxido Dismutasa 1 con mutación glicina por arginina en posición 37
SOD1G93A – Superóxido Dismutasa 1 con mutación glicina por alanina en posición 93
SRB – Sulforodamina B
STAT3 – Transductor de señal y activador de transcripción de proteínas 3
TBD – Buffer de digestión de colas
TBE – Buffer Tris Borato EDTA
TCA – Ácido Tricloroacético
TDP-43 – Proteína TAR de unión al ADN de 43KDa
TEMED - Tetrametiletilendiamina
Tg - Transgénico
TGF β - Factor de crecimiento transformante β
Tm – Temperatura de fusión
TNF- α – Factor de necrosis tumoral α
TRITC – Isotiocianato de tetrametilrodamina
Tun - Tunicamicina
UNV – Unidad Neurovascular
UPR - Respuesta a proteínas desplegadas

INTRODUCCIÓN

Astroцитos

Los astroцитos son las células gliales más abundantes en el cerebro de los mamíferos y las responsables del mantenimiento de la homeostasis del sistema nervioso central (SNC) (Liddelow y Barres 2017; Yamanaka y Komine 2018). Estas células toman su nombre de la apariencia estrellada que presentan al ser reconocidos por técnicas de impregnación o luego de la inmunotinción con su marcador prototípico, la proteína glial ácida fibrilar (GFAP). Sin embargo, la morfología de los astroцитos no es estrellada sino que son ovillos tridimensionales que en condiciones normales no solapan sus dominios territoriales aunque están en estrecho contacto a través de uniones gap, los que les permite formar un sincitio funcional donde numerosas células están acopladas entre sí (Maragakis y Rothstein 2006; Sofroniew y Vinters 2010; Verkhratsky y Nedergaard 2017).

Biología

Los astroцитos son células pertenecientes al sistema nervioso que se originan a partir de células madres pluripotentes, compartiendo el mismo origen embrionario (neuroectodermo) con neuronas y oligodendrocitos (Chandrasekaran y cols. 2016). Dado su tamaño respecto de la microglía, los astroцитos junto a los oligodendrocitos, forman la macroglía donde se distinguen de los oligodendrocitos porque no tienen capacidad mielinizante. Los astroцитos presentan un repertorio molecular muy extenso que les permite ser las células responsables del mantenimiento de la homeostasis de SNC a todos los niveles (Parpura y Verkhratsky 2010; Liddelow y Barres 2017; Yamanaka y Komine 2018). Esto es posible por el desarrollo de un gran número de funciones especializadas entre las que se incluyen la regulación del flujo sanguíneo y del pH, el control del pool de los principales neurotransmisores (glutamato y GABA), del equilibrio hídrico y el volumen celular (Sofroniew y Vinters 2010). Participan también en el desarrollo y organización del SNC, brindan soporte estructural a las neuronas, guían a los neuroblastos durante el desarrollo e integran y son responsables en gran parte del funcionamiento de la barrera hematoencefálica (Xie y Yang 2015; Lécuyer y cols. 2016). Además, los astroцитos proveen metabolitos e intermediarios energéticos a las células neuronales y participan activamente en la neurotransmisión lo que ha llevado al concepto de sinapsis tripartita donde están propuestos como el tercer gran integrante activo (Durkee y Araque 2018).

Dado el alto número de funciones que cumplen los astroцитos, no resulta sorprendente que constituyan una población celular heterogénea tanto morfológica como funcionalmente. Además, los astroцитos son capaces de responder a señales de daño con una diversidad de respuestas que pueden incluir cambios marcados en la morfología celular, en la expresión génica y en sus funciones y un aumento significativo de la proliferación (astrogliosis). La diversidad de respuestas depende a su vez del tipo, lugar e intensidad del daño al SN, y es la resultante de un cúmulo de cambios entre efectos positivos y negativos, que promueve en los astroцитos una contribución activa al daño o a la protección de las demás poblaciones celulares neurales. (Pekny y Pekna 2014; Sofroniew 2015; Pekny y cols. 2017).

Papel de los astrocitos en la fisiología del SNC

-Desarrollo del SNC

El neurodesarrollo está dado por un proceso inicial de neurogénesis que es seguido de un proceso de gliogénesis, el establecimiento de las primeras sinapsis y la supresión de las sinapsis no funcionales, lo que resulta en una gran reestructuración morfológica y funcional del SNC. En estos complejos procesos, los astrocitos cumplen roles claves entre los que se incluyen actuar como célula madre inicial, realizar la guía espacial de los neuroblastos hasta su destino final donde se produce la diferenciación a neuronas y participar en la arquitectura y remodelación de los contactos sinápticos (Clarke y Barres 2013; Sloan y Barres 2014; Chandrasekaran y cols. 2016). A modo de ejemplo, al inicio del neurodesarrollo en la neocorteza, los progenitores de las células gliales derivadas de las células madres neuroepiteliales, más conocidas como glía radial (denominadas así por su expresión de GFAP y su apariencia de prolongaciones a modo de rayos que sirven como andamios para la migración celular), extienden largos procesos, generando un marco físico por donde los neuroblastos migran lo que permite el desarrollo de las capas más profundas de la corteza. Una vez que los neuroblastos migran, empiezan a extender procesos que serán futuras dendritas y axones; y posteriormente establecerán interacciones con otras células neuronales cercanas formando los esbozos de las futuras sinapsis. Luego de la fase de neurogénesis, comienza el proceso de astrogénesis y de diferenciación glial (**Figura 1**) (Chandrasekaran y cols. 2016).

La transición de neurogénesis a gliogénesis está dada por la activación de Notch1, la producción de citoquinas de la familia de la interleuquina 6 (IL-6) como el factor ciliar neurotrófico (CNTF), el factor de inhibición de leucocitos (LIF) y la carditrofina 1 (CT-1) que inducen la activación de la vía canónica JAK/STAT que regula la expresión de STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) (Soan y Barres 2014). STAT3 es un gen crucial para que la astrogénesis ocurra ya que es un activador transcripcional de genes astrocitarios específicos, como GFAP y S100 β (Soan y Barres 2014). A diferencia de la neurogénesis, la gliogénesis es un proceso más prolongado en el tiempo, ya que las células gliales a diferencia de las neuronas, continúan multiplicándose a partir de progenitores gliales como si fueran clones generando nuevos astrocitos y dominios astrocitarios (Bushong y cols. 2004). Por último, aunque los contactos neuronales comienzan a establecerse antes de que se inicie la gliogénesis, las sinapsis no comienzan a ser funcionales hasta la aparición de los primeros astrocitos, y van madurando al mismo tiempo que los astrocitos se vuelven más maduros y diferenciados (Farthy-Tselnicker y Allen 2018), indicando que los astrocitos desempeñan un papel crucial durante el desarrollo al contribuir activamente en los pasos finamente coordinados necesarios para establecer las redes neuronales funcionales (Clarke y Barres 2013; Chung y cols. 2013; Sloan y Barres 2014). A su vez, la astrogénesis depende de la señalización de las neuronas recién formadas (Barnabé y cols. 2005). Por otra parte, el desarrollo y la poda sináptica normales requieren de un tiempo y comunicación estrechamente regulados entre los astrocitos y las neuronas (Helmuth 2001; Eroglu y cols. 2009; Dodla y cols. 2010).

En este contexto de influencia mutua que es crucial para la función normal del SNC, se ha propuesto que las alteraciones de la diferenciación o función de los astrocitos pueden desequilibrar irreversiblemente los eventos coordinados del desarrollo pudiendo participar en trastornos del desarrollo neurológico. Además, como la mayoría de las células gliales surgen de astrocitos diferenciados tempranamente (Ge y cols. 2012), si el daño tisular ocurre temprano, durante la astrogénesis o durante la generación de los primeros astrocitos, el daño podría ser mantenido y amplificado por los descendientes astrocitarios clonales, perpetuando la disfunción astrocitaria lo que puede explicar en parte las enfermedades del desarrollo del SN (Sloan y Barres 2014).

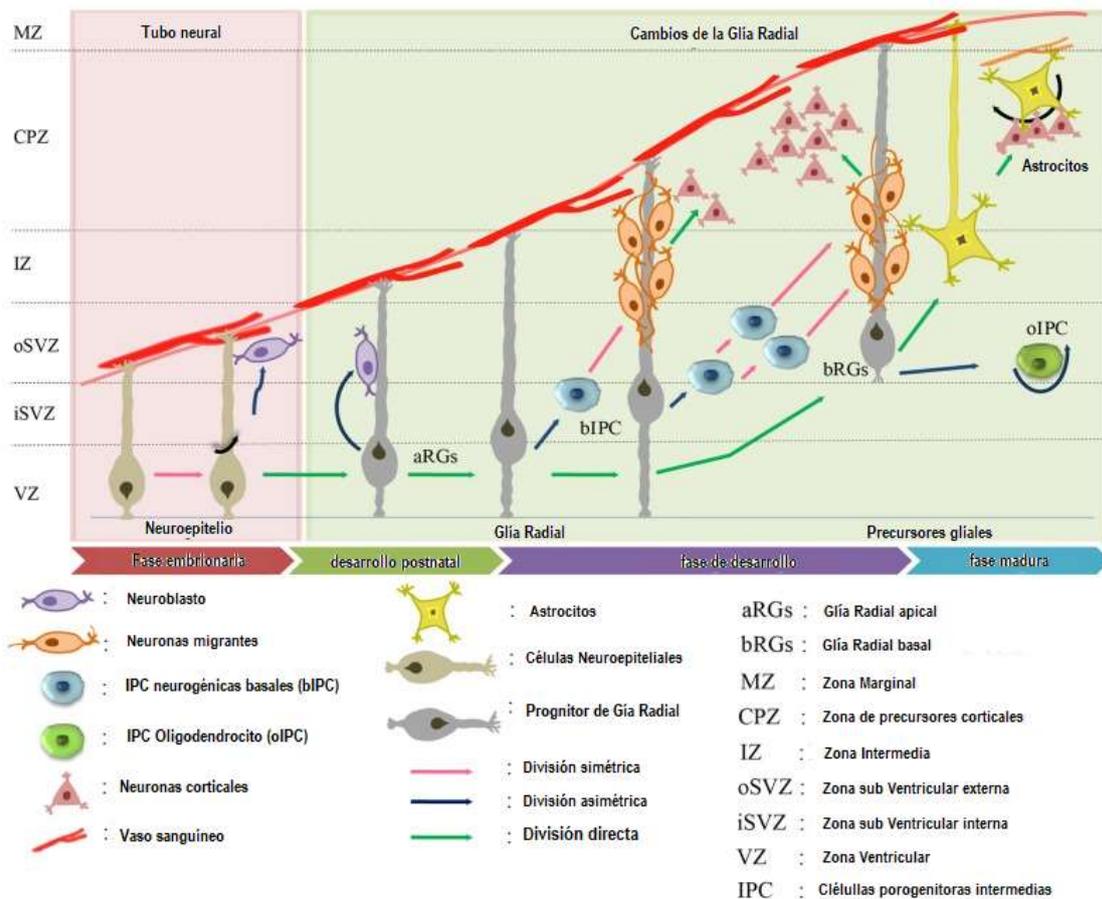


Figura 1: Neurogénesis y gliogénesis en el SNC de mamíferos. El esquema muestra el curso temporal y el surgimiento de los distintos tipos celulares neurales surgidos a partir de las células madre neuroepiteliales. (Tomado de Chandrasekaran y cols. 2016).

-Regulación del flujo sanguíneo

Los astrocitos presentan múltiples contactos con los vasos sanguíneos del SNC, recubriendo más del 95% de los capilares cerebrales. La interacción astrocito-vasculatura es bidireccional, lo que los hace partícipes en la regulación local del flujo sanguíneo en el SNC a través de una compleja señalización celular entre todos los componentes de la unidad neurovascular (astrocitos, microglía, neuronas, células endoteliales y pericitos). Los astrocitos pueden producir y liberar mediadores moleculares como prostaglandinas, óxido nítrico y ácido araquidónico; los que modulan el diámetro de los vasos y el flujo sanguíneo de manera coordinada (Gordon y cols. 2007; Iadecola y Nedergaard 2007).

Además debido a su disposición, los astrocitos serían el mediador primario de los cambios de flujo sanguíneo en respuesta a cambios de la actividad neuronal (la denominada hiperemia cerebral). Es decir, los procesos de los astrocitos que contactan con los vasos sanguíneos y con las neuronas pueden censar y regular el flujo sanguíneo y el aporte de nutrientes en función de la actividad neuronal. (Koehler y cols. 2009; Schummers y cols. 2008). La **figura 2** muestra la estrecha relación de los procesos astrocitarios con los vasos sanguíneos, en condiciones normales y en un modelo experimental de encefalitis autoinmune donde se observa una hiperreactividad de GFAP cercana a células inflamatorias que también se reporta en muestras autopsicas humanas.

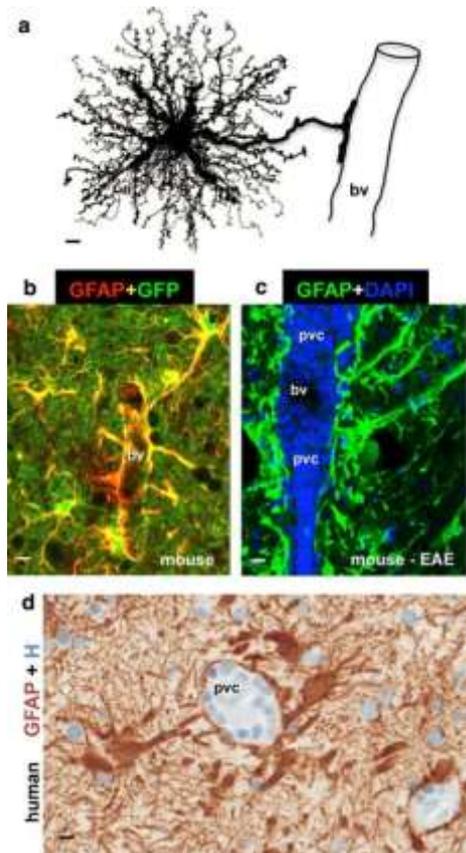


Figura 2: Morfología astrocitaria e interacciones con los vasos sanguíneos en tejido sano y enfermo. **a)** Esquema de un astrocito protoplasmático proyectando una densa red de procesos y un largo filopodio que extiende sus pies a lo largo de un vaso sanguíneo (bv). **b)** Inmunohistoquímica en sustancia gris de ratón sano mostrando GFP (verde) en los neuropilos de los astrocitos y GFAP (rojo) solo en los principales procesos y envolviendo los vasos sanguíneos. La colocalización de señales se ve en amarillo. **c)** Inmunohistoquímica de terminaciones de procesos astrocitarios perivasculares de un modelo experimental de encefalitis autoinmune mostrando los pies astrocitarios positivos a GFAP (verde) y la disrupción de la envoltura astrocitaria del vaso facilitando la trasvasación de las células inflamatorias al parénquima del SNC. **d)** Inmunohistoquímica de una autopsia humana donde se observan astrocitos reactivos perivasculares, formando una barrera tipo cicatriz en la zona periventricular muy similar a lo observado en modelos experimentales animales. (Tomado de Sofroniew y Vinters 2010).

-Homeostasis hídrica, iónica y regulación del pH

Entre las funciones de mantenimiento que realizan los astrocitos se encuentran la regulación iónica, del pH y la homeostasis hídrica que son críticas para preservar la función sináptica. La expresión de la proteína de membrana aquaporina 4 (AQP4), un canal de agua, y de transportadores de potasio (K⁺) en los procesos astrocitarios es esencial para mantener la homeostasis hídrica (Simard y Nedergaard 2004; Zador y cols. 2009).

Además las membranas astrocitarias expresan distintas bombas de iones como los intercambiadores de sodio y de protones; transportadores de bicarbonato y de ácidos monocarboxilados que permiten ajustar las condiciones para un correcto funcionamiento del sistema nervioso. Los canales de agua formados por AQP4 son altamente expresados en los procesos astrocitarios que contactan con los vasos sanguíneos lo que permite una respuesta rápida y directa para preservar el control homeostático así como para ser partícipes en los procesos de daño (Sofroniew y Vinters 2010).

Los astrocitos también son los encargados de mantener los niveles de neurotransmisores en la hendidura sináptica ya que son los principales efectores en la captación y reciclado de los neurotransmisores allí presentes. Para ello, los astrocitos expresan altos niveles de transportadores de los neurotransmisores glutamato, GABA y glicina lo que permite retirar el exceso de neurotransmisores presentes en la hendidura sináptica. Luego de recaptados, los neurotransmisores son reciclados a glutamina o a otros precursores que son transportados a las neuronas para su reconversión en neurotransmisores activos y posterior almacenamiento en vesículas (Sattler y Rothstein 2006; Seifert y cols. 2006)

Para agregarle complejidad al sistema, los astrocitos son capaces además de formar grandes redes de células interconectadas mediante uniones gap a través de las cuales son

capaces de pasar moléculas pequeñas como iones, glucosa y ATP evitando una acumulación potencial y la formación de gradientes en células individuales (Sofroniew y Vinters 2010).

En resumen, los astrocitos tienen una gran capacidad para regular la homeostasis hídrica e iónica, ya que pueden expresar un gran y variado número de transportadores moleculares que les permiten mantener un ambiente saludable que contribuye a la función sináptica normal. Además son capaces de comunicarse entre sí formando grandes redes, lo que contribuye a que tengan una mayor capacidad a la hora de disipar altas concentraciones de moléculas lo que podrían alterar la homeostasis general (Sofroniew y Vinters 2010; Verkhratsky y Nedergaard 2017).

-Función Sináptica

El papel de los astrocitos en la función sináptica ha sido uno de los aspectos descritos más tardíamente, ya que inicialmente se pensaba que los astrocitos solo poseían un papel pasivo consistente en proteger y brindar nutrientes a las neuronas. Aunque el concepto de sinapsis tripartita proponiendo a los astrocitos como el tercer componente activo en la sinapsis fue acuñado previamente, en la década de los '90 se obtuvieron datos relevantes que permitieron demostrar la participación activa de los astrocitos en la sinapsis dando así sustento experimental al concepto de sinapsis tripartita (Araque y cols. 1999; Perea y cols. 2009). Si bien los astrocitos no son células eléctricamente excitables, poseen receptores para neurotransmisores muy similares a los que se expresan en las neuronas, lo que sugiere que estas células son capaces de censar el contenido del espacio sináptico y pueden responder de diferente manera dependiendo del estímulo recibido. Los astrocitos poseen además la capacidad de liberar al medio extracelular y en el espacio sináptico, señales químicas denominadas gliotransmisores (glutamato, ATP, D-serina), que salen al medio extracelular a través de hemicanales o mediante sistemas de secreción que parecen presentar similitudes con los sistemas de exocitosis neuronales (Sofroniew y Vinters 2010).

El mecanismo más estudiado por el cual los astrocitos son capaces de responder a estímulos externos parece involucrar la liberación de inositoltrifosfato (IP_3) que es agonista de canales de calcio del retículo endoplasmático sensibles a IP_3 causando un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular que actuando como segundo mensajero permite la liberación al espacio sináptico de vesículas conteniendo neurotransmisores mediante un mecanismo de tipo SNARE. Para agregarle complejidad al sistema, hay que destacar que los astrocitos forman un sincitio celular acoplado, y por lo tanto, en el caso de un aumento en la señal de Ca^{2+} , ésta es capaz de propagarse hacia otros astrocitos circundantes (Perea y Araque 2002; Zorec y cols. 2016; Verkhratsky y cols. 2016; Durkee y Araque 2018). Uno de los ejemplos más simples del papel activo de los astrocitos en la sinapsis se ha descrito en las sinapsis glutamatérgicas donde los astrocitos pueden liberar glutamato para colaborar con el pool del neurotransmisor proveniente de la neurona pre-sináptica y al mismo tiempo son capaces de captarlo en el espacio sináptico para evitar la sobreexcitación de la neurona postsináptica (Sofroniew y Vinters 2010). Asimismo, cabe destacar que los astrocitos son capaces de responder prácticamente a todos los neurotransmisores conocidos, que pueden dar respuestas superpuestas dependiendo de las señales que reciban y que su respuesta varía dependiendo de la frecuencia e intensidad del estímulo (Parpura y Verkhratsky 2010). Por todo ello, el papel de los astrocitos en la sinapsis, es un área de estudio que continúa analizándose y cuyos resultados han permitido nuevos avances en el estudio de patologías que afectan al SNC (Perea y cols. 2009; Durkee y Araque 2018).

Finalmente, los astrocitos tienen un rol muy importante en la regulación, manutención

y plasticidad de los procesos sinápticos participando no solo en la promoción de los mismos sino también en su remodelación (Allen y Eroglu 2017), lo que conlleva un papel clave de éstas células en los distintos tipos de plasticidad sináptica.

-Metabolismo Energético y Soporte Trófico

Los astrocitos parecen ser los principales efectores en la síntesis, manejo, uso, almacenamiento y liberación de sustratos energéticos necesarios para satisfacer los altos requerimientos energéticos del cerebro, lo que requiere una intensa cooperatividad entre astrocitos y neuronas (Bélanger y cols. 2011). Los astrocitos almacenan y brindan nutrientes necesarios para las neuronas ya que forman un puente anatómico y funcional entre los vasos sanguíneos cerebrales y las neuronas y funcionan como intermediarios capaces de abastecer a éstas con glucosa u otros metabolitos necesarios. Además, los astrocitos son las únicas células del SNC capaces de acumular glucógeno, lo que ocurre especialmente en zonas con alta actividad sináptica en donde los requisitos energéticos son mayores (Phelps 1972; Falkowska y cols. 2015; Alberini y cols. 2018). Se ha observado además que las reservas de glucógeno pueden ser moduladas frente a neurotransmisores como el glutamato y que pueden degradarse hasta lactato, el cual es suministrado a las neuronas durante períodos de alta actividad neuronal o en condiciones de hipoglucemia (Brown y Ransom 2007; Rouach y cols. 2008; Occhipinti y cols. 2009). Los astrocitos proveen además sustancias tróficas que tienen efectos sobre las demás poblaciones neurales, principalmente neuronas y oligodendrocitos, entre las que se incluyen factores de crecimiento como BDNF, CNTF, LIF que favorecen la función de dichas células (Sofroniew y Vinters 2010).

-Barrera Hematoencefálica

La barrera hematoencefálica (BHE) es una compleja estructura física y bioquímica que brinda protección al SNC limitando la llegada de diversas moléculas potencialmente dañinas para las neuronas y permitiendo el pasaje de nutrientes para abastecer de energía al sistema, aunque también ha sido un impedimento para el desarrollo de nuevos fármacos a la hora de tratar patologías que afectan al SNC. La BHE está formada principalmente por células endoteliales que están rodeadas por una lámina basal entre las que se encuentran los pericitos y los “pies” de los astrocitos que cubren más del 95% de la superficie de los capilares cerebrales, constituyendo la unidad neurovascular (UNV). La selectividad de la BHE está dada por la presencia de uniones estrechas u oclusivas entre las células endoteliales que limita el pasaje inespecífico de moléculas y la presencia de diversos transportadores transmembrana que permiten el pasaje selectivo de algunos nutrientes como la glucosa o regulan el volumen celular a mediante la expresión de acuaporinas presentes en los pies astrocitarios como AQP4. La interacción entre los distintos componentes celulares de la UNV permite además el control local del flujo sanguíneo y su acoplamiento con las demandas del SNC (Beck y cols. 1984; Abbott y cols. 2006; Savidge y cols. 2007).

Papel de los astrocitos en la patología del SNC: reactividad astrocitaria-astrogliosis

Si bien los astrocitos se encargan del mantenimiento de la homeostasis del SNC, durante determinados estímulos, usualmente dañinos para el SNC, los astrocitos pueden perder sus capacidades homeostáticas y responder al daño de una forma deletérea que ha sido denominada reactividad glial o astrogliosis (Sofroniew 2015; Yamanaka y Komine 2017; Verkhratsky y Nedergaard 2017). La astrogliosis se caracteriza por ser un proceso continuo altamente dependiente del estímulo en el que se observa aumento de la proliferación,

cambios morfológicos y en la expresión génica y por consecuencia un cambio en sus funciones (Sofroniew 2015; Verkhratsky y Nedergaard 2017), que resulta en acciones tendientes a proteger el daño y otras que lo amplifican. Por ejemplo, luego de un traumatismo que afecta al SNC, las células gliales se vuelven reactivas tratando de reparar el daño, también impiden la regeneración axonal posterior al daño (Sofroniew 2015; Trías y cols. 2018). Es decir, dependiendo del tipo y contexto de la lesión, la respuesta de los astrocitos varía y puede volverse crónica e irreversible lo cual es caracterizado por la presencia de cicatriz glial, reordenación del tejido estructural, así como un desequilibrio permanente entre el apoyo homeostático y la ganancia de funciones neurotóxicas (Pekny y cols. 2014; Burda y Sofroniew 2014). A su vez, los astrocitos contribuyen a mantener la astrogliosis a través de la señalización autocrina y paracrina, que provoca una retroalimentación positiva que lleva a una respuesta que va siendo generalizada y las cascadas de lesiones perpetúan el daño al SNC (Zhang y cols. 2010; Hostenbach y cols. 2014; Burda y Sofroniew 2014).

-Cambios morfológicos y proliferación celular

Entre los cambios morfológicos mayormente observados durante la reactividad astrocitaria moderada se encuentran la hipertrofia del soma, la eminencia de procesos celulares, manteniéndose los límites de los dominios astrocitarios y la proliferación celular sin mayores cambios (Sofroniew y Vinters 2010; Sofroniew 2015). En la astrogliosis severa difusa se observa una hipertrofia similar pero también la pérdida de algunos dominios astrocitarios observándose la superposición con otros dominios astrocitarios cercanos y se da un aumento moderado de la proliferación celular. Estos cambios están asociados a enfermedades neurodegenerativas, traumas difusos, isquemias y/o algunos tipos de infección, lo que lleva a procesos de reorganización tisular que puede o no resolverse en un retorno hacia la normalidad tisular (Sofroniew y Vinters 2010, Sofroniew 2015). Los cambios morfológicos observados en una astrogliosis más severa, asociados a los casos de injurias focalizadas, se caracterizan por altas tasas proliferativas de las células gliales, formas elongadas y procesos que se solapan sobre el área dañada formando una cicatriz glial (Pekny y cols. 2014; Sofroniew 2015; Adams y Gallo 2018).

-Cambios en la expresión génica

Los cambios en la expresión génica durante la reactividad glial son muy variados y dependen fuertemente del estímulo que reciben los astrocitos, la región que recibe dicho estímulo y además la variación intrínseca entre cada célula. Por lo que muchas veces dependiendo el estímulo algunos marcadores tienden a aumentar y otras veces tienden a disminuir o mantenerse inalterados. Entre las moléculas que muestran mayores cambios son las citoquinas como el factor de crecimiento transformante beta (TGF β), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), interleuquina IL-6, el factor inhibitorio de leucemia (LIF) y diversos transportadores vinculados a funciones homeostáticas como los transportadores de sodio y potasio, neurotransmisores, acuaporinas, enzimas responsables de la catálisis de eventos asociados al estrés oxidativo, así como mediadores inflamatorios (Maragakis y Rothstein 2006; Sofroniew y Vinters 2010; Pekny y Pekna 2014). Los cambios observados en la reactividad glial se reflejan también en la expresión de marcadores prototípicos como GFAP, Vimentina y Nestina (**Figura 3**), cambios en proteínas de la matriz extracelular y en las interacciones célula-célula como colágenos, lamininas, integrinas, cadherinas, proteoglicanos y conexinas (Sofroniew 2009; Sofroniew y Vinters 2010).

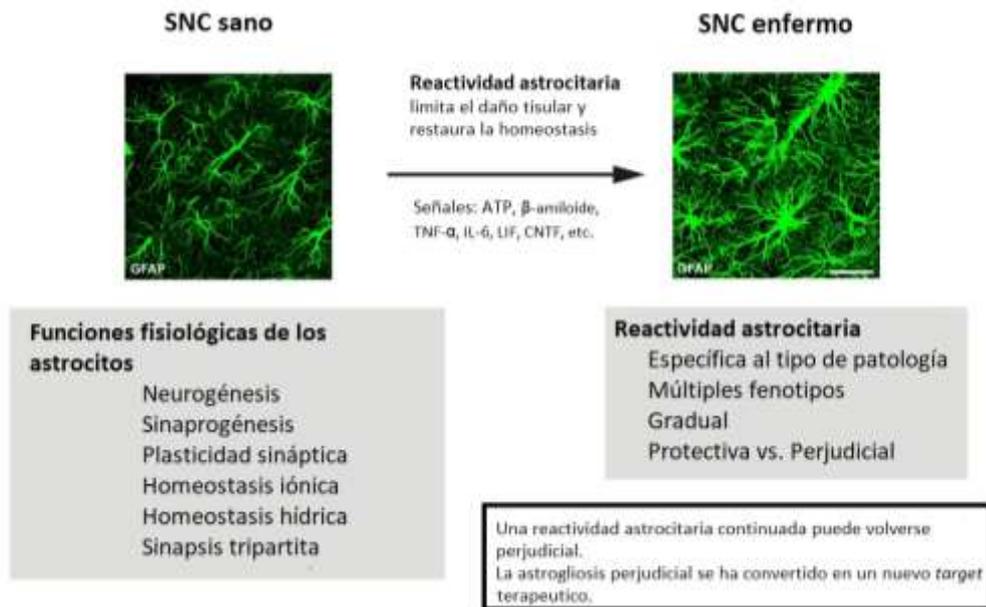


Figura 3: Cambios morfológicos y funcionales de los astrocitos en respuesta al daño del SNC. Las imágenes de inmunofluorescencia contra GFAP muestra el aumento de inmunoreactividad en presencia de daño al SNC constituyéndose en una de las formas de expresión de la astrogliosis, el término acuñado para describir la respuesta astrocitaria frente a diferentes condiciones de daño del SNC. Los recuadros debajo resumen las principales funciones de los astrocitos en condiciones normales y las características de la reactividad astrocitaria. (Tomado de Pekny y Pekna 2014).

Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa fatal cuya prevalencia es de 2-3 personas cada 100000 por año; tiene un riesgo de vida en torno a 1 persona cada 500 o 1000 y muestra un pequeño predominio de hombres sobre mujeres afectadas (Talbot y cols. 2016; Couratier y cols. 2016; Curtis y cols. 2017). La ELA se caracteriza por el desarrollo de debilidad progresiva y atrofia de los músculos esqueléticos; como resultado de la muerte selectiva de motoneuronas en la corteza cerebral, el tronco cerebral y la médula espinal, la que es acompañada por una fuerte reactividad glial. La muerte de las motoneuronas conduce a una parálisis progresiva e irreversible que generalmente resulta en la muerte del paciente por falla respiratoria en un plazo de 1 a 5 años desde el inicio de los síntomas (Yamanaka y Komine; 2018). En la mayoría de los casos, la aparición de la enfermedad es esporádica (90%) y multifactorial resultante de interacciones aún desconocidas entre el entorno, los genes y las modificaciones epigenéticas (Siddique 2015; Jimenez-Pacheco y cols. 2017). Entre el 5% y un 10% restante de los casos está ligado a factores genéticos hereditarios de los cuales se han identificado más de 20 genes causales (Yamanaka y Komine 2018).

