



PEDECIBA Biología
Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas
Sub-área Neurociencias



**Alteraciones de la barrera hematoencefálica y de la
sustancia blanca en un modelo experimental de
Acidemia Glutárica tipo I**

Lic. Eugenia Isasi

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

Orientador: Dra. Silvia Olivera Bravo

Co-orientador: Dr. Luis Barbeito

Tribunal

Presidente: Dra. Mónica Brauer

Vocales: Dras. Giselle Prunell y Alejandra Kun

Montevideo, setiembre de 2013

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Silvia Olivera por acompañarme en las luces y sombras del recorrido científico, desde el inicio, hace cuatro años y medio, pero siempre con el ánimo y la fuerza de avanzar y explorar nuevos caminos.

A mi co-tutor Luis Barbeito por ser un referente para el laboratorio, en este y todos los proyectos.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, María Noel, Mariana, Valentín, Pablo y Emiliano.

Se la dedico especialmente a mi madre y a mi tía, mis referentes en la vida, por su apoyo, amor y comprensión en esta etapa y siempre.

A toda mi familia y mis amigos por su apoyo incondicional.

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	2
RESUMEN	6
TABLA DE ABREVIATURAS	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Antecedentes generales.....	8
1.1.1 Barrera Hematoencefálica	8
1.1.2 Oligodendrocitos y Mielinización	14
1.2 Antecedentes específicos.....	19
1.2.1 Acidemia Glutárica tipo I.....	19
1.2.2 Alteraciones vasculares en GA-I.....	25
1.2.3 Patología de la sustancia blanca en GA-I.....	25
1.2.4 Disfunción astrocitaria en GA-I	26
2. HIPÓTESIS	29
3. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo general.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
5.1 Materiales	30
5.2 Animales.....	30
5.3 Inyección de GA en ratas neonatas.....	30
5.4 Procesamiento de animales para análisis inmunohistoquímico	31
5.5 Análisis de la extravasación de <i>Evans Blue</i> (EB)	31
5.6 Cultivos celulares.....	31
5.6.1 Cultivo primarios de astrocitos	31
5.6.2 Cultivo primario de oligodendrocitos.....	32
5.6.3 Cultivo primario de pericitos.....	32
5.7 Tratamiento de las células	33
5.8 Ensayos de proliferación con bromodeoxiuridina (BrdU).....	33
5.9 Ensayos de migración.....	34
5.10 Técnicas de inmunofluorescencia	34
5.10.1 Reclutamiento antigénico para inmunohistoquímica.....	34
5.10.2 Inmunohistoquímica	35

5.10.3 Inmunocitoquímica y visualización de la actina cortical en células	36
5.11 Análisis semi-cuantitativo de los niveles de ARN mensajero (ARNm) por PCR en tiempo real	36
5.11.1 Extracción de ARN	36
5.11.2 Determinación de la concentración y de la integridad del ARN	37
5.11.3 Síntesis de ADN copia (ADNc)	37
5.11.4 Cuantificación relativa por PCR en tiempo real	37
5.12 Análisis de la expresión de proteínas por <i>Western blotting</i>	40
5.12.1 Obtención de muestras enriquecidas en proteínas	40
5.12.2 Cuantificación de proteínas	41
5.12.3 Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida.....	41
5.13 Análisis de imágenes	43
5.14 Análisis Estadístico	43
6. RESULTADOS	44
6.1 Resultados I: Estudio de la BHE en un modelo de inyección perinatal de GA en ratas. Efectos sobre pericitos y astrocitos.	44
6.1.1 Aumento de la extravasación de EB en animales inyectados con GA	44
6.1.2 Análisis de la expresión de ocludina	44
6.1.3 Cambios inmunohistoquímicos en células perivasculares y membrana basal en animales inyectados con GA	45
6.1.4 Vulnerabilidad de la población neuronal en el modelo de inyección neonatal de GA47	
6.1.5 Caracterización de los cultivos primarios de pericitos aislados de la microvasculatura cerebral.....	48
6.1.6 Ausencia de efectos directos de GA sobre pericitos en cultivo	51
6.1.7. El medio condicionado de astrocitos tratados con GA retrasa el cierre del <i>scratch</i> en cultivos de pericitos	51
6.2 Resultados II: Efectos de GA sobre oligodendrocitos <i>in vitro</i> y su correlato <i>in vivo</i> . Rol de los astrocitos en la toxicidad de GA.	54
6.2.1 Ausencia de efectos directos de GA sobre número y morfología de células precursoras de oligodendrocitos (CPO).	57
6.2.2 GA no afecta la proliferación, ni la inmunorreactividad para iNOS o caspasa 3 clivada en las CPO.....	57
6.2.3 Efectos del medio condicionado de astrocitos controles (MC-C) y de astrocitos tratados con GA (MC-GA) sobre la morfología de los oligodendrocitos.....	57
6.2.4 Efectos agudos de la inyección neonatal de GA sobre CPO y astrocitos	58

6.2.5 Estudio de la expresión de ARNm de LIF, BMP-4 y CNTF en astrocitos controles y tratados con GA.....	61
7. DISCUSIÓN.....	62
7.1 Discusión I- Estudio de la BHE en un modelo de inyección perinatal de GA en ratas. Efectos sobre pericitos y astrocitos.	65
7.2 Discusión II- Efectos de GA sobre oligodendrocitos <i>in vitro</i> y su correlato <i>in vivo</i> . Rol de los astrocitos en la toxicidad de GA.	68
8. CONCLUSIONES	70
9. PERSPECTIVAS	71
10. BIBLIOGRAFÍA.....	72
Anexo I.....	81

RESUMEN

La Acidemia Glutárica tipo I (GA-I, del inglés, *Glutaric aciduria type I*) es una enfermedad neurometabólica hereditaria donde el catabolismo alterado de lisina, hidroxil-lisina y triptófano, causa la acumulación de ácido glutárico (GA, del inglés, *Glutaric acid*) y metabolitos derivados en el cerebro y fluidos corporales. En su gran mayoría, los pacientes sufren crisis encefalopáticas que producen necrosis estriatal y secuelas motoras irreversibles. Independientemente de la ocurrencia de crisis, y por causas mayormente desconocidas, un porcentaje significativo de pacientes presenta alteraciones vasculares y en la sustancia blanca. En este trabajo se estudiaron los efectos del GA sobre la barrera hematoencefálica (BHE) y algunos de sus componentes; y en una segunda parte, se analizaron los efectos del GA sobre las células productoras de mielina. Neonatos Sprague Dawley de 1 día de vida recibieron una inyección intracerebroventricular de 2.5 $\mu\text{mol/g}$ de GA y se analizaron los efectos a los 14 y 30 días post-inyección (DPI). Los animales inyectados con GA presentaron un aumento de la permeabilidad de la BHE a nivel del estriado que estuvo asociada a cambios en la membrana basal, podocitos astrocitarios y pericitos. Los animales inyectados con GA mostraron aumento de neuronas apoptóticas estriatales a los 30 DPI. Los estudios realizados sobre pericitos en cultivos, permitieron descartar efectos directos de GA sobre la viabilidad, morfología, proliferación y migración. Sin embargo, los medios condicionados de astrocitos tratados con GA produjeron una inhibición de la migración de los pericitos, lo que sugiere que la respuesta astrocitaria inducida por GA podría provocar alteraciones funcionales en los pericitos que podrían explicar en parte algunas de las alteraciones vasculares reportadas en la enfermedad. Por otra parte, el análisis de los efectos de GA sobre células precursoras de oligodendrocitos permitió descartar efectos directos sobre el número, proliferación, morfología o diferenciación. En cambio, se observó una simplificación del patrón morfológico de los oligodendrocitos incubados con medio condicionado de astrocitos tratados con GA, sugiriendo una inhibición de su diferenciación mediada por la respuesta astrocitaria que el GA induce. En este sentido, el tratamiento de astrocitos en cultivo con GA produjo un aumento al doble, del ARNm del factor neurotrófico ciliar sin afectar los niveles de mensajeros de otros factores implicados en la diferenciación de oligodendrocitos como el factor inhibidor de leucemia (LIF) o la proteína morfogénica de hueso (BMP-4). In vivo, a las 24 horas después de su administración, GA no produjo efectos agudos sobre el número o morfología de las células precursoras de oligodendrocitos estriatales. En cambio, GA produjo una importante astrocitosis S100 β + aguda y persistente que precede a las alteraciones en la mielina observadas anteriormente por el grupo. El conjunto de los resultados obtenidos en ambas partes de este trabajo sugiere que tanto los pericitos como los oligodendrocitos y sus células precursoras no son afectados directamente por GA, sin embargo, éste es capaz de producir alteraciones en los astrocitos que repercuten posteriormente en la BHE y la mielinización.

TABLA DE ABREVIATURAS

3-OHGA	Ácido 3-hidroxiglutámico
AQP4	Acuaporina 4
BHE	Barrera hemato-encefálica
BMP	Proteína morfogenética de hueso
BrdU	Bromodeoxiuridina
BSA	Albúmina sérica bovina
CNTF	Factor de crecimiento neurotrófico ciliado
EB	Azul de Evans
FBS	Suero fetal bovino
FGF-2	Factor de crecimiento fibroblástico 2
GA	Ácido Glutámico
GA-I	Acidemia Glutámica tipo I
GCDH	Glutaril-CoA deshidrogenasa
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
LIF	Factor inhibidor de leucemia
MAG	Glicoproteína asociada a mielina
MBP	Proteína básica de mielina
MC-C	Medio condicionado de astrocitos controles
MC-GA	Medio condicionado de astrocitos tratados con GA
NeuN	Proteína nuclear neuronal
NG2	Neuroglicano 2
PBS	Búfer fosfato salino
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFRα	Receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFRβ	Receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PLP	Proteína proteolípida
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
αSMA	alfa- actina de músculo liso

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes generales

1.1.1 Barrera Hematoencefálica

1.1.1.1 Generalidades

La barrera hematoencefálica (BHE) es una barrera física entre los capilares y el parénquima del Sistema Nervioso Central (SNC) que regula el flujo de moléculas y asegura la homeostasis y la correcta funcionalidad del sistema. Está compuesta por células endoteliales especializadas que recubren el interior de los vasos sanguíneos y hacia afuera se encuentran los pericitos inmersos en la membrana basal, los astrocitos, la microglía, los oligodendrocitos y las neuronas, todos ellos conformando la unidad neurovascular (Fig.1). La interacción entre todos estos componentes asegura una correcta permeabilidad de la BHE y una adecuada función del SNC. Las funciones principales de la unidad neurovascular incluyen la regulación hemodinámica, la permeabilidad microvascular, la inactivación de neurotransmisores, el acoplamiento neurotrófico, y el acoplamiento angiogénico y neurogénico (Zlokovic, 2008; Engelhardt & Sorokin, 2009). La BHE, más que una barrera pasiva, es un complejo metabólico activo, con múltiples bombas, transportadores, receptores de neurotransmisores y citoquinas, esenciales para el funcionamiento del SNC.

La BHE no existe en algunas áreas cerebrales vascularizadas. En dichas regiones, el endotelio presenta características similares a las de otros lechos microvasculares sistémicos, con fenestraciones, vesículas pinocíticas y pérdida de la continuidad celular. Estas estructuras conocidas como órganos circumventriculares

comprenden la hipófisis posterior, la eminencia media, el área postrema, la glándula pineal y el órgano subfornical (Ballabh et al., 2004).

El sistema vascular, comprendiendo la micro y macrovasculatura, ocupa del 25 al 30% del volumen cerebral (Fig. 2). A nivel de la microvasculatura, el endotelio capilar es continuo y tiene una superficie aproximada de 100 cm² por gramo de tejido (Zlokovic, 1998). El sistema vascular es fundamental para el intercambio de nutrientes y metabolitos entre la sangre y las células del parénquima, pero además, a través de factores solubles secretados por el endotelio, cumple un rol

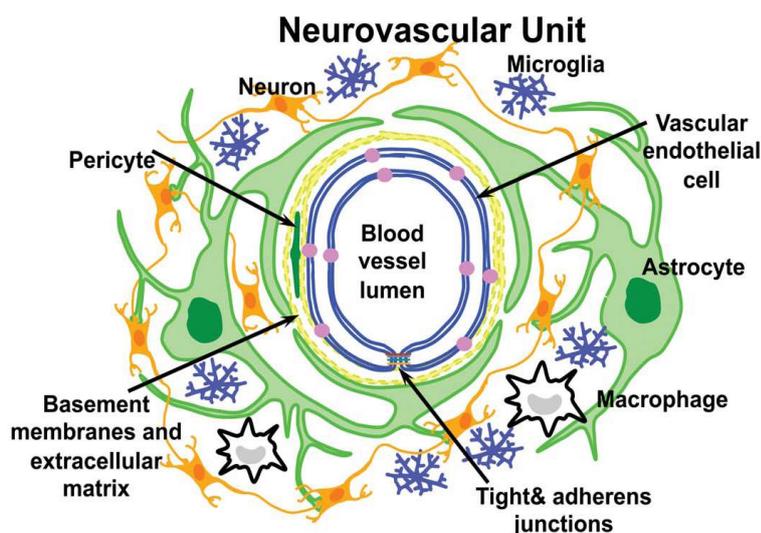


Figura 1. Esquema de la unidad neurovascular con sus componentes celulares principales. [Extraído de Willis et al., 2011]

en la diferenciación neuronal, el crecimiento axonal y el mantenimiento de los nichos neurogénicos (Shen et al., 2004; Dugas et al, 2008; Makita et al., 2008).

