



Licenciatura en Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Disminución de la reactividad glial por un fármaco antineoplásico en un modelo animal de Esclerosis Lateral Amiotrófica

Tesis de grado
Orientación Neurociencias
Bachiller: Sofía Ibarburu

Tutor: Emiliano Trias

Co-Tutor: Pablo Díaz-Amarilla

Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Laboratorio de Neurodegeneración
Institut Pasteur de Montevideo

Montevideo, noviembre de 2014

Quiero agradecer...

...a Emiliano y Pablo, porque me tuvieron la paciencia y la confianza para dejarme trabajar a su lado, y me enseñaron todo de lo que hoy se, por lo que son parte más que fundamental de este trabajo.

...a Luís por su confianza, y por dejarme ser parte de este grupo dándome la oportunidad de trabajar de lo que realmente me gusta.

...a Silvia y mis compañeras de laboratorio del IIBCE con quienes compartimos el día a día

...a mis compañeras del IPMON con las que estoy empezando a trabajar

...a Flavio y Adriana, integrantes del tribunal, que aceptaron amablemente corregir este trabajo.

...a mis amigos, con quienes hemos compartido todos estos años de carrera.

...y por supuesto, a mi familia, de quien he tenido, tengo y tendré siempre, apoyo incondicional.

ÍNDICE	Pág.
Resumen	3
INTRODUCCIÓN	4
Hipótesis.....	10
Objetivo.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Modelo Animal.....	11
Genotipado por PCR.....	11
Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	15
Revelado.....	16
Tratamiento con Busulfán in vivo	17
Perfusión y disección de tejido	17
Inclusión de médula espinal y cortes	17
Inmunohistoquímica	18
Análisis por microscopía confocal y epifluorescencia	20
Cuantificación de células AbAs y microgliales presentes en la médula espinal degenerante	24
Análisis estadístico	24
Cultivos de médula espinal degenerante de animales SOD1 ^{G93A}	25
RESULTADOS	26
Efecto del Busulfán sobre el número de células AbAs obtenidas en cultivos primarios de médula espinal	26
El <i>Busulfán</i> previene la aparición de células AbAs en la médula espinal.....	26
Efecto del Busulfán sobre la reactividad microglial en ratas SOD1 ^{G93A} sintomáticas.....	29
DISCUSIÓN	33
Conclusión.....	37
Perspectiva	37
BIBLIOGRAFÍA	38

Resumen

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa, caracterizada por una parálisis muscular progresiva, como resultado de la muerte selectiva de motoneuronas (MTNs). En esta enfermedad, como en muchas otras enfermedades neurodegenerativas, las células gliales juegan un papel importante en la progresión, ya que contribuyen a la formación del ambiente neuro-inflamatorio. Nuestro grupo logró aislar una población glial con fenotipo aberrante, denominadas AbAs, en un modelo animal de ELA, en ratas transgénicas que sobre expresan el gen SOD1 humano con la mutación G93A. Las células AbAs contribuyen a la muerte de MTNs y se caracterizan por proliferar a gran velocidad en ratas sintomáticas e inducir factores neurotóxicos. El objetivo del presente trabajo fue determinar si la quimioterapia con un agente antineoplásico alquilante como el *Busulfán*, podía disminuir el número de células AbAs en la médula espinal en degeneración de ratas SOD1^{G93A}. El *Busulfán* fue inyectado por vía intraperitoneal (25 mg/kg/día) durante 4 días, en ratas con síntomas de parálisis muscular. Luego, las ratas fueron sacrificadas y analizadas por inmunohistoquímica. El tratamiento con *Busulfán* causó una eliminación del 70% de células AbAs, así como una disminución significativa de la microgliosis y la proliferación celular en la médula. En otro experimento, se realizó el tratamiento con *Busulfán* para depletar las células AbAs en la médula espinal y a las 24 horas se realizó el cultivo para obtener células AbAs in vitro. El tratamiento con *Busulfán* disminuyó significativamente el número de células aisladas, y no se pudieron obtener células AbAs. El conjunto de estos resultados, permiten concluir que las células AbAs son sensibles a la quimioterapia antineoplásica y que ésta también modula negativamente la microgliosis observada en la fase sintomática de la enfermedad. En futuros experimentos se estudiará la posible adaptación de este tratamiento para modificar el curso de la parálisis en ratas ELA.

INTRODUCCIÓN

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa, que se caracteriza por el desarrollo de una parálisis muscular progresiva como resultado de la muerte selectiva de motoneuronas (MTNs) en la corteza cerebral, el tallo cerebral y la médula espinal (1). El término “amiotrófica” hace referencia a la atrofia de las fibras musculares que acompaña a la degeneración de MTNs y a la parálisis; la expresión, “lateral amiotrófica”, hace referencia al endurecimiento y cicatrización de los tractos anteriores y laterales de la médula espinal, como consecuencia de la degeneración de los axones cortico-espinales y la degeneración de las MTNs de esta área (2). En la mayoría de los casos (90%) la enfermedad aparece de manera esporádica, es decir que no posee un componente genético evidente, y aproximadamente el 10% son heredadas de manera autosómica dominante (estas últimas son conocidas como familiares). A pesar de las diferencias genéticas estas dos formas de ELA son clínicamente indistinguibles. Los síntomas característicos de la ELA son: I) debilidad y atrofia muscular progresiva, seguido por parálisis progresiva, como consecuencia de la pérdida incesante de MTNs, II) fasciculaciones asociadas a la denervación muscular, III) exaltación de los reflejos tendinosos, que reflejan la pérdida de control inhibitorio por la degeneración de la vía cortico-espinal. Este fenómeno de muerte neuronal viene acompañado de un proceso conocido como gliosis reactiva, que es la activación de las células de la glía, que actúan en respuesta al daño neuronal. En el caso de la ELA las células de la glía que contribuyen en mayor medida a la formación de un ambiente tóxico para las MTNs son los astrocitos y la microglía (3).

De los casos de ELA familiar, un 10-20% son causados por mutaciones en el gen que codifica la enzima citosólica Cu/Zn Superóxido Dismutasa-1 (SOD1) (4). Se han identificado más de 100 mutaciones en el gen que codifica para SOD1 capaces de generar la enfermedad (5). El desarrollo de la enfermedad no está asociado a una pérdida de función de la SOD1 mutada, sino a una ganancia de función, que la hace neurotóxica. Ésta ha sido vinculada a la formación de agregados que inhiben la maquinaria de

proteosomas, disminuyen la actividad de chaperonas, y desregulan la función de organelos incluyendo Golgi, retículo endoplasmático y mitocondrias (6). La identificación y aislamiento de estas mutaciones a partir de pacientes con ELA hereditaria ha permitido el desarrollo de modelos animales murinos de la enfermedad (7-9). En estos animales, la sobre-expresión de algunas mutaciones de SOD1 recapitulan fenómenos fisiopatológicos similares a los que ocurren en el ser humano, como la muerte de MTNs, la degeneración muscular y la subsiguiente parálisis progresiva hasta la muerte. Cabe destacar, que la expresión de la SOD1 mutada exclusivamente en neuronas (10, 11) o en astrocitos (12) no genera el desarrollo de la enfermedad. Esto indica que es necesaria expresión de la SOD1 mutada en más de una población celular para generar la enfermedad. La ELA es una enfermedad no autónoma celular que afecta tanto a las MTNs como a las células gliales que las rodean, siendo la microgliosis uno de los principales componentes que contribuyen a la neurodegeneración (13).

Las células microgliales constituyen el principal componente del sistema inmune en el Sistema Nervioso Central (SNC) y funcionan como macrófagos residentes (14). Tienen la capacidad de matar y fagocitar virus, bacterias y otros agentes extraños que invaden el sistema, y pueden remover detritos como parte de los procesos de cicatrización de heridas y reparación de tejidos(15). Las células microgliales derivan de precursores de la línea hematopoyética que se infiltran y establecen en el SNC en etapas tempranas del desarrollo. Tienen gran capacidad proliferativa y migran activamente cuando ocurre un daño (16). En su estado “arrestado” la microglía es la encargada de censar el microambiente en el que se encuentra y juega un papel importante en el correcto funcionamiento de las sinapsis neuronales principalmente durante el desarrollo postnatal (17, 18). Una característica importante es su bajo umbral de activación que le permite responder, directa o indirectamente, a pequeños cambios que ocurren en el SNC (19). Frente al daño del sistema la microglía adquiere un fenotipo activado, caracterizado por cambios estructurales, síntesis y liberación de diversos factores pro- o anti-inflamatorios, como citoquinas y/o quemoquinas (20). La activación microglial se produce en cuestión de minutos, pero se puede mantener activa por un

largo período de tiempo (21), convirtiéndose en la inflamación crónica característica de las patologías neurodegenerativas. En su forma activa la microglía puede adquirir dos fenotipos, uno pro inflamatorio, conocido como M1, este surge por activación clásica de la microglía por componentes microbianos o citoquinas pro-inflamatorias, y uno antiinflamatorio, conocido como M2, que surge por activación alternativa (20).

En la ELA la activación microglial es un componente principal en la patología del SNC. La microglía adulta SOD1^{G93A} ha mostrado ser tóxica para las MTNs in vitro (22). Se ha reportado en varias ocasiones un aumento en el número de células microgliales activadas en la sustancia gris de la médula espinal en la fase sintomática de la enfermedad, y un aumento durante la progresión de la patología (23, 24). La activación de la microglía está vinculada a la progresión de la enfermedad, y no al inicio de la misma (25). En el modelo murino de ELA la microglía parece pasar de un fenotipo M2, neuroprotector, a un fenotipo M1, a medida que avanza la enfermedad, pudiendo inducir daño neuronal mediante la secreción, por la ruta clásica del NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-1 β (26), y por reducción de la expresión y liberación de factores tróficos (27).

Algunos de los marcadores típicos que podemos encontrar en las células microgliales son: Iba1 que se encuentra en bajas concentraciones y difuso en el citoplasma y aumenta notablemente su expresión en la microglía activa, está asociada a las funciones de migración y fagocitosis de las mismas (28); MHC de clase II (MHCII) que se expresa constitutivamente a bajos niveles, y frente a neuropatologías infecciosas, enfermedad autoinmune, trauma, isquemia, o condiciones neurodegenerativas, aumentan su número notablemente transformando a la microglía en una célula presentadora de antígeno (29); y CD68 un marcador típico de fagocitosis que en ELA ya se ve aumentada en la fase pre-clínica de la enfermedad (30).

Los astrocitos son células gliales que poseen una gran variedad de funciones esenciales en el mantenimiento de un correcto funcionamiento del SNC. Tienen

funciones críticas en la maduración de las neuronas, en la formación de sinapsis, en la supervivencia neuronal durante el desarrollo, en la regulación de la angiogénesis, y en mantener un ambiente viable para las neuronas (31, 32). Son un reservorio importante de glucógeno, el cual, dependiendo de la actividad que presenten las neuronas, se degrada a lactato, el cual es utilizado por estas y los oligodendrocitos como fuente de energía (33), y juegan un rol vital en el mantenimiento de la homeostasis iónica y osmótica, mediada principalmente por flujos de potasio y agua, respectivamente. Además, los astrocitos cumplen un rol de células secretoras de factores tróficos, como los son, los factores neurotróficos derivados del cerebro (BDNF), factores neurotróficos derivados de células gliales (GDNF), y el factor de crecimiento nervioso (NGF). Estos factores juegan un papel importante en el desarrollo y la plasticidad del SNC, regulando el crecimiento de los axones y dendritas, y modificando en muchos casos la plasticidad neuronal (34). La respuesta de los astrocitos en condiciones patológicas es muy heterogénea. En algunas circunstancias es posible observar una degeneración astrocitaria con una consecuente pérdida de función, y en otros casos se puede observar cambios morfológicos que llevan a una hipertrofia y proliferación, esto último se conoce como estado reactivo (astrogliosis), y es lo que se observa en la ELA, (35).

