



**Tesis de Grado de la Licenciatura en Ciencias
Biológicas –Orientación Neurociencias–**

**Estudio de los efectos de la administración
perinatal de ácido glutárico sobre
poblaciones astrocitarias y neuronales de
estriado, hipocampo y cerebelo**

Estudiante: María Noel Sarlabós

**Tutor: Dra. Silvia Olivera Bravo
Neurobiología Celular y Molecular
Instituto de Investigaciones Clemente Estable (IIBCE)
Agosto 2013**

Agradecimientos

A mi tutora Silvia Olivera por haberme dado la oportunidad de formar parte del grupo. Muchas gracias por tu dedicación, paciencia y conocimiento compartido.

Al tribunal por aceptar corregir este trabajo y por dedicarme su tiempo.

A mis compañeros de laboratorio, Eugenia, Mariana, Valentín, Pablo y Emiliano, por haber hecho el día a día muy ameno y haberme ayudado en lo que he necesitado.

A mi familia, en especial, a mis padres y esposo, por el apoyo y comprensión incondicional. A mi hermosa hija, Rocío, por iluminarme día a día.

INDICE

RESUMEN	4
<u>INTRODUCCIÓN</u>	5
ACIDEMIA GLUTÁRICA TIPO I (GAI)	5
<i>INTRODUCCIÓN GENERAL</i>	5
<i>ESTRUCTURAS CEREBRALES AFECTADAS</i>	7
<i>Estriado: introducción general y daño en GAI</i>	7
<i>Hipocampo: introducción general</i>	9
<i>Cerebelo: introducción general</i>	11
<i>Afectación del hipocampo y cerebelo en GAI</i>	13
<i>MODELOS EXPERIMENTALES DE GAI</i>	14
<i>MECANISMOS DE DAÑO PROPUESTOS PARA GAI</i>	15
<i>UNA NUEVA HIPÓTESIS PARA GAI</i>	16
<i>Bases para una nueva hipótesis sobre la patogénesis de GAI</i>	18
<u>HIPÓTESIS DE TRABAJO</u>	19
<u>OBJETIVOS</u>	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
<u>ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN</u>	19
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	20
ANIMALES	20
MODELO EXPERIMENTAL DE GAI	20
ANESTESIA Y PERFUSIÓN	20
OBTENCIÓN DE SECCIONES DE TEJIDO	20
INMUNOHISTOQUÍMICA	21
<i>Bases</i>	21
<i>Marcadores empleados</i>	21
<i>Reclutamiento antigénico para NeuN</i>	23
<i>Protocolo de inmunohistoquímica</i>	23
EVALUACIÓN DE NEURODEGENERACIÓN MEDIANTE FLUORO JADE C	23
ANÁLISIS DE DATOS	24
<u>RESULTADOS</u>	25
EFFECTOS DE GA SOBRE ASTROCITOS Y NEURONAS DEL ESTRIADO	25
EFFECTOS DE GA SOBRE ASTROCITOS Y NEURONAS DEL HIPOCAMPO	28
EFFECTOS DE GA SOBRE ASTROCITOS Y NEURONAS DEL CEREBELO	30
<u>DISCUSIÓN</u>	33
<u>PERSPECTIVAS</u>	35
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	35

RESUMEN

La acidemia glutárica I (GAI) es un trastorno genético autosómico recesivo del catabolismo del triptófano, lisina e hidroxilisina que se caracteriza por la acumulación de ácido glutárico (GA) y metabolitos relacionados en tejidos y fluidos corporales. GAI afecta a niños pequeños nacidos aparentemente normales que luego de una crisis encefalopática sufren neurodegeneración estriatal aguda y secuelas neurológicas permanentes. Los mecanismos patogénicos de la enfermedad no han sido dilucidados y las evidencias experimentales descartan a las neuronas como blancos celulares primarios de los metabolitos acumulados. Nuestro grupo ha propuesto que dichos metabolitos producen una disfunción astrocitaria que participa en la muerte neuronal característica de GAI. Para probarlo desarrollamos un modelo animal de GAI reproduciendo, mediante una inyección intracerebroventricular de GA en ratas neonatas, las concentraciones cerebrales reportadas durante las crisis. En este trabajo, luego de la inyección de GA, evaluamos las poblaciones astrocitarias y neuronales del estriado, hipocampo y cerebelo. La administración de GA dentro de las 24 horas del nacimiento produjo una astrocitosis estriatal significativa que persistió hasta los 45 días posteriores a la inyección (P45). A P21 y P45 la disminución de la inmunoreactividad para NeuN y el aumento del marcador de neuronas en neurodegeneración Fluoro JadeC evidenciaron una muerte neuronal estriatal significativa, secundaria a la astrocitosis inicial. El análisis del marcador astrocitario GFAP y de los marcadores neuronales NeuN y GAD67 realizado a P30 en hipocampo evidenció un aumento de GFAP en los cuerpos y procesos celulares y una consistente pérdida de NeuN en la capa de granos cercana a la región subventricular. No se observaron diferencias ni en la morfología ni en el número de células positivas para GAD67. A P30, los animales inyectados con GA mostraron un aumento significativo de GFAP en la capa molecular y granular de la corteza cerebelosa y una disminución de las neuronas de Purkinje GAD67 positivas. Los resultados obtenidos nos sugieren que nuestro modelo reproduce la muerte neuronal estriatal reconocida como la principal característica de GAI. Sin embargo, la muerte neuronal estriatal no fue identificada como un daño agudo inmediato a la inyección, sino como un proceso retardado y progresivo que alcanzó significación estadística recién a P21, secundariamente a una astrocitosis permanente. Estos datos refuerzan nuestra hipótesis sobre el papel de los astrocitos en la neurodegeneración de GAI y muestran que el modelo no solo concuerda con los reportes previos donde el estriado es la estructura más afectada, sino que reproduce la astrocitosis hipocampal y la afectación tardía del cerebelo que se describen en pacientes y modelos animales de GAI.

INTRODUCCIÓN

Los errores innatos del metabolismo (EIM) son en su mayoría enfermedades monogénicas de herencia autosómica recesiva. Se producen por una alteración genética que causa un defecto enzimático y consecuentes alteraciones bioquímicas que son particulares de cada enfermedad metabólica y producen fenotipos propios de cada patología. La mayoría de los EIM se manifiestan desde las primeras horas de vida hasta la adolescencia, con síntomas y signos similares a otras patologías, lo que dificulta la identificación de cada tipo de enfermedad y conduce a secuelas importantes producidas en parte por diagnósticos tardíos o erróneos (1). Los EIM son incurables y la terapia nutricional, consistente fundamentalmente en la sustitución o disminución de las sustancias que participan en la vía metabólica alterada, es la única alternativa paliativa eficaz al momento (2). Dentro de los EIM, existe un grupo de enfermedades caracterizadas por la acumulación de grandes cantidades de ácidos orgánicos en tejidos y fluidos corporales. Estas enfermedades, denominadas acidemias orgánicas, se caracterizan por afectar selectivamente al sistema nervioso sin alterar significativamente otros sistemas. La mayoría de las acidemias orgánicas se producen por deficiencias enzimáticas del metabolismo mitocondrial de los ácidos carboxílicos activados por la coenzima A. Estos defectos producen gran acumulación de metabolitos tóxicos que alteran la homeostasis y son responsables del cuadro clínico (3) de cada una de ellas. Estos metabolitos pueden ser detectados en la orina por cromatografía y /o espectroscopía de masa (2). Entre las acidemias orgánicas más frecuentes se encuentra la acidemia glutárica tipo I (GAI).

ACIDEMIA GLUTÁRICA TIPO I (GAI)

INTRODUCCIÓN GENERAL

La acidemia glutárica tipo I (GAI) es un trastorno genético autosómico recesivo que ocurre debido a la actividad deficitaria de la enzima mitocondrial glutaril-CoA deshidrogenasa (GCDH). La GCDH participa en el catabolismo de los aminoácidos triptófano, lisina e hidroxilisina y su disfunción determina la acumulación de ácido glutárico (GA), ácido 3-hidroxiglutarico (3OHGA) y en menor medida ácido glutacónico, a nivel de los tejidos y fluidos corporales según se muestra en la figura 1 (4).

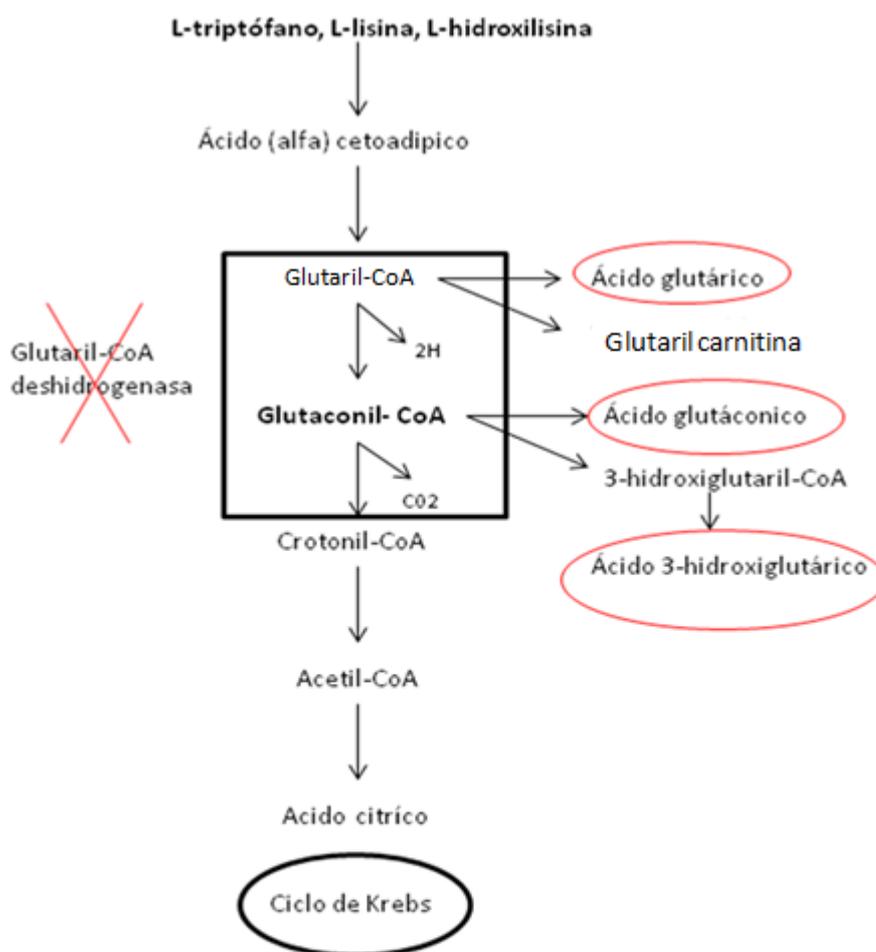


Figura 1: Esquema de la vía metabólica del triptófano, lisina e hidroxilisina. Los círculos rojos indican los principales ácidos acumulados debido a la disfunción de la GCDH.

La GAI afecta a 1:30000 nacimientos en poblaciones abiertas y hasta 1:300 en poblaciones muy cerradas con alta endogamia. Se caracteriza por la acumulación de GA y 3OHGA en la orina y por el agotamiento de carnitina ya que esta se conjuga con el glutarilo en exceso formando glutaril-carnitina. GAI usualmente se evidencia en la niñez temprana pero puede no manifestarse ocasionalmente hasta la edad adulta. Al nacer, los niños portadores de la enzima mutada aparentan ser sanos o presentan síntomas neurológicos leves difíciles de ser reconocidos como patológicos. Entre los 6 y 18 meses de vida, la enfermedad se detecta clínicamente ya que la mayoría de los niños no diagnosticados sufren crisis encefalopáticas intercurrentes que producen deficiencias neurológicas severas con secuelas motoras y cognitivas (5). Las manifestaciones clínicas pueden variar considerablemente, incluso entre hermanos con la misma mutación en GCDH, lo que sugiere un componente ambiental importante además de la genética (6). En hasta el 40% de los niños que no han sufrido crisis precipitantes, los hallazgos neurorradiológicos típicos y más frecuentes son la

macrocefalia y atrofia cortical fronto-temporal (7) que se atribuye a una alteración en la maduración durante la segunda mitad de la gestación (8). Después de las crisis encefalopáticas, la atrofia del caudado y putamen es característica y a más largo plazo alteraciones en la sustancia blanca, las que rara vez se observan en forma aguda (7). El deterioro neurológico puede aparecer de forma aguda generalmente después de una enfermedad típica de la niñez temprana o un episodio febril con algún grado de deshidratación que lleva a las crisis encefalopáticas intercurrentes. En otros casos, los menos frecuentes, el inicio puede ser insidioso, sin un evento bien definido que funcione como disparador. El primer síntoma severo en GAI suele ser es una profunda hipotonía muscular, que suele mejorar en el transcurso de los días o semanas, momento en el cual se hacen progresivamente prominentes la distonía, disquinesia y coreoatetosis. En algunos casos el inicio de la disfunción motora aguda puede estar acompañado de convulsiones (9). GAI se manifiesta raramente en adultos y el diagnóstico de la enfermedad se dificulta ya que los patrones clínicos y neurorradiológicos son diferentes a los que se manifiestan en la infancia. Entre los síntomas diferentes que presentan los pacientes adultos que suelen manifestar la enfermedad se encuentran episodios recurrentes de dolor de cabeza y una severa leucoencefalopatía evidenciada en estudios de Resonancia Magnética (RM) (7).

La enfermedad se puede diagnosticar mediante RM, tomografía computarizada, espectrometría de masa o análisis bioquímico de los metabolitos acumulados prototípicos en orina (6). Su diagnóstico precoz perinatal es esencial para realizar un manejo dietario adecuado. Se realiza actualmente en varios países y junto con una dieta baja en lisina y triptófano que incluye además L-carnitina y riboflavina (cofactor de la GCDH) se pueden prevenir las crisis encefalopáticas y gran parte del deterioro neurológico que éstas ocasionan (5). Sin embargo, por causas hasta ahora desconocidas, hasta un tercio de los pacientes diagnosticados precozmente sufren degeneración progresiva no asociada a la aparición de crisis encefalopáticas (7).