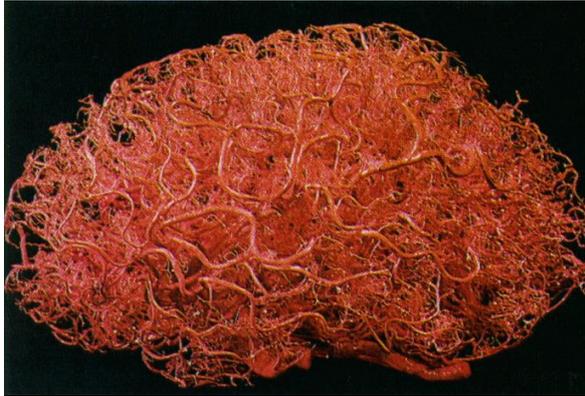


Figura 2. Vasos sanguíneos de un cerebro humano adulto. Se inyectó una emulsión plástica en la vasculatura del cerebro y se disolvió el tejido parenquimatoso. [Extraído de Zlokovic et al., 1998]

La vascularización del SNC en mamíferos comienza por la invasión de células endoteliales desde los plexos perineurales hacia el neuroectodermo (Riseau et al., 1997). En la corteza cerebral de rata, la angiogénesis comienza en el día embrionario 13 (E13) cuando las células endoteliales invaden el tejido nervioso a partir del plexo capilar pial (Daneman et al., 2010; Marín-Padilla, 2012). En los vasos perineurales, el endotelio es fenestrado, no obstante, durante el proceso de migración hacia el neuroectodermo ocurre la inducción del fenotipo endotelial característico de la BHE, ya sea por factores solubles o mediante contacto célula-célula (Haseloff et al., 2003). En roedores,

durante el desarrollo embrionario tardío se puede observar un endotelio continuo y presencia de uniones ocluyentes; la BHE ya es funcional y es capaz de excluir del SNC, proteínas y macromoléculas (Daneman et al., 2010). La BHE madura gradualmente con el desarrollo del SNC y durante las primeras etapas, cuando la astrogliosis está ausente, los pericitos cumplen un rol fundamental en su inducción. En ratas jóvenes de 15 días postnatales (P15), la permeabilidad aún no es totalmente selectiva, pero a P28 o P30 la funcionalidad de la BHE está completamente establecida y la permeabilidad iónica medida a través de la resistencia transendotelial alcanza el máximo valor (Xu et al., 1993; Butt et al., 1990).

1.1.1.2 Componentes celulares principales

1.1.1.2.1 Células endoteliales

Las células endoteliales de la microvasculatura cerebral tienen una alta resistencia eléctrica, una baja actividad pinocítica y una relación mitocondria/citoplasma alta debido a la elevada actividad metabólica (Oldendorf et al., 1977; Abbott et al., 2002; 2006). Presentan complejos de unión intercelular de tipo ocluyente (*zonula occludens*), que involucran proteínas de unión como la ocludina y claudinas y proteínas de anclaje al citoesqueleto de actina, que causan una restricción al pasaje paracelular de solutos hidrofílicos. La ocludina (65KDa) es una proteína integral de membrana, constituida por cuatro dominios transmembranosos y dos bucles extracelulares. Es altamente expresada en células endoteliales de la microvasculatura cerebral y su nivel de expresión y estado de fosforilación se asocia con la permeabilidad y funcionalidad de la BHE (Persidsky et al., 2006). Las claudinas (20-24 KDa, isoformas 3 y 5 principalmente expresadas en las células endoteliales del SNC) son un conjunto de proteínas integrales de membrana, que comparten una localización celular similar con la ocludina y se encargan de la formación primaria de la unión estrecha, mientras que la ocludina estabiliza y refuerza esta unión (Persidsky et al., 2006). La ocludina y las claudinas están conectadas al citoesqueleto de actina, a través de proteínas de anclaje como las *zonula occludens* 1, 2 y 3 (ZO-1, ZO-2 y ZO-3). Estas proteínas pertenecen a la familia de las guanilato quinasa asociadas a membrana (MAGUK, del inglés, *Membrane-associated guanylate*

kinase), tienen múltiples sitios de interacción proteína-proteína y la pérdida de ZO-1 en particular, se asocia con un aumento de la permeabilidad de la BHE en condiciones de hipoxia (Mark & Davis 2002; Perisdsky et al., 2006).

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

1.1.1.2.2 Pericitos

Los pericitos fueron descritos por primera vez en 1873 por el científico francés Charles Benjamin Rouget e inicialmente fueron conocidos como las células de Rouget. Los pericitos rodean y envuelven a las células endoteliales. Están localizados predominantemente en capilares y escasamente distribuidos en vénulas y arteriolas. Si bien están presentes en la mayoría de los tejidos del organismo, la densidad de pericitos se estima que es mayor en la retina (cubren el 40% de la superficie capilar) y en el cerebro (hasta un 30% de la superficie capilar, a nivel de la corteza cerebral) respecto de otros órganos (Frank et al., 1987; Shepro & Morel, 1993). Si bien no se conoce por qué la microvasculatura del SNC está extensamente cubierta por pericitos, en comparación con cualquier otra región del organismo, se cree que los pericitos cumplen funciones importantes en la formación de la BHE, regulación de la angiogénesis y del flujo sanguíneo capilar (Armulik et al., 2005; Winkler et al., 2011). Los pericitos son células aplanadas, de núcleo ovalado, que extienden numerosas prolongaciones largas. Los procesos primarios se extienden a lo largo del eje longitudinal del capilar y los secundarios rodean la circunferencia del vaso, penetrando en la membrana basal. Las células endoteliales y los pericitos están en estrecho contacto, a través de uniones *gap*, uniones ocluyentes y contactos de tipo *peg and socket* (von Tell et al., 2006; Armulik et al., 2005).

El pericito se origina durante el desarrollo embrionario a partir de células madre mesenquimales derivadas del mesodermo y células de la cresta neural derivadas del neuroectodermo. Durante la vascularización del SNC, los pericitos migran y son reclutados hacia los tubos capilares en formación, gracias a factores quimotácticos secretados por el endotelio (Winkler et al., 2011). En la vida adulta, nuevos pericitos se generan por proliferación o por migración y diferenciación *in situ* de células

madre mesenquimales circulantes en la sangre, según lo observado experimentalmente en modelos de isquemia (Kokovay & Cunningham, 2006; Winkler et al., 2011).

No existe un único marcador prototípico de pericitos. Generalmente, se utiliza la combinación de varios marcadores: α -actina de músculo liso (α -SMA, del inglés, *α Smooth Muscle Actin*), desmina, Neuroglicano 2 (NG2, del inglés, *Neuroglican 2*), receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- β , del inglés, *Platelet Derived Growth Factor Receptor- β*), aminopeptidasa A y N, nestina, proteína reguladora de la señalización de la proteína G (RGS5, del inglés, *Regulator of G-protein Signaling 5*), vimentina, fosfatasa alcalina, entre otros (Balabanov et al., 1999; Armulik et al., 2005; Bondjers et al., 2006). De esta batería de marcadores, los más utilizados para identificar pericitos cerebrales a nivel pericapilar son α -SMA y NG2 (Kamouchi et al., 2011).

En el SNC, los pericitos contribuyen a la estabilidad mecánica de la microvasculatura, son capaces de sintetizar componentes de la matriz extracelular (colágeno tipo IV, glicosaminoglicanos y laminina), y de promover la diferenciación y quiescencia de las células endoteliales (Lai & Kuo, 2005; Armulik et al., 2010; von Tell et al., 2006). Los pericitos sintetizan y liberan factores de crecimiento y moléculas capaces de regular la permeabilidad, la maduración y estabilidad vascular, y la angiogénesis (Lai et al., 2005; Dore-Duffy, 2008). A través del factor de crecimiento transformante β (TGF- β , del inglés, *Transforming Growth Factor β*), del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor*) y de las angiopoyetinas 1 y 2; los pericitos regulan la angiogénesis (Dore-Duffy & La Manna, 2007).

Los pericitos son células contráctiles capaces de regular el flujo sanguíneo en respuesta a cambios en la actividad neural (Peppiat et al., 2006). Expresan filamentos contráctiles y proteínas asociadas como α -SMA, miosina, tropomiosina y quinasas dependientes de GMPc (Kamouchi et al., 2011). Además, expresan receptores para una variedad de sustancias vasoactivas, incluyendo, noradrenalina, acetilcolina, histamina, serotonina, angiotensina II, endotelina-1, entre otros (Kamouchi et al., 2011). Por otro lado, los pericitos son células presentadoras de antígenos y pueden cumplir una función fagocítica ya que expresan marcadores del linaje monocito/macrófago e importantes cantidades de fosfatasa ácida a nivel lisosomal (Kreuger et al., 2010).

Pericitos aislados de la microvasculatura cerebral tienen la capacidad de transformarse en células madre pluripotenciales y de diferenciarse en glía y neurona. Dore-Duffy et al. (2006) observaron que de un cultivo primario de pericitos aislados de cerebro de rata, que expresa NG2 y nestina, se pueden generar neuroesferas si se cultiva en un medio sin suero y en presencia del factor de crecimiento fibroblástico β (FGF- β , del inglés, *Fibroblast Growth Factor- β*) y son capaces de diferenciarse en células de linaje neural, incluyendo astrocitos, neuronas y oligodendrocitos (Dore-Duffy et al., 2006; 2008). Asimismo, otros estudios realizados con pericitos procedentes de otras regiones del organismo (hígado, piel, testículo, pulpa del diente), sostienen que son células progenitoras capaces de diferenciarse en distintos tipos celulares y eventualmente regenerar tejidos (Dore-Duffy, 2008).

A partir de modelos genéticos de ratones deficientes en PDGF- β y PDGFR- β , surgieron claras evidencias acerca del rol de los pericitos en la homeostasis vascular del SNC. Durante el desarrollo del embrión, PDGF- β es producido en el endotelio, mientras que PDGFR- β es expresado en pericitos y músculo liso vascular (Lindahl et al., 1997). Los ratones homocigotas y mutantes nulos para PDGF- β y PDGFR- β , mueren antes de nacer como consecuencia de la disfunción vascular, las hemorragias microvasculares y el edema, además de presentar anomalías cardíacas y renales (Lindahl et al., 1997; Hellstrom et al., 2001). La ausencia de pericitos rodeando la microvasculatura, se correlacionó

con hiperplasia endotelial, microaneurismas e hiperpermeabilidad a nivel de la BHE, aunque la densidad, longitud y ramificación de los vasos no presentó cambios (Hellstrom et al., 2001). La interacción entre el PDGF- β endotelial y su receptor en la membrana del pericito, estimula la proliferación, migración y reclutamiento de pericitos hacia la pared de los nuevos vasos (Dore-Duffy & LaManna, 2007; Winkler et al., 2011)

Con respecto al rol de los pericitos en la formación y mantenimiento de la BHE, varios trabajos *in vivo* e *in vitro* evidencian la importancia de estas células para la correcta permeabilidad de la misma. Pericitos cultivados sobre células endoteliales en monocapa, aumentan la función de barrera para moléculas hidrofílicas e incrementan la resistencia eléctrica transendotelial (Dente et al., 2001). Durante el desarrollo embrionario, los pericitos son fundamentales en la formación de la BHE y son reclutados en los vasos nacientes, al menos una semana antes de la generación de la astrogliá (Daneman et al., 2010).

1.1.1.2.3 Astrocitos

Los astrocitos son las células gliales más abundantes del SNC y recubren más del 99% de la superficie capilar (Hawkins & Davis, 2005). Son células estrelladas con múltiples y finas prolongaciones que se clasifican en dos grupos principales en base a sus características morfológicas y su localización. Los astrocitos protoplasmáticos o tipo I se localizan en la sustancia gris y presentan numerosas prolongaciones cortas y muy ramificadas, en tanto los astrocitos fibrosos o tipo II se localizan en la sustancia blanca y se caracterizan por tener prolongaciones más largas delgadas y menos ramificadas (Sofroniew & Vinters, 2010). Ambos subtipos de astrocitos contactan con los vasos sanguíneos y con la superficie pial.

