



Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Área Biología

Sub-área Neurociencias



**Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas**

Rol de los astrocitos en el compromiso  
neurovascular y de la sustancia blanca en dos  
patologías del neurodesarrollo

**M.Sc. Eugenia Isasi**

Neurobiología Celular y Molecular

Instituto Clemente Estable

**Orientadora:** Dra. Silvia Olivera, IIBCE

**Co-orientador:** Dr. Luis Barbeito, IPMon

**Tribunal:**

Dra. Mónica Brauer

Dra. Giselle Prunell

Dra. Nathalia Vitureira

**Montevideo, abril 2018**

## AGRADECIMIENTOS

A mi orientadora Silvia por haberme acompañado y apoyado desde mis inicios como estudiante de grado hasta culminar el doctorado, hace ya 9 años. Por haberme incentivado en el trabajo y haberme dado libertades para explorar diferentes caminos.

A mis compañeros del laboratorio del IIBCE por el apoyo humano y la colaboración científica, los que estuvieron en diferentes épocas y los que están actualmente.

A Verónica Abudara y Patricia Cassina por su apoyo humano y científico.

A los compañeros del Dpto. de Histología por el apoyo en las últimas etapas del Doctorado.

A la ANII, PEDECIBA y Facultad de Medicina por el apoyo económico.

\*\*\*\*\*

A mis padres, familia y amigos por estar siempre.

A Álvaro por la paciencia y comprensión durante estos años del Doctorado.

***Esta tesis va dedicada a mi madre y a mi tía por haberme dado todo su amor, apoyo incondicional y por haberme inculcado el valor de la perseverancia, el estudio y la investigación.***

# TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN .....	11
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	13
1. Astrocitos.....	13
1.1. Concepto y diversidad .....	13
1.2. Principales funciones.....	14
1.2.1. Rol en el desarrollo.....	15
1.2.2. Homeostasis iónica, hídrica y de pH.....	15
1.2.3. Regulación del flujo sanguíneo cerebral .....	16
1.2.4. Metabolismo energético .....	16
1.2.5. Barrera hematoencefálica (BHE) .....	16
1.2.6. Rol en la función sináptica.....	17
1.3. Respuesta de los astrocitos frente al daño: astrogliosis reactiva .....	18
1.4. Respuesta de los astrocitos frente al daño durante el neurodesarrollo.....	19
CAPÍTULO I. ALTERACIONES VASCULARES EN LA ACIDEMIA GLUTÁRICA TIPO I: ROL DE LOS ASTROCITOS Y PERICITOS.....	21
ANTECEDENTES .....	21
1. Unidad neurovascular.....	21
1.1. Concepto y componentes.....	21
1.2. Pericitos .....	21
1.2.1. Concepto y características principales .....	21
1.2.2. Principales funciones.....	24
1.2.2.1. Permeabilidad de la BHE .....	24
1.2.2.2. Angiogénesis.....	25
1.2.2.3. Flujo sanguíneo cerebral .....	25
1.2.2.4. Desecho ( <i>clearance</i> ) de detritos y productos residuales.....	25
1.2.2.5. Propiedades de células madre.....	25
1.2.2.6. Neuroinflamación.....	26
1.2.3. Disfunción de los pericitos .....	26
-Eugenia Isasi-	3

1.3. Acoplamiento neurovascular: papel de los astrocitos y pericitos .....	26
1.3.1. Astrocitos como mediadores de la respuesta neurovascular .....	27
1.3.2. Pericitos como reguladores de la contractilidad capilar .....	29
2. Vasculatura cerebral y barrera hematoencefálica .....	31
2.1. BHE: concepto y componentes.....	32
1.2. Aspectos patológicos de la BHE.....	33
3. Acidemia Glutárica tipo I .....	34
3.1. Generalidades.....	34
3.2. Modelos animales .....	36
3.2.1. Modelos farmacológicos .....	37
3.2.2. Modelo genético .....	38
3.3. Mecanismos patogénicos principales.....	39
3.3.2. Disrupción del metabolismo energético .....	41
3.3.3. Estrés oxidativo .....	41
3.3.4. Rol de la BHE en el transporte de los metabolitos de AG-I .....	42
3.4. Alteraciones vasculares en pacientes y modelos animales de AG-I .....	43
3.5. Papel de los astrocitos en AG-I.....	45
HIPÓTESIS .....	49
OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	50
1. Objetivo general .....	50
2. Objetivos específicos.....	50
ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN .....	50
MATERIALES Y MÉTODOS .....	52
1. Animales .....	52
2. Modelo farmacológico de AG-I.....	52
3. Fijación y corte de tejido .....	53
4. Ensayo de permeabilidad vascular con azul de Evans .....	53
5. Inmunohisto/citoquímica .....	54
6. Análisis de imágenes .....	55
7. Western blotting.....	56
7.1. Obtención de muestras enriquecidas en proteínas.....	57
7.2. Cuantificación de proteínas.....	57
7.3. Electroforesis SDS-PAGE y electrotransferencia .....	58
-Eugenia Isasi-	4

7.4. Bloqueo e incubación con anticuerpos .....	58
7.5. Revelado con quimioluminiscencia enzimática .....	59
8. Cultivos celulares.....	59
8.1. Cultivo primario de astrocitos .....	59
8.2. Obtención de medios condicionados de astrocitos .....	59
8.3. Cultivos primarios de pericitos.....	60
9. Ensayos funcionales con células.....	60
9.1. Análisis de viabilidad celular mediante sulforodamina B.....	60
9.2. Ensayos de migración y proliferación celular con bromodeoxiuridina.....	61
9.3. Evaluación de la contractilidad.....	61
9.4. Tratamientos con enzimas e inhibidores.....	62
9.5. Determinación de citoquinas en medios condicionados de astrocitos.....	62
10. Obtención de rodajas de cerebro <i>ex vivo</i> .....	63
11. Evaluación de la contractilidad capilar .....	63
12. Evaluación de la muerte de pericitos en rodajas <i>ex vivo</i> .....	64
13. Análisis estadístico.....	64
RESULTADOS .....	65
1. La inyección intracisternal de AG causó un aumento de la extravasación de EB en el estriado.....	65
2. EB marcó neuronas estriatales en animales inyectados con AG .....	68
3. Disminución de la expresión de AQP4 y PDGFR $\beta$ rodeando vasos sanguíneos en animales inyectados con AG.....	68
4. Expresión de laminina, ZO-1 y ocludina en animales inyectados con AG .....	69
5. AG induce la constricción de capilares en rodajas de corteza cerebral .....	69
6. AG no afecta la supervivencia de pericitos <i>ex vivo</i> o en cultivos primarios .....	74
7. Caracterización del cultivo primario de pericitos de cerebro .....	76
8. AG no afecta la contractilidad de los pericitos en cultivo .....	76
9. El medio condicionado de astrocitos induce la contractilidad de los pericitos <i>in vitro</i> .....	78
10. El medio condicionado de astrocitos tratados con AG inhibe la migración de pericitos.....	77
11. Los astrocitos tratados con AG secretan niveles aumentados de citoquinas solubles.....	81
DISCUSIÓN.....	86

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO I .....	92
CAPÍTULO II. RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS FRENTE A LA DEFICIENCIA DE HIERRO .....	94
ANTECEDENTES .....	94
1. Mielinización del SNC .....	94
2. Oligodendrocitos .....	95
2.1. Biología del oligodendrocito.....	95
2.2. Origen y desarrollo .....	96
2.3. Diferenciación y Mielinización.....	97
2.4. Vulnerabilidad del oligodendrocito frente al daño .....	99
3. Metabolismo del hierro y mielinización .....	100
3.1. Metabolismo del hierro y captación cerebral .....	100
3.2. Captación cerebral del hierro .....	102
3.3. Hierro y mielinización.....	103
4. Papel de los astrocitos en la mielinización y captación de hierro .....	105
4.1. Rol de los astrocitos en la mielinización .....	105
4.2. Papel de los astrocitos en el metabolismo del hierro .....	108
5. Deficiencia de hierro y anemia ferropénica .....	109
5.1. Alteraciones del neurodesarrollo e hipomielinización .....	111
5.2. Modelos animales de DH .....	111
5.3. Modelo farmacológico celular de DH.....	112
HIPÓTESIS .....	113
OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS .....	113
1 Objetivo general .....	113
2. Objetivos específicos .....	113
ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN .....	114
MATERIALES Y MÉTODOS .....	115
1. Modelo animal .....	115
2. Análisis hematológicos .....	115
3. Inmunohisto/citoquímica .....	116
4. Cultivos celulares.....	117
4.1. Oligodendrocitos .....	117
4.2. Cultivo primario de astrocitos de corteza cerebral .....	118
4.3. Ensayos con medios condicionados de astrocitos.....	118

4.4. Tratamiento con deferoxamina .....	118
4.5. Ensayo de 3-(4,5-dimetialdiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) .....	118
4.6. Ensayo de proliferación celular con bromodeoxiuridina.....	118
5. Análisis de imágenes .....	118
6. Análisis estadístico.....	119
RESULTADOS .....	119
1. Validación del modelo DH: anemia microcítica e hipocrómica .....	119
2. Hipomielinización en el cuerpo caloso .....	120
3. Cambio fenotípico de los astrocitos del cuerpo caloso de animales DH .....	120
4. Relación de marcadores de astrocitos y oligodendrocitos en el cuerpo caloso .....	124
5. Efectos del medio condicionado de astrocitos C y DH sobre la maduración de los oligodendrocitos.....	124
6. La DFX afecta diferencialmente la expresión de GFAP y S100 $\beta$ en astrocitos de animales controles o DH.....	127
7. La DFX reduce diferencialmente la sobrevivencia de oligodendrocitos de animales controles o DH.....	129
DISCUSIÓN.....	132
CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO II .....	136
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES.....	136
PERSPECTIVAS.....	137
REFERENCIAS.....	141

## TABLA DE ABREVIATURAS

<b>3-OHGA</b>	<b>Ácido 3-hidroxiglutámico</b>
<b>AA</b>	<b>Ácido araquidónico</b>
<b>AG</b>	<b>Ácido glutámico</b>
<b>AG-I</b>	<b>Acidemia glutámica tipo I</b>
<b>AQP4</b>	<b>Acuaporina 4</b>
<b>BHE</b>	<b>Barrera hemato-encefálica</b>
<b>BMP</b>	<b>Proteína morfogenética de hueso</b>
<b>BrdU</b>	<b>Bromodeoxiuridina</b>
<b>BSA</b>	<b>Albúmina sérica bovina</b>
<b>CNTF</b>	<b>Factor de crecimiento neurotrófico ciliar</b>
<b>CPO</b>	<b>Célula precursora de oligodendrocito</b>
<b>DFX</b>	<b>Deferoxamina</b>
<b>DH o ID</b>	<b>Deficiencia de hierro o <i>iron deficiency</i></b>
<b>DIC</b>	<b>Contraste de interferencia diferencial</b>
<b>DIV</b>	<b>Días <i>in vitro</i></b>
<b>DMT-1</b>	<b>Transportador 1 de metales divalentes</b>
<b>DPI</b>	<b>Días post-inyección</b>
<b>DPN</b>	<b>Días post-natales</b>
<b>EB</b>	<b>Evans Blue o azul de Evans</b>
<b>FBS</b>	<b>Suero fetal bovino</b>
<b>FGF-2</b>	<b>Factor de crecimiento fibroblástico 2</b>
<b>GCDH</b>	<b>Glutaril-CoA deshidrogenasa</b>
<b>GDM</b>	<b>Medio glial definido</b>
<b>GDNF</b>	<b>Factor neurotrófico derivado de la glía</b>



<b>GFAP</b>	<b>Proteína glial fibrilar ácida</b>
<b>GLUT-1</b>	<b>Transportador de glucosa 1</b>
<b>GS</b>	<b>Glutamina sintasa</b>
<b>HCP-1</b>	<b>Proteína transportadora de hemo 1</b>
<b>HIF-1</b>	<b>Factor inducible por hipoxia 1</b>
<b>HH</b>	<b>Hierro hemínico</b>
<b>HNH</b>	<b>Hierro no hemínico</b>
<b>IB4</b>	<b>Isolectina B4</b>
<b>IP</b>	<b>Ioduro de propidio</b>
<b>IRP1y2</b>	<b>Proteína reguladora de hierro 1 y 2</b>
<b>LCRa</b>	<b>Líquido cefalorraquídeo artificial</b>
<b>LIF</b>	<b>Factor inhibidor de leucemia</b>
<b>MAG</b>	<b>Glicoproteína asociada a mielina</b>
<b>MBP</b>	<b>Proteína básica de mielina</b>
<b>MC-C</b>	<b>Medio condicionado de astrocitos controles</b>
<b>MC-AG</b>	<b>Medio condicionado de astrocitos tratados con AG</b>
<b>NaC3</b>	<b>Co-transportador de dicarboxilatos dependiente de sodio 3</b>
<b>NeuN</b>	<b>Proteína nuclear neuronal</b>
<b>NG2</b>	<b>Neuroglicano 2</b>
<b>NMDG</b>	<b>Cloruro de N-metil d-glucamina</b>
<b>NO</b>	<b>Óxido nítrico</b>
<b>OAT</b>	<b>Transportador de aniones orgánicos</b>
<b>PBS</b>	<b>Búfer fosfato salino</b>
<b>PDGF</b>	<b>Factor de crecimiento derivado de plaquetas</b>
<b>PDGFR<math>\alpha</math></b>	<b>Receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas</b>

<b>PDGFR<math>\beta</math></b>	<b>Receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas</b>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	<b>Prostaglandina E2</b>
<b>PLP</b>	<b>Proteína proteolípida</b>
<b>ROS</b>	<b>Especies reactivas del oxígeno</b>
<b>RNS</b>	<b>Especies reactivas del nitrógeno</b>
<b>SD</b>	<b><i>Sprague Dawley</i></b>
<b>SNC</b>	<b>Sistema nervioso central</b>
<b>SNP</b>	<b>Sistema nervioso periférico</b>
<b><math>\alpha</math>SMA</b>	<b>alfa- actina de músculo liso</b>
<b>TGFB</b>	<b>Factor de crecimiento transformante beta</b>
<b>UNV</b>	<b>Unidad neurovascular</b>
<b>VEGF</b>	<b>Factor de crecimiento vascular endotelial</b>
<b>vWF</b>	<b>Factor de von Willebrand</b>

## RESUMEN

En la presente tesis abordamos el estudio de dos enfermedades de diferente etiología que afectan el neurodesarrollo; la Acidemia Glutárica tipo I (AG-I) y la hipomielinización por deficiencia de hierro (DH) durante la gestación y la lactancia. AG-I es una enfermedad neurometabólica hereditaria producida por la pérdida de función de una enzima vinculada al metabolismo del triptofano y la lisina causando la acumulación cerebral de ácido glutámico (AG) y sus derivados. La co-ocurrencia de altas concentraciones de los metabolitos de AG-I y de episodios desencadenantes de crisis encefalopáticas durante la niñez temprana, causan muerte neuronal estriatal aguda y neurodegeneración crónica. En ausencia de crisis, los rasgos distintivos de la enfermedad son alteraciones de la sustancia blanca, hemodinámicas y vasculares producidas por causas y mecanismos mayormente desconocidos. En la primera parte de esta tesis evaluamos algunos aspectos de las alteraciones estructurales y funcionales de la unidad neurovascular (UNV) y de la barrera hematoencefálica (BHE) en un modelo farmacológico de AG-I, focalizando el estudio en los astrocitos, pericitos y su *interacción in vitro*. Observamos que una única inyección de AG en ratas neonatas provocó alteraciones en la permeabilidad de la BHE que se asociaron con la disminución de proteínas astrocitarias y pericitarias, AQP4 y PDGFR $\beta$  presentes en la UNV. Además, en experimentos *ex-vivo* realizados en rodajas de cerebro de ratas, AG indujo la contractilidad capilar lo que explicaría la reducción del flujo sanguíneo en pacientes AG-I, a través de una señalización indirecta hacia el pericito. *In vitro*, a diferencia de los astrocitos, los pericitos parecen no ser blancos celulares directos de la acción de los metabolitos de AG-I ya que con los abordajes experimentales que hemos empleado no pudimos observar cambios funcionales o fenotípicos significativos. En cambio, el análisis de los medios condicionados de astrocitos mostró que en presencia de AG, los astrocitos aumentan la expresión de citoquinas y factores solubles que pueden repercutir sobre los pericitos retrasando su migración *in vitro*, lo cual puede tener relevancia en el contexto de la vasculogénesis cerebral durante el desarrollo y en el caso de AG-I ser uno de los mecanismos subyacentes a las alteraciones vasculares presentes.

En el segundo modelo de enfermedad del neurodesarrollo, la hipomielinización inducida por deficiencia nutricional de hierro, expusimos ratas madres a una dieta reducida en hierro durante la gestación y la lactancia. Aparte de constatar la ocurrencia de anemia ferropénica microcítica e hipocrómica severa sin otros cambios significativos en el desarrollo sistémico de las crías, se observó hipomielinización asociada a la deficiencia en la maduración de los oligodendrocitos lo que afecta directamente la producción de mielina. Como las causas de este

fenómeno aún se desconocen y como la señalización astrocitaria depende del fenotipo celular, hemos especulado si la DH podría alterar el fenotipo astrocitario repercutiendo deletéreamente en la maduración de los oligodendrocitos. En los animales DH, de acuerdo a la hipótesis formulada, hemos observado que en el cuerpo calloso, la región seleccionada de estudio por ser la comisura mielinizada considerada más importante del encéfalo, los astrocitos presentan un fenotipo más inmaduro lo cual parece repercutir en su señalización hacia otros tipos celulares. De esta manera, los astrocitos de animales DH afectan la diferenciación de los oligodendrocitos DH a través de factores solubles que aún no hemos identificado. Por otra parte, en cultivo, los astrocitos y los oligodendrocitos de animales DH y controles tienen una respuesta celular diferente frente a la presencia del quelante de hierro, deferoxamina (DFX). Mientras que frente a DFX, los astrocitos cultivados a partir de cortezas cerebrales de animales controles presentaron reactividad y hubo una muerte masiva de oligodendrocitos, las células de animales DH presentaron respuestas menores, sugiriendo que son más “resistentes” a la falta de hierro *in vitro*, posiblemente por la expresión génica diferencial de transportadores de hierro o la activación de vías celulares citoprotectoras tal como se reporta en la literatura. En suma, en los modelos experimentales de ambas patologías del neurodesarrollo los astrocitos mostraron un fenotipo inmaduro y cambios en su señalización extracelular que parecen afectar la comunicación con otros tipos celulares como los pericitos en el caso de AG-I u oligodendrocitos en el modelo de DH.

# INTRODUCCIÓN GENERAL

## 1. Astrocitos

### 1.1. Concepto y diversidad

Los astrocitos, o células “estrelladas” como fueron denominadas por von Lenhossék en 1893, son células polarizadas pertenecientes a la macroglía no mielinizante, que presentan procesos que contactan con células de origen mesodérmico como las células endoteliales y los pericitos y otros procesos en estrecho contacto con las prolongaciones neuronales y las sinapsis (Verkhrastky & Nedergaard, 2018). Los astrocitos representan entre el 20 y el 40% del total de células en el cerebro de los mamíferos (Herlucano et al., 2014). Su número es similar al de las neuronas, sin embargo, la relación astrocito: neurona presenta una variabilidad regional cuya relevancia funcional aún se desconoce (Kahkh & Sofroniew, 2015). Desde el punto de vista evolutivo, el número, la complejidad y la diversidad de células astrogiales se ha incrementado considerablemente. La neocorteza humana contiene múltiples subtipos de astrocitos que son más grandes, estructuralmente más complejos y diversos que los presentes en roedores (Oberheim et al., 2009). Los astrocitos protoplasmáticos humanos GFAP positivos son 2.6 veces más grandes, tienen 10 veces más cantidad de procesos primarios y propagan 4 veces más rápido las ondas de calcio, respecto de los astrocitos de roedores (Oberheim et al., 2009).

Los astrocitos presentan múltiples y finas prolongaciones y se clasifican en dos grupos principales en base a sus características morfológicas y su localización. Los astrocitos protoplasmáticos o de tipo I se localizan en la sustancia gris y presentan numerosas prolongaciones cortas y muy ramificadas, en tanto los astrocitos fibrosos o tipo II se localizan en la sustancia blanca y se caracterizan por tener prolongaciones más largas delgadas y menos ramificadas (Sofroniew & Vinters, 2010). Ambos subtipos de astrocitos contactan con los vasos sanguíneos y con la superficie pial. Al día de hoy se conoce una multiplicidad de moléculas y marcadores astrocitarios que permiten evidenciar diferentes sub-poblaciones de astrocitos a nivel del SNC (ver revisión Verkhrastky & Nedergaard, 2018). La proteína ácida fibrilar glial (GFAP, del inglés, *Glial Fibrillary Acidic Protein*) fue el primer marcador molecular asociado con astrocitos, aunque no está presente en todos ellos y sus niveles de expresión pueden variar según la región del cerebro. GFAP es expresado además por la glía radial en el SNC y por otros tipos celulares presentes en órganos periféricos (Sofroniew & Vinters, 2010). Por otro lado, la expresión de GFAP en astrocitos aumenta frente al daño del SNC mientras que en el tejido

sano muchos astrocitos pueden expresar niveles no detectables (Sofroniew & Vinters, 2010; Kahkh & Sofroniew, 2015). Los astrocitos negativos a GFAP pueden ser identificados mediante microscopía electrónica o utilizando otros marcadores como la proteína de unión al calcio S100 $\beta$ , la enzima glutamina sintetasa (GS) o la isoforma L1 de la aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1L1).

También se observan diferencias en la expresión de otras proteínas astrocitarias a lo largo del SNC. Por ejemplo, mientras que el transportador de glutamato GLT-1 es más abundante en el hipocampo, la corteza cerebral y el estriado, el transportador GLAST tiene mayor expresión en el cerebelo (Lehre, 1995). La conexina 30 es expresada por los astrocitos de la sustancia gris pero no por los de la sustancia blanca y el canal de potasio Kir4.1 se expresa poco en los astrocitos de la sustancia blanca y en forma variable en los astrocitos de sustancia gris (Nagy et al., 1999). Análisis recientes utilizando transcriptómica a gran escala han fortalecido la noción de la diversidad molecular de los astrocitos en las diferentes regiones del SNC y de los perfiles transcripcionales producidos por diferentes estímulos (Zhang et al., 2014).

## **1.2. Principales funciones**

Los astrocitos desarrollan numerosas funciones esenciales para la homeostasis del SNC en distintos niveles: molecular, celular, metabólico, orgánico y sistémico (Figura 1). A diferencia de las neuronas, los astrocitos no generan ni propagan potenciales de acción a lo largo de sus procesos (Sofroniew & Vinters, 2010). Sin embargo, presentan cierto grado de excitabilidad ya que aumentan la concentración de calcio intracelular de forma regulada (Charles et al., 1991; Cornell-Bell et al., 1990). El incremento de calcio intracelular es de importancia funcional en la comunicación astrocito-astrocito así como también en la comunicación astrocito-neurona y en el acoplamiento neurovascular. La elevación del calcio intracelular puede ocurrir por la liberación del ión desde los compartimientos intracelulares o por su ingreso a través de canales permeables a calcio y es desencadenada por neurotransmisores liberados durante la actividad neuronal (Volterra & Meldolesi, 2005; Verkhrastky & Nedergaard, 2018). Además, las señales de calcio pueden propagarse a células vecinas a través de uniones *gap* constituidas por conexinas las cuales forman un sincitio eléctrico y funcional. En este sentido, las redes gliales interactúan con los circuitos neuronales adicionando un nivel de complejidad en la interacción neurona-glía (Giaume & Liu, 2012).

### **1.2.1. Rol en el desarrollo**

Los astrocitos cumplen importantes funciones durante el desarrollo de la sustancia gris y blanca. A modo de guía, contribuyen con la migración de los axones en desarrollo y de algunos neuroblastos (Powell & Geller, 1999). Además, participan en la formación y función de sinapsis así como también en el refinamiento sináptico (Barres, 2008; Sloan & Barres, 2014). Comparten precursores con los oligodendrocitos en el SNC y poseen funciones en la diferenciación y maduración de los oligodendrocitos (Sloan & Barres, 2014).

### **1.2.2. Homeostasis iónica, hídrica y de pH**

Los procesos astrocitarios envuelven a todas las sinapsis y cumplen un rol esencial en el mantenimiento de la homeostasis hídrica, iónica y del pH del fluido intersticial. La membrana de los astrocitos tiene diferentes lanzaderas de protones, incluyendo, el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , transportadores de bicarbonato y de ácidos monocarboxílicos, los cuales contribuyen a regular el pH extracelular (Sofroniew & Vinters, 2010). Además, los procesos astrocitarios que rodean las sinapsis juegan un rol esencial en la homeostasis de neurotransmisores expresando altos niveles de transportadores de glutamato, GABA y glicina, permitiendo eliminar los neurotransmisores de la hendidura sináptica y regulando el *pool* disponible de los mismos. Algunos de estos neurotransmisores son metabolizados en el interior del astocito a través de enzimas específicas como la glutamina sintetasa (GS) (Verkhrastky & Nedergaard, 2018). La membrana de los podocitos astrocitarios que rodean los vasos sanguíneos presenta varias características particulares; tiene una alta densidad de canales permeables al agua conocidos como acuaporina 4 (AQP4) y de canales de potasio Kir4.1, importantes en la homeostasis iónica y en la regulación del volumen del SNC (Abbott et al., 2006). Por otra parte, algunos componentes de la membrana basal de la microvasculatura, como la agrina, el  $\alpha$ -dístroglicano y la  $\alpha$ -sintrofina, son esenciales para la distribución de AQP4 y Kir 4.1 a nivel de los podocitos astrocitarios por lo que existe una comunicación física entre la membrana basal y los pies terminales astrocitarios que determina una polaridad estructural de los astrocitos (Abbott et al., 2006). Dado que la actividad neuronal normal conlleva un aumento del  $\text{K}^+$  extracelular y que el metabolismo glucosídico produce una importante tasa de generación de agua, el reciclado de los iones y la remoción y excreción del agua, son fundamentales para la homeostasis del SNC. En este sentido, el astrocito cumple un rol esencial ya que es capaz de captar el  $\text{K}^+$  extracelular, en los sitios de sinapsis, y eliminarlo a nivel de los podocitos (un mecanismo de tamponamiento espacial de  $\text{K}^+$ ) (Kofuji & Newman, 2004). Por último, el astrocito al captar  $\text{K}^+$ , a través de distintos transportadores y recibir una ganancia neta de

iones, aumenta la concentración de agua por ósmosis que luego es eliminada a nivel de los podocitos, hacia el líquido intersticial (Amiry-Moghaddam et al., 2003).

### **1.2.3. Regulación del flujo sanguíneo cerebral**

Debido a su localización estratégica, los astrocitos son células esenciales en el acoplamiento entre la actividad neuronal y el flujo sanguíneo (Abbott et al., 2006; Attwell et al., 2010). Para ello, tienen procesos (podocitos o pies terminales) que están en contacto con vasos sanguíneos mientras que otros se encuentran rodeando las sinapsis. Los astrocitos producen y liberan varios mediadores moleculares tales como ácido araquidónico (AA), prostaglandinas, óxido nítrico y ATP que son capaces de modular el diámetro de los vasos sanguíneos y el flujo sanguíneo de manera coordinada (Iadecola & Nedergaard, 2007; Koehler et al., 2009; Attwell et al., 2010; Mishra, 2016)

### **1.2.4. Metabolismo energético**

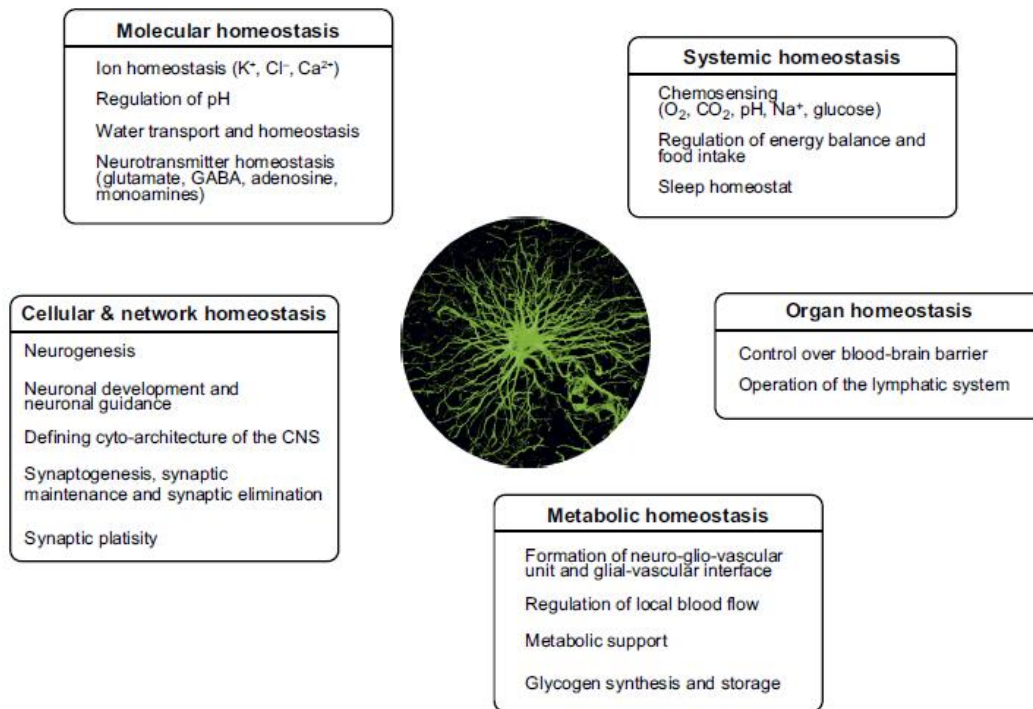
Los astrocitos contribuyen al metabolismo del SNC de diversas maneras. Son capaces de acumular granos de glucógeno en su citoplasma presentando la mayor acumulación en áreas de alta densidad sináptica (Peters et al., 1970). El glucógeno astrocitario puede mantener la actividad neuronal durante la hipoglicemia y en períodos de alta actividad neuronal dado que puede metabolizarse a lactato y transferirse posteriormente a otros elementos neurales donde es utilizado como sustrato del metabolismo aeróbico (Pellerin et al., 2007). Este eflujo de lactato desde los astrocitos es esencial para la obtención de sustratos metabólicos ya que durante la actividad neuronal alta, la fosfofructoquinasa neuronal permanece inhibida bloqueando la glucólisis neuronal como posible suplemento energético (Occhipinti et al., 2009).

### **1.2.5. Barrera hematoencefálica (BHE)**

Los astrocitos participan en la inducción y mantenimiento de la BHE (Haseloff et al., 2005; Abbott et al., 2006). Se ha demostrado que el co-cultivo de astrocitos y células endoteliales o el tratamiento de células endoteliales de la microvasculatura cerebral con medios condicionados de astrocitos, induce la formación de uniones ocluyentes, el aumento de la resistencia eléctrica transendotelial y el incremento de actividad de la gamma-glutamyltranspeptidasa y de la expresión del transportador de glucosa GLUT-1 (Tao-Cheng et al., 1987; Haseloff et al., 2005). Entre los varios factores importantes en la inducción y mantenimiento de la BHE, los astrocitos pueden liberar el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ , del inglés, *Transforming*



*Growth Factor  $\beta$* ) y el factor neurotrófico derivado de glía (GDNF, del inglés, *Glial-Derived Neurotrophic Factor*) que son importantes para la formación de uniones ocluyentes en células endoteliales en cultivo (Abbott et al., 2006; Haseloff et al., 2005). Por su parte, las células endoteliales también envían señales a los astrocitos ya que sintetizan y liberan el factor inhibidor de leucemia (LIF, del inglés, *Leukemia Inhibitory Factor*), que promueve la diferenciación astrocitaria (Mi et al., 2001).



**Figura 1.** [Extraído de Verkhrasty & Nedergaard, 2018]. **Funciones homeostáticas de la astroglia en todos los niveles: molecular, metabólico, celular, orgánico y sistémico.**

### **1.2.6. Rol en la función sináptica**

Los astrocitos cumplen un rol directo en la transmisión sináptica a través de la liberación regulada de moléculas sinápticamente activas incluyendo glutamato, purinas (ATP y adenosina), GABA y D-serina (Perea et al., 2009; Sofroniew & Vinters, 2010). La liberación de estas sustancias, denominadas gliotransmisores, ocurre en respuesta a cambios de la actividad sináptica e involucra un incremento de la concentración de calcio intracelular en astrocitos (Halassa et al, 2007; Perea et al., 2009). Estas evidencias han sido parte del sustento de la hipótesis de sinapsis tripartita, la cual propone que los astrocitos cumplen un rol activo e

interactivo con las neuronas durante la actividad sináptica (Araque et al., 1999; Perea et al., 2009).

Además de la liberación de gliotransmisores, los astrocitos pueden liberar factores de crecimiento y otras moléculas que pueden influenciar la actividad sináptica y la remodelación y refinamiento sináptico en el SNC sano y en respuesta al trauma u otras patologías (Barres, 2008, Sloan & Barres, 2014).

### **1.3. Respuesta de los astrocitos frente al daño: astrogliosis reactiva**

Los astrocitos responden a diversas condiciones traumáticas y patológicas del SNC, experimentando un conjunto de cambios moleculares, celulares y funcionales que en su conjunto se conocen como astrogliosis reactiva. Los estudios realizados en los últimos años han concluido que la reactividad astrocitaria no es un fenómeno simple y único en su manifestación, sino que se trata de un proceso que presenta diferentes grados que incluye desde alteraciones reversibles en la expresión génica con hipertrofia celular, hasta la formación de una cicatriz glial con remodelación permanente del tejido (Pekny & Pekna, 2014). Los cambios que experimentan los astrocitos reactivos varían dependiendo de la severidad del insulto de forma gradual y continua; pueden involucrar tanto la pérdida como ganancia de funciones específicas y son regulados por multiplicidad de señales inter e intracelulares (Sofroniew 2009; Sofroniew & Vinters, 2010; Sofroniew, 2014).

La astrogliosis no es una simple respuesta celular estereotipada, si no que comprende un espectro de cambios potenciales finamente regulado (Sofroniew & Vinters, 2010; Sofroniew 2014). Algunos autores categorizan la astrogliosis reactiva en suave, moderada, severa difusa y severa con formación de cicatriz glial (Sofroniew & Vinters, 2010; Sofroniew, 2014). A pesar de la existencia de características comunes en las distintas formas de la astrogliosis tales como la sobre-expresión de GFAP y la hipertrofia celular, estos cambios pueden variar y ser pequeños o muy intensos. De hecho, señales pro-inflamatorias en cultivos de astrocitos pueden alterar sustantivamente el perfil transcripcional sin producir cambios en GFAP (Hamby et al., 2012).

Además de existir una gran heterogeneidad de astrocitos en distintas regiones del SNC sano y dentro de una misma región (Zhang & Barres, 2010), también existe una heterogeneidad de respuestas en los astrocitos reactivos a varios niveles: expresión génica, proliferación celular, morfología, topografía (respecto del sitio de lesión), fisiología (Anderson et al., 2014). Los astrocitos exhiben un amplio rango de cambios en la expresión de genes que aumentan o

disminuyen en respuesta a señales de daño *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo, quimioquinas o citoquinas, moléculas de señalización o factores de transcripción, entre muchos otros (Sofroniew, 2014).

La astrogliosis es inducida, regulada o modulada por una multiplicidad de señales extracelulares, desde pequeñas moléculas como purinas, neurotransmisores y hormonas esteroideas, hasta grandes polipéptidos, factores de crecimiento, citoquinas o proteínas asociadas a la neurodegeneración como el péptido  $\beta$  amiloide (Sofroniew, 2014). Estas moléculas actúan sobre un repertorio variable de receptores desencadenando cascadas de segundos mensajeros y respuestas celulares. Además, las propiedades intrínsecas de los astrocitos individuales tales como mecanismos epigenéticos o polimorfismos genéticos de receptores, segundos mensajeros o proteínas reguladoras, podría impactar en la astrogliosis (Sofroniew & Vinters, 2010; Sofroniew, 2014).

La capacidad de los astrocitos reactivos para responder de diferentes maneras a distintas señales moleculares, implica una heterogeneidad funcional que puede tener efectos detrimentales o beneficiosos (Sofroniew & Vinters, 2010) dependiendo del contexto. Por ejemplo, ciertas respuestas de astrocitos reactivos pueden ser beneficiosas en el contexto de una infección bacteriana y detrimentales en el contexto de daño traumático o isquémico (Anderson et al., 2014).

Es importante enfatizar que la astrogliosis no ocurre como un fenómeno aislado, sino que es parte de una respuesta multicelular coordinada del SNC frente al daño, que también involucra a otros tipos de células gliales, neuronas y células no neuronales que interactúan entre sí (Sofroniew, 2014). En este sentido, los astrocitos forman parte de estas interacciones; reciben y envían señales que influyen a otras células (Sofroniew, 2014).

#### **1.4. Respuesta de los astrocitos frente al daño durante el neurodesarrollo**

Los astrocitos desempeñan roles cruciales durante el desarrollo del SNC, contribuyendo a la coordinación fina necesaria para el establecimiento de las redes neuronales, el desarrollo sináptico normal y la poda sináptica a través de una comunicación astrocito-neurona muy finamente regulada en tiempo y en espacio (Sloan & Barres, 2014). A su vez, la astrogénesis depende de la señalización que realizan las neuronas recientemente formadas. En este contexto de influencia mutua, se ha propuesto que alteraciones en la diferenciación o en la función de los astrocitos pueden alterar la coordinación entre los distintos eventos del

desarrollo lo que puede tener un papel en el origen y sostenimiento de las enfermedades del neurodesarrollo (Sloan & Barres, 2014). Más aún, dado que la mayoría de las células gliales surgen de divisiones clonales, si el daño ocurre durante la astrogénesis o las primeras generaciones de astrocitos, éste podría ser perpetuado y amplificado por las descendencias clonales (ver revisión Olivera et al., 2016).

Algunas evidencias al respecto se encuentran en los llamados errores innatos del metabolismo, enfermedades que son producidas por mutaciones genéticas que alteran rutas bioquímicas produciendo exceso de sustancias nocivas o deficiencia de compuestos normales que en ambos casos producen efectos tóxicos al cerebro y las neuronas (Olivera et al., 2016) ya sea por toxicidad directa o mediados por una disfunción primaria en las células gliales (Sloan & Barres, 2014). Ejemplos de este último caso son las denominadas astrocitopatías, donde las rutas bioquímicas son primariamente alteradas en astrocitos. Subsecuentemente, el daño producido en astrocitos desencadena mecanismos corriente abajo que dañan neuronas y oligodendrocitos mediante diversos mecanismos que incluyen excitotoxicidad, acidosis láctica, privación energética, estrés oxidativo o nitro-oxidativo o neuroinflamación, (Maragakis & Rothstein, 2006; De Keyser et al., 2008; Olivera et al., 2016).

Más aún, el desbalance de rutas enzimáticas predominantemente astrocitarias como la de la glutamina sintasa puede ocasionar distintas enfermedades que afectan sobre todo al SNC (neurometabólicas) ya sea por defecto o por exceso de los productos enzimáticos, fundamentalmente la glutamina. En el caso de exceso de actividad GS, como en la encefalopatía hepática que presenta manifestaciones neuropsiquiátricas severas, la sobrecarga de glutamina produce hinchazón (*swelling*) de los astrocitos que desencadena diversas rutas que incluyen la activación de receptores NMDA, la elevación de calcio intracelular y la excitotoxicidad de glutamato, todo ello resultando en un círculo que se retroalimenta causando excitotoxicidad y estrés oxidativo que puede matar neuronas por un lado y perpetuar la reactividad astrocitaria por otro (De Keyser et al., 2008; Butterworth, 2010). Contrariamente, la pérdida de función de la GS que impide la síntesis de compuestos nitrogenados y ocasiona la acumulación de amoníaco, produce un síndrome congénito muy raro que causa muerte neonatal asociado a severas malformaciones cerebrales, incluyendo formación anormal de las áreas corticales y lesiones en la sustancia blanca (Haberle et al., 2011). Por lo cual, la funcionalidad correcta de los astrocitos es determinante para el funcionamiento apropiado de todo el SNC.

# CAPÍTULO I. ALTERACIONES VASCULARES EN LA ACIDEMIA GLUTÁRICA TIPO I: ROL DE LOS ASTROCITOS Y PERICITOS

## ANTECEDENTES

### 1. Unidad neurovascular

#### 1.1. Concepto y componentes

La unidad neurovascular (UNV) comprende células vasculares (células endoteliales, pericitos y musculares lisas), terminaciones neuronales y astrocitos que actúan de forma organizada modulando sus funciones recíprocamente (Hawkins & Davis, 2005). En la Figura 2 se ilustran los componentes de la UNV desde el nivel capilar hasta las arteriolas piales. Dentro de este grupo también se puede incluir a la microglía ya que cumplen un papel importante en el mantenimiento de la función tanto de las neuronas como de los vasos sanguíneos, contribuyendo así a la homeostasis cerebral. La comunicación orquestada entre los distintos tipos celulares que componen la UNV contribuye a procesos tales como la angiogénesis, formación y mantenimiento de la BHE, la regulación del flujo sanguíneo cerebral, el acoplamiento neurotrófico y angiogénico / neurogénico (Zlokovic, 2008; Engelhardt & Sorokin, 2009). Diversos componentes estructurales entre los que se incluyen las uniones en hendidura, las proteínas de anclaje y los canales iónicos especializados (AQP4, canales de K<sup>+</sup>, canales TRP), contribuyen a la interacción célula- célula dentro de la UNV (ver revisión Filosa et al., 2016).

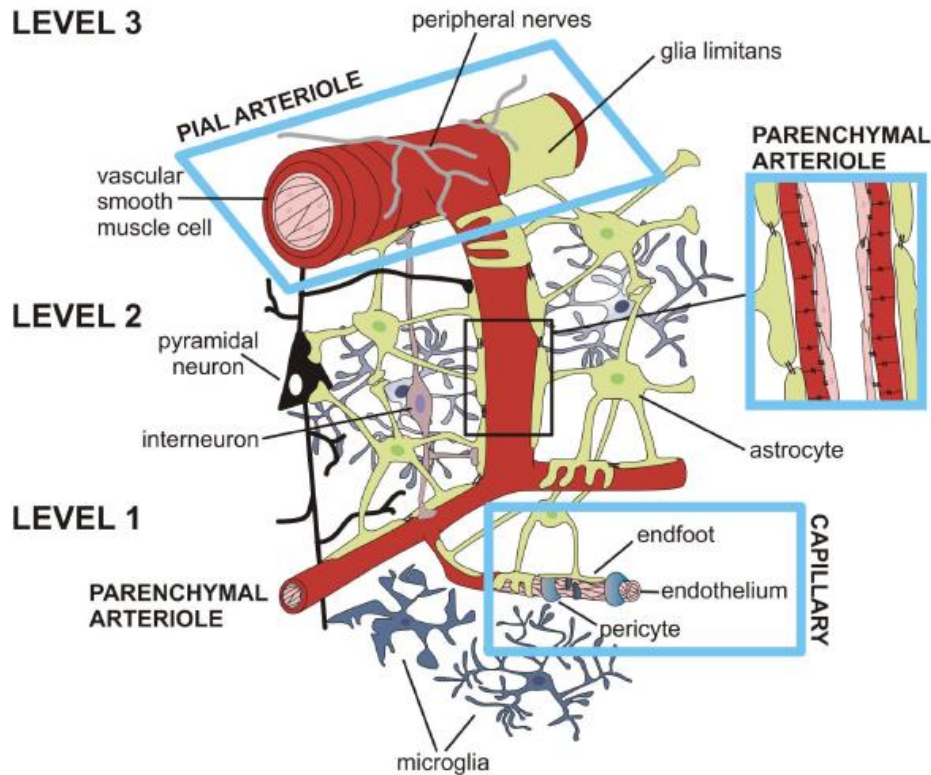
#### 1.2. Pericitos

##### **1.2.1. Concepto y características principales**

Los pericitos fueron descritos por primera vez por Eberth y Rouget como células espacialmente aisladas que aparecen como una protuberancia lateral en el exterior de los capilares tanto en los tramos rectos como en los puntos de ramificación (*bump-on-a-log morphology*). Inicialmente conocidos como células de Rouget, el término pericito fue acuñado por Zimmermann en 1923 dada su cercanía con las células gliales quien propuso diversos subtipos basados en su morfología, localización y función (Attwell et al., 2016). Los pericitos rodean y envuelven a las células endoteliales por lo que además se conocen como células murales de los microvasos sanguíneos. Están localizados predominantemente en capilares y escasamente distribuidos en vénulas y arteriolas. Si bien están presentes en la mayoría de los

tejidos del organismo, se estima que la densidad mayor se encuentra en la retina y en la corteza cerebral (donde cubren hasta un 40 y un 30% de la superficie capilar, respectivamente (Frank et al., 1987; Shepro & Morel, 1993).

Los pericitos son células aplanadas, de núcleo ovalado, que extienden numerosas



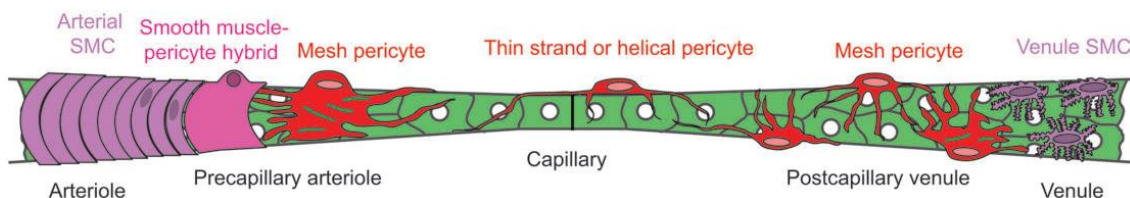
**Figura 2.** [Extraído y adaptado de Filosa et al. (2016)]. **Ilustración representativa de los constituyentes de la UNV desde el nivel capilar hasta las arteriolas piales.** El diagrama ilustra, de forma simplificada, varios puntos de control (niveles 1-3) a través del árbol cardiovascular. A nivel capilar (nivel 1) que representa el sitio inicial para el acoplamiento neurovascular, los principales constituyentes de la UNV son: células endoteliales, pericitos, astrocitos y neuronas. En el nivel 2, los principales constituyentes de la UNV son: la capa de músculo liso vascular que forman las arteriolas parenquimales, los pericitos (no ilustrados) y los procesos astrocitarios y neuronales. En el nivel 3, el endotelio está rodeado de múltiples capas de células musculares lisas vasculares formando parte de las arteriolas piales, procesos astrocitarios alrededor formando la glía limitans y terminaciones nerviosas perivasculares que ingresan desde los ganglios periféricos.

prolongaciones a lo largo del eje longitudinal y rodeando la circunferencia de capilares. Los procesos circunferenciales son más numerosos en el extremo arteriolar del lecho capilar mientras que los procesos más longitudinales son más frecuentes en el medio del lecho capilar y la morfología estrellada en el extremo venular de los capilares (Hartmann et al., 2015) (Figura 3).

Los pericitos expresan diversas proteínas contráctiles y del citoesqueleto incluyendo la alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA, del inglés, *alpha Smooth Muscle Actin*), vimentina, desmina, miosina y nestina, además de antígenos de superficie como el proteoglicano NG2 (del inglés, *Neuroglican 2*), el receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR $\beta$ , del inglés, *Platelet Derived Growth Factor  $\beta$* ), aminopeptidasa A y N, entre otras, algunas de las cuales también son expresadas por las células musculares lisas vasculares (ver revisiones Winkler et al., 2011; Sweeney et al, 2016).

Estudios realizados con ratones transgénicos expresando proteínas fluorescentes bajo el control de los promotores de NG2, PDGFR $\beta$  y  $\alpha$ SMA, han permitido identificar diferentes subpoblaciones de pericitos a lo largo del lecho microvascular en base a su morfología, localización y expresión de  $\alpha$ SMA (Hartmann et al., 2015; Hill et al., 2015). Sin embargo, han surgido controversias respecto de si las células  $\alpha$ SMA positivas contráctiles presentes en las arteriolas precapilares se definen como células musculares lisas o como pericitos. En la revisión de Attwell y cols. (2016) se aclara este concepto aceptando la definición de Zimmerman que incluye todas las formas transicionales y se definen tres subtipos diferentes de pericitos (Figura 3) : i- los pericitos híbridos con las células musculares lisas: cercanos a las arteriolas, expresan más  $\alpha$ SMA, poseen mayor cantidad de procesos circunferenciales y están involucrados en la regulación del flujo sanguíneo cerebral; ii- los pericitos helicoidales: presentes en la región media de lecho capilar que expresarían menos  $\alpha$ SMA y cumplirían un papel importante en el mantenimiento de la BHE; y iii- los pericitos “en malla”: cercanos a las vénulas que regularían el ingreso de células del sistema inmune al parénquima.

Los pericitos se originan durante el desarrollo embrionario a partir de células madre mesenquimales derivadas del mesodermo y células de la cresta neural derivadas del neuroectodermo (Winkler et al., 2011). Durante la vascularización del SNC, los pericitos migran y son reclutados hacia los tubos capilares en formación, gracias a factores quimotácticos



**Figura 3.** [Extraído y adaptado de Hartmann et al. (2015)]. **Diversidad morfológica de los pericitos en el lecho microvascular.** Esquema basado en las imágenes microscópicas de proteínas fluorescentes bajo el control de los promotores de NG2 y PDGFR $\beta$ .

secretados por el endotelio (Hellstrom et al., 1999; Stratman et al., 2010). En la vida adulta, nuevos pericitos se generan por proliferación o por migración y diferenciación in situ de células madre mesenquimales circulantes en la sangre, según lo observado experimentalmente en modelos de isquemia (Kokovay & Cunningham, 2006; Winkler et al., 2011).

### **1.2.2. Principales funciones**

Los pericitos del SNC contribuyen a la estabilidad mecánica de la microvasculatura, son capaces de sintetizar componentes de la matriz extracelular (colágeno tipo IV, glicosaminoglicanos y laminina), y de promover la diferenciación y quiescencia de las células endoteliales (Lai & Kuo, 2005; von Tell et al., 2006; Armulik et al., 2010). De hecho, las células endoteliales y los pericitos están en estrecho contacto, a través de uniones *gap*, uniones ocluyentes y contactos de tipo *peg and socket* (Armulik et al., 2005; von Tell et al., 2006).

A partir de modelos genéticos de ratones deficientes en PDGF-B y PDGFR- $\beta$ , surgieron claras evidencias acerca del rol de los pericitos en la homeostasis vascular del SNC. Durante el desarrollo del embrión, PDGF-B es producido en el endotelio, mientras que PDGFR- $\beta$  es expresado en pericitos y músculo liso vascular (Lindahl et al., 1997). Los ratones homocigotos y mutantes nulos para PDGF-B y PDGFR- $\beta$ , mueren antes de nacer como consecuencia de la disfunción vascular, las hemorragias microvasculares y el edema, además de presentar anomalías cardíacas y renales (Lindahl et al., 1997; Hellstrom et al., 2001). La ausencia de pericitos rodeando la microvasculatura, se correlacionó con hiperplasia endotelial, microaneurismas e hiperpermeabilidad a nivel de la BHE, aunque la densidad, longitud y ramificación de los vasos no presentó cambios (Hellstrom et al., 2001). La interacción entre el PDGF-B endotelial y su receptor en la membrana del pericito, estimula la proliferación, migración y reclutamiento de pericitos hacia la pared de los nuevos vasos (Stratman et al., 2010).

#### **1.2.2.1. Permeabilidad de la BHE**

Los pericitos controlan la expresión de proteínas de uniones estrechas y adherentes interendoteliales y la transcitosis pinocítica (Daneman et al., 2010; Armulik et al., 2010). Pericitos cultivados sobre células endoteliales en monocapa, inhiben la permeabilidad a moléculas hidrofílicas e incrementan la resistencia eléctrica transendotelial (Dente et al., 2001). Durante el desarrollo embrionario, los pericitos son fundamentales en la formación de la BHE y son reclutados en los vasos nacientes, al menos una semana antes de la generación de la astrogliá (Daneman et al., 2010). Los pericitos no solamente regularían la expresión de genes



específicos de la BHE, si no también inducirían la polarización de los podocitos astrocitarios rodeando los vasos sanguíneos (Armulik et al., 2010).

#### **1.2.2.2. Angiogénesis**

Los pericitos sintetizan y liberan factores de crecimiento y moléculas capaces de regular la permeabilidad, la maduración y estabilidad vascular, y la angiogénesis (Lai & Kuo., 2005; Dore-Duffy & La Manna, 2007). A través de TGF- $\beta$ , del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) y de las angiopoyetinas 1 y 2; los pericitos regulan la angiogénesis (Dore-Duffy & La Manna, 2007).

#### **1.2.2.3. Flujo sanguíneo cerebral**

Los pericitos son células contráctiles capaces de regular el flujo sanguíneo en respuesta a cambios en la actividad neural (Peppiatt et al., 2006; Hall et al., 2014; Mishra et al., 2016) ya que expresan filamentos contráctiles y proteínas asociadas como  $\alpha$ -SMA, miosina, tropomiosina y quinasas dependientes de GMPc. Además, expresan receptores para una variedad de sustancias vasoactivas, incluyendo, noradrenalina, acetilcolina, histamina, serotonina, angiotensina II, endotelina-1, entre otros (ver revisión Hamilton et al., 2010).

#### **1.2.2.4. Desecho (*clearance*) de detritos y productos residuales**

Los pericitos son células presentadoras de antígenos que pueden cumplir una función fagocítica ya que expresan marcadores del linaje monocito/macrófago e importantes cantidades de fosfatasa ácida a nivel lisosomal (Kreuger & Bechmann, 2010). Son capaces de fagocitar detritos y proteínas foráneas inyectadas sistémica y/o localmente en el SNC y participar del *clearance* de productos residuales deletéreos como el  $\beta$ -amiloide en un modelo murino de Alzheimer (Sagare et al., 2013).

#### **1.2.2.5. Propiedades de células madre**

Los pericitos aislados de la microvasculatura cerebral tienen la capacidad de transformarse en células madre pluripotenciales y de diferenciarse en células gliales y neuronas. A partir de un cultivo primario de pericitos aislados de cerebro de rata mantenidos en un medio de cultivo sin suero y en presencia del factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2, del inglés, *Fibroblast Growth Factor 2*), se obtuvieron neuroesferas que fueron capaces de diferenciarse en astrocitos, neuronas y oligodendrocitos (Dore-Duffy et al., 2006; 2008). Asimismo, otros estudios realizados con pericitos procedentes de otras regiones del organismo (hígado, piel,

testículo, pulpa del diente) mostraron que son células progenitoras capaces de diferenciarse en distintos tipos celulares y eventualmente regenerar tejidos (Dore-Duffy, 2008).

#### **1.2.2.6. Neuroinflamación**

Los pericitos controlan la adhesión y tráfico leucocitario en el SNC (Wang et al., 2010) y además presentan activación inmunológica, es decir, frente a estímulos pro-inflamatorios desencadenan cambios en la expresión de citoquinas, interleuquinas y moléculas de adhesión indicando un papel activo en la neuroinflamación (Jansson et al., 2014)

#### **1.2.3. Disfunción de los pericitos**

La degeneración de pericitos juega un rol en la disfunción cerebrovascular que acompaña a enfermedades neurológicas complejas como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer (Sagare et al., 2013), la esclerosis lateral amiotrófica (Winkler et al., 2013), la microangiopatía y retinopatía asociada a la diabetes tipo 2 y la arteriopatía autosómica dominante cerebral con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (conocida por sus siglas en inglés como CADASIL) (ver revisión Sweeney et al., 2016). La degeneración de los pericitos conduce a la rotura de la BHE causando la acumulación de moléculas neurotóxicas derivadas de la sangre (Winkler et al., 2012; 2014). En la isquemia, los pericitos se contraen y mueren *en rigor* obstruyendo el flujo sanguíneo capilar (Yemisci et al., 2009; Hall et al., 2014). Por otra parte, defectos genéticos específicos en genes codificantes para las proteínas PDGFR $\beta$  y PDGF-B, producto de mutaciones autosómicas dominantes, pueden conducir a la enfermedad idiopática de calcificación de los ganglios basales conocida como síndrome de Fahr (Nicolás et al., 2013).

### **1.3. Acoplamiento neurovascular: papel de los astrocitos y pericitos**

El cerebro humano constituye el 2% de la masa corporal pero consume más del 20% de sustratos metabólicos (oxígeno y glucosa) y recibe cerca del 15% del gasto cardíaco de todo el organismo (Magistretti et al., 1999; Attwell et al., 2010). Este consumo energético alto es importante para el correcto funcionamiento del cerebro y es empleado, mayoritariamente, para mantener las concentraciones iónicas intra y extracelulares necesarias para la generación de potenciales sinápticos y potenciales de acción (Attwell et al., 2010). Para satisfacer estas demandas, el cerebro ha desarrollado mecanismos de acoplamiento neurovascular que le permiten incrementar el flujo sanguíneo en regiones donde las neuronas están activas; lo que se denomina hiperemia funcional.

Durante la hiperemia funcional el aumento en la actividad neuronal resulta en una respuesta vasodilatadora local y transitoria que conduce a un suministro mayor de glucosa y oxígeno en áreas que tienen demandas metabólicas aumentadas (Filosa et al., 2016). La hiperemia funcional activa, entre las múltiples vías, algunas que involucran la señalización directa de las neuronas hacia los vasos sanguíneos (Cauli & Hamel, 2010) mientras que en otras los astrocitos actúan como células intermediarias (Attwell et al., 2010; Mishra et al., 2016). Los estudios iniciales sobre acoplamiento neurovascular se enfocaron en definir la señalización directa desde las neuronas hacia las células musculares lisas vasculares. La activación glutamatérgica de neuronas puede desencadenar la producción y liberación de sustancias vasoactivas como el óxido nítrico y prostaglandinas que inducen la dilatación arteriolar (Attwell et al., 2010). Además, la vasculatura intracortical está innervada por terminales nerviosas de regiones subcorticales que pueden liberar neurotransmisores vasoactivos como acetilcolina, serotonina, dopamina y noradrenalina (Hamel, 2006; Cauli & Hamel, 2010). Asimismo, las arterias piales también reciben terminales nerviosas desde el Sistema Nervioso Periférico que pueden controlar su contracción o dilatación (Hamel, 2006). Sin embargo, la innervación vascular desde centros subcorticales y axones periféricos está distribuida extensamente en todo el cerebro y vasculatura pial, respectivamente, sugiriendo que este nivel de regulación podría generar cambios regionales del flujo sanguíneo pero no locales (Mishra, 2017).

### **1.3.1. Astrocitos como mediadores de la respuesta neurovascular**

Los astrocitos cumplen una importante función en el acoplamiento del flujo sanguíneo con la actividad neuronal regulando la hiperemia cerebral; la vasodilatación y vasoconstricción, a través de su señalización autócrina y parácrina hacia otros tipos celulares de la UNV (Iadecola & Nedergaard, 2007; Attwell et al., 2010; Filosa et al., 2016). Los astrocitos se posicionan idealmente para conducir información bidireccional entre las neuronas y los vasos sanguíneos ya que contactan cientos de sinapsis y sus procesos conocidos como podocitos cubren más del 99% de la superficie de los vasos sanguíneos cerebrales (Kacem et al., 1998, Simard & Nedergaard, 2004, Mathiisen et al., 2010). Por otra parte, como los dominios astrocitarios no se solapan entre sí (Bushong et al., 2002), un único astrocito sería capaz de ejercer múltiples funciones a la vez; incluyendo la modulación de la transmisión sináptica, el acoplamiento neurovascular y el mantenimiento de la homeostasis iónica, entre otras funciones (Verkhrastky & Nedergaard, 2018). Los astrocitos están acoplados a través de uniones en hendidura lo cual permite la formación de un sincitio celular a través del cual las señales llegan a diferentes regiones (Giaume & Liu, 2012). Este acoplamiento físico es una vía eficiente para la

propagación y amplificación de señales a través de redes neurales por un lado (Giaume et al., 2010) y además sirve de ruta para conducir información corriente arriba hacia la circulación pial (Figuroa & Duling, 2009).

Estudios *ex vivo* realizados en rodajas de corteza e hipocampo sugieren que el glutamato es la principal señal que activa la respuesta neurovascular (Fergus & Lee, 1997). Trabajos pioneros realizados por el grupo de Carmignoto mostraron que la estimulación neuronal desencadena una respuesta vasodilatadora arteriolar dependiente de la activación de receptores metabotrópicos glutamatérgicos, que es precedida por la activación del calcio astrocitario (Zonta et al., 2003). A nivel mecanístico los autores proponen que la prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) es la señal vasodilatadora derivada de la glía (Zonta et al., 2003). Estos resultados fueron corroborados *in vitro* e *in vivo* por diversos autores quienes demostraron que los cambios en los niveles de calcio intracelular en los astrocitos producen la liberación de metabolitos del ácido araquidónico (AA) (Zonta et al., 2003; Takano et al., 2006; Koehler et al., 2009). Además, el incremento de calcio astrocitario contribuye a la generación de otras sustancias vasoactivas como óxido nítrico, ácidos epoxieicosatrenoicos, glutamato, adenosina y ATP, todos ellos capaces de modular el tono vascular arteriolar (ver revisiones Filosa et al., 2016; Mishra et al., 2017). Recientemente, Mishra et al. (2016) demostraron que el incremento intracelular de calcio en los astrocitos en respuesta a la actividad neuronal, depende del ingreso de calcio a través de canales regulados por ATP y de la posterior activación de la fosfolipasa D2 y la diacilglicerol quinasa generando ácido araquidónico y PGE<sub>2</sub>. Por el contrario, la dilatación arteriolar depende de la producción de óxido nítrico neuronal resultante de la activación de receptores NMDA, sugiriendo que existen diferentes cascadas de señalización regulando el flujo sanguíneo cerebral a nivel capilar y a nivel arteriolar.

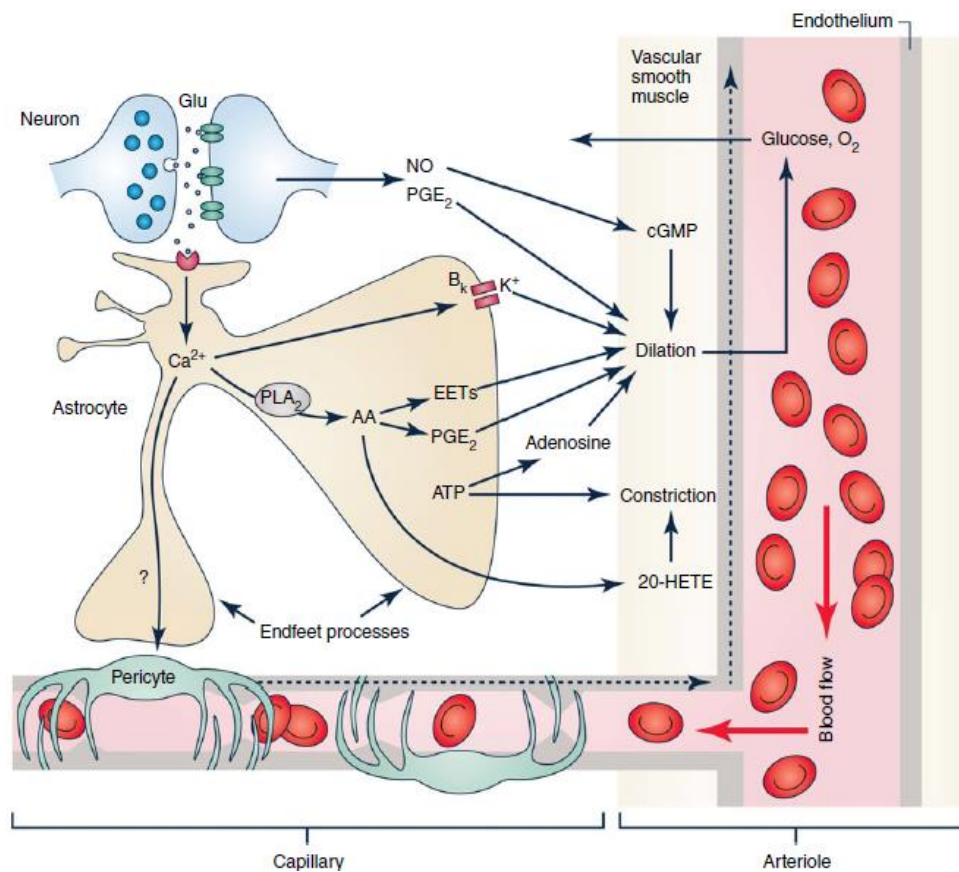
Sin embargo, pese a que la mayoría de los trabajos evidencian un efecto vasodilatador mediado por los astrocitos en respuesta a la actividad neuronal, algunos estudios muestran resultados contradictorios donde el incremento de calcio astrocitario produce constricción arteriolar (Mulligan & MacVicar, 2004). Posteriormente, se reportó que la respuesta vascular frente a la activación astrocitaria dependería de la concentración de oxígeno del perfusato que a la vez altera el estado metabólico del tejido (Gordon et al., 2008). La estimulación neuronal produce un incremento de lactato que, a bajas concentraciones de oxígeno, inhibe a los transportadores de prostaglandinas favoreciendo la disponibilidad extracelular de PGE<sub>2</sub> y la vasodilatación (Chan et al., 2002). Por el contrario, a concentraciones de oxígeno suprafisiológicas (95% O<sub>2</sub>) se

producen bajos niveles de lactato y por lo tanto una reducción de la disponibilidad extracelular de  $PGE_2$  favoreciendo la vasoconstricción (Gordon et al., 2008), sugiriendo que existen mecanismos dependientes del oxígeno que pueden afectar la respuesta neurovascular en preparaciones aisladas de cerebro. Contrariamente a estos resultados, otros estudios *in vivo* constataron únicamente una respuesta vasodilatadora frente a la estimulación neuronal independientemente de los niveles de oxígeno (Mishra et al., 2011), sugiriendo que la dependencia de la respuesta neurovascular con la concentración de oxígeno es un fenómeno que ocurre *in vitro* pero no *in vivo*. Otros autores confirmaron efectos vasodilatadores o vasoconstrictores dependiendo de la magnitud del incremento de calcio en los podocitos astrocitarios y del potasio extracelular (Girouard et al., 2010). En este sentido, el hecho de que algunos trabajos muestren dilataciones evocadas por la activación glial y en otros, constricciones, plantea la posibilidad de un control bidireccional de la vasculatura mediado por los astrocitos. Sin embargo, aún se desconocen las condiciones que determinan una respuesta u otra y cómo se regulan estos mecanismos *in vivo*. Por otra parte, además del rol del AA y sus metabolitos en la vasodilatación o vasoconstricción, otros mediadores como el ATP y la liberación de potasio a través de los canales  $B_k$  activados por calcio, pueden jugar un papel en la señalización del astrocito hacia la vasculatura (Filosa et al., 2016; Mishra, 2017). En la Figura 4 se muestran varias vías de señalización que participan en el acoplamiento neurovascular mediado por el astrocito.

### **1.3.2. Pericitos como reguladores de la contractilidad capilar**

La modulación del diámetro vascular y por ende de la resistencia vascular y del flujo sanguíneo está controlada por células murales que poseen propiedades contráctiles entre las que se incluyen los pericitos. Los pericitos expresan proteínas contráctiles (Hirschi & D'Amore, 1996) y canales iónicos y receptores que modulan sus niveles intracelulares de calcio y su estado contráctil. Estas células responden a numerosas señales vasoconstrictoras como el ATP, la dopamina, la angiotensina II, la noradrenalina y el 20-HETE y son capaces de relajarse frente a señales como NO/GMPc, adenosina y  $PGE_2$  (ver revisión Hamilton et al., 2010).

Varios estudios sugieren que los capilares son los sitios principales de regulación del flujo sanguíneo ya que aproximadamente el 84% de la modulación del flujo sanguíneo cerebral tiene lugar a nivel de los capilares terminales donde los pericitos son las células murales predominantes (Hall et al., 2014).



**Figura 4.** [Extraído de Mishra, 2017]. **Vías que participan en el acoplamiento neurovascular.** La actividad neuronal resulta en la liberación de glutamato activando tanto a neuronas post-sinápticas como a los astrocitos. Los mensajeros neuronales tales como el NO y PGE<sub>2</sub> pueden dilatar directamente a las arteriolas cerebrales. La activación de los astrocitos desencadena una cascada de vías de señalización. La activación dependiente de calcio de los canales B<sub>k</sub> puede llevar a la liberación de K<sup>+</sup> extracelular y la dilatación vascular. El calcio puede activar a la fosfolipasa A<sub>2</sub>, provocando la síntesis y liberación de metabolitos del AA que son vasodilatadores (EETs y PGE<sub>2</sub>). El AA también puede ser liberado por los astrocitos y ser metabolizado en las células musculares lisas a 20-HETE, poderoso vasoconstrictor. La liberación de ATP desde los astrocitos puede directamente contraer a los vasos sanguíneos o ser metabolizado por ectonucleotidasas, aumentando los niveles de adenosina, un vasodilatador. Mientras que algunas moléculas vasoactivas generadas por los astrocitos pueden contribuir a mantener el tono basal (ej: ATP y PGE<sub>2</sub>), otras están involucradas en los cambios del diámetro vascular en respuesta a la actividad neuronal y median en el fenómeno de hiperemia funcional.

Sin embargo, otros estudios realizados en corteza y retina sugieren que la contractilidad del pericitio ocurre pero no es muy significativa para el control del flujo sanguíneo (Fernández-Klett, 2010; Hill et al, 2015). Por lo tanto, hasta ahora, se desconoce con exactitud la contribución relativa del pericitio respecto de la célula muscular lisa vascular en la regulación del flujo sanguíneo cerebral y la secuencia de eventos y los mecanismos que gobiernan los distintos niveles de auto-regulación del flujo sanguíneo cerebral. No obstante, las propiedades físicas de la pared capilar (delgada, compresible y distensible) y la resistencia causada por las

propiedades intrínsecas de las células musculares lisas permiten sugerir que la dilatación capilar evocada por los pericitos probablemente ocurra antes que en la arteriola. En este aspecto, Hall et al. (2014) demostraron que los pericitos son los elementos vasculares que primero se dilatan durante la actividad neuronal siendo los iniciadores de la respuesta funcional ante la señal nerviosa. Los mismos autores destacan que la mayoría de las neuronas están más próximas a los capilares (8.4  $\mu\text{m}$  de distancia en el hipocampo) que a las arteriolas (70  $\mu\text{m}$ ), sugiriendo que la llegada de señales neuronales para ajustar el flujo sanguíneo a las demandas metabólicas, es más rápida hacia los pericitos que hacia las arteriolas (Hall et al., 2014).

Por otro lado, Hall et al. (2014) mostraron que la constricción de los pericitos puede causar una disminución del flujo sanguíneo cerebral que se mantiene aún con la re-apertura de la arteria bloqueada luego del infarto. Luego de un evento de isquemia, los pericitos mueren contraídos (*en rigor*), estado que está mediado por el glutamato pero no por la producción de radicales libres. La muerte de los pericitos *en rigor* sería responsable de la disminución del flujo sanguíneo de forma sostenida así como también de la ruptura de la BHE.