La astrocitosis reactiva es la respuesta astrocitaria durante el curso de injurias del SNC, incluyendo las enfermedades neurodegenerativas. Muchos estudios han llevado a comprender el importante papel que desempeñan los astrocitos en el desarrollo de estas enfermedades (34, 36). Los procesos básicos que sufren estas células cuando adquieren este estado, involucran hipertrofia celular y cambios en la expresión genética. La respuesta astrocitaria frente al daño está caracterizada por hipertrofia de los núcleos y de los cuerpos celulares, aumento de la proliferación y por el desarrollo de procesos gruesos y largos con un alto contenido de GFAP (del inglés *Glial Fibrillary Acidic Protein*) y S100 β .

Los astrocitos pueden provocar la muerte de MTNs a través de diversos mecanismos. Estudios realizados en modelos de ELA han reportado numerosos mecanismos mediante los cuales los astrocitos, en su estado

reactivo, pierden su papel protector y llevan a la muerte de MTNs. Una de estas vías de muerte incluye la toxicidad mediada por NGF liberado por los astrocitos, luego de ser inducidos por FGF1, a través del receptor de neurotrofinas p75 re - expresado en MTNs en condiciones patológicas en el SNC (37-39). También la disfunción mitocondrial asociado al estrés nitro-oxidativo observado en astrocitos SOD1^{G93A} promueve la muerte de las MTNs circundantes (40).

Recientemente en el laboratorio se logró aislar, de la médula espinal degenerante de ratas SOD1^{G93A} durante la fase sintomática, un sub-tipo celular con fenotipo astrocitario nunca antes descrito, y se le denominó células AbAs (acrónimo en inglés de **Aberrant Astrocytes**) (41).

Las células AbAs presentan un patrón de marcadores astrocitarios distintivos - GFAP, S100 β , Conexina 43 y glutamina sintasa-, un aumento notable de la tasa proliferativa (dos veces la tasa de los astrocitos neonatales) y falta de senescencia replicativa. Estas células mostraron ser altamente tóxicas para las MTNs en cultivo, siendo las células más tóxicas para MTNs hasta el momento identificadas. Además las células AbAs BrdU+ y Ki67+ pudieron ser identificadas rodeando a las MTNs en degeneración en la médula espinal de ratas SOD1^{G93A} durante la fase sintomática, lo que sugiere que proliferan en el cuerno ventral conforme va progresando la parálisis de la rata (41). Estudios posteriores en nuestro laboratorio mostraron que las células AbAs en cultivo derivan de una transformación fenotípica de la microglía aislada de la médula espinal sintomática (42). Luego de aproximadamente 20 días in vitro las células con fenotipo microglial (Iba1+, CD11b+, CD68+), comienzan a expresar marcadores típicos astrocitarios (GFAP+, S100 β) hasta que alcanzan confluencia y un fenotipo típico de astrocitos. Además se mostró que las células AbAs que proliferan en la médula espinal en degeneración co-expresan marcadores astrocitarios (GFAP) y microgliales (Iba1 y CD163)

Teniendo en cuenta estos resultados, podríamos pensar en la posibilidad de que disminuyendo el número de células AbAs proliferantes, así como los niveles inflamatorios, consecuencia de la activación de la microglía en la

médula espinal en degeneración, se podría enlentecer el curso de la ELA en el modelo murino SOD1^{G93A}. Una posible estrategia para disminuir el número de células AbAs sería la utilización de agentes antineoplásicos. Estos son sustancias de origen natural o sintético que afectan el ciclo replicativo de las células, y son comúnmente utilizados en terapias contra el cáncer. Uno de esos agentes, que es utilizado actualmente en terapias dirigidas a disminuir el número de células proliferantes en los casos de leucemia, es el *Busulfán*.

El *Busulfán* es un agente antineoplásico alquilante que interfiere en la replicación del ADN, teniendo como consecuencia una disminución en la proliferación celular. Actualmente es utilizado en terapias contra algunos tipos de leucemia. Este fármaco penetra en las células mediante difusión pasiva, en medio acuoso se hidroliza para liberar grupos metil-sulfonatos lo que produce iones carbonio que alquilan el ADN, estos reaccionan con residuos de guanina del ADN lo que provoca una lectura errónea del código del ADN y la ruptura de la cadena simple. Se considera que el daño del ADN, en células que se dividen rápidamente, es el responsable de gran parte de la citotoxicidad del *Busulfán*. En el presente trabajo se estudió la posibilidad de modular el ambiente neuroinflamatorio, que se observa en la fase sintomática de la enfermedad, mediante la utilización del agente antineoplásico *Busulfán*.

Hipótesis

Como el principal atributo funcional de la células AbAs es su activa proliferación, éstas podrían ser blanco de un agente antineoplásico como el *Busulfán*, provocando así su eliminación. De esta manera se podría determinar la contribución de estas células al ambiente neuroinflamatorio de la ELA y a la progresión clínica de la parálisis.

Objetivo

Nuestro objetivo ha sido “determinar el efecto de un fármaco antineoplásico sobre la respuesta neuroinflamatoria en la ELA”. Para esto se analizó la respuesta de las células AbAs así como de las células microgliales al tratamiento con Busulfán.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo Animal

Como modelo de estudio se utilizaron ratas transgénicas que expresan la mutación G93A de la enzima Cu, Zn superóxido dismutasa-1 (SOD1^{G93A}) humana. Estas fueron comparadas con ratas no transgénicas de la misma camada. Los animales a utilizar fueron seleccionados de partos de cruzamientos de machos heterocigotos para el gen mutante con hembras no transgénicas. Como la segregación de este gen se da de forma mendeliana, se espera obtener un 50% de crías que posean el gen que porta la SOD1 mutada y un 50% de crías no transgénicas aproximadamente. Para saber cuáles crías son transgénicas y cuáles no se realizó el genotipado de las mismas utilizando como método la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico extraído de la cola (9).

Genotipado por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica in vitro utilizada para amplificar enzimáticamente una región determinada de ADN situada entre dos regiones de ADN cuya secuencia se conoce. Con esta técnica incluso un único ejemplar de un gen puede amplificarse hasta un millón de ejemplares en tan solo unas pocas horas. Las técnicas de PCR se han hecho indispensables para muchos procedimientos comunes, como la clonación de fragmentos específicos de ADN, la detección e identificación de genes para diagnóstico y medicina legal, y en la investigación de modelos de expresión de genes.

Principios de la PCR

La PCR se basa en el mecanismo de la replicación in vivo del ADN: el ADN bicatenario se desenrolla y pasa a ADN monocatenario, se duplica y se vuelve a enrollar.

Esta técnica consiste en ciclos repetitivos de:

1. Desnaturalización. En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del molde, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como molde para el siguiente paso.

2. Hibridación. En esta etapa, los cebadores se alinean al extremo 3' del molde previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo molde-cebador, es importante que la temperatura de hibridación sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60°C. Si el diseño de los cebadores es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.

3. Extensión. En esta etapa, los cebadores se extienden a lo largo de la secuencia diana utilizando una ADN polimerasa termoestable (frecuentemente se trata de la ADN Taq polimerasa) en presencia de dNTP, lo que produce la duplicación del material diana inicial. La temperatura de trabajo ideal para la ADN polimerasa Taq es de 72 °C. Cuando los cebadores se han extendido unas cuantas bases, ejercen una atracción iónica más fuerte sobre el ADN molde, lo que reduce la probabilidad de que se invierta el proceso. Los cebadores que no se corresponden exactamente se vuelven a soltar (debido a la temperatura elevada) y no dan lugar a la extensión del fragmento. Las bases (complementarias del ADN molde) se unen al cebador en el extremo 3' (la polimerasa añade dNTP desde 5' hacia 3', leyendo el ADN molde desde 3' hacia 5'). El tiempo necesario para las fases de extensión del cebador puede aumentar si es larga la región de ADN que se va a amplificar; sin embargo, en la mayoría de experimentos de PCR es suficiente un tiempo de 1 min para conseguir una extensión completa.

Tras cada ciclo, las hebras de ADN recién sintetizadas pueden servir de ADN molde para el ciclo siguiente.

El proceso de la PCR ha podido automatizarse gracias a dos importantes avances:

1. El uso de ADN polimerasas termoestables, que resisten a la inactivación a temperaturas elevadas; así pues, es posible que una alícuota inicial de polimerasa se mantenga a lo largo de muchos ciclos del protocolo. Inicialmente la técnica era lenta, ya que las polimerasas se desnaturalizaban al realizar los cambios de temperatura y era necesario agregar nuevas polimerasas en cada ciclo. Puesto que las temperaturas del ciclo (95 °C en las fases de desnaturalización del ADN) suponen la inmediata desnaturalización de toda proteína, se emplean ADN polimerasas termoestables, extraídas de microorganismos adaptados a vivir a esas temperaturas, restrictivas para la mayoría de los seres vivos. Dichos microorganismos, generalmente arqueas, son: *Thermus aquaticus* (polimerasa Taq), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Thermococcus litoralis* (Vent) y *Thermus thermophilus* (Tth). Generalmente se emplean mezclas de polimerasas muy procesivas (Taq) con otras capaces de hacer corrección de errores (Pfu, Vent);
2. El desarrollo de equipos que pueden subir y bajar rápidamente su temperatura de forma automatizada y programada; se denominan termocicladores.

Es importante resaltar que durante la manipulación de las muestras se requiere de especial cuidado, sobre todo para evitar la contaminación cruzada entre los tubos. Además, como se va a amplificar un transgén proveniente del humano, es indispensable el riguroso manejo de las muestras para no transformarse en una fuente de contaminación y obtener falsos positivos.

A continuación se detalla el protocolo seguido para el genotipado de los animales.

Todo el material utilizado durante el proceso de genotipado fue esterilizado (*tips*, *ependorf*, *buffers*, etc.) por autoclavado.

1. A los 30 días del parto las ratas son destetadas y marcadas con orificios en las orejas siguiendo un código específico para lograr su posterior

identificación. Utilizando un bisturí estéril se corta aproximadamente 0,5 cm de la cola de cada una de las ratas.

2. La porción de tejido se coloca en un *eppendorf* conteniendo 300 μ l de *buffer* de digestión de colas (TDB: **Tail Digestion Buffer**), y luego se le agrega a cada *eppendorf* 185 μ l de TDB + 15 μ l de Proteinasa K (New England BioLabs Inc. #P8102S).
3. Los tubos son incubados durante 15 minutos a 65 °C para inactivar las ADNasas. Luego a 50°C durante 8 horas para disgregar de forma adecuada el tejido. Por último los tubos son incubados a 95°C durante 15 minutos para inactivar la Proteinasa K y evitar que posteriormente degrade la Taq polimerasa (Fermentas #EP0402)
4. Luego de centrifugar durante 10 minutos a 12.000 g cada uno de los tubos y así lograr bajar partes del tejido sin digerir, se toman 10 μ l del sobrenadante y se hace una dilución 1:20 en agua. De esta dilución se toman 1,5 μ l para realizar la PCR.

A continuación se muestra una tabla que detalla los volúmenes utilizados en cada reacción de PCR. El cálculo se realiza para N + 1 tubos, teniendo en cuenta la inclusión de un blanco, al cual no se le agregará ADN.

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

- Los *cebadores* utilizados fueron proporcionados por Integrated DNA Technologies (IA, USA) y su secuencia se detalla debajo:
Forward. 3' GTC GCA TCA GCC CTA ATC CA 5'
Reverse. 3' CAC CAG TGT GCG GCC AAT GA 5'
- Cada uno de los tubos de PCR se mantiene en hielo para inhibir la actividad de la Taq polimerasa.
- A cada uno de los tubos se le agregan 1,5 μ L de la dilución del sobrenadante conteniendo ADN y se llevan al termociclador (Biometra).

A continuación se detallan las temperaturas y el tiempo establecido para cada uno de los pasos de los ciclos.