Los astrocitos son células polarizadas ya que algunos procesos contactan con células de origen mesodérmico (ej: células endoteliales, pericitos) y otros están en estrecho contacto con prolongaciones neuronales y sinapsis. Debido a su localización estratégica, los astrocitos son células esenciales en el acoplamiento entre la actividad neuronal y el flujo sanguíneo (Abbott et al., 2006). Los podocitos o pies terminales de los astrocitos recubren casi la totalidad de la superficie capilar y están en estrecho contacto con células endoteliales y pericitos. La membrana de los podocitos presenta varias características particulares, tiene una alta densidad de canales permeables al agua conocidos como acuaporina 4 (AQP4, del inglés, *Aquaporin 4*) y de canales de potasio Kir4.1, importantes en la homeostasis iónica y en la regulación del volumen del SNC (Abbott et al., 2006). Además, algunos componentes de la membrana basal de la microvasculatura, como agrina, α -dístroglicano y α -sintrofina, son esenciales para la distribución de AQP4 y Kir 4.1 a nivel de los podocitos astrocitarios (Abbott et al., 2006). Dado que la actividad neuronal normal conlleva un aumento del K^+ extracelular y que el metabolismo glucosídico produce una importante tasa de generación de agua (~ 28 nl/g.min), el reciclado de los iones y la remoción y excreción del agua, son fundamentales para la homeostasis del SNC. En este sentido, el astrocito cumple un rol esencial ya que es capaz de captar el K^+ extracelular, en los sitios de sinapsis, y eliminarlo a nivel de los podocitos (un mecanismo de tamponamiento espacial de K^+) (Kofuji et al., 2004). Por último, el astrocito al captar K^+ , a través de distintos transportadores y recibir una ganancia neta de iones, aumenta la concentración de agua por ósmosis que luego es eliminada a nivel de los podocitos, hacia el líquido intersticial (Amiry-Moghaddam et al., 2003)

Los astrocitos expresan diversos marcadores moleculares que sirven como herramientas para identificarlos y caracterizarlos. La proteína fibrilar glial ácida (GFAP, del inglés, *Glial Fibrillary Acid Protein*) es una proteína de filamentos intermedios tipo III considerada un marcador prototípico de astrocitos. En el SNC sano, GFAP es altamente expresado por astrocitos fibrosos y en muy bajos niveles por astrocitos protoplasmáticos (Sofroniew & Vinters, 2010). Existe una gran proporción de astrocitos maduros que no expresan niveles detectables de GFAP. Además, la expresión de este marcador tiene una gran variabilidad regional que está regulada por señales intra- e intercelulares (Sofroniew, 2009; Sofroniew & Vinters, 2010). Existen otros marcadores moleculares de astrocitos como la glutamina sintasa, la proteína S100 β , la conexina 43 y el miembro L1 de la familia aldehído deshidrogenasa (Barres, 2008; Sofroniew & Vinters, 2010). Los astrocitos presentan una gran heterogeneidad morfológica y funcional que se traduce en que dentro del SNC, existen poblaciones con diferentes capacidades de proliferación, con diferente perfil de expresión de genes y propiedades electrofisiológicas, o con diferentes capacidades para generar ondas de calcio o captar glutamato, entre otras (Matyash & Kettenmann, 2010; Zhang & Barres, 2010). Estas diferentes poblaciones astrocitarias, acompañan a las características neuronales, sinápticas y funcionales propias de cada región del SNC.

Diversos trabajos aportan evidencias acerca del papel de los astrocitos en la inducción y mantenimiento de la BHE (Haseloff et al., 2003; Abbott et al., 2002; 2006). Se ha demostrado que el co-cultivo astrocito y célula endotelial o el tratamiento de células endoteliales de la microvasculatura cerebral con medios condicionados de astrocitos, inducen la formación de uniones ocluyentes, aumentan la resistencia eléctrica transendotelial, incrementan la actividad de la gamma-glutamyltranspeptidasa y la expresión del transportador de glucosa GLUT-1 (Tao-Cheng et al., 1987; Rubin et al., 1991; Haseloff et al., 2003). Los astrocitos pueden liberar varios factores importantes en la inducción y mantenimiento de la BHE, como el TGF- β y el factor neurotrófico derivado de glía (GDNF, del inglés, *Glial-Derived Neurotrophic Factor*) que son importantes para la formación de uniones ocluyentes en células endoteliales cultivadas (Abbott et al., 2002; 2006; Haseloff et al., 2003). Por su parte, las células endoteliales también envían señales al astrocitos ya que sintetizan y liberan el factor inhibidor de leucemia (LIF, del inglés, *Leukemia Inhibitory Factor*), el cual promueve la diferenciación astrocitaria (Mi et al., 2001).

Los astrocitos también cumplen otras funciones importantes como el acoplamiento del flujo sanguíneo con la actividad neuronal, regulando la hiperemia cerebral (Koehler et al., 2009). Para ello, tienen receptores metabotrópicos de glutamato capaces de censar el aumento de este neurotransmisor en la hendidura sináptica, y mediante proteínas de señalización aumentar el calcio intracelular y activar enzimas que promueven la síntesis y liberación de sustancias vasoactivas como prostaglandinas E2, adenosina u óxido nítrico (NO, del inglés, *Nitric Oxide*), que producen relajación arteriolar y aumento del flujo sanguíneo (Takano et al., 2006; Koehler et al., 2009).

1.1.1.3 Alteraciones de la BHE

La correcta funcionalidad de la BHE es esencial para mantener la homeostasis del SNC, actuando como una barrera física que limita el pasaje de moléculas desde la sangre hacia el parénquima y regulando el influjo y eflujo de nutrientes y otros metabolitos. En diversas condiciones patológicas como hipoxia-isquemia, inflamación, enfermedades neurodegenerativas, metabólicas, desmielinizantes o tumorales, entre otras, se han reportado alteraciones de la permeabilidad y

funcionalidad de la BHE (Ballabh et al., 2004; Abbott et al., 2010; Luissint et al., 2012). En modelos de hipoxia-isquemia, *in vitro* e *in vivo*, se ha observado que el aumento de VEGF y de NO, influye en la disrupción de las uniones estrechas, aumento de la permeabilidad de la BHE y formación de edema cerebral (Mark & Davis, 2002; Persidsky et al., 2006). Enfermedades neurológicas con un componente neuroinflamatorio como la Esclerosis Múltiple, la Enfermedad de Alzheimer o la Esclerosis Lateral Amiotrófica, presentan alteraciones en la expresión y función de las uniones estrechas, debido al efecto sobre la célula endotelial de citoquinas, quimioquinas, radicales libres, entre otros; liberados por microglía activada y astrogliá reactiva (Persidsky et al., 2006). Diversos trabajos sobre enfermedades del SNC y disfunción de la BHE, han dado luz acerca de posibles mecanismos moleculares involucrados en la disrupción de la misma, incluyendo la fosforilación de residuos de serina/treonina o tirosina, modificaciones post-traduccionales y degradación o translocación de las proteínas que conforman las uniones estrechas (Luissint et al., 2012). Preservar la integridad de la unidad neurovascular, considerando la importancia de las células perivasculares, es un objetivo terapéutico para combatir varias enfermedades del SNC.

1.1.2 Oligodendrocitos y Mielinización

1.1.2.1 Biología del oligodendrocito

El término oligodendroglía fue introducido por del Río Hortega en 1921, para describir células neurogliales con escasos procesos que se evidenciaban en preparaciones histológicas teñidas con técnicas de impregnación argéntica. La oligodendroglía presenta una citoarquitectura que la diferencia de la astrogliá y la microglía. Los oligodendrocitos tienen un cuerpo celular pequeño y un citoplasma muy denso, rico en retículo endoplásmico rugoso, polirribosomas libres, aparato de Golgi, mitocondrias y microtúbulos, sin presencia de filamentos intermedios ni de gránulos de glucógeno (Peters et al., 1991). Presentan menor número de prolongaciones y menor ramificación de las mismas, en comparación con otros tipos celulares gliales.

La principal función del oligodendrocito es la formación de mielina en el SNC. La mielina es una estructura espiralada constituida por extensiones de la membrana del oligodendrocito (en el SNC) o de la célula de Schwann (en el Sistema Nervioso Periférico (SNP)). Tiene una composición química particular (70% de lípidos y 30% de proteínas) que la hace una sustancia aislante y puede identificarse usando marcadores como la proteína proteolípida (PLP, del inglés *Proteolipid Protein*), la proteína básica de mielina (MBP, del inglés *Myelin Basic Protein*) y la glicoproteína asociada a mielina (MAG, del inglés *Myelin Associated Glycoprotein*) (Dubois-Dalcq et al., 1986). La mielina recubre segmentos axonales, denominados internodos, permitiendo una conducción de tipo saltatoria y rápida del impulso nervioso. En el SNC, cada oligodendrocito puede mielinizar hasta 40 segmentos internodales, dependiendo de la región en que se encuentre (Baumann, 2001). El oligodendrocito es una célula polarizada con dos dominios de membrana de composición diferente, la membrana plasmática y las vainas de mielina y para mantener dicho fenotipo, la célula realiza una clasificación y transporte de proteínas y lípidos altamente regulada (Maier et al., 2008). Los oligodendrocitos presentan distintos estadios de maduración, desde la célula precursora de oligodendrocitos (CPO) hasta el oligodendrocito maduro y mielinizante. Estos distintos estadios del linaje oligodendroglial presentan diferencias morfológicas, bioquímicas y funcionales, y se pueden reconocer *in vitro* o *in vivo* por la expresión de antígenos de superficie o antígenos intracelulares (Fig. 3).

1.1.2.2 Origen y desarrollo

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

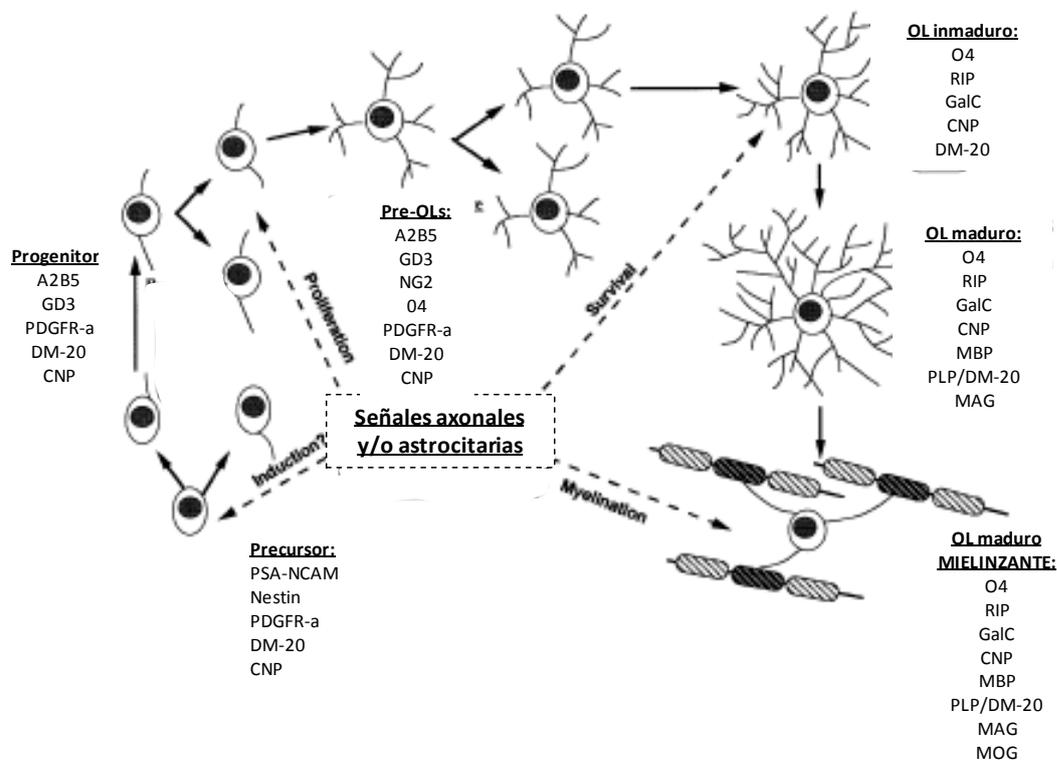


Figura 3. Esquema de los estadios de diferenciación del oligodendrocito, desde la célula precursora hasta el oligodendrocito maduro y mielinizante. Se indican los marcadores celulares que corresponden a los estadios de precursor, progenitor, pre-oligodendrocito, oligodendrocito maduro y mielinizante [Extraído y modificado de Baumann et al., 2001.]

los astrocitos tipo I (Lillien et al., 1988). Otros estudios han reportado que los oligodendrocitos podrían tener un origen cercano a las motoneuronas, existiendo un precursor común (MNOP, del inglés *Motor Neuron-Oligodendrocyte Precursor cell*) a nivel de la médula espinal (Noble et al., 2005). Durante el desarrollo embrionario, los precursores de oligodendrocitos se originan en múltiples regiones de la zona ventricular de manera secuencial. A nivel del telencéfalo, primero surgen en la eminencia ganglionar medial y el área entopeduncular anterior. Una segunda población de CPO se origina en la eminencia ganglionar lateral y caudal, y un tercer grupo se origina en la corteza postnatal. Un gran porcentaje de estas tres poblaciones celulares logra diferenciarse y mielinizar

axones ubicados en distintas regiones del SNC (Kessar et al., 2006). Estudios recientes han identificado algunos factores de transcripción importantes en la diferenciación hacia un linaje oligodendroglial de células madre neurales. Olig1 y Olig 2 son dos factores de transcripción importantes en la diferenciación del linaje, y se expresan tempranamente en las CPO de la médula espinal y cerebro anterior. Ratones mutantes nulos para Olig 1/2, carecen completamente de CPO en el SNC, corroborando la importancia de estos factores en la diferenciación de células madre neurales hacia precursores oligodendrogliales (Nicolay et al., 2007).