## **2. Vasculatura cerebral y barrera hematoencefálica**

El sistema vascular cerebral, comprendiendo la micro y macrovasculatura, ocupa del 25 al 30% del volumen cerebral y es fundamental para el intercambio de nutrientes y metabolitos entre la sangre y el parénquima. A través de factores solubles secretados por el endotelio, el sistema vascular cerebral cumple un rol en la diferenciación neuronal, el crecimiento axonal y el mantenimiento de los nichos neurogénicos (Shen et al., 2004; Dugas et al, 2008).

La vascularización del SNC en mamíferos comienza por la invasión de células endoteliales desde los plexos perineurales hacia el neuroectodermo (Riseau, 1997). En la corteza cerebral de rata, la angiogénesis comienza en el día embrionario 13 cuando las células endoteliales invaden el tejido nervioso a partir del plexo capilar pial (Daneman et al., 2010; Marín-Padilla, 2012). En los vasos perineurales, el endotelio es inicialmente fenestrado y durante el proceso de migración hacia el neuroectodermo ocurre la inducción del fenotipo endotelial característico de la BHE: endotelio continuo y presencia de uniones ocluyentes (Haseloff et al., 2005). Durante el desarrollo embrionario tardío de los roedores, la BHE ya es funcional y es capaz de excluir proteínas y macromoléculas del SNC (Saunders et al., 2000). La BHE madura gradualmente con el desarrollo del SNC y durante las primeras etapas, cuando la astrogliá está ausente, los pericitos cumplen un rol fundamental en su inducción. En ratas jóvenes de 15 días postnatales

(PN 15), la permeabilidad aún no es totalmente selectiva, pero a PN 28 o PN 30 la funcionalidad de la BHE está completamente establecida y la resistencia eléctrica transendotelial alcanza el máximo valor (Butt et al., 1990; Xu & Ling, 1993).

### **2.1. BHE: concepto y componentes**

La BHE es una barrera física celular entre los capilares y el parénquima que regula el flujo de moléculas entre la sangre y el SNC asegurando la homeostasis y correcta función del SNC. Está compuesta por células endoteliales especializadas que recubren el interior de los vasos sanguíneos y desde la luz hacia afuera por pericitos inmersos en la membrana basal, astrocitos, microglía, oligodendrocitos y neuronas, todos ellos conformando la UNV. La BHE no existe en algunas áreas cerebrales vascularizadas denominadas órganos circumventriculares (hipófisis posterior, la eminencia media, el área postrema, la glándula pineal y el órgano subfornical) donde el endotelio presenta características similares a las de otros lechos microvasculares sistémicos incluyendo fenestraciones, vesículas pinocíticas y pérdida de la continuidad celular (Ballabh et al., 2004).

La BHE, más que una barrera pasiva, es un complejo metabólico activo, con múltiples bombas, transportadores, receptores de neurotransmisores y citoquinas, esenciales para el funcionamiento del SNC (Zlokovic, 2008). Las células endoteliales de la microvasculatura cerebral tienen una alta resistencia eléctrica, una baja actividad pinocítica y una relación mitocondria/citoplasma alta debido a la elevada actividad metabólica (Abbott et al., 2006). Presentan complejos de unión intercelular de tipo ocluyente, que involucra proteínas de unión como las ocludinas, claudinas y proteínas de anclaje al citoesqueleto de actina, que causan una restricción al pasaje paracelular de solutos hidrofílicos. La ocludina (65KDa) es una proteína integral de membrana que es altamente expresada en células endoteliales de la microvasculatura cerebral. Su nivel de expresión y estado de fosforilación se asocia con la permeabilidad de la BHE ya que estabiliza y refuerza las uniones estrechas (Persidsky et al., 2006). Por otro lado, también se expresan las claudinas (sobre todo las isoformas 3 y 5, 20-24 KDa) que comparten una localización celular similar con la ocludina y son responsables de la formación primaria de la unión estrecha (Perisdsky et al., 2006). La ocludina y las claudinas están conectadas al citoesqueleto de actina, a través de proteínas de anclaje como las *zonula occludens* 1, 2 y 3 (ZO-1, ZO-2 y ZO-3).

Además de la barrera física, la BHE constituye una barrera enzimática capaz de metabolizar drogas y nutrientes. Esta barrera está constituida por diversas enzimas (la gamma-glutamil



transpeptidasa, la fosfatasa alcalina, la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, el citocromo P450, entre otras) que están en alta concentración en la microvasculatura cerebral en comparación con la microvasculatura de otras regiones (Pardridge, 2005). Por otra parte, la célula endotelial cerebral presenta una polaridad estructural y funcional entre su membrana plasmática luminal y abluminal que contribuye al funcionamiento de la BHE. Por ejemplo, las enzimas gamma-glutamil transpeptidasa, fosfatasa alcalina y glicoproteína P (transportador, con actividad ATPasa, importante en el eflujo de drogas del SNC) están presentes en la región luminal, en tanto el transportador de aminoácidos dependiente de sodio, la enzima  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPasa y el transportador de glucosa GLUT-1, se distribuyen principalmente en la región abluminal (Abbott et al., 2006). En este sentido, las uniones ocluyentes no solamente cumplen un rol fundamental limitando el pasaje paracelular de solutos, sino que también permiten segregar el dominio de membrana luminal del abluminal, convirtiendo al endotelio en un conjunto de células polarizadas. Subyacente a las células endoteliales polarizadas, se encuentra la membrana basal, con un espesor de 20-200nm, constituida fundamentalmente por lamininas, colágeno tipo IV, heparán sulfato y nidógenos (Engelhardt & Sorokin, 2009). Las lamininas son glicoproteínas heterotriméricas en forma de cruz constituidas por distintas isoformas de cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  que conforman un componente biológicamente activo de la membrana basal capaz de interactuar con receptores presentes en distintos tipos celulares como células endoteliales, astrocitos o pericitos (Engelhardt & Sorokin, 2009).

## **1.2. Aspectos patológicos de la BHE**

La correcta función de la BHE es esencial para mantener la homeostasis del SNC, actuando como una barrera física que limita el pasaje de moléculas desde la sangre hacia el parénquima y regulando el influjo y eflujo de nutrientes y otros metabolitos. En diversas condiciones patológicas como en la hipoxia-isquemia, inflamación, enfermedades neurodegenerativas, metabólicas, desmielinizantes o tumorales, se han reportado alteraciones de la permeabilidad y función de la BHE (Ballabh et al., 2004; Abbott et al., 2010; Luissint et al., 2012). En modelos de hipoxia-isquemia, *in vitro* e *in vivo*, se ha observado que el aumento de VEGF y de óxido nítrico, influye en la disrupción de las uniones estrechas, aumento de la permeabilidad de la BHE y formación de edema cerebral (Mark & Davis, 2002; Persidsky et al., 2006). Enfermedades neurológicas con un componente neuroinflamatorio como la Esclerosis Múltiple, la Enfermedad de Alzheimer o la Esclerosis Lateral Amiotrófica, presentan alteraciones en la expresión y función de las uniones estrechas, debido a los efectos sobre la célula endotelial de citoquinas, quimioquinas, radicales libres, entre otros; liberados por microglía activada y

astroglía reactiva (Persidsky et al., 2006; Zlokovic, 2008). Diversos trabajos sobre enfermedades del SNC y disfunción de la BHE, han dado luz acerca de posibles mecanismos moleculares involucrados en la disrupción de la misma, incluyendo la fosforilación de residuos de serina/treonina o tirosina, modificaciones post-traduccionales y degradación o translocación de las proteínas que conforman las uniones estrechas (Luissint et al., 2012). Preservar la integridad de la unidad neurovascular, considerando la importancia de las células perivasculares, es un objetivo terapéutico para combatir varias enfermedades del SNC.

### **3. Acidemia Glutárica tipo I**

#### **3.1. Generalidades**

La Acidemia Glutárica tipo I (AG-I) es una enfermedad neurometabólica hereditaria producida por la deficiencia en la enzima mitocondrial glutaril-CoA deshidrogenasa (GCDH). Esta enzima participa del catabolismo de los aminoácidos esenciales L-lisina, L-hidroxilisina y L-triptófano y su deficiencia produce una acumulación de ácidos orgánicos como el glutárico (AG), el 3-hidroxisglutárico (3-OHAG), el glutacónico (menos frecuente) y la glutarilcarnitina en el cerebro y otros fluidos corporales (suero, orina y líquido cefalorraquídeo) de pacientes. AG-I fue descrita por primera vez en 1975 por Goodman y colaboradores (Goodman et al., 1975) y clínicamente se caracteriza por presentar macrocefalia, distonías y disquinesias con degeneración estriatal, en particular, de los núcleos caudado y putamen (Goodman et al., 1975; Strauss et al., 2003; Funk et al., 2005).

AG-I tiene una prevalencia mundial estimada de 1 cada 100.000 nacimientos (Lindner et al., 2004). No obstante, esta enfermedad tiene mayor prevalencia (hasta 1: 300) en poblaciones cerradas como la comunidad Amish en Pensilvania (EEUU) (Morton et al., 1991), los indígenas Oji-Cree en Canadá (Haworth et al., 1991) y los Lumbee en Carolina del Norte (Basinger et al., 1996).

AG-I es causada por una mutación en el gen que codifica para la enzima GCDH y que se encuentra localizado en el cromosoma 19p13.2 (Greenberg et al., 1995). Se han descrito más de 200 mutaciones que ocasionan distintos grados de reducción de la actividad enzimática de GCDH (Goodman et al., 1998). La mutación R402W en el exón 10 es la más frecuente (representa un 20% de las mutaciones) y retiene solamente un 3% de la actividad enzimática (Goodman et al., 1998). Otras mutaciones como la A421V en el exón 11, preservan hasta un 40% de la actividad enzimática residual (Goodman et al., 1998). No existiría una correlación

entre el fenotipo bioquímico de la enfermedad y el genotipo determinante de la actividad enzimática residual, ya que paradójicamente se han encontrado pacientes con mutaciones severas en ambos alelos y con niveles normales de metabolitos en orina (Christensen et al., 2004). En base a la excreción urinaria de AG, se han definido dos subgrupos de pacientes: excretadores de altos o bajos niveles (Baric et al., 1999). Pacientes que excretan bajos niveles de AG tienen el mismo riesgo de sufrir daño estriatal que los excretadores de altos niveles (Christensen et al., 2004; Kölker et al., 2006). Por lo tanto, hay otros factores no genéticos, como la presencia de infecciones, fiebre, ayunos prolongados, entre otros, que podrían precipitar las crisis encefalopáticas y el daño neuronal en AG-I. El diagnóstico de la enfermedad se realiza mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC/MS) midiendo AG y 3-OHAG en orina o por espectrometría de masa en tándem (MS/MS) cuantificando acilcarnitina (glutaril-carnitina) en plasma. Dado que los pacientes que excretan bajos niveles de estos metabolitos pueden no ser detectados con el uso de estas técnicas, se recomienda emplear otros métodos más precisos como el análisis mutacional de GCDH y la determinación de la actividad enzimática en fibroblastos (Baric et al., 1999; Kolker et al., 2011).

Clínicamente, los niños con AG-I se caracterizan por presentar macrocefalia desde el nacimiento o poco tiempo después (Funk et al., 2005). El 90% de los pacientes que no son tratados, desarrollan síntomas neurológicos entre los 3 y 36 meses de vida, luego de una crisis encefalopática aguda precipitada por enfermedades virales, infecciosas, fiebres intercurrentes, inmunización o intervenciones quirúrgicas (Hoffmann et al., 1996). La secuela neurológica principal luego de la crisis es la injuria estriatal, con pérdida neuronal severa, que causa síntomas motores importantes (Funk et al., 2005, Harting et al., 2009). La distonía generalizada es el síntoma extrapiramidal principal (Hoffmann et al., 1996) que con la edad evoluciona hacia una distonía fija y parkinsonismo rígido-aquínético (Gitiaux et al., 2008). Mediante resonancia magnética y tomografía computada, se han descrito varios cambios estructurales en el desarrollo del cerebro de pacientes AG-I que incluyen macrocefalia, hipoplasia o atrofia de los lóbulos temporales y frontales, ensanchamiento de las cisuras de Silvio, atrofia de los núcleos caudado y putamen, presencia de higromas subdurales, hemorragias subdurales o retinianas y distintos grados de mielinopatías (Neumaier-Probst et al., 1995; Hoffmann et al., 1996; Knapp et al., 2002; Twomey et al., 2003; Strauss et al., 2003; Singh et al., 2011).

A pesar de que se considera una aciduria orgánica cerebral, recientes publicaciones han demostrado que el sistema nervioso periférico (Herskovitz et al., 2013) y los riñones también

podrían estar afectados por mecanismos que aún se desconocen (Kolker et al., 2015; du Moulin et al., 2017).

Los pacientes que sufren crisis encefalopáticas tienen una altísima morbilidad y mortalidad (Hoffmann et al., 1996). Por otro lado, un bajo porcentaje de pacientes AG-I no sufren crisis encefalopáticas, sin ningún tratamiento dietario preventivo, y algunos comienzan a manifestar síntomas de la enfermedad en la adolescencia o adultez (Bahr et al., 2002; Kulkens et al., 2005; Kolker et al., 2011). Los pacientes de comienzo tardío de la enfermedad presentan leucoencefalopatías severas, manifestando variedad de síntomas neurológicos como dolores de cabeza o síntomas óculo-motores, entre otros (Bahr et al., 2002; Kulkens et al., 2005).

El diagnóstico temprano de AG-I es muy importante, ya que el comienzo de un tratamiento dietario, en niños pre-sintomáticos, durante los primeros meses de vida, puede prevenir las crisis encefalopáticas y los síntomas neurológicos (Monavari & Naughten, 2000; Strauss et al., 2003). El *screening* de glutarilcarnitina en gotas de sangre seca por MS/MS en recién nacidos ha sido incorporado en varios países (Loeber et al., 2012), teniendo una buena relación costo-efectividad (Pfeil et al., 2013).

El tratamiento dietario con bajo contenido de lisina complementado con L-carnitina y riboflavina y un tratamiento de emergencia durante episodios de enfermedad intercurrente es la estrategia que se utiliza en la mayoría de los pacientes diagnosticados (Kolker et al., 2011). El tratamiento de emergencia que se aplica siempre que exista una crisis, consiste en una alta ingesta calórica, reducción transitoria o total del consumo de proteínas naturales (durante 24-48 h) y administración de suero o líquidos parenterales (Monavari & Naughten, 2000; Strauss et al., 2003). La nueva guía de recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de AG-I fue recientemente publicada (Boy et al., 2017). A pesar de que el pronóstico de los pacientes tratados tempranamente mejora sustancialmente, un tercio de pacientes que son adherentes al tratamiento, presentan igualmente injuria estriatal y discapacidades severas a largo plazo (Strauss et al., 2003). Por otro lado, se ha reportado que pacientes diagnosticados tempranamente y con tratamiento dietario, presentan discapacidades motoras finas y cognitivas, aún no habiendo sufrido crisis encefalopáticas, lo cual es confirmatorio de una toxicidad crónica en AG-I (Beauchamp et al., 2009; Jafari et al., 2011).

### **3.2. Modelos animales**

Se han empleado distintas estrategias experimentales, empleando modelos animales

farmacológicos y el genético con el objetivo de comprender la fisiopatología de esta enfermedad y contribuir al desarrollo de herramientas terapéuticas.

### **3.2.1. Modelos farmacológicos**

Se han utilizado distintas vías de administración de AG y sus metabolitos en ratas y ratones de distintas edades con el fin de reproducir la sintomatología de la enfermedad y estudiar sus mecanismos patogénicos. Dado que el estriado es una de las regiones cerebrales más vulnerables frente a concentraciones tóxicas de estos ácidos, la inyección intraestriatal unilateral de AG (0.4- 4  $\mu$ moles) o de 3-OHAG (1.4- 6  $\mu$ moles) fue una estrategia utilizada para estudiar los efectos comportamentales y la neurotoxicidad de estos metabolitos (Lima et al., 1998; de Mello et al., 2001). La inyección de AG produjo un comportamiento rotacional hacia el lado contralateral de la inyección y convulsiones clónicas dependientes de la dosis, que fueron prevenidas con la administración previa de DNQX (antagonista de receptores no-NMDA) y muscimol (agonista de receptores GABA-A), sin observarse efectos con MK801 (antagonista de receptores NMDA) (Lima et al., 1998). Por otro lado, la administración de 3-OHAG también indujo convulsiones clónicas y daño estriatal dependientes de la dosis, pero dichos efectos fueron prevenidos con la administración previa de MK801 y muscimol (de Mello et al., 2001). Por lo tanto, la neurotransmisión glutamatérgica no dependiente de receptores NMDA y la neurotransmisión gabaérgica estarían involucradas en el comportamiento inducido por AG (Lima et al., 1998). Por su parte, el 3-OHAG podría inducir un daño excitotóxico a través de los receptores NMDA (de Mello et al., 2001).

Otro modelo experimental utilizado, ha sido la inyección subcutánea de una dosis alta (5  $\mu$ mol/g) de AG de forma aguda o crónica, en ratas (Latini et al., 2007). En este modelo se observó un aumento de especies reactivas del oxígeno y una disminución de defensas antioxidantes en muestras de cerebro medio, hígado y eritrocitos, con ambos regímenes de tratamiento, sugiriendo que el estrés oxidativo participa en la toxicidad inducida por AG (Latini et al., 2007). Por otro lado, el tratamiento crónico con AG, produciría un déficit de memoria espacial de larga duración evaluado con el test de aprendizaje conocido como laberinto acuático de Morris (da Costa et al., 2008). Sin embargo, los modelos que emplean una inyección sistémica de AG o de sus metabolitos, no lograrían concentraciones significativas a nivel cerebral, según lo reportado en Sauer et al. (2006).

### 3.2.2. Modelo genético

El modelo del ratón deficiente en GCDH (Gcdh<sup>-/-</sup>) fue generado mediante la delección dirigida a los primeros siete exones del gen Gcdh en células madre embrionarias (Koeller et al., 2002). Los ratones Gcdh<sup>-/-</sup> tienen un perfil bioquímico similar al de los pacientes AG-I, presentando niveles aumentados de AG y 3-OHAG en orina, sangre y parénquima cerebral (Koeller et al., 2002). Sin embargo, estos ratones no desarrollan crisis encefalopáticas, ni presentan muerte neuronal o astrogliosis en condiciones basales o frente a estresores metabólicos como la administración de interferón alfa, lipopolisacáridos, bajas temperaturas y privación de alimento (Koeller et al., 2002). El único hallazgo patológico en el cerebro de estos ratones es la presencia de una mielino patía esponjiforme difusa a edades adultas, que remeda las anomalías de la sustancia blanca observadas en pacientes AG-I de comienzo tardío (Koeller et al., 2002). La ausencia de síntomas neurológicos y de muerte neuronal parece sugerir que los mecanismos patogénicos que operan en humanos enfermos de AG-1 y ratones Gcdh<sup>-/-</sup> son diferentes (Koeller et al., 2002; 2004).

Se realizaron varios intentos para reproducir las crisis encefalopáticas en ratones Gcdh<sup>-/-</sup>, sin resultados exitosos, hasta que el grupo de Zinnanti et al. (2006; 2007) demostró que la exposición a una dieta con alto contenido de lisina permite desarrollar una encefalopatía aguda comparable a la de los pacientes AG-I. Estos ratones acumulan AG en altas concentraciones, presentan convulsiones, parálisis, hemorragias y un 75% de mortalidad entre los 3 y 6 días luego del comienzo de la dieta (Zinnanti et al., 2006). Por el contrario, ratones adultos de 8 semanas, sobrevivieron a 6 semanas de dieta alta en lisina, presentaron menor concentración de AG y desarrollaron lesiones estriatales bilaterales (Zinnanti et al., 2006). Los autores sugirieron que la combinación del modelo genético con la dieta alta en lisina mostraba que la vulnerabilidad del cerebro frente al daño es dependiente de la edad, y que podría estar relacionada con una mayor captación de lisina a nivel cerebral en animales más jóvenes y como consecuencia una mayor acumulación de AG (Zinnanti et al., 2006). Los resultados de Zinnanti no pudieron ser reproducidos por otros grupos, incluyendo el trabajo de Sauer et al. (2015) que concluyeron que a las dosis y tratamientos reportados por Zinnanti, solo el 7% de los ratones Gcdh<sup>-/-</sup> presentó alguna sintomatología pero no desarrollaron ni lesiones estriatales ni hemorragias intracerebrales. En el mismo trabajo, se mostró en cambio, que el género, cambios en el background genético y en las dosis de lisina son factores determinantes (Sauer et al., 2015).

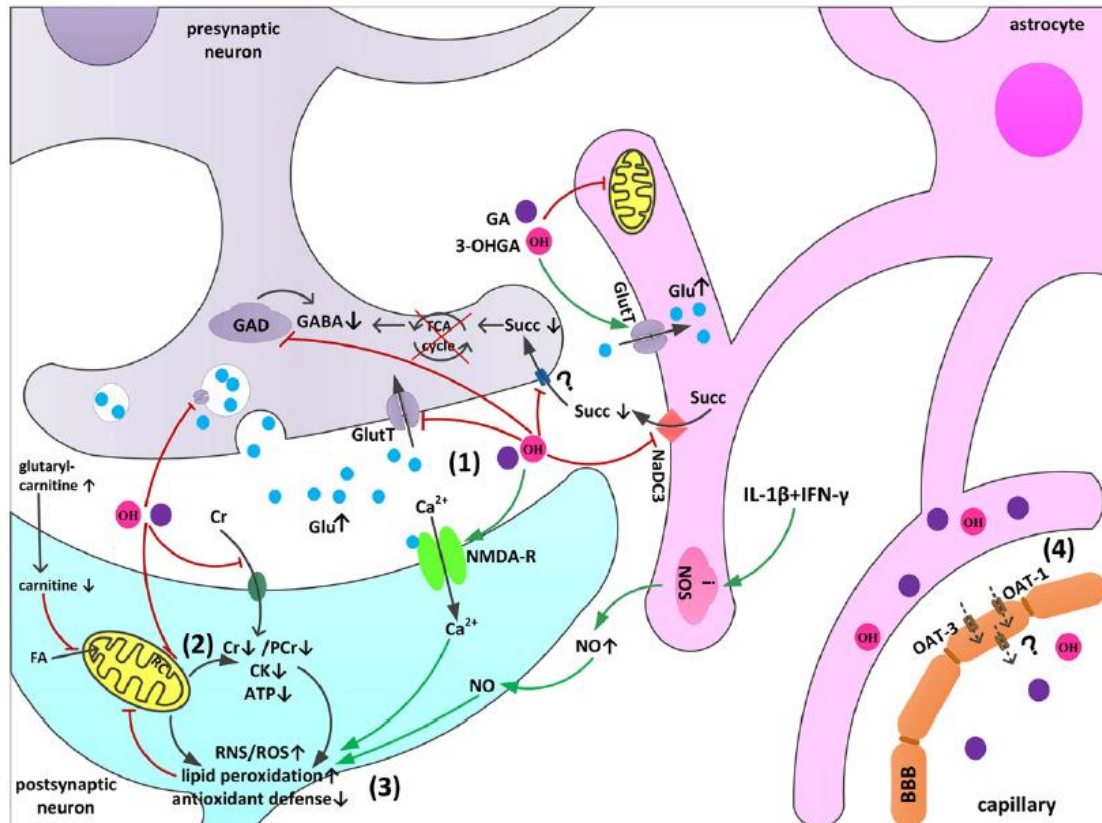
Por otro lado, para conocer los efectos bioquímicos del tratamiento dietario que se aplica en pacientes, Sauer et al. (2011) demostraron que el tratamiento con bajo contenido de lisina, redujo los niveles de AG en suero, hígado, riñón y cerebro, pero no modificó los niveles de 3-OHGA. La suplementación de L-arginina, sumado a la dieta pobre en lisina, redujo aún más los niveles de AG en cerebro e hígado, probablemente porque compite con la lisina por los sitios de unión de los transportadores de aminoácidos básicos en la BHE o en la membrana mitocondrial (Sauer et al., 2011). El complemento dietario con L-carnitina, no modificó los niveles de AG o 3-OHAG, pero aumentó el reservorio de carnitina libre en hígado y cerebro y la formación de glutaril-carnitina (Sauer et al., 2011).

### **3.3. Mecanismos patogénicos principales**

Se han descrito al menos 4 mecanismos patogénicos principales involucrados en AG-I (Figura 5): excitotoxicidad, alteración del metabolismo energético, inducción de estrés oxidativo y alteración de la hemodinámica cerebral. Por otro lado, se ha considerado de relevancia el rol de la BHE en la limitación del transporte de AG y sus metabolitos, demostrándose la presencia de GCDH en el cerebro y una síntesis local de estos metabolitos (Sauer et al., 2006; 2010).

#### **3.3.1. Excitotoxicidad**

Tanto el AG como su derivado hidroxilado 3-OHAG, son moléculas estructuralmente relacionadas al glutamato. El hecho de que el AG tenga la misma fórmula del glutamato, sin la presencia del grupo nitrogenado, llevó a pensar que la excitotoxicidad podía ser un mecanismo de daño operante en AG-1. Este mecanismo de daño celular es inducido por la sobreactivación de los receptores de glutamato, produciendo un aumento del calcio y del sodio intracelular que inducen la activación de diversas enzimas catabólicas como proteasas, fosfolipasas y endonucleasas; estimulan la producción de radicales libres y promueven la formación de óxido nítrico y peroxinitrito, que son inductores directos o indirectos de muerte. La muerte celular podrá ser necrótica o apoptótica, en función de la intensidad del estímulo causante de muerte (Dong et al., 2009). El análisis post mortem del cerebro de pacientes AG-I, muestra signos de daño neuronal excitotóxico caracterizado por vacuolización de neuronas post sinápticas y gliosis a nivel estriatal y cortical (Kolker et al., 2003). En 1987, Heyes propuso que el ácido quinolínico, producto del metabolismo del triptófano y ligando endógeno de los receptores NMDA, podría estar aumentado en pacientes, causando la neuropatología en AG-I (Heyes, 1987).



**Figura 5.** [Extraído de Jafari et al. (2011)]. **Principales mecanismos patogénicos propuestos en AG-I.** (1) Excitotoxicidad, (2) disrupción del metabolismo energético, (3) estrés oxidativo, (4) transporte limitado de AG y otros metabolitos a través de la BHE. Abreviaturas: CK (creatina quinasa), Cr (creatina), FA (ácidos grasos), GA (ácido glutámico), GAD (glutamato descarboxilasa), 3-OHGA (ácido 3-hidroxiglutarámico), Glu (glutamato), GluT (transportador de glutamato), iNOS (óxido nítrico sintasa inducible), NaDC3 (co-transportador de dicarboxilatos dependiente de sodio), NMDA-R (receptor de NMDA), NO (óxido nítrico), OAT (transportador de aniones orgánicos), Pcr (fosfocreatina), RC (cadena respiratoria), RNS (especies reactivas del nitrógeno), ROS (especies reactivas del oxígeno), Succ (succinato).

Más adelante, otros autores propusieron que la acción sinérgica del ácido quinolínico con el 3-OHAG sobre los receptores NMDA, desencadenaría la excitotoxicidad en el modelo *Gcdh*<sup>-/-</sup> (Varadkar & Surtees, 2004).

Mientras que algunos estudios *in vitro*, realizados en cultivos organotípicos hipocámpales y corticoestriales de rata o en cultivos primarios de neuronas telencefálicas de pollo, han probado el efecto excitotóxico del AG y 3-OHAG (0.1-5mM) (Kolker et al., 1999; 2000; Ullrich et al., 1999), otros estudios realizados también en cultivos neuronales corticales y estriales de rata, embrionarios o postnatales, no han observado un efecto excitotóxico ni muerte neuronal



ulterior, aún en presencia de receptores NMDA funcionales (Bjugstad et al., 2001; Lund et al., 2004; Freudenberg et al., 2004).

Recientemente, el grupo de Wajner ha demostrado un aumento en la expresión de las isoformas NR2A y B de los receptores NMDA y del transportador GLT1 desde los 7 y hasta los 60 días de vida en el estriado y/o la corteza de ratones *Gcdh*<sup>-/-</sup> sugiriendo que la neurotransmisión glutamatérgica podría estar involucrada en la fisiopatología de AG-1 y probablemente contribuya a explicar la vulnerabilidad del estriado y corteza en esta enfermedad (Lagranha et al., 2014). Es más, evidencias del mismo grupo sugieren que la sobreexpresión de NR2B está asociada con la vacuolación observada en ratones *Gcdh*<sup>-/-</sup> sometidos a dietas altas en lisina (Rodrigues et al., 2015), dando nuevos impulsos a la teoría excitotóxica en AG-1.

### **3.3.2. Disrupción del metabolismo energético**

Estudios realizados en cultivos neuronales aislados o mixtos de rata o embriones de pollo, mostraron que el AG y 3-OHAG (0.2-5 mM) inhiben distintos complejos mitocondriales, provocando una deficiencia energética moderada (Ullrich et al., 1999; Kolker et al., 2002). Otros trabajos han mostrado que AG y 3-OHAG reducen los niveles de fosfocreatina y creatina quinasa cuantificados en cultivos mixtos de corteza de rata y en el sobrenadante de cerebro medio de rata (Das et al., 2003; Ferreira da Costa et al., 2005). Dado que la fosfocreatina sirve como una fuente de fosforilos para la regeneración del ATP celular y la creatina quinasa es la enzima que cataliza dicha reacción, su disminución puede conducir a la deficiencia energética. Por otro lado, la deficiencia de carnitina en plasma, se ha reportado en pacientes AG-I (Lipkin et al., 1988). La conjugación del glutaril-CoA con la carnitina para la formación de glutarilcarnitina es un proceso fisiológico que permite el reciclado del CoA intracelular. Dado que la carnitina se conjuga con el acilo graso-CoA en el citoplasma, reacción catalizada por la enzima carnitina aciltransferasa I, y luego ingresa a la matriz mitocondrial a través del transportador acilcarnitina/carnitina, esta molécula es esencial en el transporte de acilos grasos para su oxidación a nivel mitocondrial. Por lo tanto, la disminución de carnitina intracelular podría implicar una deficiencia en la oxidación de los ácidos grasos y contribuir al déficit energético en AG-I (Lipkin et al., 1998).

### **3.3.3. Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo es el resultado de un desbalance entre la producción de radicales libres (anión superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico, peroxinitrito y radicales peroxi-lipídicos) y las defensas celulares antioxidantes (Young & Woodside, 2001; Eugenia Isasi-

Trushina et al., 2007). Pese a que las especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) son moléculas señalizadoras en varios tejidos; muchas condiciones patológicas se asocian con su producción excesiva pues tienen la capacidad de oxidar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, alterar vías de señalización y metabólicas, inducir disfunción mitocondrial, destruir membranas y organelos subcelulares por lipo peroxidación y conducir a la apoptosis celular (Young & Woodside, 2001; Trushina et al., 2007).

Varios estudios realizados *in vivo*, tanto en modelos farmacológicos como en el modelo Gcdh-/, han evidenciado un aumento de indicadores de estrés oxidativo (de Oliveira et al., 2003; Latini et al., 2007). Además, cultivos mixtos hipocampales o astrocitos aislados de rata, tratados con AG o 3-OHAG, presentan marcadores de estrés oxidativo con un aumento de ROS, inducción de iNOS y disminución del glutatión reducido intracelular (Kolker et al., 2001; Olivera et al., 2008; 2011). Este mecanismo patogénico podría ser consecuencia de la inhibición de la fosforilación oxidativa mitocondrial per se u ocurrir secundariamente a un mecanismo excitotóxico ya que la sobre-estimulación de los receptores NMDA causa un incremento del calcio intracelular y la activación de enzimas que producen ROS y RNS (Kolker et al., 2001, Jafari et al., 2011).

#### **3.3.4. Rol de la BHE en el transporte de los metabolitos de AG-I**

A pesar de que la expresión de la enzima GCDH es mucho mayor en el hígado que en el cerebro (Woontner et al., 2000) y que originalmente se pensó que AG y 3-OHAG podían ingresar al SNC a través de la BHE, se demostró que existe una síntesis de novo de estos metabolitos en el cerebro y que su eliminación está limitada, acumulándose a nivel cerebral (Sauer et al., 2006). Recientemente, se ha demostrado por inmunohistoquímica la expresión de GCDH en diferentes órganos y tejidos de ratas adultas y embriones: hígado, túbulo proximal renal, mucosa intestinal, diferentes regiones de cerebro y nervios periféricos (Braissant et al., 2017). GCDH se expresaría en todas las regiones cerebrales fundamentalmente a nivel neuronal (soma y dendritas) pero no en células gliales (Braissant et al., 2017). No obstante, cultivos de astrocitos corticales de ratones salvajes mostraron actividad GCDH y fueron capaces de producir niveles detectables por espectrometría de masa de AG y 3-OHAG (Olivera-Bravo et al., 2015). Dado que AG y 3-OHAG son compuestos polares, el eflujo de estos metabolitos a nivel de la BHE requiere de transportadores específicos como los transportadores de aniones orgánicos 1 y 3 (OAT1 y OAT3). Sin embargo, dada la baja expresión de estos transportadores en la membrana apical de las células endoteliales de los capilares cerebrales, hay un eflujo lento de dichos metabolitos, quedando atrapados en el compartimiento cerebral (Sauer et al., 2010).

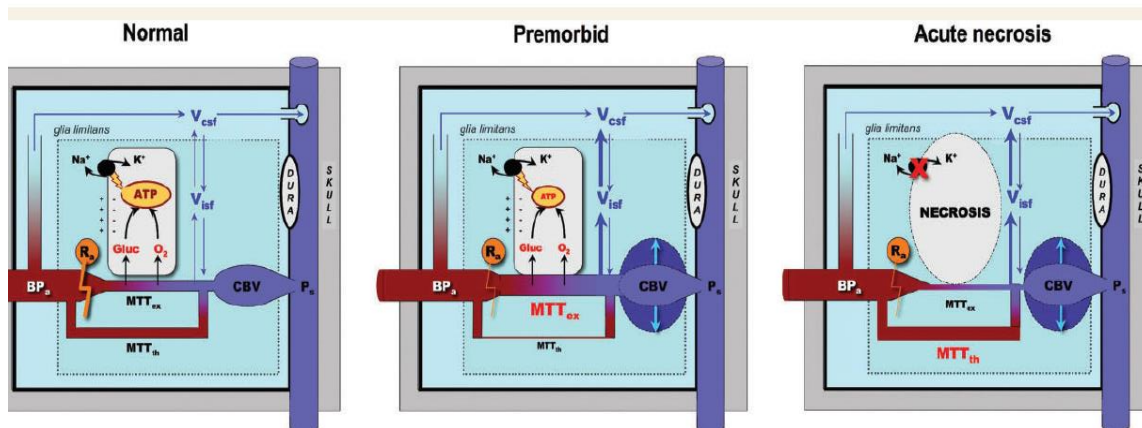
### **3.4. Alteraciones vasculares en pacientes y modelos animales de AG-I**

En pacientes AG-I, se han reportado anomalías vasculares que incluyen disrupción de la BHE, hemorragias subdurales y retinianas, extravasación crónica de los vasos transaracnoideos, aumento del volumen de líquido cefalorraquídeo y alteraciones del flujo sanguíneo cerebral que ocurren generalmente en forma temprana y de manera independiente de la muerte neuronal o de las crisis encefalopáticas (Knapp et al., 2002; Twomey et al., 2003; Strauss et al., 2003; 2010; Muhlhausen et al., 2004).

El término “infarto metabólico” fue utilizado para AG-I y otras enfermedades metabólicas en las cuales existe un defecto primario del ciclo de Krebs o de la cadena respiratoria lo que podría desencadenar la muerte neuronal necrótica (Strauss et al., 2007). La evidencia directa de que existe una deficiencia energética a nivel cerebral en humanos surge de los estudios de tomografía de emisión de positrones (PET) en niños AG-I asintomáticos que mostraron una disminución de la captación de fluorodeoxiglucosa de entre 14-28% en distintas áreas del estriado, tálamo y corteza cerebral (Strauss et al., 2007). Sin embargo, la expansión del líquido cefalorraquídeo sumado a hemorragias intradurales y alteraciones vasculares observadas en tomografías computadas de perfusión tales como el aumento del volumen sanguíneo cerebral y del tiempo de tránsito promedio en niños AG-I, no pueden explicarse únicamente por mecanismos metabólicos, sino también por defectos hemodinámicos (Strauss et al., 2007).

En el trabajo de Strauss et al. (2010) se propone que durante la toxicidad crónica causada por los metabolitos acumulados en AG-I, el acoplamiento flujo-metabolismo permanece intacto lo que se refleja en una disminución del flujo y velocidad de la sangre a nivel cerebral. De hecho, en pacientes asintomáticos entre 6 meses y 5 años de edad, la velocidad promedio de flujo en la arteria cerebral media es 18-26% menor que en los controles siendo los niveles de caída similares a los registrados en la captación de glucosa anteriormente mencionados (Strauss et al., 2007; 2010). Además, varios pacientes AG-I presentaban disminución del flujo y de la velocidad sanguínea cerebral (con un tiempo de tránsito promedio aumentado), sugiriendo que los defectos en la utilización de la glucosa podrían compensarse con un aumento en el tiempo de extracción de ella (Strauss et al., 2010). En este contexto, Strauss et al. proponen que la toxicidad causada por la deficiencia en GCDH induciría un estado de dilatación arteriolar, un aumento del volumen sanguíneo cerebral e hipertensión venosa lo que conduce a la expansión del líquido cefalorraquídeo, hemorragias intradurales y edema intersticial. Sin embargo, durante las crisis estriatales habrían cambios del flujo sanguíneo que podrían reflejar

gradientes regionales en las presiones de perfusión (Reulen et al., 1977) o redistribución de capilares (Hudetz, 1997) lo que implica la apertura de nuevos capilares que son vías rápidas de pasaje de la sangre en paralelo con capilares funcionales (Strauss et al., 2010). Estos resultados concuerdan con los datos de estudios Doppler transcranianos realizados en el cerebro de niños AG-I que sufrieron crisis entre 16 y 18 meses, en los cuales se observa un aumento de la velocidad de la sangre en la arterial cerebral media y luego una caída de este valor (Strauss et al., 2010). Este aumento luego del daño cerebral, podría representar el desacoplamiento entre el flujo y el metabolismo como ocurre en otras condiciones patológicas como el infarto isquémico (Gjedde et al., 1990; Strauss et al., 2010). En resumen, fenómenos hemodinámicos se sumarían a la toxicidad metabólica de AG y 3-OHAG desencadenando las crisis encefalopáticas en pacientes AG-I (Figura 6).



**Figura 6.** [Extraído y adaptado de Strauss et al. (2010)]. **Resumen de los mecanismos metabólicos y hemodinámicos observados en pacientes de AG-I.** Panel izquierdo: en condiciones normales, el ATP generado en la mitocondria es utilizado para mantener el gradiente electroquímico (bombas Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa) y el flujo de sangre que lleva oxígeno y glucosa es determinado por la presión de perfusión (presión arterial- venosa y resistencia arteriolar). Dos poblaciones de capilares paralelos, vasos de intercambio (MTT<sub>ex</sub>) y vías rápidas de paso (MTT<sub>th</sub>) conducen la sangre a través del tejido. En el estado normal los vasos de intercambio conducen la mayor parte del flujo. En las venas cerebrales se acumula el 80% del volumen sanguíneo cerebral y están influenciadas por la presión del fluido intersticial y la presión del seno dural. El volumen y presión del sistema venoso afectan la producción neta del fluido intersticial (V<sub>isf</sub>) y este comunica con el líquido cefalorraquídeo (sistema glinfático). Panel del medio: el estado premórbido está caracterizado por un aumento del volumen sanguíneo y disminución del tiempo de tránsito promedio. El desorden metabólico primario conduce a una reducción en la producción de ATP, desencadenando dilatación arteriolar y aumento del flujo a través de los capilares de intercambio (MTT<sub>ex</sub>). Estos capilares maximizan el tiempo de extracción de sustratos, lo cual desencadena en un aumento del volumen y presión venosa, aumento de la producción del fluido intersticial y mayor riesgo de hemorragias retinianas e intradurales. Panel derecho: condiciones metabólicas (ej: fiebre) o hemodinámicas (hipotensión) desencadenates de las crisis, podrían llevar a una caída de la producción de ATP por debajo de un umbral crítico, causando despolarización y edema citotóxico. En estas condiciones, el flujo es heterogéneo y el tiempo de tránsito rápido podría reflejar una redistribución de la sangre hacia capilares que son vías rápidas de paso (MTT<sub>th</sub>).

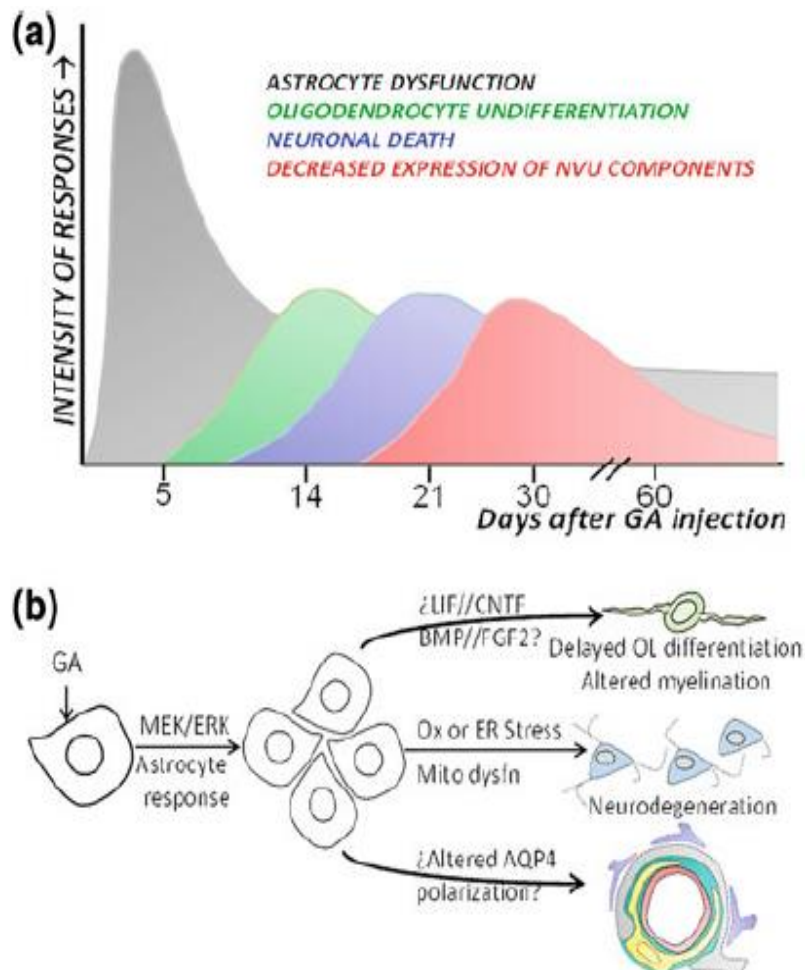
Por otro lado, las anomalías vasculares incluyendo dilatación capilar, hemorragias y engrosamiento de los grandes vasos también son evidentes en ratones *Gcdh*<sup>-/-</sup> expuestos a una dieta alta en lisina (Zinnanti et al., 2006). Sin embargo, otras evidencias sugieren que en el modelo *Gcdh*<sup>-/-</sup>, aún cuando se mimetizan las crisis encefalopáticas suministrando una dieta alta en proteínas, el compromiso de la BHE es escaso y por ende el transporte de metabolitos de AG-I a través de ella también es escaso (Keyser et al., 2008).

Para comprender las causas de las alteraciones vasculares observadas en pacientes AG-I, Mulhausen et al. (2006) analizaron los efectos de AG y 3-OHAG sobre células endoteliales en cultivo. Estos autores reportan que a concentraciones mayores a 4mM, 3-OHAG, pero no AG, tiene una toxicidad directa sobre células endoteliales alterando el citoesqueleto de actina, enlenteciendo la migración y disminuyendo la expresión de cadherinas. Por otra parte, la aplicación local de 3-OHAG solo o combinado con VEGF causó dilatación vascular y hemorragias en un ensayo realizado sobre la membrana corioalantoidea de embriones de pollo. Dado que 3-OHAG es un metabolito reportado en bajas concentraciones (50-200uM) en el suero y muestras post-mortem de pacientes AG-I (Funk et al., 2005; Kulkens et al., 2005; Sauer et al., 2006), es discutible la relevancia fisiológica de los hallazgos realizados por Mulhausen et al. (2006) y hasta el momento se desconocen las causas de las alteraciones vasculares en AG-1 y no existen reportes acerca de cómo se afectan las células perivasculares, astrocitos y pericitos, ni el papel que cumplen en la patología vascular de esta enfermedad.

### **3.5. Papel de los astrocitos en AG-I**

En nuestro grupo hemos mostrado evidencia de que los astrocitos podrían participar en las cascadas de daño observadas en AG-1. Cultivos de astrocitos corticales y estriales aislados de rata expuestos a concentraciones fisiopatológicas de AG y 3-OHAG aumentaron la proliferación celular mediada por la activación de la vía MEK/ERK y los niveles de estrés oxidativo, disminuyeron el potencial de membrana mitocondrial y los niveles de glutatión reducido (Olivera et al 2008; 2011). Esta disfunción astrocitaria parece afectar la supervivencia de neuronas estriales en experimentos con medios condicionados de astrocitos pre-tratados con AG y en co-cultivos astrocito-neurona (Olivera et al., 2011). Además, astrocitos del ratón transgénico *Gcdh*<sup>-/-</sup> fueron capaces de sintetizar y liberar AG y 3-OHAG cuando son tratados con lisina (sustrato de la enzima GCDH); presentando aumento de la proliferación celular y estrés oxidativo e indujeron muerte neuronal estriatal y cortical (Olivera-Bravo et al., 2015). Sin embargo, el tratamiento con AG o lisina en neuronas *Gcdh*<sup>-/-</sup> o WT, en ausencia de astrocitos,

no produjo toxicidad, indicando que la muerte neuronal es mediada por los astrocitos (Olivera-Bravo et al., 2015; 2016). Cuando se administró a ratas Sprague Dawley (SD) de 1 día de vida una inyección intracerebroventricular (i.c.v.) de AG, se observaron efectos celulares que persistieron en el tiempo. Tempranamente, se observó un aumento de la proliferación celular que en su mayoría correspondían a células S100 positivas (marcador de astrocitos inmaduros) en el estriado a los 5 días post-inyección (DPI) (Olivera et al., 2008). Posteriormente, se observó que la reactividad astrocitaria, con aumento en la expresión de S100 $\beta$  y disminución de GFAP, era perdurable en el tiempo hasta los 45 DPI. A la respuesta astrogliar inicial, le siguieron alteraciones progresivas de la sustancia blanca; reducción del área mielinizada, de la expresión de la proteína básica de mielina (MBP) y de la glicoproteína asociada a mielina (MAG) en el estriado a partir de los 12 DPI hasta los 45 DPI, así como también alteraciones ultraestructurales de los oligodendrocitos (estrés de retículo endoplásmico) y de la mielina observables por microscopía electrónica de transmisión (Olivera-Bravo et al., 2014). Estos efectos no se deberían a una toxicidad aguda de AG sobre células precursoras de oligodendrocitos, si no posiblemente a mecanismos indirectos y progresivos de daño a los oligodendrocitos probablemente mediados por astrocitos (Olivera-Bravo et al., 2014). Por otra parte, no se observó muerte neuronal aguda post-inyección de AG, pero sí una degeneración neuronal progresiva significativa, evaluada con FluorJade C y conteo de células NeuN positivas desde los 21 DPI hasta los 45 DPI (Olivera-Bravo et al., 2011). En resumen, una única inyección de AG en un periodo crítico del desarrollo (P0-P1), ocasionó una respuesta astrogliar temprana y sostenida que parece desencadenar otros rasgos neuropatológicos de AG-I que incluyen alteraciones de la mielina, muerte neuronal y el compromiso neuronal y vascular (Isasi et al., 2014; Olivera-Bravo & Barbeito, 2015; Olivera-Bravo et al., 2016). Por lo tanto, la neurotoxicidad inducida por AG en este modelo parece ser el resultado de un complejo interjuego de señales entre distintas células neurales que es desencadenado por una única exposición a altas concentraciones de AG en un período crítico del desarrollo. Estos efectos se autoperpetúan en el tiempo conduciendo a un daño progresivo del SNC que remeda varios aspectos neuropatológicos de AG-I. El curso temporal de los efectos hallados en el modelo farmacológico de AG-I y la hipótesis gliocéntrica, se muestran en la Figura 7 (extraído de Olivera-Bravo et al., 2016).



**Figura 7.** [Extraído y adaptado de Olivera-Bravo et al. (2016)]. **Curso temporal de la respuesta astrocitaria al AG e hipótesis gliocéntrica para explicar los mecanismos patogénicos de AG-I.** (a) Esquema que muestra una respuesta astrocitaria temprana al AG que persiste en el tiempo y es seguida por una diferenciación defectuosa de los oligodendrocitos y muerte neuronal significativa. Disminución en la expresión de componentes de la unidad neurovascular; PDGFRb, AQP4 y laminina, comienzan a ocurrir más tardíamente. (b) Eventos patológicos que podrían ocurrir luego de una exposición perinatal a altas concentraciones de AG y que están mediadas por una disfunción astrocitaria primaria: (i) diferenciación retardada de oligodendrocitos y defectos en la mielinización; (ii) estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en los astrocitos que inducirían a una muerte neuronal progresiva; (iii) defectos en la polarización de AQP4 o el desbalance en la comunicación astrocito/ célula endotelial y/o astrocito/pericito podrían explicar los defectos en la composición de la unidad neurovascular y aumento de la permeabilidad de la BHE. Abreviaturas: BMP (proteína morfogenética de hueso), CNTF (factor neurotrófico ciliar), FGF2 (factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2), LIF (factor inhibidor de leucemia), MEK/ERK (proteín kinasas activadas por mitógeno), Ox/ER Stress (estrés oxidativo y estrés de retículo endoplásmico).

Por otro lado, otros investigadores también han aportado evidencias sobre cómo AG afecta a los astrocitos y de esta manera se altera la homeostasis del SNC. Se ha demostrado que el transporte anaplerótico de intermediarios metabólicos del ciclo de Krebs entre astrocitos y

neuronas *Gcdh*<sup>-/-</sup> está afectado (Lamp et al., 2011). AG y 3-OHAG inhiben competitivamente la captación de succinato dependiente de sodio tanto en astrocitos como en neuronas de ratones salvajes o *Gcdh*<sup>-/-</sup> (Lamp et al., 2011). Posiblemente este efecto esté mediado por el co-transportador de carboxilatos dependiente de sodio 3 (NaC3, del inglés, Na<sup>+</sup>-coupled transporter 3) expresado en astrocitos y el co-transportador NaC2, expresado en neuronas (Mulhausen et al., 2008; Lamp et al., 2011). Por otra parte, se observó una reducción de la tasa de eflujo de succinato en astrocitos *Gcdh*<sup>-/-</sup>, que ocurre a través de transportadores aún no identificados, ya que el gradiente de sodio dirigido hacia el interior excluye a NaC3 y NaC2 como mediadores del eflujo de succinato (Lamp et al., 2011). Este importante resultado apoya el concepto de que la inhibición del soporte anaplerótico desde el astrocito hacia la neurona podría comprometer la síntesis de ATP y de neurotransmisores, explicando la deficiencia energética y el daño neuronal en AG-I (Lamp et al., 2011).

Otro estudio publicado por Jafari et al. (2013) demostró que los astrocitos son las células principalmente afectadas en cultivos organotípicos de cerebro de rata E15 tratados con 1mM de AG o 3-OHAG diariamente durante 6 días. Los autores observaron disminución de la inmunorreactividad para GFAP, muerte celular no apoptótica (incremento de la actividad de la lactato deshidrogenasa, LDH, sin aumento de caspasa 3 clivada), aumento significativo de amonio y disminución de glutamina en el medio de cultivo. A la luz de estos resultados, los autores proponen que la pérdida de astrocitos GFAP conduciría a una hiperamonemia (dado que los astrocitos son las principales células del SNC que metabolizan el amonio a través de la glutamina sintetasa) que secundariamente provocaría muerte de neuronas y oligodendrocitos (Jafari et al., 2013).

Recientemente, en el trabajo de Komatsuzaki et al. (2017) demuestran que AG causa muerte de una línea celular de astrocitos inmortalizada en condiciones de privación energética del cultivo: baja glucosa, sin suero fetal bovino ni glutamina y que la suplementación con glutamina revierte completamente la toxicidad inducida por AG. Además, AG interferiría con una vía de degradación de glutamina, inhibiendo específicamente a la glutamato deshidrogenasa (GDH) (Komatsuzaki et al. (2017)), enzima reversible que produce  $\alpha$ -cetoglutarato para el ciclo de Krebs. En estas condiciones, AG produciría muerte por deficiencia energética de los astrocitos, sin embargo, inhibe fuertemente pero no completamente a la GDH ya que el suministro de glutamina aumentaría el flujo de la vía de glutaminólisis y de esta forma atenúa el efecto tóxico de AG.



En suma, frente a la exposición a altas concentraciones de AG, dependiendo de los abordajes experimentales empleados, los astrocitos sufren diversos cambios que incluyen: aumento de la proliferación celular, estrés oxidativo, despolarización mitocondrial, muerte celular e inhibición de la glutaminólisis y del soporte anaplástico a las neuronas. Por lo tanto, los astrocitos parecen ser blancos celulares a la acción del AG produciendo efectos deletéreos que repercutirán sobre las demás células neurales.

En este sentido, parte de la respuesta de los astrocitos a las altas concentraciones de AG podría contribuir a la disfunción vascular observada en la enfermedad. Más aún, dado que trabajos anteriores (Mulhausen et al., 2006) han descartado efectos significativos de AG sobre las células endoteliales, entre los componentes de la UNV que podrían verse afectados por este metabolito se encuentran los astrocitos y los pericitos. Más aún, el daño sobre uno de estos tipos celulares podría repercutir sobre el otro, dadas las evidencias de una comunicación funcional entre ambos tipos celulares (Bonkowski et al., 2011).

*Los datos iniciales que se muestran en los objetivos 1 y 2 del capítulo 1 de la presente tesis fueron obtenidos durante mis estudios de Maestría. Durante los estudios de Doctorado estos datos fueron profundizados y ampliados, logrando un conocimiento específico y más profundo sobre el compromiso de la UNV en AG-I.*

## **HIPÓTESIS**

Dado que los metabolitos acumulados en AG-I alteran la fisiología vascular cerebral y los astrocitos que cumplen un rol clave en el acoplamiento neurovascular sufren cambios fenotípicos inducidos por altos niveles de AG, proponemos que las **alteraciones en los astrocitos provocadas por AG podrían ocasionar cambios en el repertorio de señales extracelulares que repercutirían negativamente en el funcionamiento de la UNV y del pericito**. Por otra parte, AG podría tener efectos directos sobre los pericitos afectando subsecuentemente la funcionalidad de la UNV.

## **OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

### **1. Objetivo general**

Estudiar el compromiso de la BHE, los componentes de la UNV y la interrelación funcional entre los astrocitos y pericitos en distintos modelos experimentales de AG-I.

### **2. Objetivos específicos**

2.1. Estudiar la integridad estructural y funcional de la BHE frente a la administración i.c.v. perinatal de AG.

2.2. Analizar los efectos de la inyección i.c.v. de AG sobre algunos componentes de la UNV: proteínas constitutivas de la lámina basal, de podocitos astrocitarios y pericitos

2.3. Evaluar el efecto directo de AG sobre la contractilidad capilar y la viabilidad de pericitos en rodajas, *ex vivo*, de cerebro de rata.

2.4. Evaluar los efectos directos de AG sobre pericitos cerebrales aislados en cultivo y los efectos indirectos mediados por el medio condicionado de astrocitos tratados con AG.

2.5. Analizar la expresión diferencial de citoquinas presentes en el medio condicionado de astrocitos controles o tratados con AG.

## **ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN**

Para los objetivos 1 y 2 se empleó un modelo farmacológico de AG-I consistente en la inyección i.c.v. (a nivel de la Cisterna magna) de 2.5  $\mu\text{mol/g}$  de AG o igual volúmen de PBS en ratas SD al día 0 y se analizó la integridad de la BHE a los 14 y 30 días post-inyección (DPI). Para ello, los animales recibieron perfusión intracardíaca con una mezcla del colorante de bajo peso molecular azul de Evans (EB, del inglés, *Evans Blue*) con 4% paraformaldehído (PAF) y luego se analizó la extravasación de EB al parénquima por microscopía de luz y fluorescencia. Al observarse células marcadas con EB, se realizó la co-marcaación con NeuN (proteína nuclear neuronal), S100 $\beta$  (astrocitos) y lectina (microglia) para identificar la estirpe celular que presenta daño en la membrana plasmática y de esta manera es capaz de captar el colorante. Por otra parte, se evaluó mediante inmunohistoquímica la extravasación al parénquima de proteínas de alto peso molecular como las inmunoglobulinas gamma y se analizó la expresión de ocludina y *zonula occludens 1*, ambas, proteínas constituyentes de las uniones estrechas interendoteliales. Para llevar a cabo el objetivo 2, se analizó la expresión de laminina (lámina

-Eugenia Isasi-

basal vascular), acuaporina 4 (podocitos astrocitarios) y PDGFR $\beta$  (pericitos) a nivel de la microvasculatura cerebral y densidad microvascular cuantificando cortes teñidos con lectina de tomate. Los estudios se realizaron en cortes coronales de cerebro de rata (50  $\mu$ m) a los 14 y/o 30 DPI, conteniendo la corteza cerebral y el estriado. Las imágenes se obtuvieron por microscopía óptica de luz y fluorescencia confocal. Para el análisis de las imágenes; áreas, números de células, intensidad de fluorescencia y densidad óptica, se empleó el software Image J.

Para el objetivo 3 se analizó la respuesta de capilares de corteza cerebral expuestos a altas concentraciones de AG en rodajas de cerebro (300  $\mu$ m) de ratas SD de 21 días perfundidas con líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa, líquido cefalorraquídeo artificial) y burbujeadas con 20% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>/75% N<sub>2</sub> a una temperatura cercana a 35°C para mantener condiciones óptimas de viabilidad celular y fisiología vascular. Mediante un sistema de perfusión acoplado a un microscopio de luz con contraste de interferencia diferencial (DIC), se tomaron imágenes cada 30 s, durante 25 min, en condiciones basales (5 min) y en presencia de AG (1-5 mM, pH=7.4, 20 min). Se cuantificaron los diámetros internos de los capilares en cada imagen y se procesaron los datos. Por otro lado, otras rodajas de cerebro carbogenadas fueron incubadas con LCRa o LCRa+ AG (1-5 mM) por 30 min y posteriormente fijadas con PAF. Se realizó la tinción con isolectina B4 (IB4) fluorescente (para marcar la membrana basal y visualizar los cuerpos celulares de los pericitos), Hoechst y NG2 (pericitos) y se cuantificaron diámetros de capilares en imágenes de *stacks* obtenidas con microscopio confocal. Se identificaron somas de pericitos y se midieron diámetros hasta 20  $\mu$ m de distancia desde el centro del soma. Para evaluar la viabilidad de los pericitos en las rodajas de cerebro, éstas se incubaron 1 h con LCRa o LCRa-AG (1- 5 mM) y otra hora en presencia de IB4 y yoduro de propidio (IP) (marcador de muerte celular). Las rodajas se fijaron, se tomaron imágenes en *stacks* por microscopía confocal y se cuantificaron las células doble marcadas.

Para el objetivo 4, se optimizó un método para realizar cultivos primarios de pericitos aislados de cerebro de ratas SD de 2-3 semanas. Los cultivos de segundo pasaje fueron utilizados para todos los experimentos. Con el fin de evaluar los efectos directos de AG sobre pericitos y los indirectos mediados por astrocitos, se incubaron las células con PBS (controles), AG (5 mM, ph=7.4), medio condicionado de astrocitos controles (MC-C) y de astrocitos tratados con AG (MC-AG) durante 24 h y se evaluó viabilidad celular con sulforodamina B, morfología celular con faloidina fluorescente y marcadores de estirpe celular por inmunocitoquímica para NG2,

PDGFR $\beta$  y  $\alpha$ SMA. Por otro lado, se estudió migración y proliferación celular por incorporación de bromodeoxiuridina en un ensayo de *scratch* a distintos tiempos (0, 24 y 48 h). Se evaluó contractilidad *in vitro* a las 2 h de tratamiento, utilizando como control positivo al ATP (100  $\mu$ M) y cuantificando porcentaje de células con cambios morfológicos visibles (tamaño del soma y del núcleo reducido con procesos celulares conspicuos) y mediante inmunocitoquímica se analizó la señal de la fosforilación de la cadena liviana de la miosina.

Para el objetivo 5, se colectaron los medios condicionados, sin suero fetal bovino, de astrocitos controles o previamente tratados con AG y se concentraron para poder determinar los niveles de 32 citoquinas solubles mediante un kit comercial, *Rat Cytokine Antibody Array C2* de RayBiotech®, siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis de las imágenes obtenidas de las membranas incubadas con MC-C y MC-AG se realizó con el software Image J.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Animales**

El modelo animal farmacológico empleado consistente en la inyección i.c.v. de AG en neonatos así como también los cultivos primarios de células se realizaron con ratas de la cepa SD criadas en el bioterio del IIBCE. Los animales fueron albergados en cajas con alimento y agua *ad libitum*, con un régimen controlado de temperatura y ciclos de 12 horas de luz/oscuridad. Se cumplieron las normas vigentes institucionales en conformidad con la Ley de Experimentación Animal (Ley Nº 18.611). Todos los procedimientos experimentales realizados con animales fueron aprobados por el Comité de Ética del IIBCE. Ratas SD de 21 días, machos o hembras, utilizadas para la obtención de rodajas de cerebro con el fin de realizar los ensayos de contractilidad capilar *ex vivo* y de viabilidad de pericitos, fueron obtenidas del bioterio de la *University College of London*. Todos los procedimientos con animales en Reino Unido fueron realizados siguiendo las guías de Animales (Procedimientos científicos) Act 1986, Comité Nacional de Ética Danés y Directiva Europea 2010/63/UE.

### **2. Modelo farmacológico de AG-I**

Para reproducir experimentalmente las crisis encefalopáticas que sufren los pacientes con AG-I, se inyectó AG (2.5  $\mu$ mol/g, pH=7.4) o vehículo (buffer fosfato salino (PBS), 10 mM, pH=7.4) i.c.v., a nivel del IV ventrículo (Cisterna magna) en ratas neonatas, antes de las 24 h de nacidas

(P0). Un volumen máximo de 5 µl fue inyectado utilizando 3mm de una aguja 30G acoplada a un tubo de plástico Tygon (Olivera et al., 2008; 2011; 2013). La concentración de AG utilizada se encuentra en el rango de concentraciones halladas en el cerebro post-mortem o biopsias de pacientes con AG-I así como también en el modelo animal *Gcdh*<sup>-/-</sup> (Koeller et al., 2002; Funk et al., 2005; Kulkens et al., 2005). Este método de inyección permite alcanzar altas concentraciones de este ácido en el cerebro, lo cual es difícil de lograr mediante una inyección sistémica debido al flujo limitado de AG y de sus metabolitos a través de la BHE (Sauer et al., 2006). Los animales controles fueron hermanos de la misma camada, quienes recibieron una inyección con igual volumen de PBS. Luego de la inyección con AG, los animales sufrieron convulsiones tónicas-clónicas, seguidas de un período de hipotonía que cesaba aproximadamente a los 30-45 min. Todos los animales permanecieron aislados, recuperándose a una temperatura cercana a los 30°C, antes de ser devueltos a la madre.

### **3. Fijación y corte de tejido**

Los animales sacrificados para inmunohistoquímica fueron anestesiados con ketamina:xilacina (90:10 mg/kg) y perfundidos intracardíacamente, primero con suero fisiológico conteniendo 0.04% de citrato de sodio y luego con PAF al 4% en PBS 10 mM (pH=7.4). Luego de la perfusión, los cerebros fueron disecados y post-fijados toda la noche con PAF 4% a 4°C y luego mantenidos en PBS-azida (0.05%) hasta su procesamiento. Se realizaron cortes coronales consecutivos de 50 µm conteniendo toda la región del estriado, con vibrátomo Leica 1000S. Los cortes se mantuvieron en PBS-azida de sodio (0.05%) a 4°C o en glicerol-PBS (1:1) a -20 °C.

### **4. Ensayo de permeabilidad vascular con azul de Evans**

Para evaluar la permeabilidad de la BHE se utilizó EB, un colorante diazo que se une cuantitativamente a la albúmina y que se ha empleado para estudiar la integridad de la BHE en distintos modelos animales (Uyama et al., 1988; Rákos et al., 2007). El protocolo utilizado fue el descrito en del Valle et al. (2008), con modificaciones menores. Ratas inyectadas con AG al día 0, fueron anestesiadas a los días 14 y 30 con ketamina:xilacina (90:10 mg/kg) y fueron perfundidas intracardíacamente con suero fisiológico conteniendo 0.04% de citrato de sodio y luego con una solución de EB 1% y PAF 4% en PBS 10mM (pH=7.4). Luego de la perfusión, los cerebros fueron disecados, post-fijados y cortados con vibrátomo como se describió anteriormente. La presencia de EB se observó en cortes por microscopía de luz y fluorescencia (Olympus IX-81, cámara DP 70, DP Controller) y microscopía confocal (OLYMPUS FLUOVIEW FV300), detectando la fluorescencia roja emitida por el colorante al unirse con proteínas como

la albúmina. EB tiene dos picos de máxima absorción a 470 nm y 540 nm y un pico de máxima emisión a 680 nm (Hed et al., 1987). Se cuantificó la intensidad de fluorescencia roja en la corteza y estriado para los controles y tratados, con el software Image J (NIH, USA).

## 5. Inmunohisto/citoquímica

Se analizaron 5 cortes de regiones equivalentes, que comprendían al estriado, para cada animal y marcador empleado. Se tomó en cuenta el aspecto, tamaño y posición de la comisura anterior, el cuerpo caloso, los ventrículos laterales y el estriado para comparar a un mismo nivel las rodajas de cerebro de los animales inyectados con vehículo o AG. Todos los ensayos de inmunohistoquímica se realizaron, por flotación, en cortes de vibrátomo de 50  $\mu\text{m}$ . En algunos casos se empleó un protocolo estándar de reclutamiento antigénico que consistió en la incubación de los cortes en una solución de citrato de sodio 10mM, (pH=6, en PBS 10mM) y se calentaron sobre tela de amianto hasta alcanzar una temperatura cercana a la de ebullición. Se dejaron enfriar durante 30 min y se lavaron varias veces con PBS antes de comenzar el protocolo estándar de inmunomarcado. Para la inmunohistoquímica de laminina, el reclutamiento antigénico consistió en la incubación de los cortes con proteinasa K (0.25 g/ml) durante 4 min a 37°C, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Luego del reclutamiento antigénico, los cortes fueron lavados y permeabilizados con Tritón X-100 (0.05-0.3% en PBS, 20 min, temperatura ambiente). Posteriormente, se incubaron con albúmina sérica bovina (BSA) 5% en PBS durante 1 h, para bloquear los sitios de unión inespecíficos, antes de proceder a la incubación del anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C en Tritón X-100 (0.05-0.3% en PBS). La tabla 1 indica los anticuerpos específicos (anticuerpos primarios) empleados para el estudio de las distintas poblaciones celulares. Luego de la incubación con el anticuerpo primario, se lavaron los cortes con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 90 min a temperatura ambiente (la tabla 2 muestra los anticuerpos secundarios utilizados). Luego de finalizada la incubación con el anticuerpo secundario, se lavaron los cortes con PBS y se montaron con glicerol-PBS (1:1) conteniendo Hoechst 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Para la detección de IgG en el parénquima cerebral, se realizó el mismo procedimiento de permeabilización y bloqueo de sitios inespecíficos con BSA y luego se incubaron los cortes con anti-IgG rata conjugado a FITC (1:300, Pierce) 2 h a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se montaron con glicerol-Hoechst.

Los ensayos de inmunohistoquímica realizados sobre rodajas gruesas (238  $\mu\text{m}$ ) utilizadas en los experimentos *ex vivo*, siguieron un protocolo similar al descrito anteriormente pero con

algunas modificaciones. La fijación se realizó por flotación con PAF 4% en PBS (1h, temperatura ambiente). Luego de lavados con PBS, los cortes fueron incubados en un búfer de bloqueo conteniendo suero de caballo 10%, BSA 1%, glicina 1.5%, Tritón X-100 0.3% en PBS, durante toda la noche a 4°C e incubados en el mismo búfer con los anticuerpos primarios toda la noche a 4°C. Luego de los lavados, las rodajas se incubaron en el mismo búfer de bloqueo con los anticuerpos secundarios y la isolectina B4 fluorescente conjugada Alexa Fluor 647 (10 µg/ml). Finalmente los cortes se incubaron con DAPI (0.1 µg/ml) 1h a temperatura ambiente, se lavaron y montaron.

Por otra parte, los cultivos de pericitos fueron fijados con PAF 4% en PBS, 20 min, a temperatura ambiente. Fueron permeabilizados con Tritón X-100 (0.1%, 20 min), bloqueados con BSA 5% en PBS (30-60 min) e incubados con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C (los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en cultivos se resumen en las tablas 1 y 2). Luego de lavados con PBS, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes, durante 90 min a temperatura ambiente. En algunos experimentos, para visualizar la citoarquitectura y la disposición de los filamentos de actina, las células se incubaron con faloidina; una micotoxina que se une a los filamentos de actina, inhibiendo su despolimerización y que, conjugada a un fluoróforo, es muy utilizada para visualizar los microfilamentos por microscopía de fluorescencia (Copper, 1987). Se utilizó una faloidina conjugada a tetrametilrodamina (TRITC) (1:250, 20 min, temperatura ambiente). Luego, las células se lavaron con PBS y se montaron con glicerol-PBS (1:1) conteniendo Hoechst 1 µg/ml. La visualización de la fluorescencia y las imágenes capturadas se obtuvieron con el microscopio confocal Olympus FLUOVIEW FV300 provisto de láseres que emiten luz a 405, 488, 546 y 633 nm. Se realizaron controles negativos, omitiendo los anticuerpos primarios o secundarios.

## **6. Análisis de imágenes**

Las imágenes de fluorescencia fueron analizadas con el software libre Image J (NIH, USA). Para la cuantificación de la fluorescencia emitida por EB, se midió el nivel medio de grises (MGV) de imágenes obtenidas a baja magnificación delimitando la región de interés (estriado o corteza). Para la cuantificación del área de microvasos (< 10 µm) inmunomarcados con AQP4, PDGFRβ o laminina y teñidos con lectina, se delimitaron ROIs y manualmente se delinearon los microvasos marcados. En las cuantificaciones que involucran número de células se utilizó la herramienta *Cell counter* y para el análisis de las bandas en imágenes de Western blot se utilizó la herramienta *Gel Analyzer* del Image J. En las imágenes de fluorescencia en cultivo, las

imágenes se transformaron en 8-bit, se umbralizaron y se midió el % de área inmunopositiva y el MGv, limitado al umbral.