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

- Los pasos de desnaturalización, hibridación y elongación se repiten 35 veces.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Al final de la PCR, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de acrilamida 6 % en TBE (Tris-Borate-EDTA: 90 mM Tris, 89 mM Ac. Bórico, 2 mM EDTA) con peines de 1,5 mm de espesor. El tamaño esperado del amplicón es de 160 pares de bases. La electroforesis en geles de poliacrilamida es utilizada para ver secuencias de ADN de bajo peso molecular, entre 80pb y 300pb. Es una herramienta útil para el aislamiento de pequeñas secuencias cuyo trabajo se dificulta en geles de menor resolución como los son los geles de agarosa.

La técnica consiste en la elaboración de una fina capa de gel de acrilamida adherida a una lámina de vidrio por la cual migra el ADN. Al igual que en un gel de agarosa, la migración responde a la carga negativa neta de la molécula de ADN y la concentración del gel. Las secuencias de ADN más pequeñas migran a mayor velocidad mientras que las grandes se quedan atrás. La técnica se lleva a cabo en cinco pasos: el montaje de la cámara de electroforesis, la preparación de la solución de poliacrilamida y el llenado de la cámara, la pre-corrída del gel, la corrida de las muestras y la tinción del gel.

A continuación se detalla la receta para la preparación del gel

- 8 ml de TBE 1X
- 2 ml de STOCK de bis-acrilamida (30:1)
- 100 μ L de APS (persulfato de amonio 10 % w/v)
- 10 μ L TEMED (N,N,N',N' – Tetramethyl-ethylenediamine)

En cada uno de los pocillos del gel se cargan 5 μ l del producto de PCR más 1.5 μ l de buffer de carga 6X (0,25 % *Bromophenol blue*, 0,25 % Xylene Cyanol FF, 30 % Glicerol, en H₂O destilada)

La electroforesis se realiza a 80 V (40 mA) durante 40 minutos.

Revelado

El revelado de los geles se hizo mediante tinción de los mismos con nitrato de plata (AgNO₃). La detección en geles de poli-acrilamida teñidos con AgNO₃ ofrece la mejor relación costo-beneficio. La tinción del ADN en geles de poli-acrilamida con AgNO₃ consta de varias etapas o pasos cuyos tiempos de incubación son críticos para la obtención de buenos resultados. Las soluciones que se utilizan en el proceso pueden ser reutilizadas un número limitado de veces.

- Luego de finalizada la corrida se desmonta el gel en la solución de fijación (500 μ l Ác. Acético, 13.7 ml Etanol, en 100 ml de H₂O destilada). Se mantiene en agitación suave durante 10 minutos.
- Se recupera el fijador y se incuba durante 10 minutos en solución plata (0.2 g AgNO₃ en 100 ml de H₂O destilada)
- Luego de recuperar la solución de plata se lava rápidamente tres veces con H₂O destilada, para quitar el exceso de plata no unido al ADN.
- Se incuba con la solución de revelado (3 g NaOH, 500 μ l formaldehído, en 100 ml de H₂O destilada). Se mantiene en la solución con agitación suave hasta divisar nítidamente las bandas.

Tratamiento con Busulfán in vivo

Se seleccionaron ratas transgénicas SOD1^{G93A} que estuviesen en la fase sintomática de la enfermedad y se les administró 25 mg/kg/día de *Busulfán* vía intraperitoneal durante 4 días. Al quinto día se llevó a cabo la perfusión intracardiaca y la disección de médula espinal, y raíces de cada una de las ratas. Como control se utilizaron ratas hermanas SOD1^{G93A} sintomáticas tratadas con vehículo (agua).

Perfusión y disección de tejido

Los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal con Ketamina/Xilacina (90:10mg/Kg), y se realizó la perfusión intracardiaca con paraformaldehído para fijar su médula y raíces. Para ello, se hizo pasar 150 ml aproximadamente de solución salina lavadora con citrato de sodio 0,4% para eliminar el exceso de sangre, seguida por 250 ml aproximadamente de solución de paraformaldehído al 4%. Posteriormente se realizó la disección de médula espinal y de las raíces de cada una de las ratas y se colocaron en la misma solución fijadora durante 24 h a 4°C, luego de lo cual se pasó el tejido a PBS-Acida de sodio 0.05%

Inclusión de médula espinal y cortes

De las médulas espinales disecadas se tomaron dos segmentos de la región lumbar y se incluyeron en bloques de BSA 45% en PBS-Acida de sodio (400 µl) - gelatina 2% en PBS-Acida de sodio (200 µl) - glutaraldehído (15 µl).

Los bloques se cortaron en *slices* de 40 µm de espesor en el vibrátomo LeicaVT1000S, y se guardaron en PBS-Acida de sodio 0,05% a 4°C hasta el momento de uso (Figura 1).

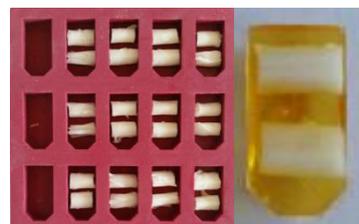


Figura 1. En la figura se muestra, en la parte superior, una fotografía del dispositivo que se utiliza para incluir las médulas y de las médulas incluidas. En la parte inferior se muestra una fotografía del vibrátomo utilizado para realizar los cortes.

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica utilizada para localizar y visualizar, mediante la utilización de anticuerpos específicos marcados con fluoróforos o enzimas, antígenos específicos en un corte o sección de tejido biológico. La IHQ, se utiliza comúnmente en diferentes tipos de aplicaciones tales como:

- Diagnóstico de células anormales
- El desarrollo de fármacos
- La investigación biológica para conocer la ubicación y la co-localización de una proteína dentro de las diferentes partes de una célula (núcleo, citoplasma o membrana, etc.)

Mientras que el uso de anticuerpos adecuados para dirigirse específicamente a los antígenos correctos y amplificar la señal, es importante para la visualización de los antígenos, una preparación completa y correcta de la muestra es un paso importante para mantener la morfología celular, la arquitectura del tejido y la antigenicidad de los epítopes diana. Esto requiere una recolección adecuada de tejido, perfusión, fijación del tejido, inclusión y corte, etc.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas no son visibles con el microscopio por lo que tienen que ser conjugadas a otras moléculas que nos den una señal visible. Estas moléculas que aportan visibilidad a los anticuerpos suelen ser de dos tipos: moléculas fluorescentes y enzimas. Las primeras se pueden observar con el microscopio de fluorescencia mientras que las segundas pueden convertir determinados sustratos solubles en productos insolubles y coloreados. La señal aparece allí donde está la sustancia fluorescente o el enzima, que es donde se ha unido la inmunoglobulina.

La inmunofluorescencia se basa en las propiedades de los fluorocromos. Son moléculas que emiten luz visible cuando se les ilumina con una determinada longitud de onda. Aunque la inmunofluorescencia se puede usar para detectar a una sola molécula tisular, su verdadero potencial se muestra cuando necesitamos una múltiple inmunodetección, es decir, dos o más moléculas presentes en una misma célula o matriz extracelular de forma simultánea. Esto es posible porque existe una gran variedad de fluorocromos que son capaces de emitir luz visible tras ser excitados con diferentes longitudes de onda, luego seleccionando el intervalo de longitudes de onda con el que

iluminamos un tejido podemos excitar de modo individual, y secuencial, varios fluorocromos que hayamos usado, unidos a inmunoglobulinas diferentes, para detectar moléculas diferentes. Tomando fotografías tras cada excitación y superponiendo dichas imágenes podemos averiguar si las moléculas se expresan, por ejemplo, en la misma célula.

Método de Detección

La detección por IHQ puede ser de dos maneras: "directa" o "indirecta". En la primera el marcador se encuentra unido a través de un enlace covalente al anticuerpo primario que reacciona directamente con el antígeno en secciones de tejido. Mientras que en el método de detección indirecto (Figura 2), el marcador se une covalentemente a un anticuerpo secundario, que se une al anticuerpo primario.

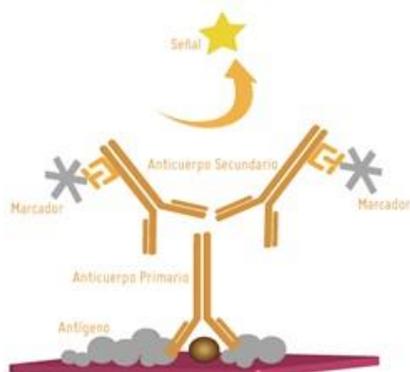


Figura 2. Unión de los anticuerpos conjugados a la proteína de interés. Se muestra como el anticuerpo secundario, conjugado a la enzima, se une al anticuerpo primario que reconoce a la proteína de interés

El método de detección directo, usando una unión covalente previa del marcador con el anticuerpo primario, sólo requiere una única etapa de incubación con el antígeno y una sola etapa de lavado.

El método de detección indirecto es un proceso más largo que el directo, ya que se compone de dos etapas de incubación y de lavado en lugar de una sola etapa con la detección directa. Este último método fue el empleado en este trabajo y comprende los siguientes pasos:

- Los cortes son lavados 15 minutos en PBS 1X
- Luego se permeabilizan durante 30 minutos con Tritón 0,3% en PBS 1X a temperatura ambiente (T.A.). En el caso de ser necesario, previo a la permeabilización, se realiza la recuperación antigénica en buffer Citrato de Sodio 10 mM pH 6
- Se hacen 3 ciclos de lavado de 10 minutos en PBS 1X
- Se realiza el Bloqueo con BSA 5% en PBS 1X durante una hora a T.A.

- Al terminar el bloqueo los anticuerpos primarios son incubados en tritón 0,3% en PBS 1X durante 48 hs a 4°C
- Luego se hacen 3 ciclos de lavado de 10 minutos en PBS 1X
- Se incuban los anticuerpos secundarios en tritón 0,3% en PBS 1X durante 24 hs a 4°C
- Se hacen 3 ciclos de lavado de 10 minutos en PBS 1X
- Por último se realiza el montaje con Mowiol

El análisis de las láminas se llevó a cabo por microscopia confocal y epifluorescencia.

A continuación se muestra una tabla en donde se detallan los anticuerpos que se utilizaron en IHQ para reconocer los distintos tipos celulares que se encuentran en el ambiente neurodegenerativo en la médula espinal. Todos se encuentran disponibles comercialmente.

Reconocimiento de:	Anticuerpo primario	Dilución
Microglía	Anti-Iba1 (MABN92)	1/200
	Anti-CD68 (MAB1435)	1/200
	Anti-MHCII (ab23990)	1/200
Astrocitos/ AbAs	Anti-GFAP(G3893)	1/400
	Anti-GFAP(G9269)	1/400
	AntiS100β(sigma2532)	1/400

Análisis por microscopía confocal y epifluorescencia

El microscopio de epifluorescencia es un microscopio óptico. A diferencia del microscopio óptico convencional, en el microscopio de epifluorescencia el mismo lente ilumina y recibe la luz emitida por la muestra. Su funcionamiento se basa en la propiedad de fluorescencia que tienen ciertas moléculas denominadas fluorocromos (Figura 3). Los fluorocromos son sustancias que tienen la propiedad de emitir un fotón de una longitud de onda determinada cuando son excitados por un fotón incidente de una longitud de onda

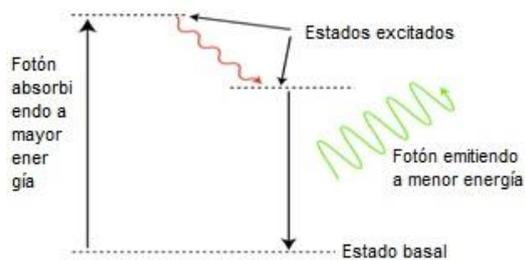


Figura 3. Mecanismo de fluorescencia. La línea horizontal indica niveles quantum de energía de la molécula. Un colorante fluorescente es elevado a un estado de energía mayor por el fotón de alta energía. Éste cede energía a otras moléculas resultando en un estado de excitación más bajo.

característica. La parte de la molécula que emite la fluorescencia se denomina fluoróforo. Existen una gran cantidad de fluorocromos que permiten marcar de forma selectiva la mayoría de los componentes celulares y tisulares, además pueden ser acoplados químicamente a otras moléculas como anticuerpos que reconocen específicamente cierto componente celular.