ESTRUCTURAS CEREBRALES AFECTADAS

Estriado: introducción general y daño en GAI

Estos núcleos subcorticales son simétricos y constituyen la masa celular más grande del encefalo de mamíferos (11) y se sitúan principalmente en el encéfalo anterior basal (47). El termino cuerpo estriado hace referencia a los fascículos de axones que atraviesan estos núcleos determinando un aspecto estriado cuando se secciona transversalmente (12).

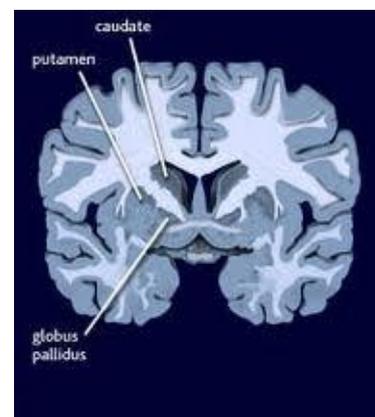


Figura 2. Esquema de una sección coronal de cerebro indicando la localización de los GB. Tomado de es.brainexplorer.org.

Desde el punto de vista estructural el núcleo caudado y pútamen son idénticos, tienen una estructura homogénea y contienen numerosas neuronas de tamaño intermedio y escasas células grandes dispersas. El 75% de las neuronas de tamaño intermedio son neuronas espinosas GABAérgicas de proyección que poseen dendritas cubiertas de espinas que irradian y se ramifican en todas las direcciones. También hay interneuronas grandes, colinérgicas e interneuronas GABAérgicas pequeñas y medianas (11). Los GB están implicados en el control de patrones complejos de la actividad motora, desempeñan un papel importante en el control cognitivo de la actividad motora y regulan la ejecución de patrones aprendidos de movimiento. Además se los vincula con funciones cognitivas como el aprendizaje procedimental y tareas de memoria de trabajo (11). Cuando se dañan ocasionan trastornos motores significativos. Por ejemplo, lesiones en el globo pálido conducen a movimientos de torsión continuos, denominados atetosis, mientras que pequeñas lesiones en el putamen, generan movimientos intermitentes llamados movimientos coreicos (10). El caudado y el putamen reciben aferencias glutamatérgicas de la corteza cerebral y del talámo, dopaminérgicas de la parte compacta de la sustancia negra y serotoninérgicas del rafe que hacen sinapsis con las neuronas espinosas medianas. Una vez integrada la información en el cuerpo estriado, este envía conexiones gabaérgicas directas e indirectas que se integran en el globo pálido interno y la parte reticulada de la sustancia negra y luego envían sus eferencias inhibitorias al talámo y colículo superior respectivamente. El talámo emite su eferencia excitadora hacia la corteza premotora, y el colículo superior hacia las motoneuronas superiores que dirigen los movimientos oculares. En condiciones normales ambas vías se equilibran, pero en condiciones patológicas en las que las neuronas que integran estas vías degeneran se producen graves problemas en el control del movimiento (12). Por ejemplo, pacientes con Corea de Huntington manifiestan movimientos involuntarios porque se afecta la transmisión de la vía indirecta como consecuencia de la degeneración de las neuronas del caudado que proyectan al globo pálido externo (10).

El estriado es afectado en una amplia variedad de enfermedades neurológicas (13). Los mecanismos que contribuyen a esta susceptibilidad particular aun no han sido dilucidados pero se cree que la concurrencia de varios factores como la presencia de fuertes aferentes glutamatérgicos, la elevada demanda energética y el alto contenido de neuronas espinosas medianas GABAérgicas es responsable de la vulnerabilidad del estriado (14).

En este sentido, la estructura más vulnerable en GAI es el cuerpo estriado (15). En pacientes que sufren crisis encefalopáticas se ha reportado que existe una muerte necrótica masiva en el estriado y luego de la degeneración estriatal una atrofia cortical progresiva (16). Se cree que la degeneración neuronal estriatal ocurre inmediatamente

luego de la primera crisis. En caso de ocurrir otras, el pronóstico se agrava, pero los efectos sobre la población neuronal estriatal remanente parecen estabilizarse paulatinamente. La severidad de las lesiones parece depender de la edad. En edades tempranas el núcleo caudado no es afectado, sugiriendo que el putamen podría ser la primera región que se afecta en GAI (16).

Se sabe poco acerca de las características específicas de la enfermedad que pueden contribuir a la vulnerabilidad de esta región. Se cree que anomalías durante el desarrollo de otras estructuras cerebrales, en particular la corteza frontotemporal, puede modular la vulnerabilidad estriatal (17). Algunos autores proponen que la vulnerabilidad del cuerpo estriado frente a los ácidos acumulados en GAI podría deberse a la abundancia de receptores de glutamato y a la cercanía estructural de los metabolitos acumulados con este neurotransmisor lo que facilitaría el daño excitotóxico (6). Esta cercanía es tal que se ha llegado a postular una competencia de GA con el glutamato por el transportador glial y una activación de receptores glutamatérgicos por GA (18). A su vez, el daño estriatal puede ser agravado por la producción de citoquinas, óxido nítrico y alteraciones vasculares reportadas en la enfermedad (6).

Según lo reportado hasta el momento, la acumulación de GA y 3OHGA produce la muerte neuronal aguda en el cuerpo estriado en el momento de la sepsis/fiebre (6). Sin embargo, aunque se creyó inicialmente que el daño estriatal era exclusivamente agudo, al menos un tercio de los pacientes de GAI sufren degeneración estriatal crónica pese a ser diagnosticados perinatalmente y manejados dietariamente para evitar la ocurrencia de las crisis encefalopáticas necrotizantes (7). Por otra parte, pacientes con aparición tardía de la enfermedad, presentan fundamentalmente una afectación de la mielina en diferentes áreas del cerebro, incluyendo el estriado (7). En el ratón knock out (KO) adulto para la GCDH la mielina del estriado también es afectada ya que se observa la presencia de vacuolas que interrumpen los haces mielínicos en forma previa a la muerte neuronal masiva (15,19).

Hipocampo: introducción general

La formación del hipocampo es una parte filogenéticamente antigua de la corteza que durante el desarrollo se desplaza desde la superficie hacia la parte interna medial del lóbulo temporal. El término hipocampo hace referencia al cuerno de Ammón (CA) y al giro dentado (GD) y su denominación deriva de su semejanza con el caballito de mar (hippokampos en griego) (20). Las neuronas del hipocampo se pueden dividir en dos tipos: las principales (neuronas piramidales localizadas en el CA y granos presentes en el GD) y las secundarias que en su gran mayoría han sido reconocidas como interneuronas GABAérgicas que poseen un papel regulatorio sobre las células principales y en la función global del hipocampo (21).

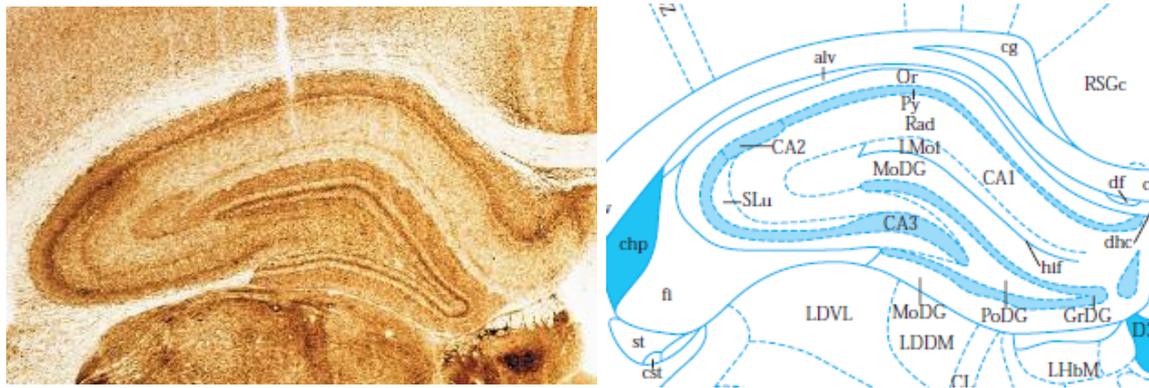


Figura 3. Corte transversal de cerebro de rata a nivel del hipocampo en el que se realizó el reconocimiento para acetilcolinesterasa (izq). A la derecha se muestra el esquema correspondiente con las diferentes regiones y estratos. Tomado de Paxinos y cols (2008, Atlas del cerebro de rata, 22).

El **Cuerno de Ammón** se divide en tres áreas (CA1, CA2, CA3, Fig. 3, 22) y posee una organización laminar fácilmente identificable en el microscopio. Presenta tres capas celulares:

-capa molecular: es la más interna y en ella se puede observar diferentes estratos: el *lúcido* donde se encuentran las fibras musgosas provenientes del GD que hacen sinapsis con las células piramidales e interneuronas GABAérgicas, el *estrato lacunosomolecular* (LMol) donde están las terminaciones de la corteza entorrinal del tálamo medial y un gran número de interneuronas y el radiado (Rad) donde se localizan las dendritas apicales de las células piramidales;

-capa piramidal (Py): se encuentra entre el estrato radiado y el *oriens* (Or). Es donde se localizan los somas de las neuronas piramidales glutamatérgicas, las únicas neuronas extrínsecas del hipocampo, y algunas interneuronas (23). Las neuronas piramidales de CA1 son más pequeñas y tienen un árbol dendrítico homogéneo; las de CA2 y CA3 poseen un árbol dendrítico extenso y son más heterogéneas;

-capa polimórfica: está recubierta por el alvéus (alv, una delgada capa de sustancia blanca formada por las fibras eferentes de las neuronas piramidales) al que se le atribuyen importantes funciones en la memoria, aprendizaje y en el manejo del espacio (20, 23). Por debajo del *alveus* se encuentra el estrato *oriens* (Or) que contiene las dendritas basales de las piramidales e interneuronas de diferentes formas y tamaños donde algunas de ellas arborizan sus axones alrededor de las células piramidales en forma de canasto y constituyen sinapsis inhibitorias GABAérgicas axo-somáticas (23).

En el **Giro Dentado** se describen tres capas o estratos:

-capa molecular (MoDG) donde se localizan las dendritas apicales de los granos y escasas interneuronas;

-capa granular (GrDG) donde se localizan los somas de los granos y diversas interneuronas entremezcladas; Los granos son el grupo principal de células ubicadas

en el GD y el tamaño celular varía dependiendo de su posición. Tienen un árbol dendrítico apical ramificado, un vértice en el soma y prácticamente no tiene dendritas basales (24). Son células excitatorias y utilizan al glutamato como neurotransmisor primario (25). La vía eferente principal la constituyen las fibras musgosas que se proyectan a la dendrita apical y basal de las neuronas de CA3 y sobre algunas interneuronas GABAérgicas;

-capa polimórfica (PoDG) donde están las dendritas basales de los granos e interneuronas GABAérgicas de mayor tamaño.

El hipocampo tiene una participación crucial en el procesamiento y consolidación de la memoria (26). En términos generales, la memoria se puede definir como la capacidad de un organismo de retener información sobre sí mismo y su entorno y utilizarla con fines adaptativos. La potenciación de larga duración (LTP) parece mediar la consolidación de la memoria a largo plazo (27). El hipocampo parece tener un rol preponderante en la LTP y distintas variantes de plasticidad sináptica asociadas al aprendizaje y la memoria. Estudios clínicos muestran que una lesión bilateral del hipocampo produce una profunda amnesia anterógrada y el deterioro de la memoria se ha observado en numerosos estudios en animales y humanos tras la lesión unilateral o bilateral de la formación hipocampal, o específicamente de sus subdivisiones indicando que todo el sistema hipocampal participa en procesos diferentes de la memoria. En este sentido, el GD y CA3 parece que se especializan en el procesamiento de patrones espaciales, mientras que CA1 parece más implicada en la información temporal y en la consolidación (28). El hipocampo se relaciona además con el procesamiento de la información emocional, ya que envía y recibe información de zonas como la amígdala, la corteza prefrontal y/o corteza cingular (12). En muchas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson, el daño hipocampal es traducido en una atrofia significativa (29, 30) y funcionalmente, en trastornos de la memoria y/o aprendizaje.

Cerebelo: introducción general

El cerebelo representa el 10% del peso del encéfalo y contiene la mitad del total de las neuronas cerebrales. Se ubica debajo de la porción occipital del encéfalo detrás del cuarto ventrículo, la protuberancia y el bulbo raquídeo. Tiene una forma más o menos ovoide y está conformado por dos hemisferios unidos por un vermis mediano estrecho (31). Es una estructura significativamente importante de los vertebrados. Determina la forma de ejecución de los actos motores eficaces y ajustados, establece la continuidad, suavidad y armonía del comportamiento motor (12). También desempeña funciones adicionales a las motoras. Existen evidencias sobre su participación en procesos

cognitivos como el lenguaje, aprendizaje, la memoria de procedimiento y en procesos de coordinación visceral (31).

El cerebelo está compuesto por una cubierta gris denominada corteza que ocupa toda la superficie y es muy extensa dado las características lobulaciones y circunvoluciones que en un corte sagital dan el aspecto de “árbol de la vida” (12). Relacionada con la corteza se encuentra la sustancia blanca que aloja en su interior a los núcleos cerebelosos y está compuesta en su mayor parte por axones aferentes que derivan de diferentes procedencias (32).

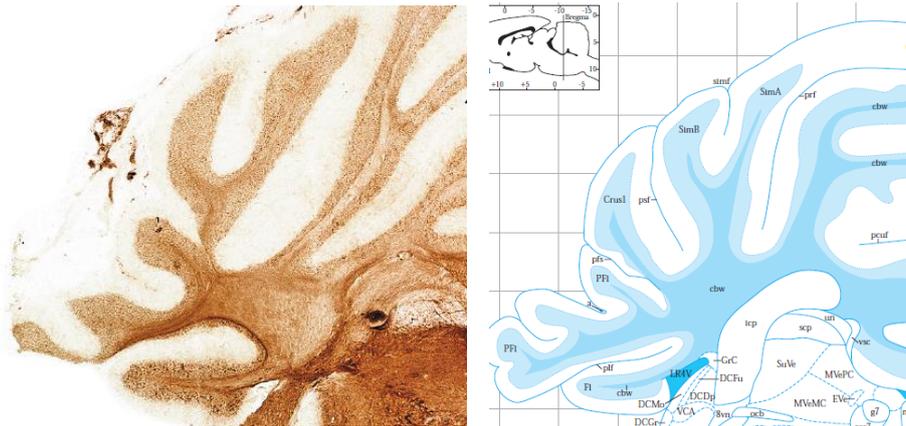


Figura 4. Corte transversal de cerebelo de rata teñido para reconocer acetilcolinesterasa (izq). A la derecha se muestra el esquema correspondiente con las diferentes regiones. Tomado de Atlas del cerebro de rata (Paxinos y cols, 2008, 22).