**TABLA 1: LISTA DE ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS**

<b>Inmunohistoquímica</b>						
<b>Antígeno</b>	<b>Tipo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Huésped</b>	<b>Cél/estructura blanco</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Código</b>
S100β	Monoclonal	1:500	Ratón	Astrocito	SIGMA	S2532
GFAP	Monoclonal	1:500	Ratón	Astrocito	SIGMA	G3893
AQP4	Policlonal	1:75	Conejo	Astrocito	Millipore	AB3594
NG2	Monoclonal	1:300	Ratón	PreOL/Pericito	Millipore	MAB5384
PDGFRβ	Policlonal	1:100	Conejo	Pericito	abcam	ab32570
Laminina 1+2	Policlonal	1:1000	Conejo	Membrana basal	abcam	ab7463
ZO-1	Policlonal	1:100	Conejo	Uniones estrechas	Santa Cruz	SC-10804
NeuN	Monoclonal	1:200	Ratón	Núcleo neuronal	Millipore	MAB3777
<b>Inmunocitoquímica</b>						
NG2	Monoclonal	1:250	Ratón	PreOL/Pericito	Millipore	MAB5384
αSMA	Monoclonal	1:100	Conejo	Pericito	SIGMA	A7607
PDGFRβ	Policlonal	1:100	Conejo	Pericito	abcam	ab32570
GFAP	Policlonal	1:500	Conejo	Astrocito	SIGMA	G9269
Factor von Willebrand	Policlonal	1:100	Conejo	Célula endotelial	abcam	ab6994
pMYL9	Policlonal	1:200	Cabra	Miosina fosforilada: cadena liviana	Santa Cruz	sc-12896

**TABLA 2. LISTA DE ANTICUERPOS SECUNDARIOS EMPLEADOS**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Fluoróforo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Código</b>
<i>Cabra anti-ratón IgG (H+L)</i>	Alexa Fluor 488 Alexa Fluor 546	1:500	Molecular Probes® Invitrogen	A-11001 A-11003
<i>Cabra anti-conejo IgG (H+L)</i>	Alexa Fluor 488 Alexa Fluor 546	1:500	Molecular Probes® Invitrogen	A-11094 A-11035
<i>Cabra anti-rata IgG (H+L)</i>	FITC	1:300	Pierce	31629
<i>anti-cabra IgG</i>	FITC	1:300	abcam	ab6881



## **7. Western blotting**

Para la cuantificación relativa de proteínas en muestras de tejido cerebral y cultivos de pericitos, se realizó la separación de proteínas mediante una electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y la transferencia (“blotting”) de las proteínas del gel a una membrana para su posterior incubación con los anticuerpos primarios: anti-occludina (1:1000, abcam), anti-zonula ocludens 1 (1:1000, Invitrogen), anti-PDGFR $\beta$  (1:1000, abcam) y anti- $\beta$ actina (1:4000, Sigma) (control de carga proteica). Luego de la incubación con los anticuerpos secundarios: anti- IgG conejo conjugado a HRP (1:4000, Molecular Probes) y anti-IgG ratón conjugado a HRP (1:4000, Molecular Probes), las membranas fueron reveladas con el kit de quimioluminiscencia (Pierce ECL, Thermo Scientific). Brevemente, se describirán algunos pasos de la técnica empleada.

### **7.1. Obtención de muestras enriquecidas en proteínas**

Para la obtención de muestras proteicas de cultivos de pericitos, se recolectaron las células confluentes de placas de Petri de 35 mm con 80  $\mu$ l de buffer de lisis conteniendo 50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 0.5% Tritón X-100 y 1 pastilla de inhibidores de proteasas SIGMAFAST™ (S8830, SIGMA). Las muestras fueron sonicadas (4-5 pulsos de 3 seg c/u) para romper las membranas, liberando el contenido celular, y luego se cuantificaron las proteínas.

Para la obtención de muestras de tejido se realizó el siguiente procedimiento. Ratas inyectadas con AG o PBS, fueron anestesiadas con ketamina: xilacina (90:10 mg/kg) y sacrificadas por dislocación cervical a los 30 DPI. Se extrajo el cerebro, se disecó el estriado y se colocó en un tubo con buffer de lisis de tejido conteniendo: 4 mM EDTA y 1 pastilla de inhibidores de proteasas SIGMAFAST™ (S8830, SIGMA) diluido en PBS 0.01 M (pH=7.4). Las muestras fueron sonicadas (5-6 pulsos de 3 seg cada uno) y centrifugadas (12000 g, 10 min a 4°C) para extraer el sobrenadante con las proteínas solubles.

### **7.2. Cuantificación de proteínas**

Para la cuantificación de proteínas se empleó el método del ácido bicinonínico (BCA, del inglés, *Bicinconinc acid*). Brevemente, se prepararon seis diluciones desde 0.25 mg/ml hasta 2 mg/ml de una solución 10 mg/ml de BSA para realizar una curva de calibración con muestras de concentración conocida. Se colocó el mismo volumen final de todas las muestras “problema” (diluidas 1/10 para tejido y 1/2 para células), por duplicado o triplicado, más dos muestras “blanco” (buffer de lisis) en una placa de 96 pocillos. Se agregó una solución de BCA:

sulfato cúprico (50:1, Novagen) manteniendo una relación 8:1 respecto del volumen de las muestras. La placa se colocó en estufa a 37°C durante 30 min y luego se midió la absorbancia a 562 nm en un lector de microplacas (Varioskan® Flash, Thermo Scientific). Se graficaron los datos de la absorbancia en función de las concentraciones conocidas del estándar de BSA, se ajustaron los puntos a una recta y se determinó el coeficiente de regresión, estimándose una aceptabilidad mínima con un  $R^2 \geq 0.98$ . Esa recta fue la utilizada para calcular las concentraciones de proteína en las muestras problema.

### **7.3. Electroforesis SDS-PAGE y electrotransferencia**

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE para separar las proteínas en función de su peso molecular. Primero, se desnaturalizaron las proteínas mediante el agregado de SDS y  $\beta$ mercaptoetanol presentes en el buffer de carga (3% SDS, 0,06 M Tris (pH 6,8), 5% glicerol, 0,3 M  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,002% azul de bromofenol) y la aplicación de calor (5 min a 95°C en termobloque). Luego, se prepararon los dos geles conteniendo una mezcla de acrilamida: bisacrilamida (30:1): el gel concentrador (4% de acrilamida) y el gel separador (10-12%), en función de los pesos moleculares de las proteínas que se querían resolver. Se cargaron 30  $\mu$ g de cada muestra en cada pocillo y 4  $\mu$ l del marcador de peso preteñido (SM0441, Fermentas). La corrida se realizó en cuba de electroforesis (Bio-Rad) a 40 mA y voltaje libre durante 3h 30 min. Posteriormente, se realizó la electrotransferencia de proteínas del gel a la membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF, Thermo Scientific) (cargada positivamente). La transferencia se realizó a 300 mA y voltaje libre durante 1h 15 min. La eficacia de la transferencia se comprobó incubando la membrana de PVDF durante 4 min en Rojo Ponceau 0.2% (preparado en 3% de ácido tricloroacético). Este colorante se unió de forma inespecífica a todas las proteínas presentes y se eliminó lavando la membrana con TBS-Tween 0.1% hasta su completa desaparición.

### **7.4. Bloqueo e incubación con anticuerpos**

Las membranas de PVDF conteniendo las proteínas se incubaron con 5% de leche en polvo descremada en TBS-Tween 0,1%, 1 h a temperatura ambiente, para bloquear los sitios de unión inespecíficos de los anticuerpos. Luego, se incubaron los anticuerpos primarios ya mencionados, en solución de bloqueo toda la noche a 4°C. Luego de varios lavados con TBS-Tween 0,1%, se incubaron los anticuerpos secundarios mencionados anteriormente durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente se repitieron los lavados con TBS-Tween 0,1% y se continuó con el revelado.

### **7.5. Revelado con quimioluminiscencia enzimática**

Para detectar a la enzima HRP, se utilizó un sustrato luminiscente que en presencia de la enzima y peróxido de hidrógeno se oxida, emitiendo luz. Brevemente, se incubó la membrana con una mezcla de los reactivos 1 y 2 de ECL (del inglés, *Enhanced chemiluminescence*) (Pierce ECL, Thermo Scientific) durante 2-3 min. Se envolvió en papel film, se expuso sobre una placa autorradiográfica (AGFA) en oscuridad y se reveló con soluciones reveladoras y fijadoras comerciales.

## **8. Cultivos celulares**

### **8.1. Cultivo primario de astrocitos**

Los cultivos enriquecidos en astrocitos fueron obtenidos de corteza cerebral de ratas SD de 1-2 días de vida, siguiendo el procedimiento descrito en Cassina et al. (2002) con algunas modificaciones. Brevemente, se extrajo el cerebro en condiciones estériles, se disecaron las dos hemi-cortezas y se retiraron las meninges. El tejido se cortó en trozos con bisturí y se realizó una disgregación enzimática con tripsina-EDTA (0.05% en PBS; 25 min a 37°C). El tratamiento enzimático se detuvo con la adición de DMEM + 10% FBS, se agregó ADNasa 50 µg/ml y se completó la disgregación del tejido mecánicamente. La suspensión celular se filtró en una malla de 80 µm y luego se centrifugó (1000 rpm, 10 min). El pellet celular se resuspendió en 1 ml de DMEM-FBS y en una dilución 1:20 se contaron las células con cámara de Neubauer y se sembraron aproximadamente  $1.5 \times 10^6$  células por botella de 25 cm<sup>2</sup>. Se adicionaron 5 ml de medio de cultivo de astrocitos conteniendo DMEM suplementado con 10% FBS, 3.6 g/l HEPES, 100 IU/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Las células se mantuvieron en una estufa de cultivo a 37°C, en una atmósfera saturada de agua, 95% aire/5% CO<sub>2</sub> y el medio se cambió cada 48 h. Cuando el cultivo celular alcanzó confluencia, se agitó a 180 rpm durante 48 h para desprender la microglía y la oligodendroglía y obtener una pureza mayor a 98% de astrocitos. Para todos los ensayos con astrocitos se realizó un re-plaqueo de las células cultivadas en botellas, en placas de Petri de 35 mm o de 60 mm. Para lograr el decolamiento de las células se realizó una tripsinización (tripsina-EDTA 0.05%, 5 min, 37°C), se colectaron las células por centrifugación (1000 rpm, 10 min) y se sembraron aproximadamente 150.000 células para cada placa de 35 mm o 500.000 para cada placa de 60 mm.

### **8.2. Obtención de medios condicionados de astrocitos**

Los cultivos confluentes de astrocitos fueron tratados con AG (5 mM, pH=7.4) o PBS (controles) por 24 h. Luego, el medio de cultivo fue removido completamente, las células se lavaron con

PBS y se incubaron nuevamente con DMEM+10%FBS. Luego de 24 h, se recolectó el medio condicionado de astrocitos tratados con AG (MC-AG) o de astrocitos controles (MC-C), se centrifugó (1000 rpm, 10 min) y se utilizó inmediatamente para el tratamiento de los cultivos de pericitos.

### **8.3. Cultivos primarios de pericitos**

Los cultivos primarios de pericitos fueron preparados siguiendo el procedimiento descrito por Tigges et al. (2012) con algunas modificaciones. Brevemente, ratas de 2-3 semanas fueron sacrificadas, se extrajo el cerebro en condiciones estériles y se descartaron los bulbos olfatorios, el cerebelo y el tronco encefálico. Se removieron cuidadosamente las meninges y el resto del tejido se cortó en trozos y se incubó durante 1 h a 37°C en una solución enzimática conteniendo 0.225 mg/ml de colagenasa I, 5mM CaCl<sub>2</sub> y 40 µg/ml ADNasa en DMEM. Luego de la digestión enzimática, se realizó la disgregación mecánica del tejido con pipeta de 1 ml y se filtró en una malla metálica de 80 µm. El homogenato se mezcló con 1.7 volúmenes de BSA 22% preparado en PBS y se centrifugó (2000 rpm, 10 min). El pellet se resuspendió en un medio de cultivo conteniendo DMEM, 10% FBS, 100 IU/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Los fragmentos de microvasos aislados fueron sembrados sobre placas de Petri de 35 mm o botellas de 25 cm<sup>2</sup> previamente cubiertas con colágeno I (10 µg/ cm<sup>2</sup>). Cuando los cultivos alcanzaron la confluencia (8-10 DIV), se decolaron las células (tripsina-EDTA 0.05%, 5 min, 37°C), se centrifugaron (1000 rpm, 10 min) y se sembraron sobre plástico en placas de Petri o botellas de 25 cm<sup>2</sup>, siguiendo una dilución 1/3. Luego de alcanzar confluencia, se realizó un segundo pasaje y esas células se utilizaron para todos los experimentos. Los cultivos de segundo pasaje contenían más del 95% de células NG2 y PDGFRβ positivas, ~ 1% de células endoteliales positivas para el factor de von Willebrand y ~ 4% de astrocitos que expresan GFAP.

## **9. Ensayos funcionales con células**

### **9.1. Análisis de viabilidad celular mediante sulforodamina B**

El ensayo de sulforodamina B (SRB) se basa en la afinidad del colorante por los aminoácidos básicos de las proteínas, en condiciones ácidas, proporcionando un índice del contenido de proteínas celulares. El ensayo se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich). Brevemente, 10000-20000 pericitos fueron sembrados en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Una vez alcanzada la confluencia, se incubaron con AG (5 mM), MC-C o MC-AG durante 24 h. Posteriormente, las monocapas de pericitos se fijaron con 10% de ácido

tricloroacético (1h, 4C) y se incubaron con SRB (0.4%, 30 min). El exceso de colorante fue removido mediante lavados repetidos con 1% de ácido acético. Las proteínas unidas al colorante fueron disueltas en una solución Tris 10 mM y se midió la densidad óptica a 565, 530 y 490 nm; la absorbancia de fondo a 690 nm y por fluorimetría la fluorescencia emitida a 585 nm (Ex: 488 nm), utilizando un lector de microplacas (Varioskan® Flash, Thermo Scientific).

## **9.2. Ensayos de migración y proliferación celular con bromodeoxiuridina**

Se realizó un *scratch* manual en pericitos confluentes de segundo pasaje sembrados en placas de 35 mm, utilizando una punta de pipeta estéril de 0.1-10  $\mu$ L. Las células desprendidas se retiraron mediante lavados con PBS. Luego del *scratch*, las células que permanecieron adheridas fueron tratadas con AG (5 mM), PBS (control), medio condicionado de astrocitos controles (MC-C) o de astrocitos previamente tratados con AG durante 24 h (MC-AG) en una dilución 1:1. Se tomaron fotos utilizando un microscopio invertido de luz con DIC (Olympus IX-81) del área total del *scratch* a las 0, 24 y 48 h posteriores. Para evaluar si existía un efecto en la proliferación celular o en la migración, se cuantificó el área libre de células a las 0, 24 y 48 h y paralelamente el número de células que incorporaron BrdU sobre el total de núcleos Hoechst positivos en la zona del *scratch* a tiempo final, luego de fijadas las células. Para los ensayos de proliferación se adicionó BrdU (40  $\mu$ M) al tiempo 0 del *scratch*, se fijaron las células a las 48 h con PAF 4% (20 min, temperatura ambiente), luego se lavaron con PBS y se incubaron con HCl (2N, 45 min, temperatura ambiente) para desnaturalizar el ADN y permitir el reconocimiento del BrdU por inmunomarcación. Se lavaron las células con PBS, se permeabilizaron con Tritón X-100 (0.1% en PBS, 20 min) y se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con BSA 5% en PBS, durante 30-60 min. Las células se incubaron con anti-BrdU monoclonal de rata (1/500, Invitrogen) toda la noche a 4°C, se lavaron con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-rata conjugado a FITC (1/300, Pierce). Luego de la incubación con el anticuerpo secundario, durante los lavados con PBS, se adicionó Hoechst 1  $\mu$ g/ml. Las células se observaron en un microscopio invertido de fluorescencia (Olympus IX-81, cámara DP-70, DP Controller) utilizando los filtros de emisión adecuados. El conteo manual del área libre de células del *scratch* y de células BrdU/ Hoechst positivas se realizó con el programa Image J (NIH, USA).

## **9.3. Evaluación de la contractilidad**

Los pericitos confluentes de segundo pasaje fueron incubados con AG (1 y 5mM), MC-C, MC-AG, ATP (100 $\mu$ M, control positivo) o PBS (controles) durante 2 h, por microscopía de luz con DIC

se tomaron imágenes y se cuantificaron manualmente número de células que presentaban cambios morfológicos (disminución del tamaño del soma y núcleo, procesos celulares engrosados y visibles) respecto del número total de células (núcleos Hoechst positivos). Esta aproximación fue complementada con el análisis por inmunocitoquímica de la expresión de la cadena liviana de la miosina fosforilada. De las imágenes obtenidas con microscopio confocal, se cuantificó con Image J (NIH, USA) el área inmunopositiva para ese marcador en todas las condiciones experimentales.

#### **9.4. Tratamientos con enzimas e inhibidores**

Para estudiar qué mediadores solubles astrocitarios podían inducir la contractilidad de los pericitos, se probaron distintos inhibidores y enzimas como se muestran en la Tabla 3. Alfa-tocoferol (10  $\mu$ M) (antioxidante) se adicionó al medio condicionado de astrocitos (MC), Brilliant Blue G (10  $\mu$ M) (antagonista de los receptores P2X7), PPADS (3  $\mu$ M) (antagonista de los receptores P2X), Reactive Blue 2 (100  $\mu$ M) (antagonista de los receptores P2Y) y carbenoxolona (100  $\mu$ M) (inhibidor de uniones comunicantes y hemicanales de conexinas) fueron adicionados al cultivo de pericitos 1 h antes y durante el tratamiento con MC, por último, apirasa (cataliza hidrólisis del ATP) (2 U/ml) se adicionó 30 min al MC previo al tratamiento de los pericitos. En cada caso se utilizaron los respectivos controles, adicionando los inhibidores en pericitos sin medios condicionados.

<b>TABLA 3. LISTA DE INHIBIDORES Y ENZIMAS</b>		
<b>COMPUESTO</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>MODO DE TRATAMIENTO</b>
$\alpha$ -Tocoferol	10 $\mu$ M	CM
<i>Brilliant Blue G</i>	10 $\mu$ M	Pre-incubación + CM
<i>PPADS</i>	3 $\mu$ M	Pre-incubación + CM
<i>Reactive Blue 2</i>	100 $\mu$ M	Pre-incubación + CM
Carbenoxolona	100 $\mu$ M	Pre-incubación + CM
Apirasa	2 U/ml	Pre-incubación + CM

#### **9.5. Determinación de citoquinas en medios condicionados de astrocitos**

Se colectaron MC-C y MC-AG en ausencia de FBS. Para ello, botellas de cultivo T75 conteniendo monocapas de astrocitos fueron tratadas con AG (5 mM, pH=7.4) o PBS (controles) durante 24 h, luego se lavaron las células con PBS tibio y se incubaron con DMEM en ausencia de FBS. A las

24 h, se recolectó el medio condicionado, se centrifugó (1000 rpm, 10 min) para eliminar células del sobrenadante y se congeló a -20°C. Se concentró el medio condicionado utilizando un Centricon® Millipore con membrana ultracel YM-3, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificaron las proteínas del medio condicionado concentrado y sin concentrar utilizando el método del ácido bicinconínico (BCA) o de Bradford. Para determinar los niveles de expresión de 32 citoquinas presentes en los medios condicionados, se utilizó un kit comercial *Rat Cytokine Antibody Array C2* de la empresa RayBiotech® y se siguieron las instrucciones del fabricante. Las membranas fueron reveladas en una cámara CCD de quimioluminiscencia y el análisis de las imágenes se realizó con el software *Image J* (NIH, USA).

## **10. Obtención de rodajas de cerebro *ex vivo***

Siguiendo el protocolo descrito en Mishra et al. (2014; 2016) se realizaron cortes coronales de 238 o 300 µm de espesor a partir del cerebro de ratas SD de 21 días con vibrátomo utilizando una solución semi-congelada conteniendo cloruro de N-metil d-glucamina (NMDG) 93 mM, KCl 2.5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 30 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, glucosa 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM, HEPES 20 mM, ascorbato de sodio 5 mM, piruvato de sodio 3 mM y ácido kineurínico 1 mM. Las rodajas fueron incubadas a 34°C en la misma solución durante 15-20 min y luego fueron transferidas a una solución similar en la cual NMDG, MgCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub> fueron reemplazados por NaCl 93 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM y CaCl<sub>2</sub> 2 mM a temperatura ambiente (21-23°C) hasta ser utilizadas en los experimentos. Durante todo el procedimiento las soluciones fueron carbogenadas (95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>), desde 20-30 min antes de iniciado el protocolo.

## **11. Evaluación de la contractilidad capilar**

Para evaluar la contractilidad capilar se siguió el protocolo descrito en Mishra et al. (2014; 2016). Las rodajas fueron perfundidas con LCRA conteniendo NaCl 124 mM, KCl 2.5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, glucosa 10 mM, ascorbato de sodio 1 mM, calentado a 31-35°C y gasificado con 20% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>/75% N<sub>2</sub>. Los capilares fueron fotografiados utilizando un microscopio con DIC a 20-50 µm de la superficie entre las capas de corteza III-VI, conteniendo regiones de corteza prefrontal y motora. Se utilizó un objetivo 40x de inmersión en agua y una cámara Colnaps HQ2 CCD y el software ImagePro Plus. Se obtuvieron imágenes cada 30 s con un tiempo de exposición de 100 ms. El tamaño de pixel fue de 160 nm. Debido a que el procedimiento de seccionado del tejido puede dañar muchos vasos sanguíneos, se siguieron los criterios de elección de “capilares saludables” descritos en Mishra et al. (2014). Los diámetros internos de los capilares fueron medidos manualmente, colocando

una línea perpendicular al vaso en regiones cercanas al soma del pericito (PS) (<15  $\mu\text{m}$  desde el centro del soma) o lejanas utilizando el software Metamorph o Image J (NIH, USA). Para evaluar el efecto de AG sobre la contractilidad capilar se obtuvieron imágenes en condiciones basales (LCRa solo) y luego de la adición de AG (1 y 5 mM) o endotelina 1 (10 nM) como control positivo.

Por otro lado, la contractilidad capilar también se cuantificó en rodajas de cerebro (238  $\mu\text{m}$ ) tratadas con LCRa solo o LCRa- AG (1 mM) (30 min en baño a 37°C) y luego fijadas para realizar inmunohistoquímica y marcar vasos sanguíneos con IB4 fluorescente. Se hicieron stacks de 23  $\mu\text{m}$  (excluyendo las primeras 30  $\mu\text{m}$  de la superficie) de distintas regiones de corteza cerebral. Se identificaron los somas y núcleos de los pericitos y se midieron cuatro diámetros en ambas direcciones, desde el centro del soma, entre 4 y 20  $\mu\text{m}$  de distancia. Se realizó la correlación entre diámetros y distancias del centro del soma del pericito y se compararon los promedios de todos los diámetros de capilares entre rodajas expuestas a AG o controles.

## **12. Evaluación de la muerte de pericitos en rodajas *ex vivo***

Se utilizó el protocolo previamente descrito en Hall et al. (2014). Brevemente, rodajas de cerebros de 238  $\mu\text{m}$  fueron incubadas en una placa de múltiples pocillos (con carbógeno insuflado sobre la superficie) conteniendo LCRa solo (controles) o LCRa con AG 1 mM y 5 mM. Luego de 1 h de incubación, se adicionó 7.5  $\mu\text{M}$  de IB4 conjugada a Alexa Fluor 488 para evidenciar la membrana basal y los pericitos embebidos en ella y 2.5  $\mu\text{M}$  de Ioduro de propidio (IP) para marcar células cuya permeabilidad de membrana es no-específica y por lo tanto su viabilidad está comprometida. Al cabo de 2 h de incubación, las rodajas fueron fijadas con PAF 4% (1 h, temperatura ambiente), se lavaron con PBS, se incubaron con DAPI (0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1 h) y fueron montadas para su visualización en el microscopio confocal Zeiss LSM700. Se realizaron stacks de 20  $\mu\text{m}$  (excluyendo las primeras 10  $\mu\text{m}$  desde la superficie) de 3 campos de corteza y 2 de estriado. Se cuantificó el número de células IP positivas que correspondían a pericitos según la morfología del núcleo, del soma y su localización visibles con IB4 fluorescente y DAPI. Se representaron los datos como porcentaje respecto del total pericitos observables en el *stack*. Para evitar el conteo de células muertas debido al daño causado por la cuchilla, se excluyeron las primeras 10  $\mu\text{m}$  del *stack* con el software ImageJ (NIH, USA).

## **13. Análisis estadístico**



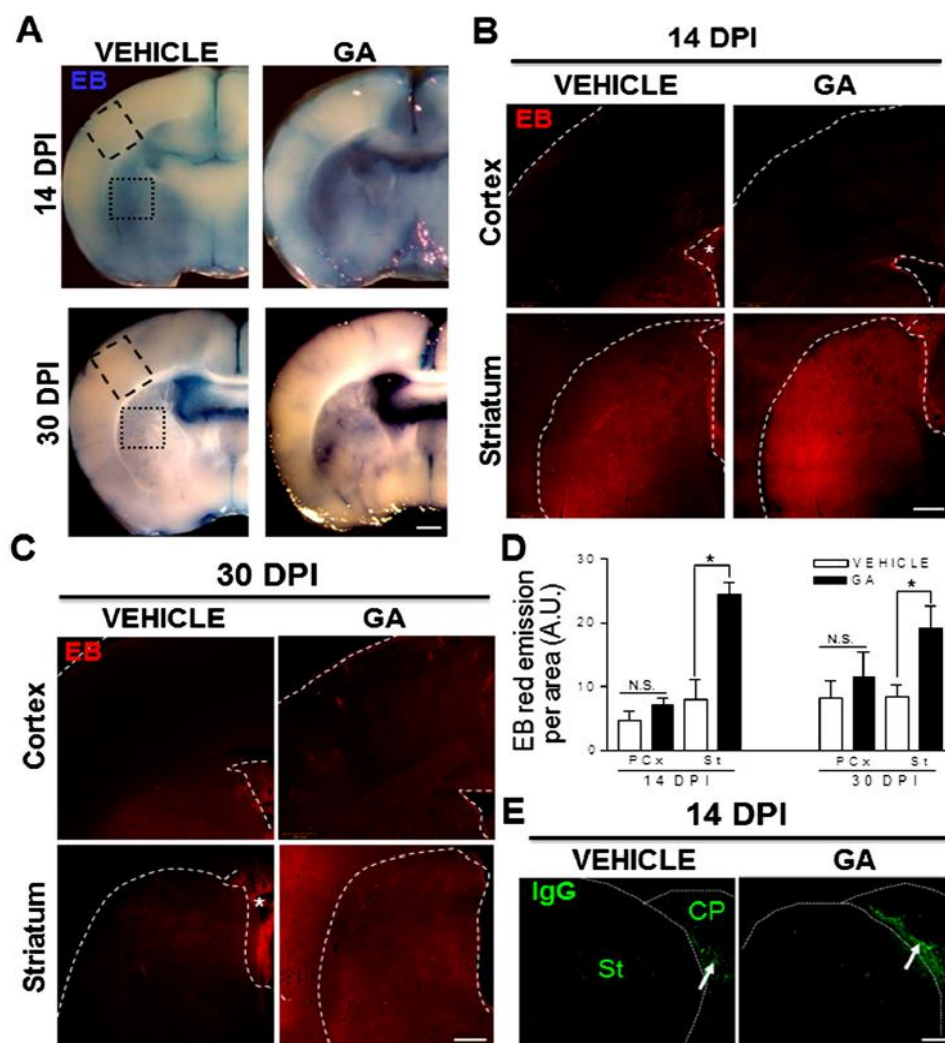
Todos los resultados que se muestran han sido obtenidos de la realización de 2-5 experimentos independientes. Cuando los datos se ajustaban a una distribución normal (test de normalidad D'Agostino-Pearson), el análisis estadístico entre dos grupos se realizó con el test t- de Student no pareado de dos colas (en homoscedasis o heteroscedasis) y entre varios grupos con ANOVA de una vía y posteriormente el test de Tukey o Bonferroni de comparaciones múltiples. Cuando los datos no se ajustaban a una distribución normal se utilizó el test de Mann Whitney entre dos grupos o Kruskal Wallisy test de Dunn de comparaciones múltiples. Se utilizaron los programas Sigma Stat 2.0 o GraphPad Prism® 3.0 y 6.0. Las diferencias entre grupos con valores de  $p < 0.05$  fueron consideradas significativas desde un punto de vista estadístico. El p valor es indicado en cada caso. Los valores representados en las gráficas corresponden a la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media) o a la mediana y el rango intercuartil, según corresponda.

## **RESULTADOS**

### **1. La inyección intracisternal de AG causó un aumento de la extravasación de EB en el estriado**

Ratas neonatas fueron inyectadas con PBS o AG en la *cisterna magna* para reproducir experimentalmente las crisis encefalopáticas que sufren los pacientes AG-I (Olivera et al., 2008; Olivera-Bravo et al., 2011; 2014). Luego, los animales fueron perfundidos con 1% EB y 4% PAF a los 14 y 30 DPI. Se observó la tinción con EB en los vasos sanguíneos (lumen o pared), en los ventrículos laterales y en el parénquima en áreas carentes de BHE como son los órganos circumventriculares, en todas las condiciones experimentales (Figura 8). A los 14 DPI, se observó la tinción azul en el parénquima estriatal de animales controles, pero la señal era más intensa y extendida en animales inyectados con AG. En concordancia, la fluorescencia roja del EB también aumentó en su mayoría en el estriado (Figura 8-A, B). A los 30 DPI, los animales controles mostraron extravasación de EB restringida a las áreas del cerebro carentes de BHE y una señal prácticamente indetectable a nivel del parénquima cortical y estriatal. Sin embargo, un aumento significativo de la extravasación de EB se observó en animales inyectados con AG respecto de los controles (Figura 8-A, C). Se cuantificó un aumento de 3 y 2.5 veces en el total de fluorescencia roja de EB en el estriado de animales inyectados con AG a los 14 y 30 DPI, respectivamente (Figura 8-D).

Por el contrario, no se detectó IgG en el parénquima cerebral de animales inyectados con AG, solamente se reconoció en los plexos coroideos de ambos ventrículos tanto en animales controles como inyectados con AG a los 14 y 30 DPI (Figura 8-E). Esto sugiere que la hiperpermeabilidad de la BHE en animales inyectados con AG está restringida a moléculas de bajo peso molecular.



**Figura 8. Aumento de la permeabilidad de la BHE luego de la inyección intracisternal de AG. (A)** Imágenes panorámicas de microscopía de luz que muestran la tinción con EB en cortes coronales de cerebro de animales inyectados con vehículo o AG a los 14 y 30 DPI. Se observa una coloración azul más intensa en animales inyectados con AG, en su mayoría a nivel del estriado, indicando un aumento de la permeabilidad de la BHE. En los cuadrados punteados se enmarcan las áreas analizadas de corteza y estriado que luego se representan en B y C. **(B-C)** Imágenes de epifluorescencia en las que se observa la fluorescencia roja emitida por el colorante EB en la corteza parietal y el estriado. La señal fluorescente es más intensa en animales inyectados con AG respecto de los inyectados con vehículo de la misma edad. Nótese la señal de EB en zonas que carecen de BHE como los plexos coroideos (\*) en todos los animales perfundidos con EB. A los 14 DPI, la señal de EB en el parénquima de animales inyectados con vehículo es mayor que a los 30 DPI ya que a esa edad la BHE no es completamente funcional. Con líneas punteadas se delimita el tejido, la región de corteza, estriado y ventrículos laterales. **(D)** Cuantificación de la fluorescencia de EB en la corteza parietal (Pcx) y estriado (St) que muestra un aumento significativo en el estriado de animales inyectados con AG a los 14 y 30 DPI respecto de los controles (\*)  $p < 0.05$ . **(E)** Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia muestran la inmunomarcación para IgG de rata en el estriado de animales inyectados con vehículo y AG a los 14 DPI. Observar la señal positiva únicamente a nivel de los plexos coroideos (CP, flechas blancas) pero no en el estriado. Barras de calibración en A: 1 mm; B, C y D: 500  $\mu$ m; E: 200  $\mu$ m.

## **2. EB marcó neuronas estriatales en animales inyectados con AG**

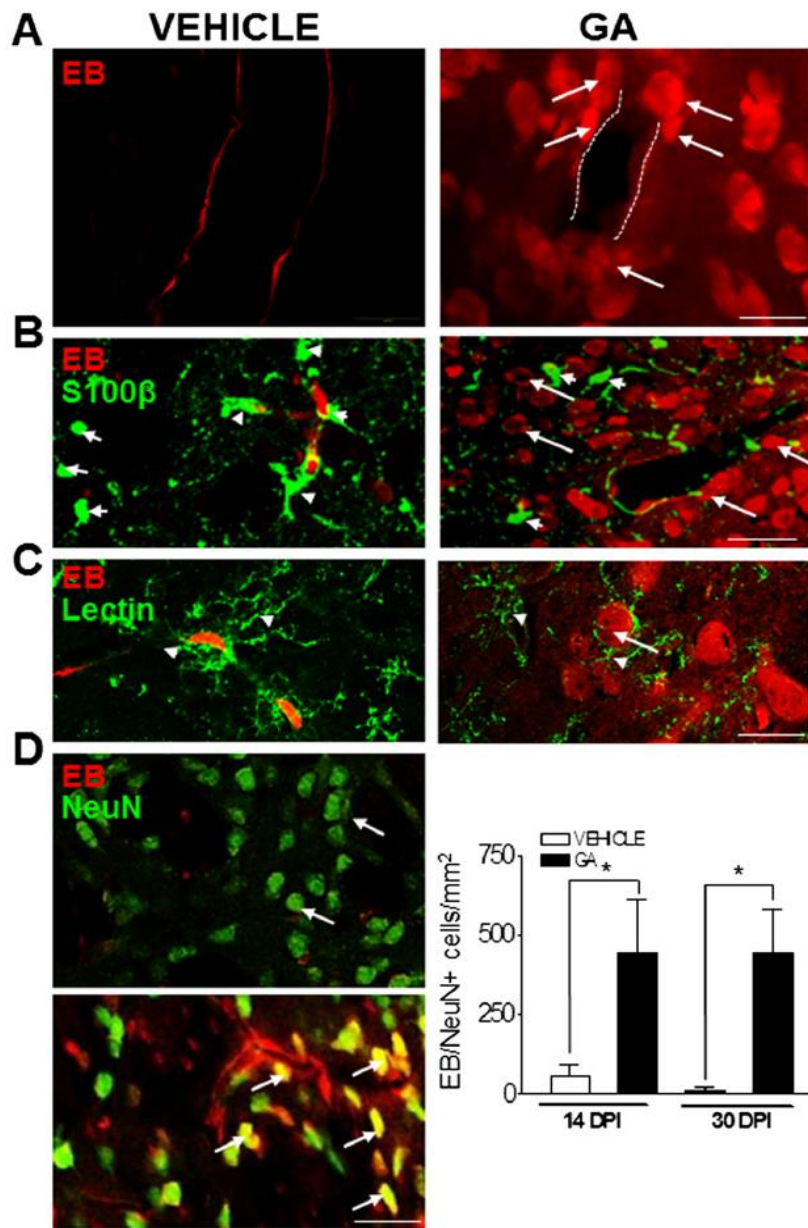
Dado que EB es capaz de unirse a proteínas y emitir una señal de fluorescencia (del Valle et al., 2008), el análisis con microscopio confocal de la señal fluorescente permitió la identificación de células EB positivas rodeando los vasos sanguíneos en animales inyectados con AG (Figura 9-A). La señal de EB no co-localizó con la señal de astrocitos S100 $\beta$  positivos que estaban dispersos en el estriado y cuyas prolongaciones rodeaban a algunos vasos sanguíneos (Figura 9-B). Tampoco co-localizó con la microglía marcada con lectina de tomate (Villacampa et al., 2013) cuya señal se observó dispersa en el parénquima estriatal y rodeando células EB positivas (Figura 9-C).

Por el contrario, la mayoría de las células EB positivas del estriado fueron co-marcadas con NeuN, marcador nuclear neuronal y el número de neuronas EB+/NeuN+ en el estriado de ratas inyectadas con AG fue 8 y 40 veces mayor que en los controles, a los 14 y 30 DPI respectivamente (Figura 9-D). Por lo tanto, los datos sugieren que EB fue internalizado exclusivamente en neuronas.

## **3. Disminución de la expresión de AQP4 y PDGFR $\beta$ rodeando vasos sanguíneos en animales inyectados con AG**

Primero, se empleó histoquímica utilizando lectina de tomate para evaluar los efectos de la inyección perinatal de AG en la densidad microvascular. Además de marcar los glúcidos de membrana en las células microgliales, la lectina también se une al glucocálix endotelial y a glicoproteínas de la membrana basal, permitiendo visualizar distintos perfiles de vasos sanguíneos. Se analizaron 40 perfiles de vasos sanguíneos (< 10  $\mu$ m de diámetro) por campo en animales controles e inyectados con AG (Figura 10-A). El análisis cuantitativo del área de pequeños vasos teñidos con lectina no reveló diferencias significativas entre animales inyectados con AG y controles a los 14 y 30 DPI (Figura 10-B). Tampoco se observaron cambios morfológicos en la microvasculatura y esto fue confirmado utilizando la tinción con cresil violeta que permitió observar núcleos aplanados de células endoteliales rodeando la luz de pequeños vasos, en animales inyectados con AG y controles (Figura 10-C).

La inmunomarcación de AQP4 permitió el reconocimiento de los podocitos o pies terminales astrocitarios rodeando distintos perfiles de vasos sanguíneos en animales inyectados con AG y controles a los 14 y 30 DPI (Figura 11-A). En animales inyectados con AG la señal de AQP4 se redujo casi un 50%, observándose una marca débil rodeando algunos vasos sanguíneos a los 30



**Figura 9. Tinción de neuronas estriales con EB luego de la administración de AG.** (A) Imágenes con microscopio confocal evidencian que EB extravasó al parénquima e ingresó en células que rodean vasos sanguíneos (líneas blancas) las cuales presentan una morfología neuronal típica (flechas blancas). Las imágenes corresponden a la región del estriado de animales a los 30 DPI. En animales inyectados con vehículo, EB se observa únicamente en la pared del vaso sanguíneo. (B) EB no atravesó la membrana de astrocitos S100 $\beta$  positivos en el estriado de animales inyectados con AG (verde, puntas de flecha). (C) Microglía marcada con lectina de tomate (verde, puntas de flecha) tampoco fue teñida con EB. Se muestra la microglía en estrecho contacto con las neuronas EB positivas (flechas blancas) en animales inyectados con AG. (D) Se observa la co-localización de EB (rojo) con NeuN (verde) en neuronas estriales (amarillo, flechas blancas, imagen inferior) de animales inyectados con AG. Por el contrario, en el estriado de animales inyectados con vehículo no se observa co-localización y las neuronas NeuN positivas muestran una distribución y apariencia normal (imagen superior). La cuantificación de las neuronas doble marcadas EB/NeuN+ evidencia un aumento significativo (\*  $p < 0.05$ ) del número de esta subpoblación de neuronas a los 14 y 30 DPI, con respecto a los controles. Barras de calibración en A: y C: 15  $\mu\text{m}$ ; B y D: 100  $\mu\text{m}$ .

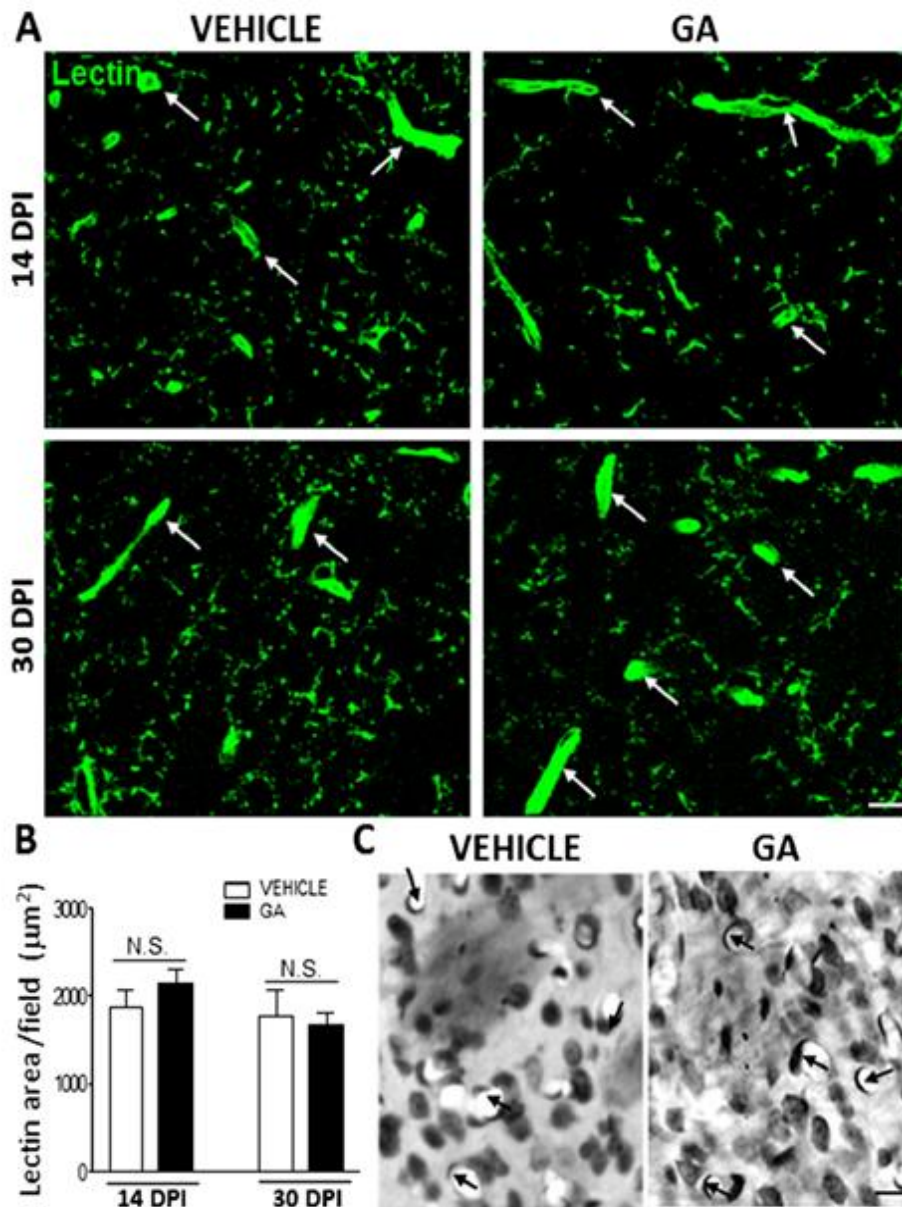
DPI (Figura 11-C). Por otro lado, la inmunoreactividad para PDGFR $\beta$  mostró la tinción de algunos vasos sanguíneos (recubiertos por prolongaciones de pericitos) y pequeñas células de núcleo redondo y prolongaciones lisas y finas cercanas a los vasos sanguíneos en cortes de animales controles (Figura 11-B). En animales inyectados con AG, se observó una reducción de casi 50% en la señal de PDGFR $\beta$  rodeando vasos sanguíneos (recubiertos por pericitos) únicamente a los 30 DPI (Figura 11-C).

#### **4. Expresión de laminina, ZO-1 y ocludina en animales inyectados con AG**

El análisis de la inmunomarcación de laminina, glicoproteína extracelular presente en la membrana basal de los vasos sanguíneos (Engelhardt & Sorokin, 2009), mostró una reducción significativa (40%) en el área positiva rodeando a los pequeños vasos (< 10  $\mu$ m de diámetro) en la región del estriado a los 30 DPI (Figura 12-A, B). Además, se constató una marcación intracelular de laminina en todos los animales, pero estaba aumentada en animales inyectados con AG (Figura 12-A). Por otro lado, los niveles de expresión de proteínas constituyentes de las uniones estrechas interendoteliales, ZO-1 y ocludina, no cambiaron en el estriado de animales inyectados con AG (Figura 12-C, D). La inmunohistoquímica para ZO-1 mostró una señal positiva en los vasos sanguíneos de características similares en animales inyectados con AG y controles (Figura 12-C).

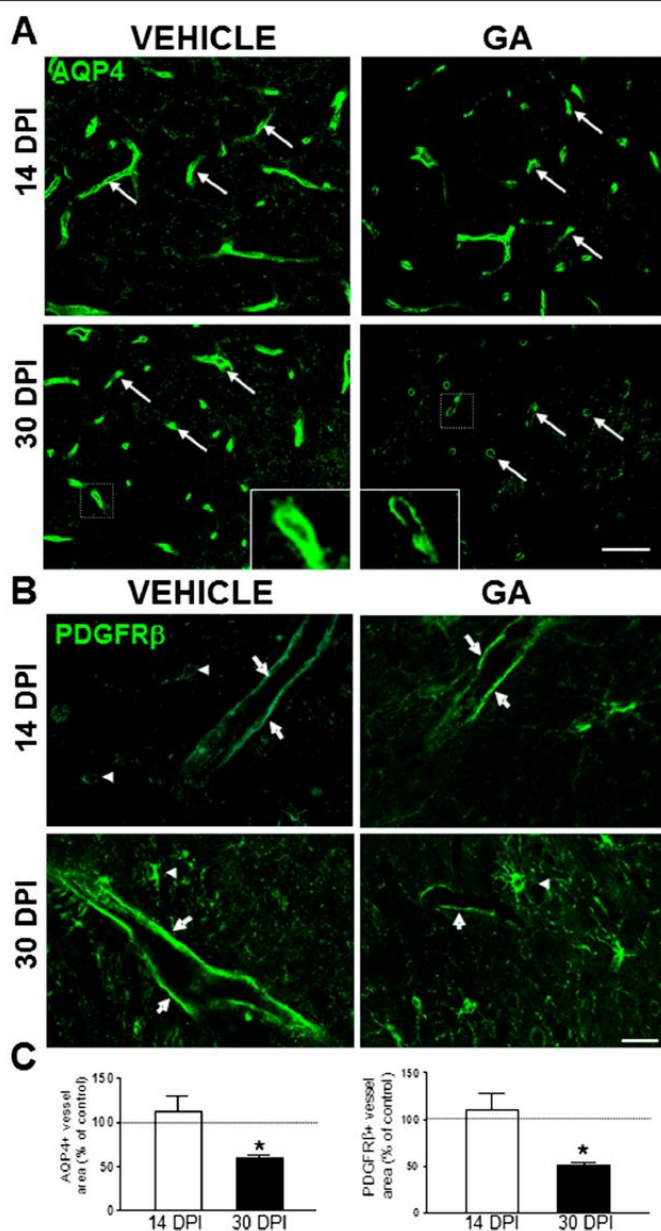
#### **5. AG induce la constricción de capilares en rodajas de corteza cerebral**

Rodajas de cerebros de ratas P21 fueron perfundidas con LCRa (5 min)- 1mM AG (20 min) y burbujeadas con 20%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>/75%N<sub>2</sub>, mientras se capturaban imágenes cada 30 seg de un capilar cortical. AG causó una reducción del diámetro capilar de ~12% al cabo de 25 min ( $p < 0.05$ ,  $n=10$ ) (Fig. 13-A, B). 5 mM AG tuvo efectos similares ( $p < 0.05$ ,  $n=5$ , dato no se muestra). Además, se realizaron experimentos controles perfundiendo solamente LCRa (N=3) y controles positivos con endotelina 1 (10 nM) (N=3) (dato no se muestra).



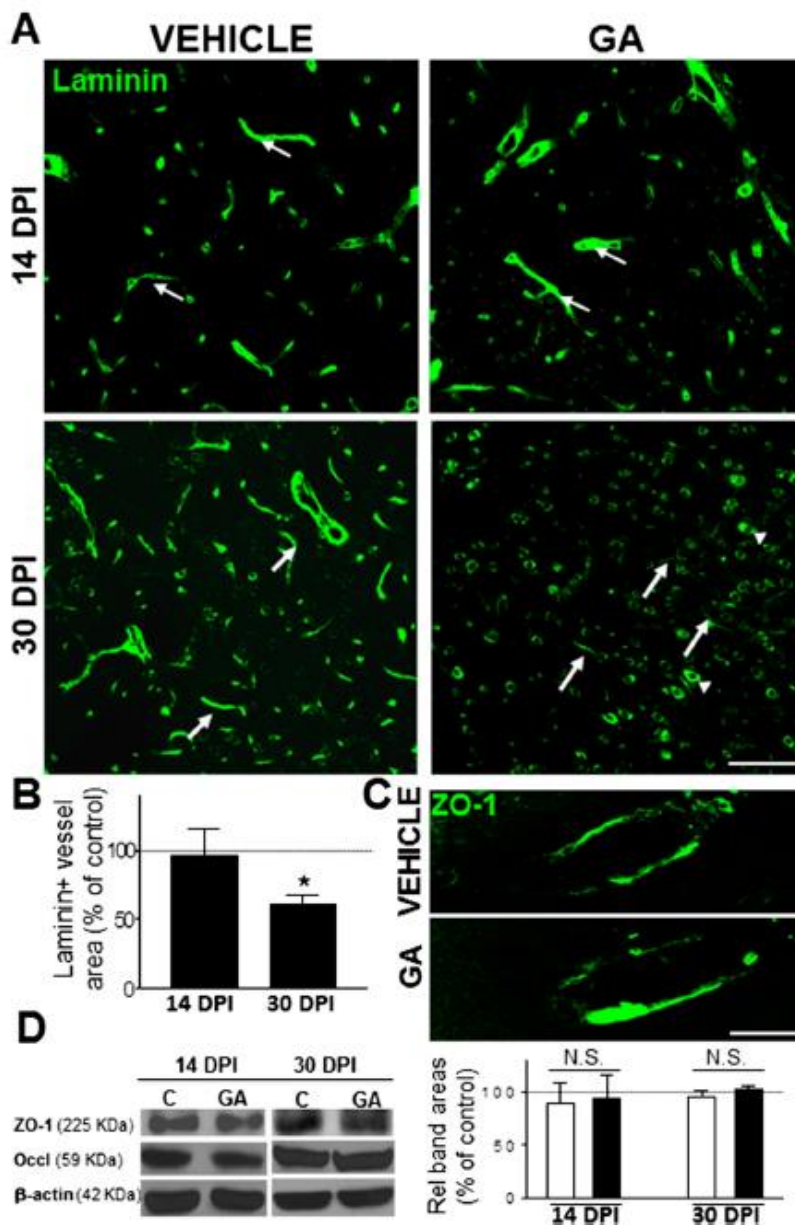
**Figura 10. La densidad microvascular en el estriado no está afectada luego de la inyección intracisternal de AG. (A)** Imágenes confocales de vasos sanguíneos (flechas blancas) y procesos microgliales que se tiñen con lectina de tomate en animales inyectados con AG y vehículo a los 14 y 30 DPI. **(B)** La cuantificación del área de pequeños vasos ( $<10 \mu\text{m}$ ) teñidos con lectina y delineados manualmente muestra que no existen diferencias significativas en animales inyectados con AG respecto de los inyectados con vehículo. **(C)** Cortes coronales de la región del estriado teñidos con cresil violeta muestra perfiles transversales y oblicuos de capilares de apariencia normal. Nótese los núcleos aplanados de células endoteliales (flechas negras) recubriendo la pared interior de los capilares en animales inyectados con AG y vehículo. Barras de calibración en A y C:  $15 \mu\text{m}$ .





**Figura 11. La administración perinatal de AG afecta a los astrocitos y pericitos. (A)** Imágenes confocales de la inmunofluorescencia de AQP4 (flechas blancas) localizada en los podocitos astrocitarios rodeando la vasculatura en la región del estriado de animales inyectados con AG y vehículo. No se observan cambios significativos a los 14 DPI. A los 30 DPI se evidencia una disminución de la inmunorreactividad, observándose una delgada marca positiva rodeando algunos vasos sanguíneos en animales inyectados con AG (imágenes ampliadas). **(B)** Imágenes representativas de la inmunorreactividad de PDGFRβ evidencian una señal positiva rodeando los vasos sanguíneos (flechas blancas) y cuerpos celulares medianos con prolongaciones visibles. A los 30 DPI, se observa una reducción de la señal de PDGFRβ rodeando vasos sanguíneos en animales inyectados con AG respecto de los controles. **(C)** La cuantificación del área de vasos sanguíneos positivos para AQP4 (izquierda) y PDGFRβ (derecha) confirma una reducción significativa de este parámetro en animales inyectados con AG respecto de los inyectados con vehículo a los 30 DPI. Los valores se representan como el porcentaje respecto de los controles de la misma edad. (\*) Indica significación estadística a  $p < 0.05$ . Barras de calibración en A: 50  $\mu\text{m}$  y C: 20  $\mu\text{m}$ .



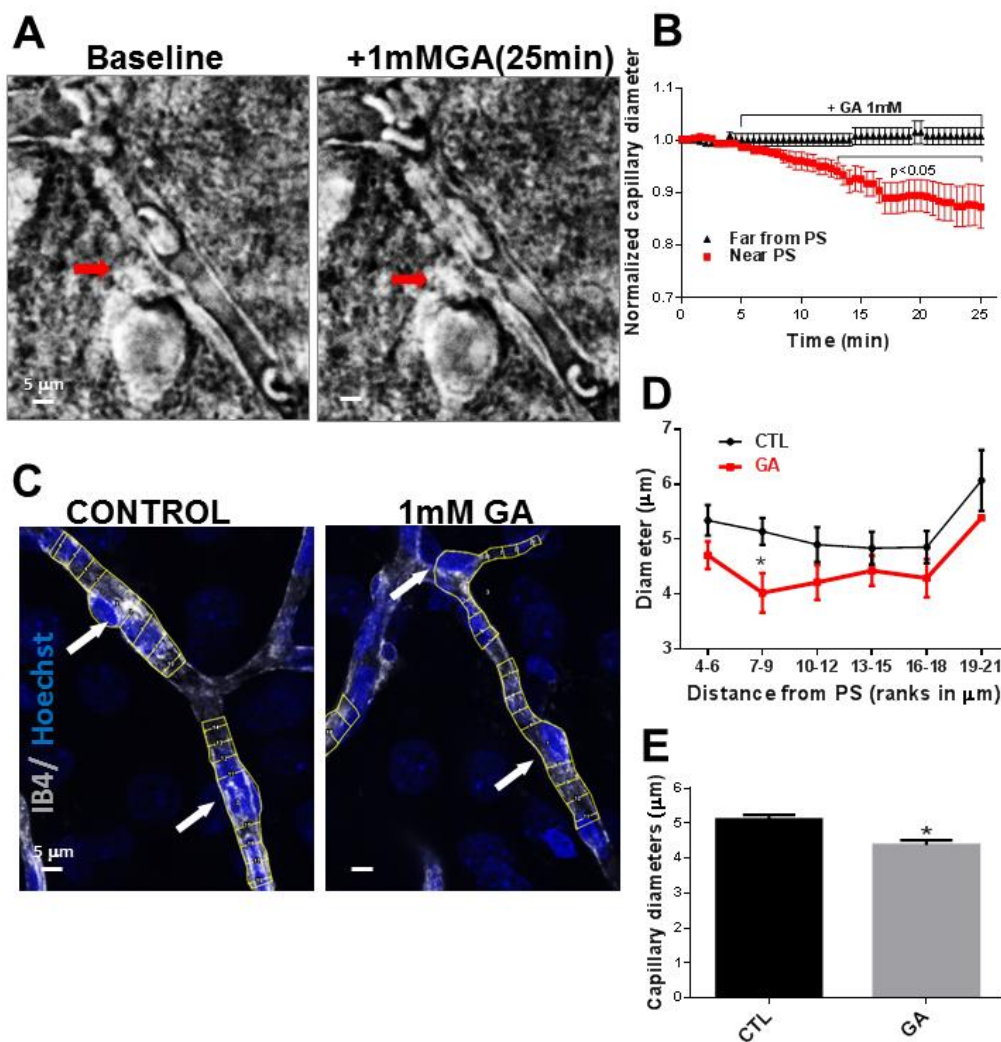


**Figura 12. Reducción de la expresión de laminina en la microvasculatura del estriado en animales inyectados con AG. (A)** Imágenes representativas de cortes de cerebro a nivel del estriado muestran la inmunorreactividad de laminina localizada en la lámina basal de vasos sanguíneos (flechas blancas). A los 14 DPI no se observan diferencias entre animales inyectados con AG y vehículo. Sin embargo, a los 30 DPI se observa una importante reducción de la señal a nivel de los vasos sanguíneos junto con un aumento de la expresión de laminina intracitoplasmática en células con morfología tipo neuronal (puntas de flecha). **(B)** La cuantificación del área de vasos sanguíneos (<10  $\mu$ m) positivos para laminina muestra una reducción significativa a los 30 DPI en animales inyectados con AG respecto de los controles. **(C)** Se muestra a alta magnificación la inmunorreactividad de ZO-1 en vasos sanguíneos estriatales de animales inyectados con AG y vehículo a los 30 DPI. No se evidencian cambios en la intensidad o distribución de la señal. Barras de calibración en A: 50  $\mu$ m y C: 15  $\mu$ m. **(D)** Western blotting (panel izquierdo) y cuantificación (panel derecho) de la expresión de ocludina y ZO-1 en muestras de tejido estriatal de animales inyectados con AG o vehículos a los 14 y 30 DPI.  $\beta$ -actina se utilizó como control de carga proteica. Los datos se representan como porcentaje del área de las bandas respecto de los controles. Columnas blancas: Ocludina (% AG/control); columnas negras: ZO-1 (% AG/control).

Por otro lado, rodajas de cerebro carbogenadas e incubadas con 1 mM AG (30 min) o LCRa solo, fueron fijadas y procesadas para inmunohistoquímica. En la figura 13-C se muestra la proyección en z del *stack* en donde se visualizan 2 capilares con IB4 (gris) y los núcleos de los pericitos con DAPI (flecha blanca). En amarillo se recuadra la región de interés del vaso sanguíneo, conteniendo al soma y núcleo del pericito y los diámetros medidos. En las figura 13-D se muestra el promedio de los diámetros cuantificados para los capilares de rodajas controles o incubadas con AG en función de la distancia desde el centro del soma del pericito. En el rango entre 7-9  $\mu\text{m}$  de distancia, hay una reducción estadísticamente significativa de los diámetros de capilares incubados con AG respecto de los controles. En la figura 13-E se compararon los promedios de todos los diámetros cuantificados en los capilares controles y AG (dentro de las 20  $\mu\text{m}$  desde el centro del soma del pericito), observándose una reducción significativa cercana al 14% ( $p < 0.001$ ).

## **6. AG no afecta la sobrevivencia de pericitos *ex vivo* o en cultivos primarios**

Se evaluó la viabilidad de los pericitos en rodajas de cerebro expuestas 2h a AG (1 y 5 mM) en presencia de IP e IB4. Se cuantificaron los pericitos IP positivos, los pericitos viables y la cantidad total de núcleos IP en un *stack* de 10  $\mu\text{m}$ . En la figura 14-A se observa una proyección en z de un capilar control y otro expuesto a AG marcado con IB4 y núcleos con DAPI. En la figura 14-B se muestra el % de pericitos muertos (pericitos marcados con PI sobre el total). No se observaron cambios significativos en la viabilidad de los pericitos frente al tratamiento con AG. Por lo tanto, la constricción capilar inducida por AG no parece estar asociada a la muerte de los pericitos en rigor, como sí fue reportado en modelos de isquemia (Hall et al., 2014). Por otro lado, se evaluó viabilidad y expresión de PDGFR $\beta$  en cultivos primarios de pericitos aislados de cerebro de rata expuestos a AG (1 y 5 mM) durante 24 h.



**Figura 13. AG induce la constricción de capilares en rodajas de corteza cerebral. (A)** Imágenes de microscopía de luz con DIC de un capilar sanguíneo conteniendo glóbulos rojos, en la condición basal (Baseline) y luego de 20 min de perfusión del tejido con LCRa (acSF) conteniendo 1 mM AG. Se observa un capilar sanguíneo en un perfil longitudinal que se constriñe con AG en una región cercana al soma del pericito (flecha roja). **(B)** Cuantificación del promedio de diámetros cercanos al soma de un pericito (< 15 μm de distancia). Los diámetros fueron medidos en imágenes obtenidas cada 30 seg en condición basal (5 min con LCRa) y durante 20 min con LCRa + 1 mM AG. A partir del minuto 13, hay una reducción significativa (\*t-test,  $p < 0.05$ ) del diámetro capilar. **(C)** Imágenes de un *stack* que evidencia la tinción de vasos sanguíneos con IB4 fluorescente (gris) y núcleos con DAPI (azul). En amarillo se enmarcan las regiones de interés conteniendo al soma de un pericito y una porción del capilar; y las líneas que representan los diámetros cuantificados a distintas distancias del centro del soma, hasta las 20 μm, en ambas direcciones. **(D)** Gráfica que muestra el promedio de los diámetros medidos en función de los rangos de distancia (desde 4 hasta 20 μm), evidenciando una disminución significativa (\* t-test,  $p = 0.0019$ ) en capilares expuestos a 1 mM AG entre 7-9 μm de distancia del soma del pericito. **(E)** Gráfica que muestra el promedio de todos los diámetros cuantificados (hasta 20 μm del centro del soma del pericito) en rodajas controles y expuestas a 1mM AG. Evidencia una disminución del 14% del diámetro capilar, que es estadísticamente significativa (\* t-test,  $p < 0.0001$ ), en capilares expuestos al AG.

En 14-C se observa el cultivo primario de pericitos control y AG (5 mM) evidenciando por inmunocitoquímica una mayoría de células PDGFR $\beta$  positivas (rojo) y el citoesqueleto de actina marcado con faloidina fluorescente (rojo). No se observan diferencias conspicuas en la inmunorreactividad de PDGFR $\beta$  o en la morfología de las células luego del tratamiento de 24 h con AG (5 mM). En 14-D se grafican los ensayos de viabilidad celular con sulforodamina B que no mostraron cambios significativos en los cultivos expuestos a 1 o 5 mM de AG (24 h) respecto de los controles. En 14-E se muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia (MGV) de PDGFR $\beta$  en células controles o expuestas a AG (5 mM), que no presentó cambios significativos. Por lo tanto, AG no induciría la muerte de pericitos *ex vivo* o en cultivos primarios ni tampoco cambios morfológicos a las 24 h de tratamiento.

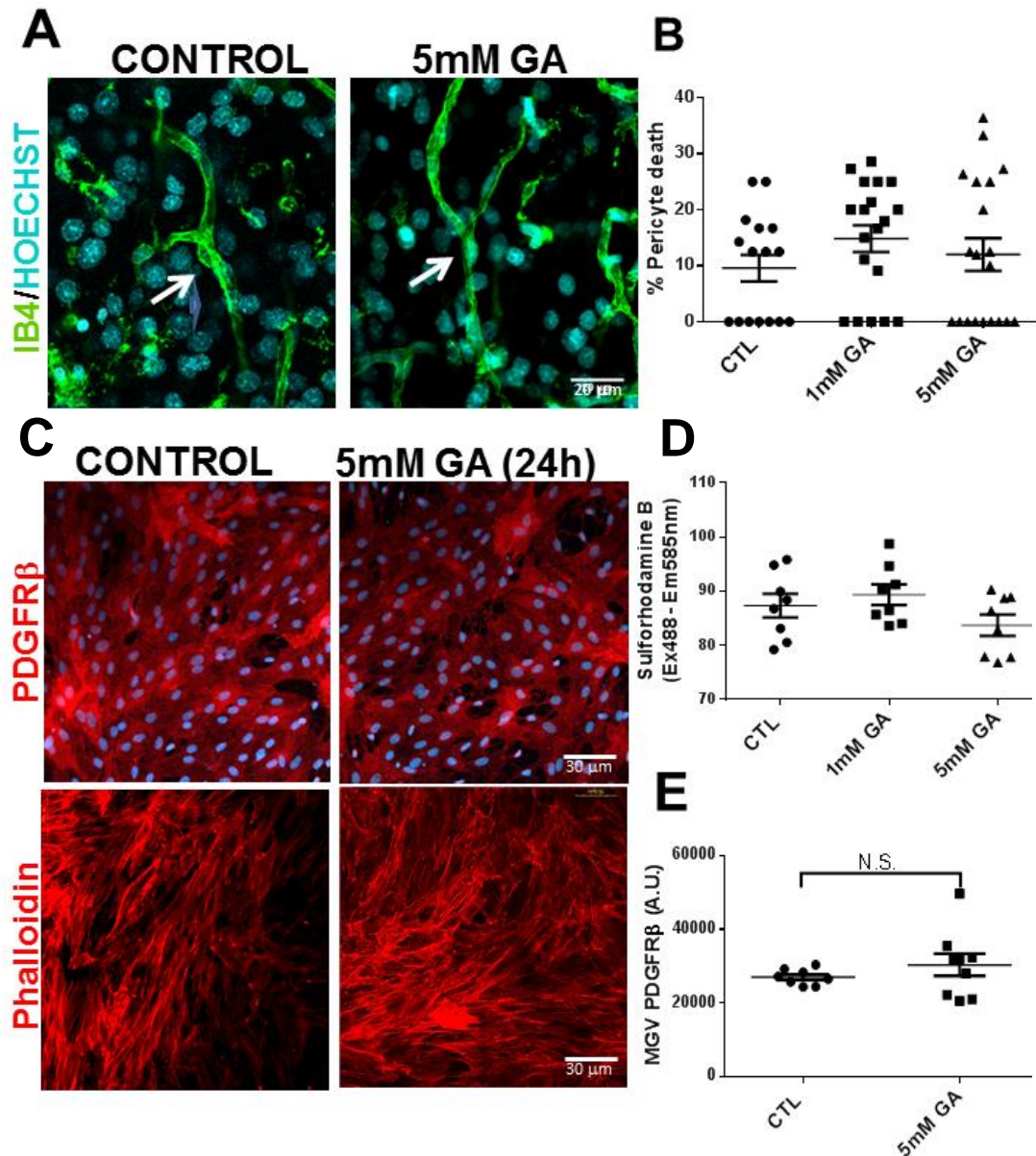
### **7. Caracterización del cultivo primario de pericitos de cerebro**

El cultivo inicial de microvasos de cerebro sobre un sustrato de colágeno evidenció la presencia mayoritaria de pericitos (NG2 y PDGFR $\beta$ +) pero también de células endoteliales (vWF+) y astrocitos (GFAP+) que migraron y proliferaron cubriendo toda la superficie de la placa (Figura 15-A). En los sucesivos pasajes del cultivo sobre placa de plástico sin sustrato, el cultivo primario se fue purificando, enriqueciéndose de pericitos (Figura 15-B) y disminuyendo la proporción de los otros tipos celulares. Los pericitos *in vitro* presentaron una morfología aplanada, elongada y de límites irregulares, dispuestos en estrecho contacto unos con otros. En la figura 15-C se muestra cómo los pericitos cambiaron su morfología en presencia de ATP (10  $\mu$ M), según lo esperado ya que se trata de un agente vasoconstrictor (Kawamura et al., 2003). Se evidenciaron los somas redondeados y las prolongaciones visibles. Por el contrario, en presencia de adenosina (10  $\mu$ M), agente vasodilatador (Matsugi et al., 1997), las células permanecieron planas y adheridas al sustrato.

### **8. AG no afecta la contractilidad de los pericitos en cultivo**

Los pericitos confluentes de segundo pasaje fueron tratados con AG (5 mM, pH=7.4), ATP (100  $\mu$ M, control positivo) o PBS (control) desde 30 min hasta 2 h.

Luego de ese tiempo, las células fueron fijadas, se incubaron con Hoechst y se obtuvieron imágenes con un microscopio de epifluorescencia. En presencia de ATP, se observó un aumento de células contraídas que presentaron un cambio morfológico conspicuo: disminución del tamaño del soma y núcleo y prolongaciones visibles. Sin embargo, no hubo cambios morfológicos en presencia de AG (5 mM) (Figura 16-A).



**Figura 14. AG no afecta la sobrevivencia de pericitos *ex vivo* o en cultivos primarios. (A)** Imágenes de un *stack* que evidencia un capilar control y otro expuesto a 5 mM AG (durante 2 h) marcado con IB4 (verde) y núcleos teñidos con DAPI (celeste). La flecha blanca indica el núcleo de un pericito. **(B)** Gráfica que muestra el % de pericitos muertos (% de pericitos marcados con IP respecto del total de pericitos) en un *stack* de 10  $\mu$ m en condición control y expuestos a 1 y 5mM AG. No se observan cambios significativos entre los distintos grupos. El % de muerte oscila entre el 10-15%, pudiendo deberse a las condiciones de oxigenación del tejido u otros artefactos metodológicos. **(C)** Imágenes de cultivos primarios de pericitos aislados de cerebro de rata que fueron inmunomarcados para PDGFR $\beta$  (panel de arriba) o incubados con faloidina fluorescente para la marcación de actina filamentosa (panel de abajo). No se observan cambios morfológicos, a nivel del citoesqueleto de actina o en la inmunomarcación luego de 24 h de exposición con 5 mM AG. **(D)** Gráfica que muestra un ensayo de viabilidad celular en cultivo con sulforodamina B en condiciones control, 1 y 5mM AG. No se observan diferencias significativas. **(E)** Cuantificación de la inmunofluorescencia (intensidad de fluorescencia, MGV) para PDGFR $\beta$  en cultivos controles y tratados con 5 mM AG. N.S: estadísticamente no significativo.

La señal inmunofluorescente de la cadena liviana de la miosina 9 fosforilada (pMYL9) también aumentó en presencia de ATP (Figura 16-B) respecto de los controles. Pero no hubo cambios significativos frente a la incubación con AG (5 mM). En la figura 16-C se muestra la cuantificación del porcentaje de células contraídas respecto del total de núcleos Hoechst+ y del área inmunopositiva de pMYL9 en las que se observa un incremento únicamente en presencia del agente vasoconstrictor (ATP). Por lo tanto, no habría un efecto directo de AG en la contractilidad de pericitos aislados.