Las CPO en el adulto representan del 2 al 9% de las células del SNC, están ampliamente distribuidas en la sustancia gris y blanca y permanecen en un estadio indiferenciado (Dawson et al., 2003). Estas células comparten marcadores antigénicos con las CPO perinatales multipotentes; expresan NG2, PDGFR- α y A2B5, entre otros. Las CPO del adulto tienen la capacidad de proliferar y re-poblar áreas desprovistas de oligodendrocitos (Dawson et al., 2003). Por ejemplo, en un modelo de desmielinización inducida por anticuerpos dirigidos contra proteínas de la mielina (modelo de Encefalitis Autoinmune Experimental), se observó un aumento del 72% de células NG2+ en la periferia de la lesión, a los 3 días luego del comienzo de la desmielinización (Keirstead et al., 1998). Por lo tanto, las CPO del adulto cumplirían una importante función en la re-mielinización frente a condiciones injuriantes.

La sobrevivencia y proliferación de las CPO están reguladas por numerosas neurotrofinas como el factor de crecimiento derivado de plaquetas AA (PDGF-AA, del inglés, *Platelet Derived Growth Factor- AA*) y el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2, del inglés, *Fibroblast Growth Factor 2*) que son importantes mitógenos y factores de sobrevivencia. PDGF-AA es altamente expresado en el cerebro en desarrollo fundamentalmente por astrocitos y neuronas y podría intervenir en la diferenciación de células madre neurales hacia el linaje oligodendroglial (Nicolay et al., 2007; Hu et al., 2008).

1.1.2.3 Diferenciación y Mielinización

Las CPO deben migrar largas distancias hasta alcanzar su destino final. Una gran variedad de señales solubles como PDGF, FGF, moléculas quimiotrópicas como netrinas y semaforinas, quimioquinas; contactos de tipo receptor-ligando y proteínas de la matriz extracelular regulan su migración (Bradl & Lassman, 2010). Las CPO son capaces de migrar sobre matriz extracelular, axones y superficies astrocitarias hasta alcanzar un destino final donde algunas células van a permanecer en un estadio indiferenciado y otras van a diferenciarse en células productoras de mielina (de Castro & Bribián, 2005). El proceso de diferenciación del oligodendrocito está regulado por señales extrínsecas que dependen del ambiente celular y molecular y señales intrínsecas. *In vitro*, las CPO bipolares que expresan el receptor alfa del PDGF (PDGFR- α) y el antígeno A2B5, en ausencia de un factor mitogénico como el PDGF-AA, se diferencian progresivamente en células ramificadas que expresan el antígeno O4 y NG2 y finalmente en estadios maduros expresando proteínas como MAG, MBP y CNPasa (Fig. 3).

La diferenciación de las CPO y el proceso de mielinización están regulados espacial y temporalmente. Los oligodendrocitos son capaces de mielinizar en un lapso temporal acotado, y más aún la mielinización de múltiples axones no ocurre de manera secuencial. Por el contrario, es un evento coordinado que transcurre en una ventana de tiempo breve (12-18h) (Watkins et al., 2008). Los oligodendrocitos no mielinizan cualquier axón, si no que seleccionan axones cuyo diámetro sea mayor a 0.2 μ m (Bradl & Lassman, 2010). Además, la mielinización está altamente regulada por señales que dependen del grado de diferenciación neuronal. Por ejemplo, la actividad eléctrica de

las neuronas conlleva la liberación de ATP y adenosina al medio, siendo ambas moléculas fundamentales en la comunicación neurona-glía. Por un lado, la adenosina favorece la diferenciación de las CPO y promueve la formación de mielina (Stevens et al., 2002), por otro lado, el ATP desencadena la liberación astrocitaria de LIF y este último promueve la mielinización en oligodendrocitos maduros (Ishibashi et al., 2006). Además de la actividad eléctrica, los axones sufren cambios en la expresión de moléculas de superficie necesarias para el reconocimiento e interacción oligodendrocito-neurona (Barres, 2008). Por otra parte, el oligodendrocito le provee a la neurona señales que modifican la estructura y el funcionamiento axonal, por ejemplo, inducen la formación de *clusters* de canales de Na⁺ a nivel de los nodos de Ranvier y *clusters* de canales de K⁺ en la región juxtapanodal (Noble et al., 2005).

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

La mielinización ocurre en sentido caudal-rostral en el cerebro y rostral-caudal en la médula espinal. En el ratón, comienza luego del nacimiento en la médula espinal y a los 45-60 días post-natales la mielinización alcanzó todas las regiones del SNC (Baumann, 2001). En humanos, la mielinización comienza en el 7mo mes de gestación a nivel del tálamo y el pico de formación de mielina ocurre durante el primer año, aunque la mielinización continúa hasta la edad adulta (hasta los 20 años aproximadamente), siendo las vías de asociación a nivel de la corteza frontal, las últimas en ser mielinizadas (Baumann, 2001; Jakovcevski et al., 2009).

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

1.1.2.4 Vulnerabilidad del oligodendrocito frente al daño

Para formar las vainas de mielina y mantener la estructura, el oligodendrocito debe producir grandes cantidades de ATP. La altísima tasa metabólica trae como consecuencia la formación de productos secundarios tóxicos, como las especies reactivas del oxígeno (McTigue & Tripathi, 2008). Además, el oligodendrocito es la célula con mayor cantidad de hierro del cerebro y expresa altos niveles de transferrina (Connor, 1994). Se cree que el hierro es esencial en la diferenciación del oligodendrocito y su deficiencia durante el desarrollo produce hipomielinización (Ortiz et al., 2004). Es co-factor de varias enzimas que participan en la síntesis de componentes de la mielina, además de formar complejos de hierro-azufre que son co-factores de enzimas mitocondriales (Badaracco et al., 2008). Sin embargo, en condiciones desfavorables, el hierro libre es capaz de reaccionar y desencadenar la formación de radicales libres. Por su parte, el oligodendrocito tiene bajos niveles

de defensas antioxidantes celulares como el glutatión. Todos esto pone en evidencia la vulnerabilidad de esta célula frente al daño oxidativo (Bradl & Lassman, 2010). Por otro lado, el oligodendrocito también podría ser vulnerable al daño excitotóxico ya que expresa los receptores de glutamato AMPA, kainato y NMDA (Noble et al., 2005; Bradl & Lassman, 2010). Finalmente, durante la mielinización el Retículo Endoplásmico (RE) debe sintetizar y plegar una enorme cantidad de proteínas y cambios metabólicos como la sobreexpresión de PLP en ratas transgénicas produjo estrés de RE y muerte apoptótica de oligodendrocitos de la sustancia gris (Bauer et al., 2002).

1.1.2.5 Astrocito y mielinización

En los últimos años varios estudios se han enfocado en el rol de los astrocitos en la mielinización y en enfermedades desmielinizantes como la Esclerosis Múltiple entre otras. Durante la mielinización primaria o en la re-mielinización de áreas de sustancia blanca dañadas, las CPO necesitan de factores de crecimiento, citoquinas y otros mediadores, para proliferar, migrar y diferenciarse en oligodendrocitos mielinizantes (Bradl & Lassman, 2010; Baumann, 2001). Los astrocitos son una fuente importante de factores solubles (PDGF-AA, FGF-2, IGF-1, CNTF, LIF, BMP-4, entre otros) que pueden actuar sobre las células precursoras u oligodendrocitos diferenciados modificando la capacidad proliferativa, migratoria y/o mielinizante de estas células (Moore et al., 2011). Mientras que algunas moléculas favorecen la supervivencia, proliferación o diferenciación (ej: FGF-2, CNTF, LIF; PDGF); otras inhiben la diferenciación de CPO (ej: BMPs). *In vitro*, el medio condicionado de astrocitos tiene un efecto mitogénico sobre las CPO, (Noble & Murray, 1984). Por otro lado, podría inducir vías de señalización que favorecen la supervivencia y diferenciación de oligodendrocitos (Arai & Lo, 2010). Más aún, en un sistema de mielinización *in vitro*, co-cultivando células ganglionares y CPO corticales, la presencia de astrocitos aumenta la tasa de mielinización (Watkins et al., 2008).

Otras evidencias que apoyan el papel de los astrocitos en la mielinización, surgieron a partir de modelos animales transgénicos y enfermedades genéticas humanas que afectan proteínas de los astrocitos. La enfermedad de Alexander es una leucodistrofia que produce pérdida de mielina, de oligodendrocitos y degeneración axonal y que está asociada con mutaciones en el gen codificante para GFAP (Brenner et al., 2001). Es un ejemplo de un desorden genético primario en el astrocito que afecta la mielinización. Por otro lado, mutaciones en el factor de iniciación de la traducción eucariota 2B5 (EIF2B5) produce ataxia infantil e hipomielinización, enfermedad conocida como *Vanishing White Matter Disease* (VWM). Esta mutación produciría una deficiencia de astrocitos GFAP+ debido a una falla en la diferenciación de células progenitoras neurales (Dietrich et al., 2005). En un trabajo recientemente publicado por Nash et al. (2011) se muestra la correlación entre el fenotipo astrocitario y su capacidad para inducir mielinización. Astrocitos “quiescentes”, sembrados sobre tenascina C, inducen la mielinización de pocos axones en un modelo *in vitro* de mielinización, en comparación con astrocitos sembrados sobre poli-lisina. Esta inhibición de la mielinización estaría mediada por la quimioquina CXCL10. En cambio, astrocitos “activados” con CNTF, favorecen la mielinización de axones, posiblemente a través de la liberación de algún factor soluble.

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

1.2 Antecedentes específicos

1.2.1 Acidemia Glutárica tipo I

1.2.1.1 Generalidades

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

GA-I es causada por una mutación en el gen que codifica para la enzima GCDH y que se encuentra localizado en el cromosoma 19p13.2 (Greenberg et al., 1995). Se han descrito más de 200 mutaciones que ocasionan distintos grados de reducción de la actividad enzimática de GCDH (Goodman et al., 1998). La mutación R402W en el exón 10 es la más frecuente (representa un 20% de las mutaciones) y retiene solamente un 3% de la actividad enzimática (Goodman et al., 1998). Otras mutaciones como la A421V en el exón 11, preservan hasta un 40% de la actividad enzimática residual (Goodman et al., 1998). No existiría una correlación entre el fenotipo bioquímico de la enfermedad y el genotipo determinante de la actividad enzimática residual, ya que paradójicamente se han encontrado pacientes con mutaciones severas en ambos alelos y con niveles normales de metabolitos en orina (Christensen et al., 2004). En base a la excreción urinaria de GA, se han definido dos subgrupos de pacientes: excretadores de altos o bajos niveles (Baric et al., 1999). Pacientes que excretan bajos niveles de GA tienen el mismo riesgo de sufrir daño estriatal que los excretadores de altos niveles (Christensen et al., 2004; Kölker et al., 2006). Por lo tanto, hay otros factores no genéticos, como la presencia de infecciones, virosis, fiebre, ayunos prolongados, entre otros, que podrían precipitar las crisis encefalopáticas y el daño neuronal en GA-I. El diagnóstico de la enfermedad se realiza mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC/MS) midiendo GA y 3-OHGA en orina o por espectrometría de masa en tándem (MS/MS) cuantificando acilcarnitina (glutaril-carnitina) en plasma. Dado que los pacientes que excretan bajos niveles de estos metabolitos pueden no ser detectados con el uso de estas técnicas, se recomienda emplear otros métodos más precisos como el análisis mutacional de GCDH y la determinación de la actividad enzimática en fibroblastos (Baric et al., 1999; Kolker et al., 2011).

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

Desde la descripción por primera vez de la enfermedad en 1975 hasta el 2011, se reportaron más de 500 casos en el mundo entero (Kolker et al., 2011).