Las mutaciones dominantes en la enzima mitocondrial superóxido dismutasa de Cu/Zn (SOD1) parecen ser responsables de hasta el 1% del total de casos de ELA y aproximadamente del 20% de los tipos familiares (Ling y cols. 2013). Las mutaciones sin sentido en la proteína TDP-43 (del inglés *43 kDa transactive response DNA/RNA-binding protein*) y en la proteína FUS/TLS (del inglés *fused in sarcoma/translocated in liposarcoma*) parecen ser responsables de hasta 5% de los casos de ELA familiares de herencia dominante (Da Cruz y Cleveland 2011; Sun y Chakrabartty 2017; Ederle y Dormann 2017). A su vez, las mutaciones en el marco de lectura abierto 72 en el cromosoma 9 (C9ORF72) que produce hasta miles de repeticiones de hexanucleótidos G4C2 en un alelo se han reportado en hasta el 40% y el 7% de los casos

familiares y esporádicos de ELA, respectivamente (Freibaum y Taylor 2017; Lall y Baloh 2017). Hay otros genes involucrados en los subtipos familiares de ELA, pero su contribución a la enfermedad es significativamente menor en términos de número de individuos afectados.

Respecto de las vías patológicas que vinculan las anomalías genéticas con la ELA, las mutaciones de SOD1 parecen estar relacionadas con el daño neuronal debido a que el plegamiento anormal de proteínas provoca conformaciones inestables, cuerpos de inclusión intracelulares u oligómeros tóxicos, así como interacciones patológicas con varias proteínas (Kaur y cols. 2015). Si bien se ha reconocido la asociación de la presencia de los repetidos de G4C2 o las mutaciones de TDP-43 y FUS con la aparición de la patología, no se ha identificado el rol que cumplen en la misma (Mackenzie y cols. 2010). Los mecanismos propuestos parecen vincular las mutaciones de TDP-43 y FUS/TLS al procesamiento alterado y al transporte y control de calidad defectuosos de ARN, mientras que las repeticiones de G4C2 pueden secuestrar proteínas de unión a ARN que afectan la regulación de las dianas de ARN (Ling y cols. 2013; Mackenzie y cols. 2010; Ratti y Buratti 2016) o causan cambios epigenéticos que disminuyen la expresión de C9ORF72 (Ling y cols. 2013). Se ha planteado además que la expansión de repetidos en la región del promotor provocaría una baja expresión del gen ocasionando una desregulación mayor del sistema, incrementando la vulnerabilidad hacia la degeneración neuronal y el envejecimiento (Lall y Baloh 2017; Moens y cols. 2017). Otras hipótesis proponen que se formen agregados peptídicos como resultados de traducciones sin codón de inicio (péptidos RAN) y que los péptidos RAN generados tengan propiedades neurotóxicas (Batra y Lee 2017).

Actualidad farmacológica

Sin embargo, hasta ahora, no se comprende completamente cómo mutaciones únicas en una proteína podrían provocar las cascadas patológicas de ELA y cómo estas cascadas pueden finalmente causar un evento neuropatológico común que se caracteriza por la agregación y acumulación de inclusiones proteicas neuronales que, además, son encontradas en otras condiciones neurodegenerativas incluyendo la enfermedad de Alzheimer (Blokhuis y cols. 2013; Corbier y Sellier 2017).

La ELA es una enfermedad descrita hace ya mucho tiempo para la cual se disponen de muy escasas aproximaciones farmacológicas para su tratamiento. El Riluzol, un compuesto antiglutamatérgico, fue el primer medicamento autorizado por la FDA y permite prolongar en 3 meses aproximadamente la supervivencia de los pacientes (Miller y cols. 2012). Recientemente la FDA aprobó Edaravona, un antioxidante secuestrante de radicales libres, convirtiéndose en el segundo medicamento para tratamiento de la ELA. Sin embargo, parece que solo tiene efectos en etapas tempranas de la enfermedad en un grupo selecto de pacientes, en los cuales mostró una leve mejora respecto al grupo placebo.

Actualmente, Masitinib, un inhibidor de tirosina quinasas, se encuentra en estudios de fase clínica III. Masitinib ha producido una mejora funcional en los pacientes tratados y que en combinación con el Riluzol retrasó la progresión de la enfermedad sin presentar efectos adversos significativos (Scott y cols 2017). Otros compuestos que están siendo evaluados en fases clínicas más tempranas son el Fingolimod, un modulador de la inmunidad que ha finalizado estudios de fase clínica IIa (Berry y cols. 2017), Ibudilast, un inhibidor de la fosfodiesterasa 4 que se encuentra en estudios clínicos de fase I-II y Mexiletine, un bloqueante de los canales de sodio que protege a las motoneuronas de la muerte por excitotoxicidad y está en estudios de fase I-II (Weiss y cols. 2016).

En todos los casos se ha observado una ajustada ventana temporal de efectos benéficos lo que obliga a continuar la búsqueda de alternativas para el tratamiento de dicha enfermedad y de nuevos estudios de fases clínicas más tempranas con potenciales nuevos fármacos. Por otra parte, es necesario el conocimiento de todos los tipos celulares participantes en la enfermedad ya que podrían ser blancos farmacológicos relevantes a los que se pudiera prestar atención junto con las neuronas.

Modelos animales y mecanismos autónomos no celulares en la ELA

Para comprender los diferentes mecanismos patológicos involucrados en la ELA, se han desarrollado numerosos modelos experimentales en organismos que incluyen desde levaduras hasta roedores. Mientras que los modelos en animales inferiores han sido herramientas genéticas poderosas que ofrecen ventajas relacionadas con su corta vida y fácil manejo, la distancia evolutiva con los sistemas nerviosos de otros mamíferos constituye una limitación importante cuando se estudia neurodegeneración humana (Arends y cols. 2016; Youssef y cols. 2016; Gitler y cols. 2017). Los sistemas nerviosos de ratones y ratas están más cercanos a la anatomía y la complejidad del cerebro humano, pero no son buenas herramientas genéticas y su ciclo vital hace necesaria la sobreexpresión de muchas copias de las proteínas humanas mutantes para imitar la enfermedad (Illieva y Maragakis 2017), aumentando el riesgo de que la cantidad de copias sobreexpresadas influyan por sí mismas en el modelo. A pesar de estas desventajas, los modelos animales aparecen como los mejores enfoques para estudiar los mecanismos patogénicos de ELA, al menos hasta que el empleo de las células pluripotentes inducibles obtenidas de pacientes humanos se convierta en una tecnología bien conocida y controlada (Robinton y Daley 2012; Yoshida y Yamanaka 2017).

Los primeros modelos exitosos de ELA que aún son extensamente empleados, se desarrollaron sobre-expresando diferentes mutaciones únicas de la SOD1 humana (SOD1G93A, SOD1G37R, SOD1G85R) en ratas y ratones (Pioro y Mitsumoto 1996; Joyce y cols. 2011; Philips y Rothstein 2015). La mayoría de estos modelos causaron un síndrome motor progresivo dependiente de la edad que imita algunas características patológicas de la enfermedad humana que no parecen derivarse de la pérdida de la actividad catalítica de SOD1 sino de una ganancia de función aún desconocida (Nardo y cols. 2016; Kaur y cols. 2016; Yamanaka y Komine 2017). Entre las mayores contribuciones de los modelos SOD1 murinos al conocimiento de la ELA se encuentra la introducción del concepto de mecanismo no-autónomo celular donde el daño en un solo tipo celular no produce ni es responsable de gran parte de la patología (Illieva y cols. 2009). En los modelos SOD1, la presencia exclusiva de la enzima humana mutada (hSOD1) en motoneuronas no causó la muerte de las motoneuronas que es típica de la enfermedad. Sin embargo, las motoneuronas murieron cuando la hSOD1 se expresó en al menos dos tipos celulares diferentes siendo las motoneuronas uno de ellos y los astrocitos o las células microgliales el otro (Illieva y cols. 2009). Por lo tanto, una comunicación célula-célula defectuosa entre las neuronas motoras y las células gliales circundantes parece participar activamente en la muerte de las motoneuronas a través de mecanismos que no se entienden completamente.

Los trabajos pioneros realizados en ratones LoxSOD1G37R/GFAP-Cre+ (Yamanaka y cols. 2009) o específicamente silenciando el transgén SOD1 mutante en diferentes tipos de células gliales en ratones (Boilleé y cols. 2008; Illieva y cols. 2009) mostraron que los astrocitos (Yamanaka y cols. 2009) y las células microgliales (Boilleé y cols. 2008) desempeñan un papel activo en la progresión del ELA. En apoyo a estos resultados que sustentan la hipótesis de los mecanismos autónomos no celulares en los modelos de ELA dependientes de SOD1, los

astrocitos reactivos obtenidos de ratas o ratones transgénicos (Nagai y cols. 2007; Cassina y cols. 2008; Di Giorgi y cols. 2008) y de pacientes de casos esporádicos y familiares (Haidet-Phillips y cols. 2011; Re y cols. 2014) causaron neurotoxicidad a las neuronas motoras incluso en los casos donde SOD1 no está involucrada (Re y cols. 2014).

Otros modelos de ELA en roedores no fueron tan claros como los que sobreexpresan la hSOD1 mutada. Los animales transgénicos que expresan mutaciones de TDP-43, FUS/TLS o ELA ligada a C9ORF72 produjeron resultados contradictorios y no mostraron una asociación clara entre cada mutación y la muerte de las motoneuronas, a pesar de dañar a las motoneuronas e incluir presencia de inclusiones proteináceas y astrogliosis (Wegorzewska y cols. 2009; Swarup y cols. 2011).

Contribución de los fenotipos gliales aberrantes a la patogénesis de la ELA

En la ELA se produce una fuerte reacción glial alrededor de las motoneuronas superiores e inferiores con astrocitos reactivos que presentan un aumento en la inmunoreactividad para GFAP y S100 β (Migheli y cols. 1999), expresión de marcadores inflamatorios (Maihöfner y cols. 2003) e inducción de enzimas vinculadas al estrés oxidativo (Sasaki y cols. 2000; Anneser y cols. 2001); Estos cambios podrían llevar a la inhibición de la función mitocondrial lo que contribuye por un lado a las alteraciones al soporte trófico y energético que realizan los astrocitos a las neuronas (Finsterwald y cols. 2015) y por otro podría potenciar la neurotoxicidad de los astrocitos (Hewett y cols. 1994). Sin embargo, los mecanismos subyacentes al papel de las células gliales en la muerte de las motoneuronas en ELA se desconocen en profundidad. Los modelos hSOD1 apoyan el concepto de que la ELA es una enfermedad no-autónoma celular en la que los fenotipos de astrocitos reactivos que se producen en el entorno lesivo contribuyen en gran medida a la muerte de las neuronas motoras (Ilieva y cols. 2009; Blackburn y cols. 2009; Díaz-Amarilla y cols. 2011; Yamanaka y Komine 2018).

Entre las preguntas que permanecían sin respuesta hasta hace poco refería a conocer si todos los astrocitos que comparten el mismo ambiente lesivo responden de la misma manera o si algunos adoptan fenotipos aberrantes que podrían explicar la mayoría de los efectos neurotóxicos que presentan. Mientras se estudiaban los fenotipos de los astrocitos presentes en la médula espinal a lo largo de la fase sintomática del modelo experimental de ELA hSOD1^{G93A} de rata, se aisló un nuevo tipo de células de linaje astrocitario de la médula espinal de animales paráliticos. Estas células, denominadas AbAs por su alta neurotoxicidad y propiedades distintas a los astrocitos típicos, aumentaron exponencialmente en número hacia las etapas terminales de la enfermedad. Las AbAs fueron obtenidas de cultivos gliales de la médula lumbar de animales hSOD1^{G93A} luego de varios pasajes, donde las AbAs se distinguieron porque proliferaron mucho más rápido que los astrocitos de neonatos o ratas adultas de tipo salvaje en cultivo (Díaz-Amarilla y cols. 2011). Las AbAs sobreviven a 12-15 pasajes sin sufrir senescencia replicativa y su toxicidad para las neuronas motoras embrionarias en co-cultivo aumenta a lo largo de sucesivos pasajes; lo que sugiere la existencia de un vínculo entre su aparición y la progresión de la parálisis que es característica en el modelo de ELA hSOD1^{G93A} en rata (**Figura 4**) (Díaz-Amarilla y cols. 2011). Más aún, el control del número de células AbAs durante la progresión de la enfermedad ha probado ser neuroprotector y extender modestamente la sobrevida en modelos murinos de ELA (Miquel y cols. 2014; Trías y cols. 2017).

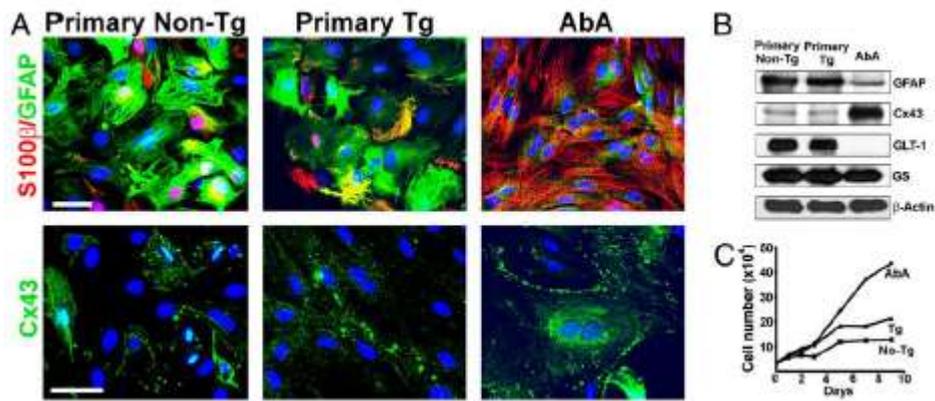


Figura 4: Expresión de marcadores astrocitarios y proliferación en AbAs. **A)** Inmunoreactividad para GFAP (verde) y S100β (rojo) en cultivos confluentes de astrocitos neonatales no transgénicos (NoTg), transgénicos (Tg) y AbAs, evidenciando la escasa señal de GFAP fibrilar y la alta señal de S100β en AbAs. Las imágenes de abajo muestran la mayor señal en AbAs de otro marcador astrocitario, la conexina 43 (Cx43). **B)** Western blotting mostrando diferencias en la expresión de Cx43 y ausencia de expresión del transportador de glutamato GLT-1 en AbAs. **C)** La gráfica muestra la mayor tasa de proliferación de las AbAs respecto de astrocitos de NoTg y Tg. (Tomado de Díaz-Amarilla y cols. 2011).

Principales características de las AbAs

Las AbAs no expresan marcadores distintivos que permitieran claramente distinguirlas de los astrocitos típicos; pero presentan características funcionales y ultraestructurales peculiares que confirman que son un fenotipo astrocitario distinto de los astrocitos típicos presentes en la médula espinal de animales normales. Entre las características más notables que poseen las AbAs, se describe la ausencia permanente de inhibición de contacto que les permite proliferar y disponerse en múltiples capas y organizarse en agregados celulares tridimensionales que adoptan un patrón helicoidal con un núcleo central de matriz extracelular rodeado por células (Jiménez-Riani y cols. 2017).

Además, el citoesqueleto de AbAs no presenta filamentos intermedios, pero son abundantes en microtúbulos, lo que ha sido descrito como un rasgo relacionado a un fenotipo inmaduro (Peters y cols. 1971). Las AbAs también presentan una disposición de las mitocondrias y del retículo endoplasmático (RE) en una posición perinuclear restringida, a diferencia de la presencia citoplasmática generalizada en astrocitos considerados normales (Jiménez-Riani y cols. 2017). Esta peculiaridad sugiere un tráfico alterado de los organelos celulares lo que podría estar asociado con la alteración de la red de microtúbulos o la fragmentación del aparato de Golgi que se describe en la enfermedad (Yoshiyama y cols. 2003). Además, las mitocondrias de las AbAs son pequeñas y oscuras, presentan matriz electrodensa y pocas crestas; lo que ha sido descrito anteriormente en modelos experimentales de ELA y en muestras autópsicas de ELA en humanos (**Figura 5**) (Yamamoto y cols. 2014; Liu y cols. 2015; Welte 2015).

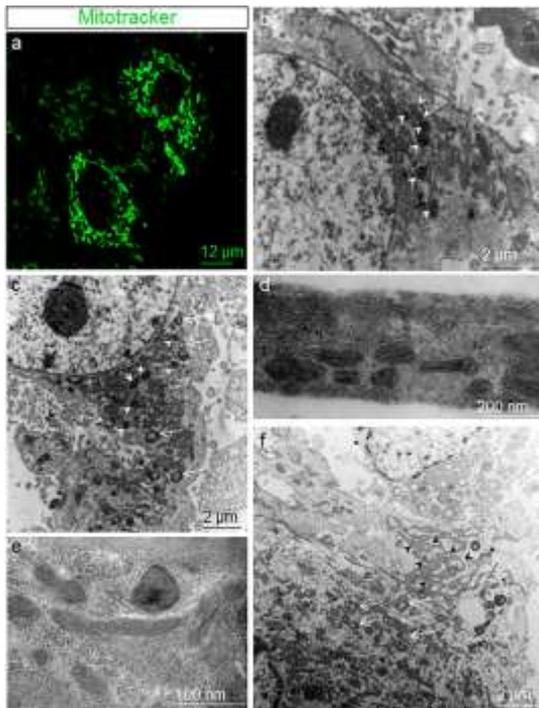


Figura 5: Mitocondrias y RE de AbAs. a) Disposición perinuclear de las mitocondrias marcadas con la sonda vital Mitotracker en cultivos vivos de AbAs mostrando un anillo perinuclear en lugar de la distribución citoplasmática uniforme típica en astrocitos. b-d) Imágenes de microscopía electrónica de transmisión mostrando el tamaño, electrondensidad y localización de las mitocondrias en las células AbA (cabezas de flecha). Las flechas largas muestran algunas mitocondrias con crestas alteradas. f) Mitocondrias con signos de daño (flechas largas) y RE de dos células AbAs diferentes, en una de ellas, las cisternas del RE están hinchadas y redondeadas y su contenido es claro (asteriscos). En la otra célula las vesículas del RE son alargadas y oscuras. Las imágenes muestran la MET de un pellet de AbAs que fueron recogidas por “scrapping”. (Tomado de Jiménez-Riani y cols. 2017).

Otra característica claramente distintiva de las AbAs respecto a los astrocitos espinales obtenidos de animales normales es la apariencia del RE. Las AbAs presentan también cisternas del RE extremadamente hinchadas a tal punto que han perdido su apariencia de sacos elongados y con algunas de las cisternas con signos de degeneración, lo que es congruente con un alto nivel de estrés de RE (Hetz y cols. 2009). De acuerdo con esta posibilidad, las AbAs expresan altos niveles de algunos marcadores de estrés de RE (Gallager y Walter 2016) y abundantes formaciones lipídicas en formas de gotas que se encuentran cercanas al RE y a las mitocondrias (Jiménez-Riani y cols. 2017), lo que indica una alteración en el metabolismo lipídico que también tiene relevancia en la neurodegeneración (**Figura 6**) (Welte 2015).

El citoplasma de las AbAs también está enriquecido en diversas vesículas de distinto tamaño, contenido, desnudas o recubiertas, lo que denota signos de secreción abundante, observándose incluso vesículas extracelulares que pueden distinguirse por microscopía electrónica de barrido y de transmisión, así como la expresión de proteínas que marcan los granos de secreción (Ozawa y Takata 1995; Hur y cols. 2010). Además, las AbAs presentan alta inmunoreactividad para el marcador de autofagia LC3B, vesículas autofágicas y cuerpos residuales (Jiménez-Riani y cols. 2017), probablemente mostrando signos de autofagia incrementada que puede permitir que las células enfrenten el estrés de RE favoreciendo la eliminación de las proteínas mal plegadas (Kawamata y Manfredi 2010).

Recientemente hemos determinado que las AbAs solo pueden aislarse de la región espinal que se afecta primero en el modelo hSOD1^{G93A} (Otero y cols. 2019). Así no fue posible aislar AbAs de la región cervical de animales paráliticos del tren posterior, mientras que no se pueden obtener AbAs de la región lumbar de animales con sintomatología superior. En cambio, se obtienen células con baja proliferación y morfología que se asemeja a microglía fagocítica. Entre las similitudes también se mantiene la baja supervivencia a largos pasajes y una nula transición fenotípica, manteniéndose como células planas como los astrocitos normales (Otero y cols. 2019). Por lo tanto podría pensarse que las células AbAs se generan como una respuesta local al daño, actuando de manera similar a los astrocitos, es decir reaccionando según el tipo de lesión, ubicación y señalización (Pekny y cols. 2014; Sofroniew 2015; Otero y cols. 2019). Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento no

permiten aún identificar los mecanismos más relevantes que darían cuenta de la neurotoxicidad de las AbAs, aunque su control ha sido neuroprotector en todos los estudios reportados (Miquel y cols. 2014; Trías y cols. 2017).

Mecanismos que podrían vincular a las AbAs con la patogénesis de la ELA

Los procesos celulares más importantes implicados en la fisiopatología de la ELA incluyen estrés oxidativo, estrés de RE, aclaramiento anormal de proteínas y distorsiones en el acoplamiento metabólico neurona-glía y la homeostasis energética alteradas (Schmitt y cols. 2014; Taylor y cols. 2016). Entre sus características más notables, los AbAs exhiben un nivel de estrés de retículo (RE) muy alto, así como gotas de lípidos y morfología mitocondrial perturbada lo (Jiménez-Riani y cols. 2017), así como alteraciones en el potencial y la funcionalidad mitocondrial (Cassina, y cols. 2008) lo que indica una deficiencia de estas células en el soporte energético a las motoneuronas que se suma a su neurotoxicidad producida a través de mecanismos aún desconocidos (Díaz-Amarilla y cols. 2011; Miquel y cols. 2014; Trías y cols. 2017).

El estrés de RE es producido por el desequilibrio que se genera entre la síntesis, plegamiento y degradación de proteínas (Valenzuela y cols. 2016). Para recuperar la homeostasis del RE, las células activan la respuesta de la proteína desplegada (UPR) que organiza respuestas celulares proadaptativas y pro-muerte que incluyen disminución de la síntesis de proteínas, excepto por los efectores que median la UPR (Walter y Ron 2011; Oakes y Papa 2015; Valenzuela y cols. 2016). Las consecuencias de un estrés de RE alto son dependientes de la duración, la intensidad y las causas del mismo; y si no se resuelve, puede transformarse en un estado crónico y es una de las primeras perturbaciones descritas en varias enfermedades neurodegenerativas (Valenzuela y cols. 2016).

Curiosamente, el estrés de RE está presente en los modelos experimentales de ELA y se describe como un mecanismo que subyace a la muerte de las neuronas motoras en pacientes de casos familiares y esporádicos (Hetz y cols. 2009; Suzuki y Matsuoka 2012; Lee y cols. 2016; Valenzuela y cols. 2016). Además, la UPR activa en AbAs puede regular a la baja la expresión de péptidos y proteínas que colaboran con la supervivencia de las neuronas, como las neurotrofinas o el glutatión que es la defensa antioxidante celular más importante (Pehar y cols. 2017). Por lo tanto, aunque el estrés de RE en AbAs no cause su propia muerte, es muy probable que afecte la supervivencia de otros tipos celulares circundantes como neuronas y oligodendrocitos, en vista de su alta dependencia de soporte de los astrocitos (Otero y cols. 2019).

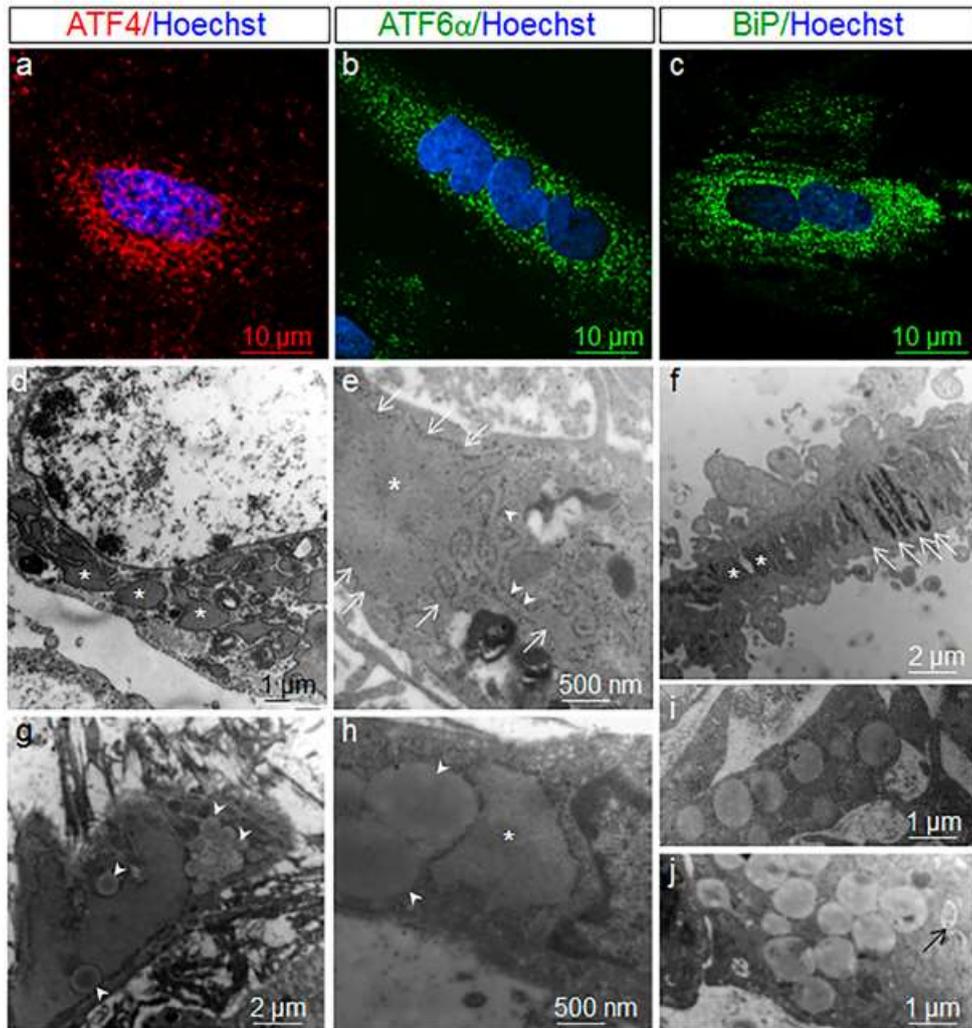


Figura 6: Estrés de RE y gotas lipídicas en AbAs. a-c) Inmunoreactividad positiva para marcadores de estrés de RE en AbAs. **d-f)** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión mostrando cisternas de RE hinchadas y de electrodensidad (*), las flechas largas en la imagen e muestran los ribosomas que delimitan el perímetro de una cisterna extremadamente hinchada y las cortas en una cisterna elongada. La imagen f muestra cisternas que están degenerando (flechas largas). **g-h)** Gotas de lípido de diferentes tamaños que aparecen aisladas (g), adyacentes a cisternas de RE hinchadas (h) o en grupos (i-j). (Tomado de Jiménez-Riani y cols. 2017).

En estrecha relación con el estrés del RE, las AbAs también están muy enriquecidas en gotas lipídicas que aparecen cerca de las mitocondrias o cisternas del RE (Welte 2015). Estas gotas se originan en el RE y se describen en situaciones de estrés de RE y en alteraciones en el aclaramiento de los agregados de proteínas, así como en la homeostasis energética desbalanceada (Penneta y Welte 2017). Las alteraciones en el recambio de proteínas constituyen uno de los marcos patológicos de la ELA, ya que en los modelos experimentales que sobreexpresan proteínas mutadas presentan depósitos intracelulares y afectación en la expresión de genes directamente involucrados en la eliminación de proteínas y la homeostasis proteica (Taylor y Brown 2016). Las gotas de lípidos que hemos encontrado en el citoplasma de las AbAs, también se han descrito en muestras de cerebros de pacientes con ELA colocalizando con la ubiquitina y algunos componentes del proteosoma (Penneta y Welte 2017), sugiriendo que podrían ser una causa o consecuencia de las alteraciones en la degradación de componentes celulares.

En el cerebro, las gotas de lípidos se encuentran principalmente en las células gliales y ayudan a proporcionar combustible a las neuronas cuando se necesita energía y la glucosa es escasa, desempeñando así un papel crucial en el soporte anaplerótico (Schmitt y cols. 2014; Welte 2015). Sin embargo, el exceso de gotitas de lípidos como se ve en AbAs puede sugerir un metabolismo de lípidos interrumpido en el cual las gotitas de lípidos no pueden emplearse para obtener energía, disminuyendo así el flujo de intermediarios energéticos que se proveen a las neuronas lo que pueden influir en la supervivencia de las neuronas motoras a través de la anaplerosis limitada (Schmitt y cols. 2014; Welte 2015). La disfunción lipídica también podría tener un impacto indirecto en la supervivencia de las neuronas motoras, como se ha demostrado en ratones que sobreexpresan TDP-43, que además de presentar síntomas neurológicos y déficits motores, también presenta una mayor acumulación de grasa e hipertrofia de los adipocitos (Stallings y cols. 2013). A la inversa, el agotamiento de TDP-43 causa reducción de la grasa corporal, mayor consumo de ácidos grasos y muerte rápida (Chiang y cols. 2010), probablemente, debido a que el agotamiento de TDP-43 bloquea el tráfico inducido por la insulina del transportador de glucosa Glut4 a la membrana plasmática, lo que dificulta la captación de glucosa e induce un cambio metabólico tendiente a emplear los lípidos como fuente de energía.