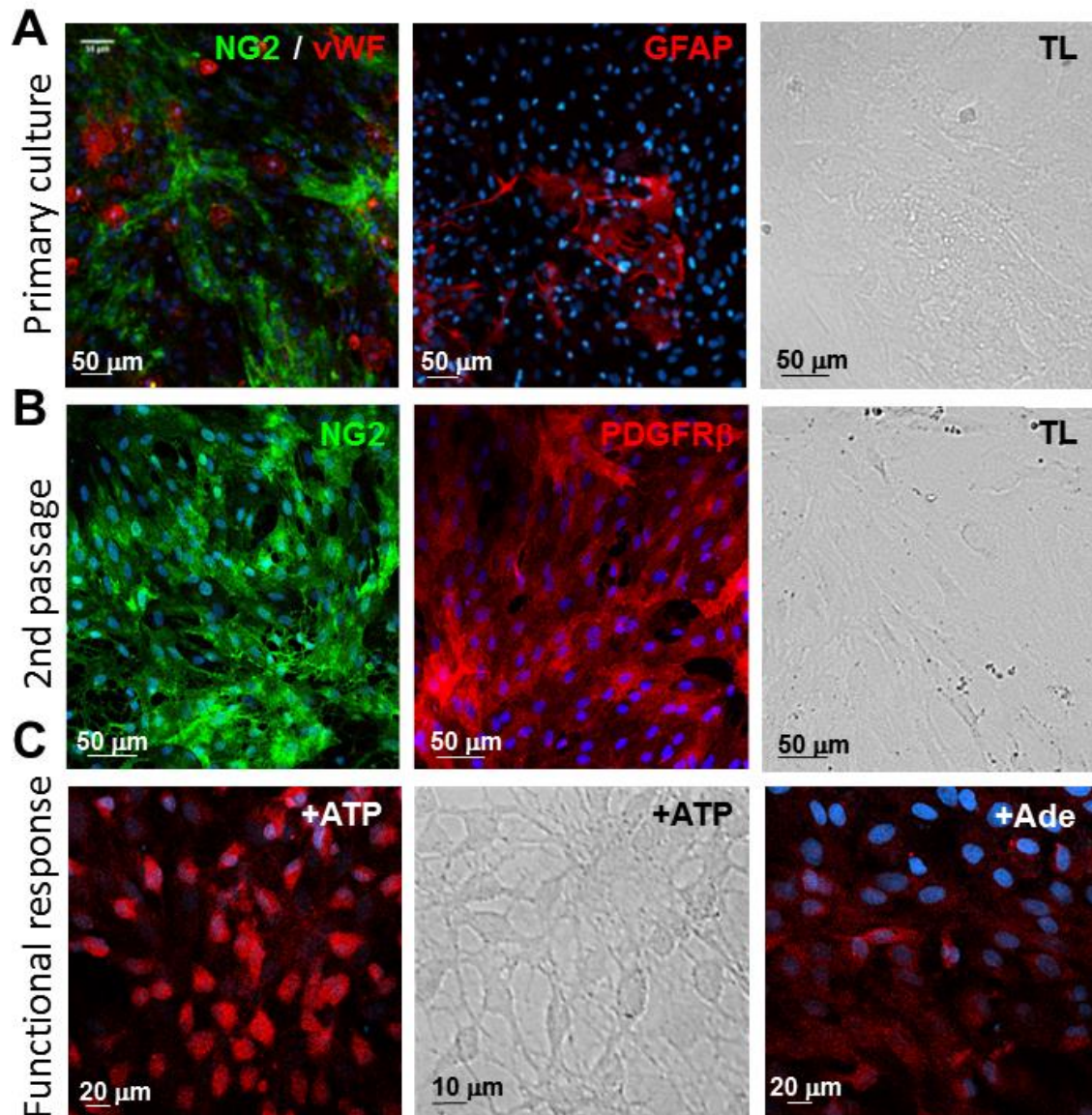
### **9. El medio condicionado de astrocitos induce la contractilidad de los pericitos *in vitro***

Los pericitos de segundo pasaje fueron tratados con medios condicionados de astrocitos controles (MC-C) y de astrocitos tratados con AG (MC-AG), sin diluir, durante 2 h. Se observó un notable cambio morfológico en los pericitos en respuesta al medio condicionado de los astrocitos: somas y núcleos más pequeños y redondeados con prolongaciones celulares visibles (flechas blancas) (Figura 17-A). Además, se constató un aumento de la inmunorreactividad de la cadena liviana de la miosina 9 fosforilada en presencia de MC-C y MC-AG (Figura 17-B). La cuantificación del % de células contraídas y del área inmunopositiva para pMYL9 evidencia un aumento significativo de ambos parámetros en presencia de MC-C y MC-AG respecto del control, sin diferencias significativas entre ambos medios condicionados. Por lo tanto, si bien el medio condicionado de astrocitos induce la contractilidad de los pericitos, el AG no estaría modulando este efecto *in vitro*. Para intentar dilucidar qué molécula conocida podría estar mediando el efecto del medio condicionado de los astrocitos sobre los pericitos, se probaron distintos inhibidores y enzimas como se muestra en la tabla 3 (Materiales y Métodos). Ninguno de los inhibidores logró neutralizar la contracción de los pericitos inducida por el medio condicionado de los astrocitos. Esto nos permite descartar que el efecto de contractilidad este mediado por ATP o radicales libres liberados por los astrocitos. Tampoco estaría influenciado por la activación de los receptores P2X o P2Y o influenciado por la apertura de hemicanales o uniones comunicantes en los cultivos de pericitos.

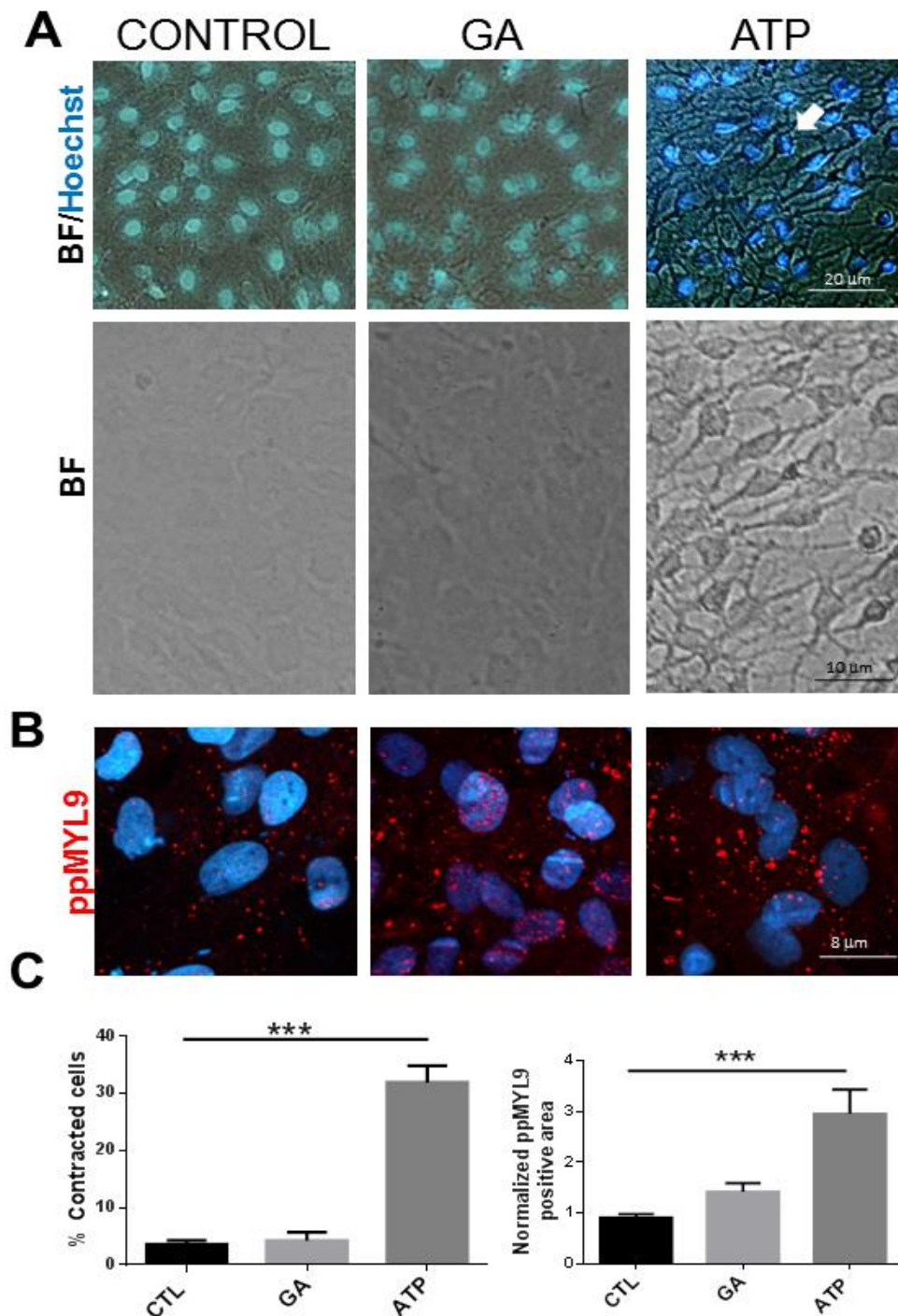
### **10. El medio condicionado de astrocitos tratados con AG inhibe la migración de pericitos**

Se realizaron ensayos de *scratch* en cultivos de pericitos confluentes y se incubaron con MC-C y MC-AG en una dilución 1:1 o con AG (5 mM, pH=7.4) o PBS (controles) durante 48 h.



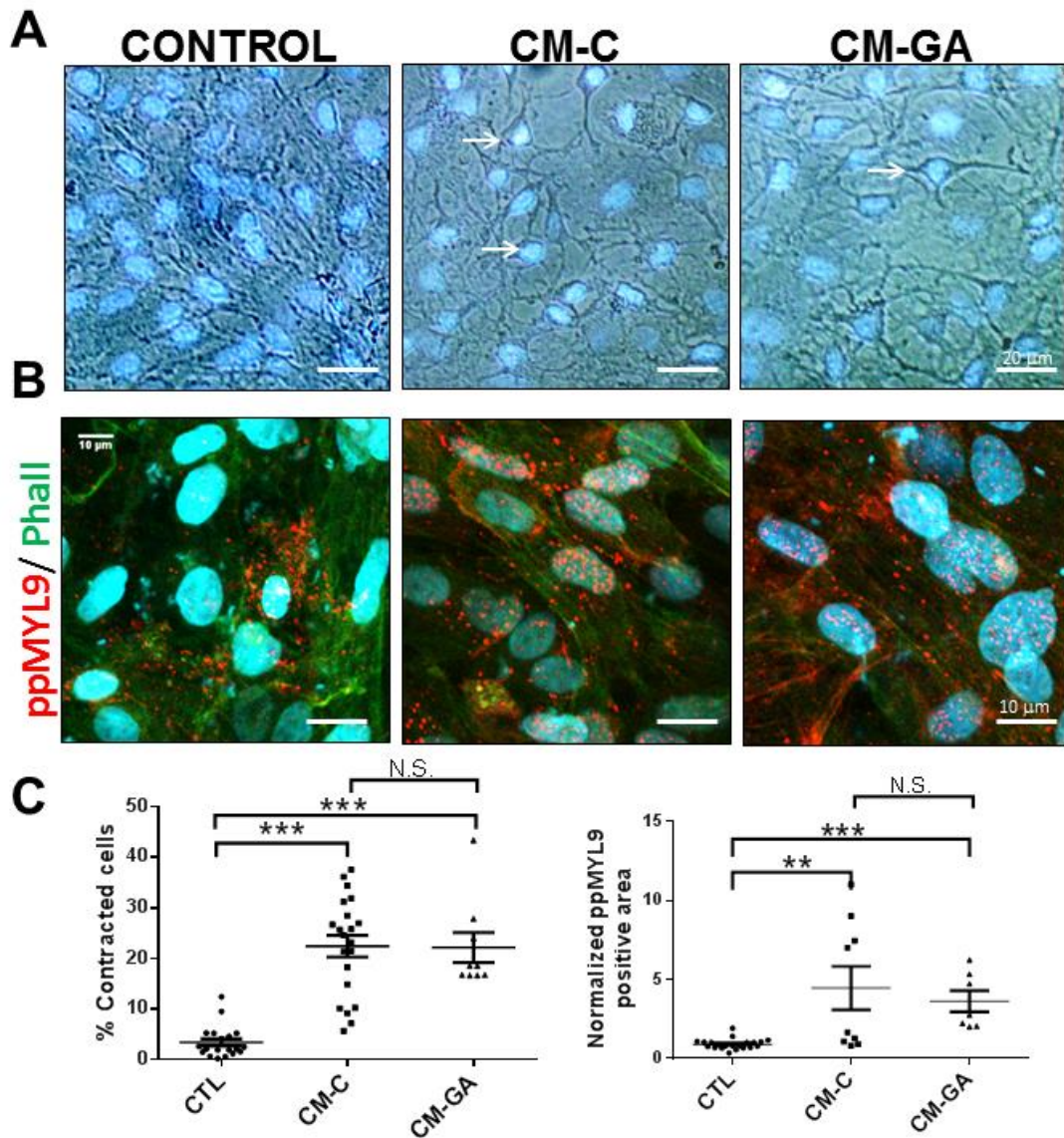


**Figura 15. Caracterización de un cultivo primario de pericitos aislados de cerebro de rata. (A)** Imágenes que muestran un cultivo primario obtenido por la proliferación y migración de células procedentes de microvasos corticales adheridos a un sustrato de colágeno. El cultivo inicial en confluencia contiene distintos tipos celulares; pericitos (NG2, verde), células endoteliales (factor de von Willebrand, vWF, rojo) y astrocitos (GFAP, rojo). **(B)** Cultivo de pericitos purificado, de un segundo pasaje sobre sustrato de plástico, que expresa los marcadores pericitarios prototípicos; NG2 (verde) y PDGFR $\beta$  (rojo). Son células aplanadas de forma irregular que se disponen en estrecho contacto entre sí, como se evidencia por microscopía de luz. **(C)** Respuesta funcional de los pericitos frente a la adición de ATP (10  $\mu$ M, 1 h) o adenosina (10  $\mu$ M, 1 h). En presencia de ATP las células presentan un cambio morfológico; adoptan una morfología estrellada con soma y núcleos que se reducen y las prolongaciones se hacen visibles como se evidencia por microscopía de luz y mediante marcación con bromuro de etidio (BrET) (rojo). En presencia de adenosina las células mantienen una morfología aplanada como se visualiza con la marcación con BrET (núcleo y citoplasma en rojo). TL: luz transmitida.



**Figura 16. AG no afecta la contractilidad de los pericitos en cultivo. (A)** Imágenes de microscopía de luz por contraste de fases de cultivos de pericitos tratados con ATP (100  $\mu$ M) o AG (5 mM) por 2 h. Los núcleos se marcan con Hoechst. Se observa un cambio morfológico conspicuo; disminución del tamaño **(B)** del soma y núcleo con prolongaciones visibles. **(B)** Imágenes de la inmunorreactividad de la cadena liviana de la miosina 9 difosforilada (ppMYL9, rojo) en cultivos de pericitos controles o expuestos al ATP (100  $\mu$ M) o AG (5 mM) durante 2 h. **(C)** Gráficas que muestran el % de células contraídas (% de células con cambios morfológicos respecto del total) y el área inmunopositiva de ppMYL9. Se observa un aumento significativo de células contraídas con ATP respecto del control, pero no hay diferencias en presencia de AG. \*\*\* Test de Kruskal- Wallis y de comparación múltiple de Dunn,  $p < 0.001$ .



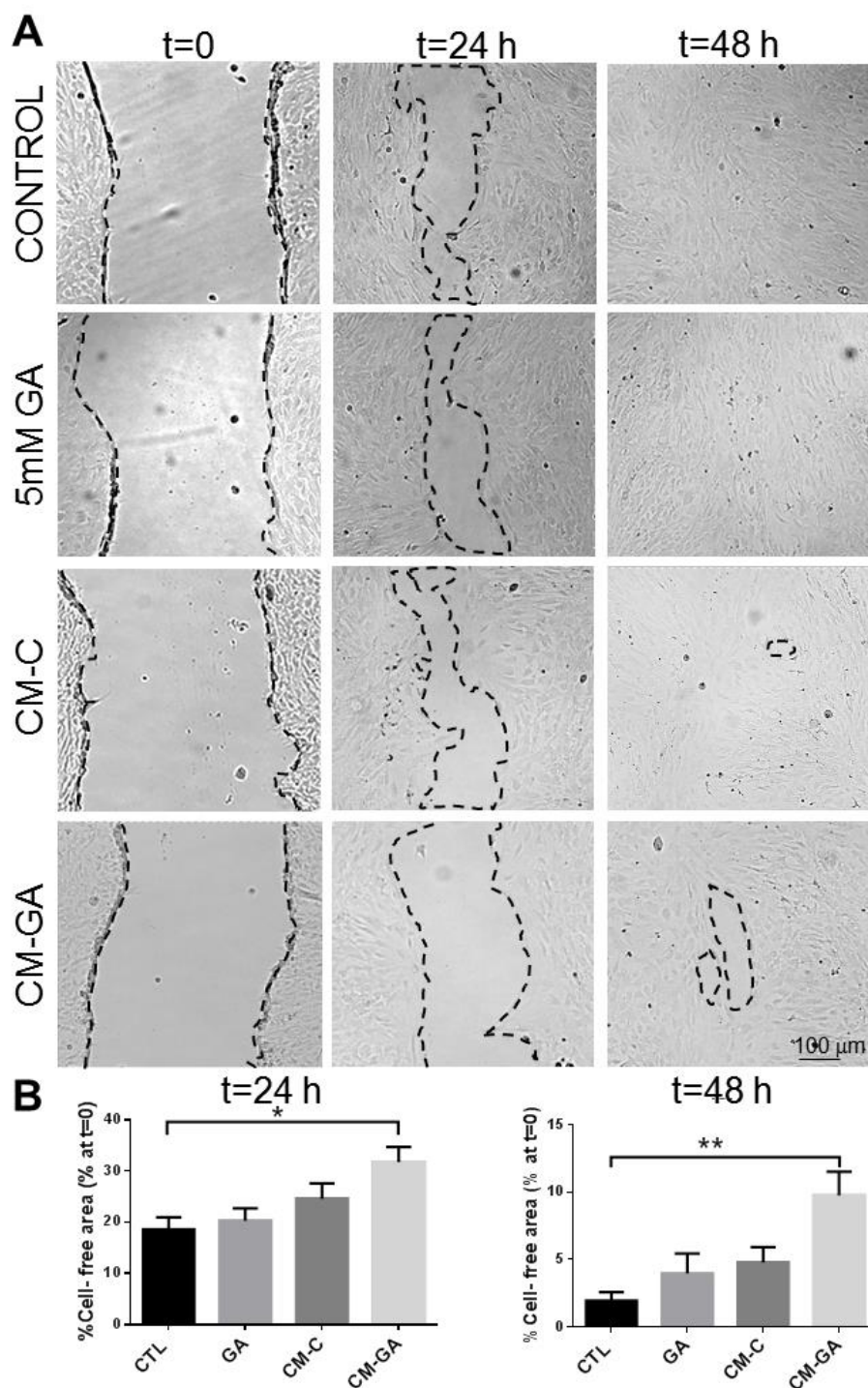


**Figura 17. El medio condicionado de astrocitos induce la contractilidad de los pericitos *in vitro*.** (A) Imágenes de microscopía de luz por contraste de fases de cultivos de pericitos controles e incubados con MC-C (CM-C) y MC-AG (CM-GA) durante 2 h. Se observa un cambio morfológico conspicuo similar al observado con ATP; disminución del tamaño del soma y núcleo con prolongaciones visibles, en pericitos tratados con MC-C y MC-AG. (B) Imágenes de microscopio confocal de los pericitos inmunomarcados para la cadena liviana de la miosina difosforilada (ppMYL9, rojo) e incubados con faloidina para evidenciar la actina (Phall, verde). Se observa un aumento de la señal con MC-C y MC-AG. (C) Gráficas que muestran el % de células contraídas y el área inmunopositiva de ppMYL9 en las tres condiciones experimentales. Se observa un aumento significativo de células contraídas y de la inmunorreactividad de ppMYL9 en pericitos tratados con MC-C y MC-AG respecto del control (CTL). Test de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Las imágenes con microscopio de luz del área del *scratch* a tiempo 0h, 24 h y 48 h se muestran en la figura 18-A. Mientras que los pericitos controles y tratados con AG logran cubrir casi toda el área libre de células a las 48 h, los pericitos en presencia del medio condicionado de astrocitos tardan más, siendo significativo el retraso del cierre del *scratch* en presencia de MC-AG (Figura 18-B). El retraso en el cierre del *scratch* podría ser el resultado de la inhibición de la migración o de la proliferación celular. Para analizar este aspecto, se adicionó BrdU al momento del *scratch* y luego de fijar las células a las 48 h, se realizó la inmunocitoquímica para revelar el porcentaje de células BrdU+/ Hoechst+. No se observaron cambios significativos en el porcentaje de células proliferantes en la zona del *scratch* con los tratamientos de AG, MC-C o MC-AG (Figura 19-A, B). Por otro lado, tampoco hubo diferencias significativas en la viabilidad celular en presencia de MC-C o MC-AG evaluada mediante el ensayo con sulforodamina B. Por lo tanto, el retraso del cierre del *scratch* se debería a una inhibición de la migración de los pericitos causada por los medios condicionados de astrocitos, siendo la inhibición aún mayor en presencia del medio condicionado de astrocitos tratados con AG.

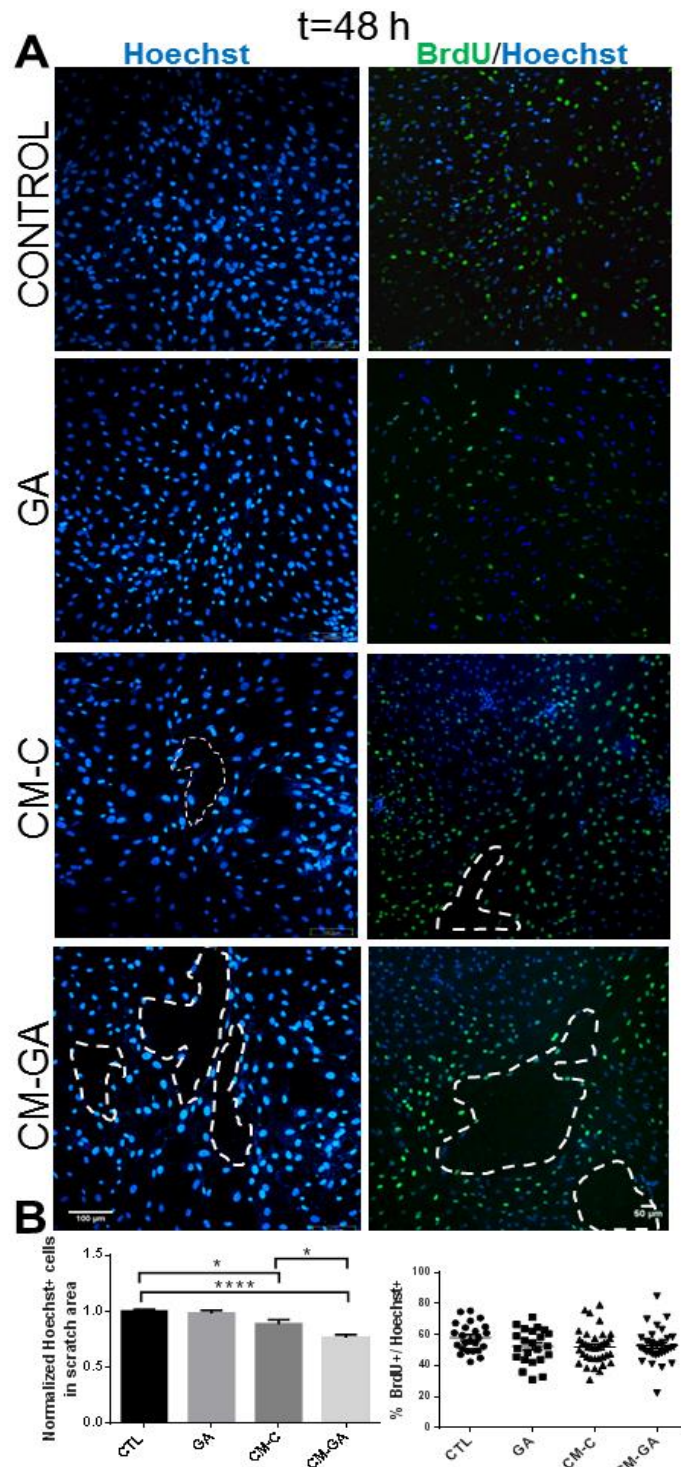
### **11. Los astrocitos tratados con AG secretan niveles aumentados de citoquinas solubles**

Para conocer qué factores solubles secretados por astrocitos podrían afectar a los pericitos *in vitro*, se analizó el medio condicionado de astrocitos controles o tratados con AG utilizando un kit comercial que permite determinar los niveles relativos de 32 citoquinas solubles (ver Materiales y Métodos). El experimento se realizó por duplicado y el promedio de los valores se muestran en la Tabla I. En la parte superior se muestran imágenes de un experimento donde se observan las membranas reveladas expuestas a los medios condicionados de astrocitos (MC-C o MC-AG) y reveladas por quimioluminiscencia con cámara CCD. Se encontraron los niveles aumentados de 12 citoquinas/factores solubles en MC-AG respecto de MC-C, incluyendo el aumento en la expresión del inhibidor tisular de metaloproteinasas I (TIMP-1), VEGF-A, molécula de adhesión intracelular I (ICAM-1), L-selectina, entre otros, que son de relevancia en el contexto de la migración celular, permeabilidad vascular y angiogénesis (Gerhardt et al., 2003; Davis & Senger, 2008; Chapouly et al., 2015). El aumento de TIMP-1 podría contribuir a inhibir la migración de los pericitos inducida por MC-AG ya que las metaloproteinasas de matriz (MMPs) promoverían la migración mediante la degradación de los componentes de matriz extracelular (ver revisión Aguilera & Brekken, 2013).

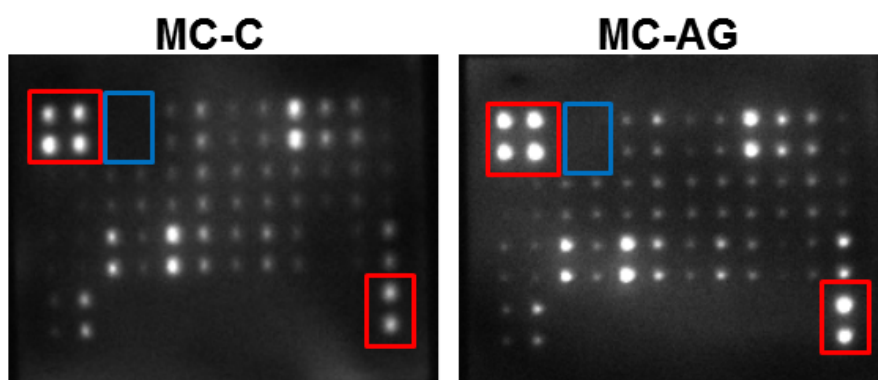


**Figura 18.** El medio condicionado de astrocitos tratados con AG inhibe el cierre del *scratch* en cultivos de pericitos. **(A)** Imágenes de microscopía de luz con contraste de fases de un ensayo de *scratch*, a las 0h, 24 h y 48 h realizado en pericitos tratados con 5 mM AG (GA), MC-C (CM-C) y MC-AG (CM-GA). Se observa con el paso del tiempo una disminución del área libre de células en todas las condiciones experimentales debido a la proliferación y migración de los pericitos. Sin embargo, el área libre de células es mayor en MC-AG. **(B)** Cuantificación del área libre de células a las 24 h y 48 h del *scratch*, muestra un aumento significativo para MC-AG respecto del control. Test de Kruskal-Wallis y de comparación múltiple de Dunn, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ .





**Figura 19. El medio condicionado de astrocitos tratados con AG inhibe la migración pero no la proliferación en cultivos de pericitos. (A)** Imágenes de fluorescencia que muestran a las 48h, las células Hoechst+ y las células proliferantes (BrdU+) en la zona del *scratch* en cultivos controles y tratados con 5mM AG (GA), MC-C (CM-C) y MC-AG (CM-GA). Se observa un aumento del área libre de células con los medios condicionados siendo más evidente en presencia de MC-AG. **(B)** Gráficas que muestran el número de células Hoechst+ y el % de células proliferantes (%BrdU+/Hoechst+) en la zona del *scratch* a las 48h. Se observa una disminución significativa del número de células en la zona del *scratch* en presencia de MC-C y MC-AG. En MC-AG el área libre de células es significativamente menor respecto de MC-C. Test de ANOVA de 1 vía y de comparación múltiple de Tukey, \*  $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . No se observan diferencias significativas en la tasa de proliferación que es de 52-58% en todas las condiciones.



Factor secretado	n-veces de aumento
Activina	8
Agrina	5
CINC-1	8
ICAM-1	8
INF- $\gamma$	14
LIX	7
L-selectina	16
MCP-1	7
MIP3	15
PDGF-AA	12
TIMP-1	25
VEGF-A	4

**CINC-1:** molécula quimioatrayente de neutrófilo inducida por citoquina; **ICAM-1:** molécula de adhesión intracelular 1; **INF- $\gamma$ :** interferón gama; **LIX:** quimioquina CXC inducida por lipopolisacárido; **MCP-1:** proteína quimioatrayente de monocitos 1; **MIP3:** proteína inflamatoria de macrófago 3 ; **PDGF-AA:** factor de crecimiento derivado de plaquetas AA; **TIMP-1:** inhibidor tisular de metaloproteinasas 1; **VEGF-A:** factor de crecimiento endotelial vascular A

**Tabla I. Análisis del secretoma de los astrocitos tratados con AG y controles.** Se cuantificó la abundancia relativa de 32 citoquinas solubles en MC-AG y MC-C utilizando un kit comercial. Se detectó un aumento en la expresión de 12 citoquinas y factores presentes en MC-AG respecto de MC-C. En la parte superior se muestran dos figuras representativas de las membranas expuestas a MC-C y MC-AG y reveladas por quimioluminiscencia con cámara CCD. Los puntos enmarcados en rojo corresponden a los controles positivos y los enmarcados en azul a los negativos. Los puntos corresponden a las señales de citoquinas expresadas y cada una de ellas esta representada por duplicado en la membrana. En la tabla se muestra el número de veces que está aumentado el nivel de cada citoquina/factor soluble en MC-AG respecto de MC-C.

## **DISCUSIÓN**

En el modelo de inyección intracerebral de AG observamos una hiperpermeabilidad de la BHE a los 14 y 30 DPI, que es selectiva a moléculas de bajo peso molecular (como el EB) y que afecta a la región del estriado pero no de la corteza cerebral. En concordancia, Zinnanti et al. (2006) muestra un aumento de la permeabilidad de la BHE cuando microvasos aislados del estriado son expuestos a AG o 3-OHAG, sin observar cambios significativos en los microvasos corticales, demostrando así una mayor vulnerabilidad de la vasculatura en el estriado. En ratones *Gcdh*<sup>-/-</sup> de cuatro semanas que recibieron una dieta alta en lisina durante tres días también se observó disrupción de la BHE con EB, además de hemorragias subaracnoideas y dilatación de algunos vasos (Zinnanti et al., 2006). Según estos autores, la ruptura de la BHE es un evento fisiopatológico temprano en ratones jóvenes *Gcdh*<sup>-/-</sup> expuestos a una dieta alta en lisina.

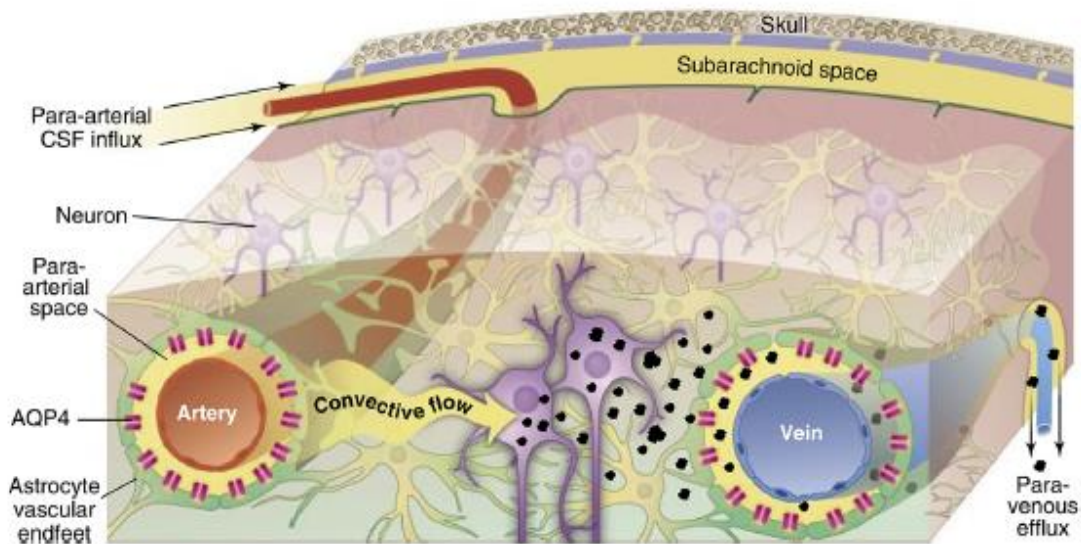
Si bien es esperable que a los 14 DPI la BHE aún no sea completamente funcional, a los 30 DPI se ha reportado que ya está totalmente establecida y la resistencia eléctrica transendotelial alcanza su máximo valor (Xu & Ling, 1993; Butt et al., 1990). Nuestros resultados muestran una hiperpermeabilidad de la BHE en ratas inyectadas con AG respecto de los controles, a los 14 y 30 DPI, y esto puede significar un retardo en la maduración funcional de la BHE. Por otro lado, la alteración de la BHE antecede a la muerte neuronal estriatal reportada en nuestro modelo de inyección de AG, la cual comenzaría a partir de los 21 DPI (Olivera-Bravo et al., 2011). **Por lo tanto, la alteración de la BHE podría contribuir al proceso de degeneración neuronal a través del ingreso de productos neurotóxicos desde la sangre.** Además, la debilidad de la BHE conjuntamente con el aumento de la presión y volumen venoso, podría explicar la frecuente ocurrencia de hemorragias en pacientes AG-I (Zinnanti et al., 2014).

Con respecto a las uniones estrechas interendoteliales, AG no indujo cambios significativos en la expresión de ZO-1 y ocludina en nuestro modelo. En cambio, Zinnanti et al. (2006; 2014) observaron una desaparición progresiva de ocludina en animales *Gcdh*<sup>-/-</sup> expuestos a una dieta alta en lisina. Si bien no hemos investigado en nuestro modelo la organización ultraestructural de las uniones estrechas mediante microscopía electrónica de transmisión, la hiperpermeabilidad de la BHE no siempre es consecuencia de la descomposición de las uniones estrechas interendoteliales. En este sentido, otros mecanismos tales como el aumento del tráfico vesicular transendotelial también puede explicar una hiperpermeabilidad de la BHE, aún cuando las uniones estrechas están intactas (ver revisión De Brock et al., 2016).

La inyección intracerebral de AG no causó cambios significativos en la densidad de los pequeños vasos marcados con lectina de tomate en el parénquima estriatal. Sin embargo, un mes luego de la inyección, se observó una reducción de la inmunomarcación de PDGFR $\beta$ , AQP4 y laminina asociada a los pequeños vasos, sugiriendo la pérdida de los componentes estructurales normales de la microvasculatura. La reducción de PDGFR $\beta$  y la disfunción de los pericitos se ha vinculado con hiperpermeabilidad de la BHE, control defectuoso del flujo sanguíneo cerebral, angiogénesis aberrante y neuroinflamación en diversas condiciones patológicas como enfermedad de Alzheimer, retinopatía diabética, Esclerosis Lateral Amiotrófica, entre otras (ver revisiones Winkler et al., 2011; Armulik et al., 2011; Sweeney et al., 2016). Además, los posibles efectos de AG sobre la densidad de pericitos, localización o función en pacientes AG-I, podrían contribuir a explicar las alteraciones hemodinámicas reportadas (Strauss et al., 2007; 2010).

Por otro lado, la disminución de la inmunorreactividad de AQP4 en animales inyectados con AG sugiere importantes alteraciones funcionales en la homeostasis hídrica. AQP4 localizado preferentemente en los podocitos perivasculares y subpiales, forma un arreglo ortogonal de partículas (Rash et al., 1998) y rodea el 99% de los vasos, incluyendo arterias, capilares y venas (Mathiisen et al., 2010). Contribuye a la homeostasis hídrica y a la regulación del volumen de líquido extracelular (Nagelhus & Ottersen, 2013), así como también cumple un rol central en el sistema glinfático (Iliff et al., 2012). A través de este sistema, el cerebro elimina el exceso de fluido y productos de desecho presentes en el líquido intersticial. Consiste en el influjo de líquido cefalorraquídeo a nivel periarterial y una ruta de eliminación del fluido intersticial a nivel perivenoso, acoplados a través de un flujo convectivo intersticial y del pasaje a través de AQP4 (Nedeergard, 2013; ver esquema en Fig. 20). **De forma remarcable, la reducción de AQP4 en animales inyectados con AG, podría significar una alteración en el sistema de drenaje de líquido a nivel cerebral y ésto podría ser una causa de expansión del líquido cefalorraquídeo y aumento del volúmen cerebral reportado en pacientes AG-I.**

Dado que la inyección de AG en neonatos indujo una reactividad astrocitaria temprana (5DPI) y sostenida en el tiempo, con aumento de la proliferación astrogliar y expresión de S100 $\beta$  (Olivera et al., 2008; Olivera-Bravo et al., 2011); es posible que la disminución en la expresión de AQP4 sea consecuencia de la diferenciación y/o polarización defectuosa de los astrocitos que se hace evidente varias semanas después de la inyección de AG.



**Figura 20.** [Extraído de Nedergaard, 2013]. **Esquema que ilustra el sistema glinfático.** El flujo convectivo glinfático arrastra los productos de desecho del metabolismo neuronal hacia el espacio paravascular y desde allí es dirigido hacia los vasos linfáticos y posterior retorno a la circulación general para su eliminación por el hígado y el riñón.

Por otro lado, la reducción en la expresión de laminina a nivel de la lámina basal de la microvasculatura es otro factor que se suma a las alteraciones estructurales de los microvasos causadas por AG. Diversos trabajos han estudiado la relación estructural entre AQP4 y laminina. En efecto, lamininas de la matriz extracelular, distroglicanos de la membrana celular y las distrofinas forman un complejo que median la polarización de AQP4 y de Kir 4.1 (Noell et al., 2011; Hirrlinger et al., 2011). **En suma, la administración intracerebral perinatal de AG afecta los componentes estructurales de los vasos sanguíneos y de la UNV.**

Por otro lado, nuestros resultados muestran que AG induce la contracción de los capilares reduciendo casi el 12% del diámetro capilar en la región cercana al soma del pericito. Si se considera la ley de Poiseuille para determinar el flujo laminar estacionario, la resistencia de un segmento capilar de distancia  $L$  (desde el soma del pericito hasta el punto medio entre dos pericitos) y radio  $r_1$ , esta dada por la ecuación  $k.L/r_1^4$ , siendo  $k$  una constante. Si el AG induce la contracción de los pericitos, reduciendo el diámetro capilar desde un valor  $r_2$  en el punto medio entre dos pericitos, a un valor  $r_1$  cercano al soma del pericito, siendo esta reducción lineal con la distancia, entonces la resistencia de un segmento capilar desde el soma al punto medio aumenta:  $r_1/r_2 \cdot (1+r_1/r_2+[r_1/r_2]^2)/3$ . Sustituyendo  $r_1$  por 0.88 y  $r_2$  por 1, la resistencia aumentaría un factor de 1.29. Dado que el flujo ( $Q$ ) es inversamente proporcional a la resistencia ( $Q=k.L/R$ ), éste cambiaría 0.77, lo que es igual a una reducción del 23%.



El metabolismo cerebral es un concepto dinámico que varía de una región a otra y durante el desarrollo (Chugani et al., 1991). En este sentido, las crisis encefalopáticas en AG-I ocurren en un periodo crítico del desarrollo del cerebro (1-3 años de vida) en el cual hay una gran captación de aminoácidos que se incorporan a nuevas proteínas y una demanda metabólica aumentada (Chugani et al., 1991; Chugani & Phelps, 1991). En niños sanos estos cambios que ocurren en los primeros años de vida están acompañados por aumentos en la superficie arterial, en la velocidad de la sangre de la arteria cerebral media y en el flujo sanguíneo cerebral (Strauss et al., 2010). Sin embargo, los niños AG-I no tendrían este aumento del flujo sanguíneo que acompaña al crecimiento y normal desarrollo cerebral. De acuerdo a los datos presentados en Strauss et al. (2010), cuatro de un total de seis niños AG-I, de diferentes edades y condiciones patológicas, presentaron una reducción significativa del flujo sanguíneo cerebral y algunos mostraron aumento del volumen sanguíneo y del tiempo de tránsito medio. Los autores proponen que las alteraciones hemodinámicas conjuntamente con la toxicidad metabólica del AG y sus derivados, causan la mayor parte de los síntomas neurológicos en AG-I (Strauss et al., 2007; 2010). Por otro lado, ratones *Gcdh*<sup>-/-</sup> expuestos a una dieta alta en lisina durante 96 h, también muestran una caída significativa del flujo sanguíneo cerebral (cercana al 50%) tanto en corteza como en estriado (Zinnanti et al., 2006; 2014).

A pesar de que la inhibición metabólica inducida por AG puede causar disminución del flujo (si el acoplamiento metabolismo-flujo permanece inalterado), nosotros mostramos **que AG induciría por sí mismo aumento de la contractilidad capilar y esto podría contribuir a explicar el flujo sanguíneo cerebral reducido en pacientes AG-I**. En efecto, la mayor parte de la resistencia vascular en el SNC está localizada a nivel capilar (Gould et al., 2017) y un subconjunto de pericitos que rodean la pared capilar tienen capacidad contráctil y regulan el flujo sanguíneo ajustando su tono contráctil (Peppiatt et al., 2006; Hall et al., 2015; Attwell et al., 2016).

Con respecto a los mecanismos celulares que subyacen a la constricción capilar inducida por AG, no observamos un efecto directo del ácido en la contracción celular de pericitos aislados en cultivo. Si bien las poblaciones celulares aisladas podrían tener un comportamiento distinto al desarrollado *ex vivo* o *in vivo*, nuestros cultivos responden de forma prototípica a moléculas vasoactivas como el ATP y la adenosina. Por lo tanto, nuestros resultados indicarían que AG no induce directamente la contractilidad de los pericitos. Por otra parte, los medios condicionados

de astrocitos controles y tratados con AG, inducen de igual manera, la contractilidad de los pericitos *in vitro*, mediante uno o varios mecanismos aún no dilucidados. Con nuestros abordajes experimentales, no observamos diferencias cuantitativas entre la contractilidad inducida por MC-AG y MC-C. Sin embargo, no descartamos que esto pueda ser corroborado con ensayos de contracción celular más específicos, por ejemplo, evaluar contractilidad sobre un sustrato deformable de dimetilpolisiloxano (Markhotina et al., 2007).

Dentro de los posibles mediadores que producen la contracción de pericitos inducida por los astrocitos *in vitro*, se podría descartar que el ATP o los radicales libres estén jugando un rol en la inducción de la contractilidad. Consistentemente, la inhibición de los receptores purinérgicos P2, ionotrópicos (P2X) y metabotrópicos (P2Y), en los pericitos, no modificó el efecto inducido por el medio condicionado de astrocitos. Asimismo, la adición de carbenoxolona, un inhibidor inespecífico de conexinas, que bloquearía uniones comunicantes o hemicanales presentes en los pericitos, tampoco inhibió el efecto de los astrocitos sobre la contracción de los pericitos. Es decir, las uniones comunicantes pericito-pericito y/o los posibles hemicanales, no estarían involucrados en la señal de contracción astrocito-pericito o en la propagación de la señales entre pericitos en cultivo. Sin embargo, el estudio de las uniones comunicantes y de los hemicanales en los pericitos y su rol en la patología es objeto de análisis en enfermedades como la retinopatía diabética o la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (Li et al., 2003; Cho et al., 2017). Aún restan por evaluar otras señales astrocitaria como el AA o sus metabolitos como el 20-HETE (Mishra, 2017), que podrían mediar el efecto del medio condicionado sobre la contractilidad de los pericitos *in vitro*.

Por otro lado, el desafío más importante será descubrir el o los mecanismos por los cuales AG induce la constricción capilar y activa la contractilidad de los pericitos en rodajas de cerebro *ex vivo*. Se podría hipotetizar que otros componentes de la UNV, las células endoteliales o las neuronas, tienen un rol preponderante en este fenómeno. Cabe destacar que numerosas moléculas vasoconstrictoras de origen endotelial tales como endotelina 1, tromboxano A2 y angiotensina II (Dodget et al., 1991; Matsugi et al., 1997) o de origen neuronal tales como noradrenalina, histamina o serotonina (Kelley et al., 1998; Markhotina et al., 2007) pueden modular la contractilidad de los pericitos (ver revisión Hamilton et al., 2010). Por otra parte, la señalización recíproca entre astrocitos disfuncionales inducidos por la exposición al AG, las

células endoteliales y los pericitos podría estar modulando el efecto de contractilidad capilar observado *ex vivo*.

Si bien se desconoce la existencia de una alteración patológica de los pericitos en pacientes AG-I o en el modelo animal deficiente en GCDH, la inhibición de la migración inducida por el medio condicionado de astrocitos tratados con AG podría ser de relevancia. Además, el normal reclutamiento de pericitos en los vasos nascentes durante la vasculogénesis y angiogénesis cerebral así como también la señalización PDGF-B en endotelio/PDGFR $\beta$  en pericito son esenciales para el normal desarrollo estructural y funcional de la vasculatura cerebral (Lindahl et al., 1997; Armulik et al., 2005; 2011). **En este contexto, defectos en la migración de los pericitos durante el desarrollo embrionario y post-natal podría traer como consecuencia una disminución del recubrimiento pericitario de los vasos y una disfunción vascular.**

En trabajos previos hemos demostrado que AG induce la disfunción astrocitaria tanto en astrocitos salvajes como deficientes en GCDH, incrementando la proliferación celular, causando despolarización mitocondrial y estrés oxidativo, y como consecuencia afectando la supervivencia neuronal (Olivera et al., 2008; Olivera-Bravo et al., 2011; 2015). En la presente tesis mostramos los niveles aumentados de expresión de citoquinas secretadas por astrocitos en cultivo tratados con AG con respecto a los astrocitos controles. Diversas citoquinas y factores de crecimiento aumentan su expresión, entre ellos TIMP-1, ICAM-1 y VEGF-A, lo cual podrían ser importante en la morfogénesis/regresión vascular (Davies & Senger, 2008), angiogénesis (Gerhardt et al., 2003) y permeabilidad de la BHE (Argaw et al., 2012; Chapouly et al., 2015). Además, el aumento de la expresión de VEGF-A en corteza y estriado de ratones *Gcdh*<sup>-/-</sup> con dieta normal y en presencia de una dieta alta en lisina fue reportado en Zinnanti et al. (2014) y anteriormente en Mühlhausen et al. (2004). **Por lo tanto, la disfunción astrocitaria inducida por AG altera la fisiología de los pericitos a través de la expresión de factores solubles y podría también influenciar a otros tipos celulares de la UNV como son las células endoteliales.**

La pregunta acerca de cómo los astrocitos internalizan el AG exógeno o si éstos lo producen intracelularmente en presencia de la enzima GCDH defectuosa, aún es un tema controversial. Si bien algunos autores observaron niveles detectables de GCDH por inmunocitoquímica y la presencia de AG y 3-OHAG por cromatografía de gases/espectrometría de masa en extractos de

células y medios condicionados (Olivera-Bravo et al., 2015); otros autores detectaron únicamente GCDH en neuronas (soma y dendritas) y no en células gliales (Braissant et al., 2017). Aún siendo los niveles de expresión de la enzima GCDH en los astrocitos muy inferiores respecto al de las neuronas, es probable que el astrocito sea capaz de internalizar AG a través de distintos transportadores. Una hipótesis es que lo capten a través del co-transportador de carboxilatos dependiente de sodio (NaC3). Los primeros trabajos que demostraron la translocación de membrana de AG y 3-OHAG a través de NaC3 y los transportadores de aniones orgánicos 1 y 4 (OAT 1 y OAT4) fueron estudios sobre mecanismos de excreción renal de los metabolitos AG-I (Stellmer et al., 2007; Mulhausen et al., 2008). Por otro lado, NaC3 es expresado en el cerebro, plexos coroideos, hígado y riñón y es un transportador con afinidad para varios sustratos dicarboxílicos, incluyendo, succinato, alfa-cetoglutarato, fumarato, malato y dimetilsuccinato (Pajor et al., 2001). Lo más importante a destacar es que NaC3 es expresado específicamente en los astrocitos cerebrocorticales pero no en neuronas, ya que estas últimas expresan otro co-transportador, NaC2, relacionado estructural y funcionalmente con NaC3 pero que no se expresa a nivel renal (Yodoya et al., 2006). **Por lo tanto, es probable que AG ingrese en los astrocitos a través de NaC3 u otros transportadores aún no identificados, produciendo diversos efectos celulares: estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y aumento de la proliferación celular, inhibición del soporte anaplerótico a las neuronas y cambio en el repertorio de señales solubles secretadas que influyen sobre otro tipos celulares; neuronas, oligodendrocitos, pericitos y células endoteliales.**

## **CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO I**

La administración de una única inyección i.c.v. de AG en ratas neonatas produce hiperpermeabilidad de la BHE y defectos en la constitución de la UNV en la región del estriado a los 30 DPI. En este sentido, se evidenció disminución de la inmunomarcación de PDGFR $\beta$  (pericitos), AQP4 (podocitos astrocitarios) y laminina (lámina basal); sin cambios en la expresión de proteínas constitutivas de las uniones estrechas como ocludina o *zonula occludens 1*. Este modelo farmacológico de inyección de AG remedia las crisis encefalopáticas que experimentan los pacientes AG-I frecuentemente antes de los 2 años de vida y reproduce ciertos hallazgos neuropatológicos, en este caso, las alteraciones de la BHE, que también han sido reportadas en el modelo genético de la enfermedad, el ratón *Gcdh*<sup>-/-</sup> cuando se le administra una dieta con alto contenido de lisina causando un pico de acumulación de AG cerebral. En suma, estos resultados muestran que una única exposición al AG desencadena una

serie de eventos fisiopatológicos que se evidencian varios días luego de la inyección y que determinan defectos en la UNV, además de alteraciones de la sustancia blanca y degeneración neuronal como fue reportado en otros trabajos de nuestro grupo de investigación.

Por otro lado, en un sistema *ex vivo*, la exposición de rodajas de cerebro de ratas SD a altas concentraciones de AG indujo la constricción de los capilares, en regiones cercanas al soma del pericito, células contráctiles que regulan el flujo sanguíneo capilar. La disminución del 12% en el diámetro capilar podría significar una reducción cercana al 23% del flujo sanguíneo cerebral. Por otro lado, en pericitos aislados *in vitro*, AG parece no afectar la contractilidad celular directamente, a diferencia de otro agente vasoconstrictor como el ATP. Además, el medio condicionado de astrocitos tratados con AG induce la contractilidad de los pericitos en igual medida que el medio condicionado de astrocitos controles, a través de mediadores solubles no identificados. Por lo tanto, AG induciría la contractilidad de los pericitos en un sistema *ex vivo* y este efecto no se debería a la señalización directa de AG sobre el pericito o a través de los astrocitos, si se considera que las poblaciones celulares aisladas mantienen las características que ellas presentan en sistemas más complejos. En suma, el efecto de AG sobre la constricción capilar y su señalización indirecta hacia el pericito, podría repercutir en la reducción del flujo sanguíneo cerebral que ha sido reportada en pacientes AG-I.

Otro aspecto evaluado *in vitro* fue la capacidad de proliferación y migración de los pericitos en presencia de AG o de medios condicionados de astrocitos tratados con AG o controles. AG no afectó la sobrevivencia, proliferación o migración de pericitos. Sin embargo, el medio condicionado de astrocitos tratados con AG inhibió la migración de los pericitos, sin afectar la proliferación o sobrevivencia. Este hecho *in vitro* podría tener relevancia si se confirma *in vivo*, ya que AG es una enfermedad que se manifiesta durante el neurodesarrollo donde procesos de vasculogénesis y angiogénesis mediados por la señalización glia-pericito-endotelio, acompañan a la diferenciación de células neurales, formación y establecimiento de circuitos neuronales.

Finalmente, el análisis del secretoma de los astrocitos controles respecto de los tratados con AG, permitió identificar un grupo de citoquinas y factores de crecimiento sobre-expresados en astrocitos AG; VEGF-A, TIMP-1, L-selectina,  $INF\gamma$ , entre otros; que podrían repercutir en la fisiología de otros tipos celulares de la UNV como los pericitos, células endoteliales o neuronas y contribuir a alteraciones en la permeabilidad de la BHE, morfogénesis /regresión vascular o contractilidad capilar.

# CAPÍTULO II. RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS FRENTE A LA DEFICIENCIA DE HIERRO

## ANTECEDENTES

### **1. Mielinización del SNC**

Las vainas de mielina que rodean los segmentos axonales (internodos) permiten una conducción saltatoria del impulso nervioso y una velocidad mayor de conducción del potencial de acción. Por lo tanto, la función integrada y sincronizada del SNC en los humanos, así como su enorme capacidad de procesamiento de información, depende de la correcta producción, mantenimiento y reparación de la mielina (Bartzokis, 2012).

La formación de vainas de mielina alrededor de los axones neuronales (mielinización) comienza en la mitad de la gestación, aproximadamente en la semana 20 y juega un rol esencial en la conectividad cerebral, aumentando la velocidad de conducción del impulso eléctrico (Fields, 2010). En humanos, la mielinización comienza en el séptimo mes de gestación a nivel del tálamo, alcanza su pico máximo durante el primer año de vida y continúa hasta la edad adulta (hasta los 20 años aproximadamente), siendo las vías de asociación a nivel de la corteza frontal, las últimas en ser mielinizadas (Baumann & Pham-Dinh, 2001; Jakovcevski et al., 2009). La mielinización avanza rápidamente durante la niñez temprana (primeros 5 años de vida) en dirección caudo-cranial en el cerebro y rostro-caudal en la médula espinal (Barkovich et al., 1988). Este patrón ontogenético está finamente regulado por la actividad neural (Ishibashi et al., 2006) y coincide con la emergencia de habilidades cognitivas y motoras (Fornari et al., 2007). En el adulto, el 25% de la masa cerebral está constituida por mielina (Bartzokis, 2012).

El desarrollo de la sustancia blanca involucra fases previas a la mielinización tales como la proliferación de células precursoras de oligodendrocitos y la diferenciación de oligodendrocitos inmaduros y maduros, siendo estos últimos los responsables de formar las vainas de mielina (Jakovcevski et al., 2009). Si bien la mayor parte de la mielinización ocurre durante los dos primeros años de vida, la remodelación de la sustancia blanca acontece durante toda la vida en respuesta a experiencias funcionales y de aprendizaje (ej: tocar el piano, leer libros, entre otros) (Fields, 2010). El fenómeno de mielinización dependiente de la actividad neural podría explicar los cambios microestructurales de la sustancia blanca, a través de la mielinización *de novo* de vías amielínicas o por remodelación de axones ya mielinizados (Fields, 2015).

## 2. Oligodendrocitos

### 2.1. Biología del oligodendrocito

El término oligodendroglía fue introducido por del Río Hortega en 1921 para describir células neurogliales con escasos procesos que se evidenciaban en preparaciones histológicas teñidas con técnicas de impregnación argéntica. Los oligodendrocitos presentan una citoarquitectura que la diferencia de la astrogía y la microglía, tienen un cuerpo celular pequeño y un citoplasma muy electrodensito, rico en retículo endoplásmico rugoso, polirribosomas libres, aparato de Golgi bien desarrollado, mitocondrias y microtúbulos, sin filamentos intermedios ni granos de glucógeno (Peters et al., 1970). Estas células presentan, además, un menor número de procesos celulares, los que a su vez son escasamente ramificados, en comparación con otros tipos celulares gliales.

La principal función del oligodendrocito es la formación de mielina en el SNC. La mielina es una estructura espiralada constituida por extensiones de la membrana del oligodendrocito en el SNC o de la célula de Schwann en el Sistema Nervioso Periférico (SNP) y presenta una composición química particular (70% de lípidos y 30% de proteínas) que le confiere propiedades aislantes. Entre los componentes principales, que a la vez pueden emplearse como marcadores de mielina en el SNC, se identifican la proteína proteolípida (PLP, del inglés, *Proteolipid Protein*), la proteína básica de mielina (MBP, del inglés, *Myelin Basic Protein*) y la glicoproteína asociada a mielina (MAG, del inglés, *Myelin Associated Glycoprotein*) (Baumann & Pham-Dinh, 2001).

La mielina recubre segmentos axonales, denominados internodos, permitiendo una conducción de tipo saltatoria y rápida del impulso nervioso. En el SNC, cada oligodendrocito puede mielinizar hasta 40 segmentos internodales, dependiendo de la región en que se encuentre (Baumann & Pham-Dinh, 2001). El oligodendrocito es una célula polarizada con dos dominios de membrana de composición diferente, por un lado la membrana plasmática y por el otro, las vainas de mielina. Para mantener dicho fenotipo, los oligodendrocitos clasifican y transportan proteínas y lípidos de manera altamente regulada (Maier et al., 2008). Los oligodendrocitos presentan distintos estadios de maduración, desde la célula precursora de oligodendrocitos (CPO) hasta el oligodendrocito maduro y mielinizante (Figura 21). Estos distintos estadios del linaje oligodendroglial presentan diferencias morfológicas, bioquímicas y funcionales y se pueden reconocer *in vitro* o *in vivo* por la expresión diferencial de diversos antígenos de superficie o intracelulares.

## **2.2. Origen y desarrollo**

En mamíferos, la gliogénesis comienza durante el desarrollo embrionario tardío y continúa en la etapa postnatal, sin embargo, es difícil discernir entre el comienzo de la astrogliogénesis y el de la oligodendrogenesis. La gliogénesis se ha estudiado extensamente en el nervio óptico, ya que en esta región no se diferencian neuronas y hay numerosos astrocitos y oligodendrocitos que comparten un progenitor glial común (Barres & Raff, 1994). *In vitro*, las células O2A, progenitores de astrocitos tipo 2 y oligodendrocitos (actualmente conocidos como CPO) aislados de nervio óptico de rata, son capaces de proliferar y/o diferenciarse dependiendo de las señales moleculares presentes en el medio. Por ejemplo, factores como PDGF, neurotrofina 3 y el factor de crecimiento tipo insulínico 1 (IGF-1, del inglés, *Insulin-like Growth Factor 1*), secretados por astrocitos o células ganglionares, son capaces de diferenciar los progenitores O2A hacia el linaje oligodendroglial (Barres & Raff, 1994). Por otro lado, progenitores O2A cultivados pueden diferenciarse en astrocitos tipo 2, en presencia del factor neurotrófico ciliar (CNTF, del inglés, *Ciliary Neurotrophic Factor*) sintetizado y liberado por los astrocitos tipo I (Lillien et al., 1988). Otros estudios han reportado que los oligodendrocitos podrían tener un origen cercano a las motoneuronas, existiendo un precursor común a nivel de la médula espinal (Noble et al., 2005).

Durante el desarrollo embrionario, las CPO se originan en múltiples regiones de la zona ventricular de manera secuencial. A nivel del telencéfalo, primero surgen en la eminencia ganglionar medial y el área entopeduncular anterior. Una segunda población de CPO se origina en la eminencia ganglionar lateral y caudal mientras que un tercer grupo se origina postnatalmente en la corteza. Un gran porcentaje de estas tres poblaciones celulares logra diferenciarse y mielinizar axones ubicados en distintas regiones del SNC (Kessaris et al., 2006).

Las CPO en el adulto representan del 2 al 9% de las células del SNC, están ampliamente distribuidas en la sustancia gris y blanca y permanecen en un estadio indiferenciado (Dawson et al., 2003). Estas células comparten marcadores antigénicos con las CPO perinatales multipotentes, expresan NG2, receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR $\alpha$ ) y A2B5, entre otros. Las CPO del adulto tienen la capacidad de proliferar y re-poblar áreas desprovistas de oligodendrocitos (Dawson et al., 2003). Por ejemplo, en un modelo de Encefalitis Autoinmune Experimental que produjo desmielinización inducida por anticuerpos dirigidos contra proteínas de la mielina, a los 3 días luego del comienzo de la desmielinización, se observó un aumento del 72% de células NG2+ en la periferia de la lesión, sugiriendo que las CPO del adulto cumplirían una importante función en la re-mielinización frente a condiciones

-Eugenia Isasi-



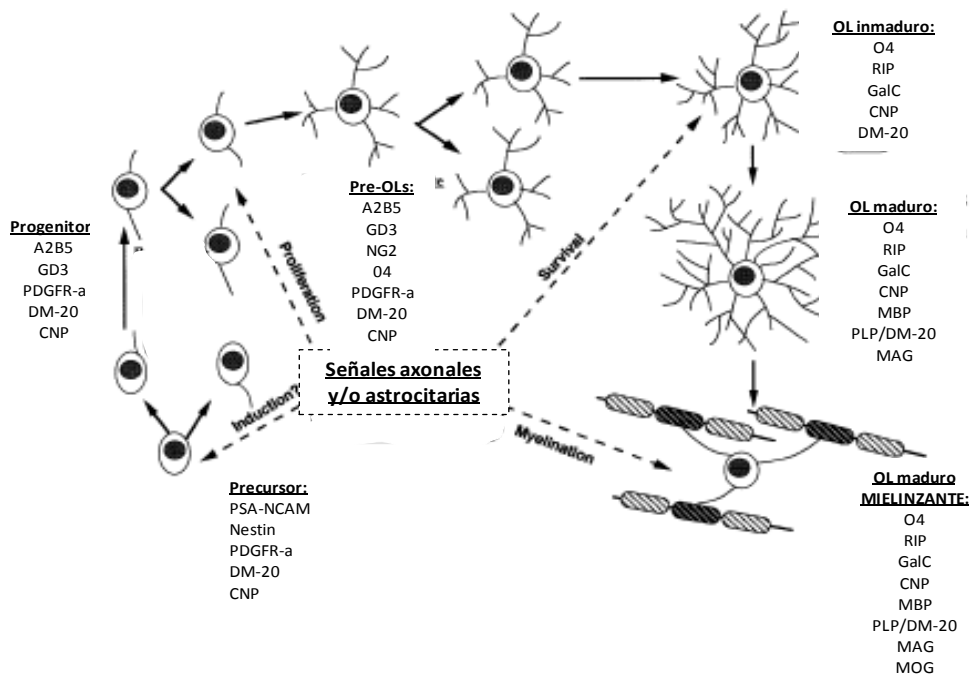
injuriantes (Keirstead et al., 1998). La sobrevida y proliferación de las CPO están reguladas por numerosas neurotrofinas como el factor de crecimiento derivado de plaquetas AA (PDGF-AA, del inglés, *Platelet Derived Growth Factor*- AA) y FGF-2 que son importantes mitógenos y factores de sobrevida. PDGF-AA es altamente expresado en el cerebro en desarrollo fundamentalmente por astrocitos y neuronas y podría intervenir en la diferenciación de células madre neurales hacia el linaje oligodendroglial (Nicolay et al., 2007).

### **2.3. Diferenciación y Mielinización**

Las CPO deben migrar largas distancias hasta alcanzar su destino final. Una gran variedad de señales solubles como PDGF, FGF, moléculas quimiotrópicas como netrinas y semaforinas, quimioquinas; contactos de tipo receptor-ligando y proteínas de la matriz extracelular regulan su migración (Bradl & Lassman, 2010). Las CPO son capaces de migrar sobre matriz extracelular, axones y superficies astrocitarias hasta alcanzar un destino final donde algunas células van a permanecer en un estadio indiferenciado y otras van a diferenciarse en células productoras de mielina (Bradl & Lassman, 2010). El proceso de diferenciación del oligodendrocito está regulado por señales extrínsecas que dependen del ambiente celular y molecular y señales intrínsecas. *In vitro*, las CPO bipolares que expresan PDGFR $\alpha$  y el antígeno A2B5, en ausencia de un factor mitogénico como el PDGF-AA, se diferencian progresivamente en células ramificadas que expresan el antígeno O4 y NG2 y finalmente en estadios maduros expresando proteínas como MAG, MBP y CNPasa (Figura 21).

La diferenciación de las CPO y el proceso de mielinización están regulados espacial y temporalmente. Los oligodendrocitos son capaces de mielinizar en un lapso temporal acotado, y más aún la mielinización de múltiples axones no ocurre de manera secuencial. Por el contrario, es un evento coordinado que transcurre en una ventana de tiempo breve (12-18 h) (Watkins et al., 2008). Los oligodendrocitos no mielinizan cualquier axón, por el contrario seleccionan axones de diámetro mayor a 0.2  $\mu\text{m}$  (Bradl & Lassman, 2010). Además, la mielinización está altamente regulada por señales que dependen del grado de diferenciación neuronal. Por ejemplo, la actividad eléctrica de las neuronas conlleva la liberación de ATP y adenosina al medio, siendo ambas moléculas fundamentales en la comunicación neurona-glía. Por un lado, la adenosina favorece la diferenciación de las CPO y promueve la formación de mielina (Stevens et al., 2002), por otro lado, el ATP desencadena la liberación astrocitaria de LIF que promueve la mielinización en oligodendrocitos maduros (Ishibashi et al., 2006). Además de la actividad eléctrica, los axones sufren cambios en la expresión de moléculas de superficie

necesarias para el reconocimiento e interacción oligodendrocito-neurona (Barres, 2008). Por otra parte, el oligodendrocito envía a la neurona señales capaces de modificar la estructura y el funcionamiento axonal, por ejemplo, inducen la formación de agrupamientos (clusters) de canales de Na<sup>+</sup> a nivel de los nodos de Ranvier y de canales de K<sup>+</sup> en la región juxtapanarodal (Noble et al., 2005).



**Figura 21.** [Extraído y modificado de Baumann & Pham- Dinh, 2001]. **Esquema de los estadios de diferenciación del oligodendrocito, desde la célula precursora hasta el oligodendrocito maduro y mielinizante, y sus marcadores moleculares.**

Los oligodendrocitos pre-mielinizantes que fallan en establecer contacto con los axones, mueren por apoptosis (Trapp et al., 1997). Durante el desarrollo embrionario y en el cerebro postnatal un importante porcentaje de oligodendrocitos (entre 20% y 50% dependiendo de la región) sufre apoptosis debido, en parte, a la competencia por los factores de crecimiento y por la falta de las señales de supervivencia axonales (Barres et al., 1992; Trapp et al., 1997). Por otro lado, el proceso de mielinización requiere de la síntesis, clasificación y transporte de gran cantidad de proteínas. Algunas proteínas como MBP (que representa el 30% de las proteínas de la mielina) requiere del transporte de su ARNm hacia los procesos oligodendrogiales donde ocurre una síntesis local de la proteína. En cambio, PLP (que representa el 50% de las proteínas de mielina) es transportada hacia la vainas de mielina en vesículas a través de la vía biosintética (Bradl & Lassman, 2010).

Además de mielinizar los axones en el SNC, los oligodendrocitos son fundamentales para la supervivencia del axón y de la neurona a través del aporte de metabolitos energéticos como glucosa y lactato (Lee et al., 2012) o a través del soporte trófico por la síntesis y liberación de factores de crecimiento como el GDNF, el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF, del inglés, *Brain-Derived Neurotrophic Factor*) y el IGF-1 (Bradl & Lassman, 2010).

#### **2.4. Vulnerabilidad del oligodendrocito frente al daño**

Para formar las vainas de mielina y mantener la estructura, el oligodendrocito debe producir grandes cantidades de ATP y para ello requiere de moléculas precursoras y sustratos oxidativos. La altísima tasa metabólica trae como consecuencia la formación de productos secundarios tóxicos, como los ROS (McTigue & Tripathi, 2008). Debido a su gran dependencia del metabolismo oxidativo, son altamente sensibles a condiciones de hipoxia-isquemia. Esto ocurre en la hipoxia perinatal que desencadena la leucomalacia periventricular (Back et al., 2002; Volpe et al., 2001). Además de la alta vulnerabilidad de los progenitores de oligodendrocitos al daño oxidativo en esta etapa temprana del desarrollo, se constató disminución del flujo sanguíneo en la sustancia blanca de niños prematuros, respecto de la sustancia gris, lo que implica una restricción aún mayor de oxígeno y sustratos para los oligodendrocitos (ver revisión Roth & Nuñez, 2016).

Por otra parte, la acumulación de gran cantidad de hierro intracelular en el oligodendrocito, determina que en condiciones desfavorables, éste sea capaz de reaccionar y desencadenar la formación de ROS, lo que sumado a los bajos niveles de defensas antioxidantes celulares como el glutatión (Back et al., 1998), los transforma en altamente vulnerables frente al daño oxidativo (Bradl & Lassman, 2010). El oligodendrocito también podría ser vulnerable al daño excitotóxico ya que expresa receptores de glutamato de tipo AMPA, kainato y NMDA (Noble et al., 2005; Bradl & Lassman, 2010).

Por otro parte, durante la mielinización, el retículo endoplásmico debe sintetizar y plegar una enorme cantidad de proteínas, a tal punto que se cree que más del 60% de los productos de síntesis del oligodendrocito se destinan a la mielina (Bartzokis, 2012). En este sentido, cambios metabólicos como la sobreexpresión de PLP en ratas transgénicas producen estrés de retículo endoplásmico (RER) y muerte apoptótica de oligodendrocitos de la sustancia gris (Bauer et al., 2002). Asimismo, oligodendrocitos diferenciados de células madre de pacientes con la enfermedad de Pelizaeus-Merzbache, que portan mutaciones en PLP1 y acumulan la proteína

mutada en el RER, presentan estrés de retículo y mayor tasa de apoptosis (Numasawa-Kuroiwa et al., 2014).

### **3. Metabolismo del hierro y mielinización**

#### **3.1. Metabolismo del hierro y captación cerebral**

Los adultos humanos tienen 45 mg (mujeres) y 55 mg (hombres) de hierro por kg de peso lo que representa un total de 3-5 g de hierro corporal. Cerca de  $\frac{2}{3}$  de esta cantidad está unida a la hemoglobina en el interior de glóbulos rojos y sus precursores eritroides. El tercio restante está unido a la ferritina y es almacenado en el interior de macrófagos reticulo-endoteliales (aprox. 0.6 g) y en hepatocitos (aprox. 1 g). Además, hay hierro unido a la mioglobina (aprox. 0.3 g) de los músculos y en otras proteínas y enzimas (aprox. 8 mg) (Guo et al., 2016).

La mayor parte de la absorción dietaria del hierro ocurre en el intestino delgado (duodeno y yeyuno). Normalmente, un individuo absorbe 1-2 mg de hierro diariamente y pierde la misma cantidad a través de la descamación epitelial y mucosa (Chifman et al., 2014). Hay dos formas de hierro dietario con mecanismos de absorción diferentes: hierro hemínico (HH) y no hemínico (HnH). El HnH representa el 90% del hierro dietario y para la absorción se requiere su liberación desde los productos digeridos y el mantenimiento de su estado soluble. El pH ácido estomacal disuelve al hierro inorgánico y permite que el ion férrico sea reducido a ferroso por ferrireductasas en la superficie apical de los enterocitos. El ion ferroso es luego transportado hacia el interior de la célula por el transportador de metales divalentes 1 (DMT-1). El HH representa el 10% del hierro dietario y es transferido al interior de las células intestinales absorbivas por la proteína transportadora de hemo (HCP-1) localizada en la membrana luminal del enterocito. Una vez dentro de la célula absorbiva, las hemo-oxigenasas metabolizan el HH, liberando ion ferroso que posteriormente es transportado baso- lateralmente por ferroportina 1 y oxidado por la hefestina, una ferropoxidasa de membrana. Finalmente el ion férrico se une a la apotransferrina formando el complejo transferrina-hierro que viaja por todo el torrente sanguíneo e ingresa a las células a través de endocitosis mediada por receptor. Estos complejos contienen 3-5 mg del hierro corporal y constituyen el pool de hierro cinéticamente activo (ver revisiones Chifman et al., 2014; Guo et al., 2016; Daher & Karim, 2017).