El microscopio de epifluorescencia funciona de la siguiente manera (Figura 4):

- La luz procedente de la fuente (lámpara de mercurio o xenón), atraviesa un primer filtro que selecciona la longitud de onda capaz de excitar al fluorocromo, antes de incidir sobre la muestra.
- Esta luz se refleja en un espejo dicroico e incide sobre la muestra, excitando al fluorocromo, el que emite fotones de una longitud de onda mayor que la incidente.
- La luz emitida por la muestra atraviesa el espejo dicroico y llega a un segundo filtro que selecciona la longitud de onda de emisión del fluorocromo
- Finalmente, la luz ingresa a un fotomultiplicador que la convierte en una señal eléctrica.

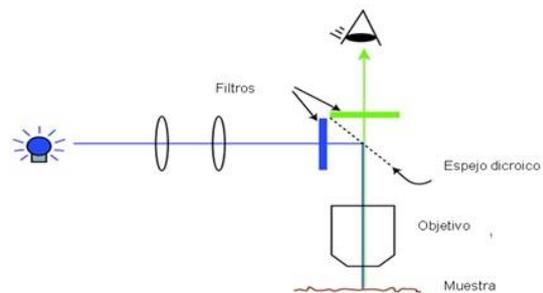


Figura 4. Organización básica de un microscopio de fluorescencia. La luz de la fuente es reflejada fuera del espejo dicroico a través del espécimen. La fluorescencia que regresa con una longitud de onda mayor pasa a través del espejo dicroico hasta el ocular.

El funcionamiento del microscopio láser confocal es muy similar al del microscopio de epifluorescencia. El principio de la microscopía confocal se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco. Para ello se ilumina una pequeña zona de la muestra y se toma el haz

luminoso que proviene del plano focal, eliminándose los haces procedentes de los planos inferiores y superiores. En este tipo de microscopio la fuente de luz es un láser que ilumina el preparado a diferentes alturas, generando secciones ópticas. El principio del funcionamiento del Microscopio Confocal se basa en la existencia de dos diafragmas (“*pinhole*”), uno entre la fuente de luz y el objetivo y el otro entre el objetivo y el detector. Ambos *pinhole* deben de estar perfectamente alineados de forma que el segundo de ellos únicamente deje llegar al detector la luz procedente del plano focal. El *pinhole* es una apertura localizada delante del fotomultiplicador que evita el pasaje de fluorescencia de las regiones de la muestra que no están en foco, la luz que proviene de regiones localizadas por encima o por debajo del plano focal no converge en el *pinhole* y no es detectada por el fotomultiplicador. Al igual que en el microscopio de epifluorescencia, la luz ingresa a un fotomultiplicador que la convierte en una señal eléctrica que se digitaliza mediante un convertidor analógico digital y se almacena en una computadora. La imagen de la muestra es visualizada en la pantalla de la computadora a medida que el láser barre toda la zona de muestra. Parte de la luz procedente de la fuente de iluminación

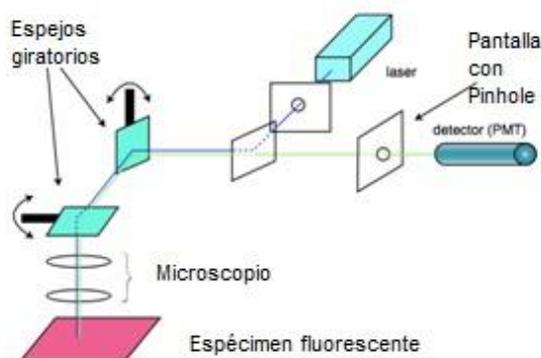


Figura 5. Organización básica de un microscopio confocal. La luz del láser es escaneada a través de los espejos. El seccionamiento óptico se produce cuando la luz pasa a través del pinhole en su camino hacia el detector.

atraviesa un primer *pinhole*, es reflejada mediante un espejo dicróico y se enfoca en un punto de la muestra mediante la lente de un objetivo. La fluorescencia emitida por el punto iluminado vuelve por el mismo camino óptico, pasa a través del espejo dicróico y es enfocada en un detector, un segundo *pinhole* es colocado delante del detector para eliminar las señales procedentes de la zona fuera de foco (Figura 5).

A la hora de adquirir imágenes con el microscopio confocal se deben ajustar los siguientes parámetros:

- Línea de excitación e intensidad del láser. Normalmente un microscopio confocal viene con varios láser que tienen una o varias líneas de

emisión: Argón (458, 476, 488, 496 y 514nm), Helio-Neón (543nm), Helio-Neón (633nm), Diodo violeta (405 nm), etc.

- Apertura del *pinhole* de detección. Para cada objetivo existe una apertura óptima del diafragma de detección en la que el espesor de la sección que se obtiene es el mínimo, lo que garantiza la máxima resolución en el eje Z. Cuando la intensidad de la fluorescencia es baja es posible que se necesite aumentar la apertura de este diafragma para recoger más señal. En este caso se estará aumentando el espesor de la sección y perdiendo resolución en Z.
- Ganancia del fotomultiplicador. Ajusta la amplificación de la señal eléctrica generada a partir de los fotones emitidos por la muestra. Si la intensidad de luz emitida por la muestra es débil deberemos de aumentar la ganancia para poder obtener la imagen. Un aumento excesivo de la ganancia se traduce en una pérdida de calidad de la imagen debido al ruido electrónico que se genera.
- Velocidad de barrido del láser. Se define como el número de líneas por segundo que barre el láser. A menor velocidad de barrido mejor calidad de imagen.
- Tamaño de la imagen. Define el número de píxeles que tendrá la imagen. Cuanto mayor sea el tamaño de la imagen para un campo determinado mejor será la resolución de la imagen.

Ventajas de la microscopía confocal frente a la microscopía óptica tradicional

- La microscopía confocal permite obtener una mayor resolución de las imágenes.
- Mayor contraste. Debido a que se elimina la luz procedente de las zonas fuera de foco.
- Posibilidad de obtener información tridimensional de la muestra, ya que variando el plano de enfoque el sistema es capaz de tomar imágenes a diferente profundidad.

- Mejor análisis de imagen. Al obtenerse la imagen de modo electrónico es posible digitalizarla y aplicar sobre ella toda una serie de técnicas de análisis de imágenes.
- Reconstrucción 3D. A partir de las secciones ópticas es posible aplicar técnicas de reconstrucción 3D que nos permitan visualizar las estructuras.

Cuantificación de células AbAs y microgliales presentes en la médula espinal degenerante

El número de células AbAs, GFAP/S100 β positivas, se cuantificó en la médula espinal de ratas no transgénicas, ratas SOD1^{G93A} asintomáticas, sintomáticas tratadas con vehículo y sintomáticas tratadas con Busulfán. La cuantificación se llevó a cabo en el asta ventral y el análisis se realizó manualmente en 8 secciones por animales (n=3) usando la herramienta de conteo del software ImageJ. El número de células microgliales, marcadas con Iba1, CD68 o MHCII, se cuantificó en la médula espinal de ratas no tg, ratas SOD1^{G93A} asintomáticas, sintomáticas tratadas con vehículo y sintomáticas tratadas con Busulfán. La cuantificación se llevó a cabo en el asta ventral, en la sustancia blanca y en las raíces ventrales. El análisis se realizó manualmente en 8 secciones por animales (n=3) usando la herramienta de conteo del software ImageJ.

Análisis estadístico

Los estudios estadísticos se llevaron a cabo utilizando las herramientas estadísticas de la aplicación Past3. Se utilizó estadística descriptiva para cada uno de los grupos, y se realizó un ANOVA entre los grupos. Todos los experimentos se realizaron en duplicados o triplicados, y fueron replicados al menos tres veces. Todos los resultados se presentaron como la media \pm DS. P < 0,05 se consideró significativo.

Cultivos de la médula espinal degenerante de animales SOD1^{G93A}

Ratas SOD1^{G93A} durante la fase sintomática de la enfermedad fueron tratadas con el agente antineoplásico *Busulfán* durante 4 días (25 mg/Kg/día). Al quinto día las ratas fueron sacrificadas y se realizó el cultivo de células AbAs (42). Como control se utilizaron ratas hermanas SOD1^{G93A} sintomáticas tratadas con vehículo (agua) (Fig. 6). A continuación se detalla el protocolo utilizado para el cultivo de células AbAs.

- Los animales son anestesiados con Ketamina/Xilacina (90:10mg/Kg) y la médula se disecciona en hielo.
- La médula espinal se chopea y disocia con 0,25% de tripsina en buffer libre de calcio por 5 minutos a 37°C.
- El tratamiento con tripsina se detiene añadiendo DMEM 10% (vol/vol) FBS en presencia de 50 µg/ml de ADNasal y por disgregación mecánica por pipeteo repetido.
- El extracto obtenido se pasa por una malla de 80 µm para eliminar detritos y luego se centrifuga.
- El pellet se re-suspende en medio de cultivo [DMEM 10% (vol/vol) FBS, HEPES (3,6 g/L), penicilina (100 IU/ml), y estreptomocina (100 µg/ml) en H₂O bi-destilada para cultivo] y luego se plaquea.
- El medio se remueve a las 24hs y luego es reemplazado cada 48hs.

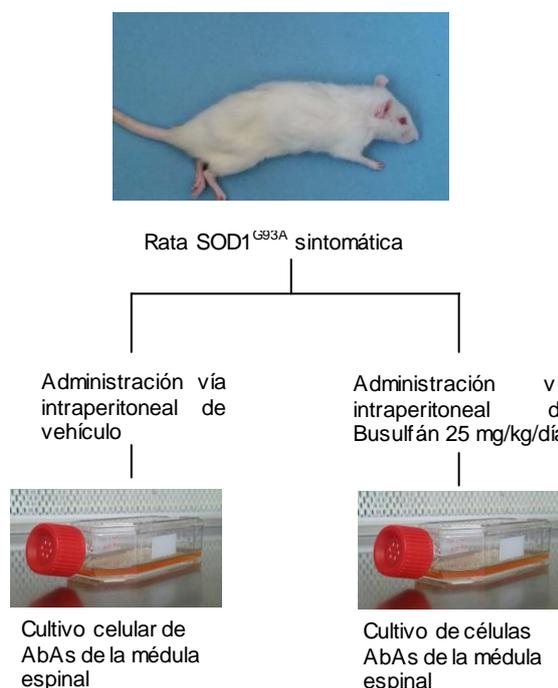


Figura 6. Cultivo de células AbAs. Las células son obtenidas de la médula espinal degenerante de ratas SOD1^{G93A} sintomáticas. En este trabajo tratamos ratas sintomáticas con Busulfán por 4 días y ratas hermanas con el vehículo, y luego se realizó el cultivo.

Las células AbAs son obtenidas de un cultivo primario de la médula espinal degenerante de animales adultos SOD1^{G93A}, que cursan la etapa final de la enfermedad (Figura 6).

RESULTADOS

Efecto del Busulfán sobre el número de células AbAs obtenidas en cultivos primarios de médula espinal

La aparición de las células AbAs está asociadas a la fase sintomática de la enfermedad. Por este motivo pueden ser aisladas de la médula espinal degenerante de animales SOD1^{G93A} sintomáticos. En la figura 7a podemos observar un cultivo típico de células AbAs a partir de la médula espinal SOD1^{G93A}. Las células que se obtienen son células con fenotipo microglial que muestran una gran capacidad proliferativa y alcanza confluencia luego de aproximadamente 20 días en cultivo. Luego de esto, un gran porcentaje de éstas células sufren una transición fenotípica a células AbAs, las células obtienen el fenotipo astrocitario aberrante típico. Estas células pueden ser mantenidas en cultivo por más de 25 pasajes. En la figura 7b se realizó el mismo cultivo de células AbAs de una rata hermana sintomática que fue sometida durante 4 días a tratamientos con *Busulfán* (25 mg/Kg) por vía intraperitoneal. Como podemos observar, no fue posible obtener células AbAs en cultivo luego del tratamiento con el agente antineoplásico. Las pocas células microgliales que lograron ser cultivadas no mostraron gran capacidad proliferativa, no alcanzaron confluencia luego de 25 días in vitro (25 DIV) y murieron luego de algunos días, no llegando a la transición fenotípica característica del cultivo.