Este cambio metabólico también se ha informado en modelos de ratones SOD1 en donde las neuronas de la médula espinal muestran un uso reducido de la glucosa (Miyazaki y cols. 2012) y donde una dieta rica en grasas restaura la masa corporal, retrasa la aparición de la enfermedad y extiende la esperanza de vida (Schmitt y cols. 2014). Además, la acumulación excesiva de gotas de lípidos en las células gliales es un sello distintivo en muchos modelos de neurodegeneración y generalmente está vinculada a la disfunción mitocondrial y la progresión de la enfermedad (Liu y cols. 2015; Welte 2015). La presencia de gotas de lípidos abundantes también pareció un factor suficiente para promover la neurodegeneración por sí misma (Liu y cols. 2015), ya que los lípidos extraídos de pacientes y modelos animales mostraban señales de daño oxidativo y lipoperoxidativo que causaba muerte neuronal en cultivo. Por lo tanto, las gotas de lípidos en las AbAs pueden tener funciones duales, podrían ser sustento energético en caso de alteraciones mitocondriales que afecten el metabolismo energético habitual, pero por otro, su abundancia podría indicar que no se están empleando como fuente energética o tener una neurotoxicidad directa.

Finalmente, las células AbAs también muestran evidencias de una alta actividad secretora, que también se describe como crucial para el daño neuronal en la ELA. Si bien los granos de secreción parecen una respuesta protectora para conservar energía y permitir la recuperación en condiciones de estrés, la actividad secretora sostenida de los granos de estrés parece crucial para la patogénesis de la ELA (Li y cols. 2013). Además, se ha demostrado que las cromograninas interactúan y se localizan conjuntamente con SOD1 mal plegada mutada (Urushitani y cols. 2006) y puede eventualmente actuar como chaperonas para promover la secreción de mutantes de SOD1, los que una vez liberados, pueden desencadenar la microgliosis y la muerte neuronal (Urushitani y cols. 2006).

En resumen, los astrocitos son células que se encargan de mantener la homeostasis del SNC, para ello son capaces de llevar a cabo un enorme número de funciones; además son capaces de responder bajo situaciones de daño, sufriendo cambios funcionales y estructurales que eventualmente podrían generar nuevos fenotipos astrocitarios con efectos deletéreos sobre las demás poblaciones celulares del SNC. La identificación de dichos fenotipos y los mecanismos subyacentes a sus funciones es necesaria para lograr una mayor prevención o tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas que aún son incurables.

Por lo tanto, dado que:

-La muerte de motoneuronas espinales que tiene lugar en la ELA desencadena una cascada patológica que induce una pronunciada respuesta astrocitaria que parece ser llevada a cabo mediante distintos fenotipos astrocitarios (Illieva y cols 2009; Díaz-Amarilla y cols 2011).

-Las Abas constituyen una población de astrocitos proliferantes presente en las fases sintomáticas de animales Tg SOD1G93A que presentan la mayor neurotoxicidad reportada hasta el momento.

-El control de las AbAs ha demostrado ser neuroprotector (Trías y cols 2013; Miquel y cols 2014; Martínez-Palma y cols 2018), sin embargo, los tratamientos realizados podrían afectar otros fenotipos astrocitarios que preservan la mayoría de las funciones homeostáticas.

HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis actual sostiene que **es posible realizar el control selectivo de las AbAs, ya sea modulando su fenotipo o controlando su número, sin afectar los astrocitos responsables de las propiedades homeostáticas.** De este modo, podría lograrse una disminución de la neurotoxicidad producida por las AbAs y por otro preservar las células astrocitarias que tienen un rol preponderante en la protección de las motoneuronas supervivientes al controlar los niveles de estrés celular.

OBJETIVOS

Objetivo general

En forma general, este estudio pretende aportar al conocimiento de la respuesta de células gliales frente a diferentes desafíos farmacológicos *in vitro*. En forma más específica, pretende aportar evidencias sobre la posible modulación selectiva del fenotipo AbA, preservando los astrocitos considerados normales.

Objetivos específicos

1. Analizar los efectos de compuestos químicos con diferentes propiedades sobre la viabilidad y funcionalidad mitocondrial de cultivos celulares de linaje astrocitario.
2. Evaluar los efectos del pigmento Violaceína sobre la viabilidad y fenotipo de astrocitos obtenidos de animales No Tg y AbAs.

ABORDAJE METODOLÓGICO

Para ejecutar los objetivos se trataron cultivos de astrocitos de animales adultos NoTg con distintos compuestos farmacológicos de diseño o disponibles comercialmente con acciones reportadas sobre algunos de los mecanismos que presentan alteraciones en las células AbAs. Se emplearon AbAs de bajo pasaje (P4-P7) y de alto pasaje (P14-P18) para evaluar los distintos compuestos a las mismas concentraciones. Esto se debe del supuesto de que el fenotipo Aba es un fenotipo en transición.

Como parte del objetivo 1, se analizaron los efectos de diferentes compuestos sobre los astrocitos y las AbAs midiendo viabilidad celular con sulforodamina B, funcionalidad mitocondrial por MTT, nivel de estrés de RE mediante inmunocitoquímica para BiP7GRP78 y expresión de marcadores astrocitarios empleando inmunocitoquímica para GFAP y S100 β . En algunos casos se evaluó cambios en el citoesqueleto de actina con faloidina-rodamina.

Antes de comenzar los experimentos, determinamos que se seleccionarían aquellos compuestos que tuvieran efectos a concentraciones menores de 100 μ M para favorecer la selectividad y que el tiempo estándar de tratamiento sería de 24 h que es el tiempo estimado de duración del ciclo celular de astrocitos en cultivo (Díaz-Amarilla y cols. 2011). La búsqueda de fármacos trató de identificar una ventana de concentraciones que idealmente permita la acción sobre las células AbAs y no sobre los astrocitos obtenidos de animales NoTg. Además se analizó si el nivel de expresión de dos marcadores de AbAs mediante qPCR puede modificarse a lo largo de los pasajes para iniciar el estudio de la estabilidad de dicho fenotipo.

El objetivo 2 estuvo dirigido a testar los efectos de un compuesto con acciones antitumorales reportadas buscando las concentraciones que afecten el número de AbAs sin alterar la viabilidad ni funcionalidad de los astrocitos provenientes de animales No Tg. Agregándose las células de glioma de rata C6 (Grobben y cols. 2002) como control positivo, dado que se han reportado acciones antiglioma de este compuesto (Bromberg y cols. 2010).

Selección de compuestos

Los compuestos evaluados fueron seleccionados debido a sus antecedentes como posibles moduladores de vías de señalización que podrían estar implicadas en la transición de los astrocitos hacia un fenotipo aberrante.

La Forskolina y S14 fueron seleccionados por ser inductores de la vía de CREB (del inglés *cAMP response element-binding protein*) a través del aumento de los niveles del segundo mensajero 3'-5'-adenosín-monofosfato cíclico (AMPC, Gascón y cols. 2017; Sapio y cols. 2017). El AMPC ha sido involucrado desde su descripción como una molécula versátil involucrada en la regulación de la homeostasis energética a nivel central y periférico y parte de sus acciones son mediadas a nivel transcripcional a través de la activación de CREB y sus coactivadores (Ravnskjaer y cols. 2016). La Forskolina, un compuesto natural extraído de la planta *Plectranthus barbatus* cuya estructura es un labdano dipireno, es un estimulador bien conocido de la vía que actúa estimulando la enzima adenilato ciclasa responsable de catalizar la síntesis del AMPC (Mehan y cols. 2017). Por otra parte, la Forskolina ha producido cambios morfológicos en astrocitos, por lo que se considera una prueba definitiva para determinar el linaje astrocitario (Díaz-Amarilla y cols. 2011). El compuesto S14 fue sintetizado por el laboratorio de la Dra. Ana Martínez (García y cols. 2014) como un inhibidor selectivo para fosfodiesterasa 7 (PDE 7) que es la enzima responsable de catalizar la hidrólisis del AMPC, por lo que su inhibición provocaría la acumulación de AMPC (Morales-García y cols. 2017).

Debido a que las AbAs presentan alteraciones a nivel mitocondrial, presentan una alta tasa mitótica (Díaz-Amarilla y cols. 2011; Jiménez-Riani y cols. 2017) y una tasa respiratoria menor que la de los astrocitos normales (Miquel y cols. 2012; 2014), se ha planteado que una posible estrategia para modular el fenotipo AbA es la restauración de algunas de las vías metabólicas clásicas de astrocitos normales. La 6-Aminonicotinamida (6AN) fue seleccionada para tratar a las células AbAs debido a que es un inhibidor de la ruta de las pentosas fosfato, una vía que si bien tiene como función aportar ribosa como sustrato para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos, también es capaz de aportar poder reductor a las células e

intermediarios a la vía glucolítica con la que está estrechamente relacionada (Tyson y cols. 2000). La hipótesis que subyace a este tratamiento postula que la inhibición de una de las rutas metabólicas alternativas puede ser un elemento de control de las células AbAs. En apoyo a esta idea, en algunos modelos experimentales la 6AN ha mostrado actuar como una gliotoxina (Penkowa y cols. 2004), por lo que un manejo de las concentraciones podría ser una herramienta farmacológica para ayudar a controlar las AbAs.

Otro compuesto seleccionado es el cloruro de Zinc. La literatura reporta que el Zinc contribuye al daño neural en isquemia, daño cerebral traumático y accidente cerebrovascular y que en particular los astrocitos son vulnerables a dicha toxicidad debido a la acción deletérea de especies reactivas de oxígeno inducidas por la acción oxidante del Zinc (Bishop y cols. 2007; 2010). Por lo tanto, podría ser posible emplear distintas concentraciones de Zinc que tengan acción selectiva sobre las AbAs y no sobre los astrocitos obtenidos de animales No Tg.

Otra de las alternativas farmacológicas empleadas se focalizó en aumentar aún más, el estrés de RE que las AbAs presentan (Jiménez-Riani y cols. 2017), intentando afectar su viabilidad. El compuesto seleccionado fue la Tunicamicina, un inductor de estrés de RE clásico (Cheng y cols. 2013), del cual conocemos que a la concentración que emplearemos no tiene efectos significativos en la sobrevivencia y funcionalidad mitocondrial de astrocitos obtenidos de animales neonatos normales (**tesina de grado de Valentín Cópola**).

Otro compuesto desarrollado por la Dra. Ana Martínez, es el denominado ERP1.1.4A, conocido como inhibidor de la proteína quinasa 7 de la división del ciclo celular (CDC7) que interviene durante la transición de las fases G1 y S del ciclo celular, actuando a nivel de la modulación de la RNA polimerasa II (Remus y Diffley 2009). Finalmente, dada la alta tasa de proliferación de las AbAs y su ausencia de senescencia replicativa (Díaz-Amarilla y cols. 2011) lo que lleva a que en algunos aspectos, presenten algunas características que recuerdan a líneas celulares tumorales, evaluamos los efectos del pigmento violaceína, un compuesto propuesto como posible agente anticancerígeno con aplicación médica futura ya que estimula la apoptosis celular (Bromberg y cols. 2010).

La preparación comercial de lipopolisacáridos de *Escherichia Coli* O111:B4 (SIGMA) fue empleada como inductor de inflamación en algunos experimentos, solo o en co exposición con otros compuestos, para evaluar si alguna de estas condiciones podría lograr el control de las Abas (Cavaillon 2018).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se emplearon reactivos puros para análisis y aptos para cultivo celular cuando correspondiere. Los reactivos generales, Lipopolisacárido (LPS), Sulforodamina B, Forskolina, Cloruro de Zinc, Tunicamicina, 6-Aminonicotinamida y Bromuro de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolio y los reactivos aptos para cultivo celular (HEPES, bicarbonato de sodio, cloruro de potasio, albúmina sérica bovina (BSA) fueron adquiridos a Sigma. Los medios y suplementos para cultivo celular DMEM alto en glucosa (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Minimal Medium* Código N° 12100-061 1x10L), Tripsina-EDTA 0.5%, Penicilina-Estreptomicina 10000 UI/mL/10000 µg/mL y suero fetal bovino (FBS) y las sondas fluorescentes Falloidina-Rodamina y Hoechst 33342 fueron comprados a GIBCO® (Invitrogen). El material de plástico empleado para cultivo celular (botellas, placas de Petri, placas multipocillos, tubos, puntas) fueron comprados a Greiner Bio-One® y Nunc®. El material para PCR en tiempo real fue

adquirido a Qiagen, Fermentas e Invitrogen. Los anticuerpos empleados fueron adquiridos a Abcam, Invitrogen, Hybridoma Bank o Cell Signalling.

Los compuestos químicos no comerciales empleados fueron suministrados gracias a colaboraciones académicas con la Dra. Ana Martínez Gil del Instituto de Química Médica del CSIC, Madrid que suministró S14 y ERP1.1.4^a y con el Laboratorio de Epigenética e Inestabilidad Genómica del Instituto de Investigaciones Biológicas Celomente Estable (IIBCE), que proporcionaron violaceína purificada del microorganismo Antártico *Janthinobacterium sp.* UV13.

Salvo situaciones especiales, las soluciones rutinarias fueron preparadas en el laboratorio e incluyeron:

-solución salina tamponada de fosfatos (PBS) 10 mM, pH 7.4 cuya composición es la siguiente: 8 g de NaCl, 0,20 g de KCl, 0,92 g de Na₂HPO₄ y 0,24 g de KH₂PO₄. Las cantidades respectivas fueron disueltas en 1 litro agua destilada, el pH fue ajustado a 7.4 con HCl 1N o NaOH 2N utilizando un pHmetro Orion Modelo 420. Luego del ajuste de pH y volumen, la solución se esterilizó por filtración utilizando filtros Milipore® con un tamaño de poro de 0,22 µm.

-solución de fijación: PBS + 4% Paraformaldehído (PFA)

-solución de bloqueo y de incubación de anticuerpos: PBS + 5% albúmina sérica bovina (BSA)

-medio de cultivo para células gliales: DMEM alta glucosa + 3,6 g/L HEPES, 1,2 g/L NaHCO₃, 100 IU/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina y suplementado con 10% FBS.

Animales

Todos los procedimientos realizados con animales estuvieron de acuerdo con los códigos internacionales que regulan el uso de animales para experimentación y fueron aprobados por el Comité de Ética de Uso de Animales (CEUA) del IIBCE y bajo la ley de experimentación animal N° 18.611. Los animales empleados pertenecen a la cepa *Sprague-Dawley* (SD) y forman parte de una colonia cerrada originada con 2 ratas machos hemicigotos NTac:SD-TgN (hSOD1^{G93A})L26H (Taconic) que fueron desarrollados por (Howland y cols. 2002) y 6 ratas hembras *wild type* compradas a Jackson Laboratory. Los animales transgénicos (Tg) sobreexpresan el transgen de la enzima humana SOD1 con una mutación puntual Glicina por Alanina en la posición 93 (hSOD1^{G93A}). Los harenos fueron realizados en el bioterio del IIBCE, estuvieron compuestos por 1 macho Tg y 3 hembras No Tg empleándose la segunda y generaciones subsecuentes para mantener la colonia. En un grupo de experimentos se emplearon animales doble positivos nacidos de machos y hembras Tg.

En todos los casos, las condiciones de cría se mantuvieron estables (temperatura controlada, 12 h de ciclo luz/oscuridad y acceso a agua y comida a voluntad). El mantenimiento de los animales estuvo a cargo del personal del bioterio institucional, mientras que el marcado y el genotipado de los mismos fue parte de las tareas desarrolladas para esta tesis. Para todas las aproximaciones experimentales se emplearon animales Tg portadores de la mutación y los hermanos negativos (No Tg).

Genotipado de ratas neonatas mediante PCR

El genotipado de ratas neonatas es un paso fundamental para el reconocimiento de los animales Tg y No Tg dado que los signos y síntomas de la enfermedad se manifiestan en animales adultos. Por ello, el genotipado debe realizarse antes de realizar el cultivo de células de animales neonatos que suelen realizarse dentro de los primeros días posteriores al nacimiento, ya que es donde se obtiene el mayor rendimiento del cultivo (Saneto y de Vellis

1987).

El protocolo seguido para realizar el genotipado de animales neonatos fue tomado de Vargas y cols. (2006). En primer lugar, los animales se marcaron bajo la piel con tinta china aprovechando la condición de alopecia de los neonatos. Posteriormente, luego de 30 min de UV y bajo campana se prepararon los tubos conteniendo 200 μ L de buffer de digestión GNTK (50 mM de KCl, 1,5mM de $MgCl_2$, 10mM de Tris-HCL pH 8.5, 0.01% de gelatina, 0.45% de Nonidet P-40 y 0.45% de Tween 20®) y 100 μ g/mL de proteinasa K (New England BioLabs Inc. #P8102S). Luego se limpió la cola de cada animal con etanol 70%, se cortaron 2-5 mm de cola con bisturí estéril, se colocaron en un tubo Eppendorf conteniendo GNTK y se incubaron en termobloque durante 30 min a 55 °C que es la temperatura óptima de la proteinasa K. Luego se inactivó la proteinasa K incubando las muestras a 95 °C durante 10 min y se centrifugó brevemente y se tomó 1 μ L de la misma conteniendo ADN genómico para agregarlo a la mezcla de la reacción de PCR de la siguiente composición:

| Stock | Concentración | Volumen (μ L) |
|-------------------------------|-----------------|--------------------|
| H2O para PCR | - | 14,2 |
| PCR buffer (Perkin Elmer) 10X | 1X | 2 |
| $MgCl_2$ 25 mM | 1,5 mM | 0,6 |
| dNTP's 5 mM (Invitrogen) | 0,2 mM | 0,8 |
| Cebadores 10 μ M | 0,2 μ M | 0,4 |
| Taq Polimerasa 5U/ μ L | 0,25 U/ μ L | 1 |
| Volumen Final | - | 19 |

Los cebadores utilizados que reconocen parte de la secuencia de la $hSOD1^{G93A}$ fueron comprados a Integrated DNA Technologies (IDT, USA) y su secuencia es la siguiente:

Forward: 5' GTG GCA TCA GCC CTA ATC CA 3'

Reverse: 5' CAC CAG TGT GCG GCC AAT GA 3'

La mezcla de reacción de PCR se calculó para el número de tubos más 1 ($n + 1$), teniendo en cuenta la inclusión de un blanco. Los tubos se mantuvieron en hielo para inhibir la actividad de la Taq polimerasa y después de agregar 1,0 μ L de la solución del sobrenadante conteniendo ADN, se introdujeron en un termociclador Biometra® T1. La configuración de temperaturas y tiempos establecidos para cada paso de la amplificación es el siguiente:

| Temperatura (°C) | Tiempo (min) | Propósito |
|------------------|--------------|--|
| 95 | 2 | Activación de la Taqpol |
| 95 | 0,5 | Desnaturalización de ADN |
| 60 | 0,5 | Unión del Cebador |
| 72 | 0,5 | Elongación |
| 72 | 5 | Completar amplicones de ADN simple hebra |

Los pasos de desnaturalización, hibridación y elongación se repitieron 35 veces:

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para visualizar los amplicones generados durante la amplificación, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida 6% en buffer Tris Borato EDTA (TBE, de composición: 90 mM Tris, 89 mM de Ácido Bórico, 2 mM EDTA) empleando peines de 1,5 mm de espesor. Los geles de poliacrilamida, con frecuencia son utilizados para caracterizar proteínas y ADN de bajo

peso molecular (entre 80pb y 300pb, (McGookin 1988; Stellwagen 2009). En este caso los amplicones esperados son de 160pb, por lo que es preferible utilizar geles de poliacrilamida.

La técnica consiste en la elaboración de una fina capa de gel de acrilamida adherida a una lámina de vidrio por la cual el ADN migra debido a su carga negativa cuando es sometido a un campo eléctrico. La distancia de migración depende del tamaño de la molécula y de la densidad del gel. Gracias a que la densidad de carga de ADN es constante, las distintas moléculas solo se diferenciarán por su peso molecular, y como estamos hablando de polímeros de nucleótidos, podemos simplificar esto como “su tamaño”. La técnica se llevó a cabo en cinco pasos: montaje de la cámara de electroforesis, preparación de la solución de poliacrilamida y llenado de la cámara de electroforesis, pre-corrida del gel, corrida de las muestras y tinción del gel.

Para la preparación de un gel de 10 mL con 15 pocillos se agregaron los siguientes reactivos en el orden que son nombrados, 8 mL de TBE 1X, 2 mL de stock de bis-acrilamida (30:1), 100 µL de persulfato de amonio 10% y 10 µL de TEMED (N,N,N',N'-Tetrametilendiamina). En cada uno de los pocillos del gel se cargaron 5 µL del producto de PCR más 1,5 µL de buffer de carga 6X de composición: 0,25% azul de bromofenol, 0,25% de xilén-cianol FF, 30 % de Glicerol, en H₂O destilada. La electroforesis se realizó a 80 V (40 mA) durante 40 minutos.

Revelado del gel en plata

El revelado de la PCR nos permite discriminar entre los animales positivos para la mutación SOD1^{G93A} de los no transgénicos, mediante la detección de la presencia o ausencia del amplicón. Para lograr esta discriminación se realiza la tinción argéntica del gel de poliacrilamida conteniendo las muestras de la amplificación, procediendo de la siguiente manera: Se desmonta el gel en una solución de fijación (500 µL de Ácido Acético y 13,7 mL de Etanol 100% en 100 mL de H₂O destilada) y se mantiene en agitación suave durante 10 min. Posteriormente se recupera la solución fijadora y el gel se incuba durante 10 min en una solución 0.2% de AgNO₃ en H₂O destilada. Luego de recuperar la solución de plata, el gel se lava rápidamente tres veces con H₂O destilada para quitar el exceso de plata no unido al ADN y se incuba con la solución de revelado (3 g de NaOH y 500 µL de formaldehído en 100 mL de H₂O destilada). Finalmente, el gel se mantiene en la solución de revelado con agitación suave hasta divisar nítidamente las bandas que indiquen los animales positivos y la ausencia de las mismas que permite identificar los no positivos.

Genotipado de ratas adultas

El genotipado de ratas adultas tiene el mismo principio y los mismos reactivos que el de ratas neonatas con variaciones referentes a los tiempos de digestión. Luego de haber cumplido un mes de nacidas, las ratas fueron destetadas y marcadas con orificios en las orejas, siguiendo un código específico que permite identificarlas en todo momento. Una semana después se cortó aproximadamente 5 mm de la cola y se colocó en un tubo Eppendorf® con 300 µL de buffer de digestión de cola (TBD del inglés *Tail Digestion Buffer* de composición: 50 mM de Tris pH 8, 50 mM de EDTA y 0.5% de SDS). Posteriormente se agregaron 185 µL de TBD + 15 µL de proteinasa K (20mg/mL > 30U/mg). Las muestras se incubaron durante 15 min a 65° C para inactivar posibles ADNasas y posteriormente se incubó a 50°C toda la noche. Al día siguiente se incubó durante 15 min a 95°C para inactivar la proteinasa K y evitar la degradación de la Taq polimerasa. Se centrifugó 10 min a 12.000g con el fin de sedimentar los restos de tejido sin digerir; se tomaron 10 µL del sobrenadante y se llevó a una dilución 1:20 en agua. De

esta dilución se tomó 1,0 µL para realizar la PCR y se prosiguió del mismo modo que lo previamente descrito para el genotipado de neonatos.

Cultivos celulares

Cultivo primario de astrocitos

Los cultivos enriquecidos de astrocitos de animales Tg y No Tg fueron obtenidos de la médula espinal de ratas de 1-2 días de vida luego de realizar el genotipado. El protocolo empleado se basa en Saneto y de Vellis (1987) con modificaciones menores. Los animales fueron limpiados con agua destilada y Etanol 70% y decapitados con tijera. La médula espinal fue disecada bajo condiciones estériles utilizando materiales de disección previamente esterilizados y dentro de una cámara de cultivo con flujo horizontal. Una vez disecada la médula, se retiraron las meninges bajo lupa, el tejido se cortó con bisturí y se realizó una disgregación enzimática con tripsina-EDTA (0.05% en PBS, Invitrogen) durante 25 min en baño de agua a 37°C. El tratamiento enzimático fue detenido adicionando DMEM+10% FBS, se agregó 20 µL de ADNasal 50 µg/mL con el fin de evitar agregados ya que el ADN liberado puede aumentar la viscosidad de la solución y la disgregación del tejido se completó mecánicamente por pipeteo repetido sin burbujas. La suspensión celular fue filtrada con una malla de 80 µm, se centrifugó 10 min a 1000 rpm en centrífuga Sigma BCL-2 y el pellet obtenido fue resuspendido en 1 mL de DMEM+10% FBS. Se realizó una dilución 1:20 de la suspensión, se contaron las células en cámara de Neubauer y se corrigieron los volúmenes para obtener 1.5×10^6 células en 5 mL de medio de cultivo y sembrar en botella de cultivo de 25 cm². Las células se mantuvieron en una estufa de cultivo a 37°C, en una atmosfera saturada de agua en 95% aire y 5% CO₂. El medio se cambió totalmente cada 48 h. Una vez que los cultivos alcanzaron confluencia, fueron agitados durante 48 h a 180 rpm en un agitador orbital con el fin de desprender la microglía y la oligodendrogía y obtener una pureza de astrocitos mayor al 98%. Luego de 48 h de agitación, las células fueron decoladas con Tripsina-EDTA 0.05% (5 min, 37°C), colectadas por centrifugación (1000 rpm, 10 min en centrífuga Sigma BCL-2) y posteriormente fueron re-sembradas en placas de 35 mm, 60 mm o multipocillos de 24 o 96 pocillos, dependiendo del experimento. El número de células sembradas por placa o por pocillo para mantener la misma densidad celular es el siguiente:

| Placa | Número de Células |
|-----------------------|-------------------|
| Petri Ø 35 mm | 150000 |
| Petri Ø 60 mm | 500000 |
| Multiwell 24 pocillos | 25000 |
| Multiwell 96 pocillos | 15000 |

Cultivo de AbAs o de animales adultos

Los cultivos enriquecidos de AbAs fueron obtenidos de acuerdo a lo reportado por Díaz-Amarilla y cols. (2011). Se emplearon animales Tg sintomáticos homo y heterocigotos de alrededor de 175 - 190 días de vida. Los animales fueron sacrificados con tijera bajo anestesia profunda con ketamina:xilacina en una relación 90:10 mg/Kg, se dispusieron boca abajo y el área dorsal fue sanitizada con Etanol 70%. La piel fue cortada y la columna vertebral fue disecada en hielo y colocada en tubo de 50 mL en PBS estéril. Bajo campana de flujo laminar, se realizaron dos cambios de PBS y posteriormente se disecó la médula y se retiraron las meninges. La médula se cortó en trozos de 5 mm, se incubó en Tripsina-EDTA 0.05% durante 25 min en baño de agua a 37°C. La tripsina se bloqueó con DMEM+10% FBS, se pipeteó repetidamente, se centrifugó y el pellet resultante se sembró en placa de 60 mm en 2 mL de

DMEM-10% FBS. Luego de 48 h, se retiró el sobrenadante, las células adheridas fueron tripsinizadas 5 min en Tripsina-EDTA 0.05% y sembradas a una densidad de 1×10^6 en botella de 25 cm^2 y fueron replicadas cuando alcanzaron confluencia. En los cultivos de AbAs se realizaron hasta 20 pasajes agrupándose los experimentos entre pasajes 4-7 (bajo pasaje), 8-13 (pasaje medio), 14-18 (pasajes altos). En los cultivos de animales No Tg adultos, se procedió a replicar y emplear pasajes 2-4 dado que sufren senescencia replicativa y no sobreviven a pasajes posteriores.

Criopreservación y revitalización de la línea celular de glioma de rata C6

Para los experimentos con la línea celular se emplearon pasajes 7 a 12 derivados de viales comerciales de células C6 adquiridos a ATCC. Los distintos pasajes fueron conservados en una mezcla crioprotectora realizada con 10% de DMSO y 90% de FBS (Pegg 2007; Baust 2017). El DMSO actúa como agente criopreservante ya que es permeable a la membrana celular y puede desplazar parte del agua del interior de la célula, evitando la formación de cristales de hielo intracelulares que pueden dañar las estructuras celulares durante el descongelamiento, debido a la menor densidad del hielo lo que provoca un mayor volumen durante la congelación y una retracción al descongelarse. El enfriamiento se lleva a cabo en una cámara Mr. Frosty (Nalgene®) conteniendo isopropanol, lo que permite un enfriamiento progresivo de 1°C por min, minimizando así la formación de cristales y el daño.

El procedimiento empleado para descongelar células fue el siguiente: se procedió a descongelar un criotubo conteniendo 10^6 células en un baño de agua a 37°C , el contenido fue transferido a un tubo falcon estéril conteniendo 10 mL de DMEM+10% FBS precalentado a 37°C y se centrifugó durante 5 min a 200 g. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 1 mL de medio de cultivo. Se realizó el recuento con el fin de evaluar la cantidad y viabilidad de las células recuperadas y si la viabilidad es mayor al 90%, la mitad de las células descongeladas fueron sembradas en 5 mL de medio de cultivo en botellas de 25 cm^2 . Al alcanzar el 90% de confluencia, las células fueron tripsinizadas con Tripsina-EDTA 0.05% durante 5 min y pasadas a botella o sembradas en placas para su uso. El otro 50% de las células viables, fueron centrifugadas y el pellet celular se resuspendió en 1 mL de mezcla crioprotectora a una concentración de entre 2 y 3×10^6 cel/mL. Se dispensaron entre 1 - 1,5 mL de suspensión celular por criotubo, los cuales fueron almacenados en un freezer de -80°C si las células se emplean dentro de los 3 meses siguientes, o en tanque de nitrógeno para almacenamientos más largos.

Mantenimiento de los cultivos celulares

Los cultivos obtenidos de los animales Tg y No Tg, neonatos y adultos y de la línea C6 fueron cultivados a 37°C en una atmosfera húmeda con 5% de CO_2 para tamponar el pH del medio que contiene bicarbonato. En todos los casos, el medio de cultivo fue DMEM+10% FBS en presencia de Penicilina y Estreptomina. Debido a que todas las células crecen en adherencia, los sustratos utilizados para el mantenimiento en cultivo fueron botellas de 25 cm^2 o placas de Petri de 60 y 35 mm de diámetro, realizándose pasajes utilizando tripsina-EDTA 0.05%. Para despegar las células, se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS estéril dos veces para retirar el FBS que inhibe la Tripsina y se adicionó 1 mL de Tripsina-EDTA 0.05% incubando 5 min a 37°C . Se adicionó 3 mL de medio de cultivo completo, se centrifugó para descartar la tripsina y se transfirió la dilución adecuada a una nueva botella de cultivo o a las placas correspondientes para su uso.

Recuento y evaluación de viabilidad celular

El recuento celular se realizó utilizando cámara de Neubauer empleando las diluciones convenientes de acuerdo con la densidad celular de la muestra (usualmente 1:20 o 1:50 en PBS). La proporción de células viables se determinó empleando el método de exclusión con Azul de Tripán 0.5% durante 2 min (Strober 2001) en el cual el colorante se incorpora a las células muertas debido a la alteración de la integridad de la membrana plasmática y la ausencia de mecanismos activos de exclusión. Los cultivos empleados presentaron ~ 95% de viabilidad celular estimada como células negativas a Azul de Tripán respecto de células totales.