El metabolismo del hierro es compensado por dos sistemas regulatorios; uno que actúa sistémicamente y está basado en la acción de la hormona hepcidina junto con la ferroportina, y otro que controla el metabolismo intracelular del hierro a través de proteínas reguladoras del hierro (IRPs, del inglés, *Iron Regulatory Proteins*) que regulan la expresión génica de otros

transportadores y moléculas como la transferrina y ferroportina (Hentze et al., 2010). La hepcidina, un pequeño péptido sintetizado por los hepatocitos, es la principal hormona reguladora de los niveles de hierro sérico. Al unirse con la ferroportina, favorece su internalización, ubiquitinación y degradación lisosomal (Nemeth et al., 2004) y de esta manera regula el ingreso de hierro hacia la circulación, limitando su absorción intestinal y su liberación desde el sistema retículo-endotelial (Ganz & Nemeth, 2011). En los hepatocitos, diversas señales sistémicas (hipoxia, inflamación, eritropoyesis, entre otras), modulan la expresión de hepcidina y por ende, los niveles de hierro sérico (Ganz & Nemeth, 2011). Por otro lado, el pool de hierro citosólico esta finamente regulado ya que es una importante fuente de hierro para numerosas proteínas nucleares, citosólicas y mitocondriales. En este sentido, IRP1 e IRP2 son proteínas de unión al ARN que sensan los niveles intracelulares de hierro. Frente a la depleción de hierro IRP1 y 2 pueden inhibir la traducción de ferritina y ferroportina y en cambio, favorecer la expresión del receptor de transferrina y DMT-1 (Hentze et al., 2010)

Cuatro clases principales de proteínas contienen hierro y llevan a cabo numerosas funciones en el organismo (Beard, 2001): 1) proteínas no enzimáticas que contienen hierro (ej: hemoglobina y mioglobina), son las principales proteínas transportadoras de oxígeno y el hierro es un ligando crítico para la unión del dioxígeno; 2) enzimas hierro sulfurosas donde el hierro participa en la cadena transportadora de electrones; 3) enzimas que contienen grupo hemo (ej: citocromo P450). El hierro se une a varias formas de hemo y participa en la cadena transportadora de electrones asociado a otros cofactores; 4) enzimas que contienen hierro pero no son hemoproteínas ni hierro sulfurosas, es decir contienen hierro no unido a una estructura porfirínica ni asociado a complejos sulfurosos.

El exceso de hierro puede dañar los sistemas biológicos dado que el hierro activo en los procesos de óxido reducción cataliza la generación de ROS mediante la reacción de Fenton (Welch et al., 2002). Por lo tanto, tanto la deficiencia de hierro como su acumulación excesiva son condiciones perjudiciales para las funciones neurales (Beard & Connor, 2003; Youdim, 2001).

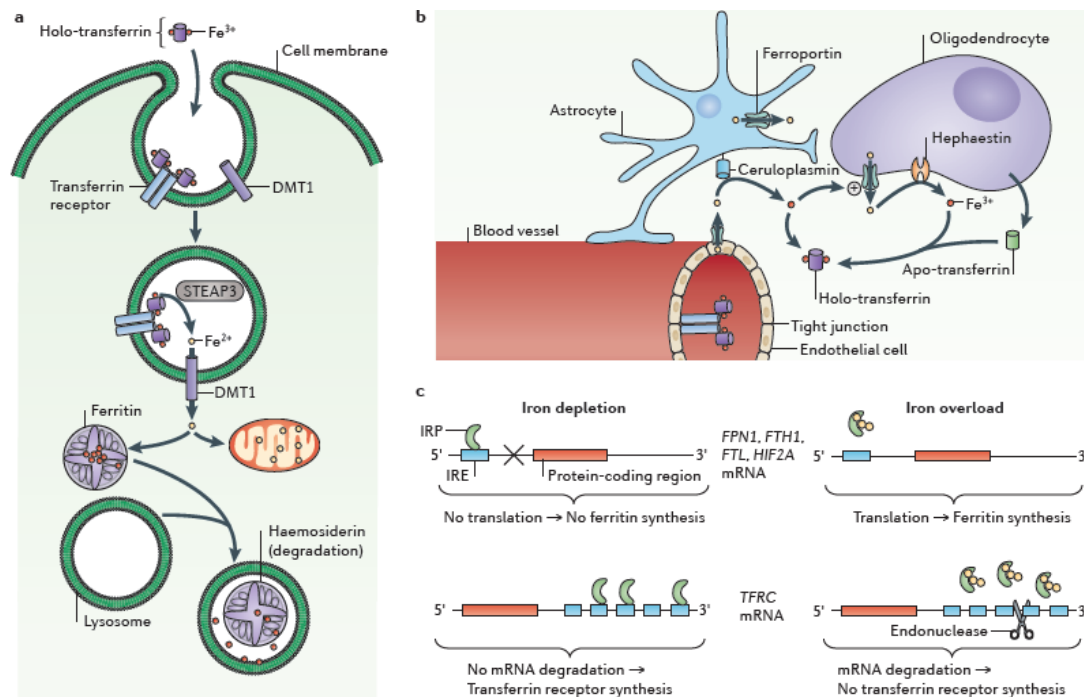
La acumulación de hierro cerebral ocurre en animales envejecidos, incluyendo humanos en distintas regiones (globo pálido, núcleo rojo, dentado y sustancia nigra) (Gelman et al., 1999) y sería resultado de varios factores incluyendo hiperpermeabilidad de la BHE, inflamación, cambios en la homeostasis del hierro, entre otros (Zecca et al., 2004). La acumulación de hierro podría tener un rol en la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas como las

enfermedades de Parkinson o Huntington (Ward et al., 2014). La acumulación de hierro libre en neuronas podría inducir el daño y muerte por apoptosis, mientras que en la glía podría inducir un estado inflamatorio a través de la liberación aumentada de citoquinas pro-inflamatorias (Ward et al., 2014).

### **3.2. Captación cerebral del hierro**

A partir de los 6 meses de edad, la BHE es un punto de control fundamental para el ingreso de hierro al cerebro (Beard & Connor, 2003). Sin embargo, en el recién nacido, la BHE no es completamente funcional, las proteínas transportadoras de hierro no pueden difundir hacia el parénquima cerebral así como tampoco hay un sistema eficiente de transferencia de hierro desde la sangre al parénquima (Collard, 2009). En el periodo pre-natal el hierro se acumula en el cerebro y alcanza los máximos valores luego del nacimiento (Siddappa et al., 2003), sin embargo, los valores caen hasta los 6 meses aproximadamente, cuando el tracto gastrointestinal y la BHE maduran y son capaces de absorben hierro dietario y regular su ingreso a nivel cerebral.

La captación cerebral de hierro a través de la BHE está mediada por la expresión del receptor de transferrina en la membrana luminal de la célula endotelial. Una vez que el hierro unido a la transferrina es endocitado, se libera en el interior del endosoma y es reducido por una metaloreductasa. Posteriormente, el ión ferroso sale al citosol a través de DMT-1 y es transportado hacia el espacio extracelular mediante la ferroportina 1 localizada en la membrana abluminal de la célula endotelial (Rouault, 2013) (Figura 22). El influjo de hierro por los podocitos astrocitarios que forman parte de la BHE ocurre principalmente a través del transportador DMT1, ya que *in vivo* no se ha demostrado la presencia del receptor de transferrina, mientras que el eflujo hacia el neuropilo se produce a través de la ferroportina 1 (Rouault & Cooperman, 2006; Dringen y cols., 2007; Rouault, 2013). El ion ferroso es oxidado por la ceruloplasmina lo que es crítico para su unión a la transferrina, secretada por los oligodendrocitos y plexos coroideos, que está presente en el fluido intersticial. Es probable que el hierro también ingrese al SNC a través de las células epiteliales de los plexos coroideos. Es probable que las neuronas, los oligodendrocitos y la microglía capten mayoritariamente hierro unido a transferrina presente en el fluido intersticial y líquido cefalorraquídeo (Rouault, 2013).



**Figura 22.** [Extraído de Rouault et al. (2013)]. **Metabolismo celular del hierro y transporte en células de mamífero.** **A.** El ión férrico unido a la transferrina circula en el torrente sanguíneo con 1 o 2 átomos de ión férrico por molécula de transferrina. Las células expresan al receptor de transferrina en la membrana plasmática y éste se une a la holo-transferrina para endocitarlo. El endosoma se acidifica y la metaloreductasa STEAP3 reduce al ión férrico en ión ferroso, el cual posteriormente es transportado al citosol a través de DMT1. El hierro puede luego unirse a chaperonas que donan hierro a otras proteínas blanco o ingresar a las mitocondrias a través de transportadores de hierro mitocondriales (mitoferrin 1 y mitoferrin 2). El hierro también puede almacenarse en el citosol unido a la ferritina, la cual puede secuestrar hasta 4500 átomos de hierro. La degradación de la ferritina en lisosomas lleva a la formación de depósitos ricos en hierro conocidos como hemosiderina. **B.** Mecanismos por los que el hierro atraviesa la BHE. La holo-transferrina circulante en los capilares cerebrales puede internalizarse por endocitosis mediada por receptor en las células endoteliales y luego liberarse ión ferroso al citosol para finalmente ser exportado al fluido intersticial a través de la ferroportina. Los astrocitos expresan una ferroxidasa conocida como ceruloplasmina que está anclada a la membrana plasmática mediante glicosilfosfatidilinositol. La ceruloplasmina y la hefestina, otra ferroxidasa, se expresan diferencialmente en el SNC. Cuando el ión ferroso para al intersticio cerebral, es oxidado y el ión férrico es capaz de unirse nuevamente a la apo-transferrina que es sintetizada y secretada por los oligodendrocitos. **C.** En el citosol, las proteínas reguladoras del hierro 1 y 2 (IRP1 e IRP2) afectan la regulación post-traduccional de genes que contienen elementos de respuesta al hierro (IRE), como por ejemplo, el receptor de transferrina 1 (TFRC), DMT1, ferroportina 1 (FPN1), ferritina de cadena livina y pesada (FTL y FTH1) y el factor inducible por hipoxia 2alfa (HIF2A).

### **3.3. Hierro y mielinización**

El hierro es crucial para el mantenimiento de la función neurológica normal ya que es indispensable para la producción de energía, la síntesis y reparación del ADN, el metabolismo fosfolipídico, la síntesis de neurotransmisores y fundamentalmente la mielinización (Beard, 2001; Beard & Connor, 2003). En las áreas cerebrales enriquecidas en hierro, sustancia nigra, estriado y núcleos cerebelares, los oligodendrocitos son las células que se tiñen más prominentemente (Connor & Menzies, 1996; Todorich et al., 2009). Además, la sustancia blanca enriquecida en oligodendrocitos se tiñe más robustamente que la gris (LeVine & Macklin, 1990). En la figura 23 se muestra la tinción de Perl, técnica citoquímica que evidencia ión férrico, que impregna a los oligodendrocitos en la región del cuerpo calloso medial.

El hierro es requerido por enzimas involucradas en funciones cerebrales específicas, incluyendo la mielinización y la síntesis de neurotransmisores como la serotonina y dopamina (McCann & Ames, 2007). Además, forma complejos de hierro-azufre que son co-factores de enzimas mitocondriales esenciales para la síntesis de ATP (Todorich et al., 2009).

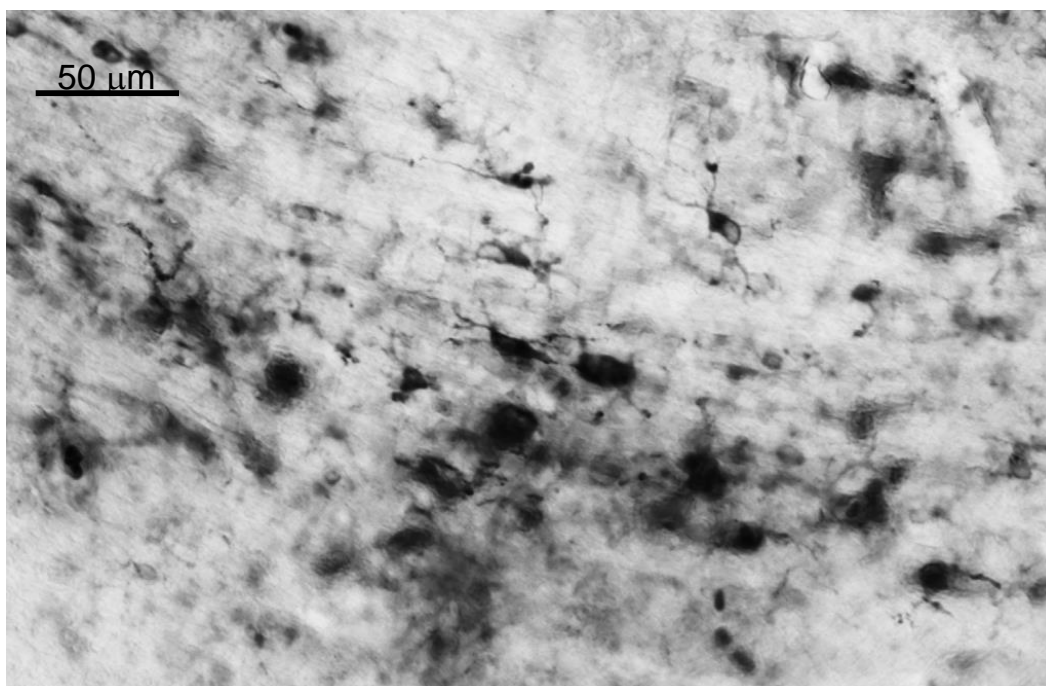
El período de máxima acumulación de hierro en el oligodendrocito coincide con el pico de mielinización (Connor & Menzies, 1996; Todorich et al., 2009). Funcionalmente, esta coincidencia está ligada a las altas demandas energéticas del oligodendrocito ya que éste debe sintetizar gran cantidad de proteínas y lípidos para formar la mielina (Todorich et al., 2009). La alta tasa del metabolismo oxidativo que conlleva además a una gran necesidad de acumulación de hierro en los oligodendrocitos, es una de las causas de la alta vulnerabilidad al estrés oxidativo y a la deficiencia energética (Connor & Menzies, 1996). Además, la expresión de transferrina y ferritina es importante para la diferenciación del oligodendrocito y la formación de mielina (Escobar-Cabrera et al., 1994; Todorich et al., 2009). Ratones que sobre-expresan transferrina en el cerebro presentan una maduración acelerada del linaje oligodendroglial con respecto a los animales que expresan niveles normales (Sow et al., 2006). *In vitro*, la apo-transferrina induce la diferenciación de células madre y progenitores neurales hacia el linaje oligodendroglial (Silvestroff et al., 2012). En suma, además del rol de la transferrina como dador de hierro, es un factor trófico que acelera la diferenciación de los oligodendrocitos e induce el compromiso de precursores neurales hacia el linaje oligodendroglial.

La importancia del hierro en la función del oligodendrocito se refuerza por la observación de que la deficiencia de hierro severa y crónica conduce a la hipomielinización cerebral, lo que se ha documentado tanto en animales como en humanos (Todorich et al., 2009).



Sin embargo, la acumulación de hierro también es deletérea para el SNC. Aunque los datos más conocidos se asocian a la acumulación de hierro con la edad (Simmons et al., 2007), dos enfermedades genéticas son causadas por disfunción de proteínas directamente involucradas en el metabolismo y almacenamiento de hierro: la ferritinopatía hereditaria y la aceruloplasminemia a la que nos referimos más adelante. En ambas enfermedades, la acumulación de hierro es temprana y precede largamente la aparición de los síntomas clínicos (ver revisión de Dusek et al., 2012).

Por otra parte, el alto contenido de hierro de los oligodendrocitos puede ser dañino como se evidenció en la esclerosis múltiple (EM). En pacientes con EM, el hierro liberado por los oligodendrocitos es acumulado en macrófagos y microglía alrededor del sitio de lesión y estos a su vez liberan el hierro en estado redox activo hacia el espacio extracelular, dañando la integridad de los axones (ver revisión Roth & Nuñez, 2016).



**Figura 23.** Foto ilustrativa de la tinción del cuerpo calloso con la técnica de Perl en un corte coronal de un animal de 14 días. Se evidencia el precipitado oscuro en el soma de células pequeñas, con núcleo excéntrico y escasas prolongaciones cuya morfología corresponde a la de oligodendrocitos.

## **4. Papel de los astrocitos en la mielinización y captación de hierro**

### **4.1. Rol de los astrocitos en la mielinización**

Durante la mielinización primaria o en la re-mielinización de áreas dañadas, las CPO necesitan factores de crecimiento, citoquinas y otros mediadores, para proliferar, migrar y diferenciarse

en oligodendrocitos mielinizantes (Baumann & Pham-Dinh, 2001; Bradl & Lassman, 2010). Los astrocitos son una fuente importante de factores solubles (PDGF-AA, FGF-2, IGF-1, CNTF, LIF, entre otros) que pueden actuar sobre las células precursoras u oligodendrocitos diferenciados modificando su capacidad proliferativa, migratoria y/o mielinizante (Moore et al., 2011).

*In vitro*, el medio condicionado de astrocitos tiene un efecto mitogénico sobre las CPO (Noble & Murray, 1984). Por otro lado, en un sistema de mielinización *in vitro* que involucra el cocultivo de células ganglionares y CPO corticales, la presencia de astrocitos aumenta la tasa de mielinización (Watkins et al., 2008).

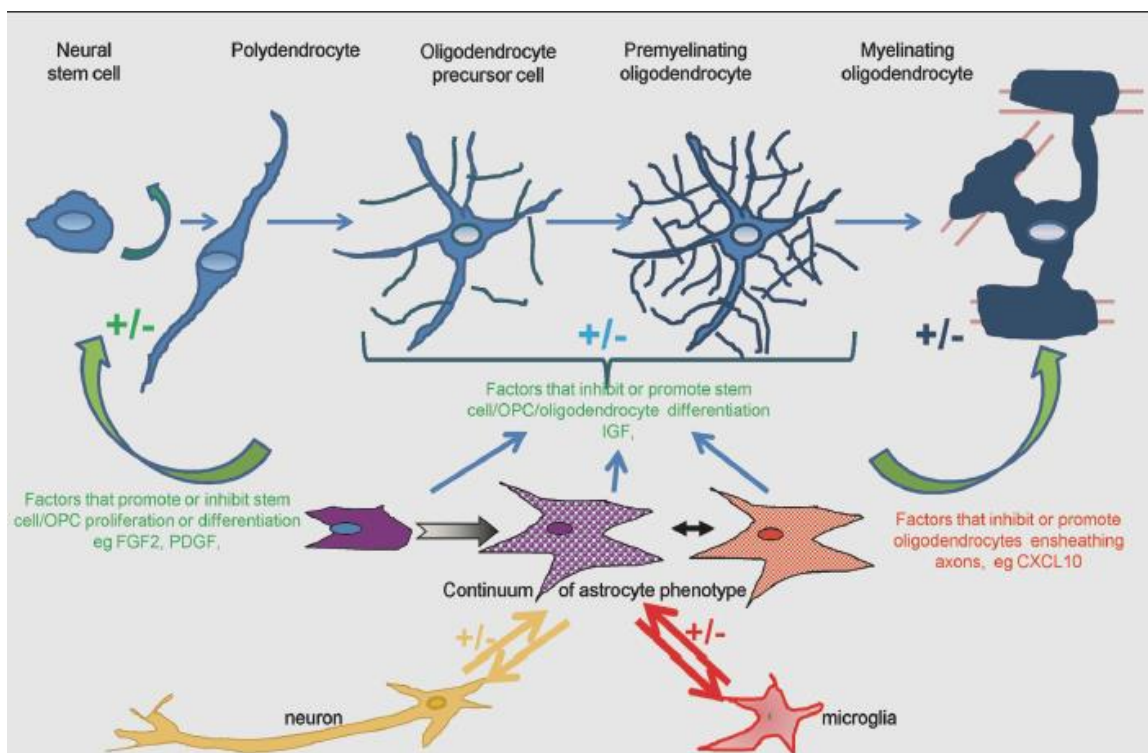
En un trabajo publicado por Nash et al. (2011) se muestra la correlación entre el fenotipo astrocitario y su capacidad para inducir mielinización. Astrocitos “quiescentes”, sembrados sobre tenascina C, inducen la mielinización de pocos axones en un modelo *in vitro* de mielinización, en comparación con astrocitos sembrados sobre poli-lisina. Esta inhibición de la mielinización estaría mediada por la quimioquina CXCL10. En cambio, astrocitos “activados” con CNTF, favorecen la mielinización de axones, posiblemente a través de la liberación de algún factor soluble. Por lo tanto, el fenotipo astrocitario tendría un rol central en la mielinización y reparación del SNC. Los astrocitos pueden secretar factores que promueven o inhiben la mielinización afectando directamente la proliferación o diferenciación del linaje oligodendroglial y/o mielinización; o indirectamente actuando sobre otros tipos celulares como las neuronas o microglía (Barnett & Linington, 2012) (Figura 24).

Además de la interacción astrocito-oligodendrocito que ocurre a través de factores solubles, diversos autores han demostrado la existencia de uniones gap heteroméricas (Cx43:Cx47 o Cx32:Cx30) entre estos dos tipos celulares permitiendo un acoplamiento metabólico y funcional relevante en la fisiología y patología del Sistema Nervioso (Waseff & Scherer, 2011).

Otras evidencias que apoyan el papel de los astrocitos en la mielinización, surgieron a partir de modelos animales transgénicos y enfermedades genéticas humanas que afectan proteínas de los astrocitos donde la disfunción astrocitaria es primaria y compromete el desarrollo e integridad de la mielina. La enfermedad de Alexander es considerada una astrocitopatía primaria causada por mutaciones en el gen codificante para GFAP que causa varios síntomas neurológicos entre ellos leucodistrofia (Messing et al., 2012). En esta enfermedad se observa pérdida de mielina, de oligodendrocitos y degeneración axonal que producen los síntomas clínicos de la enfermedad y que son consecuencia de una disfunción astrocitaria pero no de muerte de astrocitos (Messing et al., 2012). Se cree que estas mutaciones en GFAP producen

una ganancia de funciones tóxicas que provocan astrocitos hipertróficos con agregados multiproteicos intracitoplasmáticos cuya presencia se correlaciona directamente con la pérdida de oligodendrocitos (De Keyser et al., 2008; Messing et al., 2012).

Otro ejemplo paradigmático de leucodistrofia asociada primariamente a la disfunción astrocitaria es la enfermedad conocida como *Vanishing White Matter Disease* (VWM). En esta enfermedad, mutaciones en el factor de iniciación de la traducción eucariota 2B5 (EIF2B5) que es expresado en astrocitos y oligodendrocitos produce ataxia infantil e hipomielinización y rápido declive de salud que puede llevar a la muerte. A partir de muestras de pacientes con VWM se obtuvieron cultivos de oligodendrocitos de apariencia normal, mientras que los cultivos de astrocitos contenían pocas células GFAP+ y presentaban una morfología y fenotipo anormales (Dietrich et al., 2005). Además, el silenciamiento de EIF2B5 en progenitores gliales humanos inhibió severamente la diferenciación de células GFAP+, por lo tanto, la deficiencia de astrocitos GFAP+ contribuiría a la pérdida de la sustancia blanca en esta enfermedad. Finalmente, la pérdida de sustancia blanca asociada a estrés metabólico, como los producidos en los nacimientos prematuros o en los sobrevivientes a isquemia cerebral, podrían explicarse en parte, por una especificación aberrante de los progenitores comunes causando una proliferación astrocitaria excesiva a expensas de los oligodendrocitos (Bain et al., 2010).



**Figura 24.** [Extraído y modificado de Barnett & Linington, 2012]. **Los distintos fenotipos astrocitarios secretan factores que pueden influenciar la mielinización directa o indirectamente.**

## **4.2. Papel de los astrocitos en el metabolismo del hierro**

Los astrocitos tienen un rol preponderante en el metabolismo de hierro cerebral fundamentalmente en la liberación del hierro captado desde los vasos sanguíneos ya que tiene un sistema de transporte y almacenamiento eficiente, que asegura un adecuado suministro de hierro a las neuronas, la oligodendroglía y la microglía. El influjo de hierro en el astrocito ocurre principalmente a través del transportador DMT1, ya que *in vivo* no se ha demostrado la presencia del receptor de transferrina, mientras que el eflujo de hierro hacia el neuropilo se produce a través de la ferroportina 1 (Rouault & Cooperman, 2006; Dringen y cols., 2007; Rouault, 2013).

Los astrocitos perivasculares son los responsables de la producción de ceruloplasmina, tanto en su forma soluble como en su forma unida a la membrana astrocitaria por un grupo glicofosfatidil-inositol. La ceruloplasmina es una ferroxidasa, que media la oxidación del ion ferroso transportado desde el citosol por la ferroportina y la subsecuente unión del ion férrico a la transferrina quedando así disponible para la captación por las neuronas y los oligodendrocitos. La actividad ferroxidasa de la ceruloplasmina es importante, además, para inhibir la lipoperoxidación lipídica y la formación de ROS en los astrocitos (De Keyser et al., 2008).

La aceruloplasminemia es una enfermedad congénita producida por mutaciones en el gen codificante para la ceruloplasmina. Los principales signos neuropatológicos incluyen excesiva deposición de hierro en los astrocitos, deformación de los podocitos perivasculares astrocitarios y muerte neuronal progresiva (Oide et al., 2006; Miyajima, 2015). La falta de la ceruloplasmina imposibilita que la transferrina pueda transportar hierro contenido en los astrocitos, provocando un exceso de hierro intracelular que resulta en daño oxidativo y alteración del volumen celular produciendo una deformación de los podocitos astrocitarios (Miyajima, 2015) que podría alterar la funcionalidad de la BHE. Dado que los astrocitos sin ceruloplasmina no pueden transportar ión férrico a la transferrina, las demás células neurales deberán captar hierro de fuentes alternativas (hierro no unido a la transferrina) o sufrir una deficiencia de dicho ión. Por lo tanto, en esta enfermedad las neuronas son afectadas por la depleción de hierro inicialmente y luego por estrés oxidativo aumentado y alteración del soporte protector que brindan los astrocitos (Oide et al., 2006; De Keyser et al., 2008; Miyajima, 2015).

Por otra parte, los astrocitos están situados óptimamente para actuar como sensores de hierro en el cerebro, comunicando las necesidades de este ion a las células endoteliales mediante señalización parácrina. La hepcidina, ceruloplasmina, interleuquina 6, la proteína precursora del amiloide soluble y la holotransferrina son algunos de los candidatos del secretoma astrocitario que comunican el estatus del hierro a las células endoteliales (McCarthy & Kosman, 2015). Mientras que la hepcidina secretada por los astrocitos induciría la internalización y ubiquitinación de la ferroportina expresada en las células endoteliales, estas últimas inducirían la expresión de ceruloplasmina en astrocitos, en un modelo *in vitro* de BHE, sugiriendo mecanismos bidireccionales astrocito-endotelio de regulación del metabolismo del hierro (McCarthy & Kosman, 2014). Además, frente a la depleción de hierro, el astrocito libera factores solubles que inducirían la expresión de un intercambiador endosomal catión/protón en las células endoteliales que promueve la inserción del receptor de transferrina a la membrana (Beydoun et al., 2017).

Desde P0 a P14, la evidencia *in vivo* indica un ingreso dramático de la cantidad de hierro cerebral que acompaña a una pérdida de hierro desde las células endoteliales microvasculares cerebrales, y un aumento en el recubrimiento de los podocitos astrocitarios rodeando la microvasculatura (McCarthy & Kosman, 2015). En este sentido, la proximidad de los astrocitos a las células endoteliales cerebrales, desde P0 a P14, permite que la ceruloplasmina soluble astrocitaria llegue a las endoteliales favoreciendo el eflujo de hierro a través de la ferroportina (McCarthy & Kosman, 2015).

## **5. Deficiencia de hierro y anemia ferropénica**

La deficiencia de hierro (DH) es la causa primaria de anemia, afectando a casi un cuarto de la población mundial (McLean et al., 2009). Afecta a todos los grupos etarios, siendo más prevalente en niños entre 0 y 5 años (McLean et al., 2009). La ferropenia materna, aun cuando es moderada, reduce las reservas de hierro del feto, provocando una condición de deficiencia de hierro neonatal (Rao & Georgieff, 2002). Por otro lado, la deficiencia de hierro neonatal es más común en niños prematuros o hijos de madres diabéticas (Lozoff et al., 2006).

En Uruguay, según datos del Sistema Informático Perinatal, en el año 2012, el 6.5% de las mujeres presentó anemia antes de las 20 semanas de gestación y esta cifra aumentó a 20.9% luego de las 20 semanas de gestación. Este porcentaje es mayor entre las adolescentes embarazadas, ya que el 24,3% presentó anemia después de las 20 semanas de gestación. Por

otra parte, la prevalencia de anemia en niños de 6 a 23 meses de edad en el año 2011 fue de 31,5%, alcanzando cifras de 41% entre los 6 y 11 meses<sup>1</sup>.

La DH puede ocasionar un espectro de fenómenos biológicos que van desde la depleción de las reservas de hierro hasta la anemia. En la primera, las reservas de hierro disminuyen, lo cual puede medirse cuantitativamente conociendo las concentraciones de ferritina en suero (< 15 µg/L), sin embargo, el transporte y la cantidad de hierro funcional no está afectado. En una segunda etapa, la depleción de las reservas de hierro puede ocasionar una deficiencia en la eritropoyesis ya que se produce una reducción del hierro libre transportado (unido a transferrina) y por lo tanto el hierro disponible es insuficiente para la producción de glóbulos rojos (Alwan & Hamamy, 2015). Esto conducirá en última instancia a la anemia ferropénica que presenta diferentes manifestaciones clínicas como síntomas de fatiga, astenia, mareos, náuseas, cefaleas, sensación de falta de oxígeno, deficiencia en la termorregulación, funciones inmunitarias y mentales, irritabilidad, pica; y signos como taquicardia, palidez, coiloniquia, esteatorrea, pioderma gangrenoso, entre otros (Baumann & Pham-Dinh, 2001). Dado que la mayoría de las consecuencias funcionales de la deficiencia de hierro están relacionadas con la severidad de la anemia, es un desafío separar los eventos causados por la falta de oxígeno de los causados por déficit de hierro.

La DH y la anemia ferropénica en mujeres embarazadas se asocian con un mayor riesgo de preeclampsia, bajo peso al nacer, prematuridad, mortalidad perinatal, maduración fetal retardada y compromiso del desarrollo neurocognitivo y motor de los hijos (Zhou et al., 2006, Friedrisch & Friedrisch, 2017).

Considerando las necesidades de hierro para el desarrollo del embrión y la placenta, el aumento de la producción de glóbulos rojos maternos y la pérdida de sangre en el parto, el requerimiento de hierro durante el embarazo y la lactancia es de 1 g. Por lo tanto, la ingesta de hierro dietario durante la gestación debería ser de al menos 27 mg y de 10 mg durante el periodo de lactancia, en lugar de los requerimientos normales, 1-8 mg, para la población general (Roodenburg, 1995; McLean et al., 2009).

---

<sup>1</sup> Ministerio de Salud Pública. Plan nacional de salud perinatal y primera infancia. Recomendaciones para la prevención y tratamiento de la deficiencia de hierro, 2014:  
[http://www.msp.gub.uy/sites/default/files/archivos\\_adjuntos/Guia%20prevenci%C3%B3n%20deficiencia%20de%20hierro%202014.pdf](http://www.msp.gub.uy/sites/default/files/archivos_adjuntos/Guia%20prevenci%C3%B3n%20deficiencia%20de%20hierro%202014.pdf)

La prevención de la DH y de la anemia ferropénica en el embarazo es llevada a cabo en varios países a través de la suplementación de hierro cuando el aporte de la dieta no alcanza los requerimientos diarios recomendados (Roodenburg, 1995). A pesar de ello, los efectos de la suplementación de hierro en el embarazo y sus efectos en los hijos son controversiales (Friedrich & Friedrich, 2017).

### **5.1. Alteraciones del neurodesarrollo e hipomielinización**

El impacto de la DH perinatal en el desarrollo cerebral y cognitivo de los humanos es de particular interés ya que el crecimiento cerebral entre el último trimestre del embarazo y los dos primeros años de vida es muy acelerado, ocurriendo crecimiento dendrítico, sinaptogénesis y proliferación glial (Courchesne et al., 2000; Gogtay et al., 2006). El volumen total del cerebro se duplica durante el primer año de vida y alcanza el 80-90% del volumen del adulto a los dos años (Knickmeyer et al., 2008). Esta fase de rápido crecimiento representa un periodo de alta sensibilidad en el cual condiciones nocivas ambientales puede afectar el neurodesarrollo (McEwen, 1999), por ejemplo, la DH. La DH en el período perinatal está asociada con alteraciones de la expresión de genes críticos para el desarrollo y función del hipocampo (Carlson et al., 2007), y disfunción neurocognitiva (Beard & Connor, 2003). Como se manifestó anteriormente, la DH severa y crónica conduce a la hipomielinización cerebral, lo que repercute en la velocidad de transmisión del impulso nervioso y en la sincronización de la información. En estudios humanos se ha observado aumento de la latencia de los potenciales auditivos del tronco encefálico y de potenciales visuales evocados en niños deficientes en hierro (Roncagliolo et al., 1998; Algarin et al., 2003) Además, uno de los principales síntomas de la DH en niños pequeños es el declive de la capacidad cognitiva que resulta en un bajo rendimiento escolar y problemas de comportamiento (Grantham-McGregor & Ani, 2001; Felt et al., 2006).

### **5.2. Modelos animales de DH**

Los modelos animales permiten estudiar los efectos de la DH en condiciones ambientales controladas, lo que frecuentemente se complica en humanos por la multiplicidad de factores concomitantes, y en diferentes estadios del desarrollo. Se han empleado varios modelos de DH nutricional durante la gestación y/o lactancia en roedores (Felt et al., 1996; Badaracco et al., 2008; Rosato-Siri et al., 2018) que reproducen la DH materna durante el periodo gestacional, la lactancia y hasta los primeros dos años de vida del infante. Los efectos de la deprivación temprana de hierro han sido extensamente estudiados en regiones cerebrales como el estriado

e hipocampo y en procesos del desarrollo como la mielinización, siendo muchos de estos efectos irreversibles aún luego de una suplementación posterior de hierro (Felt et al., 2006; ver revisión Lozoff & Georgieff, 2006).

En estos modelos se observó reducción del peso seco de mielina, disminución de lípidos, colesterol y de proteínas como MBP, PLP y transferrina (Badaracco et al., 2010). Aun cuando se re-establecieron los valores normales de hierro en sangre y en el cerebro luego del destete, y hasta los 6 meses de edad, los efectos de la deprivación de hierro fueron persistentes (Beard, 2007; Badaracco et al., 2010). La DH en el período post-destete (21-63 días) produjo una reducción transitoria en los niveles de mielina que fue revertida con el re-establecimiento de los valores normales de hierro, sugiriendo que esta carencia también puede afectar la producción y mantenimiento de la mielina aún en la vida adulta (Beard & Connor, 2003).

En referencia a los estudios de hierro y mielina, Larkin & Rao (1990) sugirieron que los animales DH tienen una disminución global de la cantidad de mielina y no un déficit de componentes particulares, por lo tanto, los niveles relativos de los componentes de la mielina serían normales. Si bien aún se investiga cómo la DH produce hipomielinización, algunos estudios apuntan a la falla en la diferenciación de los oligodendrocitos (Todorich et al., 2009; Rosato-Sirí et al., 2010; 2018). Los animales DH presentarían un aumento de proliferación de CPO en el cuerpo calloso y disminución de la expresión de marcadores de oligodendrocitos maduros (Rosato-Sirí et al., 2010). *In vitro*, los cultivos primarios de oligodendrocitos de animales DH tendrían mayor proliferación de células precursoras y mayor expresión de marcadores de estirpe inmadura respecto de los oligodendrocitos controles (Badracco et al., 2010; Rosato-Sirí et al., 2018).

### **5.3. Modelo farmacológico celular de DH**

Para reproducir *in vitro* la condición deficiente en hierro, se utilizó un quelante conocido como deferoxamina (DFX). La DFX fue aislada inicialmente de un sideróforo de la especie *Streptomyces pilosus* conocido como ferrioxamina B, tiene gran afinidad por el ión férrico y en forma de mesilato es capaz de remover el hierro de la hemosiderina, ferritina, y en menor medida, de la transferrina (di Nicola et al., 2015). DFX es utilizada en el tratamiento de la intoxicación por hierro o aluminio, especialmente en niños pequeños, y en la hemocromatosis genética o adquirida (di Nicola et al., 2015).

Cultivos primarios de astrocitos tratados con DFX (1 mM, 4-72 h) aumentan la expresión del receptor de transferrina (Hoepken et al., 2004). Sin embargo, la expresión de este receptor en



astrocitos de humano no ha sido demostrado *in vivo* (Connor & Menzies, 1996). No obstante, el aumento de la inmunorreactividad para el receptor de transferrina se ha observado en el cerebro de animales que sufrieron DH perinatal (Siddappa et al., 2003). Por otro lado, el pretratamiento de cultivos primarios de astrocitos con DFX (0.2-25 mM, 4 h) sometidos a privación de oxígeno y glucosa (mimetizando las condiciones de isquemia), redujo la muerte celular, el estrés oxidativo y el edema (Zhang et al., 2014). Por lo tanto, DFX reduce la apoptosis y la oncosis de los astrocitos en un modelo *in vitro* de isquemia (Zhang et al., 2014). Además, el tratamiento de células gliales con DFX (100  $\mu$ M, 24 h) aumentó la expresión del factor de crecimiento insulínico tipo II, lo que puede favorecer la homeostasis del tejido cerebral cuando hay disminución de la disponibilidad de hierro (Morales-Gonzalez et al., 2013). Por último, la administración sistémica de DFX en ratas induciría la activación de HIF-1 y consecuentemente de otros genes regulados por este factor de transcripción como por ejemplo, eritropoyetina, GLUT-1 y VEGF, produciendo neuroprotección frente a la isquemia (Freret et al., 2006). Además, DFX, a través de HIF-1 produciría vasodilatación cerebral en voluntarios normales (Sorond et al., 2009).

## **HIPÓTESIS**

Dado que el astrocito, a través de multiplicidad de señales, es capaz de regular la supervivencia, proliferación, migración y/o diferenciación del oligodendrocito y que además posee un rol central en el metabolismo del hierro a nivel cerebral; proponemos que el astrocito podría contribuir a los defectos en la mielinización persistentes frente a la carencia nutricional de hierro durante el desarrollo.

## **OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS**

### **1. Objetivo general**

Profundizar en el conocimiento de los mecanismos patogénicos que subyacen a las alteraciones cerebrales causadas por la deficiencia dietaria de hierro durante la gestación y la lactancia, jerarquizando el rol del astrocito.

### **2. Objetivos específicos**

2.1. Validar un modelo nutricional de DH gestacional

2.2. Evaluar la mielinización y marcadores astrocitarios en el cuerpo calloso de las crías DH y controles

2.3. Estudiar el efecto del medio condicionado de astrocitos de animales DH sobre la maduración de oligodendrocitos

2.4. Evaluar el efecto de la DFX sobre astrocitos y oligodendrocitos de animales DH y controles

### **ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN**

Para la realización de los objetivos propuestos se debió, en primera instancia, validar en el laboratorio del IIBCE, un modelo nutricional de DH que reproduzca las alteraciones en el neurodesarrollo de la progenie reportadas en otros trabajos (Badaracco et al., 2008; 2010; Todorich et al., 2009; Rosato-Sirí et al., 2010; 2018).

El modelo consistió en la administración de una dieta baja en hierro (DH), conteniendo 4 mg/kg de Fe o dieta normal (controles) con 40 mg/kg de Fe, a hembras preñadas de la cepa *Sprague Dawley* a partir del día de gestación 5 (E5) y durante la lactancia hasta el destete (21 días). Luego del destete, los animales fueron alimentados con dieta control. A los 14 días y 30 días postnatales (DPN), se pesaron los animales, se obtuvo sangre por punción intracardíaca, se sacrificaron con y sin perfusión con PAF y se disecó el cerebro. Para determinar la anemia producida por DH en las crías, se realizó un hemograma completo de las muestras de sangre de animales DH y controles a los 14 y 30 DPN, en el Laboratorio de Análisis Clínicos de Facultad de Veterinaria.

Para llevar a cabo los objetivos 2 y 3 del proyecto, se realizaron cortes coronales de cerebro de ratas a los 30 DPN y se realizó inmunohistoquímica para proteínas de mielina, oligodendrocitos y astrocitos: PLP, antipoliposis adenomatosa coli clon CC1, GFAP, S100 $\beta$ , glutamina sintasa (GS) y tinción de lípidos de mielina con Fluoromielina. Se cuantificó intensidad de fluorescencia, área inmunopositiva y densidad de células según el marcador utilizado y el área de análisis fue la región del cuerpo calloso medial.

Para el objetivo 3, en colaboración con el laboratorio de la Dra. Pasquini (Dpto. de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA), se realizaron cultivos de astrocitos de animales DH y controles y los medios condicionados de utilizaron para el tratamiento de oligodendrocitos DH y controles. Se evaluó diferenciación de los oligodendrocitos según el número relativo de células que expresaron marcadores de estirpe inmadura como PDGFR $\alpha$  o de estirpe madura como MBP. El anticuerpo contra el antígeno de membrana O4 se utilizó

como marcador de linaje oligodendroglial expresándose en estadios de diferenciación inmaduro y maduro. Además, se realizó análisis morfológico de los oligodendrocitos con análisis de Sholl.

Para el objetivo 4 se realizaron cultivos primarios de astrocitos y oligodendrocitos de animales neonatos DH y controles y se trataron con DFX (50-200  $\mu$ M, 24 h). Se evaluó funcionalidad mitocondrial (actividad de la succinato deshidrogenasa con MTT), proliferación celular (por incorporación de BrdU), expresión de marcadores de oligodendrocitos (CC1) y astrocitos (GFAP y S100 $\beta$ ) y de apoptosis (caspasa 3 clivada).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Modelo animal**

Se empleó un modelo murino de deficiencia nutricional de hierro durante la gestación y la lactancia. En el grupo DH, hembras preñadas SD fueron alimentadas con una dieta deficiente en hierro (con 4 mg/kg de Fe) a partir del día 5 de gestación y durante la lactancia hasta el destete (21 días). A partir del día 21, las crías fueron alimentadas con dieta control hasta su sacrificio. En el grupo control, una dieta con 40 mg/kg de Fe fue suministrada a las hembras preñadas durante la gestación y lactancia. La formulación de la dieta control y DH fue la misma, dieta de crecimiento AIN-93G, a excepción del contenido de hierro, y fue comprada a la empresa internacional TestDiet® en forma de *pellets*. Los animales fueron albergados en cajas con alimento y agua *ad libitum*, con un régimen controlado de temperatura y ciclos de 12 horas de luz/oscuridad. Los animales fueron obtenidos y mantenidos en el bioterio del IIBCE. Se cumplieron las normas vigentes institucionales en conformidad con la Ley de Experimentación Animal (Ley Nº 18.611). Todos los procedimientos experimentales realizados con animales fueron aprobados por el Comité de Ética del IIBCE.

### **2. Análisis hematológicos**

Se obtuvo sangre de animales DH y controles a los 14 y 30 DPN por punción intracardíaca en animales anestesiados, previo a la fijación del tejido por perfusión. Las muestras de sangre fueron recolectadas en un tubo EDTA Tri-K (Deltalab) de 0.5 ml y transportadas al Laboratorio de Análisis Clínicos de Facultad de Veterinaria. Se realizó el hemograma completo de un total de 40 muestras analizadas.

### 3. Inmunohisto/citoquímica

Se empleó el mismo protocolo general descrito en el capítulo I para la fijación, seccionado del tejido e inmunohisto/citoquímica. Se trabajó en cortes coronales de cerebro (50  $\mu\text{m}$ ) conteniendo la región del cuerpo caloso y estriado, aproximadamente en la región comprendida entre Bregma 2.28 y -0.84. En todas las imágenes se analizó la región medial del cuerpo caloso. La inmunocitoquímica se realizó en astrocitos y oligodendrocitos fijados con PAF 4%. Se emplearon los mismos anticuerpos secundarios, a excepción de los anticuerpos primarios, que se detallan en la Tabla 4. Para la inmunomarcación de PLP y CC1 se requirió realizar el reclutamiento antigénico de los cortes siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo I. Para el análisis de la mielina, se empleó FluoroMielina™ fluorescente verde (Thermo Fisher) que presenta gran afinidad por los lípidos y es capaz de teñir las vainas de mielina que contienen un alto porcentaje de lípidos. La tinción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones ya que se emplearon cortes obtenidos con vibrátomo y no criosecciones. Brevemente, los cortes de tejido fijados fueron permeabilizados con 0.3% Tritón X-100 (20 min, TA) e incubados con FluoroMielina (1:300) diluída en PBS 0.1 M durante 20 min. Luego se lavaron tres veces con PBS y se montaron con glicerol 50%-Hoechst (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal Olympus FV300 utilizando un laser de 488nm.

**TABLA 4: LISTA DE ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS**

<b>Inmunohistoquímica</b>						
<b>Antígeno</b>	<b>Tipo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Huésped</b>	<b>Cél/estructura blanco</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Código</b>
S100 $\beta$	Monoclonal	1:500	Ratón	Astrocito	SIGMA	S2532
S100	Policlonal	1:500	Conejo	Astrocito	SIGMA	S2644
GFAP	Monoclonal	1:500	Conejo	Astrocito	SIGMA	G3983
CC1	Monoclonal	1:300	Ratón	Oligodendrocito	abcam	ab16794
PDGFR $\alpha$	Policlonal	1:100	Conejo	CPO	abcam	ab61219
GS	Policlonal	1:1000	Conejo	Astrocito	abcam	ab49873
PLP	Policlonal	1:100	Conejo	Proteolipoproteína	abcam	ab61219
<b>Inmunocitoquímica</b>						
GFAP	Monoclonal	1:500	Conejo	Astrocito	SIGMA	G3983
S100 $\beta$	Monoclonal	1:500	Conejo	Astrocito	SIGMA	S2644
CC1	Monoclonal	1:300	Ratón	Oligodendrocito	abcam	ab16794
Caspasa 3 clivada	Monoclonal	1:500	Conejo	Presencia de daño en cualquier células	abcam	ab2302

## 4. Cultivos celulares

### 4.1. Oligodendrocitos

Los cultivos primarios de oligodendrocitos fueron obtenidos de corteza cerebral de ratas SD de 1-2 días de vida, siguiendo el procedimiento descrito por Yang et al. (2005) con algunas modificaciones. Brevemente, se extrajo la corteza cerebral de 1-2 animales neonatos en condiciones estériles, se retiraron las meninges y se incubó con tripsina-EDTA (0.05% en PBS; 15 min a 37°C). El tratamiento enzimático se detuvo con DMEM + 10% FBS y ADNasa 60 µg/ml y se completó la disgregación por pipeteo. La suspensión celular se filtró en una malla metálica de 80 µm, se centrifugó (1000 rpm, 10 min) y el pellet se re-suspendió en DMEM +10% FBS. Las células disgregadas se sembraron en botellas de 25 cm<sup>2</sup> o 75 cm<sup>2</sup> cubiertas con 100 µg/ml de poli-lisina. Los cultivos se mantuvieron en DMEM suplementado con 10% FBS, 3.6 g/l HEPES, 100 IU/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina, cambiando el medio de cultivo cada 48h. Las células permanecieron en una estufa a 37°C, en una atmósfera saturada en agua, 95% aire/5% CO<sub>2</sub>. A los 10 días *in vitro*, el cultivo se agitó de 15 a 18 h a 250 rpm para desprender la oligodendroglía y la microglía adheridas a la monocapa de astrocitos. Se colectó el medio de cultivo conteniendo las células desprendidas y se centrifugó (1000 rpm, 10 min).

Se resuspendió el pellet en DMEM + 10% FBS, se sembró sobre placas de Petri de 60 mm y se dejó reposar (15-30 min) en estufa para eliminar astroglía y microglía contaminantes ya que la oligodendroglía, a diferencia de la astro y microglía, tiene escasa adherencia al plástico. Se colectó el medio de cultivo con las células en suspensión que no se adhirieron al plástico, se centrifugó (1000 rpm, 10 min) y se sembró sobre placas de Petri de 35 mm cubiertas con poli-lisina (100 µg/ml) a una densidad de 2000-50000 cél/cm<sup>2</sup>.

A las 24 h luego de sembrar las células, el medio se cambió por Neurobasal adicionado con 2% B27 y 10 ng/ml PDGF-AA. Las células se mantuvieron en este medio durante 3 días, al cabo de los cuales, el cultivo está enriquecido en células precursoras de oligodendrocitos en estadio multipolar (50% de células NG2 positivas). Para los experimentos con oligodendrocitos diferenciados, el medio inicial fue sustituido totalmente por Neurobasal + 2% B27, sin factores tróficos y se dejaron 3 días más *in vitro*, antes de comenzar los tratamientos.

Los cultivos de oligodendrocitos de animales DH y controles que se utilizaron para probar los medios condicionados de astrocitos DH y controles se realizaron en el laboratorio de la Dra. Pasquini (UBA-CONICET) siguiendo el protocolo descrito en Rosato-Siri et al. (2018) que es una modificación del protocolo original McCarthy & DeVellis (1980). Los oligodendrocitos fueron

cultivados en un medio glial definido (GDM, del inglés, *Glial Defined Medium*) conteniendo DMEM/F12 (1:1), FBS 1%, BSA 1 mg/ml, insulina 5 µg/ml, piruvato de Na 0.11 mg/ml, selenito de Na 30 nM, biotina 10 nM, T3 15 nM, hidrocortisona 2 µM, transferrina 100 µg/ml y antibiótico.

#### **4.2. Cultivo primario de astrocitos de corteza cerebral**

Se empleó el mismo protocolo descrito para el Capítulo I.

#### **4.3. Ensayos con medios condicionados de astrocitos**

Los experimentos que se realizaron para evaluar estadíos de diferenciación de oligodendrocitos utilizando medios condicionados de astrocitos controles y DH fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Juana Pasquini (UBA, CONICET) en el marco de un proyecto en colaboración. Los medios condicionados de astrocitos DH y controles fueron diluidos a la mitad en GDM concentrado 2x para luego ser adicionados a los cultivos de oligodendrocitos durante 5 días *in vitro*.

#### **4.4. Tratamiento con deferoxamina**

Se adicionó DFX (0-200 µM) durante 24 h a los cultivos de astrocitos y oligodendrocitos de animales DH y controles y se realizaron distintos ensayos de viabilidad, actividad mitocondrial y proliferación celular. Para el estudio de marcadores celulares mediante inmunocitoquímica, se empleó una dosis única de DFX (100 µM, 24 h).

#### **4.4. Ensayo de 3-(4,5-dimetaldiazo1-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)**

El ensayo de MTT se basa en la capacidad de las deshidrogenasas mitocondriales de células vivas, de romper el anillo tetrazolio del MTT (amarillo soluble), transformándolo en formazán, un compuesto de color azul-violáceo e insoluble en agua (Mathers & Roberts, 1998). Brevemente, las células se incubaron con 10 µM MTT durante 30-45 min a 37°C hasta la formación de los acúmulos oscuros. Cuando el colorante comienza a detectarse extracelularmente, la reacción se detuvo aspirando el medio y adicionando 120 µl de DMSO. Finalmente, se leyó la absorbancia a 570 nm con filtro de referencia a 630 nm.

#### **4.5. Ensayo de proliferación celular con bromodeoxiuridina**

Se evaluó la proliferación de cultivos confluentes de astrocitos DH y controles en presencia y ausencia de DFX (50-200 µM), empleando el mismo protocolo descrito en el capítulo I.

### **5. Análisis de imágenes**

Para el análisis de todas las imágenes se empleó el software libre Image J (NIH, USA). Imágenes de fluorescencia confocal fueron binarizadas y umbralizadas para cuantificar los siguientes parámetros: área de señal positiva, % área positiva y nivel medio de grises (MGV, del inglés, *Mean gray Value*). Se marcaron las área de interés (ROI, del inglés, *Region Of Interest*) manualmente utilizando la función *ROI Manager*. El conteo de células se realizó manualmente con la función (*Cell counter*) o automáticamente con la función (*Analyze Particle*). El análisis de la complejidad morfológica de los oligodendrocitos, es decir, cantidad de procesos y sus ramificaciones, se realizó con la función *Sholl Analysis*. Mediante este análisis el programa crea círculos concéntricos en torno al eje de la célula y a distancias indicadas por el operador. En este caso, se trazaron círculos cada 10  $\mu\text{m}$  a partir de las 20  $\mu\text{m}$  del centro de la célula). Cada imagen conteniendo un oligodendrocito MBP positivo fue previamente binarizada y el programa realizó la cuantificación de las intersecciones de los procesos celulares con cada círculo trazado automáticamente.

## **6. Análisis estadístico**

Se emplearon los mismos criterios de análisis estadístico de los resultados que los descritos para el capítulo I.

# **RESULTADOS**

## **1. Validación del modelo DH: anemia microcítica e hipocrómica**

Los resultados hematológicos constataron una anemia microcítica e hipocrómica severa a los 14 DPN en animales DH según lo demuestran los valores de hemoglobina (Hb), hematocrito (HCT), volumen corpuscular medio (MCV), hemoglobina corpuscular media (MCH) y amplitud de la distribución eritrocitaria (RDW). A los 30 DPN, luego del re-establecimiento de la dieta control desde el día 21, hubo una mejoría notoria de los valores hematológicos que se aproximaron a los controles, sin embargo, los valores de Hb y HCT siguieron siendo significativamente más bajos que los controles respectivos (Figura 25-A). El análisis de los pesos corporales y cerebrales entre machos DH y controles de 14 y 30 DPN no mostró cambios significativos (Figura 25-B y C). Por otro lado, se midieron los pesos promedio corporales de las camadas con número similares de crías (12-14) al momento del nacimiento (4 camadas controles y 7 DH) y se observó una disminución no significativa en el peso corporal. Peso corporal promedio para los controles fue de  $6.06 \pm 0.08$  y para los DH fue de  $5.7 \pm 0.2$ . Para

evaluar si esta diferencia puede ser estadísticamente significativa se debería aumentar el número de capas analizadas.

## **2. Hipomielinización en el cuerpo calloso**

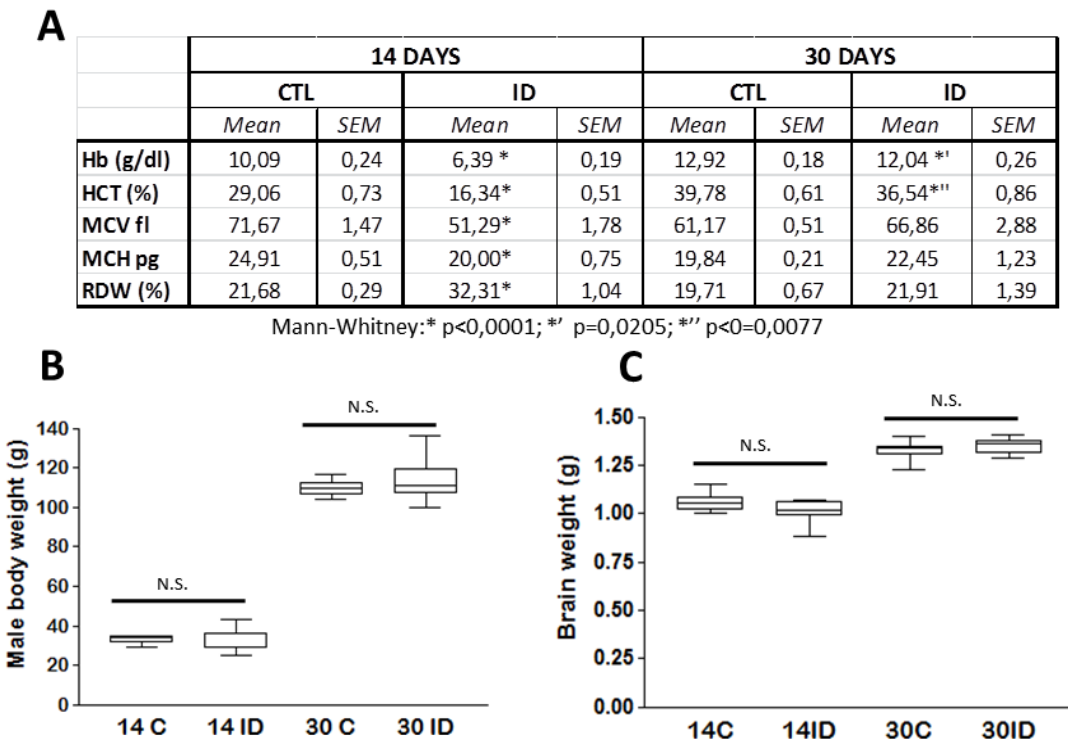
Se analizó la mielina de la región medial del cuerpo calloso en cortes coronales de cerebro de animales DH y controles a los 30 DPN (Figura 26-A). Se observó una disminución de la señal verde correspondiente a la tinción con FluoroMyelin (FM) en animales DH y en concordancia la medición del nivel medio de grises (MGV) fue significativamente más baja (33% menor) con respecto a los animales controles. Por otro lado, se analizó la expresión de PLP, proteína que constituye el 50% de las proteínas de la mielina (Baumann & Pham-Dinh, 2001) por inmunohistoquímica, observándose una disminución significativa (en promedio, 44% menos) en la intensidad de fluorescente roja (MGV) de la región medial del cuerpo calloso de animales DH. Por último, se cuantificó el número de células que expresan el marcador de oligodendrocitos maduros CC1 y se observó una reducción significativa (en promedio, 23% menos) en la densidad de estas células en el cuerpo calloso de animales DH (Figura 26-A y B). La marcación de CC1 muestra un ribete de citoplasma rodeando a un núcleo redondo central, sin observarse las prolongaciones celulares. Estos oligodendrocitos forman hileras que discurren de forma más o menos paralela a lo largo de la región medial del cuerpo calloso. En suma, los resultados muestran que los animales DH tienen una reducción de componentes de la mielina asociada a una disminución en la cantidad de oligodendrocitos maduros con capacidad mielinizante.

## **3. Cambio fenotípico de los astrocitos del cuerpo calloso de animales DH**

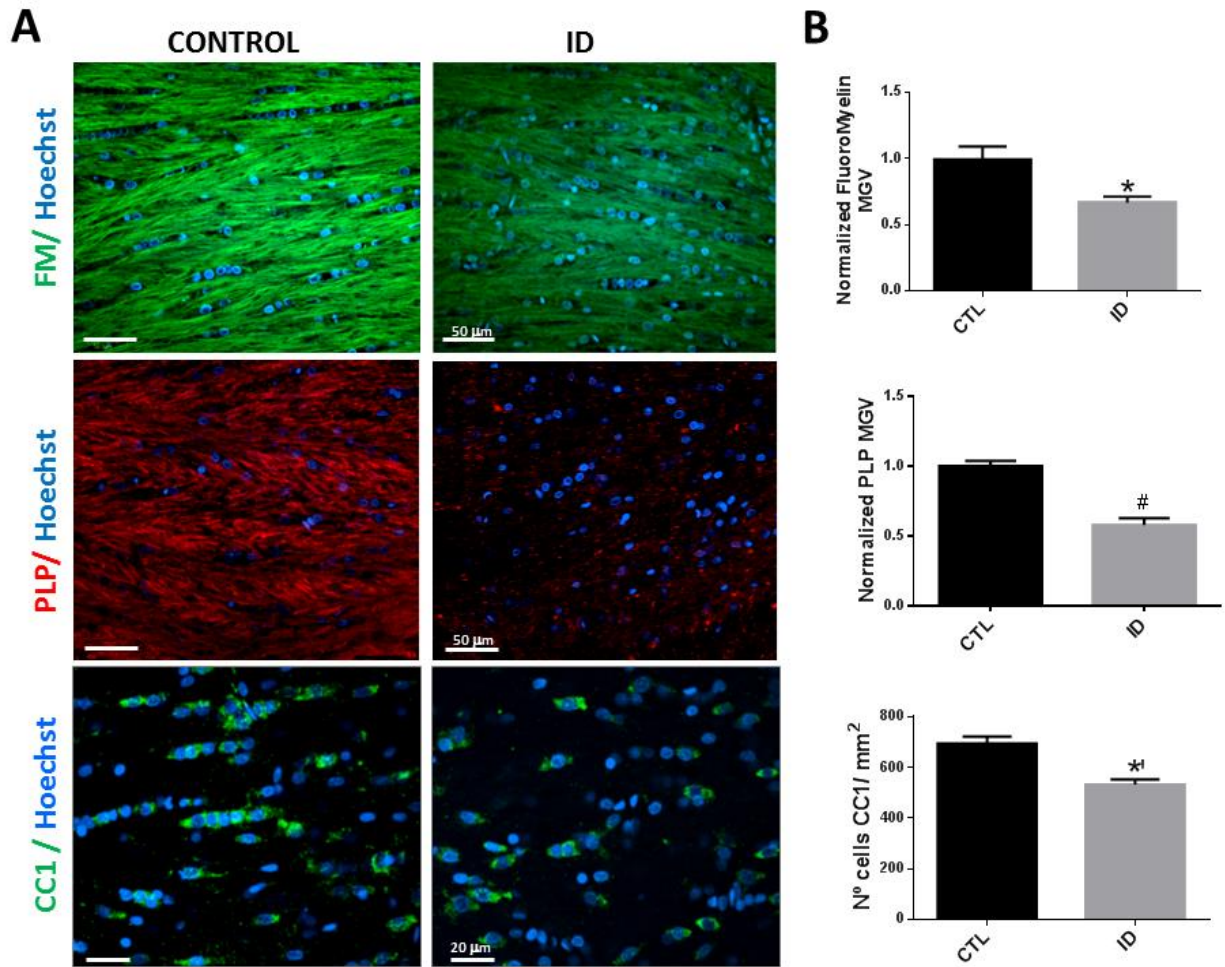
Se analizó la expresión de tres marcadores de astrocitos (GFAP, S100 $\beta$  y GS) en el cuerpo calloso de animales DH y controles a los 30 DPN (Figura 27-A). Se observó un aumento de la expresión de S100 $\beta$  (% de área inmunopositiva e intensidad de fluorescencia) y disminución del área inmunopositiva para GFAP en el cuerpo calloso de animales DH (Figura 27-B). Mientras que el área inmunopositiva de S100 $\beta$  aumentó un 77% en animales DH respecto de animales controles; el área GFAP positiva disminuyó 42%. No se observaron cambios en los parámetros medidos (% área positiva y MGV) para glutamina sintasa.



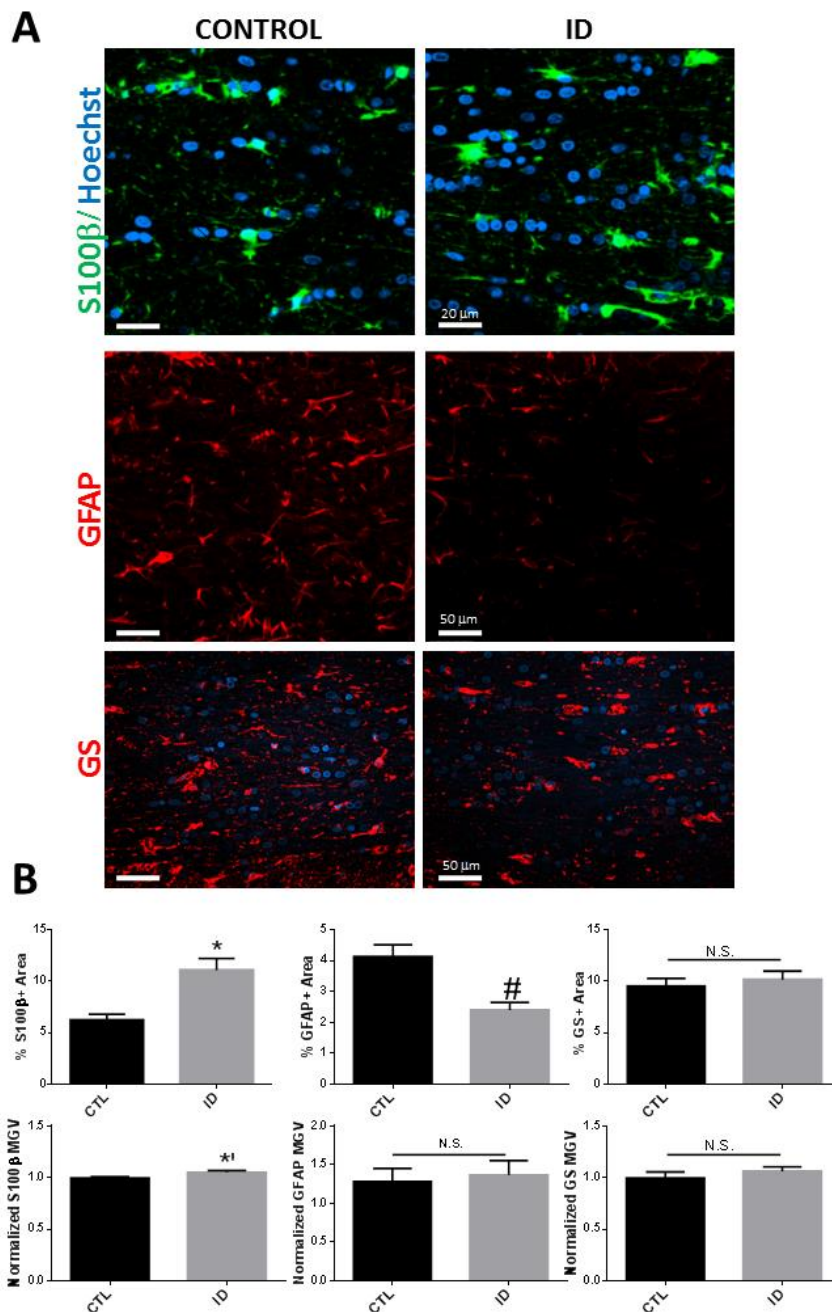
Por otro lado, no se constataron cambios en la densidad de astrocitos S100 $\beta$ + como se observa en la figura 28-B, siendo la densidad promedio para animales controles de  $101 \pm 6$  cél/  $\text{mm}^2$  y de  $103 \pm 7$  cél/  $\text{mm}^2$  en animales DH. Los valores de densidad promedio de astrocitos GS+ fueron similares a los obtenidos para S100 $\beta$ ;  $106 \pm 6$  cél/  $\text{mm}^2$  en animales controles y  $104 \pm 5$  cél/  $\text{mm}^2$  en animales DH, siendo la diferencia entre controles y DH no significativa. Por lo tanto, se evidencia una alteración en la expresión de marcadores astrocitarios prototípicos como son GFAP y S100 $\beta$  en el cuerpo calloso de animales DH que no estaría relacionada con cambios en la densidad astrocitaria.



**Figura 25. Anemia microcítica e hipocrómica en animales DH. (A)** Anemia microcítica e hipocrómica severa a los 14 DPN en animales DH (ID) según lo demuestran los valores de hemoglobina (Hb), hematocrito (HCT), volumen corpuscular medio (MCV), hemoglobina corpuscular media (MCH) y amplitud de la distribución eritrocitaria (RDW). A los 30 DPN, luego del re-establecimiento de la dieta control, se observó una mejoría de los valores hematológicos que se aproximaron a los controles (CTL). Sin embargo, Hb y HCT continúan siendo significativamente más bajos respecto de los controles. Los test estadísticos utilizados y el nivel significancia aceptado se expresan en la tabla. N=7-12 por grupo. **(B-C)** Ausencia de cambios significativos (test de Mann-Whitney) en las medianas de los pesos corporales y cerebrales entre machos C y DH (ID) a los 14 y 30 DPN. En los pesos corporales: N=7-13 por grupo; en los pesos cerebrales: N=7-12 por grupo. N.S: estadísticamente no significativo.



**Figura 26. Hipomielinización en el cuerpo calloso medial de ratas DH. (A)** Imágenes de microscopía confocal de la región del cuerpo calloso medial, en cortes coronales, para la tinción de lípidos de mielina (FluoroMielina, FM), la proteína proteolípida (PLP) y CC1 (oligodendrocitos maduros) a los 30 DPN. Los núcleos se visualizan con Hoechst. **(B)** Análisis cuantitativo de las imágenes mostradas en la parte A. Se cuantificó el nivel medio de grises (MGV) en imágenes teñidas con FM y se observó una reducción significativa de este parámetro en animales DH (ID) (\*t-test,  $p=0.0092$ ). Además, se evaluó el MGV de imágenes inmunomarcadas para PLP y se observó una reducción significativa de la fluorescencia en animales DH (# test Mann-Whitney,  $p<0.0001$ ). Por último, se cuantificó el número de células CC1 positivas (marcador de oligodendrocitos maduros) por área en la región del cuerpo calloso medial y se observó que los animales DH presentan menor densidad de oligodendrocitos maduros (\*t-test,  $p<0.0001$ ).



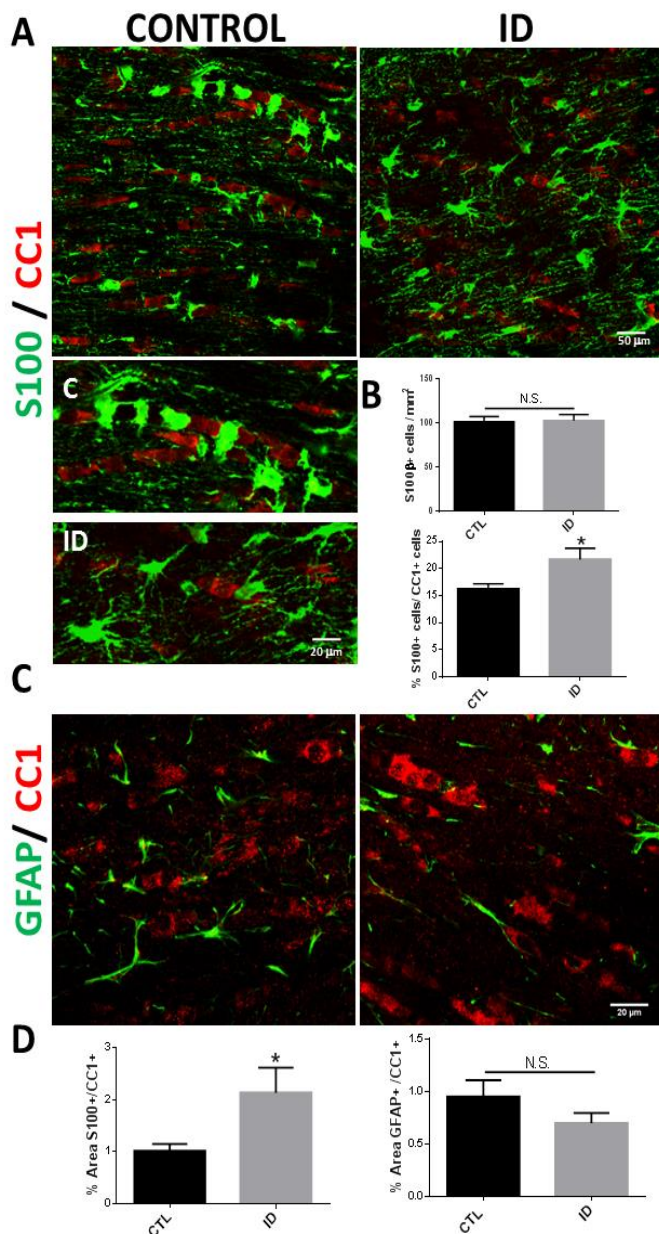
**Figura 27. Cambio fenotípico de los astrocitos en el cuerpo caloso de animales DH. (A)** Imágenes obtenidas por microscopía confocal de la inmunohistoquímica para los marcadores de astrocitos: S100 $\beta$ , GFAP y glutamina sintasa (GS), en la región del cuerpo caloso medial de animales DH (ID) y controles (CTL) a los 30 DPN. **(B)** Análisis cuantitativo de las imágenes, evaluándose el porcentaje de área positiva e intensidad de fluorescencia (nivel medio de grises (MGV)) para los tres marcadores. Se observa un aumento significativo del área S100 $\beta$  positiva (\* t-test,  $p=0.0007$ ) y del MGV (\*' t-test,  $p=0.0146$ ) y una reducción significativa del área GFAP positiva (# test Mann-Whitney,  $p=0.0003$ ). No se observaron cambios significativos en el área inmunopositiva o intensidad de fluorescencia de astrocitos GS+. N.S.: estadísticamente no significativo.