El *Busulfán* previene la aparición de células AbAs en la médula espinal

En la fase sintomática de la enfermedad se puede observar un aumento notorio del número de las células AbAs en la médula espinal rodeando las MTNs en degeneración. En la figura 8 se muestra un ensayo inmunohistoquímico en la médula espinal de ratas no transgénicas, ratas SOD1^{G93A} asintomáticas, ratas SOD1^{G93} sintomáticas tratadas con vehículo y tratadas con *Busulfán*. A diferencia de ratas no transgénicas y de ratas

SOD1^{G93A} en fase asintomática, las ratas SOD1^{G93A} en la fase sintomática muestran un aumento notable en el número de células AbAs, co-expresando niveles de GFAP y S100β, en la médula espinal rodeando a las MTNs en degeneración. Si miramos el número de AbAs así como los niveles de S100β y GFAP en ratas SOD1^{G93A} sintomáticas que fueron tratadas con *Busulfán* podemos ver que no sólo disminuyeron en número significativamente (aproximadamente un 70%), sino que también se redujeron significativamente los niveles de S100β

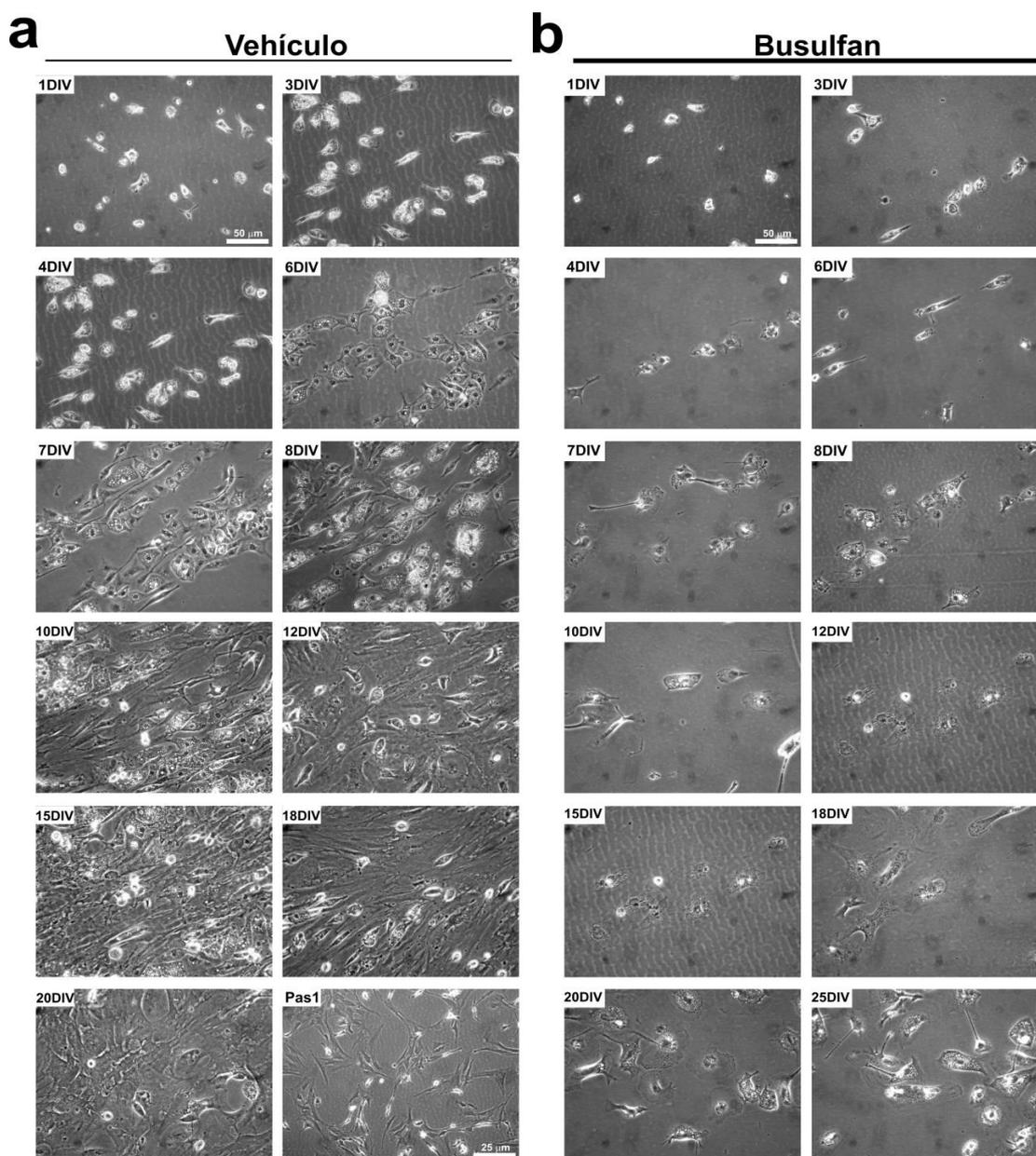


Figura 7. Las células AbAs no pueden ser obtenidas en cultivo luego del tratamiento con *Busulfán*. Figura de contraste de fase representativa del cultivo de células AbAs de ratas SOD1^{G93A} sintomáticas. Como puede observarse en **a**), las células AbAs pudieron ser obtenidas de animales sintomáticos tratados con vehículo (n=6). Sin embargo, luego del tratamiento vía intraperitoneal con el agente antineoplásico *Busulfán* (25 mg/Kg/día), no fue posible obtener células AbAs. Las pocas células que se observaron no proliferaron de gran manera y murieron luego de 30 días en cultivo **b**). (n=3).

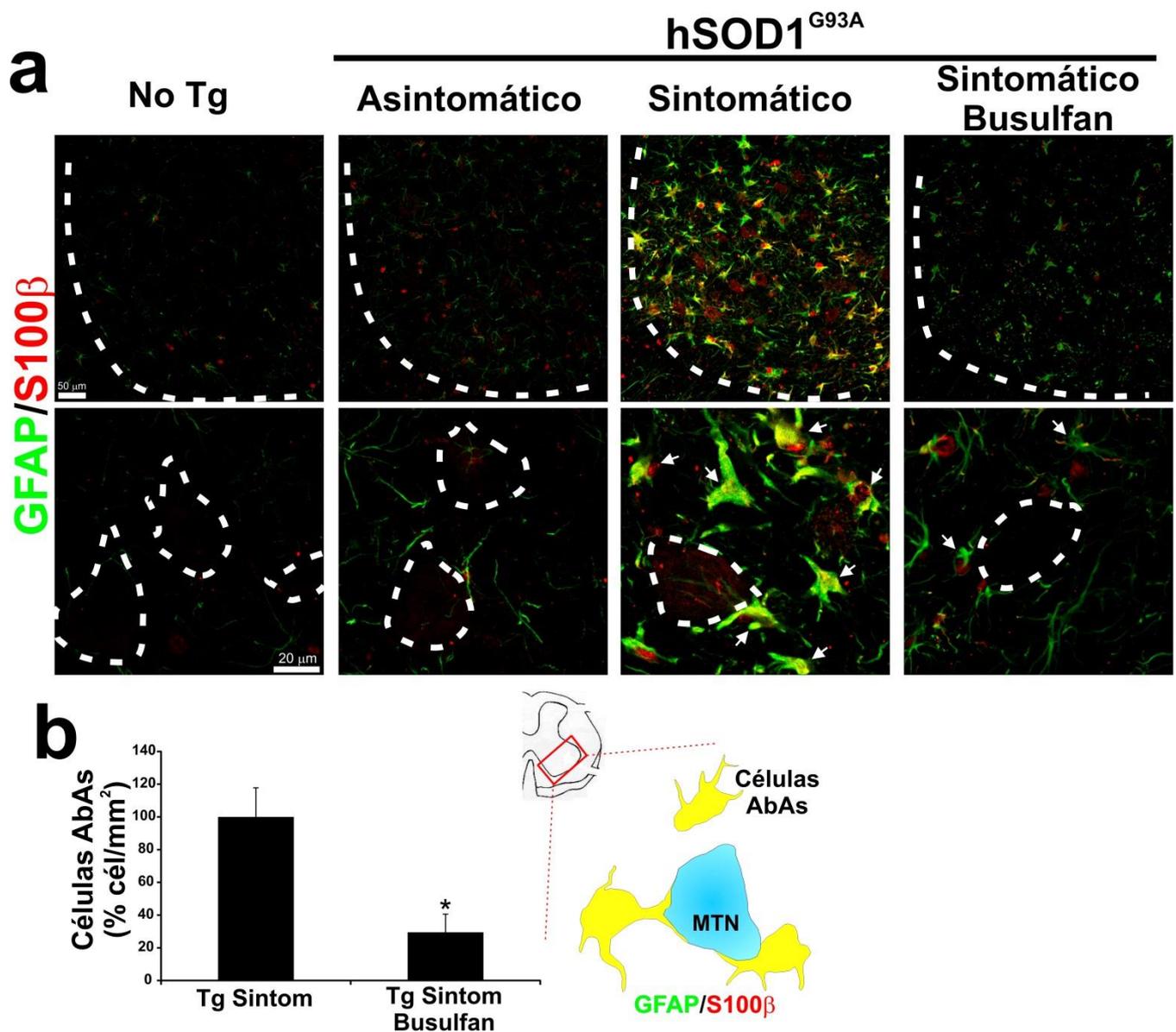


Figura 8. El tratamiento con *Busulfán* disminuye significativamente el número de células AbAs en la médula espinal. a) Inmunohistoquímica representativa del asta ventral de la médula espinal (la línea blanca punteada delimita la sustancia gris de la blanca) donde se muestra la expresión de GFAP (verde) y S100β (rojo) en ratas no transgénicas, ratas SOD1^{G93A} asintomáticas y ratas SOD1^{G93A} sintomáticas (vehículo y *Busulfán*). En el panel superior se muestran campos panorámicos donde se observan las células GFAP/S100β positivas en las 4 condiciones. Notar como durante la fase sintomática de la enfermedad aumenta significativamente el número de células GFAP+/S100β+ en el asta ventral de la médula degenerante. Sin embargo, luego del tratamiento con *Busulfán* durante 4 días (25 mg/Kg/día) el número de células AbAs disminuye drásticamente. En el panel inferior se muestra a mayor aumento como las células AbAs se encuentran típicamente rodeando a las MTNs, y como ésta sub-población de células es sensible al tratamiento con el agente antineoplásico (la línea blanca punteada delimita el soma de las MTNs). **b)** Análisis cuantitativo del número de células AbAs que rodea a las MTNs durante la fase sintomática de la enfermedad en las ratas ELA. Los datos se muestran como la media ± SD; p<0,05*. Notar como el *Busulfán* disminuye significativamente en más de un 60% el número de células que rodea a las MTNs del asta ventral. El esquema representa la zona donde las células AbAs fueron contadas. (n=3)

Efecto del Busulfán sobre la reactividad microglial en ratas SOD1^{G93A} sintomáticas

La activación de la microglía es uno de los principales componentes de la neuroinflamación. Ya está ampliamente demostrado que en la ELA hay una activación microglial y un aumento en el número de células microgliales, sobre todo en la fase sintomática de la patología, y está asociada a la progresión de la enfermedad. Aquellas ratas que fueron tratadas con *Busulfán* mostraron una disminución de la reactividad microglial, evidenciada por la disminución en el número de células Iba1, MHC-II y CD68 positivas, en el asta ventral, en la sustancia blanca y en las raíces ventrales de ratas sintomáticas SOD1^{G93A}. En la figura 9 se puede ver como en el asta ventral, de las ratas SOD1^{G93A} sintomáticas que fueron tratadas con *Busulfán*, el número de células microgliales (Iba1 positivas) se redujo significativamente, así como el número de *clusters* (células multinucleadas) de microglía que se forman en la fase sintomática de la enfermedad. El mismo resultado se obtuvo para la IHQ para MHCII y CD68 (Figura 10), donde también se muestra la disminución significativa de los niveles de estos marcadores.