Tratamiento farmacológico de los distintos cultivos celulares

Los distintos cultivos celulares fueron tratados en situaciones de confluencia y en medio de cultivo DMEM + 2% FBS. El procedimiento seguido para todos los tratamientos fue el mismo, procediéndose a retirar el medio de cultivo con pipeta Pasteur e incubar con DMEM + FBS 2% y el compuesto de interés durante 24 h salvo casos particulares que se señalarán específicamente. Las concentraciones de los distintos compuestos empleados fueron determinadas de experimentos anteriores, sugeridas por los grupos que donaron los compuestos o tomadas de la bibliografía. Así las concentraciones de S14 (30 μ M) y del inhibidor de CDC7 (20 nM) fueron sugeridas por Ana Martínez. La concentración empleada de Tunicamicina (1 μ M) fue obtenida de la literatura existente (Cheng y cols. 2013) y de datos del laboratorio que indicaban que esa es la máxima concentración que no afecta la supervivencia ni la funcionalidad mitocondrial de astrocitos obtenidos de animales neonatos normales (no publicado). La concentración de Forskolina (10 μ M) fue tomada de Díaz-Amarilla y cols. (2011) y de la literatura que muestra que es una concentración suficiente para producir una respuesta formológica reconocida por la emergencia de procesos celulares y la retracción del soma en astrocitos (Jóźwiak-Bębenista y cols. 2015; Sun y cols. 2017). Las concentraciones de Cloruro de Zinc empleadas estuvieron basadas en Bishop y cols. (2010) y fueron adaptadas de acuerdo a los distintos resultados experimentales que se fueron obteniendo (50, 100 y 200 μ M).

Las concentraciones de Violaceína inicialmente empleadas (0 – 1500 nM) fueron las mismas que las utilizadas por Diego Alem en su trabajo de Doctorado y están de acuerdo con lo reportado en Bromberg y cols. (2010) y Choi y cols. (2015). En todos los experimentos hubo controles sin ningún tratamiento y si los compuestos se disolvieron en otras soluciones diferentes a PBS o medio de cultivo, se realizaron controles exponiendo las células solo a vehículo como en el caso de Violaceína (DMSO).

Análisis de Citotoxicidad mediante Sulforodamina B

Para evaluar la citotoxicidad de los compuestos evaluados, se empleó el ensayo colorimétrico de sulforodamina B (SRB); ensayo que es recomendado por el NCI (del inglés *National Cancer Institute*, USA) para la evaluación de efectos sobre la viabilidad celular en el programa de tamizaje in vitro para el descubrimiento de nuevos agentes antineoplásicos (Skehan y cols. 1990). Posteriormente, su uso se ha generalizado para evaluar citotoxicidad celular. El ensayo de SRB se basa en la determinación del contenido proteico retenido de las células adherentes luego de haber sido fijadas directamente desde el cultivo. La SRB posee dos grupos sulfónicos cargados negativamente y en condiciones ácidas (disuelta en Ácido Acético 1%), aumenta su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas, fijándose selectivamente a estos, proporcionando información sobre el contenido de proteína celular si las células son previamente fijadas con Ácido Tricloroacético (TCA) (Skehan y cols. 1990; Monks y cols. 1991). Tiene además la ventaja de ser altamente sensible y funcionar para todas las células adheridas, sin importar su procedencia, ya que no depende de ninguna actividad enzimática intrínseca.

Para realizar la determinación de SRB las células se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano y se mantuvieron en 100 μ L de DMEM+10% FBS en incubación a 37°C y 5% CO₂ hasta alcanzar confluencia. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se incubaron las células con los compuestos de interés disueltos en DMEM+2% FBS. A las 24 h se comenzó el protocolo de SRB de acuerdo al protocolo sugerido por Sigma. Inicialmente, las células se fijaron con 25 μ L de TCA adicionado a cada pocillo. Luego se incubó 1 h a 4°C en heladera para permitir la fijación de las células vivas por precipitación debido a la presencia de TCA. Luego se decantó el contenido y las placas se lavaron 5 veces con agua destilada. Las placas se dejaron secar durante 2 días y se incubaron durante 30 min con una solución de SRB al 0,4% v/v en Ácido Acético (HA) al 1%. Se realizaron 5 lavados con HA al 1% para eliminar el colorante no adherido a las proteínas celulares y se dejó por al menos 24 h. Finalmente, el colorante adherido a la placa debido a la presencia de proteínas fue disuelto en 100 μ L de Tris base 10 Mm, pH 10, agitado hasta observarse la completa disolución y llevado al lector de placas Varioskan midiéndose absorbancia a 490 y 630 nm. Restándose los valores obtenidos a 630nm a los obtenidos a 490, ya que los primeros son considerados como ruido de fondo; y se prosiguió a realizar el análisis estadístico de los resultados utilizando el programa Prism Graphpad 6, aplicándose el test de análisis de la varianza ANOVA con método de Tukey.

Funcionalidad mitocondrial

Como método complementario para analizar la citotoxicidad de los compuestos, se realizó también el ensayo de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolio (MTT), que está basado en la actividad NAD(P)H óxido-reductasa que permite reducir el MTT a formazán formando un precipitado violeta (Mossmann 1983). En las células dependientes de la fosforilación oxidativa como son la mayoría, la reducción del MTT es un indicador de viabilidad celular y de capacidad metabólica por lo que también puede emplearse como un indicador de proliferación bajo ciertas condiciones ya que las células que tienden a dividirse más rápido van a reducir el MTT más rápidamente. Sin embargo, la dependencia de los resultados de reducción del MTT con los estados metabólicos en distintos tipos celulares no necesariamente es un buen indicador de citotoxicidad (Escobar y Aristizabal 2008). Este parece ser el caso de los astrocitos donde la reducción del MTT parece depender fundamentalmente de la actividad de la succinato deshidrogenasa mitocondrial y como estas células tienen otras rutas metabólicas alternativas a la fosforilación oxidativa como la glicólisis y la ruta de las pentosas fosfato (Falkowska y cols. 2015) que aseguran su viabilidad, la actividad de MTT en células de estirpe astrocitaria es fundamentalmente un indicador de actividad de función mitocondrial (Olivera y cols. 2008).

De acuerdo a esta última interpretación se ha empleado el ensayo de MTT. Para realizar el protocolo, las células se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano en 100 μ L de DMEM + 10% FBS y se mantuvieron en incubación a 37°C y 5% CO₂ hasta alcanzar confluencia. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se incubaron las células con los compuestos de interés disueltos en DMEM + 2% FBS. Al cabo de 24 h de tratamiento, se agregaron 10 μ L de MTT (10 mg/mL) y se siguió la aparición del precipitado violeta observándose en el microscopio invertido hasta la aparición de las primeras espículas coloreadas extracelulares. Una vez observada la aparición del precipitado, se retiró el medio con pipeta Pasteur y se disolvió el precipitado en 120 μ L de DMSO. Se midió la absorbancia a 500, 520, 570 y 630 nm en el lector de placas Varioskan; pero se utilizaron los valores de 570nm a los cuales se les sustrajo el valor obtenido a 630nm que se corresponde al ruido de fondo; y se prosiguió a realizar el análisis estadístico de los resultados utilizando el programa Prism Graphpad 6, aplicándose el test de análisis de la varianza ANOVA con método de Tukey.

Análisis estadístico de las lecturas en placas

En cada experimento, todas las determinaciones se realizaron por quintuplicado hasta octuplicado y se realizaron entre 3 y 5 experimentos independientes. Los datos se expresan relacionados al control de cada corrida y se expresan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos fueron determinadas aplicando test paramétricos como t de Student, análisis de la varianza (ANOVA) con el modelo de comparaciones múltiples de Tukey, utilizando el software GraphPad Prism 6, en caso de ser necesario. Se consideró diferencia significativa cuando el p valor fue menor al 0.05% con respecto al vehículo.

Inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica es en una técnica que permite evidenciar la presencia de componentes celulares mediante el reconocimiento de los mismos a través del reconocimiento con anticuerpos (Mori y Cardiff 2016). El uso de anticuerpos hace que se logre una gran afinidad y especificidad por los antígenos, además la incorporación de sondas fluorescentes acoplados permitió no solo aumentar la resolución gracias al uso de microscopios del tipo laser confocal; si no que también permitió el marcaje y visualización de más de un antígeno en una misma muestra (Mori y Cardiff 2016). Para realizar la técnica, los cultivos celulares fueron fijados con PFA 4% en PBS, a temperatura ambiente durante 30 min. Luego, los cultivos fueron permeabilizados con Tritón X-100 0.1% durante 20 min, se lavaron 3 veces con PBS y luego fueron bloqueados con BSA 5% en PBS por 60 min. Luego se realizó la incubación con el/los anticuerpo/s primario/s toda la noche a 4°C en cámara húmeda (los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes. Luego de la incubación primaria, se realizaron tres lavados con PBS y se realizó la incubación con el/los anticuerpo/s secundario/s correspondiente durante 90 min a temperatura ambiente, protegidos de la luz y con agitación suave. Se realizaron controles negativos, omitiendo los anticuerpos primarios o secundarios. La solución de incubación de los anticuerpos fue la misma que la de bloqueo (PBS+BSA 5%).

En algunos casos, para visualizar la citoarquitectura y la disposición de los filamentos de actina, las células se incubaron con Faloidina, una micotoxina que impide la depolarización de los filamentos de actina y que cuando está conjugada a un fluoróforo en condiciones de saturación, es muy utilizada para visualizar los microfilamentos de actina por microscopía de fluorescencia (Hendzel 2014). En los experimentos realizados para este trabajo, se empleó Faloidina conjugada a Tetrametilrodamina (TRITC). Una dilución de Faloidina-TRITC de 1:250 en PBS fue adicionada en los últimos 20 min de incubación del anticuerpo secundario. Luego las células se lavaron con PBS y se montaron en Glicerol 50% conteniendo 1 μ g/mL de la sonda nuclear fluorescente Hoescht 33342. La visualización de la fluorescencia y la captura de las imágenes se realizaron utilizando el microscopio confocal institucional Olympus FLUOVIEW FV300.

| Anticuerpos | Dilución |
|---|-----------------|
| Anti-S100 β monoclonal ratón (Sigma S2532) | 1:600 |
| Anti-GFAP policlonal conejo (Sigma G4546) | 1:500 |
| Anti-BiP policlonal (abcam ab-21,685) | 1:300 |
| Anti-pCREB monoclonal (abcam ab173780) | 1:500 |
| Anti-ATF6 α monoclonal (Sta- Cruz sc-166659) | 1:300 |
| Anti-S100 policlonal conejo (Sigma S2644) | 1:300 |

Análisis de imágenes

El análisis de las imágenes obtenidas en el microscopio confocal fue realizado utilizando los programas Image J y GraphPad Prism 6. Las imágenes obtenidas en formato TIF, fueron analizadas en el programa Image J, para que cada canal de imagen del microscopio confocal sea independiente y luego se fijó un umbral (*threshold*) único para todas las imágenes de una misma serie de datos, para evitar que se midieran señales de ruido. El número de células presentes en cada imagen fue contado utilizando la herramienta *Plugin Cell Counter*, ya que posteriormente nos permitió normalizar los parámetros medidos respecto al número de células.

Una vez contado el número de células y ajustadas las imágenes, se les aplicó el análisis correspondiente y se recolectaron los datos correspondientes al valor de intensidad de la señal por unidad de área (*Mean grey value*) y el área positiva de cada señal por campo de imagen (*Área*). Este último nos brindó información sobre el área marcada por nuestro antígeno una vez que normalizamos las imágenes respecto al número de células. El *Mean grey value* además se normalizó por el número de células. Una vez obtenidos los valores de estos datos para todas las imágenes, se les aplicó análisis de la variancia (ANOVA) con el modelo de comparaciones múltiples de Tukey, utilizando el software GraphPad Prism 6.

Análisis semicuantitativo de los niveles de ARN mensajero por PCR en tiempo real (qPCR)

Este análisis se realizó en las células AbAs a distintos pasajes celulares, que fueron cultivadas en placas de 60 mm hasta una confluencia de aproximadamente 90%. El ARN total de las distintas muestras fue extraído utilizando TRIzol® Reagent (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante con algunas pequeñas modificaciones. Brevemente, las células se lavaron con PBS estéril y luego se agregó 1 mL de TRIzol por placa de 60 mm. El lisado se colectó en un tubo Eppendorf y se homogeneizó mecánicamente con jeringa de 1 mL. Luego se agregaron 0.2 mL de Cloroformo por mL de TRIzol utilizado, se homogeneizó, se dejó reposar 5 min y se centrifugó a 12000g y 4°C durante 15 min. Se recuperó la fase incolora (más superficial), se agregó un volumen de isopropanol y acrilamida lineal a una concentración final de 15 µg/mL. Se dejó precipitando toda la noche a -20°C. Al otro día se centrifugó a 12000g a 4°C durante 15 min, se descartó el sobrenadante, se enjuagó el pellet con Etanol 75% v/v, se centrifugó durante 5 min a 12000g y se secó el pellet en una estufa seca hasta que el mismo adquiriera apariencia vidriosa. El pellet fue resuspendido en 20 µL de agua apta para PCR, se agregó 0.1 volúmenes de buffer de DNAsa 10%, 2 µL de DNAsa (Ambion) y se incubó durante 40 min a 37°C. Por último se agregó 0.1 volúmenes de inhibidor de DNAsa, se mezcló, se centrifugó por 2 min a 12000g permitiendo que el reactivo de inactivación precipite la DNAsa y se transfirió el ARN a un nuevo tubo.

Determinación de la concentración y pureza del ARN

El ARN obtenido se cuantificó midiendo la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm utilizando el equipo NanoDrop 1000. Se consideró que 1 unidad de absorbancia (UA) equivale a 40 µg/mL de ARN (Desjardins y Conklin 2010). La pureza se evaluó calculando el cociente Abs_{260}/Abs_{280} , debiéndose descartar las muestras que tuvieran un valor menor a 1.8. Para evaluar la integridad de la muestra se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (100 mV, 30 min) y 1 µL de Bromuro de Etidio para 30 mL de solución de agarosa. La visualización de las bandas se realizó mediante la colocación del gel en un transiluminador UV, debiéndose observar en todas las muestras 2 bandas claras correspondientes al ARN ribosomal 18S y 28S y un "smear" correspondiente al resto de los mensajeros.

Síntesis del ADN copia (ADNc)

Para obtener ADN copia de cada muestra de ARN de buena calidad se siguió el protocolo establecido por Rodrigues Gouveia y cols. (2014) con modificaciones menores. Se tomaron 2 µg de ARN, agua óptima para PCR hasta alcanzar un volumen de 10 µL y 2 µL de *random primers*. Se incubó 5 min a 70°C para permitir que los *primers* se emparejen con la secuencia molde y posteriormente los tubos se colocaron en hielo donde se les agregó 2 µL de buffer de retrotranscriptasa 10x (RETROscript® Kit, Ambion), 4 µL de dNTPs, 1 µL de inhibidor de RNasa y 1 µL de restrotranscriptasa (MMLV-RT). Se dejó actuar la retrotranscriptasa durante 1 h a 42°C y luego se detuvo la reacción a 92°C durante 10 minutos.

Cuantificación relativa por PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real es una variante de la PCR convencional utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación del ADN. Para marcar el producto amplificado y poder detectarlo suelen utilizarse sondas marcadas con fluorescencia o agentes intercalantes fluorescentes (ej. SYBR Green, QuantiNova™ SYBR® Green PCR Kit). SYBR Green es una molécula que cuando se une al ADN de doble hebra es capaz de emitir fluorescencia verde si es excitada a una longitud de onda adecuada, por lo que el equipo utilizado debe ser capaz de detectar la fluorescencia emitida (entre 470-510 nm). Por lo tanto se espera un aumento de la fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN producido en cada ciclo de PCR. La cuantificación es relativa ya que para poder comparar los cambios de expresión de un gen en diferentes muestras, suele utilizarse un gen que permanece inalterado (housekeeping) como gen de referencia. En este caso utilizamos como control endógeno el ARN Codificante para la β-Actina (Kozera y Rapacz 2013; Gopalani y cols. 2017).

Elección y diseño de los cebadores

Los cebadores fueron seleccionados de publicaciones científicas o creados a partir de las secuencias de ADNc para los genes de interés de la especie *Rattus norvegicus*, publicadas en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Para la elección de los cebadores se tomaron en cuenta los siguientes criterios: que el amplicón abarque más de un exón, que el porcentaje de GC sea menor o igual a 50%, que haya ausencia de cuatro o más Gs consecutivas, no poseer en los últimos nucleótidos del extremo 3' más de 2Gs y/o Cs, tener una temperatura de fusión (T_m, del inglés *temperatura of melting*) lo más cercana posible a 58-60°C. Los cebadores fueron analizados utilizando los siguientes recursos web: <https://www.idtdna.com/site/account/login?returnurl=%2Fcalc%2Falyzer%2Fhome%2Fbatch>, y luego fueron comprados y suministrados por Integrated DNA Technologies Inc. La secuencia, T_m y contenido GC para cada par de cebadores, se detalla en la siguiente tabla.

| Cebador | Secuencia 5' – 3' | T _m (°C) | GC(%) | Fuente |
|-----------|--------------------------------|---------------------|-------|-----------------------|
| βAct for | CATGAAGATCCTGACCGAGCGTG | 60 | 57 | Creado |
| βAct rev | TCTGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG | 62 | 58 | Creado |
| Gs for | CCA CTG TCC CTG GGC TTA GTT TA | 59 | 52 | Ishikawa y cols. 2011 |
| Gs rev | AGT GAC ATG CTA GTC CCA CCAA | 58 | 50 | Ishikawa y cols. 2011 |
| GLT-1 for | AGG AGC CAA AGC ACC GAA AC | 59 | 55 | Creado |
| GLT-1 rev | CCC GGG AAG GCT ATC AAC AT | 59 | 55 | Creado |
| S100β for | GCC CTC ATT GAT GTC TTC CATC | 56 | 50 | Creado |
| S100β rev | AAG AAC TCA TGA CAG GCT GTGG | 57 | 50 | Creado |

Amplificación por PCR en tiempo real

En este trabajo se utilizó SYBR GreenPCR Master Mix (Qiagen) que contiene SYBR Green I, nucleótidos trifosfato, $MgCl_2$ y ADN polimerasa (AmpliTaq Gold®). El termociclador utilizado fue el Rotor-Gene 6000 (Corbett Research) donde los volúmenes finales de reacción fueron de 10 μL . Cada muestra se corrió por triplicado sumándose un control negativo. Se agregó a cada tubo 1 μL de ADNc, 0.4 μL de cada uno de los primers, 5 μL del mix y con agua de PCR se completaron los 10 μL . El protocolo de amplificación consta de tres pasos: el primero es la desnaturalización del ADN que se realiza incubando los tubos a 95°C durante 10 min. Este paso además es clave para la activación de la Taq polimerasa, tal como se explicita en la guía de los fabricantes. Luego se realizaron 40 ciclos de dos pasos, uno de desnaturalización del ADN y otro de hibridación de los cebadores con el ADN molde y síntesis de la cadena de ADN a partir de la secuencia del cebador. Dichos pasos se configuraron de la siguiente manera: 10 segundos a 95°C de desnaturalización y luego 30 segundos a 60°C de hibridación y síntesis en donde además se iba midiendo paralelamente la fluorescencia. Una vez concluidos el equipo fue programado para realizar curvas de desnaturalización (curvas de *melting*), partiendo la muestra a 60°C hasta alcanzar los 95°C. De esta forma se mide la fluorescencia relativa en función de la temperatura, información que es de utilidad para chequear si no hubo ningún problema durante el transcurso de la reacción y en casos más aplicados se puede detectar la amplificación de distintos alelos de un mismo gen (Pryor y Witter 2006; Mastuda 2017).

Especificidad del producto de PCR

La temperatura de fusión, temperatura en la que el 50% de las moléculas de ADN doble hebra se encuentran desnaturalizadas (Niimi y cols. 2015), es una propiedad que depende del largo y composición de las hebras de ADN, por lo que es una información útil para saber si estamos ante la presencia del producto específico de nuestra reacción. Además se corroboraron los productos de amplificación mediante una corrida en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio y un marcador de peso molecular de 250 a 1000pb (Fermentas).

Método de cuantificación

La cuantificación relativa de la expresión de un gen en una muestra respecto a la expresión de otra muestra se realizó normalizando los valores respecto a un gen control. Es decir primero se calculó el aumento o disminución de la expresión de nuestro gen respecto al gen de referencia; en este caso nuestro gen de referencia fue la β -Actina (Kozera y Rapacz 2013; Gopalam y cols. 2017) y luego de esta normalización se compararon las distintas muestras respecto a nuestra muestra control. En cada corrida, cada muestra se realizó por duplicado y se realizaron 3 corridas independientes. Los resultados de los distintos experimentos se agruparon utilizando el software GraphPad Prism 6 y se analizaron mediante análisis de la varianza con el modelo de comparaciones múltiples de Tukey. Se consideró diferencia significativa cuando el p valor fue menor al 0.05% con respecto al control.

RESULTADOS

EFFECTOS DE DISTINTOS COMPUESTOS SOBRE CULTIVOS DE ASTROCITOS DE ANIMALES NO TG

Efectos en la sobrevivida y funcionalidad mitocondrial

La **Figura 7** muestra que a las concentraciones empleadas no se produjeron efectos significativos en la sobrevivida de astrocitos obtenidos de animales adultos No Tg. Esta información es importante para buscar efectos selectivos sobre la viabilidad de las AbAs.

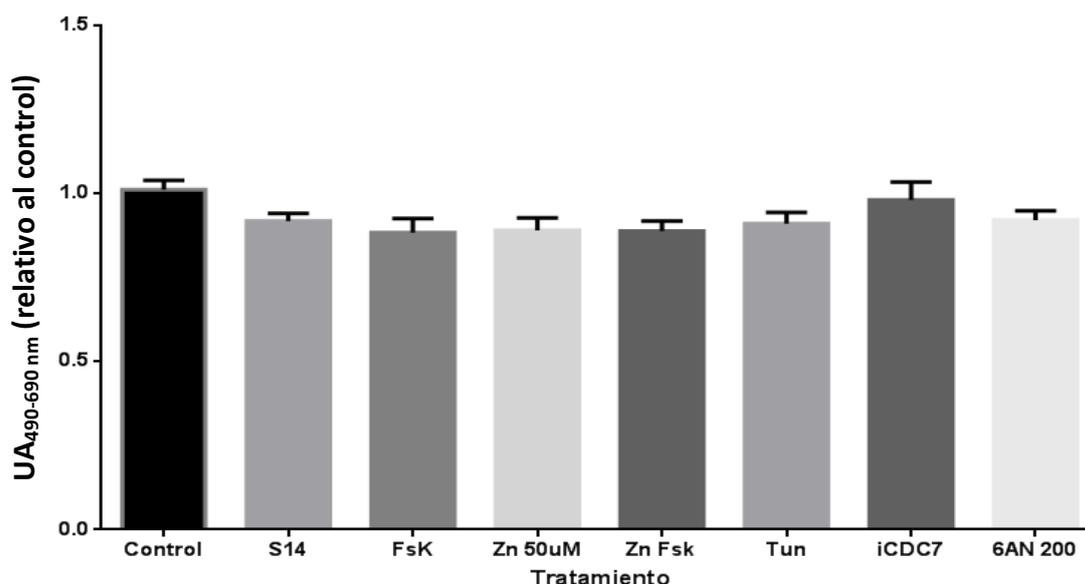


Figura 7: Ensayo de SRB en astrocitos obtenidos de animales No Tg adultos. La gráfica muestra la media \pm SEM de la absorbancia relativa respecto del control de 3 experimentos independientes cada uno realizado por triplicado, donde las células fueron expuestas durante 24 h a los distintos compuestos: S14 30 μ M, Forskolina (Fsk) 10 μ M, Zinc (Zn) 50 μ M, Tunicamicina (Tun) 1 μ M, iCDC7 20 nM y 6-Aminonicotinamida (6AN) 200 μ M.

La disfunción mitocondrial no es una condición que afecte directamente la sobrevivida de los astrocitos (Dienel y Hertz 2005) aunque distorsiona significativamente el aporte anaplerótico a las neuronas (Cassina y cols. 2008; Maragakis y Rothstein 2006; Verkhatsky y cols. 2018) y la señalización astrocitaria (Rose y cols. 2017). Dado que en condiciones de daño, el aporte anaplerótico y la señalización de los astrocitos es crucial para reparar el SNC y restaurar la homeostasis, hemos analizado si los compuestos evaluados afectan la funcionalidad mitocondrial de los astrocitos de animales No Tg. El abordaje empleado ha sido el ensayo de reducción de MTT que evalúa fundamentalmente la actividad succinato-deshidrogenasa mitocondrial (Olivera y cols. 2008). La **Figura 8** muestra que la incubación con los compuestos evaluados inicialmente no afectó la actividad succinato-deshidrogenasa mitocondrial en astrocitos No Tg.

Efectos en la expresión de marcadores de estirpe, estrés de RE y fosfoCREB

S100 β es una proteína de unión a calcio que ejerce funciones intracelulares y extracelulares que regulan el metabolismo energético, la homeostasis del calcio, el recambio y activación de proteínas, la proliferación y la diferenciación celular (Donato y cols. 2009).

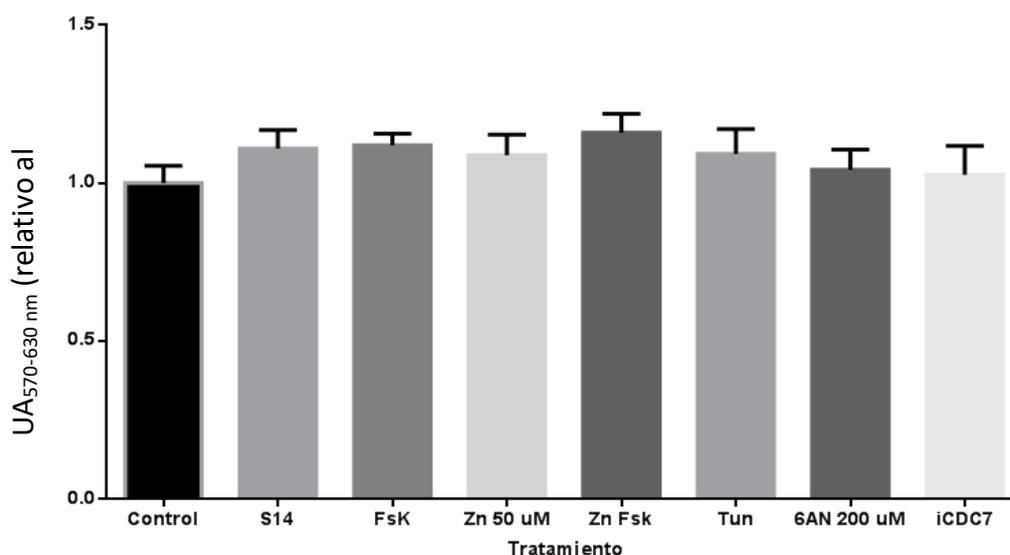


Figura 8: Funcionalidad mitocondrial en astrocitos obtenidos de animales No Tg luego de ser incubados por 24 h con los compuestos previamente seleccionados a las mismas concentraciones que las empleadas en la Figura. 7. La gráfica muestra la media \pm SEM de la absorbancia relativa respecto del control medida a 570 nm de 2 experimentos independientes realizados por triplicado.

Esta proteína también participa en el inicio y modulación de la reactividad astrocitaria y muestra cambios en sus niveles de expresión entre los astrocitos obtenidos de animales No Tg y Tg (Díaz-Amarilla y cols. 2011; Olivera-Bravo y cols. 2008; 2011; 2014), por lo que parece ser un buen indicador del estado metabólico de los astrocitos obtenidos de diferentes backgrounds genéticos y distintas edades.

Además hemos evaluado posibles cambios en la señal celular de la proteína GRP78/BiP, ya que se considera un marcador temprano de estrés de retículo endoplasmático además de ser un efector de este proceso (Valenzuela y cols. 2014). La **figura 9** muestra que la inmunofluorescencia para S100 β tiene a aumentar en los cultivos de animales adultos respecto de neonatos pero no muestra cambios entre pasajes. En condiciones basales la señal de BiP es bastante estable, pese a que en los astrocitos de animales adultos la señal muestra mayor heterogeneidad entre las células.

La activación del elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB) mediante fosforilación está implicada en varias vías asociadas a neuroprotección (Sakamoto y cols. 2011). Por ello, es de interés analizar si el tratamiento con algunos compuestos analizados es capaz de activar este factor, dado que es una condición necesaria para que se produzcan las cascadas corriente abajo involucradas con la neuroprotección. La **figura 10** muestra que dos de los compuestos analizados no tienen influencia sobre los niveles de BiP y fosfoCREB en cultivos de astrocitos de animales No Tg adultos a pasaje 4.

Efectos sobre el citoesqueleto de actina

Las respuestas astrocitarias generalmente se acompañan o evidencian por cambios morfológicos significativos tanto in vitro como in vivo (Sofroniew y Vinters 2010, Pekny y cols. 2014). Estas células tienen un citoesqueleto de actina poderoso, el que en condiciones basales se caracteriza por presentar fibras de estrés que son largas y prominentes y que en respuesta a cambios asociados a proliferación, metabolismo o señalización, se discontinúan o complejizan (Maneshi y cols. 2018). La **figura 11** muestra como el citoesqueleto de actina de los astrocitos obtenidos de animales No Tg adultos es altamente modificable frente a distintos compuestos analizados, siendo la Tunicamicina la que parece presentar efectos mayores.