#### **4. Relación de marcadores de astrocitos y oligodendrocitos en el cuerpo calloso**

Se realizó la co-inmunomarcación de CC1 con S100 o GFAP en el cuerpo calloso de animales DH y controles. Como se observa en la Figura 28-A, las células S100, que corresponderían a astrocitos, no co-localizan con CC1, pero parecen estar en estrecha proximidad física. Las prolongaciones de las células S100 rodean a los somas de oligodendrocitos CC1+. Por otro lado, la proporción de células S100/CC1 en el cuerpo calloso aumenta en animales DH, sin embargo, la densidad de células S100 $\beta$  no cambia (Figura 28-B). Por otro lado, la marcación con GFAP, evidenció prolongaciones astrocitarias menos abundantes y algunas de ellas próximas a las células CC1+ (Figura 28-C, flechas blancas). El análisis de la relación de áreas inmunopositivas entre la señal de S100 y CC1 mostró un aumento significativo en animales DH como era esperado, mientras que la relación entre GFAP y CC1 no marcó diferencias significativas (Figura 28-D). Esto último podría deberse a que existe una disminución simultánea de la señal de GFAP como se muestra en la figura 27 y de CC1 como se muestra en la Figura 26, que parcialmente se podrían compensar.

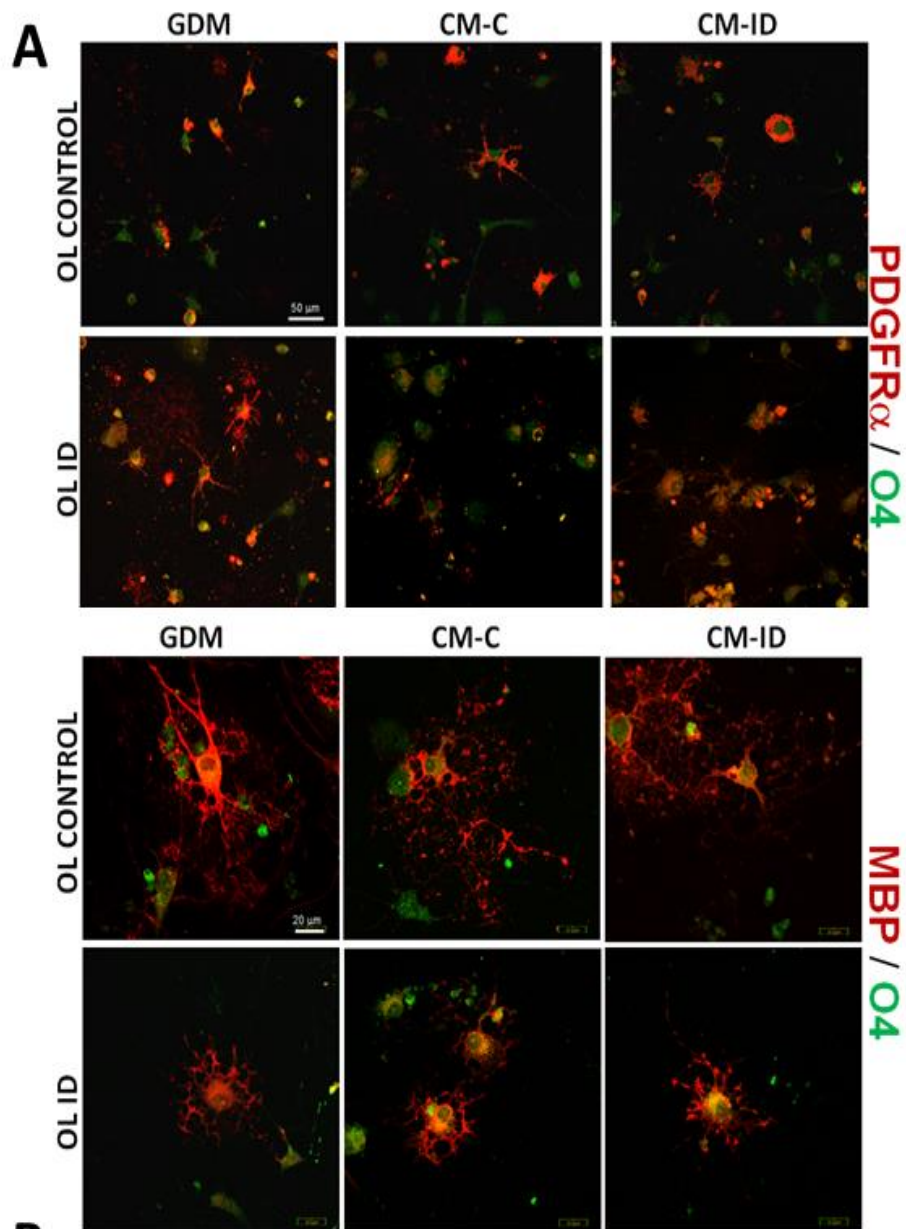
#### **5. Efectos del medio condicionado de astrocitos C y DH sobre la maduración de los oligodendrocitos**

En la figura 29-A se observa la co-marcación de O4/PDGFR $\alpha$  y O4/MBP en cultivos de oligodendrocitos de animales DH y controles incubados en condiciones control con GDM solo (GDMc) o con medios condicionados de astrocitos controles o DH. En el primer panel, se observa mayor abundancia de precursores de oligodendrocitos PDGFR $\alpha$  positivos en cultivos de animales DH, con distintas morfologías, unipolares y multipolares, con respecto a los cultivos de animales controles. Cuando los animales DH son tratados con medios condicionados de astrocitos controles, baja la abundancia de células PDGFR $\alpha$  positivas. En el panel inferior, se muestra la co-inmunomarcación de O4 con MBP, y se evidencian cambios en la complejidad morfológica de los oligodendrocitos MBP positivos. A simple vista, la longitud y número de ramificaciones de los oligodendrocitos controles parece ser superior a la de los oligodendrocitos DH. En la Figura 29-B la tabla resume la cuantificación de la abundancia de células doble marcadas O4/ PDGFR $\alpha$  y O4/MBP en cultivos de oligodendrocitos DH y controles en presencia de GDM solo o con medios condicionados de astrocitos controles y DH. Se observa que hay mayor diferenciación de los oligodendrocitos DH expuestos al medio condicionado de astrocitos controles ya que hay un aumento significativo de células MBP positivas y una disminución significativa de células PDGFR $\alpha$  positivas.

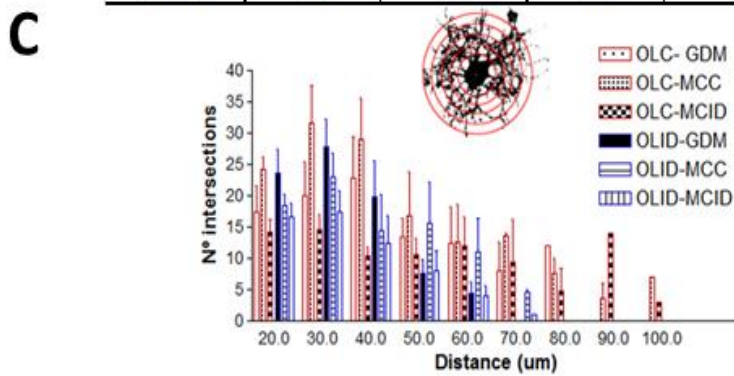


**Figura 28. Relación de marcadores de astrocitos y oligodendrocitos en el cuerpo calloso.** (A) Imágenes obtenidas por microscopía confocal de la inmunohistoquímica para S100 y CC1 en el cuerpo calloso de animales DH (ID) y controles (CTL) a los 30 DPN. Se observan los somas de oligodendrocitos CC1 positivos que forman hileras y están estrechamente asociados con el soma y las prolongaciones de las células S100. No se observa co-localización entre ambos marcadores. (B) Cuantificación del número de células S100β positivas y de la proporción de células S100 y CC1 en el cuerpo calloso medial. No hay cambios significativos en la densidad de astrocitos S100β+ y si se observa una mayor proporción de células S100+/CC1+ en animales DH (\*t-test, p=0.0218) que podría deberse a la disminución de células CC1 como se muestra en la Figura 26. (C) Inmunohistoquímica de GFAP con CC1, observándose la marca fibrilar de GFAP sobre todo en las prolongaciones de astrocitos dispersos en el cuerpo calloso de animales DH (ID) y controles (CTL). (D) La cuantificación de las áreas inmunopositivas y el cociente entre ellas, S100/CC1 y GFAP/CC1, en el cuerpo calloso, mostró un aumento significativo de la relación S100/CC1 en animales DH (ID) a los 30DPN (t-test, p=0.0047). No se observaron cambios significativos en la relación GFAP/CC1. N.S: estadísticamente no significativo.





	OLG-C		OLG-ID	
	% of double positive cells		% of double positive cells	
	O4/PDGFR $\alpha$	O4/MBP	O4/PDGFR $\alpha$	O4/MBP
CM-C	15	83	20 **	78**
CM-ID	13	82	40	57
GDMc	12	86	42	56



**Figura 29. Efectos del medio condicionado de astrocitos DH y controles sobre la maduración de los oligodendrocitos. (A)** Cultivos de oligodendrocitos DH (ID) o controles tratados con GDM (controles), medio condicionado de astrocitos controles (CM-C) o de astrocitos de animales DH (CM-ID). Se observa la inmunohistoquímica de los oligodendrocitos doble marcados con PDGFR $\alpha$  (marcador de células precursora de oligodendrocitos) y O4 (panel de arriba) o con MBP (marcador de oligodendrocito maduro) y O4 (panel de abajo). En el panel de arriba se evidencia una mayor cantidad de células PDGFR $\alpha$  y O4 positivas (amarillo) en cultivos de oligodendrocitos DH, excepto en presencia de CM-C. En el panel de abajo, se observa a gran aumento, la morfología de oligodendrocitos MBP positivos, que parecen tener ramificaciones más largas y complejas en cultivos de animales controles. **(B)** Tabla que muestra la cuantificación de las células doble marcadas PDGFR $\alpha$  /O4 y MBP/O4 en todas las condiciones experimentales. Los oligodendrocitos DH en presencia de CM-C logran mayor grado de diferenciación, ya que aumenta significativamente la cantidad de células MBP+/O4+ y disminuyen las células PDGFR $\alpha$ +/O4+ respecto del GDM (\*\*p<0.001). **(C)** Análisis de Sholl de oligodendrocitos MBP positivos en todas las condiciones experimentales. En los oligodendrocitos DH (ID) (recuadros azules) las ramificaciones son más cortas que en los oligodendrocitos controles, ya que se extienden hasta alcanzar 60  $\mu$ m del centro del soma, en tanto, los controles llegan a 100  $\mu$ m de distancia. Por otro lado, los oligodendrocitos tanto DH (ID) como controles tratados con medios condicionados tienden a tener prolongaciones más largas que en presencia de GDM solo.

Por lo tanto, el medio condicionado de astrocitos DH inhibiría la diferenciación de los oligodendrocitos DH respecto del medio condicionando de astrocitos controles. Por último, en la Figura 29-C se realizó un análisis de Sholl de las células MBP positivas en todas las condiciones experimentales. A simple vista se observa que los oligodendrocitos controles (recuadros rojos) tienen una distribución de ramificaciones que alcanza zonas más alejadas del centro del soma, mientras que en los oligodendrocitos DH (recuadros azules) las prolongaciones se restringen a la cercanía del soma. Esto podría significar que los oligodendrocitos controles MBP positivos alcanzan un mayor grado de diferenciación morfológica respecto de los oligodendrocitos DH. Por otra parte, dada la gran dispersión de los datos, no se observan diferencias concluyentes entre las distintas condiciones de tratamiento con medios condicionados o GDM. En suma, el medio condicionado de astrocitos controles favorece la diferenciación de oligodendrocitos DH, sin embargo, el medio condicionado de astrocitos DH no lograría este efecto, lo cual indicaría que los factores solubles secretados por los astrocitos controles y DH son diferentes. Por otra parte, constatamos por análisis morfológico que los oligodendrocitos DH tienen un menor

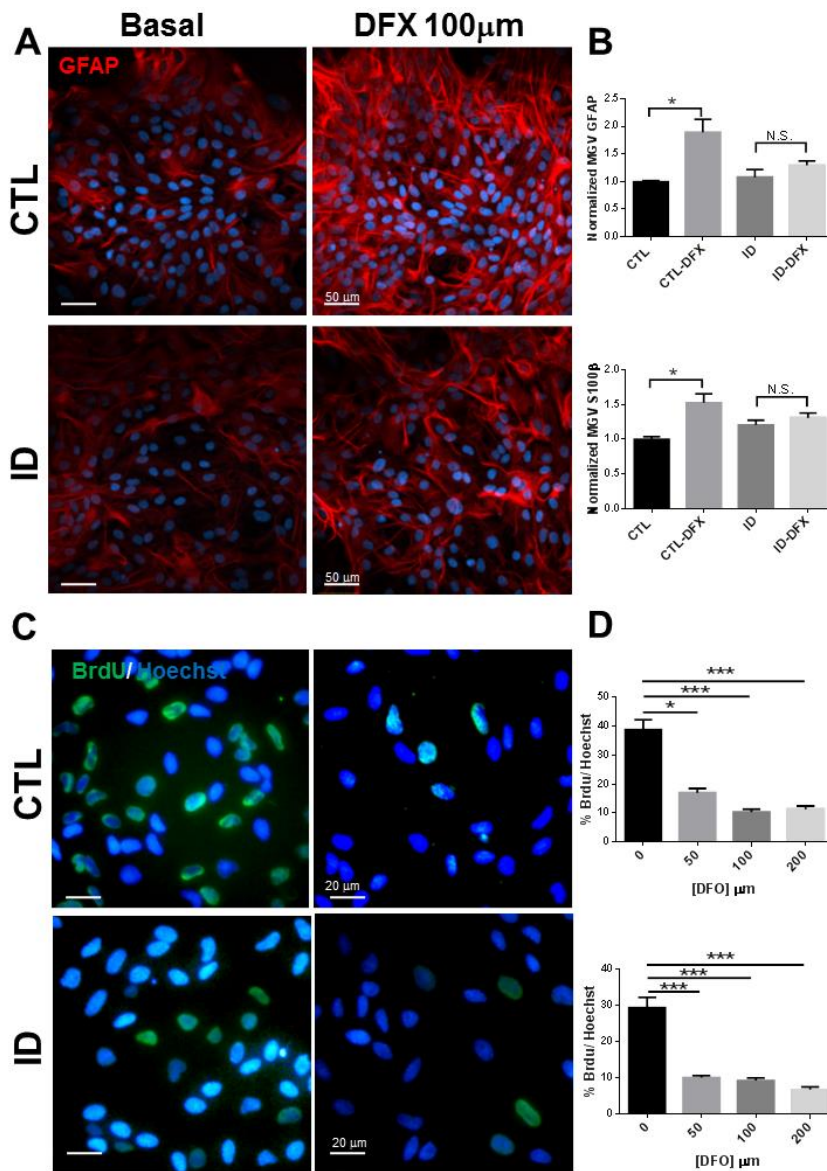
desarrollo de sus prolongaciones respecto de los oligodendrocitos controles y esto no logra revertirse con el tratamiento con medio condicionado de astrocitos controles.

## **6. La DFX afecta diferencialmente la expresión de GFAP y S100 $\beta$ en astrocitos de animales controles o DH.**

En la figura 30 se observan cultivos primarios de astrocitos de corteza de animales DH y controles que fueron tratados con distintas concentraciones de DFX. En el panel A se observa la inmunocitoquímica para GFAP en cultivos confluentes de astrocitos DH y controles en condición basal (sin DFX) o con 100  $\mu$ M de DFX durante 24 h. Se observa una marcación filamentosa citoplasmática que es de mayor intensidad en astrocitos controles tratados con DFX.

En la figura 30-B se muestran las gráficas que corresponden a la cuantificación de la intensidad de fluorescencia (MGV) para GFAP y S100 $\beta$ , y se observa un aumento significativo en los astrocitos controles tratados con DFX pero no en astrocitos DH tratados con DFX. No se observan diferencias en la expresión de GFAP y S100 $\beta$  entre astrocitos controles y DH. En las figuras 30-C y -D, se evaluó la proliferación celular (% células BrdU+/ Hoechst+) en astrocitos controles y DH frente a distintas concentraciones de DFX (0-200 $\mu$ M) y se evidencia una disminución significativa de las células proliferantes tanto en astrocitos controles como DH. Además, se evaluó la tasa de proliferación basal comparativamente entre astrocitos controles y DH y no se observan diferencias significativas. Por otro lado, el análisis de la función mitocondrial evaluada mediante el ensayo con MTT, en astrocitos controles y DH, tratados con DFX (0, 50, 100 y 200  $\mu$ M, 24h), mostró una disminución significativa únicamente en astrocitos controles expuestos a 200  $\mu$ M respecto del control absoluto ( $p < 0.05$ , test de ANOVA y test de Tukey de comparación múltiple). El promedio normalizado de la absorbancia a 570nm menos absorbancia a 630nm en astrocitos controles fue de  $1.00 \pm 0.07$  y en astrocitos tratados con DFX 200 $\mu$ M fue de  $0.72 \pm 0.07$ . En astrocitos DH no hubo diferencias significativas en las mediciones del MTT cuando fueron tratados con DFX. En suma, DFX inhibe la proliferación celular de los cultivos de astrocitos DH y controles, pero únicamente en astrocitos controles, produce un aumento significativo de la inmunorreactividad de GFAP y S100 $\beta$  así como también inhibe la función mitocondrial. Por lo tanto, astrocitos controles y DH tienen diferente respuesta celular a la ausencia de hierro *in vitro*.

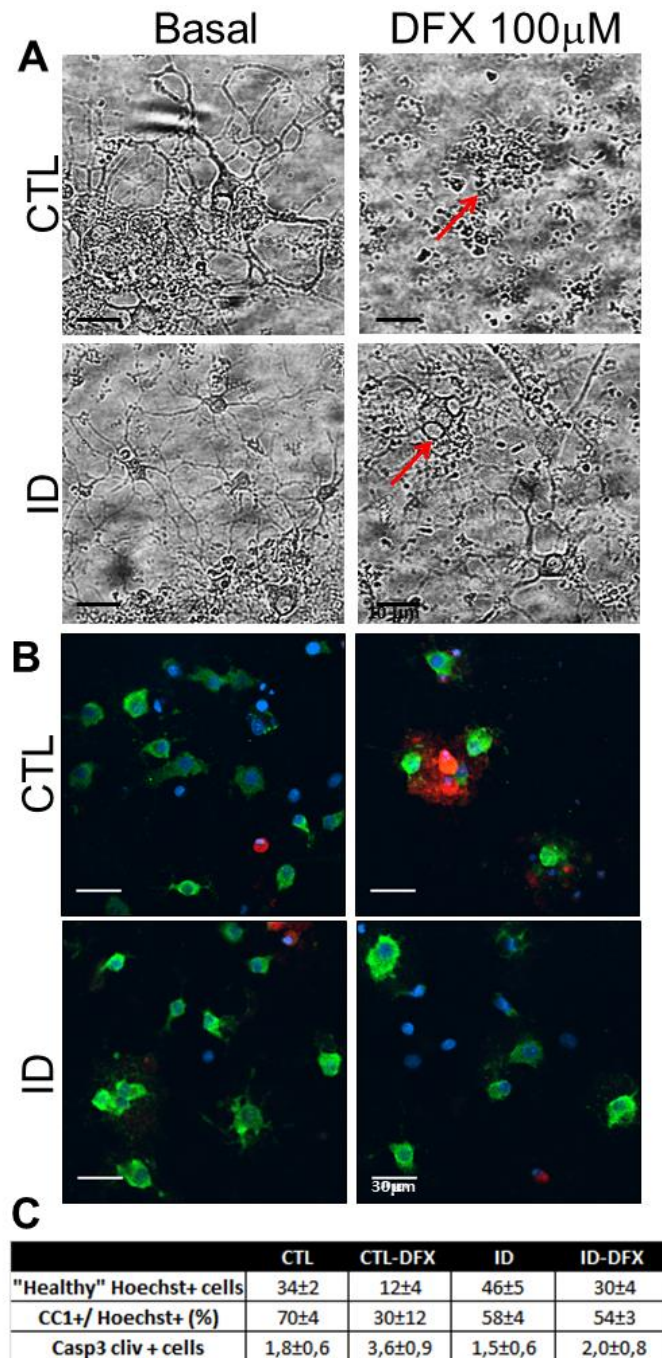




**Figura 30. La DFX afecta diferencialmente la expresión de GFAP y S100β en astrocitos de animales controles o DH. (A)** Inmunoquímica para GFAP en cultivos de astrocitos confluentes de animales DH (ID) y controles (CTL) con y sin deferoxamina (DFX) (100 µM, 24 h). **(B)** La cuantificación de la intensidad de fluorescencia (nivel medio de grises, MGUV) para GFAP y S100β, evidencia un aumento significativo de la expresión de ambas proteínas en astrocitos de animales controles tratados con DFX respecto del basal. \* test de Kruskal-Wallis y de comparaciones múltiples de Dunn p=0.0054 para GFAP y p=0.0006 para S100β. **(C)** Imágenes de fluorescencia muestran las células BrdU positivas (verdes) y ADN nuclear teñido con Hoechst en cultivos confluentes de astrocitos de animales DH (ID) o controles (CTL) con y sin DFX (100 µM, 24 h). **(D)** Cuantificación de la tasa de proliferación de astrocitos de animales controles (gráfica superior) o de animales DH (ID) (gráfica inferior) con distintas concentraciones de DFX (0, 50, 100 y 200 µM). Test estadístico de Kruskal-Wallis y de comparaciones múltiples de Dunn, \*\*\* p<0.0001, \* p<0.05.

## **7. La DFX reduce diferencialmente la sobrevida de oligodendrocitos de animales controles o DH**

En la figura 31 se observan cultivos primarios de oligodendrocitos controles y DH que a los 6 DIV fueron tratados con 100  $\mu$ M DFX durante 24 h. En el panel A se observan imágenes de microscopía de luz por contraste de fase en las cuatro condiciones, evidenciándose importante daño celular y muerte de oligodendrocitos en presencia del quelante de hierro DFX. En la figura de oligodendrocitos controles con DFX, se observan los restos celulares de un oligodendrocito muerto (flecha roja). Por su parte, en la figura de oligodendrocitos DH con DFX se observa más cantidad de células, pero algunas de ellas vacuoladas (flecha roja). En la figura 31-B se muestra la inmunocitoquímica de CC1 y caspasa 3 clivada (marcador de la vía apoptótica) y en la parte -C se muestra la cuantificación de núcleos Hoechst+ de tamaño y apariencia normal, el porcentaje de células CC1 sobre el total de núcleos viables y el número de oligodendrocitos apoptóticos (caspasa3 clivada y CC1 positivos). En la parte C, los datos de la tabla muestran que los oligodendrocitos controles en presencia de DFX reducen notablemente la viabilidad celular (alrededor del 65%), y esto podría deberse, en parte, a un mecanismo apoptótico porque se observa un incremento moderado de células con micronúcleos que expresan caspasa 3 clivada. Sin embargo, dada la muerte celular masiva observada y los detritos celulares remanentes es probable que la DFX induzca una muerte necrótica de los oligodendrocitos. Por otra parte, los oligodendrocitos de animales DH parecen tener mayor número de células viables y menor proporción de oligodendrocitos maduros CC1 positivos. Esto es compatible con hallazgos anteriores en los que se observa aumento de la proliferación de precursores de oligodendrocitos y reducción de su maduración (Badaracco et al., 2010; Rosato-Siri et al., 2018). Por último, los oligodendrocitos DH en presencia de DFX presentan una reducción del número de células viables (cerca al 35%), un porcentaje de células CC1 positivas y de células apoptóticas similar al de los oligodendrocitos DH sin DFX. Por lo tanto, los oligodendrocitos son altamente sensibles a la ausencia de hierro *in vitro*, comprometiendo su sobrevida. Sin embargo, los oligodendrocitos de animales DH son más resistentes a los efectos negativos de DFX que los oligodendrocitos de animales controles.



**Figura 31. La DFX reduce diferencialmente la sobrevivencia de oligodendrocitos controles o DH. (A)** Imágenes de microscopía de luz por contraste de fases de cultivos primarios de oligodendrocitos de animales controles (CTL) o DH (ID) con y sin DFX (100 µM, 24 h). En cultivos controles con DFX se observa una gran cantidad de células muertas, visualizándose los detritos celulares remanentes (flecha roja). En cultivos DH (ID) con DFX hay mayor cantidad de células viables en apariencia, y algunas de ellas en proceso de muerte con presencia de vacuolas intracitoplasmáticas (flecha roja). **(B)** Inmunocitoquímica para los marcadores CC1 (verde, oligodendrocitos maduros) y caspasa 3 clivada (Casp 3 cliv) (rojo, efector vía apoptótica) en oligodendrocitos DH (ID) o controles (CTL) con y sin DFX. **(C)** Tabla que muestra la cuantificación del número de núcleos Hoechst+ de forma y tamaño normales ("Healthy" Hoechst+ cells), el porcentaje de células CC1 positivas sobre el total de núcleos viables y el número de células CC1+ y -Eugenia Isasi-

Casp 3 cliv+. Los datos numéricos de la primera y tercera fila corresponden al promedio de células por campo. Los datos en todos los casos se expresan como el promedio  $\pm$  SEM.

## **DISCUSIÓN CAPÍTULO II**

El modelo de deficiencia nutricional de hierro durante la gestación y la lactancia en ratas SD, causó una anemia microcítica e hipocrómica severa en los hijos a los 14 DPN con una recuperación parcial a los 30 DPN, luego del re-establecimiento de la dieta control a partir de los 21 DPN. Por lo tanto, interpretamos que la deficiencia nutricional de hierro en la madre llevó a agotar sus reservas corporales y a disminuir el suministro de hierro a los hijos, a través del intercambio placentario y la lactancia, generando anemia severa en las crías, como se constató a los 14 DPN. Cabe destacar que nuestro modelo emplea hembras con normo hierro al momento de la concepción, comenzando a suministrar una dieta DH al día 5 de gestación, por lo que es esperable que haya una latencia entre la introducción de la dieta modificada y el inicio de la deficiencia de hierro y anemia materna. Además, se ha constatado que durante la deficiencia materna de hierro hay aumento en la expresión de transportadores de hierro placentarios, receptor de transferrina, DMT1 y ferroportina (Gambling et al., 2001), como un mecanismo de compensación para asegurar un mayor suministro de hierro a las crías. Por lo tanto, es probable que las crías sufran DH principalmente en el último tercio de la gestación y que esta deficiencia se agrave en el período postnatal durante la lactancia baja en hierro.

Nuestros datos no indican diferencias en el peso corporal o cerebral de los hijos DH respecto de los controles, cuando comparamos únicamente hijos machos a los 14 y 30 DPN. Otros autores empleando un modelo de madres anémicas que reciben dieta DH cuatro semanas antes del cruzamiento con el macho y durante toda la gestación y lactancia, observan una reducción significativa del peso corporal al día gestacional 20 y post-nacimiento a los 20 DPN y 40 DPN (Crowe et al., 1995). Consideramos que las diferencias en estos efectos se deben fundamentalmente al estado de las madres durante la concepción y la gestación temprana ya que nuestro modelo emplea madres normo hierro a las cuales se les suministra una dieta DH al día 5 de gestación donde la anemia gestacional se manifiesta más tardíamente lo que podría compensar los posibles cambios en el peso corporal de los hijos.

Nuestros resultados muestran hipomielinización en el cuerpo caloso de animales DH a los 30 DPN, evidenciado por la disminución de la tinción de lípidos con Fluoromielina y de la

inmunomarcación con PLP, así como también reducción de oligodendrocitos maduros que expresan CC1. En este sentido, PLP es importante para la compactación y estabilización de las vainas de mielina así como también cumpliría un rol en la maduración de los oligodendrocitos y en la interacción axón/oligodendrocito (Greer & Lees, 2002), por lo que su déficit implicaría alteraciones en la mielinización. La disminución de PLP en animales DH también fue reportada en el trabajo de Ortiz et al. (2004). Por otro lado, la deficiencia de oligodendrocitos maduros CC1 positivos a los 30 DPN, implicaría una alteración en la diferenciación del linaje oligodendroglial como fue previamente reportado en Morath & Mayer-Proschel (2002), Badaracco et al. (2008) y Rosato-Siri et al. (2010; 2018). Por otra parte, CC1 es una proteína que regula las propiedades adhesivas de los oligodendrocitos (Bhat et al. 1996), por lo que la disminución de CC1 podría afectar el reconocimiento oligodendrocito-axón y por ende la formación de las vainas de mielina.

Con respecto al análisis de marcadores astrocitarios en el cuerpo caloso de animales DH y controles, constatamos un aumento en la inmunomarcación de S100 $\beta$  y disminución de GFAP como fue recientemente demostrado en Rosato-Siri et al. (2018) cuantificando los niveles de ARNm en el cuerpo caloso anterior y posterior de animales DH o controles a los 35 DPN. Estos cambios en la expresión, no estarían acompañados de diferencias en la densidad de astrocitos S100 $\beta$ + o glutamina sintasa positivos, más bien con cambios de expresión a nivel de astrocitos individuales. S100 $\beta$  es un miembro de una familia de proteínas de unión al calcio que se expresa en varios tipos celulares neurales y no neurales, incluyendo astrocitos, oligodendrocitos maduros, progenitores gliales, entre otros (Donato et al., 2009). S100 $\beta$  se localiza intracelularmente en el citoplasma asociado al centrosomas, microtúbulos y filamentos intermedios tipo III (Donato, 2003) y también puede ser secretado al medio extracelular por los astrocitos (Shashoua et al., 1984; Van Eldik & Zimmer, 1987). El dímero de S100 $\beta$  es capaz de interactuar con varias proteínas blanco y así regular la proliferación, diferenciación y morfología celular, homeostasis del calcio, dinámica de los microtrúbulos y filamentos intermedios, la actividad enzimática y metabólica (Donato et al., 2009). En condiciones fisiológicas, S100 $\beta$  se encuentra a bajas concentraciones del orden nanomolar e induce la sobrevida de neuronas, estimula la proliferación astrocitaria y reduce la reactividad microglial, a través de la activación del receptor RAGE (del inglés, *Receptor for Advanced Glycation End-products*), en cambio, a niveles altos, S100 $\beta$  podría amplificar el daño celular siendo capaz de activar la microglía y favorecer la muerte neuronal (Sorci et al., 2013). Por otra parte, los

niveles de expresión de S100 $\beta$  serían muy sensibles a factores ambientales y frente a condiciones patológicas o de daño celular, aumentarían su expresión (Donato et al., 2009).

Con respecto a GFAP, observamos una disminución del área inmunopositiva para este marcador. No obstante, desconocemos si se debe a una disminución del número de astrocitos GFAP positivos o a una disminución en la expresión de esa proteína de filamentos intermedios. De forma comparable, en un modelo de estrés crónico en ratas adultas se ha reportado atrofia de los astrocitos (cantidad de procesos, ramificación y volumen), aumento de la expresión de S100 $\beta$  y disminución de astrocitos GFAP+, sin afectar la densidad de astrocitos cuantificados con Nissl o S100 $\beta$  a nivel de la corteza prefrontal (Tynan et al., 2013). Asimismo, la pérdida de GFAP y los defectos en la mielinización han sido reportados en leucoencefalopatías paradigmáticas como la *Vanishing White Matter* (Dietrich et al., 2005), indicando que la presencia de este marcador astrocitario es importante aunque los mecanismos de acción subyacentes son mayormente desconocidos. Por lo tanto, la cronicidad de nuestro modelo de deficiencia de hierro, que supone además de la falta de este oligoelemento, una deficiencia del suministro de oxígeno a los tejidos, podría causar un cambio del fenotipo astrocitario en la región analizada.

Por otra parte, los resultados en cultivos de células muestran que el medio condicionado de astrocitos primarios de animales controles y DH tienen efectos diferenciales sobre oligodendrocitos DH. En este sentido, el medio condicionado de astrocitos DH inhibiría la diferenciación de los oligodendrocitos DH respecto del medio condicionado de astrocitos controles, a través de factores solubles no identificados. Dada la multiplicidad de señales astrocitarias que regulan la supervivencia, proliferación y diferenciación de los oligodendrocitos (Moore et al., 2011), posiblemente, la falta de hierro en los astrocitos produzca alteraciones en los niveles de factores astrocitarios como PDGF-AA, LIF, BDNF o FGF-2 que juegan un papel preponderante en los efectos duales que favorecen o reprimen la mielinización tal como Moore et al. (2011) o Nash et al. (2011) proponen. Aún resta profundizar en el estudio de los mecanismos mediante los cuales los astrocitos DH pueden afectar la maduración de los oligodendrocitos DH e investigar si estos mecanismos ocurren *in vivo*.

Por otra parte, observamos un efecto diferencial de la depleción de hierro *in vitro*, con DFX, en células DH o controles. En primer lugar, corroboramos que los oligodendrocitos son células altamente dependientes del hierro para su supervivencia ya que frente a la deficiencia de hierro *in vitro* ocurre un alto porcentaje de muerte celular. En cambio, los astrocitos son más

resistentes, comprometiéndose la proliferación celular pero no la viabilidad. Además, los astrocitos controles expuestos a DFX exhiben reactividad morfológica y aumento de la expresión de GFAP y S100 $\beta$ , a diferencia de los astrocitos DH, lo que demuestra una respuesta celular diferente en células procedentes de animales DH o controles. En este sentido, Rosato-Siri et al. (2018) muestran la respuesta de astrocitos de animales controles y DH frente al tratamiento con un inductor de estrés oxidativo como el peróxido de hidrógeno, y constatan una respuesta diferente en los niveles de expresión de GFAP y S100 $\beta$  entre los cultivos controles y DH. Con respecto a los oligodendrocitos, observamos que las células de animales controles tratadas con DFX sufrieron un gran porcentaje de muerte celular, mientras que en oligodendrocitos DH el porcentaje de muerte fue sustancialmente menor, lo que demuestra una mayor resistencia de las células DH al daño ocasionado por la depleción de hierro. Una hipótesis para explicar este fenómeno es que las células de animales DH tengan basalmente una mayor expresión de transportadores de hierro como DMT-1 o receptor de transferrina que les permita incorporar más hierro aún en presencia de un quelante del hierro. En este sentido, Siddappa et al. (2003) muestran aumento en la expresión del receptor de transferrina y DMT-1 en neuronas de corteza cerebral e hipocampo a los 10 DPN procedentes de ratas que sufrieron DH durante la gestación y la lactancia. Si bien no conocemos los niveles de estas proteínas en astrocitos y oligodendrocitos de animales DH, el aumento en la expresión de estos transportadores de hierro podría ser un mecanismo que además opere en células gliales. Otra hipótesis es que frente a la falta de hierro e hipoxia prolongada, las células de animales DH tengan activados genes, por ejemplo, la vía del factor de transcripción HIF-1 y sus genes blancos: eritropoyetina, transportadores de glucosa, enzimas glucolíticas, hemooxigenasa 1, entre otros (Semenza, 1998), que favorezcan la supervivencia celular y le confieran a las células DH “resistencia” a los efectos de la depleción de *hierro in vitro*.

Por otra parte, es importante destacar las diferencias entre el modelo de depleción de hierro *in vitro* y el modelo DH en animales. En el modelo animal, hay un efecto sistémico durante la gestación y desarrollo post-natal donde se combinan la deficiencia de hierro y la hipoxia de los tejidos causada por la disminución de la hemoglobina y de glóbulos rojos. En cambio, en el *modelo in vitro*, únicamente se observa el efecto agudo de la depleción de hierro intracelular. Por lo tanto el nivel de complejidad de las interacciones celulares y de los mecanismos moleculares desencadenados por la DH en el animal es mucho mayor que el que podemos observar *in vitro* en células aisladas. No obstante, el modelo *in vitro* permite un mejor manejo de las condiciones experimentales y una profundización sobre los aspectos moleculares

involucrados en las respuestas observadas.

## **CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO II**

En suma, la DH durante el desarrollo gestacional y post-natal produce hipomielinización y defectos en la diferenciación del linaje oligodendroglial. Los astrocitos, a través de su señalización, podrían afectar la maduración de los oligodendrocitos como ocurre *in vitro*, contribuyendo a los efectos hipomielinizantes. Además, tanto los astrocitos como los oligodendrocitos de animales DH tienen diferencias fenotípicas que los hacen menos vulnerables a la carencia de hierro *in vitro* que las células de animales controles. En este sentido, el análisis transcriptómico o proteómico de los astrocitos y oligodendrocitos de animales DH y controles, permitiría conocer cuáles son las diferencias en el perfil de expresión génica y de esta forma dilucidar posibles mecanismos celulares que subyacen a la hipomielinización causada por la DH.

## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES**

En este trabajo de tesis hemos evidenciado la participación de los astrocitos en dos modelos experimentales de enfermedades del neurodesarrollo con diferentes etiologías, aportando conocimiento sobre algunos roles de los astrocitos que habían sido escasamente estudiados dado que estas células no fueron consideradas como blancos relevantes para dichas patologías. Si bien la fisiopatología en AG-I y en la hipomielinización inducida por DH durante el desarrollo es bien diferente, en ambas, hay compromiso de la sustancia blanca y afectación de los astrocitos. En este sentido, la respuesta astrocitaria es heterogénea frente a dos condiciones de daño muy diferentes entre sí, altas concentraciones de AG y deficiencia de hierro e hipoxia, pero ambas ocurren durante el periodo de máximo crecimiento y desarrollo cerebral co-existiendo con fenómenos de neurogénesis, gliogénesis, vasculogénesis y mielinización. En el caso de AG-I, trabajos anteriores de nuestro grupo mostraron que los astrocitos expuestos al AG, aumentan la proliferación celular, presentan estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, afectando la supervivencia neuronal en co-cultivos y en ensayos con medios condicionados. Los resultados de la presente tesis muestran, además, que los astrocitos tratados con AG secretan un amplio repertorio de citoquinas y factores, muchos de ellos con un rol pro-inflamatorio, que podrían afectar a células de diferentes linajes (neuronaes, gliales y vasculares).



Por otro lado, en reportes previos de nuestro grupo caracterizamos el fenotipo astrocitario en la región del estriado de animales inyectados con AG, que mostraba aumento de S100 $\beta$  y disminución de GFAP de forma similar a lo que reportamos en el cuerpo caloso de animales DH. Esto nos podría indicar que aún siendo estímulos diferentes, hay mecanismos celulares que operan de manera general. En suma, en la presente tesis hemos profundizado en el estudio del compromiso vascular en AG-I, jerarquizando el rol de los astrocitos y pericitos y su comunicación *in vitro*, además de identificar posibles efectores moleculares de dicha interacción. Por otro lado, evidenciamos cambios fenotípicos en los astrocitos de animales que sufrieron anemia ferropénica durante el desarrollo gestacional y post-natal, y comprobamos que los astrocitos DH inhiben la maduración de oligodendrocitos DH a través de factores solubles no identificados.

## PERSPECTIVAS

Con respecto a los mecanismos celulares que subyacen a las alteraciones vasculares observadas en AG-I, tanto a nivel de la BHE como en la hemodinámica, el desafío es seguir investigando cómo el AG afecta la fisiología vascular cerebral. En particular, cómo se induce la constricción capilar producida por el pericito, la cual observamos *ex vivo*. Para ello, una posibilidad es utilizar inhibidores farmacológicos, por ejemplo, el alfa-aminoadipato, como astrotoxina para inhibir el metabolismo astrocitario (Filosa et al., 2007) y observar si el efecto de contractilidad en rodajas de cerebro ocurre de la misma manera. Otra posibilidad es modular vías de señalización en el pericito, como la vía que induce contracción mediada por AA y 20-HETE, endotelina 1, tromboxano A2 o noradrenalina. *In vitro*, se podrían realizar cultivos mixtos endotelio-pericito-astrocito y evaluar contractilidad de los pericitos en respuesta al AG. También, se podría trabajar con poblaciones aisladas y probar medios condicionados cruzados. En primer lugar, pensamos que se debería analizar el efecto del medio de astrocitos AG sobre células endoteliales cerebrales, experimento que aún no hemos llevado a cabo, dada la dificultad en obtener los cultivos primarios de este linaje. En segundo lugar, pretendemos evaluar si el medio condicionado de cultivos mixtos astrocitos/endoteliales tratados con AG afectan la contractilidad de pericitos y de esta manera conocer si la señalización astrocito-endotelio interviene en la contracción de los pericitos en el contexto de AG-I. Otro aspecto interesante a evaluar refiere a conocer la contractilidad capilar en tejido de animales Gcdh -/-

con y sin exposición a lisina, que es el precursor de la síntesis de AG en la vía alterada, y la expresión de marcadores pericitarios y de podocitos astrocitarios.

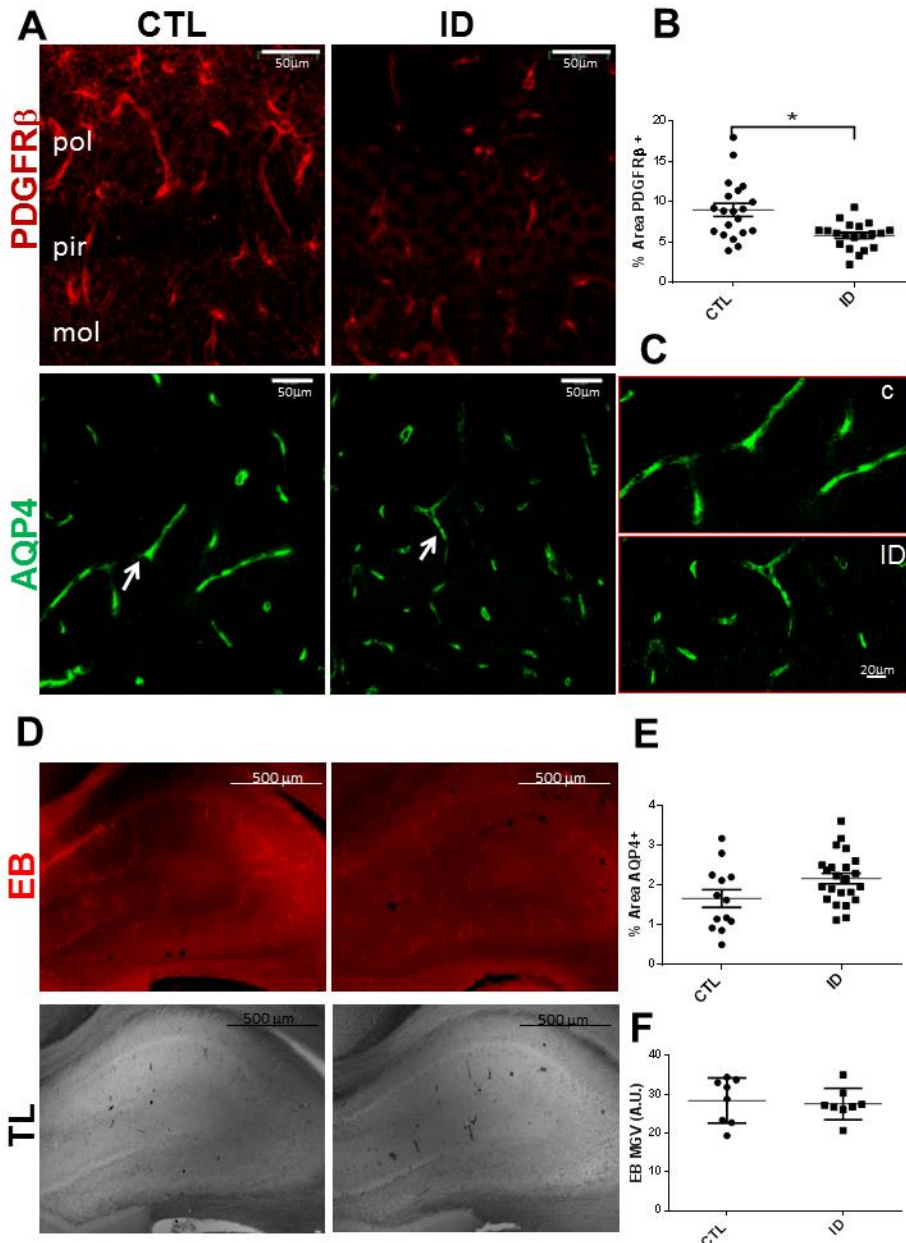
Respecto del segundo modelo, el de deficiencia nutricional de hierro durante la gestación y lactancia, si bien hemos confirmado el cambio fenotípico astrocitario y el efecto sobre oligodendrocitos *in vitro*, aún resta por identificar los componentes solubles del medio condicionado de astrocitos DH que afectan la diferenciación de los oligodendrocitos DH. Para ello, en el marco de un proyecto ANII-CONICET con el laboratorio de J. Pasquini, hemos comenzado a evaluar la expresión del ARNm de FGF-2, LIF y CNTF por RT-Real time PCR en astrocitos controles o DH, sin resultados concluyentes por el momento. Además, resta evaluar la expresión proteica de dichos marcadores así como también la de otros factores o citoquinas solubles en el medio condicionado de astrocitos DH y controles, e investigar si estos factores cambian su expresión en el tejido de los animales.

En colaboración con la Dra. Verónica Abudara también hemos comenzado el estudio de la vascularización, permeabilidad de la BHE y expresión de marcadores astrocitarios y pericitarios en el hipocampo de animales DH y controles. El hipocampo es una región cerebral muy importante para el aprendizaje y la memoria, así como también para las respuestas emocionales. Además, es una región con una gran plasticidad y alta vulnerabilidad a condiciones desfavorables durante el desarrollo como por ejemplo la DH, lo que puede desencadenar trastornos del aprendizaje, memoria y comportamiento (Carlson et al., 2007; Schachtschneider et al., 2016). Por otro lado, la DH y la anemia crónica durante el desarrollo conlleva a un estado de hipoxia tisular que puede afectar la vasculatura cerebral, aumentando la angiogénesis y/o vasculogénesis en áreas como hipocampo y corteza cerebral (Bastian et al., 2015). Sin embargo, se desconoce si este aumento de la angiogénesis/vasculogénesis se asocia con alteraciones de la BHE y defectos en la integridad de la UNV, como por ejemplo, cambios en el recubrimiento pericitario, podocitos astrocitarios o constituyentes de la lámina basal. Para evaluar parte de estas interrogantes, se analizó por inmunohistoquímica la expresión de PDGFR $\beta$ , AQP4 y laminina (no se muestra) a los 14 DPN en la región CA1 del hipocampo (Figura 32-A) y mediante perfusión con EB, se evaluó permeabilidad de la BHE a los 30 DPN (Figura 32-D). Se observó una reducción en el área inmunopositiva de PDGFR $\beta$  sin cambios para AQP4. Sin embargo, se observan perfiles microvasculares más cortos AQP4 positivos en animales DH (Figura 32-C), cuya longitud y puntos de ramificación deberán ser analizados como indicadores de angiogénesis en nuestro modelo DH. Por otra parte, el análisis de la fluorescencia emitida por EB en cortes coronales a distintos niveles incluyendo toda la región del hipocampo, no

-Eugenia Isasi-

evidenció cambios entre animales DH y controles (Figura 32-F), lo que evidenciaría que no habría alteración de la permeabilidad de la BHE a moléculas de bajo peso molecular como el EB.

*In vitro*, comenzamos a estudiar el efecto de DFX sobre cultivos de pericitos ya que existe muy poca bibliografía con respecto al efecto de la DH en este tipo celular. En suma, continuaremos con el estudio de la vascularización cerebral de los animales DH, a efectos de comprender qué cambios estructurales ocurren producto de una larga exposición a la deficiencia de hierro e hipoxia durante el desarrollo y cómo esto podría repercutir en la funcionalidad cerebral.



**Figura 32. Efectos de la DH sobre la vascularización del hipocampo. (A)** Imágenes de microscopía confocal de la región de CA1 abarcando las tres capas (pol: polimórfica, pir: piramidal y mol: molecular) que permiten observar la inmunotinción de PDGFR $\beta$  y AQP4 a los 14 DPN en animales DH (ID) y controles (CTL). **(B)** Notar la disminución de la inmunomarcación de PDGFR $\beta$  cuya reducción es estadísticamente significativa (\* t-test,  $p=0.0.0015$ ) en animales DH respecto de controles. **(C)** Los vasos marcados con AQP4 presentan segmentos visibles más cortos respecto del control. **(D)** Imágenes de epifluorescencia evidencian la fluorescencia roja emitida por el azul de Evans (EB) unido a proteínas, el cual fue perfundido intracardiácamente en animales DH (ID) y controles. **(E)** Cuantificación del área inmunopositiva de AQP4 sin diferencias significativas entre ambos grupos. **(F)** Gráfica que muestra intensidad de fluorescencia roja (MGV) emitida por EB, únicamente en la región del hipocampo de animales DH y controles, sin diferencias significativas.

## REFERENCIAS

- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7: 41–53.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010; 37:13–25.
- Aguilera KY, Brekken RA. Recruitment and retention: factors that affect pericyte migration. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(2):299-309.
- Algarín C, Peirano P, Garrido M, Pizarro F, Lozoff B. Iron deficiency anemia in infancy: long-lasting effects on auditory and visual system functioning. *Pediatr Res.* 2003; 53(2):217-23.
- Alwan NA, Hamamy H. Maternal Iron Status in Pregnancy and Long-Term Health Outcomes in the Offspring. *Pediatr Genet.* 2015; 4(2):111-23.
- Amiry-Moghaddam M, Williamson A, Palomba M, Eid T, de Lanerolle NC et al. Delayed K<sup>+</sup> clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100 (23):13615-20.
- Anderson MA, Ao Y, Sofroniew MV. Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett.* 2014; 565:23-9.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 1999;22(5):208-15.
- Argaw AT, Asp L, Zhang J, Navrazhina K, Pham T et al. Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *J Clin Invest.* 2012; 122(7):2454-68.
- Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res.* 2005; 97(6):512-23.
- Armulik A, Genove G, Mae M, Nisancioglu MH, Wallgard E et al. Pericytes regulate the blood–brain barrier. *Nature.* 2010; 468:557–61.
- Armulik A, Mäe M, Betsholtz C. Pericytes and the blood-brain barrier: recent advances and implications for the delivery of CNS therapy. *Ther Deliv.* 2011;2(4):419-22.
- Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, Macvicar BA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature.* 2010; 468(7321):232-43.
- Attwell D, Mishra A, Hall CN, O'Farrell FM, Dalkara T. What is a pericyte? *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016; 36(2):451-5.

- Back SA, Gan X, Li Y, Rosenberg PA, Volpe JJ. Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. *J Neurosci*. 1998; 18(16):6241-53.
- Back SA, Han BH, Luo NL, Chricton CA, Xanthoudakis S et al. Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia. *J Neurosci*. 2002; 22(2):455-63.
- Badaracco ME, Ortiz EH, Soto EF, Connor J, Pasquini JM. Effect of transferrin on hypomyelination induced by iron deficiency. *J Neurosci Res*. 2008; 86(12):2663-73.
- Bhat RV, Axt KJ, Fosnaugh JS, Smith KJ, Johnson KA et al. Expression of the APC tumor suppressor protein in oligodendroglia. *Glia*. 1996; 17(2):169-74.
- Bähr O, Mader I, Zschocke J, Dichgans J, Schulz JB. Adult onset glutaric aciduria type I presenting with a leukoencephalopathy. *Neurology*. 2002; 59(11):1802-4.
- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis*. 2004; 16(1):1-13.
- Baric I, Zschocke J, Christensen E, Duran M, Goodman SI, Leonard JV, Müller E, Morton DH, Superti-Furga A, Hoffmann GF. Diagnosis and management of glutaric aciduria type I. *J Inherit Metab Dis*. 1998; 21(4):326-40.
- Barkovich AJ, Kjos BO, Jackson DE Jr, Norman D. Normal maturation of the neonatal and infant brain: MR imaging at 1.5 T. *Radiology*. 1988; 166(1 Pt 1):173-80.
- Barnett SC, Linington C. Myelination: do astrocytes play a role? *Neuroscientist*. 2013; 19(5):442-50.
- Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF et al. Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*. 1992; 70(1):31-46.
- Barres BA, Raff MC. Control of oligodendrocyte number in the developing rat optic nerve. *Neuron*. 1994; 12(5):935-42.
- Barres BA. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 2008;60(3):430-40.
- Bartzokis G. Neuroglialpharmacology: myelination as a shared mechanism of action of psychotropic treatments. *Neuropharmacology*. 2012; 62(7):2137-53.
- Basinger AA, Booker JK, Frazier DM, Koeberl DD, Sullivan JA, Muenzer J. Glutaric acidemia type 1 in patients of Lumbee heritage from North Carolina. *Mol Genet Metab*. 2006; 88(1):90-2.
- Bastian TW, Santarriaga S, Nguyen TA, Prohaska JR, Georgieff MK, Anderson GW. Fetal and neonatal iron deficiency but not copper deficiency increases vascular complexity in the developing rat brain. *Nutr Neurosci*. 2015;18(8):365-75.
- Bauer J, Bradl M, Klein M, Leisser M, Deckwerth TL et al. Endoplasmic reticulum stress in PLP-overexpressing transgenic rats: gray matter oligodendrocytes are more vulnerable than white matter oligodendrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002; 61(1):12-22.

- Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev.* 2001; 81(2):871-927.
- Beard JL. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *J Nutr.* 2001; 131(2S-2):568S-579S; discussion 580S.
- Beard JL, Connor JR. Iron status and neural functioning. *Annu Rev Nutr.* 2003; 23:41-58.
- Beard J. Recent evidence from human and animal studies regarding iron status and infant development. *J Nutr.* 2007;137(2):524S-530S.
- Beauchamp MH, Boneh A, Anderson V. Cognitive, behavioural and adaptive profiles of children with glutaric aciduria type I detected through newborn screening. *J Inherit Metab Dis.* 2009; 32 Suppl 1:S207-13.
- Beydoun R, Hamood MA, Gomez Zubieta DM, Kondapalli KC. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 9 regulates iron mobilization at the blood brain barrier in response to iron starvation *J Biol Chem.* 2017; 292(10):4293-4301. Braissant O, Jafari P, Rémacle N, Cudré-Cung HP, Do Vale Pereira S. Immunolocalization of glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH) in adult and embryonic rat brain and peripheral tissues. *Neuroscience.* 2017;343:355-363.
- Bjugstad KB, Crnic LS, Goodman SI, Freed CR. Infant mice with glutaric acidemia type I have increased vulnerability to 3-nitropropionic acid toxicity. *J Inherit Metab Dis.* 2006; 29(5):612-9.
- Bonkowski D, Katyshev V, Balabanov RD, Borisov A, Dore-Duffy P. The CNS microvascular pericyte: pericyte-astrocyte crosstalk in the regulation of tissue survival. *Fluids Barriers CNS.* 2011; 8(1):8.
- Boy N, Mühlhausen C, Maier EM, Heringer J, Assmann B, et al. Proposed recommendations for diagnosing and managing individuals with glutaric aciduria type I: second revision. *J Inherit Metab Dis.* 2017; 40(1):75-101
- Bradl M, Lassmann H. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010; 119(1):37-53.
- Braissant O, Jafari P, Rémacle N, Cudré-Cung HP, Do Vale Pereira S. Immunolocalization of glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH) in adult and embryonic rat brain and peripheral tissues. *Neuroscience.* 2017; 343:355-363.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci.* 2002; 22: 183–192.
- Butt AM, Jones HC, Abbott NJ. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol.* 1990; 429:47-62.
- Butterworth RF. Altered glial-neuronal crosstalk: cornerstone in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochem Int.* 2010; 57:383–88.

- Carlson ES, Stead JD, Neal CR, Petryk A, Georgieff MK. Perinatal iron deficiency results in altered developmental expression of genes mediating energy metabolism and neuronal morphogenesis in hippocampus. *Hippocampus*. 2007;17(8):679–91.
- Cassina P, Peluffo H, Pehar M, Martinez-Palma L, Ressia A, Beckman JS, Estévez AG, Barbeito L. Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. *J Neurosci Res*. 2002; 67(1):21-9.
- Cauli B, Hamel E. Revisiting the role of neurons in neurovascular coupling. *Front Neuroenergetics* 2: 9, 2010.
- Collard KJ. Iron homeostasis in the neonate. *Pediatrics*. 2009; 123(4):1208-16.
- Connor JR, Menzies SL. Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination. *Glia*. 1996; 17(2):83-93.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*. 1990;247(4941):470-3.
- Courchesne E, Chisum HJ, Townsend J, Cowles A, Covington J et al. Normal brain development and aging: quantitative analysis at in vivo MR imaging in healthy volunteers. *Radiology*. 2000; 216(3):672-82.
- Crowe C, Dandekar P, Fox M, Dhingra K, Bennet L, Hanson MA. The effects of anaemia on heart, placenta and body weight, and blood pressure in fetal and neonatal rats. *J Physiol*. 1995; 488(Pt 2):515-9.
- Chan BS, Endo S, Kanai N, Schuster VL. Identification of lactate as a driving force for prostanoid transport by prostaglandin transporter PGT. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002; 282(6):F1097-102.
- Chapouly C, Tadesse Argaw A, Horng S, Castro K, Zhang J et al. Astrocytic TYMP and VEGFA drive blood-brain barrier opening in inflammatory central nervous system lesions. *Brain*. 2015; 138(Pt 6):1548-67.
- Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sanderson MJ. Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron*. 1991;6(6):983-92.
- Chifman J, Laubenbacher R, Torti SV. A systems biology approach to iron metabolism. *Adv Exp Med Biol*. 2014; 844:201-25.
- Cho HJ, Kuo AM, Bertrand L, Toborek M. HIV Alters Gap Junction-Mediated Intercellular Communication in Human Brain Pericytes. *Front Mol Neurosci*. 2017; 10:410.
- Christensen E, Ribes A, Merinero B, Zschocke J. Correlation of genotype and phenotype in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 2004; 27(6):861-8.
- Chugani HT, Hovda DA, Villablanca JR, Phelps ME, Xu WF. Metabolic maturation of the brain: a study of local cerebral glucose utilization in the developing cat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1991; 11(1):35-47.



- Chugani HT, Phelps ME. Imaging human brain development with positron emission tomography. *J Nucl Med.* 1991; 32(1):23-6.
- Das AM, Lucke T, Ullrich K, Glutaric aciduria I: creatine supplementation restores creatinephosphate levels in mixed cortex cells from rat incubated with 3-hydroxyglutarate. *Mol. Genet. Metab.* 2003; 78: 108–111.
- da Costa Ferreira G, Schuck PF, Viegas CM, Tonin A, Ribeiro CA et al. Chronic early postnatal glutaric acid administration causes cognitive deficits in the water maze. *Behav Brain Res.* 2008; 187(2):411-6
- Daher R, Karim Z. Iron metabolism: State of the art. *Transfus Clin Biol.* 2017; 24(3):115-119.
- Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature.* 2010; 468:562–566.
- Davis GE, Senger DR. Extracellular matrix mediates a molecular balance between vascular morphogenesis and regression. *Curr Opin Hematol.* 2008; 15(3):197-203.
- Dawson MR, Polito A, Levine JM, Reynolds R. NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol Cell Neurosci.* 2003; 24: 476–488.
- De Bock M, Van Haver V, Vandenbroucke RE, Decrock E, Wang N, Leybaert L. Into rather unexplored terrain—transcellular transport across the blood–brain barrier. *Glia* 2016; 64:1097–1123.
- De Keyser J, Mostert JP, Koch MW. Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. *J Neurol Sci.* 2008; 267(1-2):3-16.
- de Mello CF, Kölker S, Ahlemeyer B, de Souza FR, Figuera MR et al. Intrastratial administration of 3-hydroxyglutaric acid induces convulsions and striatal lesions in rats. *Brain Res.* 2001; 916(1-2):70-5.
- del Valle J, Camins A, Pallàs M, Vilaplana J, Pelegrí C. A new method for determining blood–brain barrier integrity based on intracardiac perfusion of an Evans Blue–Hoechst cocktail. *J Neurosci Methods.* 2008; 174:42–49.
- Dente CJ, Steffes CP, Speyer C, Tyburski JG. Pericytes augment the capillary barrier in in vitro cocultures. *J Surg Res.* 2001 May 1;97(1):85-91.
- de Oliveira Marques F, Hagen ME, Pederzoli CD, Sgaravatti AM, Durigon K et al. Glutaric acid induces oxidative stress in brain of young rats. *Brain Res.* 2003; 964(1):153-8.
- di Nicola M, Barteselli G, Dell'Arti L, Ratiglia R, Viola F. Functional and Structural Abnormalities in Deferoxamine Retinopathy: A Review of the Literature. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:249617.
- Dietrich J, Lacagnina M, Gass D, Richfield E, Mayer-Pröschel M et al. EIF2B5 mutations compromise GFAP+ astrocyte generation in vanishing white matter leukodystrophy. *Nat Med.* 2005; 11(3):277-83.

- Dodge AB, Hechtman HB, Shepro D. Microvascular endothelial-derived autacoids regulate pericyte contractility. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1991; 18(3):180-8.
- Donato R, Sorci G, RiuZZi F, Arcuri C, Bianchi R et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1793(6):1008-22.
- Dong XX, Wang Y, Qin ZH. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin*. 2009; 30(4):379-87.
- Dore-Duffy P, Katychev A, Wang X, Van Buren E. CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006; 26(5):613-24.
- Dore-Duffy P. Pericytes: pluripotent cells of the blood brain barrier. *Curr Pharm Des*. 2008; 14(16):1581-93.
- Dore-Duffy P, LaManna JC. Physiologic angiodynamics in the brain. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9(9):1363-71.
- Dringen R, Bishop GM, Koeppe M, Dang TN, Robinson SR. The pivotal role of astrocytes in the metabolism of iron in the brain. *Neurochem Res*. 2007; 32(11):1884-90.
- Dugas JC, Mandemakers W, Rogers M, Ibrahim A, Daneman R, Barres BA. A novel purification method for CNS projection neurons leads to the identification of brain vascular cells as a source of trophic support for corticospinal motor neurons. *J Neurosci*. 2008; 28(33):8294-305.
- du Moulin M, Thies B, Blohm M, Oh J, Kemper MJ et al. Glutaric Aciduria Type 1 and Acute Renal Failure: Case Report and Suggested Pathomechanisms. *JIMD Rep*. 2017 Jul 12. doi: 10.1007/8904\_2017\_44. [Epub ahead of print]
- Dusek P, Jankovic J, Le W. Iron dysregulation in movement disorders. *Neurobiol Dis*. 2012; 46(1):1-18.
- Engelhardt B, Sorokin L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol*. 2009;31(4):497-511.
- Escobar Cabrera OE, Bongarzone ER, Soto EF, Pasquini JM. Single intracerebral injection of apotransferrin in young rats induces increased myelination. *Dev Neurosci*. 1994; 16(5-6):248-54.
- Felt BT, Lozoff B. Brain iron and behavior of rats are not normalized by treatment of iron deficiency anemia during early development. *J Nutr*. 1996;126(3):693-701.
- Fergus A, Lee KS. Regulation of cerebral microvessels by glutamatergic mechanisms. *Brain Res*. 1997; 754(1-2):35-45.
- Fernández-Klett F, Offenhauser N, Dirnagl U, Priller J, Lindauer U. Pericytes in capillaries are contractile in vivo, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A*. 2010; 107:22290–22295.

- Ferreira Gda C, Viegas CM, Schuck PF, Tonin A, Ribeiro CA et al. Glutaric acid administration impairs energy metabolism in midbrain and skeletal muscle of young rats. *Neurochem Res.* 2005; 30(9):1123-31.
- Fields RD. Change in the brain's white matter. *Science.* 2010; 330(6005):768-9.
- Fields RD. A new mechanism of nervous system plasticity: activity-dependent myelination. *Nat Rev Neurosci.* 2015; 16(12):756-67.
- Filosa JA, Nelson MT, Gonzalez Bosc LV. Activity-dependent NFATc3 nuclear accumulation in pericytes from cortical parenchymal microvessels. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 293(6):C1797-805.
- Filosa JA, Morrison HW, Iddings JA, Du W, Kim KJ. Beyond neurovascular coupling, role of astrocytes in the regulation of vascular tone. *Neuroscience.* 2016;323:96-109.
- Fornari E, Knyazeva MG, Meuli R, Maeder P. Myelination shapes functional activity in the developing brain. *Neuroimage.* 2007; 38(3):511-8.
- Frank RN, Dutta S, Mancini MA. Pericyte coverage is greater in the retinal than in the cerebral capillaries of the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1987;28(7):1086-91.
- Freret T, Valable S, Chazalviel L, Saulnier R, Mackenzie ET et al. Delayed administration of deferoxamine reduces brain damage and promotes functional recovery after transient focal cerebral ischemia in the rat. *Eur J Neurosci.* 2006;23(7):1757-65.
- Freudenberg F, Lukacs Z, Ullrich K. 3-Hydroxyglutaric acid fails to affect the viability of primary neuronal rat cells. *Neurobiol Dis.* 2004; 16(3):581-4.
- Friedrich JR, Friedrich BK. Prophylactic Iron Supplementation in Pregnancy: A Controversial Issue. *Biochem Insights.* 2017; 10:1178626417737738.
- Funk CB, Prasad AN, Frosk P, Sauer S, Kolker S et al. Neuropathological, biochemical and molecular findings in a glutaric academia type 1 cohort. *Brain.* 2005; 128:711–22.
- Gambling L, Danzeisen R, Gair S, Lea RG, Charania Z, et al. Effect of iron deficiency on placental transfer of iron and expression of iron transport proteins in vivo and in vitro. *Biochem J.* 2001; 356(Pt 3):883-9.
- Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and disorders of iron metabolism. *Annu Rev Med.* 2011; 62:347-60.
- Gelman N, Gorell JM, Barker PB, Savage RM, Spickler EM et al. MR imaging of human brain at 3.0 T: preliminary report on transverse relaxation rates and relation to estimated iron content. *Radiology.* 1999;210(3):759-67.
- Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol.* 2003; 161(6):1163-77.
- Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci* 11: 87–99, 2010.
- Giaume C, Liu X. From a glial syncytium to a more restricted and specific glial networking. *J Physiol Paris.* 2012; 106(1-2):34-9.

- Girouard H, Bonev AD, Hannah RM, Meredith A, Aldrich RW, Nelson MT. Astrocytic endfoot Ca<sup>2+</sup> and BK channels determine both arteriolar dilation and constriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(8):3811-6..
- Gitiaux C, Roze E, Kinugawa K, Flamand-Rouvière C, Boddaert N et al. Spectrum of movement disorders associated with glutaric aciduria type 1: a study of 16 patients. *Mov Disord*. 2008; 23(16):2392-7.
- Gogtay N, Nugent TF, Herman DH, Ordonez A, Greenstein D et al. Dynamic mapping of normal human hippocampal development. *Hippocampus*. 2006; 16(8):664-72.
- Goodman SI, Markey SP, Moe PG, Miles BS, Teng CC. Glutaric aciduria; a "new" disorder of amino acid metabolism. *Biochem Med*. 1975; 12(1):12-21.
- Goodman SI, Stein DE, Schlesinger S, Christensen E, Schwartz M et al. Glutaryl-CoA dehydrogenase mutations in glutaric acidemia (type I): review and report of thirty novel mutations. *Hum Mutat*. 1998; 12(3):141-4.
- Gordon GR, Choi HB, Rungta RL, Ellis-Davies GC, MacVicar BA. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature*. 2008; 456(7223):745-9.
- Gould IG, Tsai P, Kleinfeld D, Linninger A. The capillary bed offers the largest hemodynamic resistance to the cortical blood supply. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017 Jan;37(1):52-68. Epub 2016 Oct 10.
- Grantham-McGregor S, Ani C. A review of studies on the effect of iron deficiency on cognitive development in children. *J Nutr*. 2001;131(2S-2):649S-666S.
- Greer JM, Lees MB. Myelin proteolipid protein--the first 50 years. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002; 34(3):211-5.
- Greenberg CR, Reimer D, Singal R, Triggs-Raine B, Chudley AE et al. A G-to-T transversion at the +5 position of intron 1 in the glutaryl CoA dehydrogenase gene is associated with the Island Lake variant of glutaric acidemia type I. *Hum Mol Genet*. 1995; 4(3):493-5.
- Guo S, Frazer DM, Anderson GJ. Iron homeostasis: transport, metabolism, and regulation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2016; 19(4):276-81.
- Haberle J, Shahbeck N, Ibrahim K et al. Natural course of glutamine synthetase deficiency in a 3 year old patient. *Mol Genet Metab*. 2011; 103(1):89-91.
- Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*. 2014; 508(7494):55-60.
- Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med*. 2007;13(2):54-63.
- Hamby ME, Coppola G, Ao Y, Geschwind DH, Khakh BS, et al. Inflammatory mediators alter the astrocyte transcriptome and calcium signaling elicited by multiple G-protein-coupled receptors. *J Neurosci*. 2012;32(42):14489-510.

- Hamel E. Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J Appl Physiol* (1985) 2006;100(3):1059-64.
- Hamilton NB, Attwell D, Hall CN. Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. *Front. Neuroenergetics*. 2010; 2:5.
- Harting I, Neumaier-Probst E, Seitz A, Maier EM, Assmann B et al. Dynamic changes of striatal and extrastriatal abnormalities in glutaric aciduria type I. *Brain*. 2009; 132(Pt 7):1764-82.
- Hartmann DA, Underly RG, Grant RI, Watson AN, Lindner V. et al. Pericyte structure and distribution in the cerebral cortex revealed by high-resolution imaging of transgenic mice. *Neurophotonics*. 2015; 2(4):041402.
- Haseloff RF, Blasig IE, Bauer HC, Bauer H. In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol*. 2005; 25(1):25-39.
- Haworth JC, Dilling LA, Seargeant LE. Increased prevalence of hereditary metabolic diseases among native Indians in Manitoba and northwestern Ontario. *CMAJ*. 1991; 145(2):123-9.
- Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*. 2005; 57(2):173-85.
- Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*. 1999; 126(14):3047-55.
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*. 2010; 142(1):24-38.
- Herculano-Houzel S. The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia*. 2014; 62:1377-91.
- Herskovitz M, Goldsher D, Sela BA, Mandel H. Subependymal mass lesions and peripheral polyneuropathy in adult-onset glutaric aciduria type I. *Neurology*. 2013; 81(9):849-50.
- Heyes MP. Hypothesis: a role for quinolinic acid in the neuropathology of glutaric aciduria type I. *Can J Neurol Sci*. 1987; 14(3 Suppl):441-3.
- Hill RA, Tong L, Yuan P, Murikinati S, Gupta S, et al. Regional Blood Flow in the Normal and Ischemic Brain Is Controlled by Arteriolar Smooth Muscle Cell Contractility and Not by Capillary Pericytes. *Neuron*. 2015;87(1):95-110.
- Hirrlinger PG, Pannicke T, Winkler U, Claudepierre T, Varshney S et al. Genetic deletion of laminin isoforms  $\beta 2$  and  $\gamma 3$  induces a reduction in Kir4.1 and aquaporin-4 expression and function in the retina. *PLoS One*. 2011; 6(1):e16106.
- Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res*;32(4):687-98.