Los niños con GA-I se caracterizan clínicamente por presentar macrocefalia desde el nacimiento o que se instala poco tiempo después (Funk et al., 2005). El 90% de los pacientes que no son tratados,

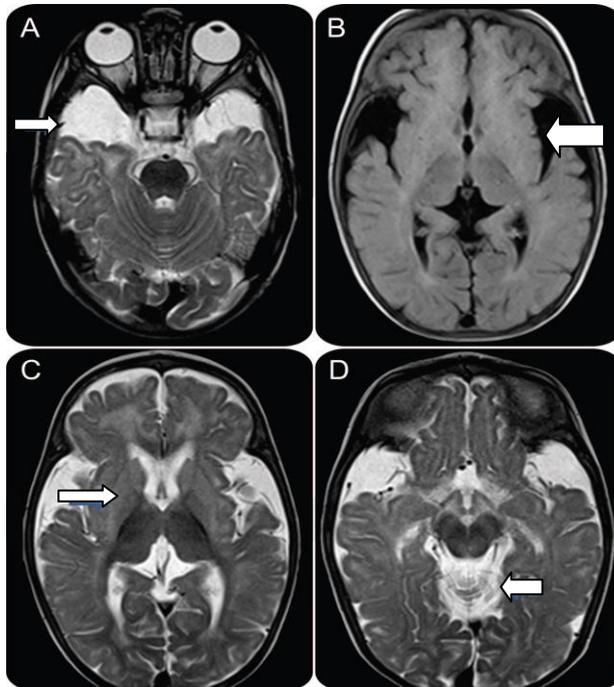


Figura 4. Resonancia magnética de un paciente GA-I de 14 meses. (A) Imagen potenciada en T2 mostrando hipoplasia bilateral de los lóbulos temporales con ensanchamiento de los espacios subaracnoideos (flecha). (B) Imagen mostrando la apariencia cuadrada de las cisuras de Silvio ensanchadas (flecha) (C) Imagen potenciada en T2 mostrando los ganglios basales hiperintensos (flecha). (D) Imagen potenciada en T2 mostrando el ensanchamiento de la cisterna mesencefálica (flecha). [Extraído de Singh et al., 2011]

(Hoffmann et al., 1996; Twomey et al., 2003; Knapp et al., 2002; Strauss et al., 2003, Neumaier-Probst et al., 1995; Singh et al., 2011) (Fig. 4).

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

El diagnóstico temprano de GA-I es muy importante, ya que el comienzo de un tratamiento dietario, en niños pre-sintomáticos, durante los primeros meses de vida, puede prevenir las crisis encefalopáticas y los síntomas neurológicos (Monavari & Naughten, 2000; Strauss et al., 2003). El tratamiento dietario con bajo contenido de lisina complementado con L-carnitina y riboflavina y un tratamiento de emergencia durante episodios de enfermedad intercurrente es la estrategia que se utiliza en la mayoría de los pacientes diagnosticados (Kolker et al., 2011). El tratamiento de

desarrollan síntomas neurológicos entre los 3 y 36 meses de vida, luego de una crisis encefalopática aguda precipitada por enfermedades virales, infecciosas, fiebres intercurrentes, inmunización o intervenciones quirúrgicas (Hoffmann et al., 1996). La secuela neurológica principal luego de la crisis es la injuria estriatal, con pérdida neuronal severa, que causa síntomas motores importantes (Funk et al., 2005, Harting et al., 2009). La distonía generalizada es el síntoma extrapiramidal principal (Hoffmann et al., 1996) que con la edad evoluciona hacia una distonía fija y parkinsonismo rígido-aquinético (Gitiaux et al., 2008). Mediante resonancia magnética y tomografía computada, se han descrito varios cambios estructurales en el desarrollo del cerebro de pacientes GA-I; macrocefalia, hipoplasia o atrofia de los lóbulos temporales y frontales, ensanchamiento de las cisuras de Silvio, atrofia de los núcleos caudado y putamen, presencia de higromas subdurales, hemorragias subdurales o retinianas y distintos grados de mielinopatías

emergencia que se aplica siempre que exista una crisis, consiste en una alta ingesta calórica, reducción transitoria o total del consumo de proteínas naturales (durante 24-48h) y administración de suero o líquidos parenterales (Monavari & Naughten, 2000; Strauss et al., 2003). A pesar de que el pronóstico de los pacientes tratados tempranamente mejora sustancialmente, un tercio de pacientes que son adherentes al tratamiento, presentan igualmente injuria estriatal y discapacidades severas a largo plazo (Strauss et al., 2003). Por otro lado, se ha reportado que pacientes diagnosticados tempranamente y con tratamiento dietario, presentan discapacidades motoras finas y cognitivas, aún no habiendo sufrido crisis encefalopáticas, lo cual es confirmatorio de una toxicidad crónica en GA-I (Beauchamp et al., 2009; Jafari et al., 2011).

1.2.1.2 Modelos animales

Se han empleado distintos modelos animales con el objetivo de comprender la fisiopatología de esta enfermedad y contribuir al desarrollo de estrategias terapéuticas.

1.2.1.2.1 Modelos farmacológicos

La inyección intraestriatal unilateral de GA (0.4- 4 μ moles) o de 3-OHGA (1.4- 6 μ moles) en ratas, han sido estrategias utilizadas para estudiar los efectos comportamentales y la neurotoxicidad de estos metabolitos (Lima et al., 1998; de Mello et al., 2001). La inyección de GA produjo un comportamiento rotacional hacia el lado contralateral de la inyección y convulsiones clónicas dependientes de la dosis, que fueron prevenidas con la administración previa de DNQX (antagonista de receptores no-NMDA) y muscimol (agonista de receptores GABA_A), sin observarse efectos con MK801 (antagonista de receptores NMDA) (Lima et al., 1998). Por otro lado, la administración de 3-OHGA también indujo convulsiones clónicas y daño estriatal dependientes de la dosis, pero dichos efectos fueron prevenidos con la administración previa de MK801 y muscimol (de Mello et al., 2001). Por lo tanto, la neurotransmisión glutamatérgica no dependiente de receptores NMDA y la neurotransmisión gabaérgica estarían involucradas en el comportamiento inducido por GA (Lima et al., 1998). Por su parte, el 3-OHGA podría inducir un daño excitotóxico a través de los receptores NMDA (de Mello et al., 2001).

Otro modelo experimental utilizado, ha sido la inyección subcutánea de una dosis alta (5 μ mol/g) de GA de forma aguda o crónica, en ratas (Latini et al., 2007). En este modelo se observó un aumento de especies reactivas del oxígeno y una disminución de defensas antioxidantes en muestras de cerebro medio, hígado y eritrocitos, con ambos regímenes de tratamiento, sugiriendo que el estrés oxidativo participa en la toxicidad inducida por GA (Latini et al., 2007). Por otro lado, el tratamiento crónico con GA, produciría un déficit de memoria espacial de larga duración evaluado con el test de aprendizaje conocido como laberinto acuático de Morris (da Costa et al., 2008).

1.2.1.2.2 Modelo genético

El modelo del ratón deficiente en GCDH fue generado mediante la delección dirigida a los primeros siete exones del gen *Gcdh* en células madre embrionarias (Koeller et al., 2002). Los ratones *Gcdh* $-/-$ tienen un perfil bioquímico similar al de los pacientes GA-I, presentando niveles aumentados de GA y 3-OHGA en orina, sangre y parénquima cerebral (Koeller et al., 2002). Sin embargo, los ratones GCDH deficientes no desarrollan crisis encefalopáticas, ni presentan muerte neuronal o astrogliosis, ya sea en condiciones basales o frente a estresores metabólicos como la administración de interferón alfa, lipopolisacáridos, bajas temperaturas y privación de alimento (Koeller et al., 2002).

El único hallazgo patológico en el cerebro de estos ratones es la presencia de una mielinopatía espongiiforme difusa, que remeda las anomalías de la sustancia blanca observadas en pacientes GA-I (Koeller et al., 2002). Estos resultados podrían sugerir que los mecanismos patogénicos que operan en humanos y ratones son diferentes (Koeller et al., 2002; 2004).

Se realizaron varios intentos de reproducir las crisis encefalopáticas en ratones GCDH deficientes, sin resultados exitosos, hasta que el grupo de Zinnanti et al. (2006; 2007) demostró que los ratones GCDH deficientes expuestos a una dieta con alto contenido de lisina desarrollan una encefalopatía aguda comparable a la de los pacientes GA-I. Ratones *Gcdh* ^{-/-} de cuatro semanas, alimentados con una dieta alta en lisina, acumulan GA en altas concentraciones y presentan convulsiones, parálisis, hemorragias y un 75% de mortalidad, 3-6 días luego del comienzo de la dieta (Zinnanti et al., 2006). Por el contrario, ratones adultos de ocho semanas, sobreviven a la dieta alta en lisina, acumulan menor concentración de GA y desarrollan lesiones estriatales bilaterales luego de seis semanas de exposición a un alto porcentaje de lisina (Zinnanti et al., 2006). Este modelo muestra una vulnerabilidad a la injuria cerebral aguda que es dependiente de la edad, y que podría estar relacionada con una mayor captación de lisina a nivel cerebral en animales más jóvenes y como consecuencia una mayor acumulación de GA (Zinnanti et al., 2006).

Por otro lado, para conocer los efectos bioquímicos del tratamiento dietario que se aplica en pacientes, se empleó el modelo del ratón *Gcdh* ^{-/-}. En un trabajo publicado por Sauer et al. (2011), los autores demostraron que el tratamiento con bajo contenido de lisina, redujo los niveles de GA en suero, hígado, riñón y cerebro, pero no modificó los niveles de 3-OHGA. El suplemento con L-arginina, sumado a la dieta pobre en lisina, redujo aún más los niveles de GA en cerebro e hígado, probablemente porque la arginina compite con la lisina por los sitios de unión de los transportadores de aminoácidos básicos, en la BHE o en la membrana mitocondrial (Sauer et al., 2011). El complemento dietario con L-carnitina, no modificó los niveles de GA o 3-OHGA, pero sí aumentó el reservorio de carnitina libre en hígado y cerebro y la formación de glutaril-carnitina. Por último, dado que la lisina se metaboliza a nivel cerebral a través de la vía del L-pipecolato peroxisomal, el tratamiento con clofibrato para favorecer esta vía de degradación, produjo una disminución de los niveles de GA en cerebro e hígado, sugiriendo que ésta puede ser nueva estrategia terapéutica (Sauer et al., 2011).

1.2.1.3 Mecanismos patogénicos

Se han descrito al menos tres mecanismos patogénicos principales involucrados en GA-I: excitotoxicidad (Heyes et al., 1987; Kolker et al., 1999; 2000; 2003; Varadkar & Surtees, 2004), alteración del metabolismo energético (Lipkin et al., 1988; Kolker et al., 2002; Das et al., 2003; Ferreira da Costa et al., 2005) e inducción del estrés oxidativo (Kolker et al., 2001; de Oliveira et al., 2003; Latini et al., 2005; Olivera et al., 2008; 2011). Recientemente, también se ha considerado el rol de la BHE en el transporte limitado de los metabolitos acumulados en GA-I (Sauer et al., 2006; 2010). En la Fig. 5 se muestra un esquema de los mecanismos patogénicos propuestos (extraído de la revisión de Jafari et al., 2011).

1.1.1.3.1 Excitotoxicidad

Tanto el GA como su derivado hidroxilado 3-OHGA, son moléculas estructuralmente relacionadas al glutamato. La excitotoxicidad es un mecanismo de daño celular inducido por la sobreactivación de los receptores de glutamato, produciendo un aumento del calcio y del sodio intracelular. Elevadas

concentraciones de calcio producen la activación de diversas enzimas catabólicas como proteasas, fosfolipasas y endonucleasas; estimulan la producción de radicales libres y promueven la formación de óxido nítrico y peroxinitrito, que son inductores directos o indirectos de muerte. La muerte celular podrá ser necrótica o apoptótica, en función de la intensidad del estímulo causante de muerte. Por ejemplo, la sobreactivación moderada de los receptores de glutamato podrá desencadenar una muerte apoptótica lenta, mientras que una estimulación intensa y sostenida podrá desencadenar una muerte necrótica (Dong et al., 2009).

El análisis *post mortem* del cerebro de pacientes GA-I, muestra signos de daño neuronal excitotóxico caracterizado por vacuolización de neuronas post sinápticas y gliosis a nivel estriatal y cortical (Kolker et al., 2003). En 1987, Heyes propuso que el ácido quinolínico, producto del metabolismo del triptófano y ligando endógeno de los receptores NMDA, podría estar aumentado en pacientes, causando la neuropatología en GA-I (Heyes, 1987). Más adelante, otros autores propusieron que la acción sinérgica del ácido quinolínico con el 3-OHGA sobre los receptores NMDA, desencadenaría la excitotoxicidad en el modelo Gcdh -/-(Varadkar & Surtees, 2004).