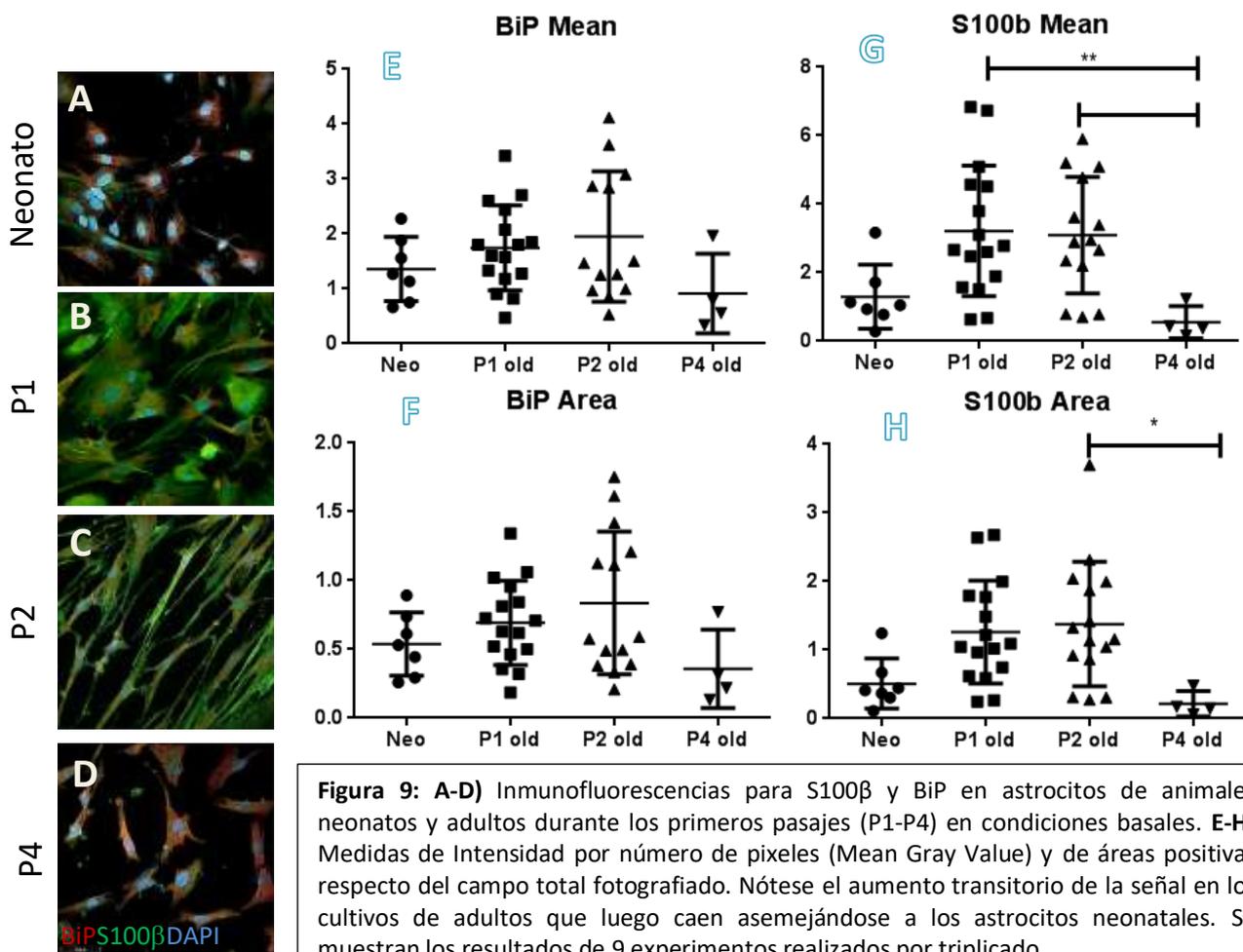


Figura 9: A-D) Inmunofluorescencias para S100 β y BiP en astrocitos de animales neonatos y adultos durante los primeros pasajes (P1-P4) en condiciones basales. E-H) Medidas de Intensidad por número de píxeles (Mean Gray Value) y de áreas positivas respecto del campo total fotografiado. Nótese el aumento transitorio de la señal en los cultivos de adultos que luego caen asemejándose a los astrocitos neonatales. Se muestran los resultados de 9 experimentos realizados por triplicado.

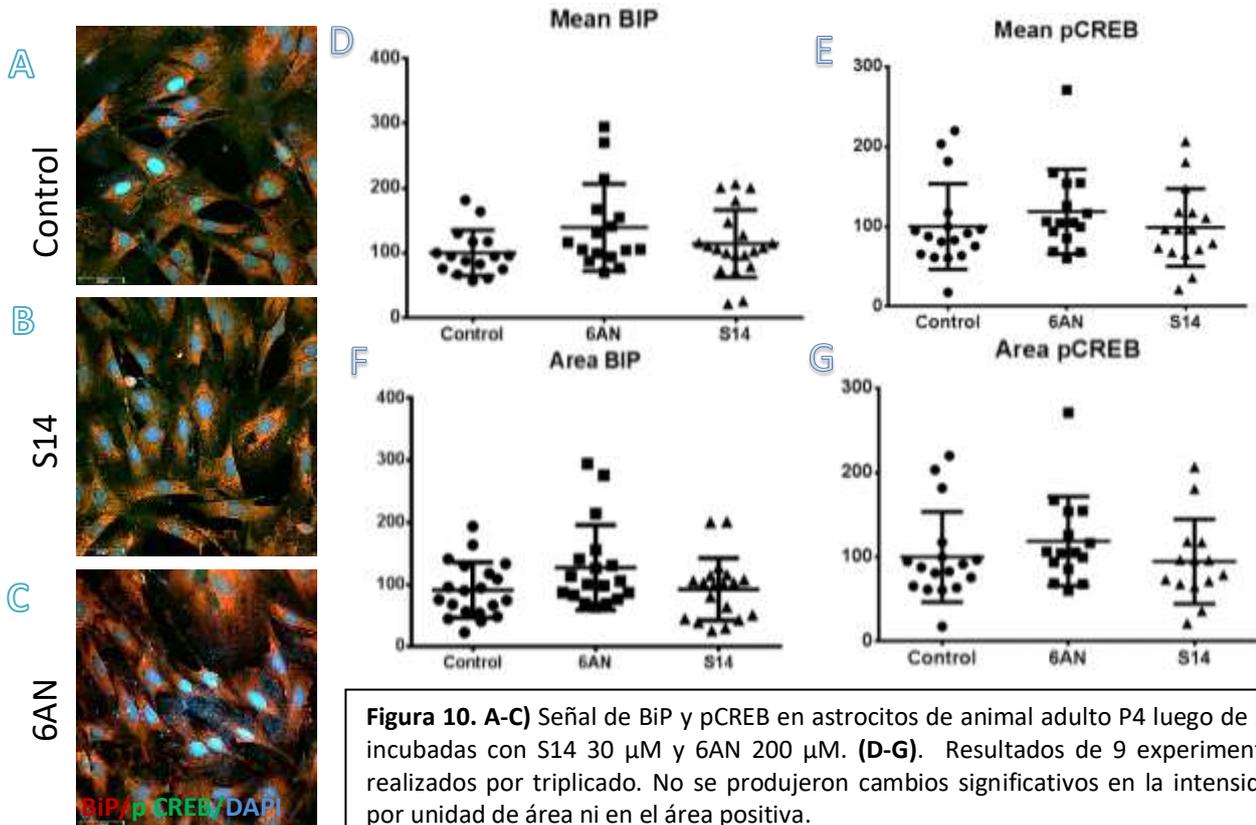


Figura 10. A-C) Señal de BiP y pCREB en astrocitos de animal adulto P4 luego de ser incubadas con S14 30 μ M y 6AN 200 μ M. (D-G). Resultados de 9 experimentos realizados por triplicado. No se produjeron cambios significativos en la intensidad por unidad de área ni en el área positiva.

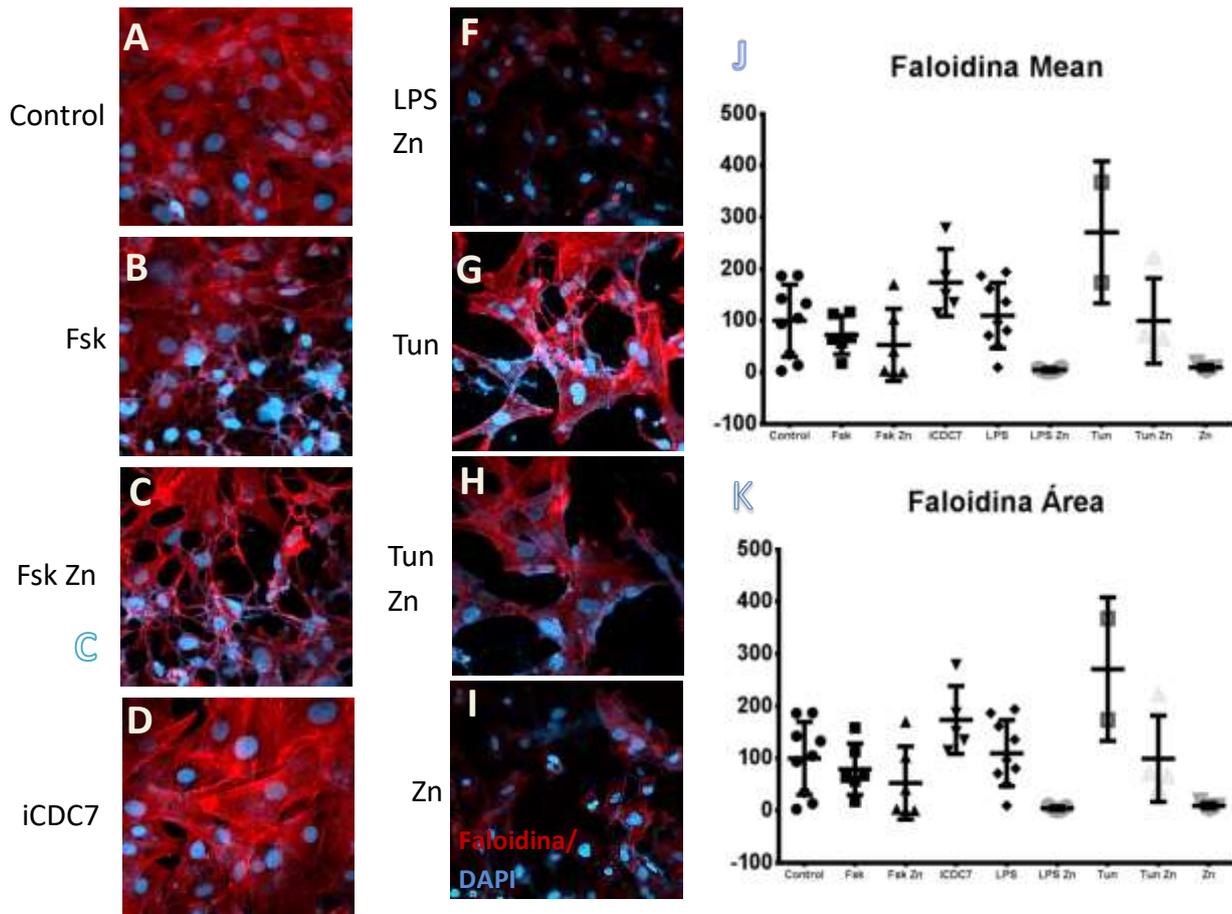


Figura 11: Respuesta del citoesqueleto de actina a los distintos tratamientos. La sonda faloidina-rodamina evidencia cambios en la forma y/o en la intensidad de la señal en B, C, F e I que se confirman en las gráficas que muestran los resultados de 4-9 experimentos independientes realizados por triplicado. Las concentraciones empleadas fueron: Fsk: 10 μ M, Fsk Zinc: Fsk 10 μ M+Zn 50 μ M, iCDC7: 20 nM, LPS: 1 μ g/mL, LPS+Zn: LPS 1 μ g/mL+Zn 50 μ M, Tun: 1 μ M, TunZn: 1 μ M Tun+50 μ M, Zn: 50 μ M.

El conjunto de los resultados presentados hasta el momento, muestra que los compuestos empleados, a las concentraciones y los tiempos de tratamientos realizados, no produjeron efectos negativos en la sobrevivencia, función mitocondrial y citoesqueleto de actina sobre los cultivos de astrocitos provenientes de animales No Tg.

COMPARACIÓN INICIAL DE LAS ABAS DE BAJO Y ALTO PASAJE

Dado que las AbAs son un fenotipo astrocitario que parece emerger de acuerdo a la progresión de la enfermedad y que no sufren senescencia replicativa (Díaz-Amarilla y cols. 2011), analizamos si los bajos y altos pasajes son comparables en cuanto a algunos marcadores típicos de astrocitos. La morfología de las AbAs en los cultivos de bajo pasaje y alto pasaje se conserva, mientras que el análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de S100 β , GLT-1 y glutamina sintasa (GS) indica que los dos disminuyen cuando se comparan bajos pasajes con altos pasajes, mientras que no hubo cambios significativos en GS. Dado que eventualmente estos cambios podrían producirse a lo largo de la enfermedad, preferimos realizar los análisis

en ambas condiciones para buscar compuestos que tengan acción sobre las mismas para que eventualmente pudieran aplicarse en el transcurso de la enfermedad en caso de corresponderse los cambios in vitro e in vivo (Figura 12).

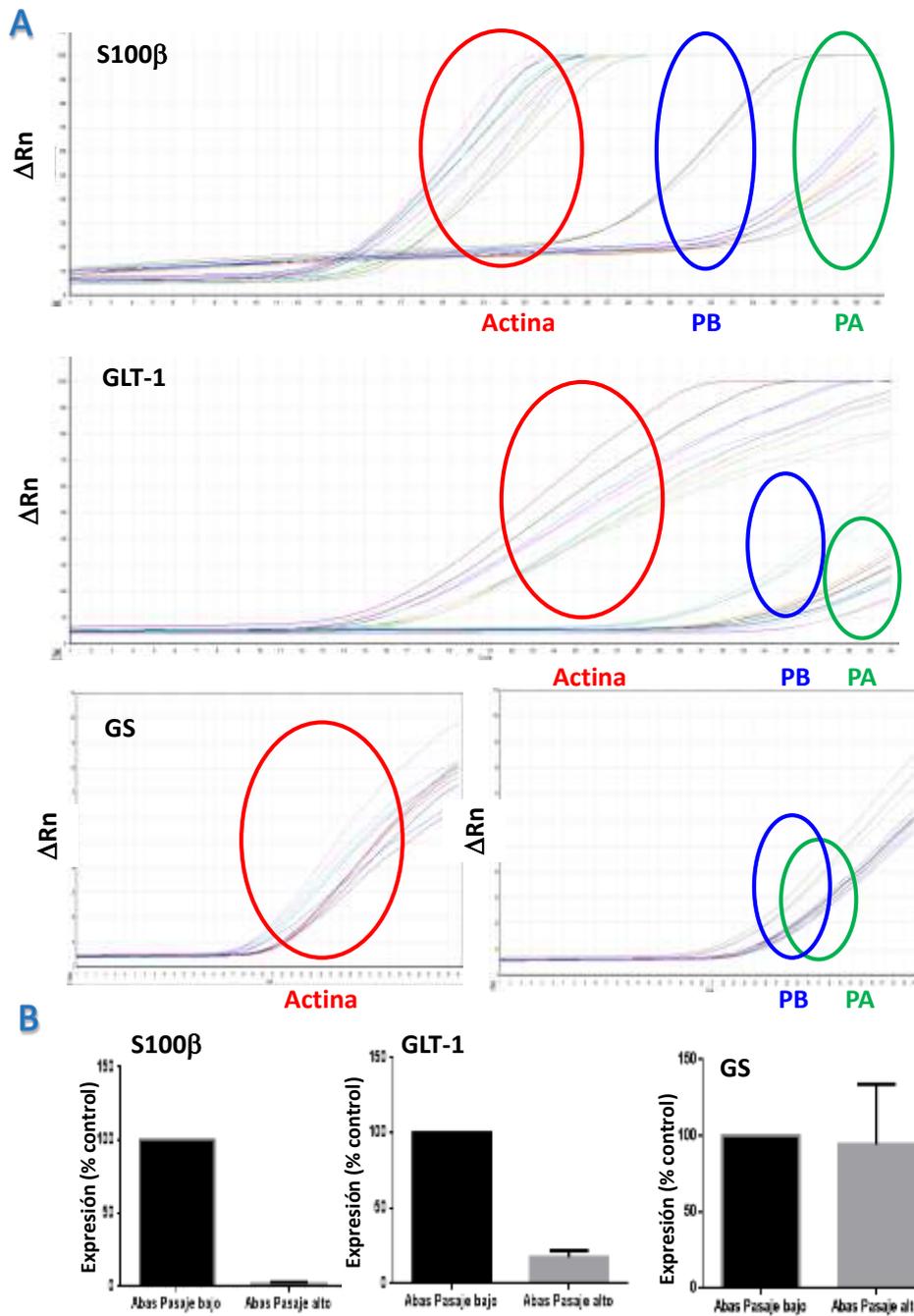


Figura 12: Expresión génica de AbAs de bajos y altos pasajes. A) Los diagramas muestran el producto de amplificación en tiempo real en función del número de ciclos, mostrando que para S100 β y GLT-1 el nivel de fluorescencia aumenta en ciclos mayores que a bajos pasajes y que dicho cambio no se observa para GS. **B)** Las gráficas muestran los niveles de expresión detectados con SYBR Green y normalizados a los transcritos de actina. Se representa la media \pm SD de 3 experimentos independientes.

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE DIVEROS COMPUESTOS SOBRE ABAS Y CÉLULAS C6

Efectos en la sobrevivida

Las Figuras 13 y 14 muestran los efectos de algunos de los compuestos evaluados en la sobrevivida de células AbAs de bajos y altos pasajes evaluados por SRB. Mientras que las células AbAs de bajo pasaje (Figura 13) presentaron una disminución significativa del orden del 10% luego de 24 h de tratamiento con Forskolina-Zinc (10 y 50 μ M respectivamente) y con 6AN 30 μ M pero no a concentraciones mayores. Los mismos tratamientos (Figura 14) no afectaron a las células AbAs de alto pasaje lo que podría indicar una acción selectiva solo en determinadas condiciones iniciales del cultivo.

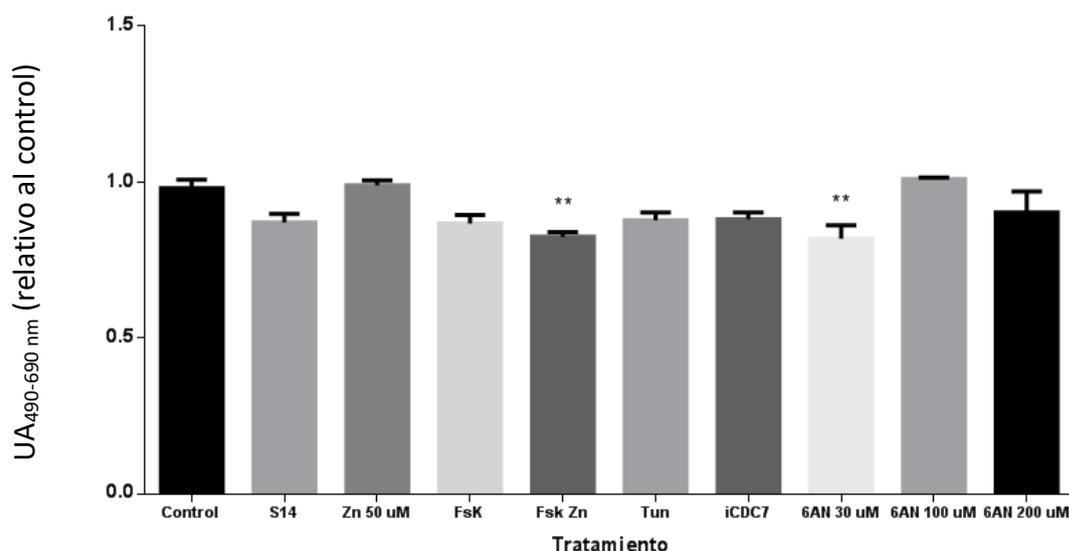


Figura 13: Sobrevivida de AbAs de bajo pasaje luego de ser incubados 24 h con los compuestos analizados determinada por SFRB. Se muestra la media \pm SEM de 3 experimentos cada condición por triplicado. Dos condiciones mostraron efectos significativos para $p < 0.05$ (**). Las concentraciones usadas fueron: S14 30 μ M, Zn 50 μ M, Fsk 10 μ M, Fsk 10 μ M y Zn 50 μ M, Tun 1 μ M, iCDC7 20 nM y 6AN 30, 100 y 200 μ M.

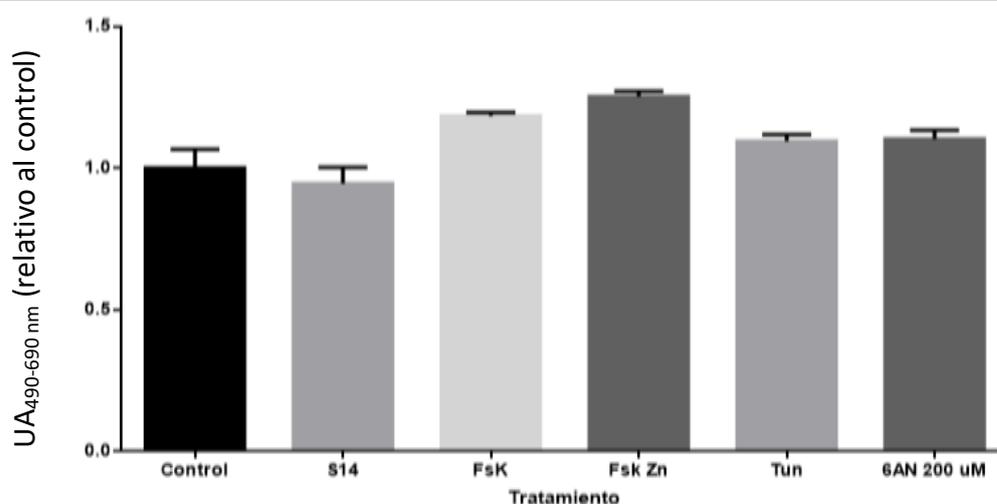


Figura 14: Ensayo de SFRB para determinar la sobrevivida de cultivos de AbAs de alto pasaje luego de ser incubados 24 h con los compuestos seleccionados. La gráfica muestra la media \pm SEM de la absorbancia relativa respecto del control, indicando la ausencia de efectos significativos en las condiciones experimentales. Los valores obtenidos son de 5 experimentos independientes realizados por quintuplicado. Las concentraciones usadas fueron: S14 30 μ M, Fsk 10 μ M, Fsk 10 μ M + Zn 50 μ M, Tun 1 μ M y 6AN 200 μ M.

En cuanto a la sobrevida de las AbAs obtenidas de animales Tg homocigotos de bajo pasaje (**Figura 15**), solo el tratamiento Forskolina-Zinc produjo una disminución de la sobrevida de aproximadamente el 20%, lo que indica un comportamiento similar a las células de bajos pasajes obtenidas de animales heterocigotos. Este resultado parece indicar que la presencia de un número de copias del transgén en los dos alelos no influye en la sensibilidad de estas células a los compuestos seleccionados. Tal como ha sido reportado en la literatura (Ho y Ames 2002, las células C6 mostraron gran susceptibilidad al tratamiento con Zinc y Zinc-Forskolina afectando la sobrevida en ~ 50%, mientras que los tratamientos con Forskolina y tunicamicina solas produjeron efectos significativos del orden del 25 y 20% respectivamente (**Figura 16**).

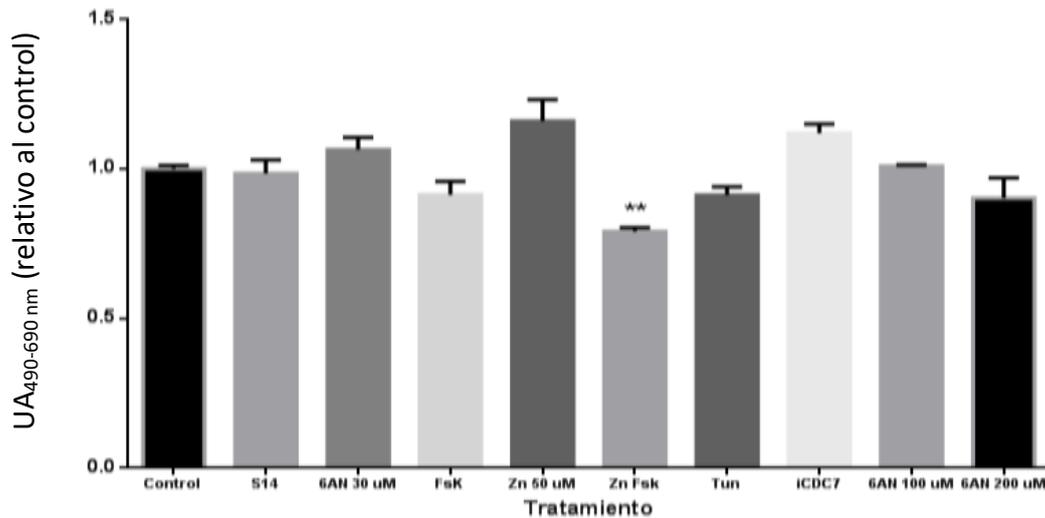


Figura 15: Absorbancia de SFRB en AbAs homocigotas luego de ser incubadas 24 h con los compuestos seleccionados determinadas mediante SFRB. La gráfica muestra la media \pm SEM de la absorbancia relativa respecto del control, de 3 experimentos independientes cada uno realizado por triplicado. Las concentraciones usadas fueron: S14 30 μ M, Fsk 10 μ M, Zn 50 μ M, Fsk 10 μ M + Zn 50 μ M, Tun 1 μ M, iCDC7 20 nM y 6AN 30, 100 y 200 μ M.

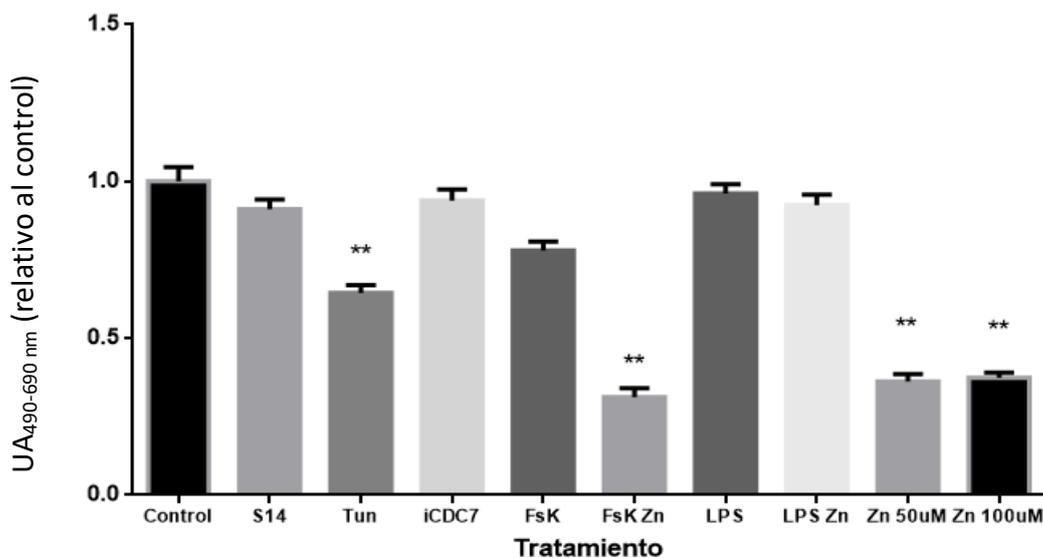


Figura 16: Determinación de sobrevida mediante SFRB en células C6 luego de ser incubados 24 h con los compuestos seleccionados. La gráfica muestra la media \pm SEM de la absorbancia relativa respecto del control de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, donde cuatro condiciones mostraron efectos significativos para $p < 0.05$. Las concentraciones usadas fueron: S14 30 μ M, Tun 1 μ M, iCDC7 20 nM, Fsk 10 μ M, Fsk 10 μ M+Zn 50 μ M, LPS 1 μ g/mL, LPS 1 μ g/mL+Zn 50 μ M y Zn 50 o 100 μ M. $p < 0.05$.

Efectos en la funcionalidad mitocondrial

Como se dijo anteriormente, la disfunción mitocondrial en astrocitos no afecta su sobrevivencia (Cassina y cols. 2008; Bélanger y cols. 2011) aunque altera significativamente el aporte anaplerótico a las neuronas (Maragakis & Rothstein 2006; Verkhatsky y cols. 2018). Se ha propuesto que los astrocitos (Cassina y cols. 2008), al igual que las células tumorales presentan el efecto Warburg, es decir la mayor parte de la energía es producida por glicólisis citosólica seguida de fermentación láctica (Liberti y Locasale 2016). Las AbAs presentan depolarización mitocondrial y una baja tasa de respiración respecto de los astrocitos de animales Tg y No Tg (Cassina y cols. 2008), por lo que afectar aún más la funcionalidad mitocondrial de estas células podría ser una alternativa específica para modular su número dadas sus alteraciones mitocondriales funcionales (Cassina y cols. 2008; Miquel y cols. 2014), morfológicas y ultraestructurales (Jiménez-Riani y cols. 2017).

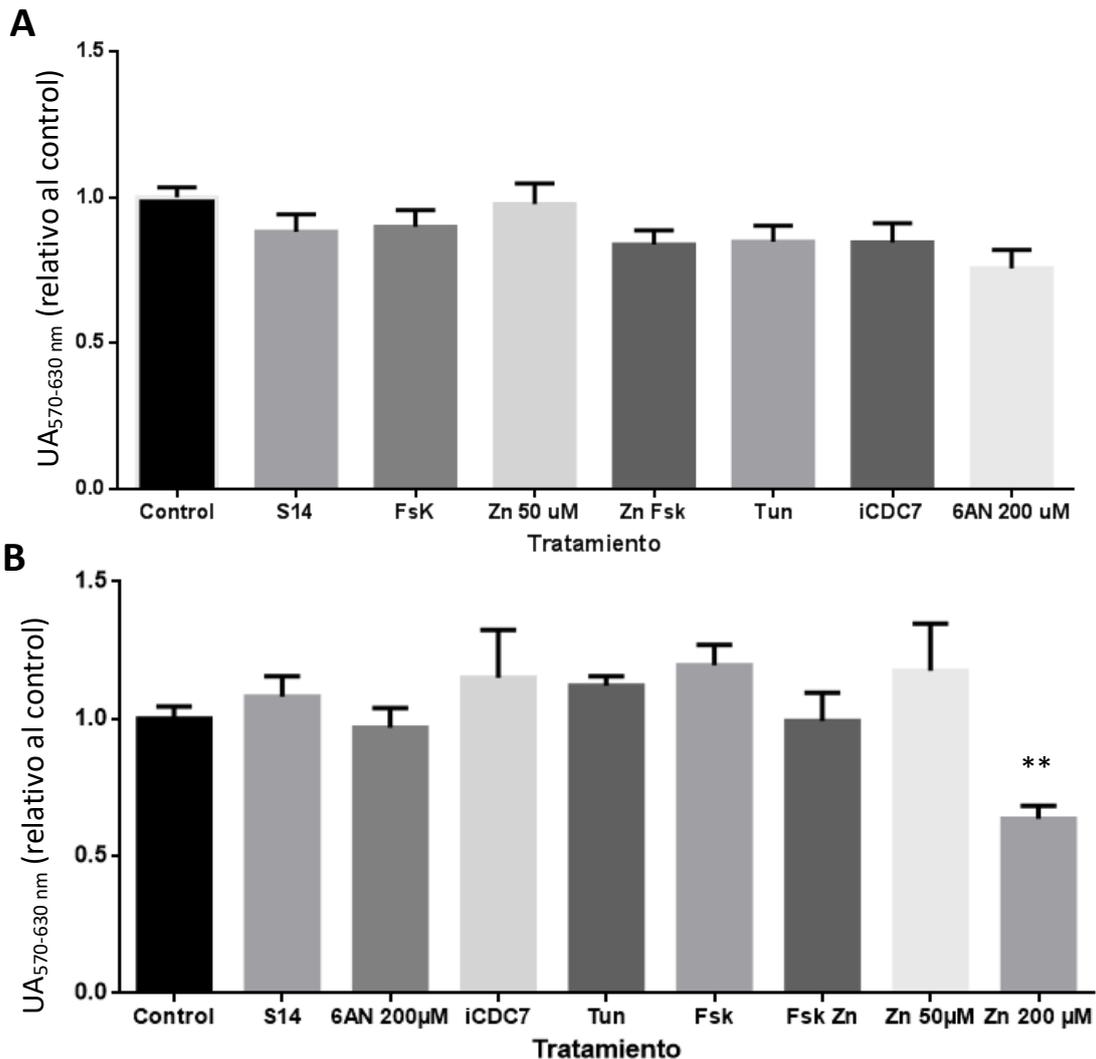


Figura 17: Funcionalidad mitocondrial evaluada por MTT en AbAs de bajo pasaje (A) y alto pasaje (B) luego de ser incubadas 24 h con los compuestos estudiados. Media \pm SEM de la absorbancia relativa producida por oxidación de MTT medida en 3 experimentos independientes realizados por septuplicado. Las concentraciones usadas fueron: S14 30 μ M, Fsk 10 μ M, Zn 50 o 200 μ M, Fsk 10 μ M+Zn 50 μ M. Tun 1 μ M. iCDC7 20 nM. 6AN 200 μ M.