La organización celular de la corteza cerebelosa mantiene una disposición y conectividad que se repite sin variación desde los vertebrados más primitivos (12). La sustancia gris de la corteza posee una estructura uniforme en toda su extensión y puede dividirse en tres capas (Fig. 4):

-capa molecular: es rica en neuropilo y presenta neuronas dispersas, pequeñas células estrelladas cercanas a la superficie y las células en cesta más grandes y profundas;

-capa de células de Purkinje: está constituida por los grandes cuerpos de las células de Purkinje que se alinean en una monocapa celular donde su polo dendrítico se orienta hacia la capa molecular en disposición perpendicular a las fibras paralelas con las que establecen sinapsis excitatorias. Las células estrelladas y en cesta hacen sinapsis inhibitorias sobre las Purkinje, las primeras sobre el árbol dendrítico y las segundas sobre el cono axónico.

-capa granular: es la de mayor grosor y está constituida por las células más pequeñas del cerebro, los granos, y por células de Golgi y de Lugaro, más grandes. El axón de los granos se bifurca en forma de T en la capa molecular dando lugar a una fibra paralela. Las dendritas de los granos son escasas y cortas y terminan en engrosamientos irregulares que junto a las fibras musgosas y el axón de las células de

Golgi forman el glomérulo cerebeloso (32).

La fuente de aferencias más importante para el cerebelo deriva de la corteza cerebral y llegan a través de las fibras musgosas o fibras trepadoras. Las únicas células eferentes de la corteza cerebelosa son las de Purkinje que son GABAérgicas, por lo tanto, la eferencia es totalmente inhibitoria (32).

Muchas enfermedades se han asociado a la degeneración neuronal y/o disfunción del cerebelo. En algunas enfermedades es afectado un tipo particular de célula, por ejemplo, en las ataxias autosómicas dominantes y las ataxias espinocerebelosas, las células de Purkinje son las principalmente afectadas (33). En otras enfermedades, la afectación ocurre indiscriminadamente, como en la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, una enfermedad priónica humana, donde todas las células del cerebelo son dañadas, aunque el daño mayor es en los granos (33). En la enfermedad de Huntington, el cerebelo degenera tempranamente, independientemente de la atrofia estriatal característica de la enfermedad. Los investigadores sugieren que tal degeneración podría explicar los síntomas poco conocidos de la enfermedad como la deficiencia de movimientos rápidos alternantes y la inestabilidad postural (34). La atrofia del cerebelo también se evidenció en niños con la enfermedad de Alexander, una enfermedad de la niñez temprana causada por mutaciones del marcador astrocitario GFAP. El análisis histopatológico de estos pacientes mostró una alteración astrocitaria primaria, escasez de mielina y deposición de fibras de Rosenthal en la sustancia blanca, el núcleo dentado y a veces en las capas subpiales de la corteza cerebelosa (32).

Afectación del hipocampo y cerebelo en GAI

Aunque el estriado es la estructura más vulnerable en GAI, otras estructuras como el hipocampo y el cerebelo están afectados en pacientes y algunos modelos experimentales de GAI. Empleando el ensayo de laberinto de agua de Morris en ratas expuestas crónicamente a GA durante su desarrollo, se demostró una alteración del rendimiento cognitivo debido a la afectación de la memoria espacial, procesada en el hipocampo (35). Por otra parte, empleando el ensayo de evitación inhibitoria, se comprobó que los ratones nulos para la GCDH presentaban una reducción en la memoria a corto y largo plazo comparado con los salvajes. Se descartó a partir del ensayo de sensibilidad al choque eléctrico que la disminución de la memoria fuera producto de una menor sensibilidad al dolor (36). La afectación del hipocampo también se evidenció histológicamente en los ratones KO después de ser alimentados con una dieta alta en lisina, observándose grandes vacuolas en toda la estructura además de una fuerte astrocitosis (19, 37).

El mecanismo por el cual GA afecta la memoria y aprendizaje se desconoce. Se cree que afecta la fase de maduración del SNC, en particular, de las estructuras cerebrales

implicadas en el aprendizaje/memoria e interacción con el ambiente. Algunos autores, asocian los efectos adversos sobre el aprendizaje y la memoria con el estrés oxidativo y la excitotoxicidad (35). Por otro lado, se cree que una alteración del sistema dopaminérgico podría estar involucrado en la disminución de la memoria ya que el aumento en los niveles de dopamina extracelular están relacionado con deficiencias cognitivas y la vía dopaminérgica es importante para la formación de la memoria (36).

Por otra parte, hay evidencias de que el cerebelo también es afectado en pacientes con GAI. La autopsia de un niño de 8 meses evidenció presencia de daño neuronal isquémico en el cerebro y cerebelo (38). Mediante RM se evidenció la presencia de atrofia cerebelar en un niño en el que la enfermedad se le había diagnosticado precozmente y había incorporado una dieta baja en lisina y suplementos de carnitina (39). En un adulto de 40 años, en el tejido cerebelar se encontró una disminución moderada de las células de Purkinje (38), sugiriendo además que la afectación del cerebelo es independiente de la ocurrencia de las crisis encefalopáticas precipitantes del daño agudo. El cerebelo es afectado además en los animales más viejos del modelo knock out para GCDH (15).

MODELOS EXPERIMENTALES DE GAI

Koeller y cols (15) desarrollaron un modelo experimental de GAI que consistió en la generación de ratones deficientes de la actividad GCDH mediante la inserción del gen reportero β -galactosidasa en la región codificante de GCDH lo que produce una enzima sin actividad catalítica (15). Los ratones nulos para esta enzima muestran un fenotipo bioquímico similar al de los pacientes, presentan una elevada excreción urinaria de ácido glutárico (GA) y metabolitos asociados. Sin embargo, a nivel clínico, los ratones nulos para GCDH no presentan los síntomas propios de los pacientes de GAI, solamente manifiestan deficiencias motoras leves y mielinopatía espongiiforme difusa y no sufren degeneración estriatal, el síntoma distintivo de los que padecen la enfermedad (15).

Otros autores recurren a la sobrecarga del metabolito que más se acumula en la enfermedad, el GA, mediante diversas vías, para mimetizar la sintomatología de GAI. El grupo de Moacir Wajner (18, PoA, Brasil) administra GA subcutáneamente mediante inyecciones múltiples de grandes dosis (5 μ g/g animal por vez) y sacrifica a los animales 1 a 12 h después para evaluar parámetros energéticos y de estrés oxidativo mediante abordajes bioquímicos. En otras aproximaciones, administra GA en forma subcutánea y crónica. El GA inhibe las defensas antioxidantes y aumenta las especies reactivas desencadenando estrés oxidativo en el cuerpo estriado. Por otra parte, en aquellas ratas tratadas crónicamente con GA, el metabolismo energético del músculo

esquelético está afectado, aunque no se detectan alteraciones en el desarrollo físico/motor. En el tratamiento crónico también se muestra afectación del rendimiento cognitivo y una deficiencia del comportamiento espacial de larga duración (40).

El grupo de Figuera y Royes (41, Sta María, Brasil) recurre a la inyección intraestriatal de altas dosis de GA para producir concentraciones locales extremas y producir descargas paroxísticas epileptoides. La administración de GA y 3OHGA mediante esta vía produce convulsiones tónico-clónicas y lesiones en el cuerpo estriado en forma dependiente de la dosis. El empleo de agonistas de receptores GABAérgicos y antagonistas de receptores glutamatérgicos ha protegido contra los efectos adversos antes mencionados (41).

Zinnanti y cols (19, 37) generaron un modelo de GAI consistente en la suplementación de lisina en altas concentraciones a ratones KO para la GCDH. Utilizando este modelo, se comprueba que la toxicidad de la lisina y el tipo de lesión cerebral dependen del desarrollo y de la duración de la dieta. Los ratones jóvenes (de 4 semanas de edad) son los que presentan un inicio agudo de los síntomas (parálisis y convulsiones), grandes acumulaciones de GA en suero y cerebro, pérdida de integridad de la barrera hematoencefálica, muerte neuronal y vacuolización en el estriado. Estos animales mueren 3-6 días después del tratamiento. Los animales adultos (8 semanas de edad) que fueron sometidos a la misma dieta alta en lisina sobreviven en su mayoría (75%) y permanecen asintomáticos, acumulan menos GA, presentan astrocitosis en la corteza e hipocampo, pérdida neuronal y vacuolización en el estriado (19, 37).

MECANISMOS DE DAÑO PROPUESTOS PARA GAI

A partir de estudios *in vitro* se han identificado al menos tres mecanismos principales que pueden estar implicados en la neuropatogénesis de GAI: excitotoxicidad, alteraciones en el metabolismo energético y estrés oxidativo. La excitotoxicidad podría producirse por la similitud existente entre los metabolitos acumulados en la enfermedad y el glutamato (6,15), los que en altas concentraciones extracelulares podrían sobreestimular los receptores de glutamato y producir altos niveles de Ca^{2+} intracelular aumentando la actividad de enzimas y potenciando cascadas que dañan diferentes estructuras celulares (40). La excitotoxicidad producida por 3OHGA ha sido demostrada bloqueando su acción mediante antagonistas de receptores de glutamato (15). En cuanto a las alteraciones metabólicas, experimentos hechos en cerebro de rata y neuronas embrionarias de pollo, mostraron que GA y 3OHGA inhiben diferentes complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (Kolker y cols. 2000 citado por Jafari y cols., 40), lo que provoca un agotamiento de la energía celular que puede conducir a una excitotoxicidad secundaria. Además, el 3OHGA disminuye los niveles de fosfocreatina en cultivos corticales de rata. La fosfocreatina funciona como un tampón

de energía intracelular y se cree que el 3OHGA puede operar sobre el transportador de carnitina ya que los niveles de ATP y de la enzima responsable de su síntesis son normales (42). Otro posible mecanismo que puede contribuir a la falta de energía en GAI es el agotamiento de carnitina en el plasma debido a su conjugación con el glutarilo acumulado.

Se demostró que los metabolitos acumulados en GAI son capaces de inducir estrés oxidativo en el estriado de la rata (Latini y cols, 2005 citado por Jafari y cols, 40), cultivos neuronales y astrogliales de pollo (Kolker y cols, 2000, citado por Jafari y cols, 40). El aumento de estrés oxidativo puede producirse como consecuencia del aumento de Ca^{2+} intracelular producto de la excitotoxicidad, ya que algunas de las enzimas que aumentan su actividad debido a influjo de calcio son enzimas catabólicas que producen radicales libres del oxígeno y nitrógeno tóxicos (40). Se piensa que en la enfermedad, todos los mecanismos propuestos cooperan de modo sinérgico determinando las alteraciones neuropatológicas encontradas en los pacientes (18). Sin embargo, ninguno de ellos ha sido capaz de explicar por sí solo los distintos efectos observados en los pacientes de GAI.

UNA NUEVA HIPÓTESIS PARA GAI

Al momento ninguno de los modelos experimentales de GAI propuestos ha logrado por si solo reproducir las características principales de GAI, en particular la muerte neuronal estriatal característica. Aunque inicialmente promisorio, el modelo propuesto por Zinnanti (19, 37) no ha podido ser repetido por otros investigadores. Los mecanismos patogénicos planteados tampoco han logrado aportar un conocimiento relevante que permita abordajes terapéuticos exitosos. Contrariamente, los efectos terapéuticos obtenidos han sido muy modestos o totalmente ausentes (2).

Creemos que uno de los errores más importantes producidos al abordar esta enfermedad ha sido considerar que las neuronas son el blanco celular exclusivamente afectado en la GAI. Los abordajes realizados hasta el momento no han tomado en cuenta la posible afectación de las células gliales por acción directa o indirecta de los metabolitos acumulados en GAI. Las células gliales constituyen el 90% de las células del cerebro humano, siendo los astrocitos el subtipo glial predominante del Sistema Nervioso Central (SNC). Tradicionalmente se pensaba que las células gliales cumplían exclusivamente una función de soporte de las neuronas, pero actualmente se reconoce que juegan un papel esencial tanto en el desarrollo como en las funciones y daño del cerebro (43). En particular, los astrocitos, intervienen activamente en el neurodesarrollo, colaboran con la migración axonal, el desarrollo de neuroblastos, mantienen y reconstituyen la sinapsis y son promotores de la sinaptogénesis tanto in vivo como in vitro y contribuyen con la formación y mantenimiento de la barrera

hematoencefálica (44, 45).

Por otra parte, la evidencia científica indica que los astrocitos también participan activamente en la neurodegeneración. Frente a un daño en el SNC, los astrocitos sufren una transformación fenotípica característica que se conoce como reactividad glial, astrocitosis o astrogliosis (46, 47). Esa transformación fenotípica incluye la proliferación y la adquisición de un fenotipo reactivo caracterizado morfológicamente por la hipertrofia nuclear y del soma, el desarrollo de procesos largos y gruesos, y un alto contenido de las proteínas GFAP, nestina y vimentina. Además, el perfil de expresión génica de los astrocitos reactivos difiere del de los astrocitos normales. Los astrocitos reactivos expresan una variedad de marcadores (proteínas del citoesqueleto, moléculas de superficie, proteasas, inhibidores de proteasas, factores de crecimiento, citoquinas y muchos otros) que podrían incidir directa e indirectamente sobre la vida de las neuronas (47, 48).

Diferentes grados y formas de astrocitosis acompañan el daño del SNC y el curso de numerosas enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Alzheimer (46-48). Un ejemplo de astrocitosis reactiva en el hipocampo se observa en el modelo de epilepsia aguda producido por inyección de ácido kainico intrahipocampal (46). Entre los efectos reportados se mencionaron aumento de la inmunoreactividad de GFAP acompañado de un cambio en la morfología astrocitaria y muerte neuronal significativa en CA1 (46).