En la figura 11 se puede observar el aumento considerable en los niveles de los marcadores microgliales Iba1, CD68 y MHCII en la sustancia blanca, y de CD68 en las raíces ventrales en la fase sintomática de la enfermedad, y como el número de células microgliales disminuye significativamente (entre un 50-70%) en aquellas ratas que recibieron el tratamiento con el agente antineoplásico.

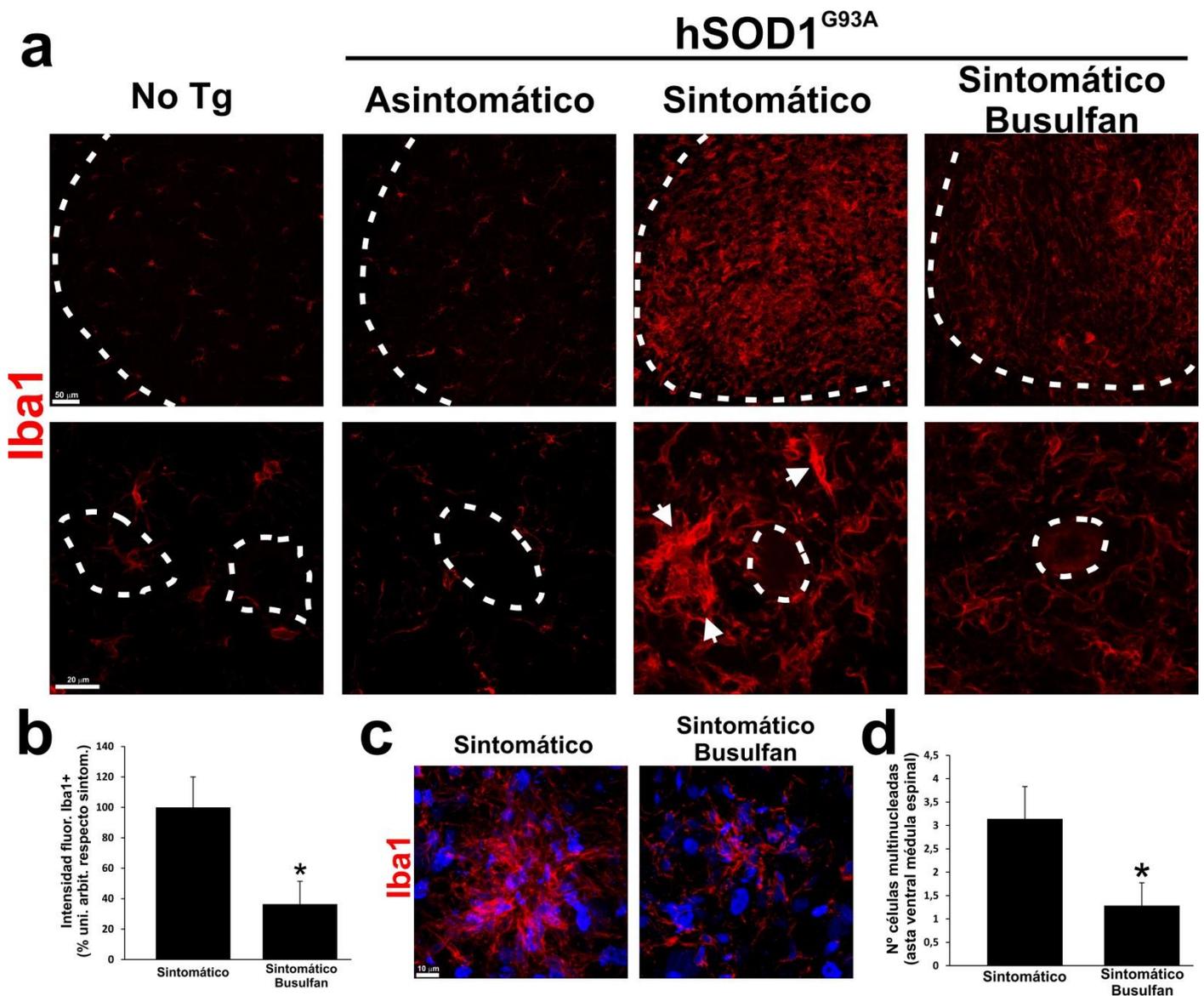


Figura 9. El tratamiento con *Busulfán* disminuye la microgliosis durante la fase sintomática en un modelo animal de la ELA. Imagen confocal por inmunohistoquímica donde se muestra la expresión de Iba1 (rojo) en el asta ventral de la médula espinal (las líneas blancas punteadas separan la sustancia gris de la blanca). **a)** IHQ para el marcador microglial Iba1 en la médula espinal de ratas No Tg, ratas SOD1^{G93A} asintomáticas y ratas SOD1^{G93A} sintomáticas (vehículo y *Busulfán*). En el panel superior se muestra el asta ventral donde se observan las células Iba1 positivas en las cuatro condiciones. Notar el aumento significativo en el número de células Iba1+ en el asta ventral en la condición sintomática, y como estas disminuyen luego del tratamiento con *Busulfán* durante 4 días (25 mg/Kg/día). En el panel inferior se muestra a mayor aumento como las células Iba1+ se encuentran rodeando a las MTNs, y como ésta sub-población de células es sensible al tratamiento con el agente antineoplásico (la línea blanca punteada delimita el soma de las MTNs). **b)** Análisis cuantitativo de células Iba1 positivas en el asta ventral de ratas SOD1^{G93A} sintomáticas (vehículo y *Busulfán*). Los datos se muestran como la media ± SD; $p < 0,05$ * **c)** Se muestra una imagen por IHQ confocal en donde se pueden ver células Iba1 positivas, formando *clusters* presentes en el asta ventral de ratas SOD1^{G93A} sintomáticas (vehículo y *Busulfán*), en azul se marcan los nucleos. **d)** Análisis cuantitativo de los *clusters* en el asta ventral de ratas SOD1^{G93A} sintomáticas (vehículo y *Busulfán*). Los datos se muestran como la media ± SD; $p < 0,05$ *. (n=3).

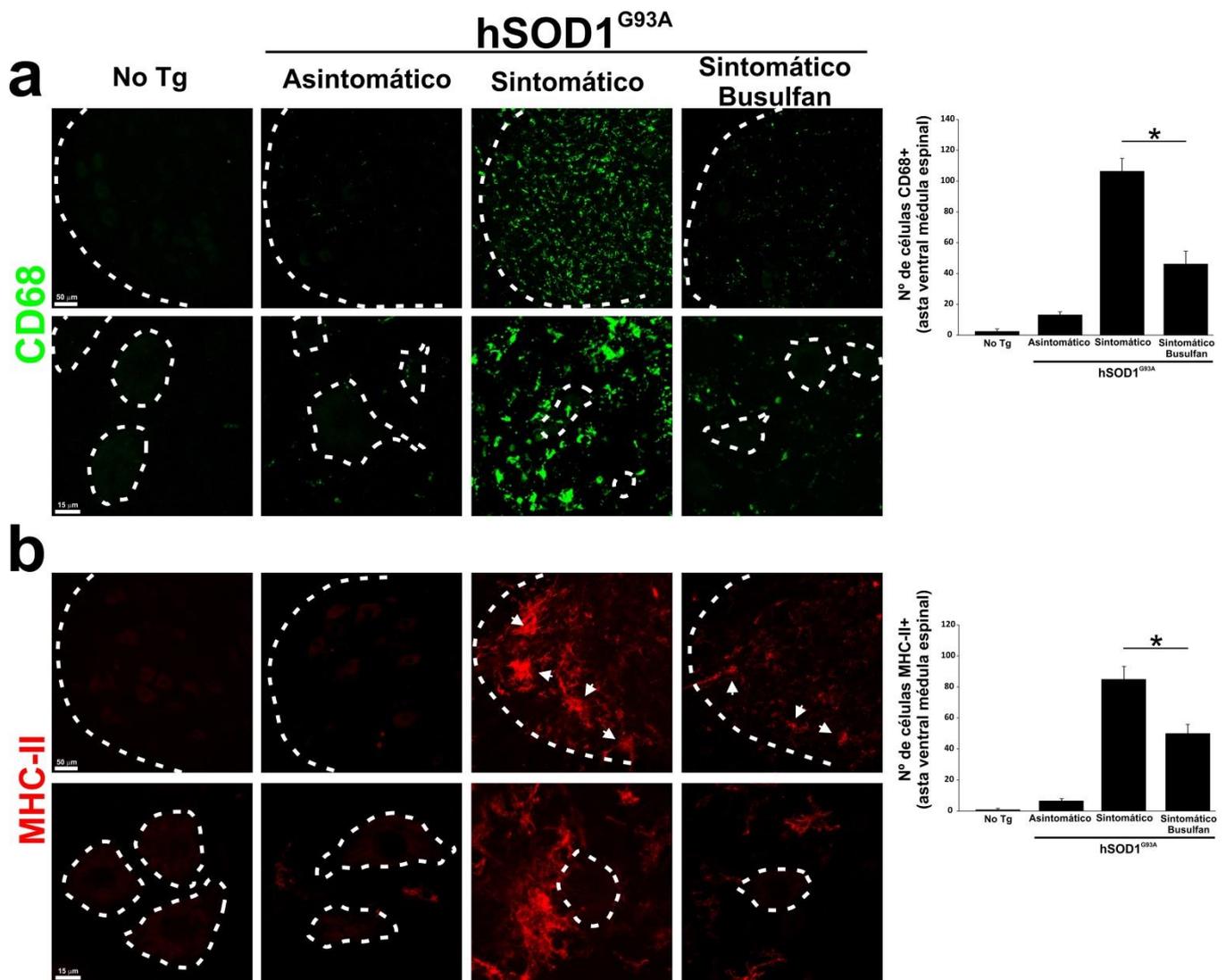


Figura 10. La administración de *Busulfán* reduce el número de células microgliales fagocíticas en la médula espinal degenerante. Figura por IHQ confocal representativa para los marcadores microgliales CD68 y MHCII en la médula espinal de ratas No Tg, ratas SOD1^{G93A} asintomáticas y ratas SOD1^{G93A} sintomáticas (vehículo y *Busulfán*) **a**) A la izquierda se observa la IHQ para el marcador microglial CD68. En el panel superior se muestra el asta ventral (delimitada por línea punteada blanca) donde se observan las células CD68+ en las cuatro condiciones. Nótese el aumento significativo en el número de células CD68+ en el asta ventral en la condición sintomática, y como estas disminuyen luego del tratamiento con *Busulfán* durante 4 días (25 mg/Kg/día). En el panel inferior se muestra a mayor aumento como las células CD68+ se encuentran rodeando a las MTNs, y como ésta sub-población de células es sensible al tratamiento con *Busulfán* (la línea blanca punteada delimita el soma de las MTNs). A la derecha se muestra el análisis cuantitativo de las células CD68+ positivas en el asta ventral en las cuatro condiciones. Los datos se muestran como la media \pm SD; $p < 0,05^*$. Notar como el tratamiento con el agente antineoplásico reduce significativamente el número de células CD68+. **b**) A la izquierda se observa la IHQ representativa para el marcador microglial MHCII. En el panel superior se muestra el asta ventral (delimitada por línea punteada blanca) donde se observan las células MHCII+ en las 4 condiciones. Nótese el aumento significativo en el número de células MHCII+ en el asta ventral en la condición sintomática, y como estas disminuyen luego del tratamiento con *Busulfán* durante 4 días (25 mg/Kg/día). En el panel inferior se muestra a mayor aumento como las células MHCII+ se encuentran rodeando a las MTNs, y como luego del tratamiento con *Busulfán*, su número se reduce drásticamente (la línea blanca punteada delimita el soma de las MTNs). A la derecha se muestra el análisis cuantitativo de las células MHCII+ en el asta ventral en las 4 condiciones. Los datos se muestran como la media \pm SD; $p < 0,05^*$. (n=3).