Las AbAs de bajo pasaje no mostraron cambios a nivel del metabolismo mitocondrial (**Figura 17A**), indicando que a las concentraciones usadas, ningún compuesto fue capaz de modular el metabolismo oxidativo de estas células. Por otra parte, los ensayos realizados con Abas de alto pasaje (**Figura 17B**), muestran que no hay cambios significativos en la funcionalidad mitocondrial salvo en el tratamiento con Zinc a muy altas concentraciones (200 μM) donde es probable que el número de células esté altamente disminuido. El tratamiento de AbAs+/+ con los compuestos evaluados mostró una disminución significativa en la funcionalidad mitocondrial principalmente frente a S14 y Zinc (**Figura 18**). Una disminución menor, aunque significativa también fue observada frente a Tunicamicina (Tun). Este resultado comparado con los anteriores, muestra que la influencia de la carga de SOD1 en la sensibilidad a los compuestos empleados es relativamente pequeña.

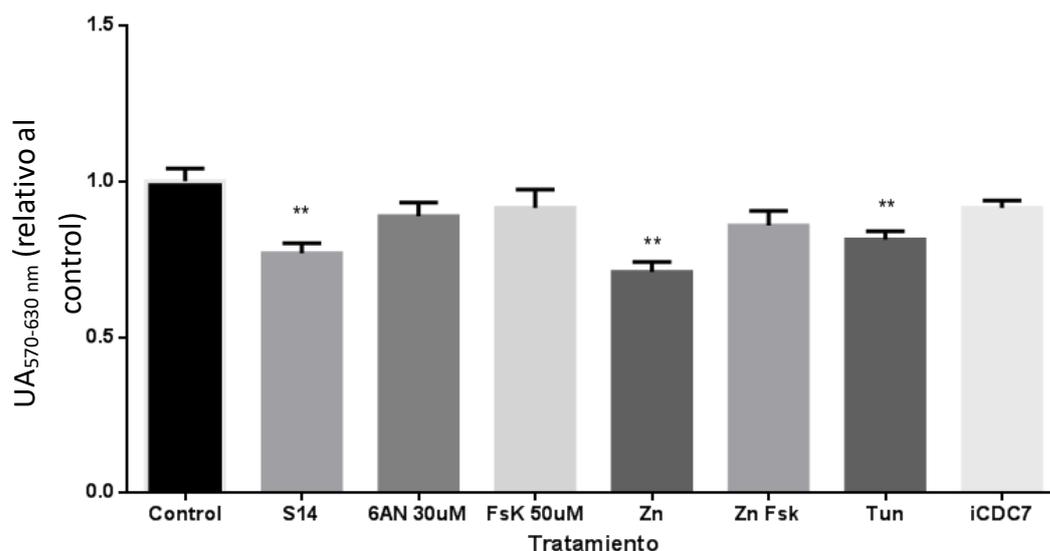


Figura 18: Funcionalidad mitocondrial en Abas homocigotas para hSODG93A luego de los tratamientos de 24 h. Media \pm SEM de la absorbancia relativa respecto del control medida a 570 nm de 4 experimentos independientes realizado por quintuplicado. Tres condiciones mostraron efectos significativos para $p < 0.05$. Las concentraciones usadas fueron: S14 30 μM , 6AN 30 μM , Fsk 10 μM , Zn 50 μM , Fsk 10 μM + Zn 50 μM , Tun μM y iCDC7 20 nM.

Efectos en la expresión de marcadores de estirpe, ER estrés y fosfoCREB

Efectos de S14, S14/LPS y 6AN

Se evaluaron los mismos marcadores que en astrocitos provenientes de animales No Tg, profundizándose algunos tratamientos en busca de confirmar resultados o tendencias. En principio los compuestos iniciales empleados fueron 6AN y S14 intentando conocer si la modulación hacia el metabolismo oxidativo por bloqueo de la ruta de las pentosas fosfato o aumentando los niveles de AMPc (Gascón y cols. 2017; Sapio y cols. 2017) podrían influenciar la expresión de marcadores de AbAs. La **Figura 19** muestra que ni 6AN ni S14 produjeron efectos significativos sobre la señal de S100 β o ATF6 α , otro marcador de estrés de retículo endoplasmático, mostrando que a bajos pasajes, las AbAs parecen tener un fenotipo bastante refractario a la modulación.

Dado que el tratamiento con S14 a las concentraciones sugeridas por la Dra. Ana Martínez, no tuvo efectos en la sobrevivencia ni en la expresión de los marcadores analizados, optamos por incubar las células con S14 durante mayor tiempo y en co-incubación con LPS, para atacar a dichas células mediante mecanismos diferentes. La **Figura 20**, que es complementaria de la **Figura 19**, confirma que no hay cambios en el marcador de estrés de RE

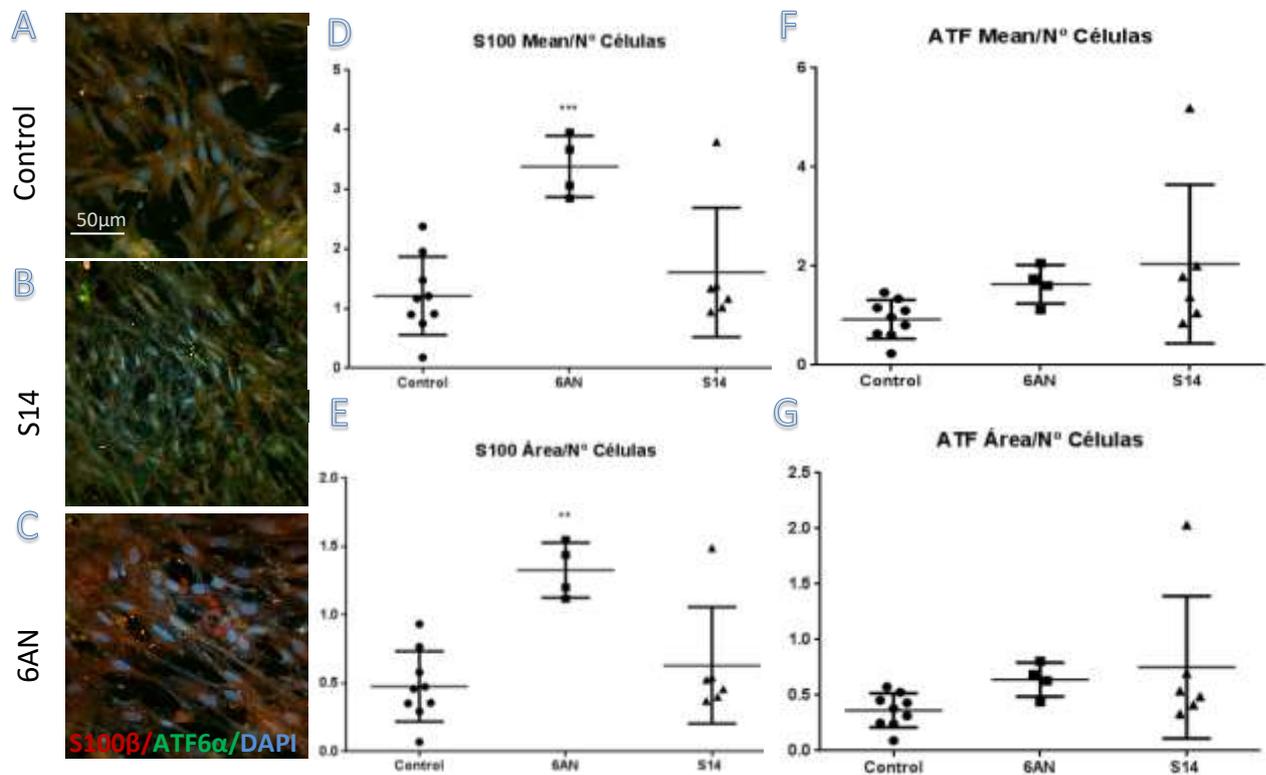


Figura 19: A-C) Señales de S100 β y ATF6 α en AbAs de bajo pasaje controles o tratadas con 200 μ M de 6AN o 30 μ M de S14 durante 24 h. D-G) Intensidad de señal por unidad de área y área positiva. 6AN aumenta ambos parámetros de S100 β . Se grafican los valores de 3 experimentos independientes realizados por quintuplicado.

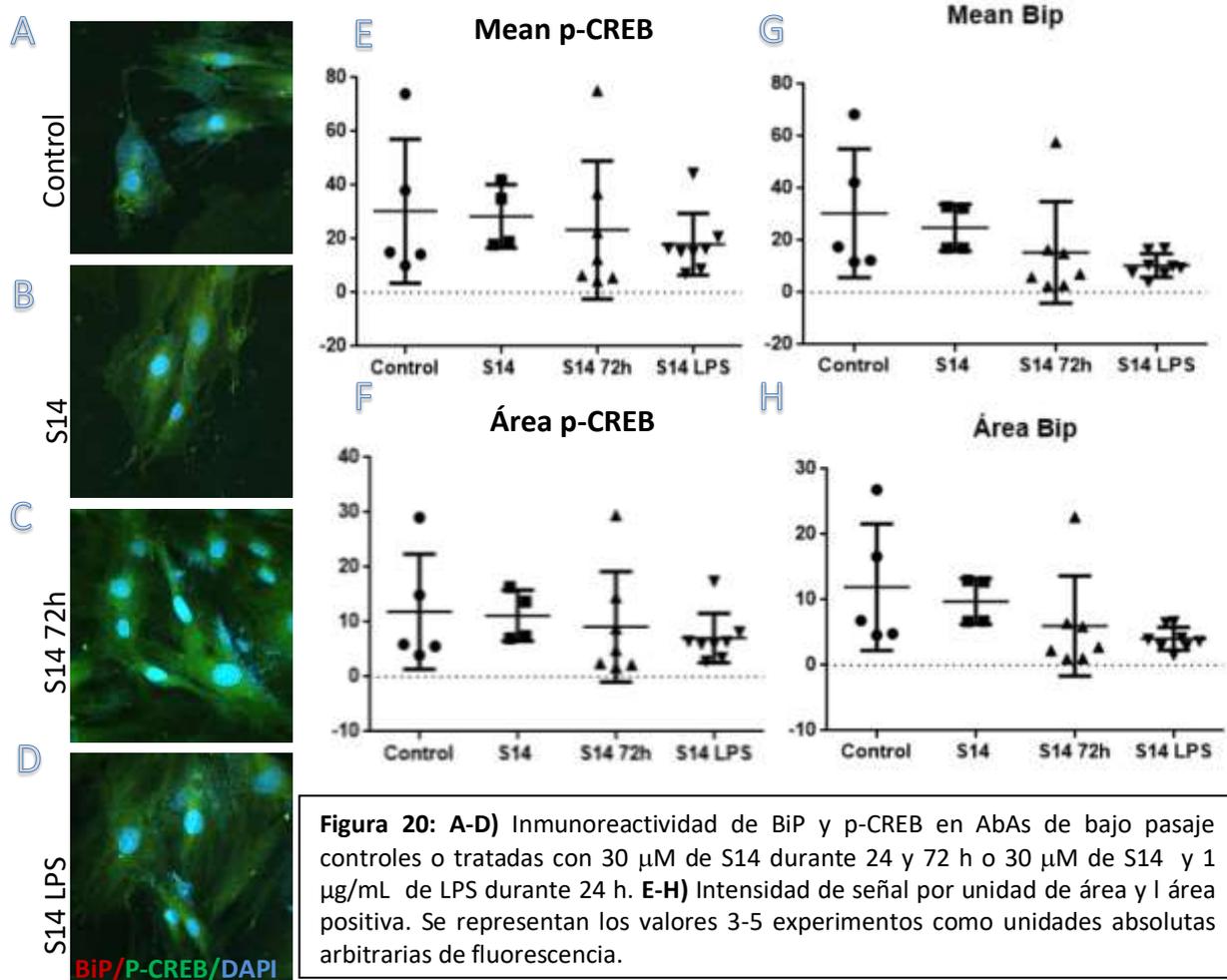


Figura 20: A-D) Inmunoreactividad de BiP y p-CREB en AbAs de bajo pasaje controles o tratadas con 30 μ M de S14 durante 24 y 72 h o 30 μ M de S14 y 1 μ g/mL de LPS durante 24 h. E-H) Intensidad de señal por unidad de área y área positiva. Se representan los valores 3-5 experimentos como unidades absolutas arbitrarias de fluorescencia.

BiP y que contrariamente a lo esperado, hay una tendencia a la baja en la señal en presencia de S14-LPS. Tampoco hubo disminución significativa de pCREB.

EFFECTOS DE LA VIOLACEÍNA EN FUNCIÓN DEL TIPO DE CULTIVO

Dado que interpretamos que algunas características de las AbAs (alta tasa de proliferación, ausencia de senescencia replicativa, depolarización mitocondrial, Díaz-Amarilla y cols. 2011; Miquel y cols. 2014; Jiménez-Riani y cols. 2017), parecen ser compartidas con las células tumorales y que el Masitinib, un compuesto con acción antitumoral ha mostrado ser neuroprotector en modelos experimentales de ELA (Trías y cols. 2016), hemos planteado estudiar los efectos de Violaceína en estos tipos celulares ya que este compuesto presenta actividad antitumoral para varios tipos de cáncer (Bromberg y cols. 2010, Masuelli y cols. 2015; Mehta y cols. 2015). En la **figura 21** se muestra que las células obtenidas de animales No Tg adultos presentaron una tendencia a la disminución de la sobrevida a partir de los tratamientos con 250 nM de Violaceína. Este dato debe ser tenido en cuenta a la hora de plantear un posible uso terapéutico de este compuesto ya que es una concentración menor a las reportadas como afectando la viabilidad de células tumorales (en el rango y mayor a 500 nM, Bromberg y cols. 2010). Además, este resultado era clave dado que debíamos corroborar ausencia de muerte en las células consideradas normales que son responsables de mantener la homeostasis del SNC (Maragakis y Rothstein 2006; Sofroniew y Vinters 2017; Verkrhatsky y cols. 2018). Por esta razón, se emplearon astrocitos obtenidos de animales No Tg adultos, porque constituyen un control respecto de las AbAs, ya que buscamos resultados selectivos sobre las mismas.

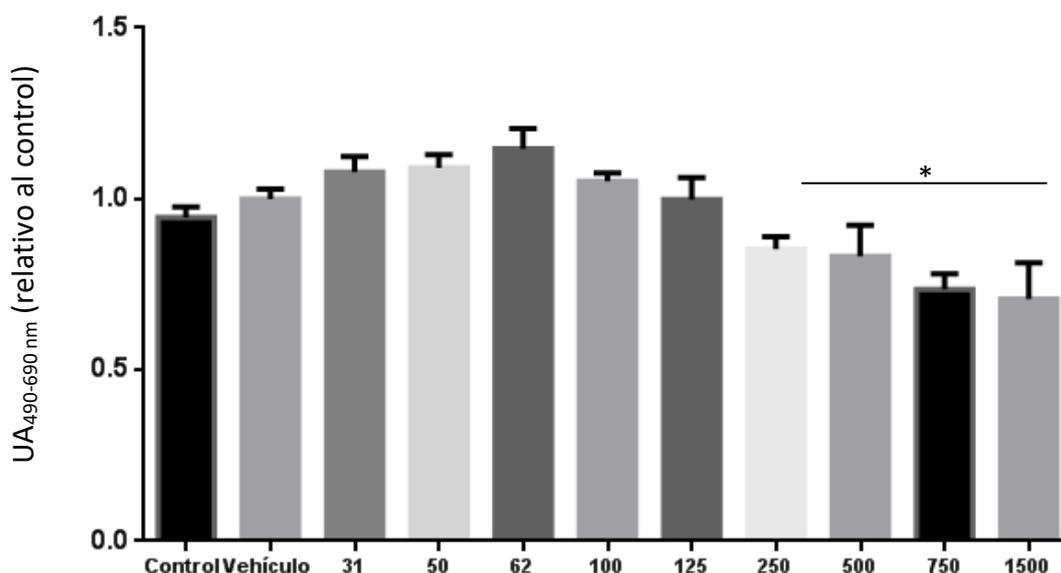


Figura 21: Sobrevida de astrocitos de ratas adultas No Tg incubados 24 h con distintas concentraciones de Violaceína. La gráfica muestra la media \pm SEM de la absorbancia relativa respecto del control, medida a 490 nm respecto a 690 nm, de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. Todos los valores de concentración se expresan en nM. *: $p < 0.05$

En la **Figura 22** se observa que la Violaceína tiende a disminuir la sobrevida de las AbAs de bajo y alto pasaje en función de la concentración. Si bien los resultados mostrados son

mayores en las células de alto pasaje; la tendencia observada es la misma y los efectos se vuelven significativos a partir de 62 nM. Lo que estaría apoyando la idea de poder contar con una ventana terapéutica en la que solo podría afectarse la sobrevivencia de células con fenotipo aberrante ya que a 250 nM que es la concentración a partir de las cuales comienzan a observarse efectos en astrocitos de animales No Tg.

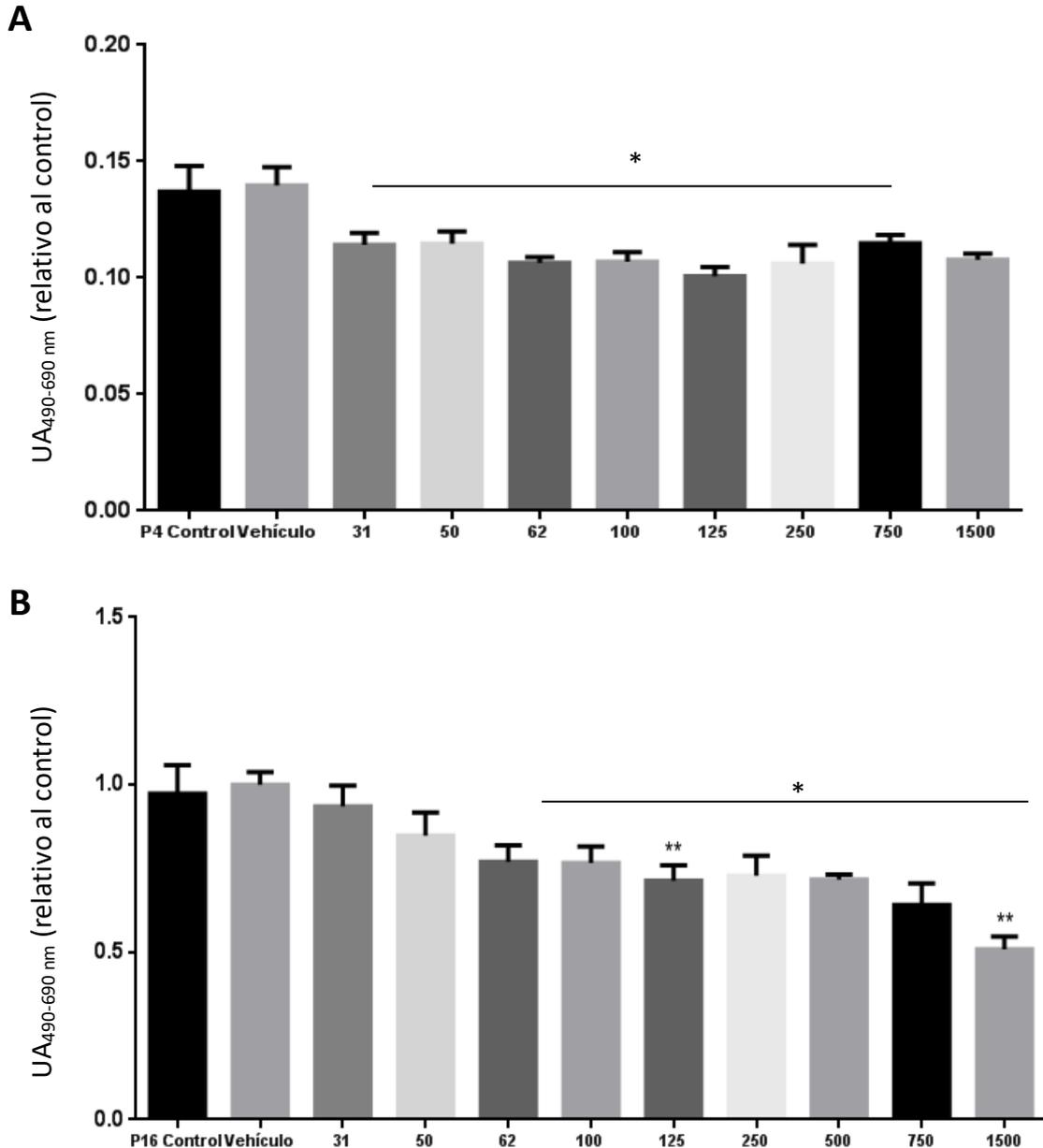


Figura 22: Sobrevivencia de Abas de bajo (A) y alto pasaje (B) luego de ser incubados 24 h con distintas concentraciones de Violaceína. Se muestra la media \pm SEM de la absorbancia relativa respecto del control, de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. Los valores de concentración de Violaceína están expresados en nano Molar (nM). Tomando en cuenta ambas gráficas, los efectos sobre la viabilidad se observan a concentraciones de 62 nM y mayores. *: $p < 0.05$.

Finalmente, para corroborar que la Violaceína purificada que empleamos tiene efectos en la sobrevivencia de células tumorales, expusimos cultivos confluentes de células C6 a las mismas concentraciones de Violaceína empleadas. Se observó que la Violaceína no tiene sobre las células C6 de glioma de rata efectos significativos a las concentraciones que tiene afectan la sobrevivencia de las AbAs. La disminución en la sobrevivencia se observó a una concentración de Violaceína de 1500 nM (**Figura 23**), lo que se encuentra en el rango de concentración reportada con efectos sobre diversos tumores (Bromberg y cols. 2010; Mehta y cols. 2015).

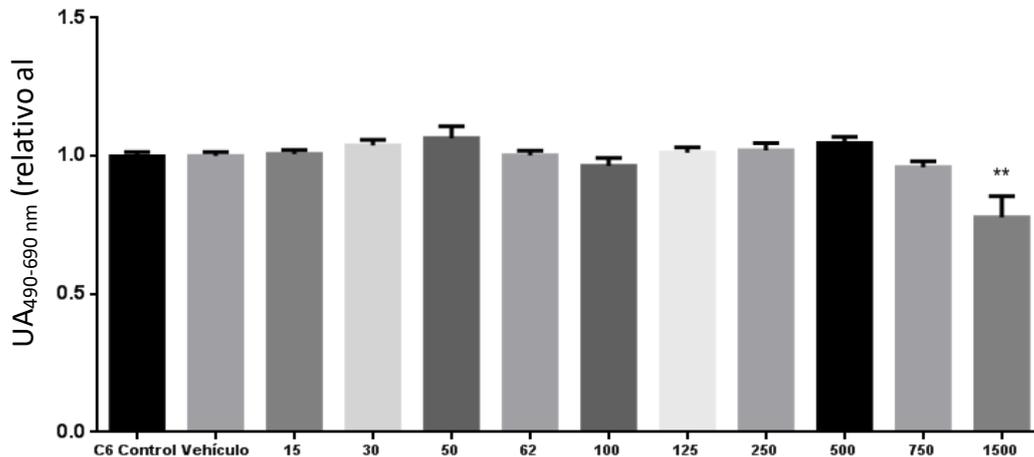
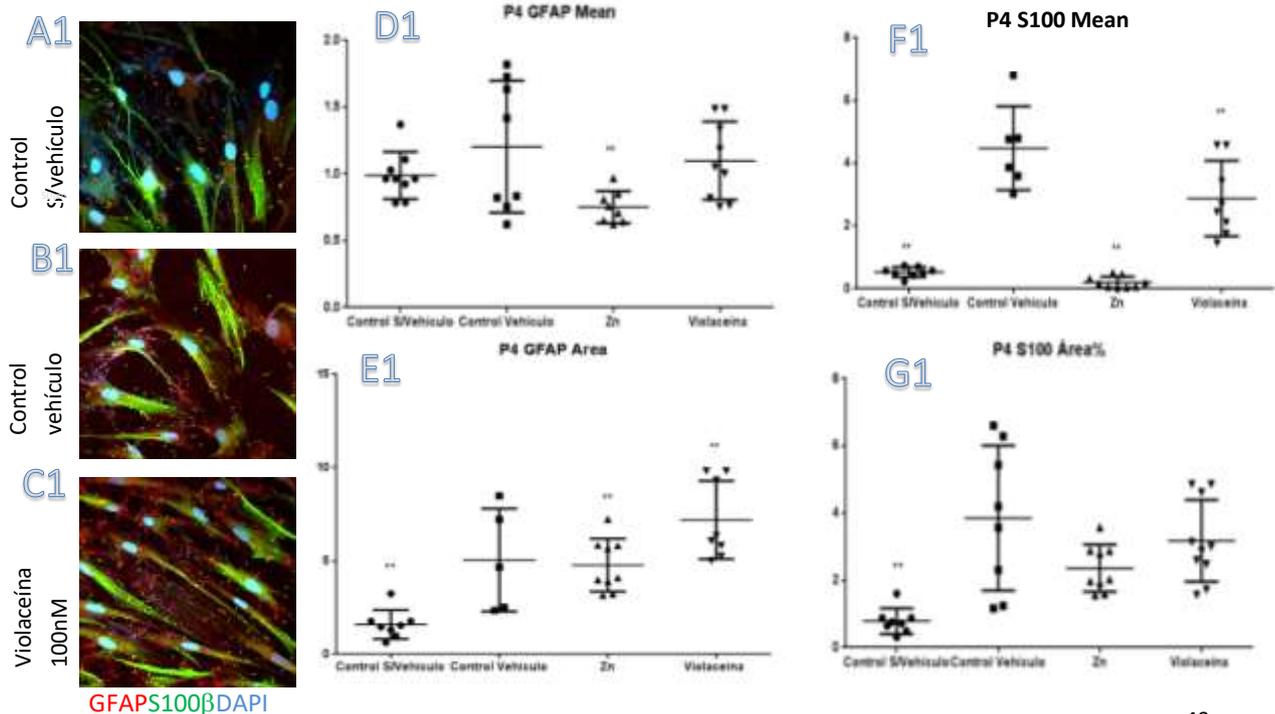
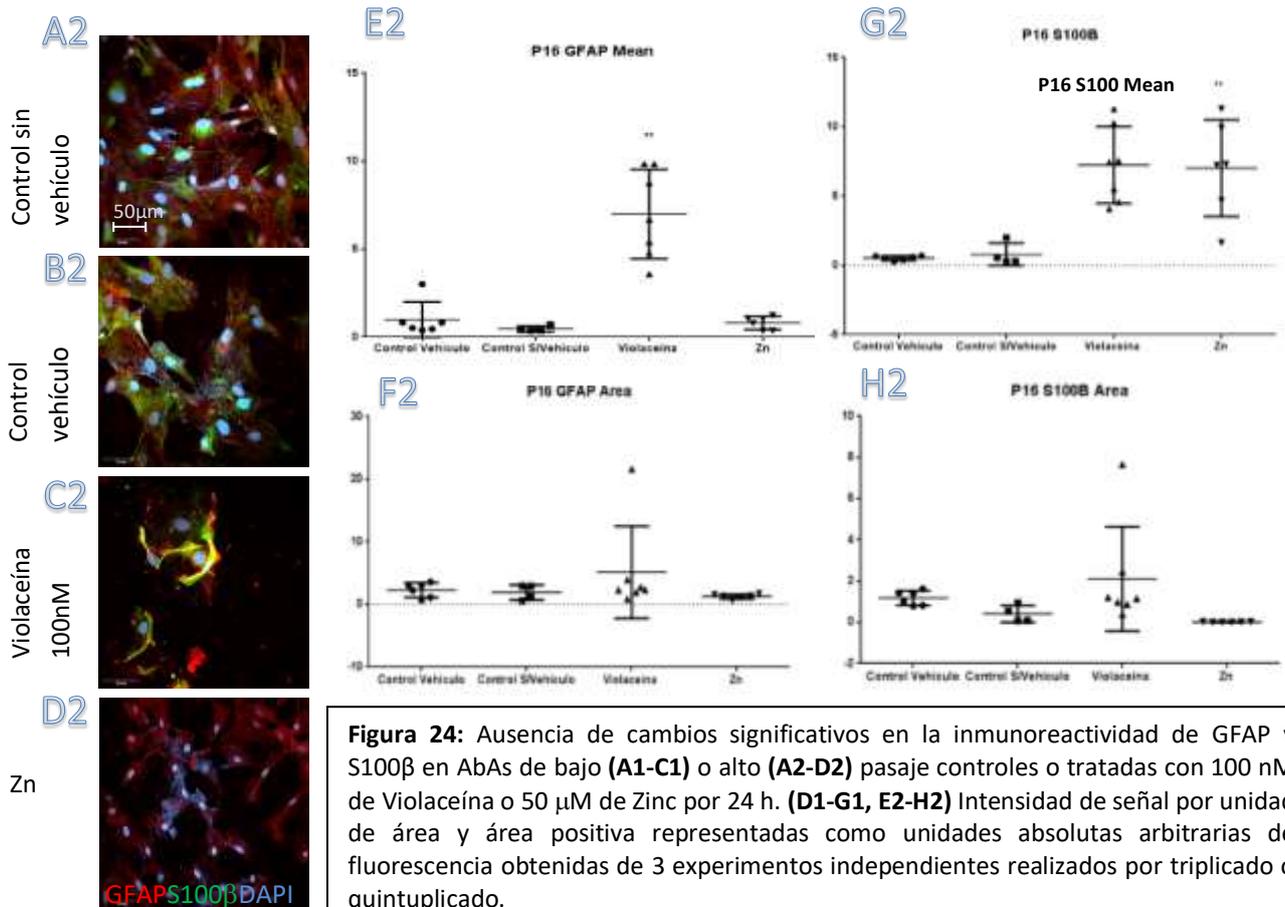


Figura 23: Sobrevivencia evaluada por SFRB de células C6 luego de ser incubadas 24 h con distintas concentraciones de Violaceína. Se muestra la media \pm SEM de la absorbancia relativa respecto del control de 3 experimentos independientes cada uno realizado por triplicado. Solo la concentración de 1500 nM mostró efectos significativos sobre la viabilidad de las células C6. Los valores de

Se estudió además si la Violaceína que produjo efectos en la sobrevivencia de AbAs a concentraciones menores que sobre astrocitos de animales No Tg podría modificar la expresión de S100 β y GFAP alterando la expresión de estos marcadores cuya relación de señales hemos interpretado como un indicador del fenotipo AbA (Díaz-Amarilla y cols. 2011; Jiménez-Riani y cols. 2017). La **figura 24** muestra los efectos de Violaceína aumentando la señal de GFAP solo a bajos pasajes. A altos pasajes se observa los efectos negativos de la misma concentración de Violaceína sobre la viabilidad de las células.