- Hudetz AG. Blood flow in the cerebral capillary network: a review emphasizing observations with intravital microscopy. *Microcirculation*. 1997; 4(2):233-52.
- Hoepken HH, Korten T, Robinson SR, Dringen R. Iron accumulation, iron-mediated toxicity and altered levels of ferritin and transferrin receptor in cultured astrocytes during incubation with ferric ammonium citrate. *J Neurochem*. 2004; 88(5):1194-202.
- Hoffmann GF, Athanassopoulos S, Burlina AB, Duran M, de Klerk JB et al. Clinical course, early diagnosis, treatment, and prevention of disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neuropediatrics*. 1996; 27(3):115-23.
- Iadecola C, Nedergaard M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci*. 2007; 10(11):1369-76.
- Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid  $\beta$ . *Sci Transl Med*. 2012; 4(147):147ra111.
- Isasi E, Barbeito L, Olivera-Bravo S. Increased blood–brain barrier permeability and alterations in perivascular astrocytes and pericytes induced by intracisternal glutaric acid. *Fluids Barriers CNS*. 2014; 11: 15.
- Ishibashi T, Dakin KA, Stevens B, Lee PR, Kozlov SV, Stewart CL, Fields RD. Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron*. 2006; 49(6):823-32.
- Jafari P, Braissant O, Bonafé L, Ballhausen D. The unsolved puzzle of neuropathogenesis in glutaric aciduria type I. *Mol Genet Metab*. 2011; 104(4):425-37.
- Jafari P, Braissant O, Zavadakova P, Henry H, Bonafé L, Ballhausen D. Ammonium accumulation and cell death in a rat 3D brain cell model of glutaric aciduria type I. *PLoS One*. 2013; 8(1):e53735.
- Jakovcevski I, Filipovic R, Mo Z, Rakic S, Zecevic N. Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Front Neuroanat*. 2009; 3:5.
- Jansson D, Rustenhoven J, Feng S, Hurley D, Oldfield RL et al. A role for human brain pericytes in neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2014; 11:104.
- Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G. Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia*. 1998; 23(1):1-10.
- Kawamura H, Sugiyama T, Wu DM, Kobayashi M, Yamanishi S et al. ATP: a vasoactive signal in the pericyte-containing microvasculature of the rat retina. *J Physiol*. 2003; 551(Pt 3):787-99.

- Keirstead HS, Levine JM, Blakemore WF. Response of the oligodendrocyte progenitor cell population (defined by NG2 labelling) to demyelination of the adult spinal cord. *Glia*. 1998 Feb;22(2):161-70.
- Kelley C, D'Amore P, Hechtman HB, Shepro D. Vasoactive hormones and cAMP affect pericyte contraction and stress fibres in vitro. *J Muscle Res Cell Motil*. 1998; 9(2):184-194.
- Kessarlis N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci*. 2006; 9(2):173-9.
- Keyser B, Glatzel M, Stellmer F, Kortmann B, Lukacs Z et al. Transport and distribution of 3-hydroxyglutaric acid before and during induced encephalopathic crises in a mouse model of glutaric aciduria type 1. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1782(6):385-90.
- Khakh B & Sofroniew M. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat Neurosci*. 2015; 18(7):942-52.
- Knapp JF, Soden SE, Dasouki MJ, Walsh IR. A 9-month-old baby with subdural hematomas, retinal hemorrhages, and developmental delay. *Pediatr Emerg Care*. 2002; 18(1):44-7.
- Knickmeyer RC, Gouttard S, Kang C, Evans D, Wilber K et al. A structural MRI study of human brain development from birth to 2 years. *J Neurosci*. 2008; 28(47):12176-82.
- Koehler RC, Roman RJ, Harder DR. Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci*. 2009; 32(3):160-169.
- Koeller DM, Woontner M, Crnic LS, Kleinschmidt-DeMasters B, Stephens J et al. Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I. *Hum Mol Genet*. 2002; 11(4):347-57.
- Koeller DM, Sauer S, Wajner M, de Mello CF, Goodman SI et al. Animal models for glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 2004; 27(6):813-8.
- Kofuji P, Newman EA. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*. 2004; 129(4):1045-56.
- Kokovay E, Li L, Cunningham LA. Angiogenic recruitment of pericytes from bone marrow after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006; 26(4):545-55.
- Kölker S, Ahlemeyer B, Krieglstein J, Hoffmann GF. 3-Hydroxyglutaric and glutaric acids are neurotoxic through NMDA receptors in vitro. *J Inherit Metab Dis*. 1999;22(3):259-62.
- Kölker S, Ahlemeyer B, Krieglstein J, Hoffmann GF. Cerebral organic acid disorders induce neuronal damage via excitotoxic organic acids in vitro. *Amino Acids*. 2000; 18(1):31-40.
- Kölker S, Ramaekers VT, Zschocke J, Hoffmann GF. Acute encephalopathy despite early therapy in a patient with homozygosity for E365K in the glutaryl-coenzyme A dehydrogenase gene. *J Pediatr*. 2001; 138(2):277-9.
- Kölker S, Pawlak V, Ahlemeyer B, Okun JG, Hörster F et al. NMDA receptor activation and respiratory chain complex V inhibition contribute to neurodegeneration in d-2-hydroxyglutaric aciduria. *Eur J Neurosci*. 2002; 16(1):21-8.

- Kölker S, Hoffmann GF, Schor DS, Feyh P, Wagner L et al. Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency: region-specific analysis of organic acids and acylcarnitines in post mortem brain predicts vulnerability of the putamen. *Neuropediatrics*. 2003;34(5):253-60.
- Kölker S, Christensen E, Leonard JV, Greenberg CR, Boneh A, et al. Diagnosis and management of glutaric aciduria type I—revised recommendations. *J Inherit Metab Dis*. 2011; 34:677–94.
- Kölker S, Valayannopoulos V, Burlina AB, Sykut-Cegielska J, Wijburg FA et al. The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea cycle disorders. Part 2: the evolving clinical phenotype. *J Inherit Metab Dis*. 2015; 38(6):1059-74.
- Komatsuzaki S, Ediga RD, Okun JG, Kölker S, Sauer SW. Impairment of astrocytic glutaminolysis in glutaric aciduria type I. *J Inherit Metab Dis*. 2018; 41(1):91-99.
- Krueger M, Bechmann I. CNS pericytes: concepts, misconceptions, and a way out. *Glia*. 2010; 58:1–10.
- Külkens S, Harting I, Sauer S, Zschocke J, Hoffmann GF et al. (2005) Late-onset neurologic disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neurol* 64:142-2144.
- Lagranha VL, Matte U, de Carvalho TG, Seminotti B, Pereira CC et al. Increased glutamate receptor and transporter expression in the cerebral cortex and striatum of *gcdn*<sup>-/-</sup> mice: possible implications for the neuropathology of glutaric acidemia type I. *PLoS One*. 2014; 9(3):e90477.
- Lai CH, Kuo KH. The critical component to establish in vitro BBB model: Pericyte. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005; 50(2):258-65.
- Lamp J, Keyser B, Koeller DM, Ullrich K, Bräulke T, Mühlhausen C. Glutaric aciduria type 1 metabolites impair the succinate transport from astrocytic to neuronal cells. *J Biol Chem*. 2011; 286(20):17777-84.
- Larkin EC & Rao GA. Importance of fetal and neonatal iron: adequacy for normal development of central nervous system. En: *Brain, Behavior and Iron in the Infant Diet* (Dobbing, J., ed.), pp. 43–63. Springer-Verlag, London, UK.
- Latini A, Ferreira GC, Scussiato K, Schuck PF, Solano AF et al. Induction of oxidative stress by chronic and acute glutaric acid administration to rats. *Cell Mol Neurobiol*. 2007; 27(4):423-38.
- Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH et al. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*. 2012; 487(7408):443-8.
- Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci*. 1995; 15(3 Pt 1):1835-53.
- Le Vine SM1, Macklin WB. Iron-enriched oligodendrocytes: a reexamination of their spatial distribution. *J Neurosci Res*. 1990; 26(4):508-12.



- Li AF, Sato T, Haimovici R, Okamoto T, Roy S. High glucose alters connexin 43 expression and gap junction intercellular communication activity in retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44(12):5376-82.
- Lima TT, Begnini J, de Bastiani J, Fialho DB, Jurach A, et al. Pharmacological evidence for GABAergic and glutamatergic involvement in the convulsant and behavioral effects of glutaric acid. *Brain Res.* 1998; 802(1-2):55-60.
- Lindhahl P, Johansson BR, Levéen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science.* 1997; 277(5323):242-5.
- Lindner M, Kölker S, Schulze A, Christensen E, Greenberg CR, Hoffmann GF. Neonatal screening for glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 2004; 27(6):851-9.
- Lipkin PH, Roe CR, Goodman SI, Batshaw ML. A case of glutaric acidemia type I: effect of riboflavin and carnitine. *J Pediatr.* 1988;112(1):62-5.
- Loeber JG, Burgard P, Cornel MC, Rigter T, Weinreich SS et al. Newborn screening programmes in Europe; arguments and efforts regarding harmonization. Part 1. From blood spot to screening result. *J Inherit Metab Dis.* 2012; 35(4):603-11.
- Lozoff B, Georgieff MK. Iron deficiency and brain development. *Semin Pediatr Neurol.* 2006; 13(3):158-65.
- Lozoff B, Beard J, Connor J, Barbara F, Georgieff M, Schallert T. Long-lasting neural and behavioral effects of iron deficiency in infancy. *Nutr Rev.* 2006; 64(5 Pt 2):S34-43; discussion S72-91.
- Luissint AC, Artus C, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud PO: Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids and barriers of the CNS* 2012, 9:23.
- Lund TM, Christensen E, Kristensen AS, Schousboe A, Lund AM. On the neurotoxicity of glutaric, 3-hydroxyglutaric, and trans-glutaconic acids in glutaric acidemia type 1. *J Neurosci Res.* 2004; 77(1):143-7.
- Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, Shulman RG. Energy on demand. *Science.* 1999; 283(5401):496-7.
- Maier O, Hoekstra D, Baron W. Polarity development in oligodendrocytes: sorting and trafficking of myelin components. *J Mol Neurosci.* 2008; 35(1):35-53. Marín-Padilla, 2012
- Maragakis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 2006; 2(12):679-89.
- Marín-Padilla M. The human brain intracerebral microvascular system: development and structure. *Front Neuroanat.* 2012; 6:38.
- Mark KS, Davis TP. Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 282(4):H1485-94.

- Markhotina N, Liu GJ, Martin DK. Contractility of retinal pericytes grown on silicone elastomer substrates is through a protein kinase A-mediated intracellular pathway in response to vasoactive peptides. *IET Nanobiotechnol.* 2007; 1(3):44-51.
- Mathiisen TM, Lehre KP, Danbolt NC, Ottersen OP. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia.* 2010; 58(9):1094-103.
- Matsugi T, Chen Q, Anderson DR. Adenosine-induced relaxation of cultured bovine retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997; 38(13):2695-701.
- Morath DJ, Mayer-Pröschel M. Iron deficiency during embryogenesis and consequences for oligodendrocyte generation in vivo. *Dev Neurosci.* 2002; 24(2-3):197-207.
- McCann JC, Ames BN. An overview of evidence for a causal relation between iron deficiency during development and deficits in cognitive or behavioral function. *Am J Clin Nutr.* 2007;85(4):931-45.
- McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol.* 1980; 85(3):890-902.
- McCarthy RC, Kosman DJ. Mechanisms and regulation of iron trafficking across the capillary endothelial cells of the blood-brain barrier. *Front Mol Neurosci.* 2015; 8:31.
- McEwen B. Development of the cerebral cortex: XIII. Stress and brain development: II. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 1999;38(1):101-3. No abstract available.
- McLean E, Cogswell M, Egli I, Wojdyla D, de Benoist B. Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993-2005. *Public Health Nutr.* 2009; 12(4):444-54.
- McTigue DM, Tripathi RB. The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *J Neurochem.* 2008; 107(1):1-19.
- Messing A, Brenner M, Feany MB, Nedergaard M, Goldman JE. Alexander disease. *J Neurosci.* 2012; 32(15):5017-23.
- Mi H, Haeberle H, Barres BA. Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *J Neurosci.* 2001;21(5):1538-47.
- Mishra A, Hamid A, Newman EA. Oxygen modulation of neurovascular coupling in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(43):17827-31.
- Mishra A, O'Farrell FM, Reynell C, Hamilton NB, Hall CN, Attwell D. Imaging pericytes and capillary diameter in brain slices and isolated retinae. *Nat Protoc.* 2014;9(2):323-36.
- Mishra A, Reynolds JP, Chen Y, Gourine AV, Rusakov DA, Attwell D. Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles. *Nat Neurosci.* 2016; 19(12):1619-1627.
- Mishra A. Binaural blood flow control by astrocytes: listening to synapses and the vasculature. *J Physiol.* 2017;595(6):1885-1902.

- Miyajima H. Aceruloplasminemia. *Neuropathology*. 2015 Feb;35(1):83-90. doi: 10.1111/neup.12149. Epub 2014 Aug 28.
- Monavari AA, Naughten ER. Prevention of cerebral palsy in glutaric aciduria type 1 by dietary management. *Arch Dis Child*. 2000 Jan;82(1):67-70.
- Moore CS, Abdullah SL, Brown A, Arulpragasam A, Crocker SJ. How factors secreted from astrocytes impact myelin repair. *J Neurosci Res*. 2011; 89(1):13-21.
- Morton DH, Bennett MJ, Seargeant LE, Nichter CA, Kelley RI. Glutaric aciduria type I: a common cause of episodic encephalopathy and spastic paralysis in the Amish of Lancaster County, Pennsylvania. *Am J Med Genet*. 1991; 41(1):89-95.
- Mühlhausen C, Ergün S, Strauss KA, Koeller DM, Crnic L et al. Vascular dysfunction as an additional pathomechanism in glutaric aciduria type I. *J Inherit Metab Dis*. 2004; 27(6):829-34.
- Mühlhausen C, Ott N, Chalajour F, Tilki D, Freudenberg F et al. Endothelial effects of 3-hydroxyglutaric acid: implications for glutaric aciduria type I. *Pediatr Res*. 2006; 59(2):196-202.
- Mühlhausen C, Burckhardt BC, Hagos Y, Burckhardt G, Keyser B et al. Membrane translocation of glutaric acid and its derivatives. *J Inherit Metab Dis*. 2008; 31(2):188-93.
- Mulligan SJ, MacVicar BA. Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature*. 2004 Sep 9;431(7005):195-9.
- Nagelhus EA, Ottersen OP. Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiol Rev*. 2013; 93(4):1543-62.
- Nagy JI, Patel D, Ochalski PA, Stelmack GL. Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance. *Neuroscience*. 1999; 88(2):447-68.
- Nash B, Thomson CE, Lington C, Arthur AT, McClure JD, McBride MW, Barnett SC. Functional duality of astrocytes in myelination. *J Neurosci*. 2011; 31(37):13028-38.
- Nedergaard M. Neuroscience. Garbage truck of the brain. *Science*. 2013; 340(6140):1529-30.
- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, et al. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004; 306(5704):2090-3.
- Neumaier-Probst E, Harting I, Seitz A, Ding C, Kolker S. Neuroradiological findings in glutaric aciduria type I (glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency). *J Inherit Metab Dis*. 2004; 27(6):869-76.
- Nicolas G, Pottier C, Charbonnier C, Guyant-Maréchal L, Le Ber I et al. Phenotypic spectrum of probable and genetically-confirmed idiopathic basal ganglia calcification. *Brain*. 2013; 136(Pt 11):3395-407.

- Nicolay DJ, Doucette JR, Nazarali AJ. Transcriptional control of oligodendrogenesis. *Glia*. 2007; 55(13):1287-99.
- Noble M, Murray K. Purified astrocytes promote the in vitro division of a bipotential glial progenitor cell. *EMBO J*. 1984; 3(10):2243-7.
- Noble M, Mayer-Pröschel M, Pröschel C. Redox regulation of precursor cell function: insights and paradoxes. *Antioxid Redox Signal*. 2005; 7(11-12):1456-67.
- Noell S, Wolburg-Buchholz K, Mack AF, Beedle AM, Satz JS et al. Evidence for a role of dystroglycan regulating the membrane architecture of astroglial endfeet. *Eur J Neurosci*. 2011; 33(12):2179-86.
- Numasawa-Kuroiwa Y, Okada Y, Shibata S, Kishi N, Akamatsu W et al. Involvement of ER stress in dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher Disease with PLP1 missense mutations shown by iPSC-derived oligodendrocytes. *Stem Cell Reports*. 2014; 2(5):648-61.
- Oberheim NA, Takano T, Han X, He W, Lin JH et al. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci*. 2009; 29(10):3276-87.
- Occhipinti R, Somersalo E, Calvetti D. Astrocytes as the glucose shunt for glutamatergic neurons at high activity: an in silico study. *J Neurophysiol*. 2009; 101(5):2528-38.
- Oide T, Yoshida K, Kaneko K, Ohta M, Arima K. Iron overload and antioxidative role of perivascular astrocytes in aceruloplasminemia. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2006; 32(2):170-6.
- Olivera S, Fernandez A, Latini A, Rosillo JC, Casanova G, et al. Astrocytic proliferation and mitochondrial dysfunction induced by accumulated glutaric acidemia I (GAI) metabolites: possible implications for GAI pathogenesis. *Neurobiol Dis*. 2008; 32: 528–34.
- Olivera-Bravo S, Fernández A, Sarlabós MN, Rosillo JC, Casanova G et al. Neonatal astrocyte damage is sufficient to trigger progressive striatal degeneration in a rat model of glutaric acidemia-I. *PlosOne*. 2011; 6:e20831-20840.
- Olivera-Bravo S, Isasi E, Fernández A, Rosillo JC, Jiménez M et al. White matter injury induced by perinatal exposure to glutaric acid. *Neurotox Res*. 2014; 25(4):381-91.
- Olivera-Bravo S, Ribeiro CA, Isasi E, Trías E, Leipnitz G et al. Striatal neuronal death mediated by astrocytes from the Gcdh<sup>-/-</sup> mouse model of glutaric acidemia type I. *Hum Mol Genet*. 2015; 24(16):4504-15.
- Olivera-Bravo S, Barbeito L. A role of astrocytes in mediating postnatal neurodegeneration in Glutaric acidemia-type 1. *FEBS Lett*. 2015; 589(22):3492-7.
- Olivera-Bravo S, Isasi E, Fernández A, Casanova G, Rosillo JC, Barbeito L. Astrocyte Dysfunction in Developmental Neurometabolic Diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 949:227-43.
- Ortiz E, Pasquini JM, Thompson K, Felt B, Butkus G, Beard J, Connor JR. Effect of manipulation of iron storage, transport, or availability on myelin composition and brain iron content in three different animal models. *Neurosci Res*. 2004; 77(5):681-9.

- Pajor AM, Gangula R, Yao X. Cloning and functional characterization of a high-affinity Na(+)/dicarboxylate cotransporter from mouse brain. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 280(5):C1215-23.
- Pardridge WM. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Mol Biotechnol*. 2005; 30(1):57-70.
- Pekny M, Pekna M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev*. 2014;94(4):1077-98.
- Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M et al. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 2007; 55(12):1251-62.
- Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*. 2006; 443(7112):700-4.
- Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*. 2009; 32(8):421-31.
- Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2006; 1(3):223-36.
- Peters A, Palay SL & Webster H. The fine structure of the nervous system. The neurons and supporting cells. New York: Harper and Row, 1970, 198 p.
- Pfeil J, Listl S, Hoffmann GF, Kölker S, Lindner M, Burgard P. Newborn screening by tandem mass spectrometry for glutaric aciduria type 1: a cost-effectiveness analysis. *Orphanet J Rare Dis*. 2013; 8:167.
- Powell EM, Geller HM. Dissection of astrocyte-mediated cues in neuronal guidance and process extension. *Glia*. 1999; 26(1):73-83.
- Rákos G, Kis Z, Nagy D, Lur G, Farkas T, et al. Evans Blue fluorescence permits the rapid visualization of non-intact cells in the perilesional rim of cold-injured rat brain. *Acta neurobiol exp*. 2007; 67:149-154.
- Rao R, Georgieff MK. Perinatal aspects of iron metabolism. *Acta Paediatr Suppl*. 2002; 91(438):124-9.
- Reulen HJ, Graham R, Spatz M, Klatzo I. Role of pressure gradients and bulk flow in dynamics of vasogenic brain edema. *J Neurosurg*. 1977; 46(1):24-35.
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997; 386(6626):671-674.
- Rodrigues MD, Seminotti B, Amaral AU, Leipnitz G, Goodman SI et al. Experimental evidence that overexpression of NR2B glutamate receptor subunit is associated with brain vacuolation in adult glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice: A potential role for glutamatergic-induced excitotoxicity in GA I neuropathology. *J Neurol Sci*. 2015; 359(1-2):133-40.

- Roncagliolo M, Garrido M, Walter T, Peirano P, Lozoff B. Evidence of altered central nervous system development in infants with iron deficiency anemia at 6 mo: delayed maturation of auditory brainstem responses. *Am J Clin Nutr.* 1998; 68(3):683-90.
- Roodenburg AJ. Iron supplementation during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1995; 61(1):65-71.
- Rosato-Siri MV, Badaracco ME, Ortiz EH, Belforte N, Clausi MG et al. Oligodendrogenesis in iron-deficient rats: effect of apotransferrin. *J Neurosci Res.* 2010; 88(8):1695-707.
- Rosato-Siri MV, Marziali L, Guitart ME, Badaracco ME, Puntel M et al. Iron Availability Compromises Not Only Oligodendrocytes But Also Astrocytes and Microglial Cells. *Mol Neurobiol.* 2018; 55(2):1068-1081.
- Roth AD, Núñez MT. Oligodendrocytes: Functioning in a Delicate Balance Between High Metabolic Requirements and Oxidative Damage. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 949:167-181.
- Rouault TA, Cooperman S. Brain iron metabolism. *Semin Pediatr Neurol.* 2006; 13(3):142-8.
- Rouault TA. Iron metabolism in the CNS: implications for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2013; 14(8):551-64.
- Sagare AP, Bell RD, Zhao Z, Ma Q, Winkler EA et al. Pericyte loss influences Alzheimer-like neurodegeneration in mice. *Nat Commun.* 2013; 4:2932.
- Sauer SW, Okun JG, Fricker G, Mahringer A, Muller I, et al. Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood-brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Neurochem.* 2006; 97:899-910.
- Sauer SW, Opp S, Mahringer A, Kamioski MM, Thiel C et al. Glutaric aciduria type I and methylmalonic aciduria: simulation of cerebral import and export of accumulating neurotoxic dicarboxylic acids in in vitro models of the blood-brain barrier and the choroid plexus. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1802(6):552-60.
- Sauer SW, Opp S, Hoffmann GF, Koeller DM, Okun JG, Kölker S. Therapeutic modulation of cerebral L-lysine metabolism in a mouse model for glutaric aciduria type I. *Brain.* 2011; 134(Pt 1):157-70.
- Sauer SW, Opp S, Komatsuzaki S, Blank AE, Mittelbronn M, Burgard P, Koeller DM, Okun JG, Kölker S. Multifactorial modulation of susceptibility to L-lysine in an animal model of glutaric aciduria type I. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1852(5):768-77.
- Saunders NR, Knott GW, Dziegielewska KM. Barriers in the immature brain. *Cell Mol Neurobiol.* 2000; 20(1):29-40.
- Schachtschneider KM, Liu Y, Rund LA, Madsen O, Johnson RW et al. Impact of neonatal iron deficiency on hippocampal DNA methylation and gene transcription in a porcine biomedical model of cognitive development. *BMC Genomics.* 2016; 17(1):856.
- Shashoua VE, Hesse GW, Moore BW. Proteins of the brain extracellular fluid: evidence for release of S-100 protein. *J Neurochem.* 1984; 42(6):1536-41.

- Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science*. 2004 May 28;304(5675):1338-40. Epub 2004 Apr 1.
- Shepro D, Morel NM. Pericyte physiology. *FASEB J* 1993; 7(11):1031-1038.
- Siddappa AJ, Rao RB, Wobken JD, Casperson K, Leibold EA, Connor JR, Georgieff MK. Iron deficiency alters iron regulatory protein and iron transport protein expression in the perinatal rat brain. *Pediatr Res*. 2003; 53(5):800-7.
- Silvestroff L, Franco PG, Pasquini JM. ApoTransferrin: dual role on adult subventricular zone-derived neurospheres. *PLoS One*. 2012; 7(3):e33937.
- Simard M, Nedergaard M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*. 2004; 129(4):877-96.
- Singh P, Goraya JS, Ahluwalia A, Saggar K. Teaching Neurolmages: Glutaric aciduria type 1 (glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency). *Neurology*. 2011; 77(1):e6
- Sloan SA, Barres BA. Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders. *Curr Opin Neurobiol*. 2014; 27:75-81.
- Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*. 2009; 32(12):638-47.
- Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010; 119(1):7-35.
- Sofroniew MV. Astroglisis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014; 7(2):a020420.
- Sorci G, Riuzzi F, Giambanco I, Donato R. RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1833(1):101-9.
- Sorond FA, Shaffer ML, Kung AL, Lipsitz LA. Desferroxamine infusion increases cerebral blood flow: a potential association with hypoxia-inducible factor-1. *Clin Sci (Lond)*. 2009; 116(10):771-9.
- Sow A, Lamant M, Bonny JM, Larvaron P, Piaud O, Lécureuil C, Fontaine I, Saleh MC, Garcia Otin AL, Renou JP, Baron B, Zakin M, Guillou F. Oligodendrocyte differentiation is increased in transferrin transgenic mice. *J Neurosci Res*. 2006; 83(3):403-14.
- Stellmer F, Keyser B, Burckhardt BC, Koepsell H, Streichert T et al. 3-Hydroxyglutaric acid is transported via the sodium-dependent dicarboxylate transporter NaDC3. *J Mol Med (Berl)*. 2007; 85(7):763-70.
- Stevens B, Porta S, Haak LL, Gallo V, Fields RD. Adenosine: a neuron-glia transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. *Neuron*. 2002; 36(5):855-68.
- Stratman AN, Schwindt AE, Malotte KM, Davis GE. Endothelial-derived PDGF-BB and HB-EGF coordinately regulate pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly and stabilization. *Blood*. 2010; 116(22):4720-30.

- Strauss KA, Puffenberger EG, Robinson DL, Morton DH. Type I glutaric aciduria, part 1: natural history of 77 patients. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2003; 121C(1):38-52.
- Strauss KA, Lazovic J, Wintermark M, Morton DH. Multimodal imaging of striatal degeneration in Amish patients with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Brain.* 2007; 130(Pt 7):1905-20.
- Strauss KA, Donnelly P, Wintermark M. Cerebral haemodynamics in patients with glutaryl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Brain.* 2010; 133:76-92.
- Sweeney MD, Ayyadurai S, Zlokovic BV. Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat Neurosci.* 2016;19(6):771-83.
- Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Libionka W et al. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci.* 2006; 9(2):260-7.
- Tao-Cheng JH, Nagy Z, Brightman MW. Tight junctions of brain endothelium *in vitro* are enhanced by astroglia. *J Neurosci* 1987; 7(10):3293-99.
- Tigges U, Welsch-Alves JV, Boroujerdi A, Milner R. A novel and simple method for culturing pericytes from mouse brain. *Microvasc Res.* 2012; 84(1):74-80.
- Todorich B, Pasquini JM, Garcia CI, Paez PM, Connor JR. Oligodendrocytes and myelination: the role of iron. *Glia.* 2009; 57(5):467-78.
- Trapp BD, Nishiyama A, Cheng D, Macklin W. Differentiation and death of premyelinating oligodendrocytes in developing rodent brain. *J Cell Biol.* 1997; 137(2):459-68.
- Trushina E, McMurray CT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Neuroscience.* 2007; 145(4):1233-48.
- Twomey EL, Naughten ER, Donoghue VB, Ryan S. Neuroimaging findings in glutaric aciduria type 1. *Pediatr Radiol.* 2003; 33(12):823-30.
- Tynan RJ, Beynon SB, Hinwood M, Johnson SJ, Nilsson M et al. Chronic stress-induced disruption of the astrocyte network is driven by structural atrophy and not loss of astrocytes. *Acta Neuropathol.* 2013; 126(1):75-91.
- Ullrich K, Flott-Rahmel B, Schluff P, Musshoff U, Das A, Lücke T, Steinfeld R, Christensen E, Jakobs C, Ludolph A, Neu A, Röper R. Glutaric aciduria type I: pathomechanisms of neurodegeneration. *J Inherit Metab Dis.* 1999; 22(4):392-403.
- Uyama O, Okamura N, Yanase M, Narita M, Kawabata K, Sugita M. Quantitative evaluation of vascular permeability in the gerbil brain after transient ischemia using Evans blue fluorescence. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1988; 8(2):282-4.
- Van Eldik LJ, Zimmer DB. Secretion of S-100 from rat C6 glioma cells. *Brain Res.* 1987; 436(2):367-70.
- Varadkar S, Surtees R. Glutaric aciduria type I and kynurenine pathway metabolites: a modified hypothesis. *J Inherit Metab Dis.* 2004; 27(6):835-42.
- Verkhatsky A, Nedergaard M. Physiology of Astroglia. *Physiol Rev.* 2018; 98(1):239-389.



- Villacampa N, Almolda B, González B, Castellano B. Tomato lectin histochemistry for microglial visualization. *Methods Mol Biol.* 2013; 1041:261-79.
- Volpe JJ. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr Res.* 2001; 50(5):553-62.
- Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6(8):626-40.
- von Tell D, Armulik A, Betsholtz C. Pericytes and vascular stability. *Exp Cell Res.* 2006; 312(5):623-9.
- Ward RJ, Zucca FA, Duyn JH, Crichton RR, Zecca L. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 2014; 13(10):1045-60.
- Wasseff SK, Scherer SS. Cx32 and Cx47 mediate oligodendrocyte:astrocyte and oligodendrocyte:oligodendrocyte gap junction coupling. *Neurobiol Dis.* 2011; 42(3):506-13.
- Watkins TA, Emery B, Mulinyawe S, Barres BA. Distinct stages of myelination regulated by gamma-secretase and astrocytes in a rapidly myelinating CNS coculture system. *Neuron.* 2008; 60(4):555-69.
- Welch KD, Davis TZ, Van Eden ME, Aust SD. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32(7):577-83.
- Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat Neurosci.* 2011; 14(11):1398-1405.
- Winkler EA, Sengillo JD, Bell RD, Wang J, Zlokovic BV. Blood-spinal cord barrier pericyte reductions contribute to increased capillary permeability. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32(10):1841-52.
- Winkler EA, Sengillo JD, Sullivan JS, Henkel JS, Appel SH, Zlokovic BV. Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte reductions in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2013; 125(1):111-20.
- Winkler EA, Sagare AP, Zlokovic BV. The pericyte: a forgotten cell type with important implications for Alzheimer's disease? *Brain Pathol.* 2014; 24(4):371-86.
- Wootner M, Crnic LS, Koeller DM. Analysis of the expression of murine glutaryl-CoA dehydrogenase: in vitro and in vivo studies. *Mol Genet Metab.* 2000; 69(2):116-22.
- Xu J, Ling EA: Studies of the ultrastructure and permeability of the blood-brain barrier in the developing corpus callosum in postnatal rat brain using electron dense tracers. *J Anat* 1994; 184 (Pt 2):227-237.
- Yemisci M, GURSOY-OZDEMIR Y, VURAL A, CAN A, TOPALKARA K, DALKARA T. Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nat Med.* 2009; 15(9):1031-7.

- Yodoya E, Wada M, Shimada A, Katsukawa H, Okada N et al. Functional and molecular identification of sodium-coupled dicarboxylate transporters in rat primary cultured cerebrocortical astrocytes and neurons. *J Neurochem.* 2006;97(1):162-73.
- Youdim MB. Deficiency and excess of iron in brain function and dysfunction. *Nutr Rev.* 2001; 59(8 Pt 2):S83-5; discussion S85-7.
- Young IS and Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* 2001; 54:176- 186.
- Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2004; 5(11):863-73.
- Zhang Y, Barres BA. Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Curr Opin Neurobiol* 2010; 20(5):588-594.
- Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR et al. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci.* 2014; 34(36):11929-47.
- Zhou SJ, Gibson RA, Crowther CA, Baghurst P, Makrides M. Effect of iron supplementation during pregnancy on the intelligence quotient and behavior of children at 4 y of age: long-term follow-up of a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83(5):1112-7.
- Zinnanti WJ, Lazovic J, Wolpert EB, Antonetti DA, Smith MB, Connor JR, Woontner M, Goodman SI, Cheng KC. A diet-induced mouse model for glutaric aciduria type I. *Brain*2006; 129(Pt 4):899-910.
- Zinnanti WJ, Lazovic J, Housman C, LaNoue K, O'Callaghan JP et al. Mechanism of age-dependent susceptibility and novel treatment strategy in glutaric acidemia type I. *J Clin Invest* 2007; 117(11):3258-3270.
- Zinnanti WJ, Lazovic J, Housman C, Antonetti DA, Koeller DM et al. Mechanism of metabolic stroke and spontaneous cerebral hemorrhage in glutaric aciduria type I. *Acta*
- Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 2008; 57(2):178-201.
- Zonta M, Sebelin A, Gobbo S, Fellin T, Pozzan T, Carmignoto G. Glutamate-mediated cytosolic calcium oscillations regulate a pulsatile prostaglandin release from cultured rat astrocytes. *J Physiol.* 2003; 553(Pt 2):407-14.

\*\*\*\*\*

**A continuación se adjuntan dos trabajos ya publicados referentes a la temática de la presente Tesis y un listado de otras publicaciones que surgieron de colaboraciones científicas durante los años del Doctorado.**



RESEARCH

Open Access

# Increased blood–brain barrier permeability and alterations in perivascular astrocytes and pericytes induced by intracisternal glutaric acid

Eugenia Isasi<sup>1</sup>, Luis Barbeito<sup>2</sup> and Silvia Olivera-Bravo<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Glutaric acid (GA) is a dicarboxylic acid that accumulates in millimolar concentrations in glutaric acidemia I (GA-I), an inherited neurometabolic childhood disease characterized by extensive neurodegeneration. Vascular dysfunction is a common and early pathological feature in GA-I, although the underlying mechanisms remain unknown. In the present study, we have used a previously-validated rat model of GA-I to determine the effect of GA on the blood–brain barrier (BBB) and the neurovascular unit.

**Methods:** Newborn rat pups received a single injection of GA (1  $\mu\text{mol/g}$ ) or vehicle into the *cisterna magna*. BBB permeability was analyzed at 14 and 30 days post injection (DPI) by assessing Evans blue (EB) and immunoglobulin G (IgG) extravasation. Blood vessels and microglia were labeled with tomato lectin. Characterization of EB positive cells was made by double labeling with antibodies to astrocyte and neuronal markers. Immunohistochemistry against aquaporin 4 (AQP4),  $\beta$  receptor of the platelet derived growth factor (PDGFR $\beta$ ) and laminin was used to recognize astrocyte endfeet, pericytes and basal lamina. *Zonula occludens 1* (ZO-1) and occludin striatal expression was assessed by Western blotting.

**Results:** Perinatal intracisternal GA administration caused an increased extravasation of free EB, but not of IgG, into the striatal parenchyma at 14 and 30 DPI. EB extravasated through the BBB was internalized exclusively into neurons. GA-injected animals did not show significant changes in the area of small blood vessels in the striatum, but at 30 DPI there was a significant decrease in AQP4, PDGFR $\beta$  and laminin positive areas associated with small blood vessels. Occludin and ZO-1 expression in the striatal tissue was unchanged in all conditions analyzed.

**Conclusions:** The present study shows a previously-unknown effect of a perinatal administration of a single intracisternal GA injection on BBB permeability and on key components of the neurovascular unit. The results suggest BBB leakage is a pathogenic mechanism and a potential therapeutic target for patients with GA-I.

**Keywords:** Blood–brain barrier, Glutaric acidemia type I, Glutaric acid, Pericyte, Astrocyte, Laminin, Neurons

## Background

Glutaric acidemia type I (GA-I) is a neurometabolic/neurodegenerative disorder caused by deficiency of the mitochondrial enzyme glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH) involved in the catabolism of lysine, hydroxylysine and tryptophan. Functional deficiency of GCDH leads to the accumulation of glutaric (GA), 3-hydroxyglutaric and glutaconic acids in body fluids and tissues [1-4].

Between 6 and 18 months of life, up to 90% of untreated GA-I children suffer an encephalopathic crisis, usually precipitated by infectious or viral illness. This initiates a process leading to permanent neurological deficits including dystonic-dyskinetic movement disorders, growth and cognitive impairments [2,4-6]. The pathological hallmarks of the disease include striatal and cortical degeneration, gliosis, white-matter abnormalities and vascular dysfunction [3,7,8].

Vascular pathology described in GA-I patients, include blood–brain barrier (BBB) breakdown, intradural or retinal hemorrhages, subdural effusions and chronic extravasation

\* Correspondence: solivera@iibce.edu.uy

<sup>1</sup>Neurobiología Celular y Molecular, IIBCE, 3318 Italia Av., 11600 Montevideo, Uruguay

Full list of author information is available at the end of the article

from trans-arachnoid vessels [3,7-10]. These pathological events may occur independently of the encephalopathic crisis [10]. Furthermore, striatal capillary distention and BBB breakdown with vasogenic oedema was observed in GCDH-deficient (*Gcdh*  $-/-$ ) mice fed with a lysine enriched diet to boost GA production [11-13], indicating the vulnerability of the neurovascular unit to GA. However, little is known about the effect of GA on the different cellular components of the neurovascular unit. Moreover, the significance and impact of BBB dysfunction in GA-I as causative of neuronal death is still poorly understood.

The BBB is responsible for the proper functioning and homeostasis of the central nervous system (CNS) by regulating cellular and molecular trafficking between blood and brain parenchyma. Formed by specialized vascular endothelial cells, the BBB structure and function is tightly regulated by basal lamina components, pericytes, perivascular microglial cells, astrocytes and neurons which altogether constitute the neurovascular unit [14-18]. The main components of the basal lamina such as laminins interact with surface receptors from different cell types, tightly modulating the BBB [18]. Moreover, in several brain diseases, BBB breakdown causes plasma protein leakage and altered transport of molecules between blood and brain. These events are associated with neuronal death and neuroinflammation [19].

Pericytes and astrocytes have key roles in the formation and maintenance of the BBB, and in blood flow regulation and neurovascular coupling, through the release of several growth factors or via cell to cell contacts [14-18]. Pericytes are highly complex regulatory cells that are essential for the formation, maturation and maintenance of normal microvasculature [20-22], and pericyte dysfunction is associated with several brain disorders including neurovascular diseases, neurodegeneration, multiple sclerosis and spinal cord injury [22]. However, the involvement of brain pericytes in GA-I pathogenesis is currently unknown.

On the other hand, astrocytes may play a pivotal role in GA-I pathology [23-25]. In a previously-validated model of GA-I consisting of a single intracisternal administration of a pathophysiological dose of GA to newborn rat pups reproducing an acute encephalopathic crisis similar to that described in humans with GA-I, astrocytes presented with oxidative stress, enhanced proliferation rate and S100 $\beta$  overexpression [23,24]. Remarkably, this early astrocyte reactivity precedes a number of delayed pathological events such as myelination failure and neuron degeneration in the striatum [24,26]. Since astrocytes are also key cellular constituents of the BBB, we have explored whether intracisternal GA could also damage the neurovascular unit.

In the present study, using our model of GA perinatal administration [23,24,26], we determined whether a single

intracisternal dose of GA was sufficient to trigger long term damage on BBB permeability and integrity by analyzing Evans blue (EB) and immunoglobulin G (IgG) extravasation and the protein expression of several components of the neurovascular unit.

## Materials and methods

### Chemicals

Evans blue, glutaric acid and all other chemicals of analytical grade were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Primary antibodies were purchased from Abcam (Cambridge, MA, USA), Invitrogen (Camarillo, CA, USA), Millipore (Billerica, MA, USA) or Sigma. Secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor<sup>®</sup> were obtained from Molecular Probes<sup>®</sup> Invitrogen (Eugene, OR, USA) or Thermo Scientific Pierce (Rockford, IL, USA). Material used in Western blotting assays was purchased from Bio-Rad (Hercules, CA, USA) and Thermo Scientific Pierce.

### Animals

Experimental animal work was conducted using Sprague Dawley rats, bred at the IIBCE animal house. Animals were housed in cages with food and water *ad libitum*, at controlled temperature and at 12 h light/dark cycle. Institutional guidelines according to National and International protection laws of vertebrate animals for scientific purposes were followed. All procedures were made to minimize animal pain or discomfort and were approved by the institutional IIBCE Ethical Committee. All the males from at least 5 whole litters were employed to administer GA and to perform immunohistochemistry and Western blotting assays.

### Intracisternal GA administration to rat pups

At times between 12 and 24 h after birth, each male pup was anesthetized with hypothermia by placing in an aluminum foil-lined tube packed in crushed ice for 10 min until most reflexes were absent. Then, each animal was injected into the *cisterna magna* with either GA (1  $\mu$ mol/g body weight, pH 7.4) [3-5], or an equal volume of vehicle (phosphate buffered saline (PBS), 10 mM, pH 7.4). A maximal volume of 5  $\mu$ l was injected using a 30G needle attached to a Tygon tube extension to allow correct manipulation and zone identification [23,24,26]. The amount of GA administered ensured immediate high brain concentrations ( $\sim$ 100 mM in the cerebrospinal fluid); which is hard to obtain by systemic injection due to limited flux across the BBB [27]. After injection, all animals were allowed to recover at 30°C on a heating pad for 30 min and then returned to their mothers until processing.

#### **Animal perfusion with a paraformaldehyde-EB mixture**

EB, a diazo blue dye of 960 Da that becomes fluorescent when attached to proteins, only leaks to the brain parenchyma when BBB is absent, immature or significantly disrupted, thus, it is widely used to assess BBB integrity [28]. EB extravasation studies were performed following the method proposed by del Valle *et al.*, with minor modifications [28]. At 14 and 30 days post-injection (DPI), GA and vehicle-injected rats (controls) were anaesthetized with 90:10 mg/Kg ketamine/xylazine and then intracardially perfused with a volume of saline solution followed by a mixture of 1% EB in 4% fresh paraformaldehyde (PFA) in 100 mM PBS (pH = 7.4). After that, the brains were dissected, maintained overnight in 4% PFA at 4°C and kept in PBS-0.05% sodium azide at 4°C, until sectioning.

#### **Analysis of EB extravasation by light and fluorescence microscopy**

Using a 1000S Leica vibratome, 50 µm thick consecutive coronal sections, covering the whole striatal region, were obtained and stored free-floating at 4°C in PBS with 0.05% sodium azide. Light microscopy images and far red fluorescence EB emission was detected by epifluorescence or confocal microscopy with a 633 nm HeNe laser attached to an Olympus FV300 laser confocal microscope. EB emission capture was performed either alone or after immunostaining with different markers. Images from age-matched animals injected with vehicle or GA were taken with the same acquisition settings (same excitation/emission and exposure parameters). Quantitation of the EB red fluorescence emission, measured as the intensity per area unit (mean gray value: averaged intensity per pixel), was done in the whole striatum and parietal cortex of vehicle- and GA-injected animals by using the Image J software (NIH, USA). Values represented are the means ± S.E.M., determined after analyzing the raw data from each experimental condition with the statistical descriptive tool of Sigma Stat2.0 program.

#### **IgG recognition in striatal tissue**

Brain sections containing the striatum from 3 animals of each experimental condition were permeabilized with 0.1% Triton X-100, blocked with 5% BSA and then incubated for 2 h at room temperature (RT) with 1:300 dilution of an anti-rat IgG conjugated to FITC (Pierce). After that, sections were washed 3 times with PBS, mounted in 1:1 glycerol-PBS containing 1 µg/ml Hoechst 33342 and imaged in a FV300 Olympus confocal microscope provided with 405, 488 and 633 nm lasers. IgG fluorescence was analyzed by using the 488 nm laser and corresponding filters. As negative controls the rat IgG antibody was omitted.

#### **Lectin histochemistry**

Striatal sections from vehicle- and GA-injected animals at 14 and 30 DPI were permeabilized with 1% Triton X-100 for 20 min at RT, quickly rinsed and incubated overnight with 5 µg/ml of *Lycopersicon esculentum* biotinylated lectin (Sigma). After 3 washes with PBS, sections were incubated with a 1:500 dilution of Alexa 488 streptavidin (Molecular Probes®). After 90 min, sections were washed 3 times, mounted in 50% glycerol and imaged in a confocal microscope. Green positive areas of blood vessels were quantified for both experimental conditions after manually delineating all vessel profiles <10 µm in diameter in a field of 211.5 mm<sup>2</sup>. At least 5–7 fields per section, 3–5 sections per animal and 3–5 animals per condition were analyzed.

#### **Basic histology**

At least 3 sections of each experimental condition were permeabilized with 0.3% Triton X-100 for 20 min and then incubated with 0.05% Cresyl Violet (Sigma) for 2 min at RT. Sections were progressively dehydrated with increasing ethanol concentrations, acetone and xylene and finally mounted with DPX (Fluka). Microphotographs of the striatal regions were obtained in an IX81 Olympus microscope (Center Valley, PA, USA).

#### **Immunohistochemistry**

For each animal and staining procedure, 5 equivalent sections covering the anterior and medial striatum (roughly between 2.28 and 0 mm to Bregma, according to Paxinos and Watson [29]) were analyzed. Anatomical landmarks were used to ensure that parameters were analyzed at similar levels within and between groups. Photomicrographs of representative areas were taken under similar conditions of acquisition to controls. Immunohistochemistry assays were performed on free-floating sections. Sections were washed with PBS; permeabilized 20 min with 0.05% Triton X-100 and incubated 30 min in blocking buffer (PBS containing 0.05% Triton X-100 and 5% bovine serum albumin (BSA)). Afterwards, sections were incubated with one of the following antibodies: anti-S100β (1:400, Sigma), anti-laminin 1 + 2 (1:1000, Abcam), anti-aquaporin 4 (AQP4, 1:75, Millipore), anti-β receptor of the platelet derived growth factor (PDGFRβ, 1:100, Abcam), anti-*zonnulla occludens* 1 (ZO-1, 1:200, Invitrogen), or anti-neuronal nuclear protein (NeuN, 1:200, Millipore). All dilutions were made in PBS containing 0.05% Triton X-100. After overnight incubation at 4°C, sections were rinsed in PBS, and incubated at room temperature (RT) for 90 min with a 1:500 dilution of 1 mg/ml corresponding secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes®). Sections were then washed, mounted in 1:1 glycerol-PBS containing 1 µg/ml Hoechst 33342 and imaged in a FV300 Olympus confocal



microscope. As negative controls the primary or secondary antibodies were omitted. Quantitation of positive areas was done by using the Image J software in manually delineated blood vessels that have a diameter less than 10  $\mu\text{m}$ . Positive areas measured in similar striatal surfaces from each brain section were averaged to obtain one value per animal. Data represented are the mean  $\pm$  S.E.M. of the values obtained in 3–5 animals per condition.

#### Western blotting

To assess the expression of occludin and ZO-1 in the striatal tissue of GA or vehicle-injected animals, 3 different batches of striatal samples were obtained from 14 and 30 DPI animals and then processed for Western blotting analysis. Briefly, fresh samples were collected in tissue lysis buffer, homogenized and protein quantified with the bicinchoninic acid method. Denatured samples were seeded and a typical SDS-PAGE electrophoresis and blotting was performed [30]. Proteins that were transferred to a PVDF membrane were further incubated overnight at 4°C with a 1:1000 dilution of anti-occludin (abcam) or anti-ZO-1 (Invitrogen) antibodies. 1:4000 of anti- $\beta$ -actin antibody (Sigma) was used as a protein loading control. After 1 h of incubation at RT with peroxidase-conjugated secondary antibodies (Bio-Rad), the reaction product was developed with the Pierce ECL kit and bands were analyzed with the Image J gel analyzer tool. Data were expressed as the percentage of  $\beta$ -actin expression in each corresponding sample.

#### Statistical analysis

Data analysis was performed with Sigma Stat 2.0 or Graphpad Prism 3.0 using the student *t*-test in parametric populations. All data was expressed as percentage of respective age-matched controls and was obtained from at least 3–5 independent experiments. Results presented are the means  $\pm$  SEM and  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### Intracisternal GA perinatal administration causes increased EB extravasation in the striatum

Rat pups were injected at postnatal day 0 with PBS or GA into the *cisterna magna* to experimentally reproduce a GA-I like encephalopathic crisis as previously reported [23,24,26]. Then, animals were perfused with 1% EB in 4% PFA at 14 or 30 DPI to analyze EB extravasation. EB staining was located in blood vessel lumen or wall, in the lateral ventricles and in the parenchyma of areas lacking a BBB such as the circumventricular organs, in all experimental conditions (Figure 1). At 14 DPI, light microscopy images of coronal sections evidenced striatal regions stained with blue in control animals but there

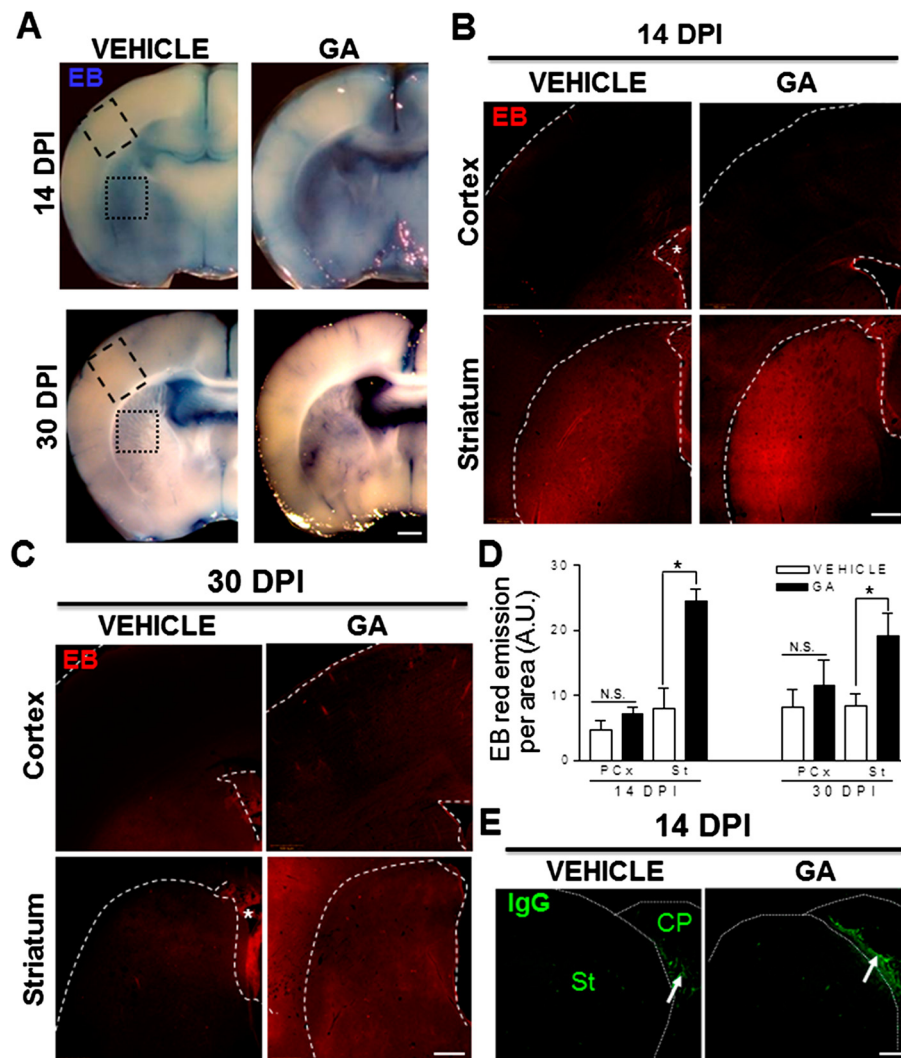
were more extensive and more strongly-stained regions in GA-injected animals. Accordingly, EB red fluorescence was increased mostly in the striatum (Figure 1A, B). At 30 DPI, control animals showed EB extravasation restricted to the brain areas that lack BBB with an almost undetectable blue and red staining in cortical and striatal parenchyma. In contrast, a significant increase in EB extravasation was seen in GA-injected animals (Figure 1A, C) and compared to controls, there was a 3-fold and ~2.5-fold increase in total EB red fluorescence in the striatum of GA-injected animals at 14 and 30 DPI, respectively (Figure 1D). In contrast, IgGs were not detected in the brain parenchyma of GA-injected animals, but were only recognized in the choroid plexus from both vehicle and GA-injected animals at 14 DPI (Figure 1E) and 30 DPI (data not shown). This suggests that the BBB leakage in GA-injected animals is restricted to low MW molecules.

### EB labeled striatal neurons in GA-injected animals

Because EB can easily attach to proteins and become fluorescent, confocal analysis of EB fluorescence allowed the identification of EB positive cells surrounding blood vessels in GA-injected animals (Figure 2A). EB did not co-localize with S100 $\beta$ -positive astrocytes that were found widespread throughout the whole striatal parenchyma with processes surrounding the blood vessels (Figure 2B), neither with tomato lectin-positive microglial cells [31] that were found dispersed throughout the striatal parenchyma and around EB positive cells in GA-injected animals (Figure 2C). Conversely, most of the EB positive cells displayed a typical morphology of striatal neurons and co-labeled with the pan-neuronal marker NeuN, and the number of double-labeled EB/NeuN positive neurons in the striatum of GA-injected rats was 8 and 40-fold higher than controls at 14 and 30 DPI, respectively (Figure 2D). Hence, all data suggest that EB was internalized exclusively into neurons.

### Decreased expression of astrocyte endfeet and pericyte markers around blood vessels after GA administration

Tomato lectin histochemistry was employed to assess the effects elicited by perinatal GA administration on the striatal microvasculature density. Besides staining microglial cells recognized by its delicate pattern of positive thin processes, lectin also bound to the endothelial glycocalyx allowing visualization around 40 profiles of small blood vessels (<10  $\mu\text{m}$ ) per field in both control and GA-injected animals (Figure 3A). Quantitative analysis of lectin-positive small vessel area, indicated that perinatal intracisternal GA did not affect the total surface area of the striatal microvasculature at 14 and 30 DPI (Figure 3B). Lectin staining did not identify any significant effect on microvessel morphology or number. This was confirmed by the staining of striatal sections

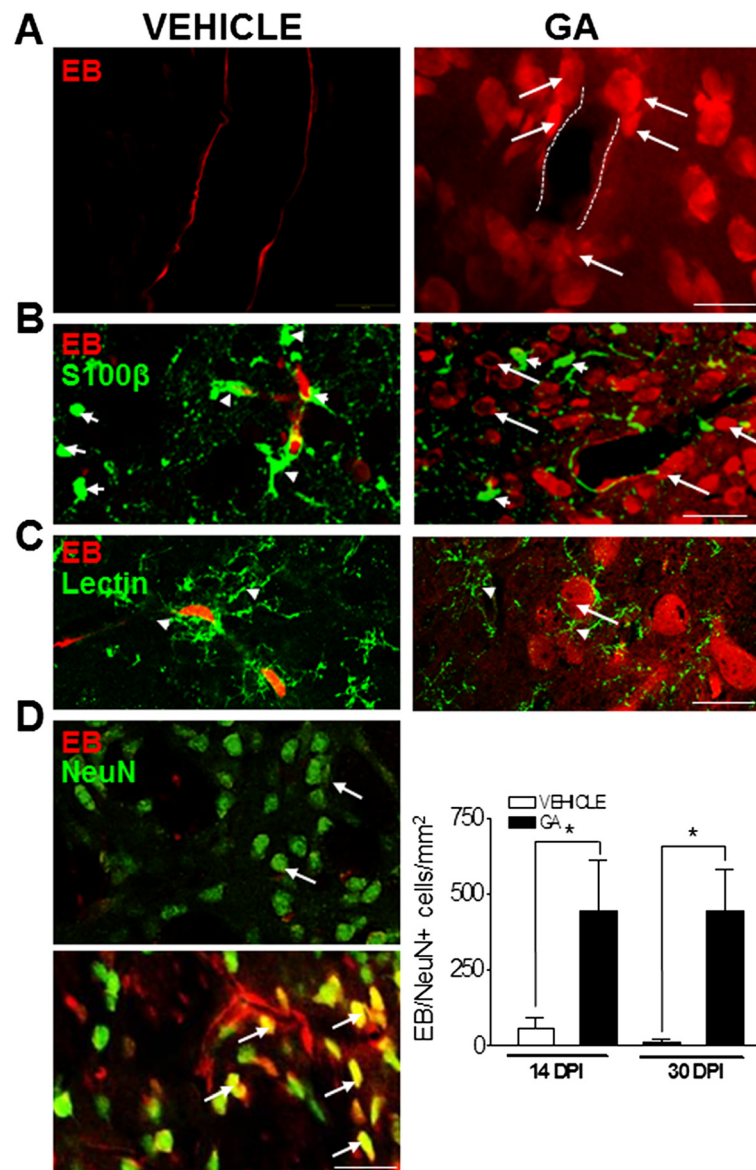


**Figure 1** Increased permeability of the BBB after a perinatal intracisternal injection of GA. **(A)** Panoramic light microscopy images of EB staining (blue) in brain coronal sections in vehicle- and GA-injected animals at 14 and 30 DPI. Note the more intense staining in GA-injected animals, mostly in the striatal region, indicating increased BBB permeability. **(B-C)** Epifluorescence images of EB red emission in the parietal cortex and striatum at levels indicated in the dashed line boxes shown in **(A)**. Increased parenchymal EB staining was found in GA-injected animals when compared to controls. It was also evident that zones that normally do not have a BBB (\*) were stained in all animals perfused with EB. Some EB parenchymal extravasation was found in vehicle-injected animals at 14 DPI, when the BBB is not fully established. **(D)** Quantitation of EB red fluorescence in the parietal cortex (PCx) and striatum (St) indicating a significant increase in the striatum of GA-injected animals at both 14 and 30 DPI when compared to controls. (\*):  $p < 0.05$ . **(E)** Confocal images of IgG immunostaining (green) in the striatum of 14 DPI vehicle- and GA-injected animals. Note that the positive signal is present only in the choroid plexus (CP, white arrows) but not in the striatum. Scale bars in A: 1 mm; B; C and D: 500  $\mu$ m; E: 200  $\mu$ m.

with cresyl violet which showed the typical appearance of flattened endothelial cells lining the lumen of small vessels in both vehicle- and GA-injected animals (Figure 3C).

Recognition of astrocyte endfeet by AQP4 immunoreactivity showed clear blood vessel profiles in vehicle-injected animals at both 14 and 30 DPI (Figure 4A). In GA-injected animals, the signal decreased until it became a weak thin rim bordering some vessels in cross section at 30 DPI. At that time, the reduction of AQP4 positive areas that surrounded blood vessels was ~50%

compared to controls (Figure 4C). On the other hand, the immunoreactivity for the pericyte marker, PDGFR $\beta$ , showed a strong signal delineating some blood vessels and staining pericytes which appeared as small round cells with smooth tiny processes located close to blood vessels in control animals (Figure 4B). In GA-injected animals there were no changes at 14 DPI with respect to controls, but at 30 DPI, the strong signal around blood vessels was decreased and the total PDGFR $\beta$  + area was reduced by 50% (Figure 4C). Some PDGFR $\beta$ -positive cells



**Figure 2 EB labels striatal neurons upon GA perinatal administration.** (A) Confocal images of the striatum evidencing that in GA-injected animals EB leaked into the parenchyma and entered many cells that surrounded the blood vessel (white dashed lines) and have a typical neuronal morphology (white arrows). In contrast, in vehicle-injected animals EB was restricted to the blood vessel wall. (B) EB did not permeate the cell membrane of S100 $\beta$  positive astrocytes in GA-injected animals (green, short white arrows) either in the striatal parenchyma or in the processes close to blood vessels, but it stained numerous rounded cells (long white arrows) that resembled the morphology of striatal neurons. (C) Lectin-positive microglia (arrowheads) were not labeled with EB. It was also evident that microglia are in close contact with EB positive neuron-like (white arrow) cells in GA-injected animals. (D) Co-localization of EB (red) and NeuN (green) was observed in many striatal neurons (yellow, white arrows, lower picture) in GA-injected animals. In contrast, the striatum from vehicle-injected animals did not show co-localization and green NeuN positive cells were typically arranged (upper picture). The quantitation of double labeled EB/NeuN neurons evidences a significant increase (\* at  $p < 0.05$ ) both at 14 and 30 DPI, with respect to controls. Scale bars in A and C: 15  $\mu$ m B and D: 50  $\mu$ m.

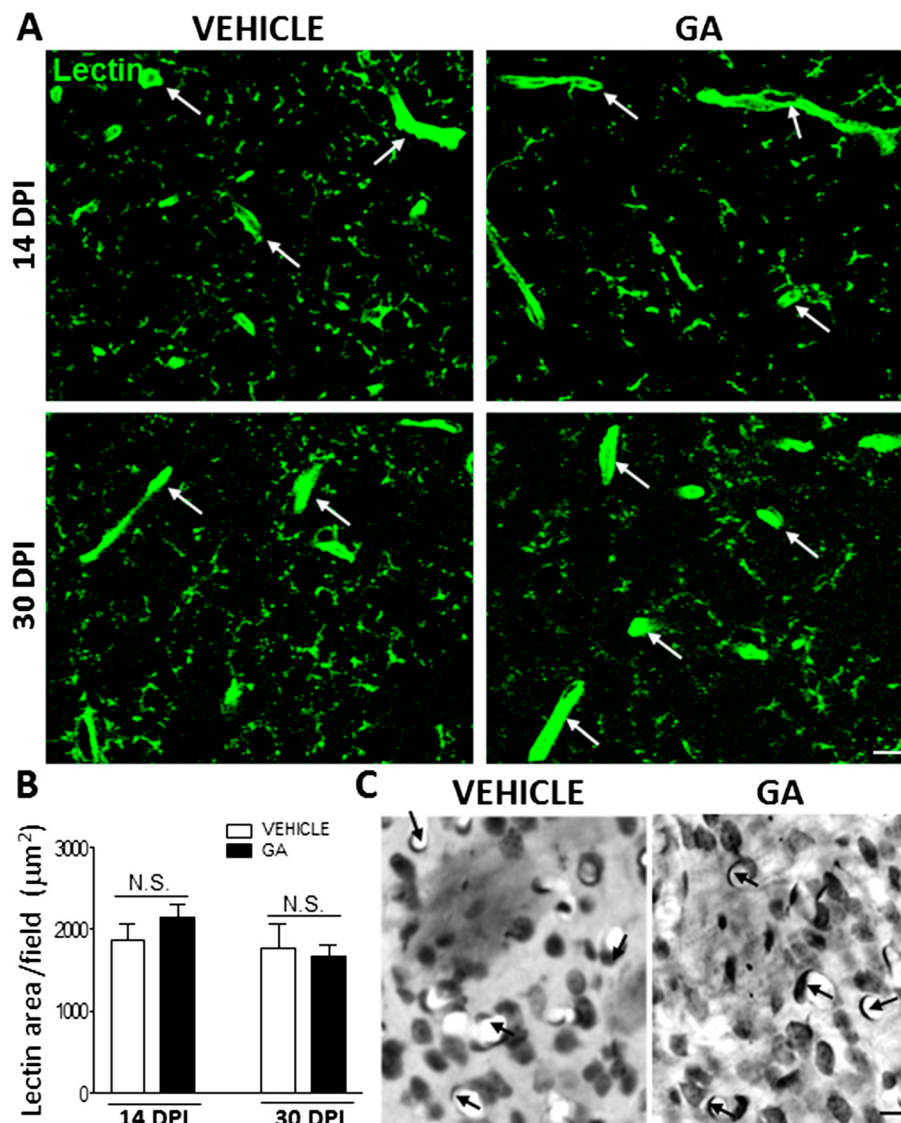
remained dispersed throughout the striatal parenchyma possibly evidencing a pericyte detachment from blood vessels that needs further confirmation.

#### GA effects on laminin, ZO-1 and occludin expression

The confocal analysis of laminin, an extracellular glycoprotein enriched in basement membranes associated

with blood vessels [18], revealed a significant (40%) reduction in positive areas surrounding small vessels (<10  $\mu$ m in diameter), in GA-injected rats at 30 DPI when compared to controls (Figure 5A, B). Moreover, intracellular laminin staining was found in all animals, but was increased in GA-injected rats (Figure 5A). On the other hand, the expression levels of endothelial cell tight





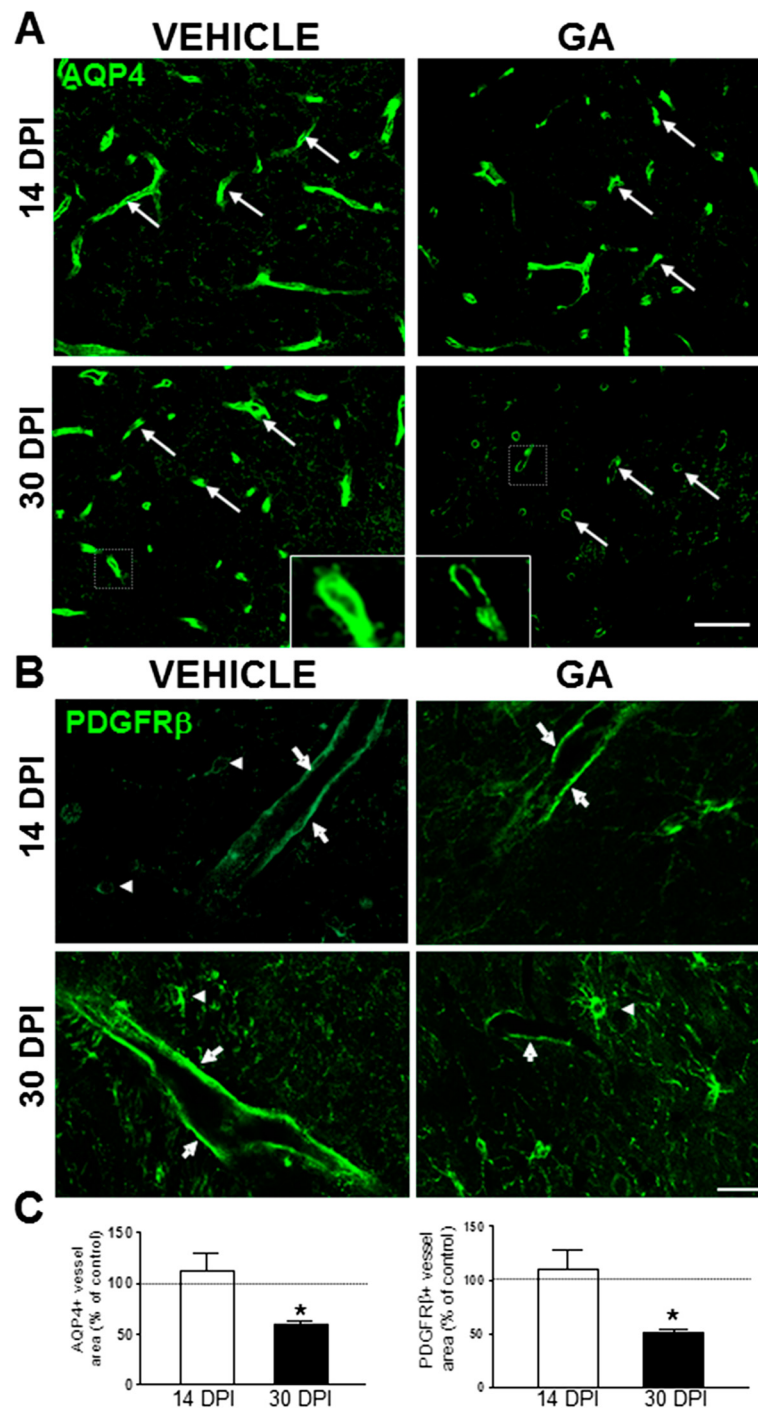
**Figure 3 Brain microvessel area was not affected by intracisternal GA injection.** (A) Confocal images of blood vessel profiles (white arrows) and microglia processes positive to lectin in both vehicle- and GA-injected animals at 14 and 30 DPI. (B) Quantitation of lectin-positive areas per field in manually-delineated small vessels (<10  $\mu\text{m}$  in diameter) showing no significant differences in GA-injected animals with respect to controls. (C) Cresyl Violet staining of striatal sections evidencing the preservation of small blood vessel (black arrows) number and appearance. Note flattened endothelial cells lining the internal wall of capillaries in both vehicle- and GA-injected animals. Scale bars in A and C: 15  $\mu\text{m}$ .

junction proteins, ZO-1 and occludin, were not modified in striatal tissue of GA-injected rats (Figure 5C, D). ZO-1 immunohistochemistry revealed a preserved localization of the signal in the striatal vasculature (Figure 5C).