Mientras que algunos estudios *in vitro*, realizados en cultivos organotípicos hipocampales y corticoestriales de rata o en cultivos primarios de neuronas telencefálicas de pollo, han probado el efecto excitotóxico del GA y 3-OHGA (0.1-5mM) (Kolker et al., 1999; 2000; Ullrich et al., 1999), otros estudios realizados también en cultivos neuronales corticales y estriales de rata, embrionarios o postnatales, no han observado un efecto excitotóxico ni muerte neuronal ulterior, aún en presencia de receptores NMDA funcionales (Bjugstad et al., 2001; Lund et al., 2004; Freudenberg et al., 2004).

1.2.1.3.2 Disrupción del metabolismo energético

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

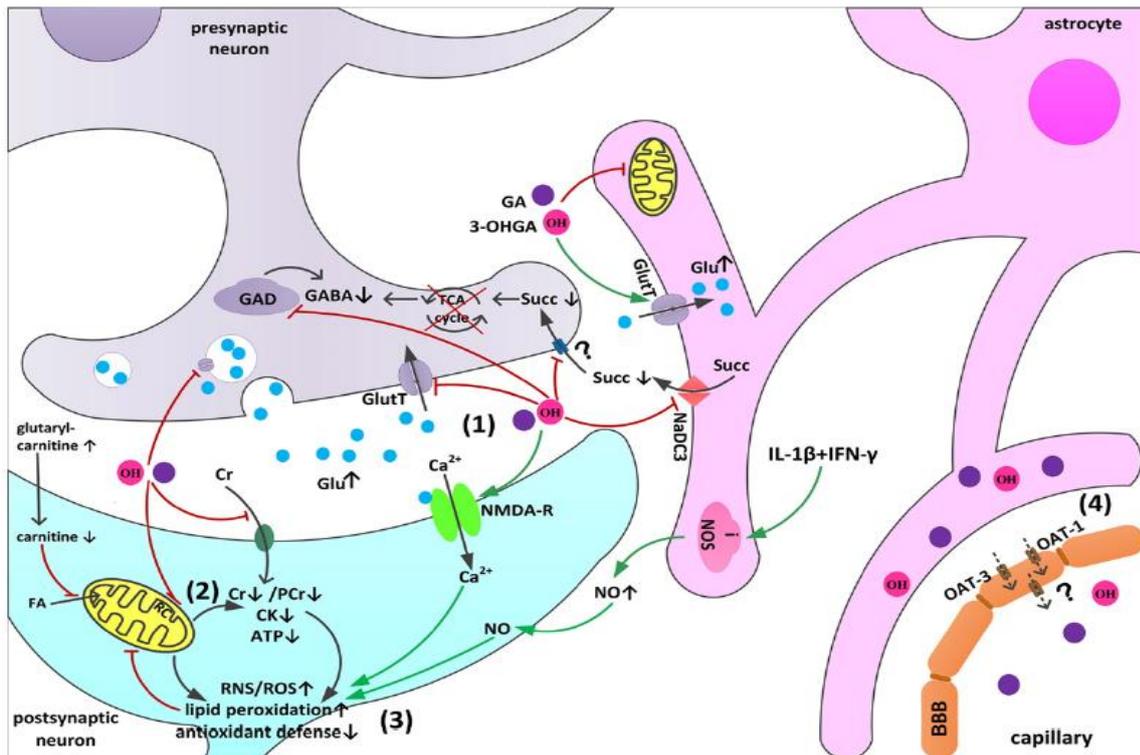


Figura 5. Principales mecanismos patogénicos reportados en GA-I. (1) excitotoxicidad; (2) disrupción del metabolismo energético; (3) estrés oxidativo; (4) transporte limitado de GA y otros metabolitos a través de la barrera hematoencefálica. [Extraído de Jafari et al., 2011]

1.1.1.3.3 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es el resultado de un desbalance entre la producción de radicales libres y defensas celulares antioxidantes. Las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (anión superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico, peroxinitrito y radicales peroxilipídicos), conocidas con el nombre genérico de radicales libres, son generadas en la célula a través de distintas reacciones enzimáticas y no enzimáticas (Young et al., 2001; Trushina et al., 2007). Pese a que las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno son moléculas señalizadoras en varios tejidos; muchas condiciones patológicas se asocian con su producción excesiva. Altas cantidades de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno pueden atacar proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, alterar vías de señalización y metabólicas, inducir disfunción mitocondrial, destruir membranas y organelos subcelulares y conducir a la apoptosis celular (Young et al., 2001; Trushina et al., 2007).

Varios estudios realizados *in vivo*, tanto en modelos farmacológicos como en el modelo del ratón deficiente en GCDH, han evidenciado un aumento de indicadores de estrés oxidativo (de Oliveira et al., 2003; Latini et al., 2007). Además, cultivos mixtos hipocámpales o astrocitos aislados de rata, tratados con GA o 3-OHGA, presentan marcadores de estrés oxidativo como aumento de especies reactivas del oxígeno, inducción de iNOS y disminución de glutatión intracelular (Kolker et al., 2001; Olivera et al., 2008; 2011). Este mecanismo patogénico podría ser consecuencia de la inhibición de la fosforilación oxidativa mitocondrial *per se* o ser secundario a un mecanismo excitotóxico ya que la sobre-estimulación de los receptores NMDA causa un incremento del calcio intracelular y la activación de enzimas que producen especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (Kolker et al., 2001, Jafari et al., 2011).

1.1.1.3.4 Rol de la BHE en el transporte de los metabolitos

A pesar de que la expresión de la enzima GCDH es mucho mayor en el hígado que en el cerebro (Woontner et al., 2000) y que originalmente se pensó que GA y 3-OHGA podían ingresar al SNC a través de la BHE, se demostró que existe una síntesis *de novo* de estos metabolitos en el cerebro y que su eliminación está limitada, acumulándose a nivel cerebral (Sauer et al., 2006). Dado que GA y 3-OHGA son compuestos polares, el eflujo de estos metabolitos a nivel de la BHE requiere de transportadores específicos como el transportador de aniones orgánicos 1 y 3 (OAT, del inglés *Organic Anion Transporter*). Sin embargo, dada la baja expresión de estos transportadores en la membrana apical de las células endoteliales de los capilares cerebrales, hay un eflujo lento de los metabolitos dicarboxílicos (GA y 3-OHGA), quedando atrapados en el compartimiento cerebral (Sauer et al., 2010).

1.2.2 Alteraciones vasculares en GA-I

En pacientes GA-I, se han reportado anomalías vasculares como disrupción de la BHE, hemorragias subdurales y retinianas, extravasación crónica de los vasos transaracnoideos, aumento del volumen de líquido cefalorraquídeo y alteraciones del flujo sanguíneo cerebral (Twomey et al., 2003; Strauss et al., 2003; 2010; Knapp et al., 2002; Muhlhausen et al., 2004) que ocurren independientemente de la muerte neuronal o de las crisis encefalopáticas. De acuerdo con Strauss et al. (2010), algunos pacientes presentan dilatación arteriolar, aumento del volumen sanguíneo cerebral e hipertensión venosa lo que conduce a la expansión del líquido cefalorraquídeo, hemorragias intradurales y edema intersticial. En este contexto, el autor propone que los fenómenos hemodinámicos sumados a la toxicidad metabólica de GA y 3-OHGA desencadenarían las crisis encefalopáticas en pacientes GA-I. Por otro lado, las anomalías vasculares también son evidentes en ratones deficientes en GCDH expuestos a una dieta alta en lisina, presentando dilatación capilar, hemorragias y engrosamiento de los grandes vasos (Zinnanti et al., 2006). Otras evidencias, en cambio, sugieren que en el modelo *Gcdh*^{-/-}, el compromiso de la BHE y el transporte de metabolitos GA-I, a través de ella es escaso (Keyser et al., 2008).

Para comprender las causas de las alteraciones vasculares observadas en pacientes GA-I, Mulhausen et al. (2006) analizaron los efectos de GA y 3-OHGA sobre células endoteliales en cultivo, demostrando que únicamente 3-OHGA a concentraciones altas (mayores a 4mM) tiene un toxicidad directa sobre células endoteliales, provocando disrupción del citoesqueleto de actina, enlentecimiento en la migración, disminución de la expresión de cadherinas; y dilatación vascular y hemorragias en un ensayo realizado sobre la membrana corioalantoidea de embriones de pollo. Sin embargo, 3-OHGA es un metabolito reportado en bajas concentraciones (50-200µM) en el suero y muestras post-mortem de pacientes GA-I (Funk et al., 2005; Sauer et al., 2006; Kulkens et al., 2005), por lo que las concentraciones analizadas por Mulhausen et al. exceden hasta 50 veces las concentraciones usualmente determinadas. Por lo tanto, aún se desconocen las causas de las alteraciones vasculares y no existen reportes acerca de cómo se afectan las células perivasculares, astrocitos y pericitos, ni el papel que cumplen en la patología vascular de GA-I.

1.2.3 Patología de la sustancia blanca en GA-I

Se han reportado diferentes alteraciones de la mielina en el cerebro de pacientes GA-I que se extienden desde retardo en la mielinización hasta distintos de grados de lesión de la sustancia blanca periventricular, evidenciado por imágenes de resonancia magnética (Hoffmann et al., 1996; Funk et al., 2005; Strauss et al., 2003). Estas alteraciones son hallazgos patológicos frecuentes en

pacientes GA-I que se manifiestan a temprana edad. Además, se han reportado pacientes no diagnosticados durante la niñez cuyos síntomas se manifiestan en la adultez y adolescencia y que presentan una leucoencefalopatía espongiiforme difusa como principal hallazgo patológico (Bahr et al., 2002; Kulkens et al., 2005). Por otro lado, el ratón deficiente en GCDH desarrolla una mielino patía espongiiforme difusa, aún sin pérdida neuronal evidente (Koeller et al., 2002). Por lo tanto, podría existir una vulnerabilidad específica de los oligodendrocitos en esta patología y existe un único reporte, al respecto, que muestra muerte apoptótica de una línea celular de oligodendrocitos inmaduros (OLN-93) cuando es tratada con GA (0.1-10mM) y 3-OHGA (0.1-10mM) durante 24h (Gerstner et al., 2005). Sin embargo, no existe ningún reporte, hasta el momento, que pruebe el efecto directo de los ácidos en cultivos primarios de oligodendrocitos o en animales expuestos a altas concentraciones de estos metabolitos. Se desconoce si las alteraciones de la mielina ocurren por fallas en las células precursoras de oligodendrocitos o en los estadios más diferenciados; si hay alguna alteración en el proceso de mielinización o en las señales que recibe el oligodendrocito desde la neurona o el astrocito.

1.2.4 Disfunción astrocitaria en GA-I

Astroцитos corticales y estriatales aislados de rata, tratados con GA (5mM) y 3-OHGA (1mM) aumentan su proliferación, presentan estrés oxidativo y disfunción mitocondrial (Olivera et al 2008; 2011), sin muerte celular aparente. Esta disfunción astrocitaria parece afectar la supervivencia de neuronas estriatales, en experimentos con medios condicionados de astroцитos y co-cultivos astrocito-neurona, por mecanismos aún no dilucidados (Olivera et al., 2011). Por otro lado, 2mM de GA y 3-OHGA inhiben competitivamente la captación de succinato, a través del transportador de dicarboxilatos dependiente de sodio 3 (NaC3, del inglés, *Na⁺-coupled transporter 3*), en astroцитos y neuronas de ratones salvajes o *Gcdh*^{-/-} (Lamp et al., 2011). Además, se comprobó una importante reducción del eflujo de succinato en astroцитos *Gcdh*^{-/-} que ocurre a través de transportadores aún no conocidos (Lamp et al., 2011). Estos resultados sugieren que la inhibición del soporte anaplerótico desde el astrocito hacia la neurona, podría comprometer la síntesis de neurotransmisores y de ATP, pudiendo ser éste otro mecanismo que explicaría la deficiencia energética y el daño neuronal en GA-I (Lamp et al., 2011).

Otro estudio publicado por Jafari et al. (2013), empleando un cultivo organotípico de cerebro de rata E15 tratado con 1mM de GA o 3-OHGA durante 6 días, mostró que los astroцитos son las células principalmente afectadas por estos metabolitos, observando una disminución de la inmunorreactividad para GFAP, muerte celular no apoptótica (incremento de la actividad de la lactato deshidrogenasa, LDH, sin aumento de caspasa 3 clivada), un aumento significativo de amonio y disminución de glutamina en el medio de cultivo. En este modelo no se observaron cambios importantes en la población neuronal. A la luz de estos resultados, los autores proponen que la pérdida de astroцитos conduciría a una hiperamonemia (dado que los astroцитos son las principales células del SNC que metabolizan el amonio a través de la glutamina sintetasa) que secundariamente provocaría muerte de neuronas y oligodendrocitos (Jafari et al., 2013).