La reactividad astrocitaria también ha sido implicada en diversas patologías del neurodesarrollo como la leucomalacia periventricular y la enfermedad de Alexander (44). La leucomalacia periventricular se identifica por la necrosis de sustancia blanca periventricular, presencia de macrófagos, esferoides axonales, reactividad astrocitaria y activación de microglia. Aún no está claro el papel de los astrocitos reactivos en esta enfermedad pero se piensa que están involucrados en la lesión de oligodendrocitos premielinizantes debido a la liberación de especies reactivas de nitrógeno y citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (50). La enfermedad Alexander es una leucoencefalopatía que prevalece en la infancia, los síntomas suelen manifestarse dentro de los primeros dos años de vida y generalmente incluyen macrocefalia, retraso del desarrollo psicomotor y convulsiones. Esta enfermedad se caracteriza histológicamente por la presencia, únicamente en astrocitos, de fibras de Rosenthal (51) en forma de inclusiones citoplasmáticas ricas en GFAP. En la mayoría de los casos, la enfermedad de Alexander se atribuye a mutaciones en el gen que codifica GFAP pero se desconoce mayormente como una afectación astrocitaria primaria afecta a la mielina y produce degeneración posteriormente (52).

Bases para una nueva hipótesis sobre la patogénesis de GAI

Como los modelos experimentales empleados no han logrado mimetizar la enfermedad y los datos de pacientes con GAI indican que las neuronas no son la población celular que primero se afecta, nuestro grupo ha comenzado el estudio de esta enfermedad desde un punto de vista nuevo. Sostenemos que las células gliales, en particular los astrocitos, estarían involucrados en la muerte neuronal característica de GAI (44, 53, 54).

En primera instancia postulamos que los astrocitos son los blancos primarios de los metabolitos acumulados en GAI porque:

- 1) los datos experimentales indican que las altas concentraciones o los niveles elevados de GA y metabolitos asociados no matan neuronas (55);
- 2) los astrocitos son responsables de la mayor parte de la captación de glutamato en el cerebro y el GA y 3OHGA compiten con el glutamato por sus transportadores (56);
- 3) la muerte neuronal ocurre solo intercurrente con otros daños tal como lo demuestra la ausencia de muerte neuronal en el ratón KO para la GCDH (57);
- 4) los astrocitos son vulnerables durante el desarrollo a una serie de mecanismos o estímulos que se han reportado en la enfermedad (58).

Para probar nuestra hipótesis sobre la participación de los astrocitos en la muerte neuronal característica de GAI desarrollamos un modelo animal de la enfermedad reproduciendo en el cerebro de ratas neonatas, las concentraciones cerebrales de GA reportadas durante las crisis de los pacientes (44, 53). Como GA no cruza la barrera hematoencefálica (59), para obtener concentraciones cerebrales altas se realizó una administración intracerebroventricular inyectando en el IV ventrículo, Cisterna magna. Los animales controles fueron inyectados de la misma manera con un volumen igual de vehículo (buffer fosfato salino, PBS, 10 mM, pH 7.4). Empleando este modelo, hemos mostrado que a las 24 h y a los 5 días posteriores a la inyección, la población astrocitaria en el estriado incrementa su número hasta 3 veces con respecto al control, mientras que el número y la morfología de la población neuronal y de precursores de oligodendrocitos se mantienen incambiadados (53,54). GA, induce en los astrocitos estriatales una disfunción mitocondrial significativa, aumento de estrés oxidativo y alteración de vías mitogénicas dependientes de MAP kinasas (44, 53).

Ahora nos proponemos evaluar en nuestro modelo si las poblaciones neuronales del estriado y de estructuras vulnerables durante el desarrollo como el hipocampo y el cerebelo podrían ser afectadas.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Niveles cerebrales de GA capaces de producir una disfunción astrocitaria pueden alterar la sobrevivencia de neuronas estriatales y eventualmente afectar las poblaciones astrocitarias y neuronales del hipocampo y cerebelo. Este daño podría contribuir a explicar en parte las alteraciones cognitivas y motoras de los pacientes de GAI.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Conocer si la administración perinatal de una dosis de GA equivalente a la reportada en los pacientes durante las crisis es capaz de afectar las poblaciones astrocitarias y neuronales del estriado, hipocampo y cerebelo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Conocer y evaluar los efectos de la administración perinatal de GA sobre la población astrocitaria y neuronal estriatal a los 5, 12, 21 y 45 días posteriores a una administración perinatal de una dosis de GA similar a la reportada durante las crisis en los pacientes
- 2) En caso de ocurrir muerte neuronal estriatal, evaluar los efectos sobre la población astrocitaria y/o neuronal del hipocampo y cerebelo a una edad en que la muerte neuronal estriatal se encuentra establecida.

ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

Las actividades se planificaron teniendo en cuenta que el estriado es la estructura más vulnerable en GAI (10). El estudio comenzó analizando los efectos de GA sobre el estriado y una vez determinado el curso temporal de la muerte neuronal estriatal se estudiaron los efectos sobre hipocampo y cerebelo a una edad determinada como P30 (30 días posteriores a la administración perinatal).

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, para cumplir con los objetivos planteados se realizaron las siguientes actividades:

- 1) Administración de GA en concentraciones fisiopatológicas o PBS (controles) a ratas dentro de las 24 h de nacidas
- 2) Sacrificio y fijación de los animales a distintos tiempos de sobrevivencia y evaluación de

la reactividad astrocitaria y de la población neuronal estriatal mediante inmunohistoquímica y tinción con Fluoro-Jade C

3) Estudio de la población astrocitaria y/o neuronal del hipocampo y cerebelo de animales controles y GA a los 30 días post-inyección.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Se emplearon 5 nacimientos completos de ratas SpragueDawley (SD) criadas en el bioterio del IIBCE), 4 de ellos para cumplir el objetivo 1 y el restante para realizar el objetivo 2. Los protocolos realizados fueron aprobados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del IIBCE (30.05.2012).

MODELO EXPERIMENTAL DE GAI

Dentro de las 24 h de nacidos, se aplicó una dosis de 2,5 $\mu\text{mol/g}$ (pH 7,4) de GA intracerebroventricular (icv) en el IV ventrículo, cisterna magna. Los controles recibieron igual volumen de vehículo (PBS, 10 mM, pH 7.4). La inyección se realizó en forma manual utilizando 2 a 5 μl mediante una aguja de anestesia de 30G unida a una extensión de Tygon. Luego de la inyección las crías fueron retornadas a la madre y se dejaron sobrevivir hasta los 5, 12, 21, 30 o 45 días posteriores a la inyección. A esta/s edad/es, se procesaron los animales controles e inyectados con GA para estudios inmunohistoquímicos (NeuN, GAD67, GFAP, S100 β) o análisis de muerte neuronal mediante Fluorojade C.

ANESTESIA Y PERFUSIÓN

Los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de Ketamina/Xilacina (90:10mg/Kg) y una vez que perdieron la conciencia se realizó una perfusión intracardíaca luego de exponer el corazón, cortar la aurícula derecha e inyectar las soluciones a través del ventrículo izquierdo. Mediante una bomba peristáltica de bajo flujo se pasó un volumen de solución de lavado (NaCl 0,9%; 0,4% citrato de sodio) y dos volúmenes de solución fijadora (paraformaldehído 4% en PBS 10 mM, pH=7,4). Luego de la fijación, se disecaron el cerebro y cerebelo. Ambos se mantuvieron en fijador a 4°C durante 24 h, luego se cambiaron a PBS y se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento.

OBTENCIÓN DE SECCIONES DE TEJIDO

Cada cerebro y cerebelo fijado y disecado fue seccionado en cortes transversales de

50 µm en vibrátomo (Leica VTS1000). Para realizar los cortes, la base del cerebro o cerebelo se adhirió a una platina móvil y se ajustó la velocidad y frecuencia a una posición 6 sobre una escala de 10. Los cortes de estriado se tomaron en series de una región contenida entre las coordenadas (bregma 1,56 mm, interaural 0,50 y bregma -0,24 mm e interaural 8,76). Para el hipocampo, se tomaron secciones entre bregma -2,28 mm, interaural 6,72 mm y bregma -3,00 mm e interaural 6,00 mm. Las secciones se recibieron en una cubeta con PBS (10 mM, pH=7,4) y se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Bases

La inmunohistoquímica consiste en la identificación *in situ* de antígenos celulares o tisulares mediante anticuerpos específicos. Esta técnica tiene sus orígenes en la década de los 40, cuando Coons y cols describieron la identificación de un antígeno en un tejido usando un protocolo de inmunofluorescencia directa (60). Existen diferentes técnicas: directas donde el anticuerpo específico que va a reconocer el antígeno a identificar está conjugado a un marcador que se visualiza directamente o indirectas donde se emplea un anticuerpo específico no marcado (anticuerpo primario) y en una segunda fase un anticuerpo marcado (anticuerpo secundario) que reconoce al anticuerpo primario (61). La especificidad y grado de la reacción dependerá del equilibrio antígeno-anticuerpo que se forme, de la calidad y selectividad de los anticuerpos empleados, así como de la calidad de la muestra a analizar y de la abundancia de antígenos que la misma posea.

Marcadores empleados

Proteína neuronal nuclear (NeuN)

NeuN es una proteína neuronal nuclear que puede ser utilizada como marcador temprano y específico de la mayoría de las neuronas (28), sin embargo está ausente en las células de Purkinje en el cerebelo, las mitrales del bulbo olfatorio y fotorreceptoras retinianas. No todos los tipos neuronales poseen el mismo nivel de expresión de NeuN lo que podría correlacionarse con el grado de diferenciación o funcionamiento neuronal. Su localización no es exclusivamente nuclear. Se ha observado en menor medida en el citoplasma y en las prolongaciones (principalmente dendritas). Aun no existen evidencias sobre la posible función de NeuN en el citoplasma o si simplemente se sintetiza allí antes de ser transportada al núcleo. Las funciones de NeuN son mayormente desconocidas pero se cree que debido a su localización nuclear, solubilidad, y propiedades de unión al ADN, puede ser una

proteína reguladora específica del Sistema Nervioso (62).

Acido Glutámico Descarboxilasa (GAD):

La GAD es la enzima que sintetiza el neurotransmisor GABA al catalizar la descarboxilación del ácido glutámico. En el cerebro adulto de mamíferos existen dos isoformas de 65 y 67 kDa y que difieren en su localización subcelular. GAD65 se localiza fundamentalmente en las terminales sinápticas y en menor medida en el soma, GAD67 es soluble y se distribuye fundamentalmente en el citoplasma y en las terminales sinápticas en menor medida (63). GAD67 además de sintetizar el GABA está implicada en su carga vesicular. Estudios en ratones knockout para GAD67 muestran que los animales son inviables y que hay una reducción del 93% en los niveles de GABA (64). Por otra parte, se han reportado aumentos en la expresión de GAD67 en el hipocampo de pacientes con esquizofrenia y epilepsia. Los animales knockout para GAD65 viven hasta la adultez, y en general son normales aunque exhiben cierta susceptibilidad a las convulsiones y alteraciones de la plasticidad cortical visual (64).

GFAP

La GFAP es una proteína perteneciente a la familia de los filamentos intermedios de tipo III. Se expresa predominantemente en los astrocitos maduros siendo el marcador clásico consensuado. Se han identificado hasta el momento ocho isoformas que se expresan en subconjuntos específicos de astrocitos y podrían tener una expresión espacial y temporal diferente que puede determinar una función especializada durante el desarrollo y envejecimiento del cerebro. Su expresión es altamente regulada, inducida por múltiples factores tales como lesiones cerebrales y enfermedad, y fluctúa según el ciclo circadiano luz-oscuridad. El estudio de las funciones de GFAP realizado en modelos animales que aumentan o disminuyen su expresión, ha permitido conocer que GFAP participa en la migración celular, funcionamiento de la barrera hematoencefálica, vías de señales de traducción e interacciones neurona-glía y se discute si desempeña un rol activo durante el daño del SNC o es un signo que lo acompaña. La expresión de GFAP aumenta en varias patologías del SNC, como en la enfermedad de Alzheimer y de Creutzfeldt-Jacob. Su expresión está alterada además en diferentes condiciones neurológicas incluyendo el desarrollo, infecciosas e inflamatorias, vasculares y trastornos del estado de ánimo (65).

S100 β

Es una proteína de unión al calcio que se expresa en astrocitos del SNC. Se encuentra en el citoplasma asociada a membranas y a elementos del citoesqueleto, y se

considera un marcador de astrocitos inmaduros y sus precursores. S100 β aumenta su expresión en condiciones de daño (66) y concentraciones elevadas de esta proteína son consideradas marcadores gliales asociados a astrocitos comprometidos en su viabilidad, gracias a su capacidad para activar células de microglia (67), y de amplificar las cascadas astrocitarias a través de una señalización autocrina (66, 67).

Reclutamiento antigénico para NeuN

El reclutamiento de antígenos previo a la inmunohistoquímica de NeuN tuvo como fin exponer los epítopes nucleares para su reconocimiento con el anticuerpo específico. Los cortes se llevaron a ebullición sobre tela de amianto luego de ser puestos en una solución de citrato de sodio (10mM, pH 6) en una relación de volumen tejido/buffer 1:100. Se dejaron reposar durante 10 min sobre la tela caliente y luego 20 min a temperatura ambiente con agitación. Se hicieron tres lavados de 10 min con PBS 10 mM, pH 7.4 y se comenzó con el protocolo usual de inmunohistoquímica.

Protocolo de inmunohistoquímica

Los cortes fueron lavados en PBS durante 5 min. Se permeabilizaron con PBS-Tritón 0,3% durante 20 min en agitación y se bloquearon las interacciones inespecíficas con PBS-BSA 5% por 30 min en agitación. Luego, los cortes se incubaron con los anticuerpos primarios anti-GFAP (1:400, Sigma), anti-GAD67 (1:150, abcam) o anti-Neun (1:200, Chemicon) en cámara húmeda toda la noche. Al día siguiente, los tejidos se lavaron 3 veces durante 10 min y se incubaron con los anticuerpos secundarios (1:500) conjugados a una sonda fluorescente (Alexa Fluor 488 ó Alexa Fluor 546, Invitrogen) durante 1 h y 30 min, en oscuridad y a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces durante 5 min y se montó en glicerol 30% con 1 μ g/ml de DAPI (diaminofenilindol) para visualizar núcleos. Los cortes se visualizaron en un microscopio confocal Olympus FV300 y las imágenes de controles e inyectados con GA fueron obtenidos con la misma potencia de laser y con el mismo nivel de fotomultiplicador.