Efectos sobre el citoesqueleto de actina y de marcadores de estrés de ER

También se analizó si la Violaceína a las concentraciones anteriormente empleadas podría alterar la morfología celular y la inmunoreactividad de proteínas marcadoras de estrés de RE en AbAs. En las **figuras 25 y 26** se pueden observar los resultados del marcaje con faloidina (citoesqueleto de actina dada su capacidad de unirse a la actina fibrilar) y BiP, en astrocitos y en células AbAs tratadas con Violaceína. Únicamente el tratamiento de astrocitos con 100 nM de Violaceína fue capaz de generar cambios en su morfología, aumentando el área y la intensidad del marcaje. De igual manera, se observó un aumento en la intensidad del área positiva para BiP luego del tratamiento de astrocitos con 100 nM de Violaceína, sin afectarse la intensidad relativa MGV. Respecto de las AbAs, se observó una disminución del área marcada con BiP para las AbAs de bajo y alto pasaje, indicando que los efectos producidos sobre la viabilidad de las AbAs no parecen estar relacionados con distorsiones en el citoesqueleto de actina ni son mediados por aumento de estrés de RE.

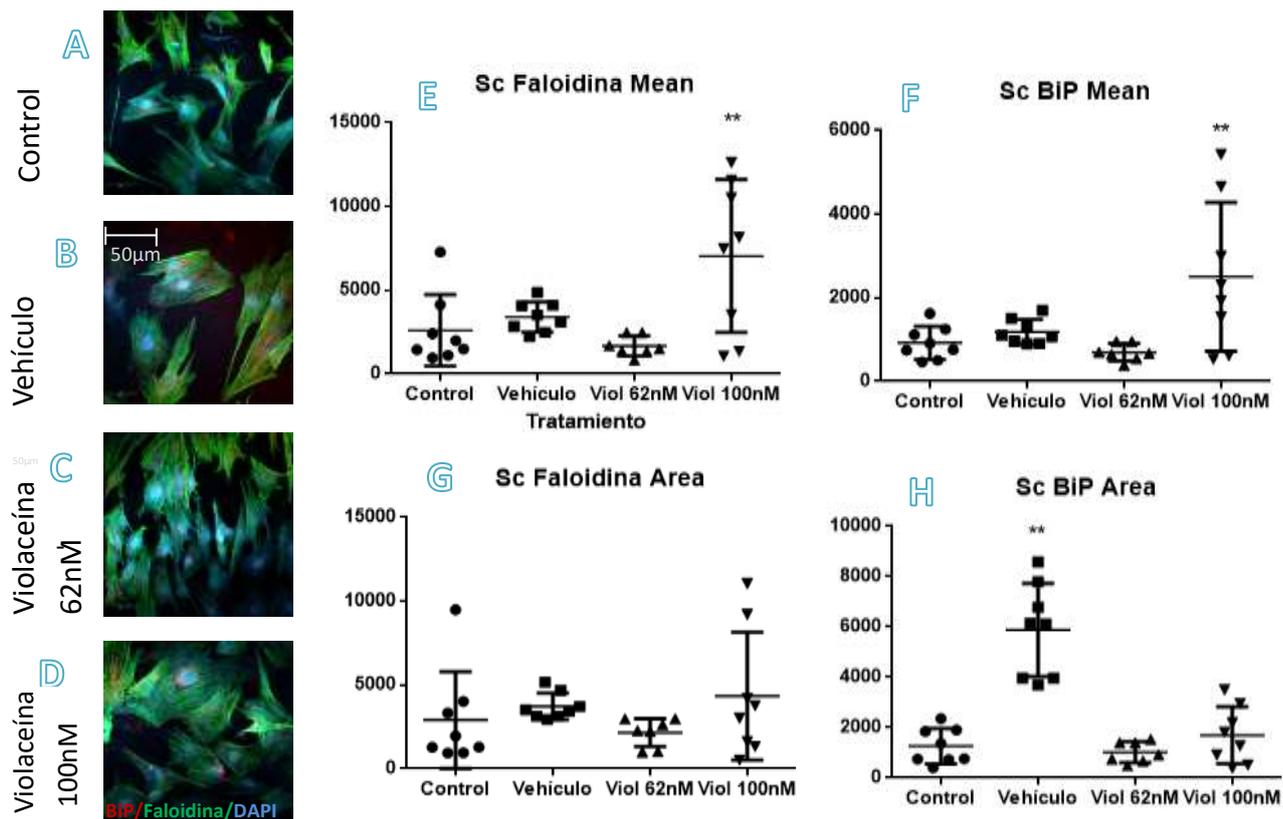


Figura 25: A-D) Señal de BiP y marcaje con faloidina en cultivo primario de astrocitos controles o tratados con 62 y 100 nM de Violaceína durante 24 h. E-H) Intensidad por unidad de área y área positiva. Se realizaron 2 experimentos independientes por triplicado o quintuplicado.

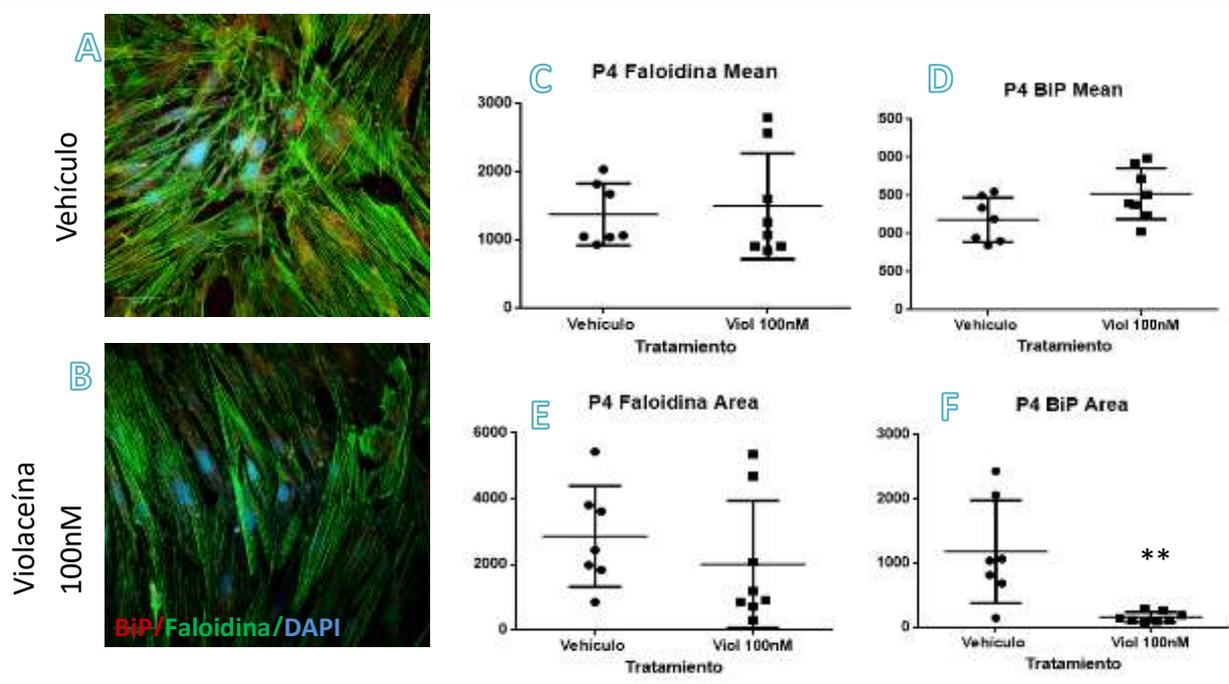


Figura 26: A-B) BiP y faloidina en AbAs de bajo pasaje tratadas con vehículo o con 100 nM de Violaceína durante 24 h. C-F) Intensidad por unidad de área y área positiva. Se representan los valores de 2 experimentos independientes por triplicado o quintuplicado. No se observaron cambios significativos respecto al control, con la salvedad de una disminución en el área marcada con BiP, pero no así la intensidad de la misma.

DISCUSIÓN

Para validar la hipótesis de la tesis que sostiene que **es posible realizar el control selectivo de las AbAs, ya sea modulando su fenotipo o controlando su número, sin afectar los astrocitos responsables de las propiedades homeostáticas**, expusimos cultivos de AbAs de bajo y alto pasaje a un grupo de compuestos que podría inducir su diferenciación hacia un fenotipo astrocitario más maduro o bloquear la vía de las pentosas fosfato para intentar restaurar su funcionalidad mitocondrial o controlar la sobrevida o aumentar el estrés de retículo endoplasmático para producir su muerte o detenerlas en fase G1/S para modular su proliferación o directamente inducir su muerte en forma selectiva respecto de los astrocitos normales. En la mayoría de los casos se emplearon astrocitos de animales no transgénicos adultos como controles.

Se emplearon compuestos químicos comerciales o cedidos de la quimioteca de la Dra. Martínez, cuyas concentraciones fueron tomadas de la literatura u optimizadas en trabajos anteriores de dicho laboratorio. Antes de comenzar, establecimos que se buscarían compuestos que tuvieran efectos a concentraciones menores de 100 μM para favorecer la búsqueda de selectividad y que el tiempo estándar de tratamiento sería de 24 h que es el tiempo estimado de duración del ciclo celular de astrocitos en cultivo (Díaz-Amarilla y cols. 2011).

Los resultados obtenidos indican que los tratamientos planteados no afectaron la sobrevida ni la funcionalidad mitocondrial de los astrocitos de animales no transgénicos, sugiriendo que a los tiempos y concentraciones trabajadas no se estaría afectando a la población astrocitaria considerada “normal” y responsable del mantenimiento de las funciones homeostáticas del SNC. Sin embargo se han visto cambios en la organización del citoesqueleto en los tratamientos con Forskolina y Forskolina-Zinc que causaron una disminución del área marcada con faloidina, de la intensidad media (MGV) y alteraciones morfológicas como la disminución del tamaño de los núcleos y la emisión de procesos celulares. Por otro lado, los tratamientos con iCDC7 y Tunicamicina tuvieron un efecto opuesto, aumentando el área y la intensidad de marcaje. También observamos que estos tratamientos no implicaron una mejora asociada a la modulación de vías dependientes de BiP o CREB.

En cuanto a las AbAs, el análisis de células de bajo y alto pasaje mostró que en los pasajes altos hay una disminución significativa de la expresión génica de los marcadores astrocitarios S100 β y GLT-1. Sin embargo, mediante inmunofluorescencia no observamos cambios significativos en la señal de S100 β en función de los pasajes (condiciones basales en **Figura 24**). Falta realizar Western blots para conocer si hay cambios en los niveles de la proteína S100 β entre AbAs de bajo y alto pasaje. Por razones de tiempo, GLT-1 no fue analizado, a pesar de la importancia que tiene este marcador respecto de la preservación del ciclo glutamato-glutamina que es típicamente astrocitario y es crucial para la sobrevida neuronal (Maragakis y Rothstein 2006).

Los estudios de sobrevida con los compuestos empleados en AbAs, mostraron que solo Zinc-Forskolina indujo una leve disminución en Abas de bajo pasaje y en Abas homocigotas, por lo que parece haber una sensibilidad algo mayor de las AbAs respecto a los astrocitos no transgénicos que se pierde en los pasajes altos. Sin embargo, para buscar la prueba de concepto en animales, empleamos este abordaje en un estudio piloto con 3 animales Tg tratados con Zn y forskolina y Tg de la misma edad sin tratamiento. Al cabo de las 24 h, todos los animales tratados habían muerto mientras que los sin tratamiento permanecieron vivos (datos no mostrados). El aumento del estrés de RE con Tunicamicina, un inductor de estrés de RE clásico (Cheng y cols. 2013), a la concentración máxima que no mata a

astrocitos No Tg tampoco tuvo efecto sobre la viabilidad de las AbAs. Asimismo, el arresto de las AbAs con el inhibidor de CDC7 proporcionado por la Dra. Martínez no disminuyó su viabilidad, sugiriendo que el arresto de 24 h no es suficiente para controlar su número.

Los resultados de funcionalidad mitocondrial no mostraron grandes cambios en la mayoría de los tratamientos salvo una disminución en las AbAs homocigotas frente a S14, Zinc y Tunicamicina. Sin embargo, la poca diferencia entre las respuestas entre AbAs homocigotas y heterocigotas no se consideró de importancia suficiente como para seguir trabajando en AbAs homocigotas ya que aparte de ser más difíciles de obtener, parece que el aumento de los niveles del transgén no es determinante para la vulnerabilidad de las células en las condiciones empleadas.

Durante el análisis de marcadores de estirpe, se vio que el tratamiento de Abas de bajo pasaje con 6AN produjo un aumento de S100 β lo que podría indicar un aumento de la cascada inflamatoria dependiente de la proteína, pero que no se vio reflejado en sobrevida o funcionalidad mitocondrial. Para comenzar a evaluar la importancia de este resultado es necesario realizar western blotting para saber si hay cambios en la expresión de la proteína.

En cuanto a estrés de RE, del marcaje con ATF6 α y BiP observamos que las AbAs no cambian sus niveles de estrés de RE durante los tratamientos con 6AN y S14, sin embargo en el tratamiento con S14-LPS se observa una tendencia a la baja difícil de explicar ya que por un lado no se observó en astrocitos controles y por otro se esperaba que LPS produjera un aumento del estrés de RE por sí mismo. También se observó que S14 a la concentración utilizada, al igual que en astrocitos no transgénicos, no fue capaz de aumentar fosfoCREB, lo que estaría en discordancia con lo reportado en la bibliografía (García y cols. 2014; Morales-García y cols. 2017). De todos modos, en ambos casos debe analizarse el balance CREB/pCREB, que intentamos pero la falla del anticuerpo anti-CREB lo impidió.

Las AbAs también mostraron cierta resistencia a presentar cambios morfológicos cuando se comparan con los astrocitos. Es conocido que a las concentraciones empleadas, la Forskolina induce cambios en astrocitos volviéndolos totalmente reactivos y adoptando en cultivo una apariencia de red, mientras que las AbAs parecen quedarse a mitad de camino, entre intentar responder y no poder hacerlo. Todos estos resultados sugieren que las AbAs presentan un fenotipo escasamente modulable hacia una mayor diferenciación, que fueron resistentes al aumento del estrés de RE, al aumento del estado inflamatorio y a la detención del ciclo celular, por lo que debimos buscar otro abordaje para lograr el control de su número.

La Violaceína, un pigmento obtenido de un microorganismo antártico y objeto de estudio de varios investigadores de Facultad de Ciencias, de Química, Ingeniería y el IIBCE, tuvo la capacidad de afectar la viabilidad celular de todos los cultivos analizados aunque a concentraciones diferentes. Las células obtenidas de animales No Tg adultos presentaron una tendencia a la disminución de la sobrevida a partir de 250 nM de Violaceína, mientras que a 100 nM podrían tener aumento de estrés de RE según lo muestran los aumentos de la señal de BiP. Las AbAs comenzaron a bajar la viabilidad a concentraciones que rondan 50 nM, observándose efectos significativos a partir de 62 nM. Las concentraciones de Violaceína que tuvieron efectos sobre las AbAs son menores que las de otros compuestos empleados para controlar esta población. Los trabajos de Miquel y cols. (2014; 2016) emplearon dicloroacetato 5 y 10 mM para restaurar la funcionalidad mitocondrial de las AbAs y controlar su número en animales. Mientras que Trías y cols. (2016) emplearon 0,1 μ M y 1 μ M del inhibidor de tirosin-kinasas Masitinib para tratar cultivos de microglía de ratas SOD1G93A paráliticas e impedir el surgimiento de las AbAs o 60 μ M para el tratamiento diario de dichos animales (Trías y cols. 2016). Por lo tanto, aunque nuestros resultados son in vitro, parecen ser prometedores dado

que Masitinib se presenta ahora como el compuesto en fase clínica con acciones potenciales mejores para el tratamiento de la ELA.

Respecto de efectos en los marcadores de estirpe y de estrés de RE endoplasmático, 100nM de Violaceína presentó una tendencia al aumento de GFAP en AbAs de alto y bajo pasaje sin afectar significativamente el área e intensidad de marcado con actina y una disminución del área del marcaje con BiP, lo que indicaría que la muerte de las AbAs inducida por Violaceína no estaría mediada por aumento de estrés de RE ni habría re-arreglo del citoesqueleto de actina.

En resumen, la Violaceína fue el único compuesto de los que empleamos que fue capaz de controlar selectivamente la sobrevida de las células AbAs (**Figura 27**). No conocemos los mecanismos de acción ni los blancos celulares de este compuesto. Se conoce que es un agente inductor de apoptosis (Bromberg y cols. 2010; Mehta y cols. 2015), pero no hay mucha literatura sobre los mecanismos de acción o blancos moleculares. De nuestros experimentos podemos afirmar que la muerte con Violaceína no se produce por aumento de estrés de RE. De igual modo, el aumento de estrés de RE (Hetz y cols. 2009; Valenzuela y cols. 2016) ni el aumento del estrés oxidativo (tratamiento con Zn o Zn+Fsk) produjeron la muerte de las AbAs, por lo que podemos afirmar que esta población celular es capaz de soportar niveles muy altos de estrés celular sin afectar su viabilidad como lo mostró anteriormente Jiménez-Riani y cols. (2017). Por lo tanto, esta población celular aberrante parece haberse adaptado para sobrevivir a expensas de rutas metabólicas alternativas y a expensas de soportar un alto estrés de RE. El costo energético que estas adaptaciones implican es probable que colabore con la falta de soporte trófico y energético al resto del sistema y con las fallas al mantenimiento de la homeostasis del SNC.

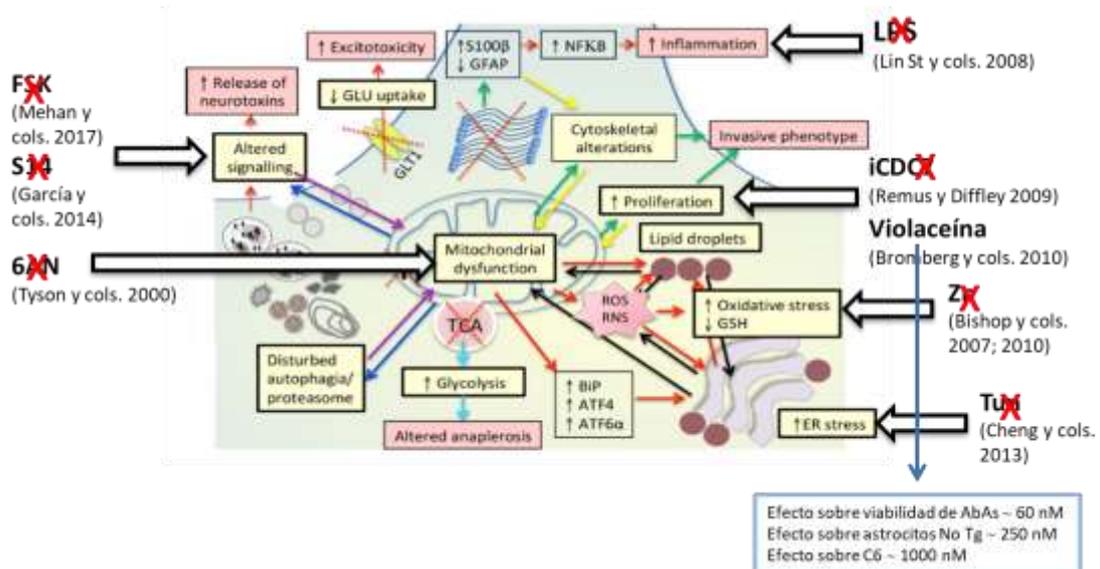


Figura 27: Esquema de resumen de los resultados obtenidos, adaptado de Otero y cols. 2019.

CONCLUSIONES

Luego del análisis in vitro de los efectos de diversos compuestos sobre las células AbAs, los datos surgidos de esta tesis llevan a sostener que:

1. Las AbAs son un fenotipo en transición muy difícilmente modulable.

2. El compuesto Violaceína podría discriminar las células AbAs respecto de astrocitos normales con una ventana de concentraciones mayores que los compuestos empleados por otros autores

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos abren un número importante de preguntas, de las cuales consideramos que deben contestarse primero:

- 1- Caracterizar en profundidad los efectos de Violaceína en AbAs de bajo, medio y alto pasaje determinando el IC50 para cada población.
- 2- Determinar el mejor abordaje terapéutico in vitro: determinar concentraciones a emplear, número de tratamientos y duración de los mismos.
- 3- Analizar e intentar determinar los mecanismos a través de los cuales Violaceína mata selectivamente a las AbAs. Intentar identificar algún blanco molecular del compuesto.
- 4- Evaluar si el pretratamiento con concentraciones inferiores a IC50 modifican la neurotoxicidad de las AbAs empleando co-cultivos de AbAs y motoneuronas espinales.
- 5- Desarrollar un ensayo piloto con animales No Tg y Tg que serán tratados con vehículo o Violaceína en etapa presintomática tardía y correlacionar con el desenlace de la enfermedad y la presencia de células AbAs espinales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*. 2006. Jan;7(1):41-53.
- Adams KL, Gallo V. The diversity and disparity of the glial scar. *Nature Neuroscience*. 2018. Jan;21(1):9-15. doi: 10.1038/s41593-017-0033-9. Epub 2017 Dec 21.
- Alberini CM, Cruz E, Descalzi G, Bessières B, Gao V. Astrocyte glycogen and lactate: New insights into learning and memory mechanisms. *Glia*. 2018. Jun;66(6):1244-1262. doi: 10.1002/glia.23250. Epub 2017 Oct 27.
- Allen NJ, Eroglu C. Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron*. 2017 Nov 1;96(3):697-708. doi: 10.1016/j.neuron.2017.09.056.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*. 1999. May;22(5):208-15.
- Arends MJ, White ES, Whitelaw CB. Animal and cellular models of human disease. *The Journal of Pathology*. 2016. Jan;238(2):137-40. doi: 10.1002/path.4662.
- Anneser JM, Cookson MR, Ince PG, Shaw PJ, Borasio GD. Glial cells of the spinal cord and subcortical white matter up-regulate neuronal nitric oxide synthase in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology*. 2001. Oct;171(2):418-21.
- Barnabé-Heider F, Wasylnka JA, Fernandes KJ, Porsche C, Sendtner M, Kaplan DR, Miller FD. Evidence that embryonic neurons regulate the onset of cortical gliogenesis via cardiotrophin-1. *Neuron*. 2005. Oct 20;48(2):253-65.
- Batra R, Lee CW. Mouse Models of C9orf72 Hexanucleotide Repeat Expansion in Amyotrophic Lateral Sclerosis/ Frontotemporal Dementia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2017. Jul 6;11:196. doi: 10.3389/fncel.2017.00196. eCollection 2017.
- Baust JM, Campbell LH, Harbell JW. Best practices for cryopreserving, thawing, recovering, and assessing cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 2017. Dec;53(10):855-871. doi: 10.1007/s11626-017-0201-y. Epub 2017 Nov 2.
- Beck DW, Vinters HV, Hart MN, Cancilla PA. Glial cells influence polarity of the blood-brain barrier. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 1984. May;43(3):219-24.

- Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metabolism*. 2011. Dec 7;14(6):724-38. doi: 10.1016/j.cmet.2011.08.016.
- Berry JD, Paganoni S, Atassi N, Macklin EA, Goyal N, Rivner M, Simpson E, Appel S, Grasso DL, Mejia NI, Mateen F, Gill A, Vieira F, Tassinari V, Perrin S. Phase IIa trial of fingolimod for amyotrophic lateral sclerosis demonstrates acceptable acute safety and tolerability. *Muscle Nerve*. 2017 Dec;56(6):1077-1084. doi: 10.1002/mus.25733. Epub 2017 Aug 29.
- Bishop GM, Dringen R, Robinson SR. Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007. Apr 15;42(8):1222-30. Epub 2007 Jan 17.
- Bishop GM, Scheiber IF, Dringen R, Robinson SR. Synergistic accumulation of iron and zinc by cultured astrocytes. *Journal of Neural Transmission (Vienna)*. 2010. Jul;117(7):809-17. doi: 10.1007/s00702-010-0420-9. Epub 2010 Jun 12.
- Blackburn D, Sargsyan S, Monk PN, Shaw PJ. Astrocyte function and role in motor neuron disease: a future therapeutic target? *Glia*. 2009. Sep;57(12):1251-64. doi: 10.1002/glia.20848.
- Blokhuis AM, Groen EJ, Koppers M, van den Berg LH, Pasterkamp RJ. Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*. 2013. Jun;125(6):777-94. doi: 10.1007/s00401-013-1125-6. Epub 2013 May 15.
- Bromberg N, Dreyfuss JL, Regatieri CV, Palladino MV, Durán N, Nader HB, Haun M, Justo GZ. Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor. *Chemico-Biological Interactions*. 2010. Jun 7;186(1):43-52. doi: 10.1016/j.cbi.2010.04.016. Epub 2010 Apr 21.
- Brown AM, Ransom BR. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*. 2007. Sep;55(12):1263-71.
- Burda JE, Sofroniew MV. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*. 2014. Jan 22;81(2):229-48. doi: 10.1016/j.neuron.2013.12.034.
- Bushong EA, Martone ME, Ellisman MH. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2004. Apr;22(2):73-86.
- Cassina P, Cassina A, Pehar M, Castellanos R, Gandelman M, de León A, Robinson KM, Mason RP, Beckman JS, Barbeito L, Radi R. Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *Journal of Neuroscience*. 2008. 28:4115-4122. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5308-07.2008.
- Cavaiillon JM. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. *Toxicon*. 2018. 2018 Jul;149:45-53. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.10.016.
- Chandrasekaran A, Avci HX, Leist M, Kobolák J, Dinnyés A. Astrocyte Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells: New Tools for Neurological Disorder Research. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2016. Sep 26;10:215. eCollection 2016.
- Clarke LE, Barres BA. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nature Reviews Neuroscience*. 2013. May;14(5):311-21. doi: 10.1038/nrn3484. Epub 2013 Apr 18.
- Cheng L, Zhao H, Zhang W, Liu B, Liu Y, Guo Y, Nie L. Overexpression of conserved dopamine neurotrophic factor (CDNF) in astrocytes alleviates endoplasmic reticulum stress-induced cell damage and inflammatory cytokine secretion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013. May 24;435(1):34-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.04.029. Epub 2013 Apr 25.
- Choi SY, Yoon KH, Lee JI, Mitchell RJ. Violacein: Properties and Production of a Versatile Bacterial Pigment. *BioMed Research International*. 2015. 2015:465056. doi: 10.1155/2015/465056. Epub 2015 Aug 3.
- Chung WS, Clarke LE, Wang GX, Stafford BK, Sher A, Chakraborty C, Joung J, Foo LC, Thompson A, Chen C, Smith SJ, Barres BA. Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature*. 2013. Dec 19;504(7480):394-400. doi: 10.1038/nature12776. Epub 2013 Nov 24.
- Corbier C, Sellier C. C9ORF72 is a GDP/GTP exchange factor for Rab8 and Rab39 and regulates

- autophagy. *Small GTPases*. 2017. Jul 3;8(3):181-186. doi: 10.1080/21541248.2016.1212688. Epub 2016 Aug 5.
- Couratier P, Corcia P, Lautrette G, Nicol M, Preux PM, Marin B. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A review of literature. *Revue Neurologique (Paris)*. 2016. Jan;172(1):37-45. doi: 10.1016/j.neurol.2015.11.002. Epub 2015 Dec 22.
 - Curtis AF, Masellis M, Hsiung GR, Moineddin R, Zhang K, Au B, Millett G, Mackenzie I, Rogaeva E, Tierney MC. Sex differences in the prevalence of genetic mutations in FTD and ALS: A meta-analysis. *Neurology*. 2017. Oct 10;89(15):1633-1642. doi: 10.1212/WNL.0000000000004494. Epub 2017 Sep 15.
 - Da Cruz S, Cleveland DW. Understanding the role of TDP-43 and FUS/TLS in ALS and beyond. *Current Opinion in Neurobiology*. 2011. Dec;21(6):904-19. doi: 10.1016/j.conb.2011.05.029. Epub 2011 Aug 2.
 - Desjardins P, Conklin D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments*. 2010.Nov 22;(45). pii: 2565. doi: 10.3791/2565.
 - Díaz-Amarilla P, Olivera-Bravo S, Trías E, Cragolini A, Martínez-Palma L, Cassina P, Beckman J, Barbeito L. Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. 2018. 108;18126-18131. doi: 10.1073/pnas.1110689108.
 - Di Giorgio FP, Boulting GL, Bobrowicz S, Eggan KC. Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation. *Cell Stem Cell*. 2008. 3:637-648. doi: 10.1016/j.stem.2008.09.017.
 - Dodla MC, Mumaw J, Stice SL. Role of astrocytes, soluble factors, cells adhesion molecules and neurotrophins in functional synapse formation: implications for human embryonic stem cell derived neurons. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2010. Sep;5(3):251-60.
 - Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009. Jun;1793(6):1008-22. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.11.009. Epub 2008 Dec 7.
 - Durkee CA, Araque A. Diversity and Specificity of Astrocyte-neuron Communication. *Neuroscience*. 2019. Jan 1;396:73-78. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.11.010. Epub 2018 Nov 17.
 - Ederle H, Dormann D. TDP-43 and FUS en route from the nucleus to the cytoplasm. *FEBS Letters*. 2017. Jun;591(11):1489-1507. doi: 10.1002/1873-3468.12646. Epub 2017 Apr 23.
 - Eroglu C. The role of astrocyte-secreted matricellular proteins in central nervous system development and function. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 2009. Dec;3(3-4):167-76. doi: 10.1007/s12079-009-0078-y. Epub 2009 Nov 11.
 - Escobar M, Aristizabal, Fabio A. Fluorometric assay for cell proliferation in human tumor cell lines application. *Vitae*. 2010. 17. 173-180.
 - Falkowska A, Gutowska I, Goschorska M, Nowacki P, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I. Energy Metabolism of the Brain, Including the Cooperation between Astrocytes and Neurons, Especially in the Context of Glycogen Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015. Oct 29;16(11):25959-81. doi: 10.3390/ijms161125939.
 - Farhy-Tselnicker I, Allen NJ. Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. *Neural Development*. 2018. May 1;13(1):7. doi: 10.1186/s13064-018-0104-y.
 - Figueroa-Romero C, Hur J, Bender DE, Delaney CE, Cataldo MD, Smith AL, Yung R, Ruden DM, Callaghan BC, Feldman EL. Identification of epigenetically altered genes in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*. 2015. 7(12), e52672.
 - Finsterwald C, Magistretti PJ, Lengacher S. Astrocytes: New Targets for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Current Pharmaceutical Design*. 2015. 21(25):3570-81.
 - Freibaum BD, Taylor JP. The Role of Dipeptide Repeats in C9ORF72-Related ALS-FTD. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2017. Feb 13;10:35. doi: 10.3389/fnmol.2017.00035. eCollection 2017.
 - Gallagher CM, Walter P. Ceapins inhibit ATF6 α signaling by selectively preventing transport of ATF6 α to the Golgi apparatus during ER stress. *Elife*. 2016. Jul 20;5. pii: e11880. doi: 10.7554/eLife.11880.