Estudios sobre los efectos de GA en rodajas de corteza cerebral de ratas de 7 días y en preparaciones sinaptosomales de estriado de ratas de 30 días, indicarían que hay una disminución de la captación de glutamato, probablemente por inhibición del transportador GLT-1, presente principalmente en

astrocitos, lo cual podría subyacer al daño excitotóxico en GA-I (Rosa et al., 2007; Magni et al., 2009).

La hipótesis de que los astrocitos podrían ser blancos celulares primarios o tempranos en GA-I surgió a partir de experimentos con animales neonatos en los que se inyectó GA (2.5 $\mu\text{mol/g}$) al día 0 de vida, a nivel del IV ventrículo. En estos animales se observó un aumento de la proliferación astrocitaria e inmunorreactividad para la proteína S100 (marcador de astrocitos inmaduros) en el estriado a los 5 días post-inyección (Olivera et al., 2008). A esta respuesta astrocitaria que se evidencia tempranamente, le sigue una degeneración neuronal progresiva y retardada en el tiempo, que se hace evidente a los 21 días post-inyección (DPI) (Olivera et al., 2011). Este modelo también muestra alteraciones de la sustancia blanca como una reducción de la mielina en el estriado que se hace evidente a partir de los 12 DPI, y alteraciones ultraestructurales de los oligodendrocitos observables por microscopía electrónica de transmisión (Olivera et al., 2013, no publicado). La reducción del área de los paquetes axonales mielinizados, se evidenció por la inmunomarcación de MAG y MBP y con técnicas histológicas como SUDAN III (Fig. 6) (Olivera et al., 2013, no publicado). Por lo tanto, en el modelo de administración neonatal de GA en ratas, se observa una respuesta astrocitaria temprana acompañada de una degeneración neuronal y fallas en la mielinización que acontecen más tardíamente.

A modo de resumen, GA-I es una patología de base genética con síntomas y gravedad variables, que depende de factores ambientales y cuyos efectos neurológicos se atribuyen a la toxicidad de los ácidos orgánicos acumulados en el cerebro. Sin embargo, poco se conoce acerca de los mecanismos patogénicos que subyacen a las alteraciones vasculares y de la sustancia blanca, que son dos hallazgos patológicos relevantes y frecuentes en los pacientes GA-I. El astrocito parece ser un blanco celular preferencial para los metabolitos acumulados en GA-I ya que puede captarlos a través de diversos mecanismos y posteriormente sufrir un cambio fenotípico neurotóxico. Nuestro modelo de inyección intracerebroventricular de GA logra reproducir las crisis encefalopáticas que sufren los pacientes, presentando una disfunción astrocitaria temprana que subyace a una degeneración neuronal retardada en el tiempo y creemos que con este modelo podremos colaborar con la dilucidación de los mecanismos subyacentes a las alteraciones en la BHE y en la mielinización en GA-I.

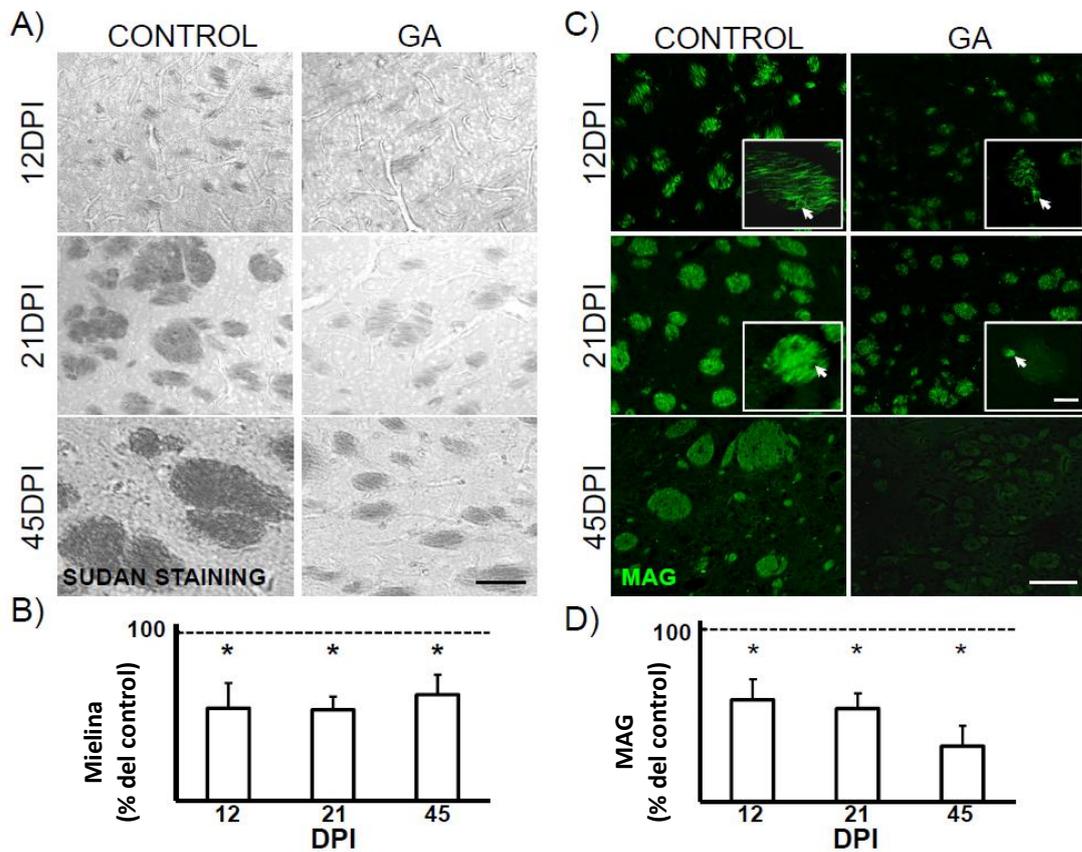


Figura 6. Alteraciones de la mielina en el estriado de animales inyectados con GA. (A) Se observan los haces de mielina teñidos con SUDÁN III, a los 12, 21 y 45 días post-inyección (DPI). Barra de calibración: 40 μ m. (B) Reducción significativa del área de los haces de mielina a los 12, 21 y 45 DPI en animales inyectados con GA. (C) Inmunomarcación de MAG en el estriado, en las tres edades. Notar la acumulación de MAG en los cuerpos celulares, en animales inyectados con GA, en contraste con su localización a nivel de los paquetes axonales en los animales controles (flechas blancas). Barra de calibración: 12 μ m. (D) Reducción significativa del área MAG positiva en el estriado. Los valores que se representan son los promedios \pm error estándar. * $p < 0.05$. [Extraído de Olivera et al., 2013, en preparación]

2. HIPÓTESIS

Los metabolitos acumulados en GA-I podrían alterar el fenotipo astrocitario lo que ocasionará un cambio en el repertorio de señales que repercutirá negativamente en la maduración o funcionalidad de la unidad neurovascular y la mielinización.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Contribuir al conocimiento de los mecanismos subyacentes a la neuropatología en GA-I, haciendo foco en las alteraciones vasculares y de la sustancia blanca características de esta enfermedad, y avanzar en la comprensión de los blancos celulares más vulnerables a la toxicidad de los ácidos acumulados.

3.2 Objetivos específicos

1. Estudiar y caracterizar los efectos de la administración temprana de GA sobre la maduración e integridad de la BHE.
2. Analizar si los pericitos son los blancos celulares de la acción directa del GA o de una acción indirecta ocasionada por la disfunción astrocitaria que este ácido induce.
3. Estudiar si el GA tiene una acción directa o mediada por astrocitos sobre cultivos primarios de oligodendrocitos.
4. Evaluar el efecto agudo de la administración neonatal de GA, sobre la población de células precursoras de oligodendrocitos y astrocitos.

4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir el primer objetivo, se inyectaron ratas *Sprague Dawley* al día 1 de vida con 2.5 $\mu\text{mol/g}$ de GA o igual volumen de PBS (controles) y se analizó la integridad de la BHE a los 14 y 30 días posteriores a la inyección, analizando y cuantificando la extravasación del colorante Evans Blue en el parénquima por microscopía de luz y fluorescencia. Paralelamente, se estudió por inmunohistoquímica la expresión de marcadores presentes en la membrana basal (laminina) y en células perivasculares: AQP4 (podocitos astrocitarios) y PDGFR β (pericitos). Mediante Western blotting se analizó la expresión de ocludina, proteína integral de membrana que forma parte de las uniones estrechas entre las células endoteliales. Para evaluar el linaje celular y la viabilidad de las células marcadas con EB, se estudió su co-localización con NeuN y anexina V.

Para cumplir con el segundo objetivo, se optimizó un método para realizar cultivos primarios de pericitos de ratas *Sprague Dawley* de 2-3 semanas de vida. El cultivo se caracterizó mediante el análisis de la expresión de marcadores prototípicos como NG2, PDGFR β y αSMA . Para evaluar efectos directos de GA, se trató con el ácido (5 mM, pH 7.4) o con PBS (controles) y se evaluó morfología, expresión de marcadores prototípicos, migración y proliferación en un ensayo de *scratch*. Por último, para evaluar efectos mediados por la disfunción astrocitaria inducida por GA, los pericitos fueron tratados con medios condicionados de astrocitos controles o tratados con GA y se evaluó proliferación y migración en un ensayo de *scratch*.

Para cumplir con el tercer objetivo, se optimizó un protocolo de cultivo de células precursoras de oligodendrocitos. Estas células en estadio inmaduro y en presencia de PDGF-AA, se trataron con GA o PBS (controles) y se evaluó número, morfología, proliferación, viabilidad, inducción de iNOS y expresión de marcadores como NG2 o PDGFR α . Paralelamente, para evaluar efectos mediados por la disfunción astrocitaria inducida por GA, se trataron oligodendrocitos con medios condicionados de astrocitos tratados con GA o controles y se evaluó morfología y número de células. Además, para estudiar posibles cambios en el repertorio de factores tróficos secretados por astrocitos e importantes en la supervivencia o diferenciación de los oligodendrocitos, se cuantificaron los niveles de ARNm de CNTF, LIF y BMP-4 en astrocitos tratados con GA o PBS (controles), mediante PCR en tiempo real.

Para cumplir con el cuarto objetivo, animales inyectados con GA o PBS al día 1 de vida, fueron fijados y procesados, 24h luego de la inyección, para el reconocimiento inmunohistoquímico y cuantificación de marcadores de precursores de oligodendrocitos (NG2 y PDGFR- α) y de marcadores de astrocitos estriatales S100 β . Simultáneamente, se obtuvieron muestras de estriado de animales controles e inyectados con GA y se cuantificó por Western blotting la expresión de PDGFR α .

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

Los medios de cultivo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y Neurobasal; la tripsina, los antibióticos y el suplemento B27, fueron comprados a GIBCO[®] (Invitrogen). El suero fetal bovino (FBS) fue comprado a PAA. El material plástico, botellas, placas de Petri y multipocillos fueron comprados a Corning y Greiner Bio-One. La colagenasa tipo I (Sigma) fue donada generosamente por Alejandra Kun (Dpto. de Ácidos Nucleicos y Proteínas, IIBCE). Otros reactivos como el ácido glutárico, la albúmina sérica bovina (BSA), poli-D-lisina, ADNasa, colágeno tipo I, Evans Blue, paraformaldehído, ácidos, bases, sales, Tris, glicina, detergentes y demás reactivos fueron comprados a Sigma, a menos que se especifique lo contrario.

5.2 Animales

El modelo animal estudiado y los cultivos celulares se realizaron con ratas de la cepa *Sprague Dawley* (SD), criadas en el bioterio del IIBCE. Los animales fueron albergados en cajas con alimento y agua *ad libitum*, con un régimen controlado de temperatura y ciclos de 12 horas de luz/oscuridad. Se cumplieron las normas vigentes institucionales en conformidad con la Ley de Experimentación Animal (Ley N° 18.611). Todos los procedimientos experimentales realizados con animales fueron aprobados por el Comité de Ética del IIBCE.

5.3 Inyección de GA en ratas neonatas

Para reproducir experimentalmente las crisis encefalopáticas similares a las que sufren los pacientes con GA-I, se inyectó GA (2.5 μ mol/g, pH=7.4) o vehículo (búfer fosfato salino (PBS), 10 mM, pH=7.4) intracerebral, a nivel del IV ventrículo (Cisterna magna) en ratas neonatas durante las primeras 24h luego de su nacimiento (P0). Un volumen máximo de 5 μ l fue inyectado utilizando 3mm de una aguja

30G acoplada a un tubo de plástico Tygon (Olivera et al., 2008; 2011). La concentración de GA utilizada está en el rango de concentraciones halladas en el cerebro post-mortem de pacientes con GA-I (Hoffman et al., 1996; Funk et al., 2006; Strauss et al., 2003). Este método de inyección permite alcanzar altas concentraciones de este ácido en el cerebro, lo cual es difícil de lograr mediante una inyección sistémica debido al flujo limitado de GA y de otros metabolitos, a través de la BHE (Sauer et al., 2006). Los animales controles fueron hermanos de la misma camada, quienes recibieron una inyección con igual volumen de PBS. Luego de la inyección con GA, los animales sufrieron convulsiones tónicas-clónicas, seguidas de un período de hipotonía que cesaba aproximadamente a los 30-45 min. Todos los animales permanecieron aislados, recuperándose durante 45 min, a una temperatura cercana a los 30°C, antes de ser devueltos a su madre.