EVALUACIÓN DE NEURODEGENERACIÓN MEDIANTE TINCIÓN FLUORO JADEC

El Fluoro Jade C (FJC) es un colorante fluorescente que permite detectar y localizar neuronas en degeneración a partir de su alta afinidad por moléculas que se expresan mayormente en las membranas de neuronas degenerantes (68). Es extremadamente específico aunque en raras ocasiones se ha observado la tinción de astrocitos y eritrocitos.

Para identificar neuronas degenerantes estriatales, se realizó el protocolo descrito por Schmued y cols (2005, 68) con modificaciones menores. Las secciones de tejido

obtenidas a vibrátomo (20 μm) fueron deshidratados-rehidratados (alcohol-agua destilada), oxidados con permanganato de potasio 0,06% e incubados con FJC 0,0001% a temperatura ambiente durante 20 min. Se lavaron y dejaron secar. Se aclararon con xileno y montaron con DPX. La detección de la fluorescencia resultante se realizó por microscopía confocal.

ANÁLISIS DE DATOS

Se realizaron comparaciones entre animales controles (3-5 por edad) y sus hermanos inyectados con GA (3-7 por edad). Se analizaron entre 5-10 cortes por animal para cubrir hasta un 80% de la estructura en estudio. Dentro de cada estructura analizada, se fotografiaron 5 campos al azar de cada corte a aumentos de 20x o 40x. Las células y núcleos se cuantificaron manualmente con el programa Image J (NIH). La medida de intensidad se realizó con el parámetro "Mean Gray Value" del mismo programa. Se emplearon test paramétricos (*t* de Student) y no paramétricos (Mann Whitney) para la comparación entre grupos tratados y controles en función de los datos obtenidos. El análisis estadístico se realizó con SigmaStat 2.0. Los valores representados en los gráficos corresponden a la media \pm SEM (error estándar). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0,05$.

RESULTADOS

EFFECTOS DE GA SOBRE ASTROCITOS Y NEURONAS DEL ESTRIADO

La administración de GA produjo una astrocitosis significativa (Fig. 5). Se observó un incremento de hasta 3 veces del número de células S100 β a los 5 días posteriores a la inyección (P5) con respecto con el control inyectado con vehículo. En las otras edades, el incremento en células S100 β fue menor, pero el número de éstas fue siempre mayor en los animales GA que en los controles. El número de astrocitos GFAP en los animales GA se mantuvo elevado en valores estables, duplicando el número de células positivas respecto al control. Estos datos indican que la fuerte reacción astrocitaria inmediata a la administración de GA decae con el tiempo pero se mantiene aumentada respecto del control.

El análisis de la inmunotinción para NeuN muestra una disminución notoria y un cambio en el patrón de tinción. En los animales controles se observó una marcación intensa en el núcleo y una menor en el citoplasma. En los animales inyectados con GA se observó menor número de células marcadas y una intensidad similar que no permitió diferenciar el núcleo del citoplasma (Fig. 6A). En los animales inyectados con GA, el número de neuronas NeuN positivas se mantuvo incambiado hasta P12 y disminuyó significativamente a P21 y P45 (Fig. 6B).

El número de neuronas en degeneración marcadas con Fluoro Jade C en el estriado de los animales controles no fue significativo a ninguna de las edades analizadas (Fig. 7A). Sin embargo, en los animales GA, se observó un aumento de la marcación que fue progresivo y se hizo significativo a P21 y P45 (Fig. 7B, C). La tinción fue predominantemente nuclear y más débil en el citoplasma. La morfología y el tamaño de las células marcadas indican que probablemente son neuronas y no astrocitos reactivos como se ha reportado previamente.

El análisis conjunto de la inmunotinción para NeuN y la tinción de FJC, permitió establecer que entre P21 y P45 parece alcanzarse una meseta en el número de neuronas NeuN o FJC positivas. Por ello, se decidió analizar la población de neuronas GABAérgicas en el estriado a una edad que estuviera entre P21 y P45. Se eligió P30, dado que es una edad donde la muerte neuronal estriatal está establecida y los animales son jóvenes y de fácil manejo.

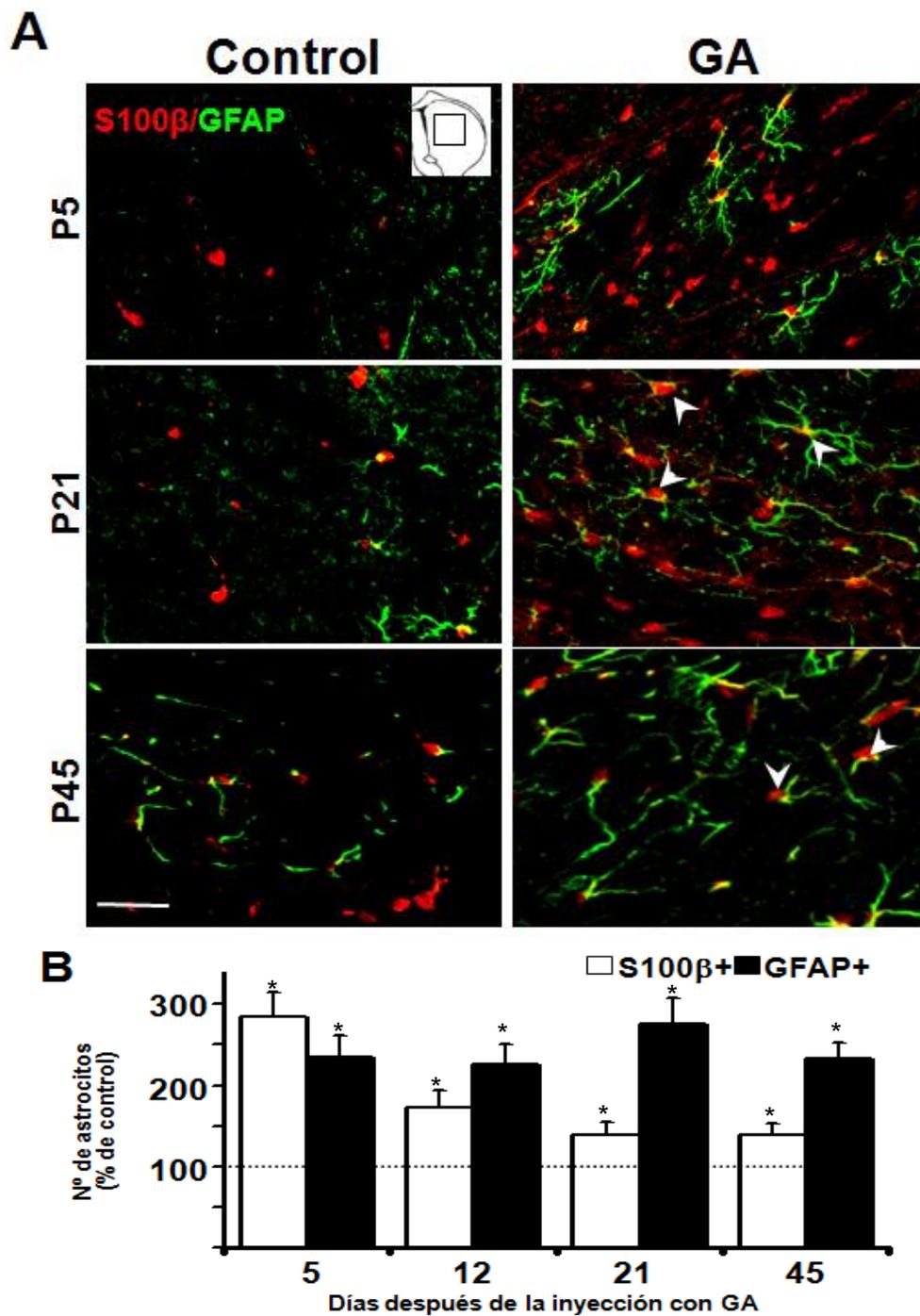


Figura 5. Efectos del GA sobre la población astrocitaria del cuerpo estriado **A:** Inmunofluorescencia contra S100 β (rojo) y GFAP (verde) a P5, P21 y P45. Se evidencia un aumento del número de astrocitos S100 β y GFAP en el estriado de animales inyectados con GA respecto a los controles inyectados con vehículo. Las cabezas de flecha muestran los cuerpos positivos a S100 β y los procesos celulares positivos para GFAP. El esquema muestra la región del estriado analizada. Barra= 25 μ m **B:** Curso temporal de la respuesta de la población astrocitaria estriatal a GA. Las células S100 β positivas hacen un máximo a P5 y luego decaen pero se mantienen elevadas respecto del control. Las células GFAP positivas muestran un aumento estable aproximado de 2 veces hasta P45. Todos los valores fueron estadísticamente significativos a $p < 0,05$. Los controles respectivos se indican con la línea punteada horizontal.

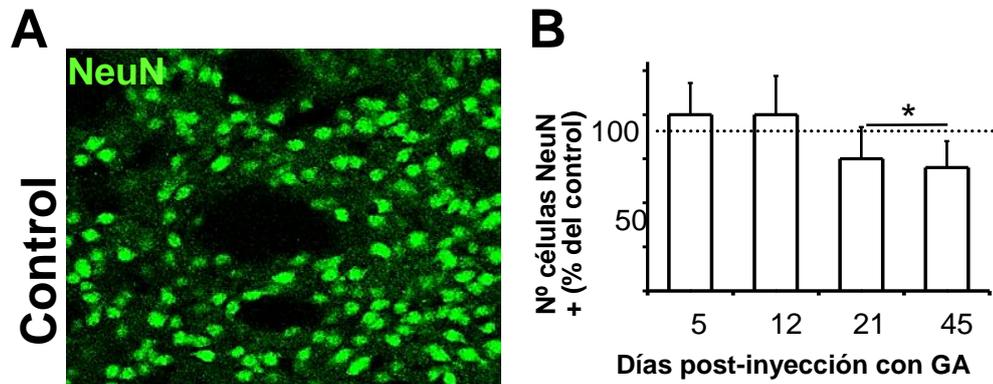


Figura 6. Efectos de GA sobre la población neuronal estriatal. A: Células NeuN positivas en el estriado de ratas control y GA a P21. En el control se observa la inmunoreactividad típica de NeuN: el núcleo es más intenso y se distingue del citoplasma menos marcado. En GA, se observan muchos menos células marcadas y el núcleo no se diferencia del citoplasma. Calibración= 100 μ m. **B:** Número de células NeuN positivas en el estriado a diferentes edades. Hay una disminución significativa a P21 y P45 en los animales GA con respecto a los controles.