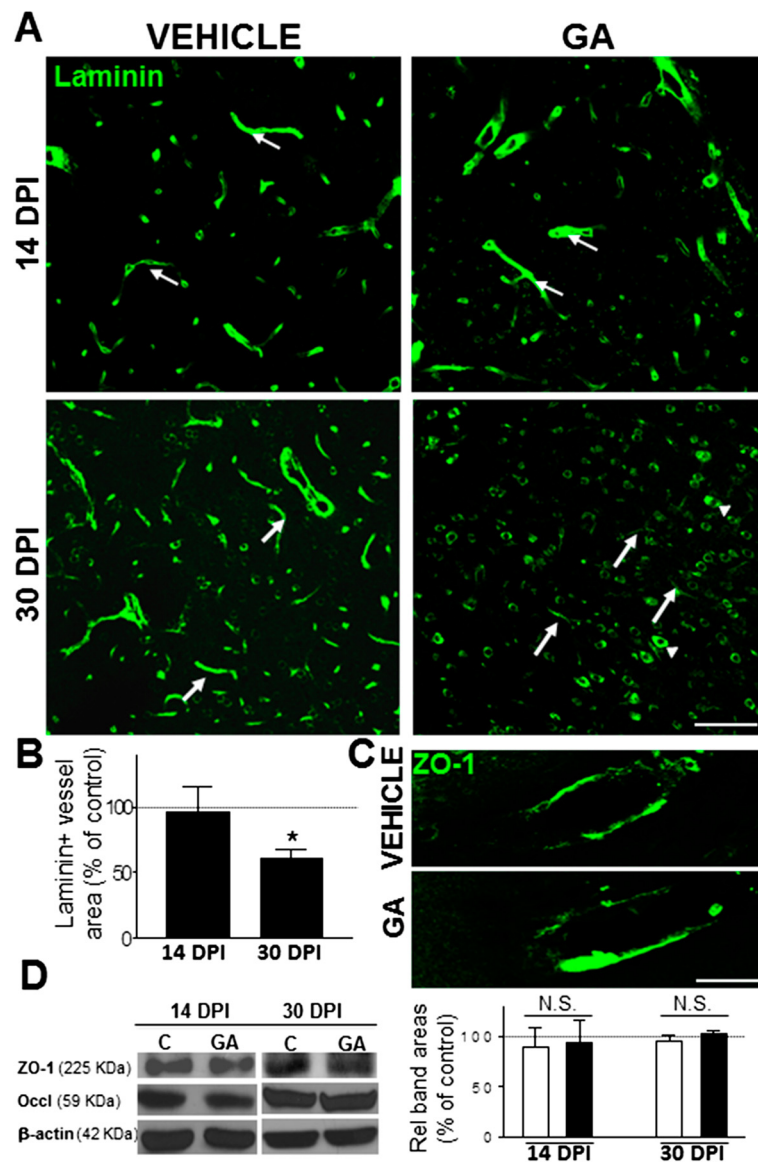
### Discussion

Because intracisternal GA administration to rat pups is sufficient to elicit an encephalopathic-like crisis and subsequent progressive glial activation and neuronal death in the striatum [23,24,26], we have analyzed the effect of a single GA perinatal injection on BBB permeability and structural components to know if this can contribute to

GA-I pathogenesis. Here we showed that intracisternal GA administration to newborn rats resulted in long term striatal BBB leakage and reduced expression in some markers of the neurovascular unit. Analysis of EB extravasation and IgG immunoreactivity in rats injected with GA indicated a significant increase in BBB permeability restricted to the lower MW marker, in the striatum at 14 DPI and 30 DPI, when the normal BBB is totally mature and the transendothelial electrical resistance reaches its maximum value [32,33]. Hence, these results strongly suggest an abnormal long-term leakage of the BBB upon GA exposure and are in accordance with the increased BBB



**Figure 4** GA perinatal administration affected astrocytes and pericytes. **(A)** Immunofluorescence images of AQP4 signal delineating blood vessels (white arrows) in the striatum of vehicle and GA-injected animals. No significant changes were observed at 14 DPI. At 30 DPI, AQP4 became a tiny ring around some vessels in GA-injected animals, as clearly shown in the higher magnifications of the areas enclosed. **(B)** Representative images of the immunoreactivity for the pericyte marker PDGFR $\beta$  evidencing strong signal around some blood vessels (white arrows) and some middle-sized positive cells (arrowheads). At 30 DPI, there was a reduction in the PDGFR $\beta$  signal around blood vessels of GA-injected animals when compared to controls. **(C)** Quantitation of AQP4 (left) and PDGFR $\beta$  (right) immunoreactivity confirming a significant decrease in the positive areas surrounding blood vessels in GA-injected animals related to age-matched controls at 30 DPI. Values are represented as the percentage of age-matched controls. (\*) indicates statistical significance at  $p < 0.05$ . Scale bars in A: 50  $\mu$ m and C: 20  $\mu$ m.



**Figure 5 Reduced laminin expression around small blood vessels in the striatum of GA-injected animals.** (A) Representative images of brain sections at the striatal level showing laminin immunoreactivity that delineates blood vessel profiles (white arrows) in control animals. In GA-injected animals laminin expression seemed unaffected at 14 DPI but an important reduction was found at 30 DPI, together with a simultaneous increased expression of cytoplasmic laminin staining in neuronal-like cells (arrowheads). (B) Quantitation of the laminin-positive area surrounding manually-delimited blood vessels <10  $\mu$ m in diameter showed a statistically-significant decrease at 30 DPI in GA-injected animals. Data represented is the percentage of respective controls. (C) High magnification images of ZO-1 immunoreactivity in striatal vessels of vehicle- and GA-injected animals at 30 DPI evidencing absence of changes in the distribution and intensity of the signal. Scale bars in A: 50  $\mu$ m and C: 15  $\mu$ m. (D) Western blotting images (left panel) and quantitation of the endothelial tight junction proteins, occludin and ZO-1 (right panel).  $\beta$ -actin was used as a protein loading control. Data represented are the percentage of areas related to controls that were indicated as 100% in the chart (dashed black line). Neither occludin nor ZO-1 changed its overall expression in the striatal tissue of vehicle and GA-injected animals, at both 14 and 30 DPI.

permeability observed in *Gcdh*  $-/-$  mice subjected to dietary high lysine supplementation [11,13], a condition that boosts the endogenous production of GA-I metabolites in the brain.

Remarkably, leakage of EB into the parenchyma allowed the visualization of cells stained with EB in the striatum of GA-injected animals. EB co-localized with the neuronal

marker NeuN, but not with either astrocytes or microglial cells recognized by S100 $\beta$  immunoreactivity or tomato lectin, respectively. Although we cannot ignore that EB could label some healthy neurons, this result suggests that EB labels a subset of neurons in which plasma membranes are altered sufficiently to allow dye to enter [28,34-36]. Since, Olivera *et al.* [24] previously demonstrated that

GA-injected animals have significant striatal neuronal death at 21 and 45 days after GA administration, our present data indicate that GA-induced defects on BBB permeability precede neuronal damage.

Intracisternal GA did not produce any significant effect on the density of lectin-positive small blood vessels in the striatal parenchyma. However, it caused a delayed reduction in some markers of the neurovascular unit, such as PDGFR $\beta$ , AQP4 and laminin associated with small blood vessels, indicating an indirect GA response. At 30 DPI, the immunoreactivity of the pericyte marker PDGFR $\beta$  associated with small striatal blood vessels was strongly reduced, suggesting an indirect vulnerability of pericytes to GA. Pericyte malfunction has been associated with a dysfunctional BBB as well as with capillary dilation and impaired blood flow control [22,37]. Thus, the involvement of pericytes may explain, at least in part, altered cerebral hemodynamics with reduced blood flow in GA-I patients [9]. Similarly, possible GA-induced changes in pericyte density, localization and/or function may contribute to the microvascular abnormalities and BBB defects reported in the disease, as has been described in different pathological conditions, including trauma, diabetic retinopathy, stroke and LPS-induced sepsis [38,39].

The decreased AQP4 immunoreactivity in GA-injected animals suggests structural and possibly functional defects in the astrocytic endfeet associated with the microvasculature. AQP4 clustering in astrocytic endfeet contributes to water homeostasis and spatial potassium buffering, playing a pivotal role in the neurovascular coupling. While polarized AQP4 expression is lost in many conditions of acute or chronic brain injury [16,40,41], this is the first report suggesting the involvement of AQP4 in GA-I. Since GA induces an early and strong striatal astrocyte reactivity evidenced by enhanced proliferation and S100 $\beta$  overexpression [23,24,26], AQP4 downregulation might be a consequence of a progressive altered differentiation and polarization of astrocytes at the neurovascular unit that became apparent several weeks after GA injection.

Reduced laminin expression around small blood vessels further supports a microvascular compromise induced by GA. In a previous study, ablation or acute disruption of astrocytic laminin altered astrocyte endfeet organization, leading to hemorrhages in deep brain regions and impaired function of vascular smooth muscle cells [42]. Furthermore, the clustered distribution of AQP4 in astrocytes appeared to be mediated by interaction with extracellular laminin-1 [43]. Similarly deletion of  $\beta$ 2 and  $\beta$ 3 isoforms of laminin caused a reduction in AQP4 expression and function in the Müller glia [44]. Taken together, our results suggest that perinatal GA administration significantly affects the establishment of the neurovascular unit during postnatal life.

On the other hand, GA did not induce significant effects on the expression of two major components of endothelial

tight junctions such as ZO-1 and occludin [18]. Previous results in the *Gcdh*<sup>-/-</sup> mice fed with a high lysine diet showed BBB defects evidenced by a progressive disappearance of occludin with no changes in ZO-1 expression [13]. Although we have not demonstrated GA effects on tight junction organization and ultrastructure, as has been shown for other brain diseases [16], our present results suggest that EB extravasation through a disrupted BBB would not necessarily require a decomposition of endothelial tight junctions. Accordingly, increased transendothelial vesicle trafficking could be a plausible mechanism that may explain BBB leakage when tight junctions remain unchanged, as was reported in a model of embolic stroke in rats [45].

Although we did not analyze the primary cellular targets of GA that account for the BBB damage, previous results strongly suggest that astrocytes may be the earliest GA targets as they would be able to internalize this acid [46,47], thus altering their function and signaling capabilities [23-26]. It is possible that early astrocyte dysfunction elicited by GA including S100 $\beta$  overexpression [23,26] and possibly altered ammonia clearance causing hyperammonemia as reported in Jafari *et al.* [25], may account for the increased BBB permeability [48,49], at least early after GA administration. Moreover, the persistence of astrocyte-enhanced proliferation and immaturity [23,24] several weeks after GA-injection may further sustain a cascade of pathological events responsible for BBB disruption and altered expression of key components of the neurovascular unit. This hypothesis seems to be consistent with the fact that a brief and transient increase in GA brain concentration during the early postnatal period is enough to trigger long lasting deleterious effects on BBB function and cellular markers and subsequent delayed neuronal death. Most of the pathological events triggered by a single exposure to GA are delayed by several weeks, implying an active and autonomous “toxic” process that is maintained independent on GA levels.

## Conclusions

We have shown that a single intracisternal GA perinatal administration elicited a previously unknown effect on the neurovascular unit leading to a sustained hyperpermeability towards low MW Evans blue dye. This suggests that disruption of the BBB is a pathogenic mechanism and a potential therapeutic target in GA-I. Further studies must be addressed to establish the mechanisms underlying this phenomenon and their relationship to GA-I progression and outcome.

## Abbreviations

AQP4: Aquaporin 4; BBB: Blood-brain barrier; DPI: Days post-injection; EB: Evans Blue; GA: Glutaric acid; GA-I: Glutaric acidemia type I; GCDH: Glutaryl-CoA dehydrogenase; IgG: Immunoglobulin G;



NeuN: Neuronal nuclear protein; PDGFR $\beta$ : Receptor  $\beta$  of the platelet derived growth factor; ZO-1: Zonula occludens 1.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

EI and SOB designed the experiments. EI performed most of the experiments, SOB participated in some experiments. EI, SOB, LB wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgements

This work was funded by the National Agency for Innovation and Research (ANII), the Program for the Development of Basic Sciences (PEDECIBA) and the Uruguayan Program for the Development of Technology (PDT) [76/23]. The authors would like to thank Dr. Patricia Cassina and Dr. Giselle Prunell for the insightful comments on the manuscript.

#### Author details

<sup>1</sup>Neurobiología Celular y Molecular, IIBCE, 3318 Italia Av., 11600 Montevideo, Uruguay. <sup>2</sup>Institut Pasteur de Montevideo, Iguá s/n CP, 11400 Montevideo, Uruguay.

Received: 20 February 2014 Accepted: 12 July 2014

Published: 24 July 2014

#### References

1. Goodman SI, Norenberg MD, Shikes RH, Breslich DJ, Moe PG: **Glutaric aciduria: biochemical and morphologic considerations.** *J Pediatr* 1977, **90**:746–750.
2. Kolker S, Hoffmann GF, Schor DS, Feyh P, Wagner L, Jeffrey I, Pourfarzam M, Okun JG, Zschocke J, Baric I, Bain MD, Jakobs C, Chalmers RA: **Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency: region-specific analysis of organic acids and acylcarnitines in post mortem brain predicts vulnerability of the putamen.** *Neuropediatrics* 2003, **34**:253–260.
3. Strauss KA, Puffenberger EG, Robinson DL, Morton DH: **Type I glutaric aciduria, part 1: natural history of 77 patients.** *Am J Med Gen Part C Semin Med Gen* 2003, **121C**:38–52.
4. Funk CB, Prasad AN, Frosk P, Sauer S, Kolker S, Greenberg CR, Del Bigio MR: **Neuropathological, biochemical and molecular findings in a glutaric acidemia type 1 cohort.** *Brain* 2005, **128**:711–722.
5. Hoffmann GF, Athanassopoulos S, Burlina AB, Duran M, De Klerk JB, Lehnert W, Leonard JV, Monavari AA, Muller E, Muntau AC, Naughten ER, Plecko-Starting B, Superti-Furga A, Zschocke J, Christensen E: **Clinical course, early diagnosis, treatment, and prevention of disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency.** *Neuropediatrics* 1996, **27**:115–123.
6. Kolker S, Christensen E, Leonard JV, Greenberg CR, Boneh A, Burlina AB, Burlina AP, Dixon M, Duran M, Garcia Cazorla A, Goodman SI, Koeller DM, Kyllerman M, Mühlhausen C, Müller E, Okun JG, Wilcken B, Hoffmann GF, Burgard P: **Diagnosis and management of glutaric aciduria type I—revised recommendations.** *J Inher Metab Dis* 2011, **34**:677–694.
7. Strauss KA, Lazovic J, Wintermark M, Morton DH: **Multimodal imaging of striatal degeneration in Amish patients with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency.** *Brain* 2007, **130**:1905–1920.
8. Harting I, Neumaier-Probst E, Seitz A, Maier EM, Assmann B, Baric I, Troncoso M, Mühlhausen C, Zschocke J, Boy NP, Hoffmann GF, Garbade SF, Kölker S: **Dynamic changes of striatal and extrastriatal abnormalities in glutaric aciduria type I.** *Brain* 2009, **132**:1764–1782.
9. Strauss KA, Donnelly P, Wintermark M: **Cerebral haemodynamics in patients with glutaryl-coenzyme A dehydrogenase deficiency.** *Brain* 2010, **133**:76–92.
10. Mühlhausen C, Ergun S, Strauss KA, Koeller DM, Crnic L, Wootner M, Goodman SI, Ullrich K, Braulke T: **Vascular dysfunction as an additional pathomechanism in glutaric aciduria type I.** *J Inher Metab Dis* 2004, **27**:829–834.
11. Zinnanti WJ, Lazovic J, Wolpert EB, Antonetti DA, Smith MB, Connor JR, Wootner M, Goodman SI, Cheng KC: **A diet-induced mouse model for glutaric aciduria type I.** *Brain* 2006, **129**:899–910.
12. Zinnanti WJ, Lazovic J, Housman C, LaNoue K, O'Callaghan JP, Simpson I, Wootner M, Goodman SI, Connor JR, Jacobs RE, Cheng KC: **Mechanism of age-dependent susceptibility and novel treatment strategy in glutaric acidemia type I.** *J Clin Invest* 2007, **117**:3258–3270.
13. Zinnanti WJ, Lazovic J, Housman C, Antonetti DA, Koeller DM: **Mechanism of metabolic stroke and spontaneous cerebral hemorrhage in glutaric aciduria type I.** *Acta Neuropathol Commun* 2014, **2**:13.
14. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ: **Structure and function of the blood–brain barrier.** *Neurobiol Dis* 2010, **37**:13–25.
15. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E: **Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier.** *Nat Rev Neurosci* 2006, **7**:41–53.
16. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M: **The blood–brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications.** *Neurobiol Dis* 2004, **16**:1–13.
17. Luissint AC, Artus C, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud PO: **Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation.** *Fluids Barriers CNS* 2012, **9**:23.
18. Engelhardt B, Sorokin L: **The blood–brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction.** *Semin Immunopathol* 2009, **31**:497–511.
19. Zlokovic BV: **The blood–brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders.** *Neuron* 2008, **57**:178–201.
20. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C: **Endothelial/pericyte interactions.** *Circ Res* 2005, **97**:512–523.
21. Hellström M, Gerhardt H, Kalen M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C: **Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis.** *J Cell Biol* 2001, **153**:543–553.
22. Lange S, Trost A, Tempfer H, Bauer HC, Bauer H, Rohde E, Reitsamer HA, Franklin RJ, Aigner L, Rivera FJ: **Brain pericyte plasticity as a potential drug target in CNS repair.** *Drug Discov Today* 2013, **18**:456–463.
23. 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.** *Neurobiol Dis* 2008, **32**:528–534.
24. Olivera-Bravo S, Fernandez A, Sarlabos MN, Rosillo JC, Casanova G, Jimenez M, Barbeito L: **Neonatal astrocyte damage is sufficient to trigger progressive striatal degeneration in a rat model of glutaric acidemia-I.** *PLoS ONE* 2011, **6**:e20831.
25. Jafari P, Braissant O, Zavadakova P, Henry H, Bonafé L, Ballhausen D: **Ammonium accumulation and cell death in a rat 3D brain cell model of glutaric aciduria type I.** *PLoS ONE* 2013, **8**(1):e53735.
26. Olivera-Bravo S, Isasi E, Fernandez A, Rosillo JC, Jimenez M, Casanova G, Sarlabos MN, Barbeito L: **White Matter Injury Induced by Perinatal Exposure to Glutaric Acid.** *Neurotox Res* 2014, **25**:381–391.
27. Sauer SW, Okun JG, Fricker G, Mahringer A, Muller I, Crnic LR, Mühlhausen C, Hoffmann GF, Horster F, Goodman SI, Harding CO, Koeller DM, Kölker S: **Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood–brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency.** *J Neurochem* 2006, **97**:899–910.
28. Del Valle J, Camins A, Pallas M, Vilaplana J, Pelegri C: **A new method for determining blood–brain barrier integrity based on intracardiac perfusion of an Evans Blue-Hoechst cocktail.** *J Neurosci Methods* 2008, **174**:42–49.
29. Paxinos G, Watson C: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates 6th Ed.* San Diego: Academic Press; 2007.
30. Diaz-Amarilla P, Olivera-Bravo S, Trias E, Cragnolini A, Martinez-Palma L, Cassina P, Beckman J, Barbeito L: **Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis.** *PNAS* 2011, **108**:18126–18131.
31. Villacampa N, Almolda B, González B, Castellano B: **Tomato lectin histochemistry for microglial visualization.** *Methods Mol Biol* 2013, **1041**:261–279.
32. Xu J, Ling EA: **Studies of the ultrastructure and permeability of the blood–brain barrier in the developing corpus callosum in postnatal rat brain using electron dense tracers.** *J Anat* 1994, **184**(Pt 2):227–237.
33. Butt AM, Jones HC, Abbott NJ: **Electrical resistance across the blood–brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study.** *J Physiol* 1990, **429**:47–62.
34. Rakós G, Kis Z, Nagy D, Lur G, Farkas T, Hortobagyi T, Vecsei L, Toldi J: **Evans Blue fluorescence permits the rapid visualization of non-intact cells in the perilesional rim of cold-injured rat brain.** *Acta Neurobiol Exp* 2007, **67**:149–154.
35. Orendáčová J, Marsala M, Marsala J: **The blood–brain barrier permeability in graded postischemic spinal cord reoxygenation in rabbits.** *Neurosci Lett* 1991, **128**(2):143–146.

36. Duran-Vilaregut J, Del Valle J, Camins A, Pallàs M, Pelegrí C, Vilaplana J: **Blood–brain barrier disruption in the striatum of rats treated with 3-nitropropionic acid.** *Neurotoxicology* 2009, **30**(1):136–143.
37. Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D: **Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes.** *Nature* 2006, **443**:700–704.
38. Wilkinson-Berka JL, Babic S, De Gooyer T, Stitt AW, Jaworski K, Ong LG, Kelly DJ, Gilbert RE: **Inhibition of platelet-derived growth factor promotes pericyte loss and angiogenesis in ischemic retinopathy.** *Am J Pathol* 2004, **164**(4):1263–1273.
39. Nishioku T, Dohgu S, Takata F, Eto T, Ishikawa N, Kodama KB, Nakagawa S, Yamauchi A, Kataoka Y: **Detachment of brain pericytes from the basal lamina is involved in disruption of the blood–brain barrier caused by lipopolysaccharide-induced sepsis in mice.** *Cell Mol Neurobiol* 2009, **29**(3):309–316.
40. Fukuda AM, Badaut J: **Aquaporin 4: a player in cerebral edema and neuroinflammation.** *J Neuroinflammation* 2012, **9**:279.
41. Ren Z, Iliff JJ, Yang L, Yang J, Chen X, Chen MJ, Giese RN, Wang B, Shi X, Nedergaard M: **'Hit & Run' model of closed-skull traumatic brain injury (TBI) reveals complex patterns of post-traumatic AQP4 dysregulation.** *J Cereb Blood Flow Metab* 2013, **33**:834–845.
42. Chen ZL, Yao Y, Norris EH, Krueger A, Jno-Charles O, Akhmerov A, Strickland S: **Ablation of astrocytic laminin impairs vascular smooth muscle cell function and leads to hemorrhagic stroke.** *J Cell Biol* 2013, **202**:381–395.
43. Noel G, Stevenson S, Moukhles H: **A high throughput screen identifies chemical modulators of the laminin-induced clustering of dystroglycan and aquaporin-4 in primary astrocytes.** *PLoS ONE* 2011, **6**:e17559.
44. Hirrlinger PG, Pannicke T, Winkler U, Claudepierre T, Varshney S, Schulze C, Reichenbach A, Brunken WJ, Hirrlinger J: **Genetic deletion of laminin isoforms beta2 and gamma3 induces a reduction in Kir4.1 and aquaporin-4 expression and function in the retina.** *PLoS ONE* 2011, **6**:e16106.
45. Krueger M, Hartig W, Reichenbach A, Bechmann I, Michalski D: **Blood–brain barrier breakdown after embolic stroke in rats occurs without ultrastructural evidence for disrupting tight junctions.** *PLoS ONE* 2013, **8**:e56419.
46. Lamp J, Keyser B, Koeller DM, Ullrich K, Bräulke T, Mühlhausen C: **Glutaric aciduria type 1 metabolites impair the succinate transport from astrocytic to neuronal cells.** *J Biol Chem* 2011, **286**:17777–17784.
47. Mühlhausen C, Burckhardt BC, Hagos Y, Burckhardt G, Keyser B, Lukacs Z, Ullrich K, Bräulke T: **Membrane translocation of glutaric acid and its derivatives.** *J Inherit Metab Dis* 2008, **31**:188–193.
48. Alexander B, Smart KA, Segal MB, Preston JE: **Hyperammonaemia reduces intracellular  $^{22}\text{Na}$  (sodium) ion and extracellular  $^{86}\text{Rb}$  ion concentrations in the blood–brain barrier of the rat.** *Metab Brain Dis* 2005, **20**:19–33.
49. Jin X, Chen Z, Liu X, Liang B, Zhang H, Zhang Z: **The expression of endothelial barrier antigen (EBA) and S100B in the rat parietal cortex following brain irradiation.** *Brain Res* 2014, **1558**:84–89.

doi:10.1186/2045-8118-11-15

**Cite this article as:** Isasi et al.: Increased blood–brain barrier permeability and alterations in perivascular astrocytes and pericytes induced by intracisternal glutaric acid. *Fluids and Barriers of the CNS* 2014 **11**:15.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



# Astrocyte Dysfunction in Developmental Neurometabolic Diseases

Silvia Olivera-Bravo, Eugenia Isasi, Anabel Fernández,  
Gabriela Casanova, Juan Carlos Rosillo and Luigi Barbeito

**Abstract** Astrocytes play crucial roles in maintaining brain homeostasis and in orchestrating neural development, all through tightly coordinated steps that cooperate to maintain the balance needed for normal development. Here, we review the alterations in astrocyte functions that contribute to a variety of developmental neurometabolic disorders and provide additional data on the predominant role of astrocyte dysfunction in the neurometabolic neurodegenerative disease glutaric acidemia type I. Finally, we describe some of the therapeutical approaches directed to neurometabolic diseases and discuss if astrocytes can be possible therapeutic targets for treating these disorders.

**Keywords** Astrocytes · Astrocyte dysfunction · Neurodevelopmental diseases · Neurodegeneration · Myelin damage

---

S. Olivera-Bravo (✉) · E. Isasi  
Cellular and Molecular Neurobiology, Instituto de Investigaciones Biológicas  
Clemente Estable (IIBCE), Montevideo, Uruguay  
e-mail: solivera@iibce.edu.uy

E. Isasi  
e-mail: eisasi@iibce.edu.uy

A. Fernández  
Neuroscience Division, IIBCE and Comparative Neuroanatomy-Associated  
Unit to the School of Sciences, UDELAR, Montevideo, Uruguay  
e-mail: afermandez@iibce.edu.uy

G. Casanova  
UMET, School of Sciences, UDELAR, Montevideo, Uruguay  
e-mail: casanova@fcien.edu.uy

J.C. Rosillo  
Neuroscience Division IIBCE, UDELAR, Montevideo, Uruguay  
e-mail: jrosillo@iibce.edu.uy

L. Barbeito  
Neurodegeneration Laboratory, Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay  
e-mail: barbeito@pasteur.edu.uy

## Abbreviations

ALS	Amyotrophic Lateral Sclerosis
AQP4	Aquaporin 4
BBB	Blood–Brain Barrier
GA	Glutaric Acid
GA-I	Glutaric Acidemia Type I
GCDH	Glutaryl CoA Dehydrogenase
GDNF	Glial-Derived Neurotrophic Factor
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
Icv	Intracerebroventricular
IEM	Inborn Errors of Metabolism
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MLC	Megalencephalic Leukoencephalopathy with Subcortical Cysts
NPC	Niemann-Pick type C Disease
NVU	Neurovascular Unit
PC	Pyruvate Carboxylase
VWM	Vanishing White Matter

## Introduction to Astrocyte Functions

As previously discussed in Chapters “[Glial Cells and Integrity of the Nervous System](#),” “[Pharmacological Tools to Study the Role of Astrocytes in Neural Network Functions](#),” and “[Role of Astrocytes in Central Respiratory Chemoreception](#),” astrocytes are indispensable for neuronal survival and activity. They play many key regulatory functions in brain homeostasis, including glutamate uptake that is vital for maintaining a physiological balance and protecting against neurotoxicity (Rothstein et al. 1996). Astrocytes are the only cells in the CNS that store and process glycogen. They thus contribute to influx of glucose and energy intermediates into neurons, and are also a significant source of neurotrophins and antioxidant defenses (Maragakis and Rothstein 2006). Moreover, astrocytes are the nearly unique neural cells that express glutamine synthase, the only brain source of endogenous glutamine, which is the major amino moiety donor for glucose precursors and nitrogenated compounds and the preferred metabolite for inter-organ transport and temporary storage of nitrogen (Haberle et al. 2005, 2011). Astrocytes also participate in blood–brain barrier formation and maintenance (Abbott et al. 2006) and have a unique role in the clearance of brain solutes along veins (Ilf et al. 2013). Mediated by a gap junction-coupled network that allows the direct cytoplasmic passage of ions and small molecules through significant distances, astrocytes communicate with each other and modulate the activity of adjacent cells (Maragakis and Rothstein 2006; Verkhratsky et al. 2012, 2015). In addition, astrocytes have receptors to a wide range



of neurotransmitters, peptides, hormones, and cytokines that regulate their own functions and also influence neurons, oligodendrocytes, and microglia (Maragakis and Rothstein 2006; Verkhratsky et al. 2012, 2015). Although astrocytes are not electrically excitable, they are capable of detecting and modulating neuronal activity by releasing neuroactive substances (glutamate, ATP, D-serine) that can feed back onto presynaptic terminals or stimulate postsynaptic neurons (Araque 2008; Verkhratsky et al. 2012; Pekny and Pekna 2014). Moreover, as each astrocyte domain covers up to  $2 \times 10^6$  synapses, and human astrocytes enhanced learning and memory skills in transplanted rodents (Han et al. 2013), important roles in integrating and processing complex cognitive have been proposed for astrocytes (Araque 2008; Han et al. 2013).

Finally, in damaging conditions, astrocytes can suffer early alterations that elicit downstream mechanisms that have the potential to irreversibly damage neurons and oligodendrocytes. Among the most important astrocyte alterations are included the decreased expression of glutamate transporters and subsequent delayed clearance of synaptic glutamate, impaired glutamate-glutamine cycle, depletion of glutamine and neurotransmitter precursors, reductions in glutathione levels as well as induced expression of nitric oxide synthase and pro-inflammatory cytokines (Maragakis and Rothstein 2006; De Keyser et al. 2008; Verkhratsky et al. 2012, 2015; Pekny and Pekna 2014).

## **Astrocyte Dysfunction and Development: A Focus on Inborn Errors of Metabolism**

Astrocytes play crucial roles during development by actively contributing to the finely coordinated steps required to establish functional neural networks (Clarke and Barres 2013; Chung et al. 2013; Sloan and Barres 2014). Moreover, normal synaptic development and pruning requires this tightly regulated timing and communication between astrocytes and neurons (Helmuth 2001; Eroglu et al. 2009; Dodla et al. 2010). In turn, astrogenesis depends on the signaling of newly formed neurons (Barnabe-Heider et al. 2005). In this context of mutual influence it has been proposed that alterations of astrocyte differentiation or function may irreversibly unbalance the coordinated developmental events, thereby producing neurodevelopmental disorders. Moreover, as most glial cells arise from clonal divisions of early differentiated astrocytes (Ge et al. 2012), if damage occurs early during astrogenesis or in the first astrocytes, it might be sustained and amplified by the clonal descendants, thus perpetuating astrocyte dysfunction (Sloan and Barres 2014) which can further account for neurodevelopmental diseases. In this regard, we will review as astrocyte dysfunction affects neurons and brain development in some inborn errors of metabolism (IEM) with a further focus on glutaric acidemia I, an IEM belonging to the group of neurometabolic diseases because of the very predominant CNS damage over the rest of the body.

## Astrocyte Dysfunction-Associated IEMs: Impact on Neuron Survival

The term inborn errors of metabolism (IEMs) encompasses an enormous group of rare disorders (more than 750) that in common affect about 1:2000 newborns. IEMs are produced by genetic mutations that alter biochemical pathways producing an excess of a damaging substance or deficiency of a normal biochemical compound, both causing toxic effects in the brain and/or the rest of the body (Scriver et al. 1995). Brain and neurons are significantly affected either by a direct toxicity or indirectly by a primary glial cell dysfunction. In the IEMs in which biochemical pathways are primarily altered in astrocytes instead of neurons, astrocyte damage elicit downstream mechanisms such as glutamate receptor-mediated excitotoxicity, lactic acidosis, energetic deprivation, oxidative/nitrosative stress, or neuroinflammation that acting alone or together have the potential to kill neurons (Maragakis and Rothstein 2006; De Keyser et al. 2008; Verkhatsky et al. 2012, 2015; Pekny and Pekna 2014). Furthermore, the imbalance of critical and exclusive astrocytic enzymatic routes such as the glutamine synthase may trigger different neurometabolic diseases associated to either excess or lack of the enzymatic product. In this regard, hepatic encephalopathy (HE) is an IEM characterized by mild to very severe neuropsychiatric manifestations that are attributed to glutamine overload produced by the activity of astrocytic glutamine synthase in response to the brain increased uptake of ammonia produced by liver failure (Butterworth 2010). Excessive brain glutamine causes significant astrocyte swelling that in turn triggers a complex signaling cascade which relies on NMDA receptor activation, elevation of intracellular calcium, and glutamate exocytosis, all together resulting in a self-amplifying signaling loop that causes excitotoxicity and increased oxidative stress that trigger neuron death for one side and sustain astrocyte activation for the other (De Keyser et al. 2008; Butterworth 2010).

Conversely to what is observed in HE, the loss of function of glutamine synthase produces the congenital glutamine synthase deficiency, a very rare IEM that usually causes neonatal death associated with severe brain malformations, including abnormal gyration and white matter lesions. Glutamine starvation impairs both the synthesis of nitrogenated compounds and the nitrogen storage and transport among organs. It is believed that the combination of all of these distorted events produces a systemic collapse which is the main responsible for unviable brain malformations (Haberle et al. 2005, 2011).

Lack of pyruvate carboxylase activity (PC), another metabolic pathway confined to astrocytes, causes the rare autosomal recessive IEM known as PC deficiency, whose neonatal form is characterized by multi-organ metabolic imbalance, lactic acidemia, and significant neurological dysfunction. PC catalyzes the conversion of pyruvate into oxaloacetate which is crucial for the replenishment of citric acid cycle intermediates, gluconeogenesis, synthesis of glycogen, maintenance of the antioxidant glutathione system, and anaplerotic support to neurons (Robinson et al. 1984; Garcia-Cazorla et al. 2006). As the main pathological findings correlate with

impaired astrocytic anaplerosis, it has been proposed that loss of PC leads to generalized hyperammonemia and death in the first few months of life. Likely, this happens because of the impaired astrocyte ammonia buffering and support to microvascular morphogenesis and myelination (Robinson et al. 1984; García-Cazorla et al. 2006). Moreover, as PC is involved in the synthesis of myelin lipids (De Keyser et al. 2008), an altered astrocyte–oligodendrocyte communication may underlie the paucity of myelin and white matter lesions observed in patients.

Niemann-Pick type C disease (NPC) is an autosomal recessive lipid-storage IEM characterized by progressive neurodegeneration, hepatosplenomegaly, and general organ dysfunction. It may be caused by mutations in the NPC-1 gene which in brain is predominantly present in the astrocytic processes closely associated to the nerve terminals (Patel et al. 1999). In NPC animal models, astrocytes become activated, and show decreased gap junctional communication and increased hemichannel activity that might predispose the surrounding neurons to death by either neuroinflammation and/or reduced astrocyte mediated-spatial buffering (Saez et al. 2013). In accordance with a crucial astrocyte role in the disease, rescuing NPC1 expression in astrocytes delays neuronal loss and prolongs life span in NPC1<sup>-/-</sup> mice; and simultaneous NPC1 recovery in neurons and astrocytes exhibited better protection than the sole recovery in neurons (Borbon et al. 2012).

Aceruloplasminemia is another IEM linked to primary astrocyte dysfunction with neuron death as a secondary phenomenon. Its neuropathological hallmarks include excessive iron deposition, astrocyte perivascular endfeet deformation, and progressive neuronal loss (Oide et al. 2006; Miyajima 2015). All defects are attributed to the lack of astrocytic ceruloplasmin ferroxidase activity which mediates the ferrous ion oxidation needed for transferrin-dependent iron efflux. Impaired ferroxidase activity leads to prominent redox-active iron accumulation in astrocytes that causes significant endfeet deformation, lipid peroxidation, and hydroxyl radical formation as well as impaired transferrin/iron shuttle to neurons. Thus, neurons will die either by increased oxidative stress, decreased astrocyte protection, and/or iron starvation (Oide et al. 2006; De Keyser et al. 2008; Miyajima 2015).

## **Astrocyte Dysfunctions and Leukodystrophies: Effects on Myelin Formation**

The term leukodystrophy comprises all of the diseases genetically determined as white matter disorders characterized by abnormal myelin formation (Hagemann et al. 2009; van der Knaap et al. 2006). Astrocyte disturbed functions may also be the leading cause of several leukodystrophies. Alexander disease, a paradigmatic leukodystrophy, clearly manifests as a primary astrocyte dysfunction that compromises myelin development and integrity. It is considered a primary astroglialopathy with myelin alterations as secondary damage (Messing et al. 2012). The only pathological causes known in Alexander disease are the several mutations

in the glial acidic fibrillary protein (GFAP) gene that lead to a toxic gain of function. Astrocytes but no other cells show the defining features of the disease that include hypertrophic cell bodies with GFAP-positive processes and characteristic intracytoplasmic multiprotein aggregates named Rosenthal fibers. As myelin failure and oligodendrocyte loss correlate with increased presence of astrocytic Rosenthal fibers, it is proposed that an altered pattern of the astrocyte signals that promote myelination is the main pathological underlying mechanism (De Keyser et al. 2008; Hagemann et al. 2009; Liem and Messing 2009; Messing et al. 2012) (see Chapter “[Oligodendrocytes: Functioning in a Delicate Balance Between High Metabolic Requirements and Oxidative Damage](#)” for further reading on oligodendrocytes and myelination).

Astrocytes also play a central role in the pathogenesis of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC), which commonly affects infants, lead to progressive spasticity and ataxia, and exhibit myelin splitting and intra-myelin vacuole formation as characteristic features (De Keyser et al. 2008; Ridder et al. 2011). The disease is directly linked to mutations in the MLC1 gene that is mainly expressed in astrocyte perivascular endfeet (Boor et al. 2005); and defective astrocyte MLC1 is enough to elicit myelin damage (Duarri et al. 2011). These findings lead to the proposition that disturbances in astrocytic MLC1 may irreversibly affect myelin by impeding the transport of essential molecules for oligodendrocytes or myelin formation (Duarri et al. 2011). Another paradigmatic leukodystrophy associated with astrocyte dysfunction is the vanishing white matter (VWM) disease that is caused by alterations in the genes that encode for the subunits of the eukaryotic initiation factor eIF2B that is expressed in astrocytes and oligodendrocytes (van der Knaap et al. 2006; Bugiani et al. 2011). VWM is predominantly manifested in early childhood, and usually presents with a rapid clinical decline triggered by stress-related events that may lead to death (van der Knaap et al. 2006). Brain patient samples from patients show astrocytes with an increased proliferation, immature phenotype, abnormal composition of intermediate filament network, and metabolic stress (Bugiani et al. 2011). Loss of white matter may be at least partially explained by excessive astrocyte proliferation at the expense of oligodendrocytes that may occur due to aberrant specification of glial progenitors, as has been shown in astrocytosis linked to myelin alterations found in children born prematurely or surviving cerebral ischemia (Bain et al. 2010).

## **A Novel Mechanism: Astrocyte Dysfunction Sustaining the Pathogenesis of the Neurometabolic IEM GA-I**

In spite of abundant evidence directly linking abnormal astrocyte pathways to neurodevelopmental disorders, the participation of astrocyte dysfunction in complex multifactorial IEMs that selectively affect the brain is much less known. Among these particular IEMs, usually named neurometabolic diseases because the

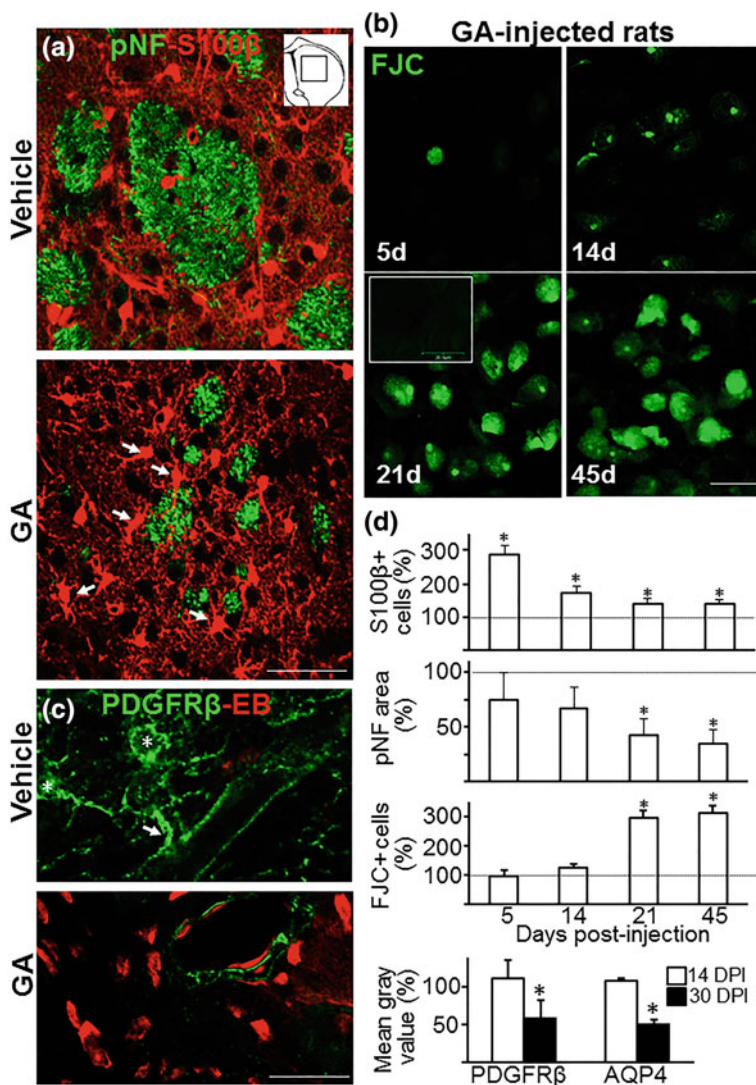
almost exclusive CNS damage over the rest of the body (Scriver et al. 1995), organic acidemias and acidurias comprise a predominant group that includes all abnormal amino acid catabolism pathways. Although most acidemias are characterized by an acute life-threatening stage, some of them present a significant and progressive neurodegenerative component that cannot be directly linked to the accumulation or lack of the metabolites transiently produced by the altered pathways. Moreover, as has been shown for glutaric acidemia type I (GA-I), that is, among the most prevalent organic acidemias/acidurias, the accumulated metabolites may not be directly toxic to neurons (Freudenberg et al. 2004; Olivera-Bravo et al. 2011; Jafari et al. 2013), so the underlying mechanisms remain mostly unknown.

GA-I is characterized by extensive acute striatal and progressive cortical neurodegeneration together with white matter and vascular abnormalities, causing permanent motor and cognitive sequels. The disease is caused by a loss of function of glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH), a mitochondrial enzyme involved in the catabolism of lysine, hydroxylysine, and tryptophan. It results in accumulated millimolar concentrations of glutaric acid (GA) and related metabolites in fluids and tissues (Goodman et al. 1977; Strauss et al. 2003; Funk et al. 2005). In spite of having a strong and progressive neurodegenerative profile, even high concentrations of GA-I metabolites did not directly account for neuron death (Freudenberg et al. 2004); and the GCDH<sup>-/-</sup> mice characterized by permanent high levels of GA-I metabolites do not suffer any neurological deficit (Koeller et al. 2002, 2004). Therefore, based on previous data that showed an altered glutamate uptake in astrocytes exposed to GA (Magni et al. 2009), we propose that instead of neurons, astrocytes are the earliest cell targets of GA-I accumulated metabolites. We have found that astrocytes, but not neurons or oligodendrocytes, respond to pathophysiological concentrations of GA by increasing their proliferation that is mediated by activation of the MEK/ERK pathway, augmenting oxidative stress, and significantly decreasing both their mitochondrial potential and glutathione production (Olivera-Bravo et al. 2008, 2011). Astrocyte increased proliferation was also found when newborn rat pups were injected intracerebroventricularly (icv) with 5 mM GA. Remarkably, astrocytes pretreated with GA were toxic to co-cultured neurons even many days after removing the acid, and GA-injected animals presented delayed striatal neuronal death that became significant only many days after the peak of astrogliosis (Olivera-Bravo et al. 2011). Astrocyte response to GA also preceded delayed oligodendrocyte differentiation, which resulted in a significant and progressive demyelination. Interestingly, striatal axon bundles from GA-injected animals exhibited not only significantly low levels of myelin, but also significant decreases in expression of myelin-associated glycoprotein and myelin-binding protein, suggesting significant white matter damage (Olivera-Bravo et al. 2014). Transmission electron microscopy of the striatum of GA-injected animals showed oligodendrocytes with significant endoplasmic reticulum stress, altered myelination, and thinner axons (Olivera-Bravo et al. 2014), all resembling the progressive myelin alterations reported in affected patients (Bähr et al. 2002; Funk et al. 2005). At the ages analyzed, GA-induced myelination failure was restricted to the basal ganglia, the most vulnerable brain area in GA-I patients

**Fig. 1** Striatal damage elicited upon astrocyte response to GA. **a** Sustained astrocytosis and axonal bundle shrinkage. Newborn rat pups received an icv injection of 1  $\mu\text{g/g}$  GA or vehicle and were sacrificed 30 days postinjection (DPI). At that time, GA-injected rats showed increased number of S100 $\beta$  astrocytes, which present enlarged bodies and stronger processes (*white arrows*) together with reduced phosphorylated neurofilaments (pNF) axonal bundle areas. *Inset* shows the region analyzed at all conditions and ages. **b** Delayed neuronal death. Pictures show an increased labeling of the marker of degenerating neurons, Fluoro-Jade C (FJC), in GA-injected rats. The *inset* shows absence of significant signal in 21 DPI controls when neuron death became significant in GA-injected animals. **c** Altered neurovascular unit (NVU) in GA-injected animals. Platelet-derived growth factor  $\beta$ -receptor (PDGFR $\beta$ ) labeled positive pericyte bodies (\*) and processes contacting blood vessels (*white arrows*) in 30 DPI vehicle-injected animals. In age-matched GA-injected rats, PDGFR $\beta$  immunoreactivity was confined to blood vessels and there appeared abundant Evans Blue positive cells, indicating abnormal permeation through the blood–brain barrier. **d** Quantitation of alterations observed in GA-injected animals. Charts show a significant and early astrocytosis that precedes increasing neuron damage and decreasing expression of NVU components such as pericytes and astrocyte endfeet that were recognized with PDGFR $\beta$  and aquaporin 4 (AQP4), respectively. All data are related to corresponding age-matched controls. Calibration: 40  $\mu\text{m}$  in (**a**), 100  $\mu\text{m}$  in (**b**), 20  $\mu\text{m}$  in (**c**). Asterisks indicate  $p < 0.05$

(Goodman et al. 1977; Strauss et al. 2003, 2007; Funk et al. 2005). On the other hand, GA did not induce acute damage to oligodendrocyte precursors in neonatal pups suggesting the delayed oligodendrocyte cytopathology found several days after a single exposure to GA was produced by an indirect neurotoxic mechanism instead of a direct action. Recently, we have found that the perinatal icv administration of GA caused significant long-lasting alterations in the permeability of the maturing brain–blood barrier (BBB) to substrates of low molecular weight, such as Evans Blue and a significant reduction in the expression of markers of critical components of the neurovascular unit (NVU), including astrocyte podocytes, pericytes, and basal lamina. These findings were statistically significant in the striatum, and a similar trend was described in parietal cortex (Isasi et al. 2014) (Fig. 1), confirming the striatal vulnerability to GA-I metabolites. In summary, our data indicate that a transient increase in GA levels in the CNS triggers an early but long-lasting astrocyte dysfunction that leads to delayed myelination, altered BBB permeability, and NVU failure together with significant loss of striatal neurons. The single exposure to GA not only caused an acute astrocyte response but also a sustained altered phenotype that seems to elicit the sequential events that account for most of the GA-I neurological features (Fig. 2). Thus, GA-induced neurotoxicity in our hands appears to require a complex cellular interplay that, after an initial trigger elicited by toxic levels of GA, can perpetuate itself in ensuing weeks, leading to progressive damage that resembles the alterations seen in patients independently on the occurrence of encephalopathic crises (Bähr et al. 2002; Funk et al. 2005). On the other hand, whereas the genetic model of GA-I expected to reproduce the human disease fails to develop neuronal loss (Koeller et al. 2002, 2004), even after overload with high amounts of lysine to boost endogenous GA production (Seminotti et al. 2012), our icv GA injection model moderately reproduces the encephalopathic crisis, striatal neuronal loss, myelination, and BBB defects reported in patients.





Our evidence also supports a crucial role of astrocytes in GA-I. Astrocytes are preferentially vulnerable because they can actively take up GA (Magni et al. 2009), which leads to mitochondrial dysfunction, increased proliferation, and oxidative stress, all causing a poorly differentiated phenotype with high S100 $\beta$  and low GFAP expression (Olivera-Bravo et al. 2008, 2011). Such inability of astrocytes to fully differentiate may critically compromise their supportive functions, as proposed in Fig. 2. Accordingly, astrocytes from *GCDH*<sup>-/-</sup> mice, which suffer permanently elevated levels of GA-I metabolites, cannot offer normal anaplerotic support to neurons (Lamp et al. 2011), and hyperammonemia caused by selective vulnerability

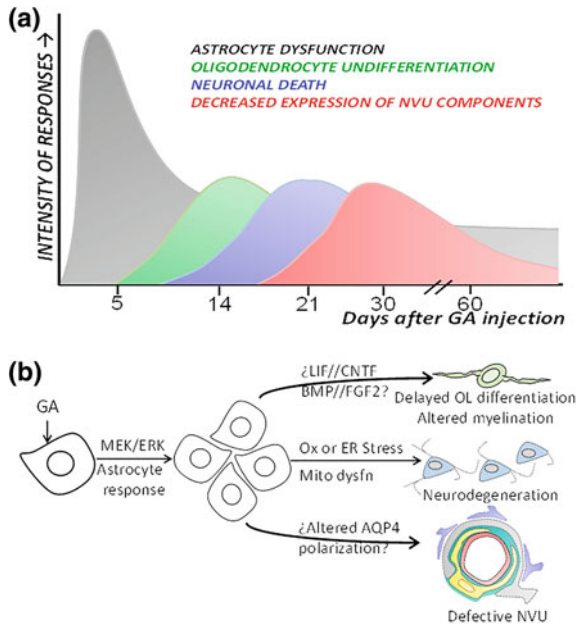
of astrocytes to GA-I metabolites is a leading neurotoxic mechanism in a three-dimensional embryo cultures that also contain neurons and oligodendrocytes (Jafari et al. 2013).

On the other hand, as multiple trophic factors produced by astrocytes are required for the survival of developing oligodendrocytes (Barres et al. 1993; Nash et al. 2011), even small changes in astrocytic function may be detrimental to oligodendrocyte survival and lead to defective myelination, as has been shown in Alexander disease (Liem and Messing 2009; Messing et al. 2012). Regarding BBB and NVU failures, it has been demonstrated that astrocytes are key players in BBB maturation and stabilization (Abbott et al. 2006). The progressive decrease of AQP4 close to blood vessels in GA-injected animals is suggestive of altered astrocyte differentiation and polarization at the NVU and probably of a deficiency of AQP4 in the neurovascular coupling. Moreover, defective laminin and pericytes, both influencing AQP4 polarization, indicate altered communication among NVU components long after GA injection (Isasi et al. 2014). In summary, the “toxic” process has evolved independently of increased GA levels but is tightly dependent on astrocyte dysfunction. Although these events should be studied in GA-I patients, astrocytes must be taken into account not only as a main player in GA-I pathogenesis but also when exploring therapies for this up to now incurable disease.

## Current Therapeutic Approaches For IEMs

Early diagnosis and systemic treatments for IEMs and neurometabolic disorders in particular have in many cases improved quality of life and increased life expectancy. Perinatal or gestational diagnosis pursues disease detection before the occurrence of precipitating crises or worsening of symptoms to allow the preservation of the systemic equilibrium and neurological performance. Disease management at this stage is directed to obtain some amounts of lacking products or avoid the accumulation of toxic compounds that becomes the organism prone to suffer encephalopathic crises (Ruiz Pons et al. 2007). Unfortunately, perinatal screening is available for very few IEMs and most patients are often diagnosed when some symptoms become evident or after the occurrence of crises that usually cause an acute life-threatening stage where the CNS is exposed to huge amounts of toxic compounds. At this time, emergency management looks for the restoration of general homeostasis including the rescue of glucose, oxygen, and pH levels. For example, glucose supplementation provided adequate preferred energetic substrates, and reduced both the demand for alternate substrates and the amino acid turnover in the liver all favoring the return of systemic parameters close to normal values (Zinnanti et al. 2007). The acute life-threatening stage produced during encephalopathic crises is followed by a sub-acute progressive neurodegenerative disorder that currently lacks effective medical treatment. In this period, neurological symptoms become more pronounced and worsening is attributed to the progressive destruction of motor, mental, and/or perceptual abilities, including loss of function





**Fig. 2** Temporal course of astrocyte response to GA and a gliocentric hypothesis for GA-I. **a** The *scheme* shows the early and long-lasting astrocyte response to GA, which was followed by delayed oligodendrocyte differentiation, which in turn preceded significant neuronal death. Significant decreases in the expression of the NVU components PDGFR $\beta$ , AQP4, and laminin close to blood vessels occurred later. **b** Proposed pathological events that occur after perinatal exposure to GA and are mediated by the consequent astrocyte dysfunction, rather than direct effects on oligodendrocytes, neurons, and NVU components. We hypothesized that astrocyte dysfunction may trigger (i) delayed oligodendrocyte (OL) differentiation and altered myelination, probably by a yet unknown imbalance of the astrocyte signals that influence myelination; (ii) astrocyte oxidative stress and mitochondrial dysfunction may account for the progressive neuron death observed; (iii) altered AQP4 polarization or imbalanced astrocyte–endothelial and/or astrocyte–pericyte communication may explain defective NVU composition and increased permeability of blood–brain barrier observed in GA-injected animals. NVU colors: *red* (endothelial cells), *cyan* (basal lamina), *yellow* (pericytes), *gray* (astrocyte endfeet), *blue* (neuronal processes). Abbreviations: *BMP* bone morphogenetic protein; *CNTF* ciliary neurotrophic factor; *ERK* extracellular signal-regulated kinases; *FGF2* fibroblast growth factor 2; *LIF* leukemia inhibitor factor; *MEK* kinase of ERK; Ox/ER stress, oxidative and endoplasmic reticulum stress

and seizures that commonly leads to early death. At this stage, all of the actions are directed to impede the amplification of damage and the recurrence of crises and catabolic states that will produce major sequels. Dietary treatment is the most important tool to avoid recurrence and worsening. It includes all of the manipulations needed to avoid the accumulation of toxic metabolites either by potentiating or inhibiting remaining enzyme action, using alternate substrates, inhibiting its precursors, or administering cofactors that favor enzyme activation such as cobalamin, thiamine, biotin, and riboflavin (Ruiz Pons et al. 2007). In some diseases such

as hepatic encephalopathy, the dietary management aimed at reducing nitrogenous load is accompanied with non-absorbed agents (rifamixin) or enhancement of ammonia removal, all attempting to reduce the levels of blood ammonia and other gut-derived toxins (Butterworth 2010). In GA-I if dietary management starts in the newborn period—before the occurrence of encephalopathic crises—most of the patients remain asymptomatic (Kölker et al. 2012). GA-I usual diets are lysine-free, tryptophan-reduced, and fortified in arginine that competes with lysine to reduce enzymatic substrate availability (Zinnanti et al. 2007; Kölker et al. 2012). A combination of diet with carnitine and emergency treatment has been demonstrated to be effective in preventing neurological disease when the GA-I patient is thought to be at risk (Kölker et al. 2012).

In addition to diet management, as oxidative stress may contribute to the pathophysiology of many IEMs, antioxidant treatment is a common complementary therapeutic approach. It is directed to reduce the brain vulnerability against the attack of oxygen and nitrogen reactive species generated by abnormal metabolites or subsequent mitochondrial dysfunction. In this regard, antioxidants such as ascorbic acid, N-acetylcysteine, folic acid, lipoic acid,  $\alpha$ -tocopherol, and L-carnitine prevented learning/memory deficits and convulsions in animal models of organic acidemias (Ribas et al. 2014) or hepatic encephalopathy (Butterworth 2010). In aceruloplasminemia, the direct attack of iron-mediated lipid peroxidation and oxidative stress with a systemic iron chelation alone or together with oral zinc sulfate administration ameliorated the neurological symptoms (Miyajima 2015).

Symptomatic therapies are usually employed in neurometabolic diseases. For example, antiepileptic drugs sometimes are used to keep patients free of seizures for prolonged periods. Tricyclic antidepressants or CNS stimulants have been shown to ameliorate cataplexy, whereas dystonia and tremor are usually treated with anticholinergic drugs or gamma-aminobutyric acid derivatives when dystonia is advanced (Ruiz Pons et al. 2007).

In summary, in spite of some advances in treatment and development of special diets, IEMs remain as yet incurable diseases with scarce disease-specific therapies and only general approaches that try to preserve overall systems avoiding recurrence of encephalopathic crises.

## **Could Astrocytes Be Therapeutic Targets in IEMs and Developmental Neurometabolic Diseases in Particular?**

The fact that astrocytes accomplish both adaptive and pathological functions makes targeting them difficult. The astrogliosis observed in most neurodevelopmental or neurological diseases is a good example of this problem, whereas glutamate uptake is beneficial because of its antioxidant effects and associated release of neuroprotective agents; reactive astrocytes release inflammatory cytokines, produce reactive

oxygen species, and impede axonal growth (Maragakis and Rothstein 2006; Verkhatsky et al. 2012, 2015; Pekny and Pekna 2014). Another complication in targeting astrocytes is the fact that many of the molecules that astrocyte secrete may be detrimental during some phases of damage, yet advantageous during others. For example, vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase inhibitors acutely increase edema and stroke volume, but many days later both are critical for angiogenesis and recovery (Zhao and Rempé 2010). In spite of these problems, some neuroprotective attempts have been focused on astrocytes. It has been shown that astrocyte-derived neuroprotective factors, such as glial-derived neurotrophic factor (GDNF), reduce neuronal death in animal models of Parkinson Disease, ALS, and stroke (Rappold and Tieu 2010; Vargas and Johnson 2010; Zhao and Rempé 2010). However, side effects and conflicting results in human trials have diminished the enthusiasm for GDNF as a potential treatment (Rappold and Tieu 2010). Similarly, erythropoietin, a neuroprotective molecule released by astrocytes that reduces stroke volume in animal models showed promising results in phase 2, but in phase 3 of clinical trials did not show efficacy (Ehrenreich et al. 2009). The potentiation of astrocyte glutamate uptake by increasing the expression of glutamate transporters has also been explored with promising effects in ALS animal models (Vargas and Johnson 2010), but results in humans are still lacking. Arundic acid reduces the production of S-100 $\beta$ , a calcium-binding protein proposed as indicator of CNS damage, in activated cultured astrocytes (Vargas and Johnson 2010) but was not effective for the treatment of stroke (Zhao and Rempé 2010).

Fewer approaches focused on astrocytes have been made in neurodevelopmental disorders, probably because we are far from having a complete knowledge of astrocyte roles in these diseases. In hepatic encephalopathy, targeting of astrocytic glutamine synthase is proposed as a potential treatment to avoid brain ammonia accumulation (Brusilow et al. 2010), but more results are needed. Compounds that had the ability to reduce GFAP expression alone or together with antioxidant effects or enhanced glutamate astrocytic uptake were employed to ameliorate the GFAP alterations found as the main pathological features of Alexander disease. Whether these findings obtained in cellular models can be easily translated into *in vivo* treatments, and eventually to humans, remains to be seen (Cho et al. 2010; Messing et al. 2012). Our experience in GA-I—that we propose as another primary astroglialopathy—indicates that abrogating the initial astrocyte response to GA with neuroprotective iron porphyrins (Wu et al. 2003) or MAPK inhibitors offers significant neuroprotection in animal models (Olivera-Bravo et al. 2008). Although we do not know the astrocyte pathways that are targeted by these compounds, the early astrocyte response to GA could offer a potential therapeutic window for a selective focus on astrocytes before the occurrence of significant myelin or neuronal damage. Furthermore, as most IEMs are diagnosed after the whole CNS is damaged, it makes unlikely that a pharmacological strategy focused on a single cell type can be successful.

## Concluding Remarks

The diversity and number of IEMs that have already been associated with astrocyte dysfunction are remarkable. However, more significant research is needed to understand what types of astrocyte dysfunction or how astrocytes themselves contribute to the pathogenesis of each of these conditions. During development, adequate neurogenesis and gliogenesis represent only the initial steps for nervous system formation. Furthermore, a close neuron–astrocyte correlation is needed to allow proper development and CNS function. Therefore, no therapeutic intervention or pharmacological manipulation of astrocytes can be assumed solely to affect astrocytes. Instead, each therapeutic approach should target astrocytes in concert with neurons, other glial cells, and the vasculature, because all together will sculpt the response to each strategy and finally determine its efficacy. Therefore, it is necessary to consider the complex cell interactions in the search for efficacious treatments for neurodevelopmental diseases, which represents an enormous challenge.

## References

- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7:41–53
- Araque A (2008) Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biol* 4:3–10
- Bähr O, Mader I, Zschocke J et al (2002) Adult onset glutaric aciduria type I presenting with a leukoencephalopathy. *Neurology* 59(11):1802–1804
- Bain JM, Ziegler A, Yang Z et al (2010) TGF $\beta$ 1 stimulates the over-production of white matter astrocytes from precursors of the “brain marrow” in a rodent model of neonatal encephalopathy. *PLoS ONE* 5(3):e9567
- Barnabe-Heider F, Wasylanka JA, Fernandes KJL et al (2005) Evidence that embryonic neurons regulate the onset of cortical gliogenesis via cardiotrophin-1. *Neuron* 48:253–265
- Barres BA, Schmid R, Sendtner M et al (1993) Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development* 118(1):283–295
- Boor PK, de Groot K, Waisfisz Q et al (2005) MLC1: a novel protein in distal astroglial processes. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:412–419
- Borbon I, Totenhagen J, Fiorenza MT et al (2012) Niemann-Pick C1 mice, a model of “juvenile Alzheimer’s disease”, with normal gene expression in neurons and fibrillary astrocytes show long term survival and delayed neurodegeneration. *J Alzheimers Dis* 30:875–887
- Brusilow SW, Koehler RC, Traystman RJ et al (2010) Astrocyte glutamine synthetase: importance in hyperammonemic syndromes and potential target for therapy. *Neurotherapeutics* 7(4):452–470
- Bugiani M, Boor I, van Kollenburg B et al (2011) Defective glial maturation in vanishing white matter disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 70:69–82
- Butterworth RF (2010) Altered glial-neuronal crosstalk: cornerstone in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochem Int* 57:383–388
- Cho W, Brenner M, Peters N et al (2010) Drug screening to identify suppressors of GFAP expression. *Hum Mol Genet* 19:3169–3178
- Chung W-S, Clarke LE, Wang GX et al (2013) Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* 504:394–400

- Clarke LE, Barres BA (2013) Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev Neurosci* 14:311–321
- De Keyser J, Mostert JP, Koch MW (2008) Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. *J Neurol Sci* 267:3–16
- Dodla MC, Mumaw J, Stice SL (2010) Role of astrocytes, soluble factors, cells adhesion molecules and neurotrophins in functional synapse formation: implications for human embryonic stem cell derived neurons. *Curr Stem Cell Res Ther* 5:251–260
- Duari A, Lopez de Heredia M, Capdevila-Nortes X et al (2011) Knockdown of MLC1 in primary astrocytes causes cell vacuolation: a MLC disease cell model. *Neurobiol Dis* 43:228–238
- Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H et al (2009) Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke* 40(12):e647–656
- Eroglu C, Allen NJ, Susman MW et al (2009) Gabapentin receptor alpha 2 delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell* 139:380–392
- Freudenberg F, Lukacs Z, Ullrich K (2004) 3-Hydroxyglutaric acid fails to affect the viability of primary neuronal rat cells. *Neurobiol Dis* 16(3):581–584
- Funk CB, Prasad AN, Frosk P et al (2005) Neuropathological, biochemical and molecular findings in a glutaric acidemia type 1 cohort. *Brain* 128:711–722
- Garcia-Cazorla A, Rabier D, Touati G et al (2006) Pyruvate carboxylase deficiency: metabolic characteristics and new neurological aspects. *Ann Neurol* 59:121–127
- Ge W-P, Miyawaki A, Gage FH et al (2012) Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex. *Nature* 484:376–380
- Goodman SI, Norenberg MD, Shikes RH et al (1977) Glutaric aciduria: biochemical and morphologic considerations. *J Pediatr* 90:746–750
- Haberle J, Gorg B, Rutsch F et al (2005) Congenital glutamine deficiency with glutamine synthetase mutations. *N Engl J Med* 353:1926–1933
- Haberle J, Shahbeck N, Ibrahim K et al (2011) Natural course of glutamine synthetase deficiency in a 3 year old patient. *Mol Genet Metab* 103(1):89–91
- Hagemann TL, Boelens WC, Wawrousek EF et al (2009) Suppression of GFAP toxicity by  $\alpha\beta$ -crystallin in mouse models of Alexander disease. *Hum Mol Genet* 18(7):1190–1199
- Han X, Chen M, Wang F et al (2013) Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. *Cell Stem Cell* 12:342–353
- Helmuth L (2001) Glia tell neurons to build synapses. *Science* 291:569–570
- Illiff JJ, Lee H, Yu M et al (2013) Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI. *J Clin Invest* 123:1299–1309
- Isasi E, Barbeito L, Olivera-Bravo S (2014) Increased blood–brain barrier permeability and alterations in perivascular astrocytes and pericytes induced by intracisternal glutaric acid. *Fluids Barriers CNS* 11:15
- Jafari P, Braissant O, Zavadakova P et al (2013) Ammonium accumulation and cell death in a rat 3D brain cell model of glutaric aciduria type I. *PLoS ONE* 8(1):e53735
- Koeller DM, Woontner M, Crnic LS et al (2002) Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I. *Hum Mol Genet* 11:347–357
- Koeller DM, Sauer S, Wajner M et al (2004) Animal models for glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inher Metab Dis* 27:813–818
- Kölker S, Boy SP, Heringer J et al (2012) Complementary dietary treatment using lysine-free, arginine-fortified amino acid supplements in glutaric aciduria type I—a decade of experience. *Mol Genet Metab* 107(1–2):72–80
- Lamp J, Keyser B, Koeller DM et al (2011) Glutaric aciduria type 1 metabolites impair the succinate transport from astrocytic to neuronal cells. *J Biol Chem* 286:17777–17784
- Liem RK, Messing A (2009) Dysfunctions of neuronal and glial intermediate filaments in disease. *J Clin Invest* 119:1814–1824
- Magni DV, Furián AF, Oliveira MS et al (2009) Kinetic characterization of l-[(3)H]glutamate uptake inhibition and increase oxidative damage induced by glutaric acid in striatal synaptosomes of rats. *Int J Dev Neurosci* 27:65–72

- Maragakis NJ, Rothstein JD (2006) Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2(12):679–689
- Messing A, Brenner M, Feany MB et al (2012) Alexander disease. *J Neurosci* 32(15):5017–5032
- Miyajima H (2015) Aceruloplasminemia. *Neuropathology* 35:83–90
- Nash B, Thomson CE, Lington C et al (2011) Functional duality of astrocytes in myelination. *J Neurosci* 31:13028–13108
- Oide T, Yoshida K, Kaneko K et al (2006) Iron overload and antioxidative role of perivascular astrocytes in aceruloplasminemia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 32:170–176
- Olivera-Bravo S, Fernández A, Latini A et al (2008) Astrocytic proliferation and mitochondrial dysfunction induced by accumulated glutaric acidemia I (GAI) metabolites: possible implications for GAI pathogenesis. *Neurobiol Dis* 32:528–534
- Olivera-Bravo S, Fernández A, Sarlabós MN et al (2011) Neonatal astrocyte damage is sufficient to trigger progressive striatal degeneration in a rat model of Glutaric Acidemia-I. *PLoS ONE* 6: e20831–20840
- Olivera-Bravo S, Isasi E, Fernández A et al (2014) White matter injury induced by perinatal exposure to glutaric acid. *Neurotox Res* 25:381–391
- Patel SC, Suresh S, Kumar U et al (1999) Localization of Niemann-Pick C1 protein in astrocytes: implications for neuronal degeneration in Niemann-Pick type C disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1657–1662
- Pekny M, Pekna M (2014) Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev* 94(4):1077–1098
- Rappold PM, Tieu K (2010) Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease. *Neurotherapeutics* 7(4):413–423
- Ribas GZ, Vargas CR, Wajner M (2014) L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders. *Gene* 533:469–476
- Ridder MC, Boor I, Lodder JC et al (2011) Megalencephalic leucoencephalopathy with cysts: defect in chloride currents and cell volume regulation. *Brain* 134:3342–3354
- Robinson BH, Oei J, Sherwood WG et al (1984) The molecular basis for the two different clinical presentations of classical pyruvate carboxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 36:283–294
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA et al (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675–686
- Ruiz Pons M, Sanchez-Valverde Visus F, Dalmau Serra J et al (2007) Nutritional treatment of inborn errors of metabolism, 1st edn. Ergon, Madrid
- Saez JP, Orellana JA, Vega-Riveros N et al (2013) Disruption in connexin-based communication is associated with intracellular  $Ca^{2+}$  signal alterations in astrocytes from Niemann-Pick Type C mice. *PLoS ONE* 8(8):e71361
- Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (1995) The metabolic and molecular bases of inherited disease, 7th edn. McGraw-Hill, New York
- Seminotti B, da Rosa MS, Fernandes CG et al (2012) Induction of oxidative stress in brain of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice by acute lysine administration. *Mol Genet Metab* 106:31–38
- Sloan SA, Barres BA (2014) Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders. *Curr Opin Neurobiol* 27:75–81
- Strauss KA, Puffenberger EG, Robinson DL et al (2003) Type I glutaric aciduria, part 1: natural history of 77 patients. *Am J Med Gen Part C Semin Med Gen* 121C:38–52
- Strauss KA, Lazovic J, Wintermark M et al (2007) Multimodal imaging of striatal degeneration in Amish patients with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Brain* 130:1905–1920
- van der Knaap MS, Pronk JC, Scheper GC (2006) Vanishing white matter disease. *Lancet Neurol* 5:413–423
- Vargas MR, Johnson JA (2010) Astrogliosis in amyotrophic lateral sclerosis: role and therapeutic potential of astrocytes. *Neurotherapeutics* 7(4):471–481
- Verkhatsky A, Sofroniew MV, Messing A et al (2012) Neurological diseases as primary gliopathies: a reassessment of neurocentrism. *ASN Neuro* 5:4(3)

- Verkhatsky A, Nedergaard M, Hertz L (2015) Why are astrocytes important? *Neurochem Res* 40 (2):389–401
- Wu AS, Kiaei M, Aguirre N et al (2003) Iron porphyrin treatment extends survival in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 85:142–150
- Zhao Y, Rempe DA (2010) Targeting astrocytes for stroke therapy. *Neurotherapeutics* 7 (4):439–451
- Zinnanti WJ, Lazovic J, Housman C et al (2007) Mechanism of age-dependent susceptibility and novel treatment strategy in glutaric acidemia type I. *J Clin Invest* 117:3258–3270

## Listado de otras publicaciones científicas

- Olivera-Bravo S, Seminotti B, **Isasi E**, Ribeiro C, Leipnitz G, Wootner M, Goodman SI, Souza D, Barbeito L, Wajner M. **Long lasting high lysine diet aggravates white matter injury in glutaryl-CoA dehydrogenase deficient (Gcdh<sup>-/-</sup>) mice.** *Mol Neurobiol.* **2018.**
- 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 Tissue Res.* **2017**; 370(3):391-401.
- Olivera-Bravo S, Ribeiro CA, **Isasi E**, Trías E, Leipnitz G, Díaz-Amarilla P, Wootner M, Beck C, Goodman SI, Souza D, Wajner M, Barbeito L. **Striatal neuronal death mediated by astrocytes from the Gcdh<sup>-/-</sup> mouse model of glutaric acidemia type I.** *Hum Mol Genet.* **2015**; 24(16):4504-15.
- Olivera-Bravo S, **Isasi E**, Fernández A, Rosillo JC, Jiménez M, Casanova G, Sarlabós MN, Barbeito L. **White matter injury induced by perinatal exposure to glutaric acid.** *Neurotox Res.* **2014**; 25(4):381-91.
- Trias E, Díaz-Amarilla P, Olivera-Bravo S, **Isasi E**, Drechsel DA, Lopez N, Bradford CS, Ireton KE, Beckman JS, Barbeito L. **Phenotypic transition of microglia into astrocyte-like cells associated with disease onset in a model of inherited ALS.** *Front Cell Neurosci.* **2013**; 7:274.