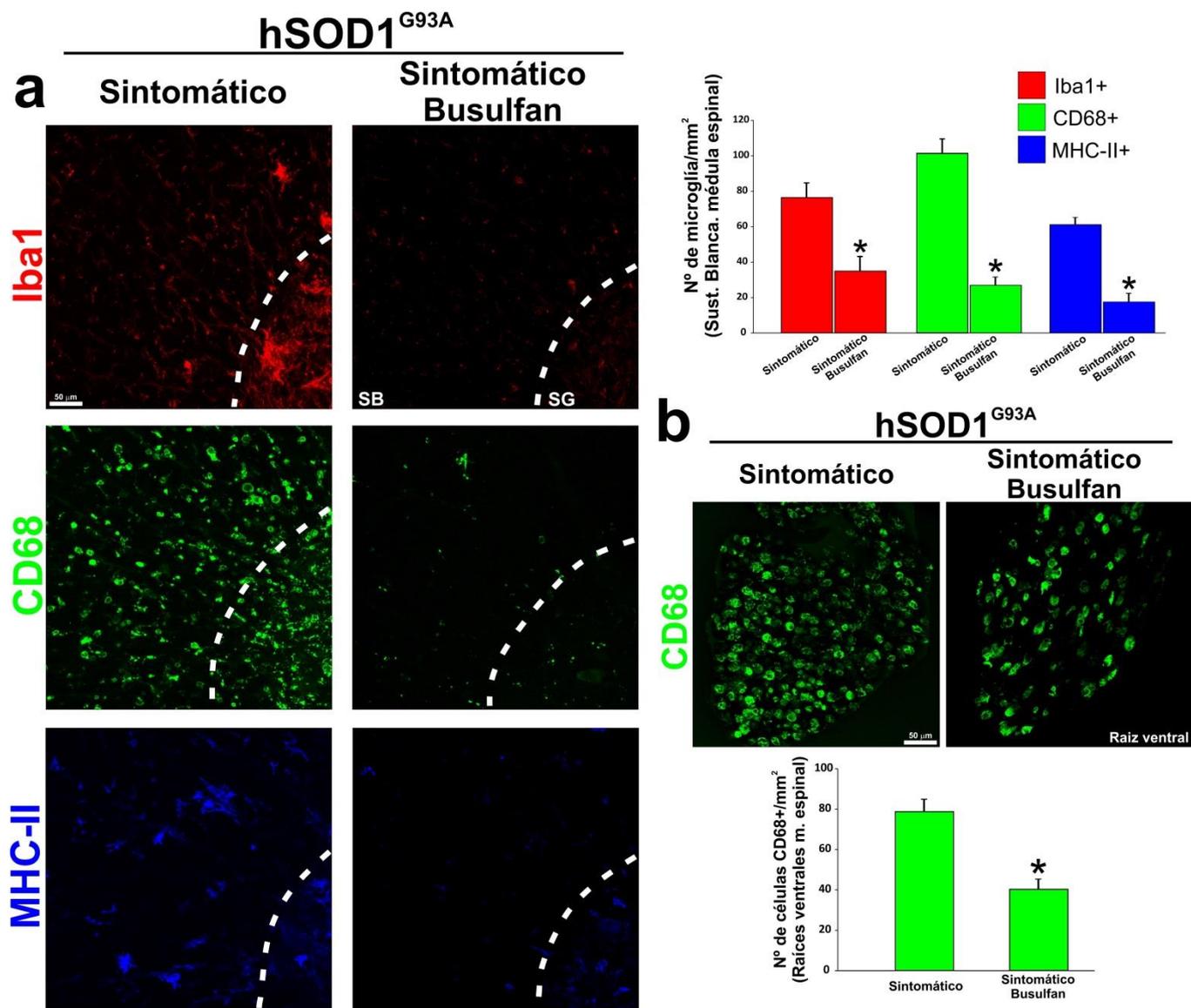


Figura 11. El tratamiento con *Busulfán* disminuye significativamente el número de células microgliales presentes en la sustancia blanca y en las raíces ventrales en la fase sintomática. Se muestra la IHQ para marcadores microgliales –Iba1, CD68 y MHCII– en la sustancia blanca y en las raíces ventrales, así como el recuento de las células positivas para dichos marcadores, en ratas SOD1^{G93A} sintomáticas (vehículo y *Busulfán*). En **a**) se puede ver, a la izquierda, la IHQ para los marcadores Iba1, CD68 y MHCII en la sustancia blanca de animales SOD1^{G93A} (vehículo y *Busulfán*) (la línea punteada blanca separa sustancia blanca de la gris), notar la reducción en los niveles de expresión de los marcadores en animales que fueron tratados con *Busulfán*. A la derecha se muestra el recuento de células microgliales en la sustancia blanca. Los datos se muestran como la media ± SD; p<0,05*. En **b**) se muestra la IHQ para el marcador CD68 en la raíz ventral de animales SOD1^{G93A} sintomáticos (vehículo y *Busulfán*) junto con el recuento de células CD68 positivas. Los datos se muestran como la media ± SD; p<0,05*. Nótese la disminución de células CD68+ en el animal sintomático tratado con *Busulfán*. (n=3).

DISCUSIÓN

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa, caracterizada por la muerte selectiva de MTNs superiores e inferiores, dando lugar a una patología paralizante que lleva a la muerte del paciente en 3 a 5 años. Esta degeneración neuronal que comienza durante la fase asintomática de la enfermedad está asociada a la formación de un ambiente neuroinflamatorio, caracterizado por la activación astrocitaria y microglial. Recientemente se describió por primera vez en la literatura, un nuevo tipo de células, denominadas AbAs, con características astrocitarias, asociadas directamente a la fase sintomática de la enfermedad. Las AbAs presentan una alta toxicidad para las MTNs en cultivo y proliferan en el asta ventral de la médula espinal en el microambiente que rodea a las MTNs. Esta nueva sub-población de células gliales representa un nuevo blanco para posibles terapias dirigidas a disminuir la neuroinflamación en la ELA. La modulación farmacológica de la aparición de las células AbAs, así como la disminución de la microgliosis, podría resultar en una inhibición del microambiente neurodegenerativo que subyace a la patología. En este trabajo nos propusimos como objetivo determinar si la quimioterapia con un agente antineoplásico como el *Busulfán*, es capaz de disminuir el número de células proliferantes, AbAs y microglía, presentes en el estadio sintomático de la ELA en ratas SOD1^{G93A}.

Durante la fase sintomática de la enfermedad en las ratas SOD1^{G93A}, es posible aislar células AbAs en cultivo luego de aproximadamente 25 días (42). Sin embargo, luego de 4 días de tratamiento con *Busulfán* (25 mg/Kg/día), no fue posible obtener células AbAs en cultivo a partir de la médula espinal de ratas sintomáticas. Las pocas células que fueron obtenidas no mostraron una gran capacidad proliferativa, no alcanzaron confluencia y murieron luego de varios días in vitro. Diversos estudios han mostrado que el *Busulfán* afecta la proliferación de las células hematopoyéticas, entre otros tipos celulares, tanto primarios como líneas celulares (43, 44). También se ha mostrado que el *Busulfán* es capaz de modular el microambiente de la médula espinal degenerante previo a un trasplante de células madre (45), reduciendo el

número de células que se encuentran proliferando en la médula. Por lo tanto es posible pensar que la reducción en el número de células AbAs que se lograron aislar de las ratas tratadas, pueda deberse a que el *Busulfán* reduce la capacidad proliferativa de las células microgliales de la médula espinal, provocando una disminución del número de microglías que son capaces de aislarse en cultivo. Las pocas células microgliales que se pueden aislar están posiblemente afectadas en su ciclo replicativo, y por este motivo no tener la capacidad de proliferar *in vitro*, por lo que no se logra la transformación fenotípica a células AbAs.

Otra evidencia que muestra el efecto que tiene el *Busulfán* sobre la subpoblación de células AbAs, proviene del resultado que muestra que el tratamiento agudo con el agente antineoplásico generó una disminución significativa del número de células AbAs en el asta ventral de la médula espinal degenerante. Las células AbAs se encuentran íntimamente asociadas al microambiente degenerativo que rodea a las MTNs en degeneración en la fase sintomática de la enfermedad, y han mostrado tener una alta tasa proliferativa y una alta toxicidad selectiva para las MTNs (41, 42). Muchos autores han propuesto diferentes mecanismos patogénicos asociados a los astrocitos en las patologías neurodegenerativas, y en particular en la ELA. Algunos de los mecanismos implican toxicidad mediada por NGF liberado por los astrocitos. La inducción de dicha liberación se da como consecuencia de la acción del FGF1, el cual es liberado por las MTNs en condiciones de daño. El NGF actúa sobre el receptor p75 cuya expresión se da durante el desarrollo y su re – expresión ocurre en condiciones patológicas en el SNC (37-39). Los resultados indican que esta producción de NGF por parte de los astrocitos SOD1^{G93A} está bajo el control del estrés oxidativo (46). Otra característica remarcable de la toxicidad mediada por astrocitos es la disfunción mitocondrial. La utilización de compuestos dirigidos a restablecer la funcionalidad mitocondrial han revertido la toxicidad de los astrocitos SOD1^{G93A} (40). El estrés nitro-oxidativo observado en astrocitos SOD1^{G93A} también promueve la muerte de las MTNs circundantes (47).

Además nuestros resultados muestran una marcada reducción de los niveles de la proteína S100 β en el asta ventral de la médula espinal. Trabajos previos han demostrado que la proteína S100 β ejerce efectos parácrinos que están asociados a la generación de fenotipos astrocitarios neurotóxicos, caracterizados por un aumento de la proliferación, capacidad migratoria y muerte neuronal (48, 49). Por este motivo, controlar la proliferación y disminuir el número de dichas células, así como los niveles S100 β podría ser útil para modificar el curso de la enfermedad, disminuyendo la progresión de la parálisis.

Además de controlar la aparición de fenotipos astrocitarios aberrantes, demostramos que el tratamiento quimioterápico con *Busulfán*, es capaz de disminuir el número de células microgliales en el asta ventral de la médula espinal. La microglía juega un papel preponderante en la neuroinflamación característica de los procesos neurodegenerativos progresivos, tanto en la ELA como en otras patologías neurodegenerativas como el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington (25, 50-53). La activación microglial crónica es un fenómeno patogénico importante en las enfermedades neurodegenerativas, el cual contribuye a la disfunción neuronal, lesión, y muerte de neuronas (14). En este trabajo aportamos evidencias de que el tratamiento con *Busulfán* es capaz de disminuir significativamente los niveles de Iba1 en el asta ventral de la médula espinal degenerante. La sobreexpresión de Iba1 es una de las principales características de la fase sintomática de la enfermedad, tanto en los modelos murinos, como en humanos (42, 54). El aumento en los niveles de Iba1 se ha asociado a un aumento en la capacidad migratoria de la microglía (28), lo cual podría contribuir a la característica progresiva lesional de la enfermedad. Además de los niveles de Iba1, también se logró disminuir el número de agregados de microglía (conocidos como “*clusters*” o células gigantes multinucleadas), presentes en la fase sintomática de la enfermedad (55). Estos *clusters* están caracterizados por la expresión de marcadores de proliferación como Ki67, y se ha planteado que no están asociados a la fagocitosis directa de las MTNs en degeneración, sino que pueden estar causando daño a las MTNs circundantes indirectamente (56). En este sentido, diversos estudios han reportado el aumento de ARNm para IL-1 β , IL-12, MIP1 α , TGF- β , y TNF- α en ratas

SOD1^{G93A} en la etapa pre-clínica de la enfermedad. El aumento de dichos factores en etapas tempranas de la enfermedad podrían estar asociados a la formación y funcionamiento de los agregados microgliales (56). Si bien aún se desconoce cuál es su relación con la progresión de la enfermedad, una de las hipótesis planteadas en la literatura propone que este comportamiento aberrante de la microglía que se agrega en *clusters*, no permitiría el buen funcionamiento de las células microgliales, principalmente su función fagocítica. Este mal funcionamiento contribuiría a la generación de un ambiente inflamatorio crónico que lleva a la muerte de las MTNs (55). Por tanto la utilización de agentes antineoplásicos en patologías como la ELA podrían ser de utilidad ya que permitirían una reducción de los niveles inflamatorios caracterizados por la proliferación de células microgliales.