- García AM, Brea J, Morales-García JA, Perez DI, González A, Alonso-Gil S, Gracia-Rubio I, Ros-Simó C, Conde S, Cadavid MI, Loza MI, Perez-Castillo A, Valverde O, Martínez A, Gil C. Modulation of cAMP-specific PDE without emetogenic activity: new sulfide-like PDE7 inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2014. Oct 23;57(20):8590-607. doi: 10.1021/jm501090m. Epub 2014 Oct 8.
- Gascón S, Ortega F, Götz M. Transient CREB-mediated transcription is key in direct neuronal reprogramming. *Neurogenesis* (Austin). 2017. Feb 6;4(1):e1285383. doi: 10.1080/23262133.2017.1285383. eCollection 2017.
- Ge WP, Miyawaki A, Gage FH, Jan YN, Jan LY. Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex. *Nature*. 2012. Mar 28;484(7394):376-80. doi: 10.1038/nature10959.
- Gitler AD, Dhillon P, Shorter J. Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope. *Disease Models & Mechanisms*. 2017. May 1;10(5):499-502. doi: 10.1242/dmm.030205.
- Gopalam R, Rupwate SD, Tumaney AW. Selection and validation of appropriate reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Salvia hispanica*. *PLoS One*. 2017. Nov 1;12(11):e0186978. doi: 10.1371/journal.pone.0186978. eCollection 2017.
- Gordon GR, Mulligan SJ, MacVicar BA. Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia*. 2007. Sep;55(12):1214-21.
- Grobden B, De Deyn PP, Slegers H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Research*. 2002. 2002 Dec;310(3):257-70. Epub 2002 Nov 6. DOI: 10.1007/s00441-002-0651-7
- Haidet-Phillips AM, Hester ME, Miranda CJ, Meyer K, Braun L, Frakes A, Song S, Likhite S, Murtha MJ, Foust KD, Rao M, Eagle A, Kammesheidt A, Christensen A, Mendell JR, Burghes AH, Kaspar BK. Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nature Biotechnology*. 2011. Aug 10;29(9):824-8. doi: 10.1038/nbt.1957.
- Helmuth L. Neuroscience. Glia tell neurons to build synapses. *Science*. 2001. Jan 26;291(5504):569-70.
- Hendzel MJ. The F-actin of nuclear actin. *Current Opinion in Cell Biology*. 2014. Jun;28:84-9. doi: 10.1016/j.ceb.2014.04.003. Epub 2014 May 4.
- Hertz L, Dienel GA. Lactate transport and transporters: general principles and functional roles in brain cells. *Journal of Neuroscience Research*. 2005. Jan 1-15;79(1-2):11-8.
- Hetz C, Thielen P, Matus S, Nassif M, Court F, Kiffin R, Martínez GCuervo AM, Brown RH, Glimcher LH. XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes & Development*. 2009. 23:2294-2306. doi: 10.1101/gad.1830709.
- Hewett SJ, Csernansky CA, Choi DW. Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS. *Neuron*. 1994. Aug;13(2):487-94.
- Ho E, Ames BN. Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFkappa B, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. 2002. Dec 24;99(26):16770-5. Epub 2002 Dec 12.
- Hostenbach S, Cambron M, D'haeseleer M, Kooijman R, De Keyser J. Astrocyte loss and astrogliosis in neuroinflammatory disorders. *Neuroscience Letters*. 2014. 17;565:39-41. doi: 10.1016/j.neulet.2013.10.012
- Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. 2002. Feb 5;99(3):1604-9. Epub 2002 Jan 29.
- Hur YS, Kim KD, Paek SH, Yoo SH. Evidence for the Existence of Secretory Granule (Dense-Core Vesicle)-Based Inositol 1,4,5-Trisphosphate-Dependent Ca²⁺ Signaling System in Astrocytes. *PLoS One*. 2010. 5(8):e11973 doi: 10.1371/journal.pone.0011973.
- Iadecola C, Nedergaard M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nature Neuroscience*. 2007. Nov;10(11):1369-76.
- Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *Journal of Cell Biology*. 2009. 187:761-772.

doi:10.1083/jcb.200908164

- Ilieva H, Maragakis NJ. Motoneuron Disease: Basic Science. In: Beart P, Robinson M, Rattray M, Maragakis NJ, editors. *Advances in Neurobiology 15: Neurodegenerative Diseases Pathology, Mechanisms, and Potential Therapeutic Targets*. Cham: Springer; 2017. P. 163-190. doi: 10.1007/978-3-319-57193-5
- Ishikawa M, Yoshitomi T, Zorumski CF, Izumi Y. Downregulation of glutamine synthetase via GLAST suppression induces retinal axonal swelling in a rat ex vivo hydrostatic pressure model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011. 52(9), 6604-16. doi:10.1167/iovs.11-7375
- Jimenez-Pacheco A, Franco JM, Lopez S, Gomez-Zumaquero JM, Magdalena Leal-Lasarte M, Caballero-Hernandez DE, Cejudo-Guillén M, Pozo D. Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2017. 978:255-275. doi: 10.1007/978-3-319-53889-1_14.
- Jiménez-Riani M, Díaz-Amarilla P, Isasi E, Casanova G, Barbeito L, Olivera-Bravo S. Ultrastructural features of aberrant glial cells isolated from the spinal cord of paralytic rats expressing the amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1G93A mutation. *Cell and Tissue Research*. 2017. 370(3):391-401. doi: 10.1007/s00441-017-2681-1
- Joyce PI, Fratta P, Fisher EM, Acevedo-Arozena A. SOD1 and TDP-43 animal models of amyotrophic lateral sclerosis: recent advances in understanding disease toward the development of clinical treatments. *Mammalian Genome*. 2011. Aug;22(7-8):420-48. doi: 10.1007/s00335-011-9339-1. Epub 2011 Jun 26.
- Józwiak-Bębenista M, Kowalczyk E, Nowak JZ. The cyclic AMP effects and neuroprotective activities of PACAP and VIP in cultured astrocytes and neurons exposed to oxygen-glucose deprivation. *Pharmacological Reports*. 2015. Apr;67(2):332-8. doi: 10.1016/j.pharep.2014.10.001. Epub 2014 Oct 16.
- Kaur SJ, McKeown SR, Rashid S. Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene*. 2016. Feb 15;577(2):109-18. doi: 10.1016/j.gene.2015.11.049. Epub 2015 Dec 2.
- Kawamata H, Manfredi G. Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2010. Jul-Aug;131(7-8):517-26. doi: 10.1016/j.mad.2010.05.003. Epub 2010 May 20.
- Koehler RC, Roman RJ, Harder DR. Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends in Neuroscience*. 2009. Mar;32(3):160-9. doi: 10.1016/j.tins.2008.11.005. Epub 2009 Jan 21.
- Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*. 2013. Nov;54(4):391-406.
- Lall D, & Baloh RH. Microglia and C9orf72 in neuroinflammation and ALS and frontotemporal dementia. *The Journal of Clinical Investigation*. 2017. 127(9), 3250-3258.
- Lécuyer MA, Kebir H, Prat A. Glial influences on BBB functions and molecular players in immune cell trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2016. Mar;1862(3):472-82. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.10.004. Epub 2015 Oct 8.
- Lee S, Shang Y, Redmond SA, Urisman A, Tang AA, Li KH, Burlingame AL, Pak RA, Jovičić A, Gitler AD, Wang J, Gray NS, Seeley WW, Siddique T, Bigio EH, Lee VM, Trojanowski JQ, Chan JR, Huang EJ. Activation of HIPK2 Promotes ER Stress-Mediated Neurodegeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuron*. 2016. 91:41-55. doi: 10.1016/j.neuron.2016.05.021.
- Li YR, King OD, Shorter J, Gitler AD. Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *Journal of Cell Biology*. 2013. 201:361-372. doi: 10.1083/jcb.201302044
- Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*. 2016. Mar;41(3):211-218. doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.001. Epub 2016 Jan 5.
- Liddel SA, Barres BA. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*. 2017. Jun 20;46(6):957-967. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.006.
- Ling SC, Polymenidou M, Cleveland DW. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron*. 2013. 79(3):416-438. doi: 10.1016/j.neuron.2013.07.033.
- Liu L, Zhang K, Sandoval H, Yamamoto S, Jaiswal M, Sanz E, Li Z, Hui J, Graham BH, Quintana A,

- Bellen HJ .Glial Lipid Droplets and ROS Induced by Mitochondrial Defects Promote Neurodegeneration. *Cell*. 2015. 160:177–190. doi: 10.1016/j.cell.2014.12.019.
- Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurology*. 2010. Oct;9(10):995-1007. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70195-2.
 - Maihöfner C, Probst-Cousin S, Bergmann M, Neuhuber W, Neundörfer B, Heuss D. Expression and localization of cyclooxygenase-1 and -2 in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neuroscience*. 2003. Sep;18(6):1527-34.
 - Maneshi MM, Sachs F, Hua SZ. Heterogeneous Cytoskeletal Force Distribution Delineates the Onset Ca(2+) Influx Under Fluid Shear Stress in Astrocytes. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018. Mar 16;12:69. doi:10.3389/fncel.2018.00069.
 - Maragakis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nature Clinical Practice Neurology*. 2006. 2(12):679-89. doi: 10.1038/ncpneuro0355.
 - Matsuda K. PCR-Based Detection Methods for Single-Nucleotide Polymorphism or Mutation: Real-Time PCR and Its Substantial Contribution Toward Technological Refinement. *Advances in Clinical Chemistry*. 2017. 80:45-72. doi: 10.1016/bs.acc.2016.11.002. Epub 2017 Jan 4.
 - McGookin R. Electrophoresis of DNA in nondenaturing polyacrylamide gels. *Methods in Molecular Biology*. 1988- 4:75-9. doi: 10.1385/0-89603-127-6:75.
 - Mehan S, Parveen S, Kalra S. Adenyl cyclase activator forskolin protects against Huntington's disease-like neurodegenerative disorders. *Neural Regeneration Research*. 2017. Feb;12(2):290-300. doi: 10.4103/1673 5374.200812.
 - Migheli A, Cordera S, Bendotti C, Atzori C, Piva R, Schiffer D. S-100beta protein is upregulated in astrocytes and motor neurons in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*. 1999. Feb 12;261(1-2):25-8.
 - Miller RG, Mitchell JD, Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;14(3):CD001447. DOI: 10.1002/14651858.CD001447.pub3
 - Miquel E, Cassina A, Martínez-Palma L, Souza JM, Bolatto C, Rodríguez-Bottero S, Logan A, Smith RA, Murphy MP, Barbeito L, Radi R, Cassina P. Neuroprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014. 70:204-213. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.019.
 - Miyazaki K, Masamoto K, Morimoto N, Kurata T, Mimoto T, Obata T, Kanno I, Abe K. Early and progressive impairment of spinal blood flow-glucose metabolism coupling in motor neuron degeneration of ALS model mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2012. 32(3):456-467. doi: 10.1038/jcbfm.2011.155.
 - Moens TG, Partridge L, Isaacs AM. Genetic models of C9orf72: what is toxic? *Current Opinion in Genetics & Development*. 2017. Jun;44:92-101. doi: 10.1016/j.gde.2017.01.006. Epub 2017 Mar 29.
 - Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of The National Cancer Institute*. 1991. Jun 5;83(11):757-66.
 - Morales-Garcia JA, Echeverry-Alzate V, Alonso-Gil S, Sanz-SanCristobal M, Lopez-Moreno JA, Gil C, Martínez A, Santos A, Perez-Castillo A. Phosphodiesterase7 Inhibition Activates Adult Neurogenesis in Hippocampus and Subventricular Zone In Vitro and In Vivo. *Stem Cells*. 2017. Feb;35(2):458-472. doi: 10.1002/stem.2480. Epub 2016 Sep 16.
 - Mori H, Cardiff RD. Methods of Immunohistochemistry and Immunofluorescence: Converting Invisible to Visible. *Methods in Molecular Biology*. 2016. 1458:1-12. doi: 10.1007/978-1-4939-3801-8_1.
 - Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983. Dec 16;65(1-2):55-63.
 - Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S. Astrocytes

- expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nature Neuroscience*. 2007. 10:615-622. doi:10.1038/nn1876.
- Nardo G, Trolese MC, de Vito G, Cecchi R, Riva N, Dina G, Heath PR, Quattrini A, Shaw PJ, Piazza V, Bendotti C. Immune response in peripheral axons delays disease progression in SOD1G93A mice. *Journal of Neuroinflammation*. 2016. 13(1), 261. doi:10.1186/s12974-016-0732-2.
 - Niimi H, Ueno T, Hayashi S, Abe A, Tsurue T, Mori M, Tabata H, Minami H, Goto M, Akiyama M, Yamamoto Y, Saito S, Kitajima I. Melting Temperature Mapping Method: A Novel Method for Rapid Identification of Unknown Pathogenic Microorganisms within Three Hours of Sample Collection. *Scientific Reports*. 2015. Jul 28;5:12543. doi: 10.1038/srep12543.
 - Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annual Review of Pathology*. 2015. 10:173-194. doi: 10.1146/annurev-pathol012513-104649.
 - Occhipinti R, Somersalo E, Calvetti D. Astrocytes as the glucose shunt for glutamatergic neurons at high activity: an in silico study. *Journal of Neurophysiology*. 2008. 101(5):2528-38. doi: 10.1152/jn.90377.2008.
 - Olivera S, Fernandez A, Latini A, Rosillo JC, Casanova G, Wajner M, Cassina P, Barbeito L. Astrocytic proliferation and mitochondrial dysfunction induced by accumulated glutaric acidemia I (GAI) metabolites: possible implications for GAI pathogenesis. *Neurobiology of Disease*. 2008. Dec;32(3):528-34. doi: 10.1016/j.nbd.2008.09.011. Epub 2008 Sep 30.
 - Otero G, Parada C, Díaz-Amarilla P, Isasi E, Bolatto C, Olivera-Bravo S. Contribution of aberrant astrocytes to motor neuron damage and death in the SOD1G93A rat experimental model of ALS. En: IntechOpen - Novel Aspects on Motor Neuron Disease. Capítulo aceptado.
 - Ozawa H, Takata K. The Granin Family-Its Role in Sorting and Secretory Granule Formation. *Cell Structure and Function*. 1995. 20:415-420. doi: 10.1247/csf.20.415.
 - Verkhatsky A, Parpura V. Recent advances in (patho)physiology of astroglia. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2010. Sep;31(9):1044-54. doi: 10.1038/aps.2010.108. Epub 2010 Aug 9.
 - Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods in Molecular Biology*. 2007. 368:39-57.
 - Pehar M, Harlan BA, Killooy KM, Vargas MR. Role and Therapeutic Potential of Astrocytes in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Current Pharmaceutical Design*. 2017. 23(33):5010–5021. doi:10.2174/1381612823666170622095802.
 - Pekny M, Pekna M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiological Reviews*. 2014. Oct;94(4):1077-98. doi: 10.1152/physrev.00041.2013.
 - Pekny M, Wilhelmsson U, Tatlisumak T, Pekna M. Astrocyte activation and reactive gliosis-A new target in stroke? *Neuroscience Letters*. 2019. Jan 10;689:45-55. doi: 10.1016/j.neulet.2018.07.021. Epub 2018 Jul 17.
 - Penkowa M, Quintana A, Carrasco J, Giralt M, Molinero A, Hidalgo J. Metallothionein prevents neurodegeneration and central nervous system cell death after treatment with gliotoxin 6-aminonicotinamide. *Journal of Neuroscience Research*. 2004. Jul 1;77(1):35-53.
 - Pennetta G, Welte MA. Emerging Links between Lipid Droplets and Motor Neuron Diseases. *Developmental Cell*. 2018. May 21;45(4):427-432. doi: 10.1016/j.devcel.2018.05.002.
 - Perea G, Araque A. Communication between astrocytes and neurons: a complex language. *Journal of Physiology (Paris)*. 2002. Apr-Jun;96(3-4):199-207.
 - Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neuroscience*. 2009. Aug;32(8):421-31. doi: 10.1016/j.tins.2009.05.001. Epub 2009 Jul 15.
 - Peters A, Palay SL, deF Webster H. The fine structure of the nervous system. Neurons and their supporting cells. University Press, NY. 1991.
 - Phelps CH. Barbiturate-induced glycogen accumulation in brain. An electron microscopic study. *Brain Research*. 1972. Apr 14;39(1):225-34.
 - Philips T, Rothstein JD. Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Current Protocols in Pharmacology*. 2015. Jun 1;69:5.67.1-21. doi: 10.1002/0471141755.ph0567s69.

- Pioro EP, Mitsumoto H. Animal models of ALS. *Journal of Clinical Neuroscience*. 1995-1996. 3(6):375-85.
- Pryor RJ, Wittwer CT. Real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Methods in Molecular Biology*. 2006. 336:19-32.
- Ratti A, Buratti E. Physiological functions and pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS proteins. *Journal of Neurochemistry*. 2016. Aug;138 Suppl 1:95-111. doi: 10.1111/jnc.13625. Epub 2016 Jun 15.
- Ravnskjaer K, Madiraju A, Montminy M. Role of the cAMP Pathway in Glucose and Lipid Metabolism. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2016. 233:29-49. doi: 10.1007/164_2015_32.
- Re DB, Le Verche V, Yu C, Amoroso MW, Politi KA, Phani S, Ikiz B, Hoffmann L, Koolen M, Nagata T, Papadimitriou D, Nagy P, Mitsumoto H, Kariva S, Wichterle H, Henderson CE, Przedborski S. Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS. *Neuron*. 2016. 81:1001-1008. doi:10.1016/j.neuron.2014.01.011.
- Remus D, Diffley JF. Eukaryotic DNA replication control: lock and load, then fire. *Current Opinion in Cell Biology*. 2009. Dec;21(6):771-7. doi: 10.1016/j.ceb.2009.08.002. Epub 2009 Sep 18.
- Robinton DA, Daley GQ. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*. 2012. Jan 18;481(7381):295-305. doi: 10.1038/nature10761.
- Rodrigues Gouveia G, Ferreira SC, Ferreira JE, Siqueira SA, Pereira J. Comparison of two methods of RNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens. *BioMed Research International*. 2014. 151724.
- Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science*. 2008. Dec 5;322(5907):1551-5. doi: 10.1126/science.1164022.
- Saneto RP, de Vellis J. Neuronal and glial cells: Cell culture of the central nervous system In: Turnber AJ, Bachelard HS (eds): "Neurochemistry- A Practical Approach," Chapter 2, Washington, DC: IRL Press, pp. 27-63.
- Sapio L, Gallo M, Illiano M, Chiosi E, Naviglio D, Spina A, Naviglio S. The Natural cAMP Elevating Compound Forskolin in Cancer Therapy: Is It Time? *Journal of Cellular Physiology*. 2017. May;232(5):922-927. doi: 10.1002/jcp.25650. Epub 2016 Nov 20.
- Sattler R, Rothstein JD. Regulation and dysregulation of glutamate transporters. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2006. (175):277-303.
- Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C, Ruhl A, Neunlist M, Bourreille A, Hurst R, Sofroniew MV. Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology*. 2007. Apr;132(4):1344-58. Epub 2007 Feb 1.
- Sasaki S, Shibata N, Komori T, Iwata M. iNOS and nitrotyrosine immunoreactivity in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*. 2000. Sep 8;291(1):44-8.
- Schmitt F, Hussain G, Dupuis L, Loeffler JP, Henriques A. A plural role for lipids in motor neuron diseases: energy, signaling and structure. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2014. 8:25. doi: 10.3389/fncel.2014.00025.
- Schummers J, Yu H, Sur M. Tuned responses of astrocytes and their influence on hemodynamic signals in the visual cortex. *Science*. 2008. Jun 20;320(5883):1638-43. doi: 10.1126/science.1156120.
- Scott A. On the treatment trail for ALS. *Nature*. 2017; 18;550(7676):S120S121. DOI:10.1038/550S120a
- Seifert G, Schilling K, Steinhäuser C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nature Reviews Neuroscience*. 2006. Mar;7(3):194-206.
- Simard M, Nedergaard M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*. 2004. 129(4):877-96.
- Sloan SA, Barres BA. Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders. *Current Opinion in Neurobiology*. 2014;27:75-81. doi: 10.1016/j.conb.2014.03.005.

- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*. 1990. Jul 4;82(13):1107-12.
- Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*. 2009. Dec;32(12):638-47. doi: 10.1016/j.tins.2009.08.002. Epub 2009 Sep 24.
- Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*. 2010. 119(1):7-35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8
- Sofroniew MV. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nature Reviews Neuroscience*. 2015. May;16(5):249-63. doi: 10.1038/nrn3898.
- Stellwagen NC. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis*. 2009. Jun;30 Suppl 1:S188-95. doi: 10.1002/elps.200900052.
- Sun Y, Chakrabartty A. Phase to Phase with TDP-43. *Biochemistry*. 2017. Feb 14;56(6):809-823. doi: 10.1021/acs.biochem.6b01088. Epub 2017 Jan 30.
- Suzuki H, Matsuoka M. TDP-43 toxicity is mediated by the unfolded protein response-unrelated induction of C/EBP homologous protein expression. *Journal of Neuroscience Research*. 2012. 90:641-647. doi: 10.1002/jnr.22777.
- Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*. 2001. May;Appendix 3:Appendix 3B. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21.
- Swarup V, Phaneuf D, Bareil C, Robertson J, Rouleau GA, Kriz J, Julien JP. Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with TDP-43 genomic fragments. *Brain*. 2011. 134(9):2610–2626. doi: 10.1093/brain/awr159.
- Talbott EO, Malek AM, Lacomis D. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Handbook of Clinical Neurology*. 2016. 138:225-38. doi: 10.1016/B978-0-12-802973-2.00013-6.
- Taylor JP, Brown RH Jr, Cleveland DW. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*. 2016. 539:197–206. doi: 10.1038/nature20413.
- Trías E, Ibarburu S, Barreto-Núñez R, Babdor J, Maciel TT, Guillo M, Gros L, Dubreuil P, Díaz-Amarilla P, Cassina P, Martínez-Palma L, Moura IC, Beckman JS, Hermine O, Barbeito L. Post-paralysis tyrosine kinase inhibition with masitinib abrogates neuroinflammation and slows disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*. 2016. Jul 11;13(1):177. doi: 10.1186/s12974-016-0620-9.
- Trías E, Ibarburu S, Barreto-Núñez R, Barbeito L. Significance of aberrant glial cell phenotypes in pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*. 2017. Jan 1;636:27-31. doi: 10.1016/j.neulet.2016.07.052. Epub 2016 Jul 26.
- Trías E, Barbeito L, Yamanaka K. Phenotypic heterogeneity of astrocytes in motor neuron disease. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*. 2018. Nov;9(4):225-234. doi: 10.1111/cen3.12476. Epub 2018 Oct 4.
- Tyson RL, Perron J, Sutherland GR. 6-Aminonicotinamide inhibition of the pentose phosphate pathway in rat neocortex. *Neuroreport*. 2000. Jun 26;11(9):1845-8.
- Urushitani M, Ezzi SA, Matsuo A, Tooyama I, Julien JP. The endoplasmic reticulum-Golgi pathway is a target for translocation and aggregation of mutant superoxide dismutase linked to ALS. *The FASEB Journal*. 2006. 22:2476-2487. doi: 10.1096/fj.07-092783.
- Valenzuela V, Oñate M, Hetz C, Court FA. Injury to the nervous system: A look into the ER. *Brain Research*. 2016. 1648:617-625. doi: 10.1016/j.brainres.2016.04.053.
- Vargas MR, Pehar M, Cassina P, Beckman JS, Barbeito L. Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR-dependent motor neuron apoptosis. *Journal of Neurochemistry*. 2006. May;97(3):687-96. Epub 2006 Mar 8.
- Verkhratsky A, Matteoli M, Parpura V, Mothet JP, Zorec R. Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: idiosyncrasies of vesicular secretion. *The EMBO Journal*. 2016. Feb 1;35(3):239-57. doi: 10.15252/embj.201592705. Epub 2016 Jan 12.
- Verkhratsky A, Nedergaard M. Physiology of Astroglia. *Physiological Reviews*. 2018. Jan 1;98(1):239-389. doi: 10.1152/physrev.00042.2016.

- Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011. 334:1081-1086. doi: 10.1126/science.1209038.
- Wegorzewska I, Bell S, Cairns NJ, Miller TM, Baloh RH. TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. 2009. 106(44):18809–18814. doi: 10.1073/pnas.0908767106.
- Weiss MD, Macklin EA, Simmons Z, Knox AS, Greenblatt DJ, Atassi N, Graves M, Parziale N, Salameh JS, Quinn C, Brown RH Jr, Distad JB, Trivedi J, Shefner JM, Barohn RJ, Pestronk A, Swenson A, Cudkowicz ME; Mexiletine ALS Study Group. A randomized trial of mexiletine in ALS: Safety and effects on muscle cramps and progression. *Neurology*. 2016 Apr 19;86(16):1474-81. doi: 10.1212/WNL.0000000000002507. Epub 2016 Feb 24.
- Welte MA. Expanding roles for lipid droplets. *Current Biology*. 2015. 25:470481. doi: 10.1016/j.cub.2015.04.004.
- Writing Group. Edaravone (MCI-186) ALS 19 Study Group. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*. 2017;16(7):505-512. DOI: 10.1016/S1474 4422(17)30115-1
- Xie L, Yang SH. Interaction of astrocytes and T cells in physiological and pathological conditions. *Brain Research*. 2015. Oct 14;1623:63-73. doi: 10.1016/j.brainres.2015.03.026. Epub 2015 Mar 23.
- Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neuroscience*. 2008. 11(3):251-253. doi: 10.1038/nn2047.
- Yamanaka K, Komine O. The multi-dimensional roles of astrocytes in ALS. *Neuroscience Research*. 2018 Jan;126:31-38. doi: 10.1016/j.neures.2017.09.011. Epub 2017 Oct 17.
- Yamamoto S, Jaiswal M, Charng WL, Gambin T, Karaca E, Mirzaa G, Wiszniewski W, Sandoval H, Haelterman NA, Xiong B, Zhang K, Bayat V, David G, Li T, Chen K, Gala U, Harel T, Pehlivan D, Penney S, Vissers LE, de Ligt J10, Jhangiani SN, Xie Y, Tsang SH, Parman Y, Sivaci M, Battaloglu E, Muzny D, Wan YW, Liu Z, Lin-Moore AT, Clark RD, Curry CJ, Link N, Schulze KL2, Boerwinkle E, Dobyns WB, Allikmets R, Gibbs RA, Chen R, Lupski JR, Wangler MF, Bellen HJ. A drosophila genetic resource of mutants to study mechanisms underlying human genetic diseases. *Cell*. 2014. 159:200–214. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.002.
- Yoshida Y, Yamanaka S. Induced Pluripotent Stem Cells 10 Years Later: For Cardiac Applications. *Circulation Research*. 2017. Jun 9;120(12):1958-1968. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311080.
- Yoshiyama Y, Zhang B, Bruce J, Trojanowski JQ, Lee VMY. Reduction of Detyrosinated Microtubules and Golgi Fragmentation Are Linked to Tau-Induced Degeneration in Astrocytes. *Journal of Neuroscience*. 2003. 23;10662–10671. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-33-10662.2003.
- Youssef SA, Capucchio MT, Rofina JE, Chambers JK, Uchida K, Nakayama H, Head E. Pathology of the Aging Brain in Domestic and Laboratory Animals, and Animal Models of Human Neurodegenerative Diseases. *Veterinary Pathology*. 2016. Mar;53(2):327-48. doi: 10.1177/0300985815623997. Epub 2016 Feb 11.
- Zador Z, Stiver S, Wang V, Manley GT. Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2009. (190):159-70. doi: 10.1007/978-3-540-79885-9_7.
- Zhang D, Hu X, Qian L, O'Callaghan JP, Hong JS. Astroglialosis in CNS pathologies: is there a role for microglia? *Molecular Neurobiology*. 2010. Jun;41(2-3):232-41. doi: 10.1007/s12035-010-8098-4. Epub 2010 Feb 12.
- Zorec R, Parpura V, Verkhratsky A. Astroglial Vesicular Trafficking in Neurodegenerative Diseases. *Neurochemical Research*. 2017. Mar;42(3):905-917. doi: 10.1007/s11064-016-2055-1. Epub 2016 Sep 14.