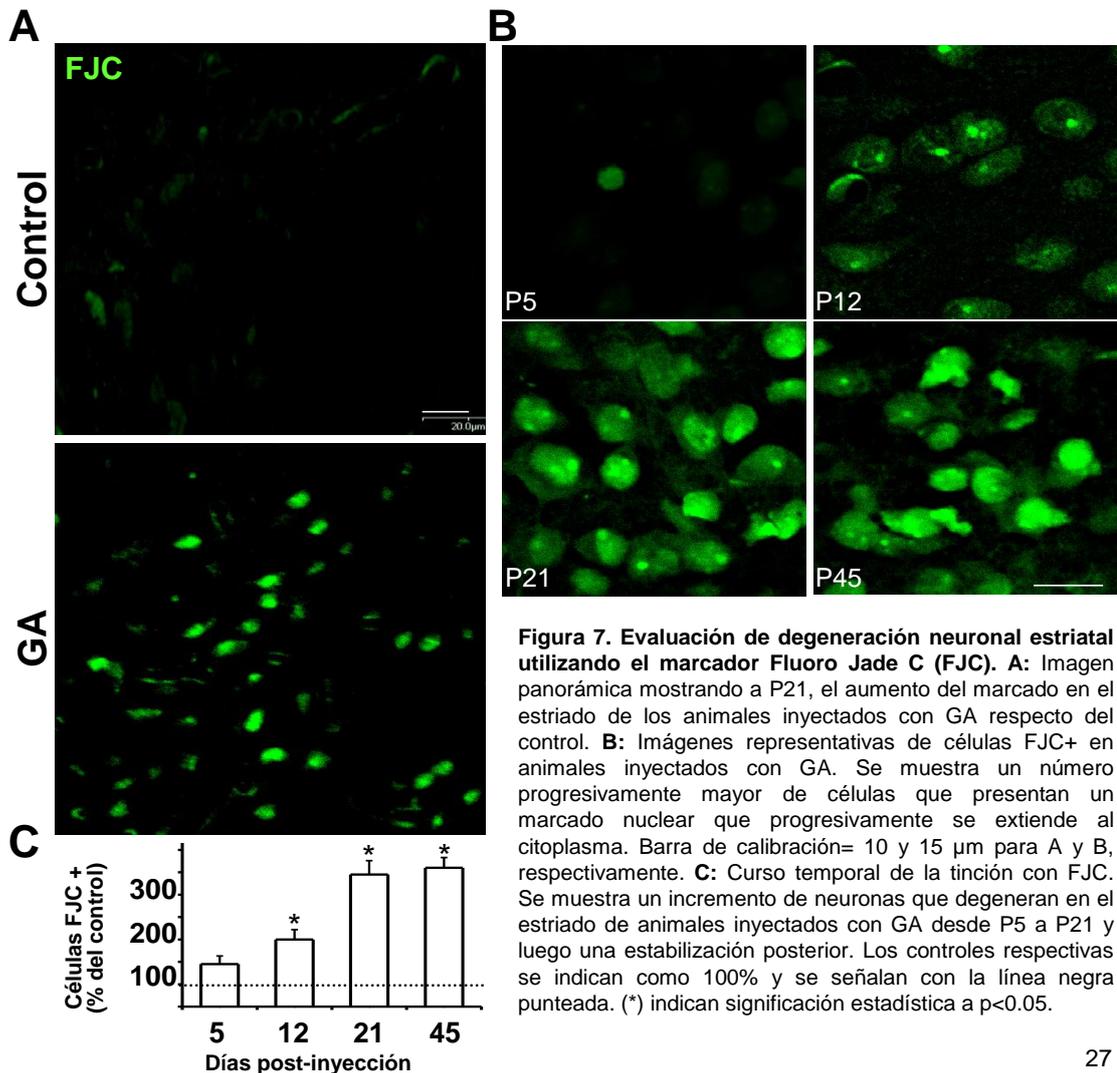
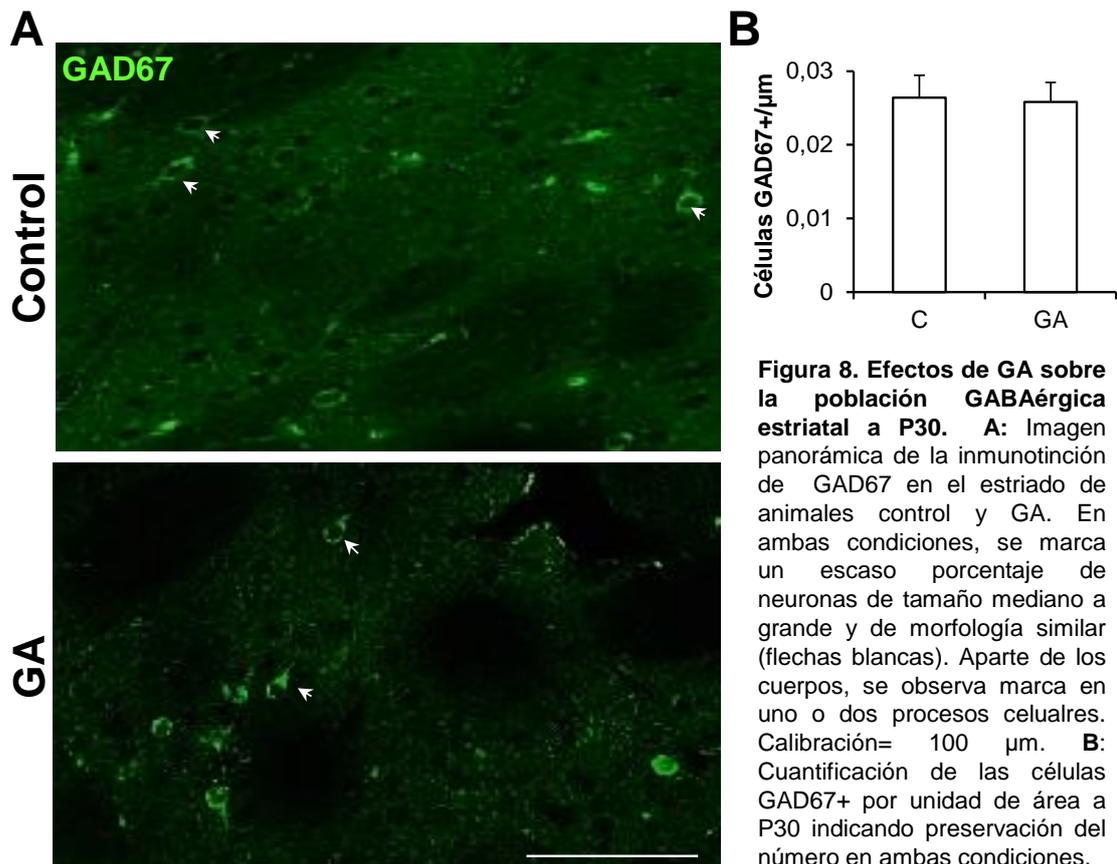


Figura 7. Evaluación de degeneración neuronal estriatal utilizando el marcador Fluoro Jade C (FJC). A: Imagen panorámica mostrando a P21, el aumento del marcado en el estriado de los animales inyectados con GA respecto del control. **B:** Imágenes representativas de células FJC+ en animales inyectados con GA. Se muestra un número progresivamente mayor de células que presentan un marcado nuclear que progresivamente se extiende al citoplasma. Barra de calibración= 10 y 15 μ m para A y B, respectivamente. **C:** Curso temporal de la tinción con FJC. Se muestra un incremento de neuronas que degeneran en el estriado de animales inyectados con GA desde P5 a P21 y luego una estabilización posterior. Los controles respectivas se indican como 100% y se señalan con la línea negra punteada. (*) indican significación estadística a $p < 0.05$.

El anticuerpo empleado (anti-GAD67) permitió reconocer un número relativamente bajo de neuronas de cuerpo grande y escasas prolongaciones como se observa en la figura 8. Siempre marcó una población celular bastante homogénea y en porcentajes muy inferiores a los esperados para una tinción GABAérgica en el estriado (Fig. 8A). No se observaron diferencias ni en la morfología ni en el número de neuronas GAD67 en los animales inyectados con GA con respecto al control (Fig. 8B).



EFFECTOS DE GA SOBRE ASTROCITOS Y NEURONAS DEL HIPOCAMPO

La figura 9 muestra los resultados obtenidos en el GD a P30. En la capa polimórfica del GD hay un aumento significativo de la inmunoreactividad para GFAP que se evidencia en aumento de marcado en los procesos celulares y aumento del número de cuerpos celulares marcados (Fig. 9A, A1).

La inmunotinción para NeuN en el GD mostró una consistente pérdida de marcado en la capa de granos en la porción cercana a la región subventricular (Fig. 9B, B1). A diferencia de los controles, donde NeuN tiñe predominantemente los núcleos y los citoplasmas en menor medida, en los animales inyectados con GA, la tinción

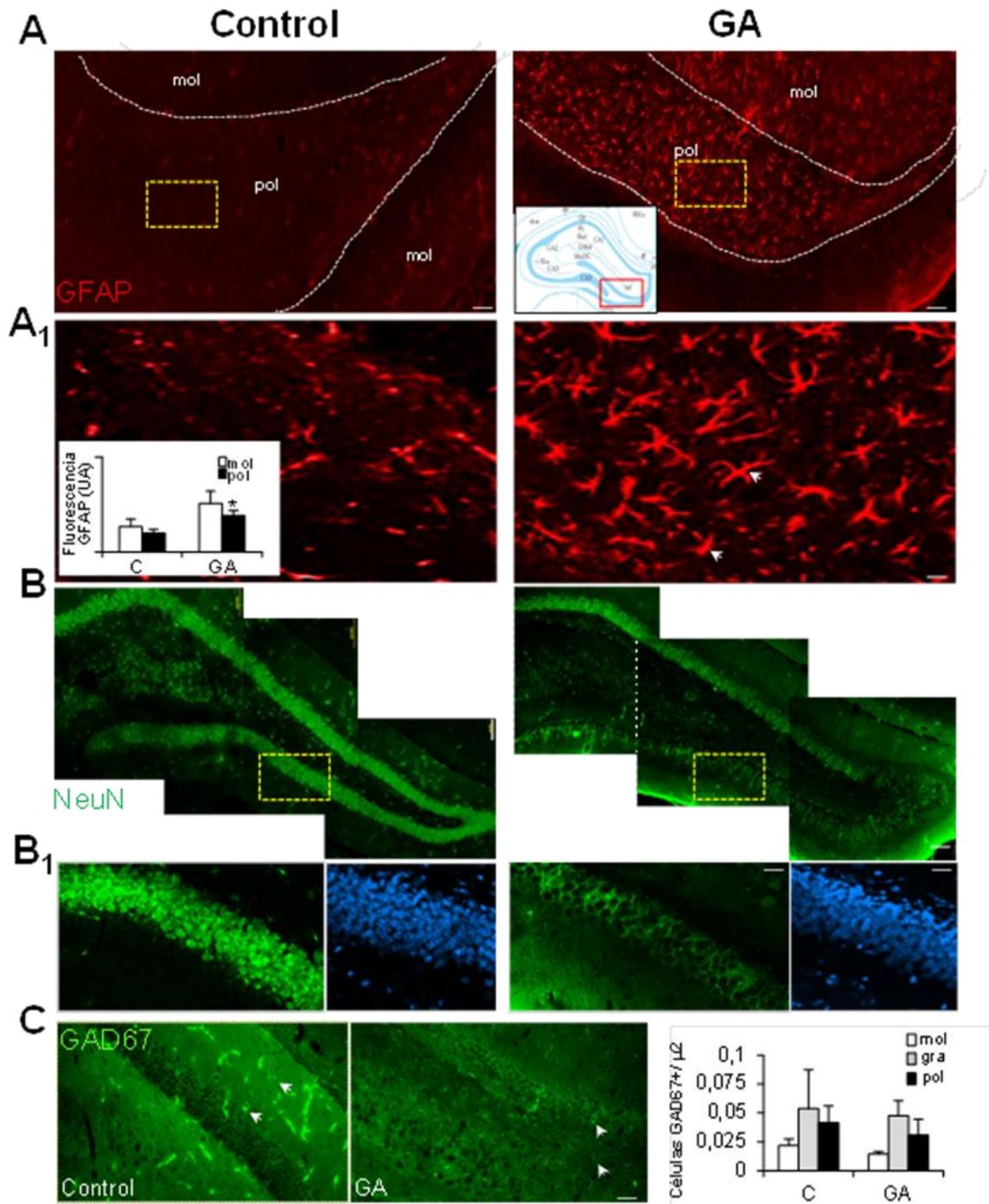


Figura 9. Efectos de GA sobre la población astrocitaria y neuronal del GD a P30. **A:** Imagen panorámica del GD mostrando un aumento de la inmunoreactividad para GFAP en las capas polimórfica (pol) y molecular (mol) del animal inyectado con GA. El esquema muestra la zona analizada. **A₁:** Mayor aumento de las zonas recuadradas en A, mostrando mayor número de células positivas para GFAP en pol (flechas). La gráfica indica aumentos en ambas capas analizadas, pero la significación estadística se alcanzó solo en pol (*). **B:** Inmunoreactividad para NeuN en el GD, evidenciando en GA una pérdida de señal en la capa granular (gra) cercana a los ventrículos. **B₁:** Mayor aumento de la parte de la capa gra sin inmunoreactividad para NeuN en GA. La tinción con DAPI indica que el número de granos se preserva. **C:** Inmunoreactividad para GAD67 en el GD a P30. Tanto en el control como en GA se marcaron células grandes en regiones cercanas a la capa granular (flechas). La intensidad de la tinción pareció disminuir en GA, pero el número de células por unidad de área se mantuvo, según se muestra en la cuantificación. Calibración=100 μm (A,B); 20 μm (A₁,B₁); 60 μm (C).

desaparece casi por completo de los núcleos y se mantiene residual en la zona perinuclear. La desaparición de la inmunotinción para NeuN en esta parte de la capa granular no se debe a una disminución del número de células, ya que no parece haber diferencias en los núcleos marcados con DAPI respecto del control (Fig. 9B1).

La inmunotinción para GAD67 mostró células positivas generalmente pequeñas a medianas, de cuerpo redondo a ovoide. La marca se observó en todo el cuerpo y en algunas prolongaciones. No se observaron diferencias ni en la morfología ni en el número de células GAD67 (Fig. 9C) en el GD aunque la intensidad del marcado parece disminuir en los animales GA.

El análisis del CA a P30 permitió observar un aumento de la inmunoreactividad para GFAP y una tendencia a disminuir del número de neuronas NeuN en la capa piramidal de la condición GA (Fig. 10A). No se observaron cambios en la inmunoreactividad de GAD67, la que permitió observar neuronas en los estratos radiado y oriens (Fig. 10B). Las cuantificaciones mostradas en la figura 10C muestran que, para los animales inyectados con GA, el aumento de la reactividad para GFAP, medido en intensidad de la reacción, fue significativo; la disminución de NeuN en el estrato piramidal no alcanzó significación y no hubo cambios en el número de células GAD67 respecto del control.

EFFECTOS DE GA SOBRE ASTROCITOS Y NEURONAS DEL CEREBELO

El análisis de la inmunoreactividad para GFAP en el cerebelo de animales P30 mostró aumento significativo de la intensidad en la capa molecular y granular de la corteza cerebelosa. La figura 11A muestra como se evidencia una mayor cantidad de procesos GFAP positivos en la capa molecular, así como un aumento del número de cuerpos positivos en la capa granular.

La figura 11B muestra la inmunotinción para GAD67 en el cerebelo. En el control, se observan las neuronas de Purkinje y numerosas células en la capa granular con una marca predominantemente citoplasmática. En el animal inyectado con GA, parecería haber una menor inmunoreactividad en ambas capas y una tendencia a disminuir el número de neuronas positivas. El aumento en la reactividad para GFAP fue significativo tal cual se muestra en la figura 11C. La disminución del número de células de Purkinje por unidad de longitud no mostró significación, estimándose necesario aumentar el número de muestras.

No se realizó análisis de NeuN en el cerebelo, ya que este marcador no reconoce las células de Purkinje y la alta densidad de granos no permite su buena visualización con NeuN.