Además de la disminución del número de células microgliales mostramos que el tratamiento con el agente antineoplásico *Busulfán* es capaz de disminuir las sub-poblaciones de células microgliales que sobre-expresan CD68 y MHCII. Los niveles de ambos marcadores ya se ven aumentados en la fase pre-sintomática de la enfermedad y alcanzan niveles significativamente mayores durante la fase sintomática, tanto en los modelos murinos como en humanos (54). Diversos reportes han mostrado que la expresión de estos marcadores, así como el número de células que los expresan, aumenta con la progresión de la ELA (24). Por lo tanto es posible pensar que la modulación negativa de estos marcadores podría tener un efecto positivo al momento de enlentecer la progresión de la enfermedad.

La reducción del número de células microgliales fue evidenciada además en la sustancia blanca de la médula espinal así como en las raíces ventrales. Luego del tratamiento con *Busulfán* existe una disminución significativa de las poblaciones de microglía Iba1+, CD68+ y MHCII+ en la sustancia blanca. Trabajos previos han mostrado la acumulación temprana de microglía en el asta ventral de la médula espinal y en la sustancia blanca adyacente, además de la acumulación de macrófagos en las raíces ventrales (23, 57). El número de estas células van aumentando acorde progresa la patología, por tanto se

podría pensar que modulando negativamente el número de estas células es posible tener un efecto positivo en la progresión de la enfermedad.

Conclusiones

Los resultados nos permiten concluir que tanto las células AbAs como las células microgliales son susceptibles a la quimioterapia con el agente antineoplásico Busulfán. Esta reducción de los niveles neuro-inflamatorios en el microambiente neurodegenerativo que rodea a las MTNs podría enlentecer la progresión de la enfermedad. Las células AbAs que proliferan en la médula espinal podrían ser blanco en la búsqueda de nuevos fármacos dirigidos a las células gliales proliferantes, principales causantes de la progresión lesional en la ELA. Además esta disminución de la reactividad astrocitaria y microglial podrían ser beneficiosos pensando en terapias de remplazo celular, donde la modulación previa del microambiente degenerativo es necesaria para que la médula espinal pueda ser repoblada por las células trasplantadas.

Perspectivas

- Encontrar nuevas vías de administración.
Como el Busulfán afecta en gran medida a las células de la línea hematopoyética, es importante encontrar nuevas vías de administración, alternativas a la sistémica
- Evaluar si el tratamiento con Busulfán (administrados de forma sistémica o local) es capaz de enlentecer la progresión de la enfermedad.
- Evaluar el efecto que tiene el Busulfán sobre otras poblaciones celulares
- Evaluar el efecto de otros compuestos antineoplásicos

BIBLIOGRAFÍA

1. L. C. Wijesekera, P. N. Leigh, Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet journal of rare diseases* **4**, 3 (2009).
2. D. Rossi, A. Volterra, Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration. *Brain research bulletin* **80**, 224 (Oct 28, 2009).
3. J. Lasiene, K. Yamanaka, Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology research international* **2011**, 718987 (2011).
4. D. R. Rosen *et al.*, Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59 (Mar 4, 1993).
5. A. E. Renton, A. Chio, B. J. Traynor, State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nature neuroscience* **17**, 17 (Jan, 2014).
6. S. Boillee, C. Vande Velde, D. W. Cleveland, ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* **52**, 39 (Oct 5, 2006).
7. M. E. Gurney, Transgenic-mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The New England journal of medicine* **331**, 1721 (Dec 22, 1994).
8. L. I. Bruijn *et al.*, Elevated free nitrotyrosine levels, but not protein-bound nitrotyrosine or hydroxyl radicals, throughout amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-like disease implicate tyrosine nitration as an aberrant in vivo property of one familial ALS-linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 7606 (Jul 8, 1997).
9. D. S. Howland *et al.*, Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 1604 (Feb 5, 2002).
10. A. Pramatarova, J. Laganier, J. Roussel, K. Brisebois, G. A. Rouleau, Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**, 3369 (May 15, 2001).
11. M. M. Lino, C. Schneider, P. Caroni, Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**, 4825 (Jun 15, 2002).
12. Y. H. Gong, A. S. Parsadanian, A. Andreeva, W. D. Snider, J. L. Elliott, Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, 660 (Jan 15, 2000).
13. D. Brites, A. R. Vaz, Microglia centered pathogenesis in ALS: insights in cell interconnectivity. *Frontiers in cellular neuroscience* **8**, 117 (2014).
14. G. E. Landreth, Microglia in central nervous system diseases. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* **4**, 369 (Dec, 2009).
15. R. M. Ransohoff, V. H. Perry, Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annual review of immunology* **27**, 119 (2009).
16. F. Vilhardt, Microglia: phagocyte and glia cell. *The international journal of biochemistry & cell biology* **37**, 17 (Jan, 2005).
17. K. Ji, J. Miyauchi, S. E. Tsirka, Microglia: an active player in the regulation of synaptic activity. *Neural plasticity* **2013**, 627325 (2013).
18. R. C. Paolicelli *et al.*, Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* **333**, 1456 (Sep 9, 2011).
19. G. W. Kreutzberg, Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences* **19**, 312 (Aug, 1996).

20. A. Michelucci, T. Heurtaux, L. Grandbarbe, E. Morga, P. Heuschling, Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. *Journal of neuroimmunology* **210**, 3 (May 29, 2009).
21. C. Colton, D. M. Wilcock, Assessing activation states in microglia. *CNS & neurological disorders drug targets* **9**, 174 (Apr, 2010).
22. S. H. Appel, W. Zhao, D. R. Beers, J. S. Henkel, The microglial-motoneuron dialogue in ALS. *Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology / edited by the Gaetano Conte Academy for the study of striated muscle diseases* **30**, 4 (Jun, 2011).
23. D. J. Graber, W. F. Hickey, B. T. Harris, Progressive changes in microglia and macrophages in spinal cord and peripheral nerve in the transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuroinflammation* **7**, 8 (2010).
24. T. Sanagi *et al.*, Appearance of phagocytic microglia adjacent to motoneurons in spinal cord tissue from a presymptomatic transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuroscience research* **88**, 2736 (Sep, 2010).
25. S. Boillee *et al.*, Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* **312**, 1389 (Jun 2, 2006).
26. A. E. Frakes *et al.*, Microglia induce motor neuron death via the classical NF-kappaB pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* **81**, 1009 (Mar 5, 2014).
27. J. S. Henkel, D. R. Beers, W. Zhao, S. H. Appel, Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* **4**, 389 (Dec, 2009).
28. K. Ohsawa, Y. Imai, H. Kanazawa, Y. Sasaki, S. Kohsaka, Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *Journal of cell science* **113 (Pt 17)**, 3073 (Sep, 2000).
29. B. R. Tambuyzer, P. Ponsaerts, E. J. Nouwen, Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. *Journal of leukocyte biology* **85**, 352 (Mar, 2009).
30. J. S. Henkel, D. R. Beers, L. Siklos, S. H. Appel, The chemokine MCP-1 and the dendritic and myeloid cells it attracts are increased in the mSOD1 mouse model of ALS. *Molecular and cellular neurosciences* **31**, 427 (Mar, 2006).
31. M. V. Sofroniew, H. V. Vinters, Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica* **119**, 7 (Jan, 2010).
32. D. D. Wang, A. Bordey, The astrocyte odyssey. *Progress in neurobiology* **86**, 342 (Dec 11, 2008).
33. J. De Keyser, J. P. Mostert, M. W. Koch, Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. *Journal of the neurological sciences* **267**, 3 (Apr 15, 2008).
34. M. V. Sofroniew, Reactive astrocytes in neural repair and protection. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **11**, 400 (Oct, 2005).
35. C. Scuderi, C. Stecca, A. Iacomino, L. Steardo, Role of astrocytes in major neurological disorders: the evidence and implications. *IUBMB life* **65**, 957 (Dec, 2013).
36. T. Magnus *et al.*, Adult glial precursor proliferation in mutant SOD1G93A mice. *Glia* **56**, 200 (Jan 15, 2008).
37. M. Pehar *et al.*, Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry* **89**, 464 (Apr, 2004).
38. L. H. Barbeito *et al.*, A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain research. Brain research reviews* **47**, 263 (Dec, 2004).

39. P. Cassina *et al.*, Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry* **93**, 38 (Apr, 2005).
40. P. Cassina *et al.*, Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 4115 (Apr 16, 2008).
41. P. Diaz-Amarilla *et al.*, Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 18126 (Nov 1, 2011).
42. E. Trias *et al.*, Phenotypic transition of microglia into astrocyte-like cells associated with disease onset in a model of inherited ALS. *Frontiers in cellular neuroscience* **7**, 274 (2013).
43. D. Y. Pacheco, C. Cook, J. R. Hincks, N. W. Gibson, Mechanisms of toxicity of hepsulfam in human tumor cell lines. *Cancer research* **50**, 7555 (Dec 1, 1990).
44. O. Pauwels, G. Atassi, R. Kiss, Combination of computerized morphonuclear and multivariate analyses to characterize in vitro the antineoplastic effect of alkylating agents. *Journal of pharmacological and toxicological methods* **33**, 35 (Feb, 1995).
45. C. A. Lewis *et al.*, Myelosuppressive conditioning using busulfan enables bone marrow cell accumulation in the spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS one* **8**, e60661 (2013).
46. M. R. Vargas *et al.*, Stimulation of nerve growth factor expression in astrocytes by peroxynitrite. *In vivo* **18**, 269 (May-Jun, 2004).
47. P. Cassina *et al.*, Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. *Journal of neuroscience research* **67**, 21 (Jan 1, 2002).
48. F. Brozzi, C. Arcuri, I. Giambanco, R. Donato, S100B Protein Regulates Astrocyte Shape and Migration via Interaction with Src Kinase: IMPLICATIONS FOR ASTROCYTE DEVELOPMENT, ACTIVATION, AND TUMOR GROWTH. *The Journal of biological chemistry* **284**, 8797 (Mar 27, 2009).
49. R. Donato *et al.*, S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochimica et biophysica acta* **1793**, 1008 (Jun, 2009).
50. C. M. Long-Smith, A. M. Sullivan, Y. M. Nolan, The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Progress in neurobiology* **89**, 277 (Nov, 2009).
51. M. P. Mount *et al.*, Involvement of interferon-gamma in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 3328 (Mar 21, 2007).
52. C. Schwab, P. L. McGeer, Inflammatory aspects of Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **13**, 359 (May, 2008).
53. G. Ellrichmann, C. Reick, C. Saft, R. A. Linker, The role of the immune system in Huntington's disease. *Clinical & developmental immunology* **2013**, 541259 (2013).
54. J. Brettschneider *et al.*, Microglial activation and TDP-43 pathology correlate with executive dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica* **123**, 395 (Mar, 2012).
55. S. E. Fendrick, Q. S. Xue, W. J. Streit, Formation of multinucleated giant cells and microglial degeneration in rats expressing a mutant Cu/Zn superoxide dismutase gene. *Journal of neuroinflammation* **4**, 9 (2007).
56. Y. Xie, P. Weydt, D. S. Howland, M. Kliot, T. Moller, Inflammatory mediators and growth factors in the spinal cord of G93A SOD1 rats. *Neuroreport* **15**, 2513 (Nov 15, 2004).

57. M. C. Dal Canto, M. E. Gurney, Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *The American journal of pathology* **145**, 1271 (Dec, 1994).