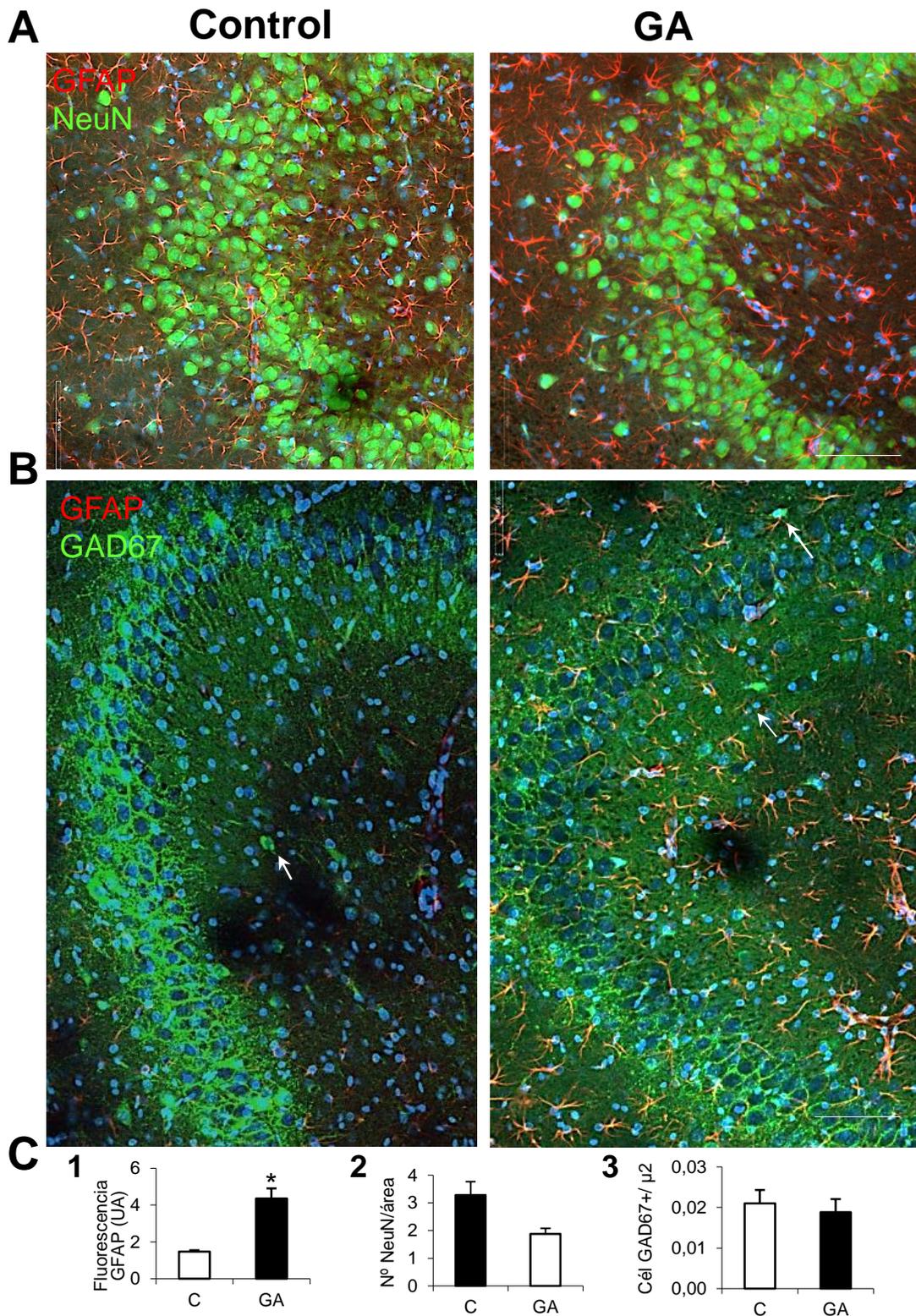


Figura 10. Efectos de GA sobre la población astrocitaria y neuronal del CA a P30. A: Imagen panorámica de CA3 mostrando un aumento de la inmunoreactividad para GFAP (rojo) y una disminución aparente del número de neuronas NeuN positivas (verde) en el animal inyectado con GA. **B:** Inmunoreactividad para GFAP (rojo) y GAD67 (verde) en CA3 mostrando neuronas GAD67 (flechas) en ambas condiciones con morfología y número similar. **C:** Cuantificación de la intensidad de la inmunoreactividad para GFAP y del número de neuronas NeuN y GAD67 por unidad de área. Hay aumento significativo de GFAP y tendencia a disminuir el número de células NeuN positivas por unidad de área. Calibración=40 μm .

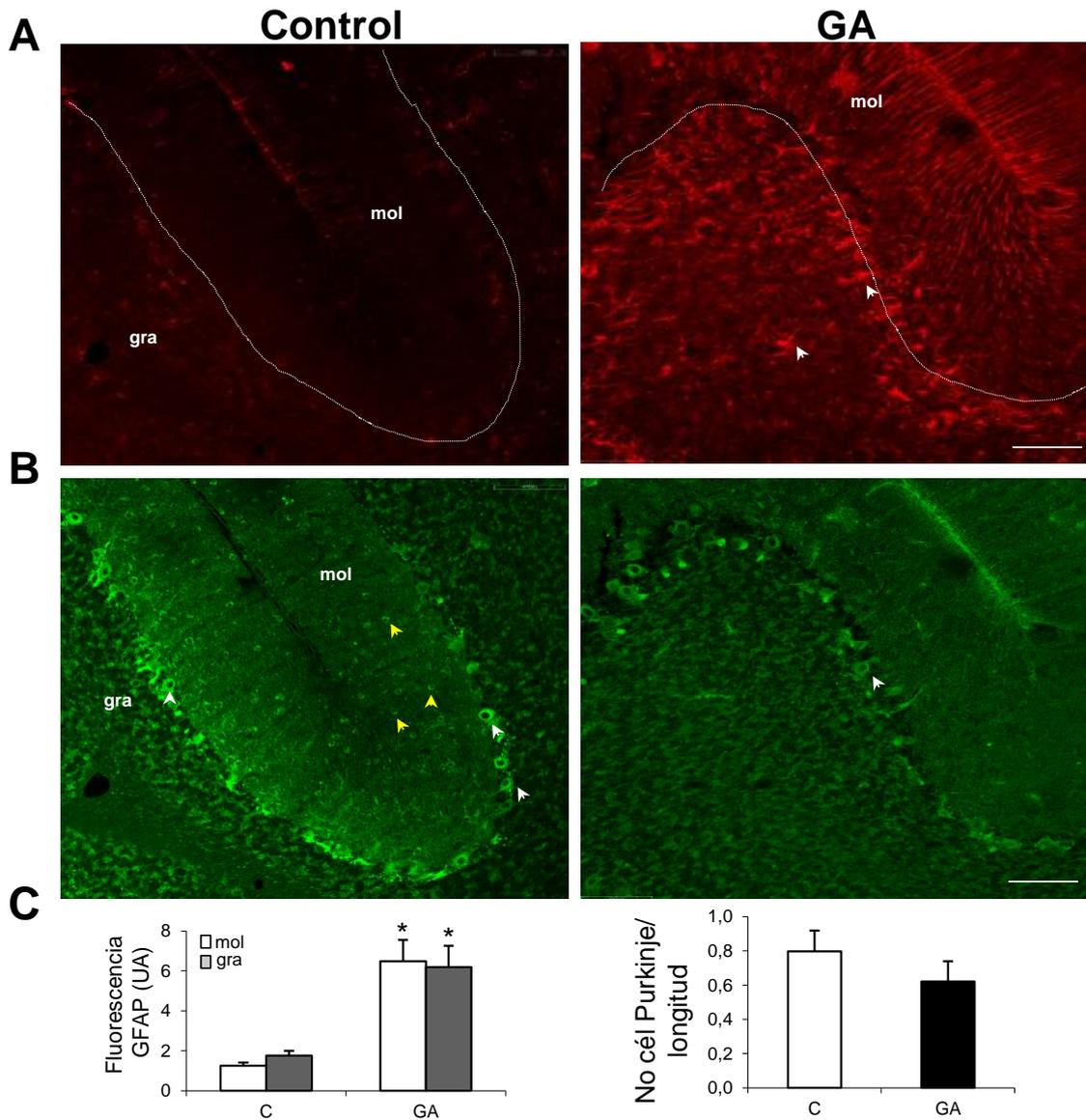


Figura 11. Efectos de GA sobre la población GFAP y GAD67 en el cerebelo a P30. **A:** Inmunotinción para GFAP en una laminilla del cerebelo mostrando aumento de inmunoreactividad en el animal GA respecto del control. Se observa un aumento del número de cuerpos marcados en la capa granular (gra, flechas) y de procesos celulares marcados en la capa molecular (mol). **B:** Inmunoreactividad GAD67 en cerebelo de animales control y GA. En el control se muestran células positivas en la capa de Purkinje (flechas blancas) y células pequeñas con características similares a granos en la capa molecular (flechas amarillas). En GA hay una disminución del número de células de Purkinje y de la capa molecular. **C:** Cuantificación de la intensidad de la inmunotinción de GFAP y del número de células de Purkinje por unidad de longitud. Se evidencia un aumento significativo de la fluorescencia para GFAP y una tendencia a disminuir el número de células de Purkinje. El número de células positivas en la capa molecular no fue cuantificado en ninguna condición. Calibración: 100 μ m.

DISCUSIÓN

En este trabajo se analizaron los efectos del GA a distintas edades de animales que recibieron una administración perinatal de GA y que sufrieron una crisis encefalopática similar a la reportada en pacientes (44, 53, 54). La reacción estriatal inicial frente al GA se caracterizó por un aumento significativo del número de células positivas para el marcador de astrocitos inmaduros S100 β . Esta reacción hizo un pico inicial y luego se mantuvo elevada respecto del control a todas las edades analizadas. También se observó aumento estable de GFAP, aunque el estriado mostró escasa marcación en condiciones control. La reacción astrocitaria primaria fue seguida por una disminución progresiva del número de neuronas positivas para NeuN y un aumento progresivo de células FJC positivas, sugiriendo que la disminución de NeuN podría deberse a la pérdida del marcador por las neuronas que están en degeneración. El análisis de ambos marcadores muestra que la muerte neuronal estriatal acontece principalmente luego de los 21 días de la inyección y parece estabilizarse hasta la edad analizada.

Por lo tanto, los análisis posteriores se realizaron a P30. El análisis de la población GABAérgica estriatal, reportada como la principal afectada en GAI (18), se analizó mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo GAD67 (abcam) que reconoció una población pequeña de células que no mostraron alteraciones visibles ni en su morfología ni en su número. Un análisis a edades mayores parece necesario para conocer si esta población celular podría ser afectada y principalmente, el empleo de un anticuerpo que reconozca las dos isoformas (GAD65 y GAD67) que permita reconocer más neuronas que las observadas con este anticuerpo.

El análisis de los efectos de GA sobre el hipocampo, muestra que en el GD y en el CA hay un aumento significativo de GFAP, confirmando una reacción astrocitaria similar a la observada en el estriado a edades anteriores. La disminución de la inmunoreactividad para NeuN en una porción de la capa de granos del GD no parece deberse a muerte celular, ya que el número de granos por unidad de área parece no cambiar, aunque falta realizar una cuantificación detallada. El análisis de FJC es necesario para conocer si la disminución de NeuN se debe a neuronas que están en proceso de neurodegeneración, pero que el DAPI aún reconoce. El estudio del número de neuronas NeuN en la capa piramidal del CA debe profundizarse realizando la correlación con FJC y aumentando el número de muestras para conocer el grado de significación estadística. Se debe analizar el marcado a edades mayores para saber si la estructura se afecta posteriormente al estriado. La ausencia de cambios en GAD67 indica que no habría cambios significativos en la población que el anticuerpo reconoce, pero es necesario contar con un anticuerpo capaz de reconocer una población celular

mayor. Los efectos sobre el cerebelo, pueden resumirse en aumento de reactividad para GFAP y una tendencia a la disminución de inmunoreactividad en las neuronas de Purkinje y de otras neuronas presentes en la capa molecular, sugiriendo un efecto significativo en esta estructura que debe profundizarse. El análisis de FJC es necesario para conocer si hay neuronas en neurodegeneración en la estructura.

El conjunto de los resultados obtenidos nos permite sugerir que nuestro modelo es capaz de reproducir la muerte neuronal estriatal que es reconocida como la principal característica de la enfermedad (5, 6, 13, 19, 37). Sin embargo, a diferencia de lo esperado, la muerte neuronal estriatal no fue identificada como un daño agudo después de la crisis encefalopática que sufrieron los neonatos luego de ser inyectados. Contrariamente se observó un proceso retardado y progresivo que alcanzó significación estadística recién a los 21 días posteriores. Estos datos, permiten descartar que las neuronas sean afectadas en primer lugar como tradicionalmente se acepta (53) y refuerzan nuestra hipótesis sobre el papel de los astrocitos en la neurodegeneración reportada en GAI. Los astrocitos son blanco celular de GA (40, 53) y la fuerte astrocitosis observada como reacción inicial del estriado frente al ácido parece confirmar este supuesto. La astrocitosis observada que evidencia cambios morfológicos y funcionales importantes en el astrocito podría causar directa o indirectamente la muerte neuronal tal como ha sido reportado en otras enfermedades neurodegenerativas (46-48)*.

En GAI se ha reportado que el estriado es la estructura que más se afecta. El hipocampo y el cerebelo parecen ser afectados en menor grado o en edades superiores (15, 38-40). Nuestros resultados están de acuerdo con los reportes previos. En el estriado se observa una muerte neuronal significativa, aunque llamativamente no se afecta la población GAD67 que reconoce el anticuerpo marcado. Probablemente, se deba a que este anticuerpo solo reconozca una población relativamente pequeña de las neuronas GABAérgicas estriatales. Se necesitan anticuerpos contra las dos isoformas (GAD65 y GAD67) que permitan reconocer un mayor porcentaje de células positivas, para saber si la población GABAérgica es afectada o no por la inyección perinatal de GA.

* Los resultados de la primera parte fueron publicados y la tesista es co-autora de la publicación: Olivera-Bravo S, Fernández A, **Sarlabós MN**, Rosillo JC, Casanova G, Jiménez 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(6):e20831.

En cuanto al hipocampo, se ha reportado astrocitosis en pacientes y en modelos animales, por lo que nuestro modelo también reproduce esa característica. No sabemos aún, si la disminución de NeuN en parte de la capa granular del GD pueda deberse a muerte neuronal y si la pérdida de células positivas en la capa piramidal es de significación. Si así fuera, podría contribuir a explicar las deficiencias cognitivas progresivas en los pacientes de la enfermedad que permanecen vivos durante varios años (4, 5, 7).

En el cerebelo, la astrocitosis y la posible disminución de células de Purkinje podrían estar de acuerdo con la afectación tardía que se describe en el modelo de Zinnanti (19, 37), pero parece ser mayor que la reportada en pacientes, donde el cerebelo parece mejor preservado que en el modelo que hemos empleado.

PERSPECTIVAS

Entre las tareas previstas a corto y mediano plazo se pretende:

- Analizar neuronas en degeneración mediante FJC en hipocampo y cerebelo a P30 para correlacionar con los resultados obtenidos con los marcadores neuronales usados
- Realizar el análisis de marcadores a los 60 y 90 días posteriores a la administración de GA para estudiar la evolución de las respuestas en las regiones analizadas
- Emplear otros marcadores de neuronas GABAérgicas para tener un mayor porcentaje de células positivas y conocer el grado de afectación de las mismas
- Correlacionar los datos inmunohistoquímicos con análisis de expresión de proteínas mediante Western blotting entre otros abordajes
- Analizar los mismos marcadores empleando otras dosis de GA o la misma dosis a distintas edades, para estudiar la dependencia de los efectos con la dosis y con la edad
- Analizar los efectos de GA inmediatos, mediatos y a largo plazo sobre marcadores de estrés oxidativo y funcionalidad mitocondrial para comenzar el estudio de mecanismos de acción subyacentes a los daños

BIBLIOGRAFÍA

1. Colombo M., Cornejo V., Raimann E. (2003) *Errores innatos en el metabolismo del niño*. 2a. ed. Santiago de Chile. Editorial Universitaria S.A.
2. Ruiz M., Sánchez F., Dalmau J. (2004) *Nutritional treatment of inborn errors of metabolism*. ERGON, Madrid Spain, pp.53-61.
3. Santillán E., Revilla N., Belmont. L. (2012) Tratamiento de urgencia de la acidemia metilmalónica. **Acta Pediátrica Mexicana** 33 (1):48-51.

4. Goodman S., Frerman F. (1995) Organic acidemias due to defects in lysine oxidation: 2 ketoacidic acidemia and glutaric acidemia. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* McGraw Hill, New York, pp. 2195-2204.
5. Gordon N. (2006) Glutaric aciduria types I and II. **Brain & Development** 28(3):136-140.
6. Hedlund G., Longo N., Pasquali M. (2006) Glutaric Acidemia Type 1. **American Journal of Medical Genetics** 142C (2): 86–94.
7. Bahr O., Mader M., Zschocke J., Dichagans J., Schulz J. (2002) Adult onset glutaric aciduria type I presenting with a leukoencephalopathy. **Neurology** 59:1802-1804.
8. Kimura S., Hara M., Nezu A. Osaka H., Yamazaki S., Saitoh K. (1994) Two cases de Glutaric Aciduria type I: Clinical and neuropathological findings. **Journal of the Neurological Sciences**123:38-43.
9. Kölker S., Greenberg CR., Lindner M., Müller E., Naughten ER., Hoffmann GF. (2004) Emergency treatment in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Journal of Inherited Metabolic Disease** 27(6):893-902.
10. Romero Pita., MC. (2008) *Análisis de la actividad celular en la corteza inferotemporal, la amígdala, el caudado y el putamen, durante la realización de una tarea visuomotora*. Tesis de Doctorado, Universidad Santiago de Compostela.
11. Nieuwenhuys JV., Van Huijzen C. (2009) *El sistema nervioso central humano* volumen 1. Ed. Médica Panamericana
12. Purves D., Augustine GJ., Fitzpatrick D., Hall WC., LaMantia AS., McNamara JO., Williams SM. (2004) *Neuroscience: third edition*. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts U.S.A.
13. Kölker S., Strauss KA., Goodman SI., Hoffmann GF., Okun JG., Koeller DM. (2004) Challenges for basic research in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Journal of Inherited Metabolic Diseases** 27(6):843-849.
14. Strauss K.A., Morton DH. (2003) Type I glutaric aciduria, part 2: a model of acute striatal necrosis. **American Journal Medical Genetic C Seminar Medical Genetics**121C (1):53-70.
15. Koeller D., Woontner M., Crnic L., Kleinschmidt-DeMasters B., Stephens J., Hunt E., Goodman S. (2002) Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I. **Human Molecular Genetics**11:347-357.
16. Kimura S., Hara M., Nezu A. Osaka H., Yamazaki S., Saitoh K. (1994) Two cases de Glutaric Aciduria type I: Clinical and neuropathological findings. **Journal of the Neurological Sciences** 123:38-43.
17. Nansen EA., Jokel ES., Lobo MK., Micevych PE., Ariano MA., Levine MS. (2000) Striatal ionotropic glutamate receptor ontogeny in the rat. **Developmental Neuroscience** 22(4):329-340.
18. Wajner M., Latini A., Ferreira G., Scussiato K., Schuck P., Solano A., Dutra C., Vargas C. (2007) Induction of Oxidative Stress by Chronic and Acute Glutaric Acid Administration to Rats. **Cellular and Molecular Neurobiology** 27(4):423-438.
19. Zinnanti WJ., Lazovic J., Wolpert EB., Antonetti DA., Smith MB., Connor JR., Woontner M., Goodman SI., Cheng KC. (2006) New insights for glutaric aciduria type I. **Brain** 129 (Pt 8):e55.
20. Squire LR., Strak CE., Clark RE. (2004) The medial temporal lobe. **Annual Review of Neuroscience** 27:279-306.
21. Freund TF., Gulyás AI. (1997) Inhibitory control of GABAergic interneurons in the hippocampus. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology** 75(5):479-487.
22. Paxinos G. & Watson C. (2008) *The Rat Brain Atlas*. Elsevier, NY.
23. N'Guyen JP., Kéravel Y., Poirier J., (2006) "Vues anatomiques comentées du rinenéphale". **Encyclopedy Medical Chirurgique Neurologie** p22.
24. Cardinali DP. (2007) *Neurociencia aplicada: sus fundamentos*. Ed. Médica Panamericana

25. Acsády L., Kamondi A., Sík A., Freund T., Buzsáki G. (1998) GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. **The Journal of Neuroscience** 18(9):3386-33403.
26. Mirá JD. (2012) *Fundamentos de la memoria y el aprendizaje*. Editorial Visión Libros.
27. Pastalkova E., Serrano P., Pinkhasova D., Wallace E., Fenton A. A., Sacktor T. C. (2006) Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. **Science** 313(5790):1141-1144.
28. Dumas S., Halley H., Frances B., Lassalle J. M. (2005). Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. **Learning & Memory** 12(4):375-382.
29. Koerkamp YK., Baciú M., Hot P. (2012) Preserved and impaired emotional memory in Alzheimer's disease. **Frontiers in Psychology** 3:331. doi: 10.3389
30. Weintraub D., Dietz N., Duda JE., Wolk DA., Doshi J., Xie SX., Davatzikos C., Clark CM., Siderowf A (2012) Alzheimer's disease pattern of brain atrophy predicts cognitive decline in Parkinson's disease. **Brain** 135:170-180.
31. Ghez C. (2000) The cerebellum. **Principles of Neural Science** pp. 832-854.
32. Puelles L., Salvador M. (2008) *Neuroanatomía*. Ed. Médica Panamericana.
33. Nawrocki RA., Shaalan M., Shaheen SE., Lorenzon NM. (2012) Monitoring performance degradation of cerebellar functions using computational neuroscience methods: implications on neurological diseases. **Plosone** 7(9):e45581.
34. Rüb U., Hoche F., Brunt ER., Heinsen H., Seidel K., Del Turco D., Paulson HL., Bohl J., von Gall C., Vonsattel JP., Korf HW., den Dunnen WF. (2013) Degeneration of the Cerebellum in Huntington's Disease (HD): Possible Relevance for the Clinical Picture and Potential Gateway to Pathological Mechanisms of the Disease Process. **Brain Pathology** 23(2):165-177.
35. Ferreira G., Schuk P., Maso Carolina., Tonin A. Ribeiro C., Pettenuzzo L., Orlandi L., Netto C., Wajner M. (2008) Chronic early postnatal glutaric acid administration causes cognitive deficits in the water maze. **Behavioural Brain Research** 187(2):411-416.
36. Busanello EN., Pettenuzzo L., Botton PH., Pandolfo P., de Souza DO., Woontner M., Goodman S., Koeller D., Wajner M. (2013) Neurodevelopmental and cognitive behavior of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient knockout mice. **Life Sciences** 92 (2):137-142.
37. Zinnanti JW., Lazovic J., Wolpert EB., Antonetti DA., Smith MB., Connor JR., Woontner M., Goodman SI., Cheng KC. (2006) A diet-induced mouse model for glutaric aciduria type I. **Brain** 129:899–910.
38. 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. (2009) Dynamic changes of striatal and extrastriatal abnormalities in glutaric aciduria type I. **Brain** 132:1764–1782.
39. Funk CB., Prasad AN., Frosk P., Sauer S., Kölker S., Greenberg CR., Del Bigio MR. (2005) Neuropathological, biochemical and molecular findings in a glutaric acidemia type 1 cohort. **Brain** 128:711–722.
40. Jafari P., Braissant O., Bonafé L., Ballhausen D. (2011) The unsolved puzzle of neuropathogenesis in glutaric aciduria type I. **Molecular Genetics and Metabolism** 104:425-437.
41. Magni DV., Furian AF., Oliveira MS., Souza MA., Lunardi F., Ferreira J., Mello CF., Royes LF., Figuera MR. (2009) Kinetic characterization of (3)Hglutamate uptake inhibition and increase oxidative damage induced by glutaric acid in striatal synaptosomes of rats. **International Journal of Developmental Neuroscience** 27:65-72.
42. Das AM., Lücke T., Ullrich K. (2002) Glutaric aciduria I: creatine supplementation restores creatine phosphate levels in mixed cortex cells from rat incubated with 3-hydroxyglutarate. **Molecular Genetics and Metabolism** 78(2):108-111.

43. Allen NJ., Barres BA. (2005) Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. **Current Opinion in Neurobiology** 15:542-548.
44. Olivera S., Fernández A., Sarlabós M.N., Rosillo JC., Casanova G., Jiménez M., Barbeito LH. (2011) Neonatal astrocyte dysfunction is sufficient to trigger progressive striatal degeneration in a rat model of Glutaric Acidemia-I. **Plosone** 6(6):e20831
45. Eroglu C., Barres BA. (2010) Regulation of synaptic connectivity by glia. **Nature** 468:223–231.
46. Maragakis NJ., Rothstein JD. (2006) Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative disease. **Nature Clinical Practice Neurologic** 2(12):679-689.
47. Barbeito LH., Pehar M., Cassina P., Vargas MR., Peluffo H., Viera L., Estévez AG., Beckman JS. (2004) A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. **Brain Research** 47:263-274.
48. Markiewicz I., Lukomska B. (2006) The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. **Acta Neurobiologiae Experimentals** 66:343-358.
49. Lee DJ., Hsu MS., Seldin MM., Arellano JL., Binder DK. (2012) Decreased expression of the glial water channel aquaporin-4 in the intrahippocampal kainic acid model of epileptogenesis. **Experimental Neurology**. 235(1):246-255.
50. Haynes RL., Folkner RD., Keefe RJ., Sung I., Swzeda LI., Rosenberg PA., Volpe JJ., Kinney HC. (2003) Nitrosative and oxidative injury to premyelinating oligodendrocytes in periventricular leukomalacia. **Journal and Neuropathology and Experimental Neurology** 62:441-450.
51. Hagemann TL., Connor JX., Meesing A. (2006) Alexander Disease-Associated Glial Fibrillary Acidic Protein Mutations in Mice Induce Rosenthal Fiber Formation and a White Matter Stress Response. **The Journal of Neuroscience** 26(43):11162–11173.
52. Li R., Johnson AB., Salomons G., Goldman JE., Naidu S., Quinlan R., Cree B., Ruyle SZ., Banwell B., D'Hooghe M., Siebert JR., Rolf CM., Cox H., Reddy A., Gutiérrez-Solana LG., Collins A., Weller RO., Messing A., van der Knaap MS., Brenner M. (2005) Glial fibrillary acidic protein mutations in infantile, juvenile, and adult forms of Alexander disease. **Annals of Neurology** 57:310–326.
53. Olivera S., Fernández A., Latini A., Rosillo JC. Casanova G., Wajner M., Cassina P., Barbeito LH. (2008) Astrocytic proliferation and mitochondrial dysfunction induced by accumulated glutaric acidemia I (GAI) metabolites: Possible implications for GAI pathogenesis. **Neurobiology of Disease** 32:528-534.
54. Olivera S., Isasi E., Fernández A., Rosillo JC., Casanova G., Jiménez M., Sarlabós MN., Barbeito LH. (2013) Dysfunctional astrocytes as determinants of myelination failure during postnatal development, en elaboración.
55. Freudenberg F., Lukacs Z., Ullrich K. (2004) 3-Hydroxyglutaric acid fails to affect the viability of primary neuronal rat cells. **Neurobiology of Disease** 16(3):581-584.
56. Magni DV., Oliveira MS., Furian AF., Fiorenza NG., Figuera MR., Ferreira J., Mello CF., Royes LF. (2007) Creatine decreases convulsions and neurochemical alterations induced by glutaric acid in rats. **Brain Research** 1185:336-345.
57. Lamp J., Keyser B., Koeller DM., Ullrich K., Bräulke T., Mühlhausen C. (2011) Glutaric aciduria type 1 metabolites impair the succinate transport from astrocytic to neuronal cells. **Journal of Biological Chemistry** 286(20):17777-17784.
58. De Keyser J., Mostert JP., Koch MW (2008) Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. **Journal of the Neurological Sciences** (267):3-16.
59. Sauer SW., Okun JG., Fricker G., Mahringer A., Müller I. (2006) 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. **Journal of Neurochemistry** (97):899-910.

60. Coons AH., Creech HJ., Jones RN. (1941) Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine** (47):200-202.
61. García del Moral, R. (1993). *Laboratorio de anatomía patológica*. Interamericana/McGraw-Hill.
62. Mullen R., Buck CR., Smith AM. (1992) NeuN a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development** (116):201-211.
63. Phelps PE., Alijan A., Tran TA. (1999) Ventrally located commissural neurons express the gabaergic phenotype in developing rat spinal cord. **The Journal of Comparative Neurology** (409):285-298.
64. Geoffrey C., Venkatesh NM. (2012) Activity-Dependent Regulation of inhibition via GAD67. **Developmental/Plasticity/Repair** 32(25):8521.
65. Middeldorp J., Hol EM. (2011) GFAP in health and disease. **Progress in Neurology** 93(3):421-443.
66. Steiner J., Bernhard B., Schroeter ML., Bernstein HG. (2011) S100 β protein in neurodegenerative disorders. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine** 49(3):409-424.
67. Brozzi F., Arcuri C., Giambanco I., Donato R. (2009) S100 β 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(13):8797-8811.
68. Schmued LC., Stowers C., Scallet AC., Xu L. (2005) Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. **Brain Research** (1035):24-31.