5.4 Procesamiento de animales para análisis inmunohistoquímico

Animales inyectados con GA a P0, fueron anestesiados con ketamina:xilacina (90:10 mg/kg) y perfundidos intracardiácamente, primero con suero fisiológico conteniendo 0.04% de citrato de sodio y luego con paraformaldehído (PAF) al 4% en PBS 10 mM (pH=7.4). Luego de la perfusión, los cerebros fueron disecados y post-fijados toda la noche con PAF 4% a 4°C y luego mantenidos en PBS-azida de sodio (0.05%) hasta su procesamiento. Se realizaron cortes coronales consecutivos de 50 µm conteniendo toda la región del estriado, con vibrátomo Leica 1000S y los cortes se mantuvieron flotando en PBS-azida de sodio (0.05%) a 4 °C o en glicerol-PBS (1:1) a -20 °C.

5.5 Análisis de la extravasación de *Evans Blue* (EB)

Para evaluar la permeabilidad de la BHE, se analizó la extravasación de EB, un colorante diazo de color azul que se une a la albúmina y ha sido utilizado para estudiar la integridad de la BHE en distintos modelos animales (Uyama et al., 1988; Rákos et al., 2007). Hemos empleado el protocolo propuesto por del Valle et al. (2008), con modificaciones menores. Ratas inyectadas con GA al día 0, fueron anestesiadas a los días 14 y 30 con ketamina:xilacina (90:10 mg/kg) y fueron perfundidas intracardiácamente con suero fisiológico conteniendo 0.04% de citrato de sodio y luego con una solución de EB 1% y PAF 4% en PBS 10mM (pH=7.4). Luego de la perfusión, los cerebros fueron disecados, post-fijados y cortados con vibrátomo como se describió anteriormente. La presencia de EB se observó en cortes por microscopía de luz, fluorescencia (Olympus IX-81, cámara DP 70, DP Controller) y microscopía confocal (OLYMPUS FLUOVIEW FV300), detectando la fluorescencia roja emitida por el colorante, al unirse con proteínas como la albúmina. EB tiene dos picos de máxima absorción a 470 nm y 540 nm y un pico de máxima emisión a 680 nm (Hed et al., 1983). Se cuantificó la intensidad de fluorescencia roja en la corteza y estriado para los controles y tratados, con el software Image J (NIH, USA).

5.6 Cultivos celulares

5.6.1 Cultivo primarios de astrocitos

Los cultivos enriquecidos en astrocitos fueron obtenidos de corteza cerebral de ratas SD de 1-2 días de vida, siguiendo el procedimiento descrito por Saneto y De Vellis (1987) con algunas modificaciones. Brevemente, se extrajo el cerebro en condiciones estériles, se disecaron las dos hemi-cortezas y se retiraron las meninges. El tejido se cortó en trozos con bisturí y se realizó una disgregación enzimática con tripsina-EDTA (0.05% en PBS; 25 min a 37°C). El tratamiento enzimático se detuvo con la adición de DMEM + 10% FBS, se agregó ADNasa 50 µg/ml y se completó la

disgregación del tejido mecánicamente. La suspensión celular se filtró en una malla de 80 μm y luego se centrifugó (1000 rpm, 10 min). El pellet celular se resuspendió en 1 ml de DMEM-FBS y en una dilución 1:20 se contaron las células con cámara de Neubauer y se sembraron aproximadamente 1.5×10^6 células por botella de 25 cm^2 . Se adicionaron 5 ml de medio de cultivo de astrocitos conteniendo DMEM suplementado con 10% FBS, 3.6 g/l HEPES, 100 IU/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina. Las células se mantuvieron en una estufa de cultivo a 37°C, en una atmósfera saturada de agua, 95% aire/5 % CO_2 y el medio se cambió cada 48h. Cuando el cultivo celular alcanzó confluencia, se agitó a 180 rpm en agitador orbital, durante 48h para desprender la microglía y la oligodendroglía y obtener una pureza mayor a 98% de astrocitos. Para todos los ensayos con astrocitos se realizó un re-plaqueo de las células cultivadas en botellas, en placas de Petri de 35 mm, de 60 mm o placas de 24 pocillos. Para lograr el decolamiento de las células se realizó una tripsinización (tripsina-EDTA 0.05%, 5 min, 37°C), se colectaron las células por centrifugación (1000 rpm, 10min) y se sembraron aproximadamente 150.000 células para cada placa de 35mm, 500.000 para cada placa de 60 mm y 25.000 en cada pocillo de la placa de 24 pocillos.

5.6.2 Cultivo primario de oligodendrocitos

Los cultivos primarios de oligodendrocitos fueron obtenidos de corteza cerebral de ratas SD de 1-2 días de vida, siguiendo el procedimiento descrito por Yang et al. (2005) con algunas modificaciones. Brevemente, se extrajo la corteza cerebral de 1-2 animales neonatos en condiciones estériles, se retiraron las meninges y se incubó con tripsina-EDTA (0.05% en PBS; 15 min a 37°C). El tratamiento enzimático se detuvo con DMEM + 10% FBS y ADNasa 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se completó la disgregación por pipeteo. La suspensión celular se filtró en una malla metálica de 80 μm , se centrifugó (1000 rpm, 10 min) y el pellet se re-suspendió en DMEM +10% FBS. Las células disgregadas se sembraron en botellas de 25 cm^2 o 75 cm^2 cubiertas con poli-lisina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Los cultivos se mantuvieron en DMEM suplementado con 10% FBS, 3.6 g/l HEPES, 100 IU/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina, cambiando el medio de cultivo cada 48h. Las células permanecieron en una estufa a 37°C, en una atmósfera saturada en agua, 95% aire/5 % CO_2 . A los 10 días *in vitro*, el cultivo se agitó de 15 a 18h a 250 rpm para desprender la oligodendroglía y la microglía adheridas a la monocapa de astrocitos. Se colectó el medio de cultivo conteniendo las células desprendidas y se centrifugó (1000 rpm, 10 min). Se resuspendió el pellet en DMEM + 10% FBS, se sembró sobre placas de Petri de 60 mm y se dejó reposar (15-30 min) en estufa para eliminar astroglía y microglía contaminantes ya que la oligodendroglía, a diferencia de la astro y microglía, tiene escasa adherencia al plástico. Se colectó el medio de cultivo con las células en suspensión que no se adhirieron al plástico, se centrifugó (1000 rpm, 10 min) y se sembró sobre placas de Petri de 35 mm cubiertas con poli-lisina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a una densidad de 2000-50000 $\text{cél}/\text{cm}^2$. A las 24h luego de sembrar las células, el medio se cambió por Neurobasal adicionado con 2% B27 y 10 ng/ml PDGF-AA. Las células se mantuvieron en este medio durante 3 días, al cabo de los cuales, el cultivo está enriquecido en células precursoras de oligodendrocitos en estadio multipolar (50% de células NG2 positivas). Para los experimentos con oligodendrocitos diferenciados, el medio inicial fue sustituido totalmente por Neurobasal + 2% B27, sin factores tróficos y se dejaron 3 días más *in vitro*, antes de comenzar los tratamientos.

5.6.3 Cultivo primario de pericitos

Los cultivos primarios de pericitos fueron preparados siguiendo el procedimiento descrito por Nakagawa et al. (2009) y Tigges et al. (2012) con algunas modificaciones. Brevemente, ratas de 2-3 semanas fueron sacrificadas, se extrajo el cerebro en condiciones estériles y se descartaron los

bulbos olfatorios, el cerebelo y el tronco encefálico. Se removieron cuidadosamente las meninges y el resto del tejido se cortó en trozos y se incubó durante 1h a 37°C en una solución enzimática conteniendo 0.225 mg/ml de colagenasa I, 5mM CaCl₂ y 40 µg/ml ADNasa en DMEM. Luego de la digestión enzimática, se realizó una disgregación mecánica del tejido con pipeta de 1ml y se filtró en una malla metálica de 80 µm. El homogenato se mezcló con 1.7 volúmenes de BSA 22% preparado en PBS y se centrifugó (2000 rpm, 10 min). El pellet, conteniendo fragmentos de microvasos, se resuspendió en un medio de cultivo conteniendo Neurobasal suplementado con 1% B27, 10% FBS, 100 IU/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Los fragmentos de microvasos aislados fueron sembrados sobre placas de Petri de 35 mm o botellas de 25 cm² previamente cubiertas con colágeno I (10 µg/ cm²). El sustrato de colágeno permitió la adherencia de algunos fragmentos de vasos, a partir de los cuales, las células endoteliales y pericitos comenzaron a migrar y proliferar cubriendo la totalidad de la placa. Cuando los cultivos alcanzaron la confluencia (8-10 DIV), se decolaron las células (tripsina-EDTA 0.05%, 5 min, 37°C), se centrifugaron (1000 rpm, 10 min) y se sembraron sobre plástico en placas de Petri o botellas de 25 cm², a la dilución ¼. Luego de alcanzar la confluencia, se realizó un segundo pasaje y esas células se utilizaron para todos los experimentos. El pasaje sucesivo del cultivo y sembrado sobre plástico permitió purificar la población de pericitos que presentó buena adherencia al plástico, a diferencia de las células endoteliales que no crecen directamente sobre este sustrato. Además, los pericitos presentaron una alta tasa proliferativa lo que permitió obtener rápidamente una población enriquecida en pericitos. Los cultivos de segundo pasaje contenían más del 95% de células NG2, PDGFR-β y α-SMA positivas, 1% de células vWF positivas (células endoteliales) y menos del 4% de células GFAP positivas (astrocitos).

5.7 Tratamiento de las células

Los cultivos celulares analizados en este trabajo (astrocitos, pericitos y oligodendrocitos) fueron tratados con GA (5 mM) o PBS durante 24h. En algunos experimentos con oligodendrocitos se realizó un tratamiento de 48 h con GA (2 mM). Para los experimentos de *scratch* en pericitos, se trataron con GA (5 mM), 3-OHGA (2-4 mM) o PBS durante 72 h. Las alícuotas de GA (1 M) fueron preparadas en PBS (10 mM) y se ajustó el pH a 7 con hidróxido de sodio.

Para obtener medio condicionado de astrocitos controles (MC-C) o tratados con GA (5 mM)(MC-GA), las células fueron tratadas 24 h, se retiró el medio de cultivo, se lavaron con PBS y se agregó DMEM + 2% FBS para los ensayos con oligodendrocitos o Neurobasal + 2% B27 y 10% FBS para los ensayos con pericitos. A las 24 h, se recogió el medio condicionado, se centrifugó (1200 rpm, 10 min) y el sobrenadante se usó para tratar oligodendrocitos (diluído ¼ en NB+ 2%B27) o pericitos (sin diluir). Además de la caracterización inmunocitoquímica de los pericitos, se evaluó la respuesta celular al aumento del AMP cíclico (AMPc) luego del tratamiento durante 2 h con forskolina (10 µM). El pericito es una célula contráctil con receptores para moléculas vasodilatadores o vasoconstrictoras y es capaz de responder al aumento del AMPc intracelular, ocasionado por el tratamiento con forskolina, adoptando una morfología arborescente (Kelley et al., 1988).

5.8 Ensayos de proliferación con bromodeoxiuridina (BrdU)

En los ensayos de proliferación de oligodendrocitos, se agregó BrdU (40 µM) al momento de realizar los tratamientos y las células fueron fijadas 24 h después. En algunos experimentos de *scratch* con pericitos (ver abajo), se adicionó BrdU (40 µM) al tiempo 0 h y las células se fijaron 48 h después. En ambos casos, la fijación fue con PAF 4% (20 min, temperatura ambiente), luego se lavaron con PBS

(10mM) y se incubaron con HCl (2N, 45 min, temperatura ambiente) para desnaturalizar el ADN y permitir el reconocimiento del BrdU por inmunomarcación. Se lavaron las células con PBS, se permeabilizaron con Tritón X-100 (0.1% en PBS, 20 min) y se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con BSA 5% en PBS, durante 30-60 min. Las células se incubaron con anti-BrdU monoclonal de rata (1/500, Invitrogen) toda la noche a 4°C, se lavaron con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-rata conjugado a Alexa Fluor 488 (1/500, Molecular Probes). Luego de la incubación con el anticuerpo secundario, durante los lavados con PBS, se adicionó Hoechst 1 µg/ml. Las células se observaron en un microscopio invertido de fluorescencia (Olympus IX-81, cámara DP-70, DP Controller) utilizando los filtros de emisión adecuados. El conteo manual de células BrdU y Hoechst positivas se realizó con el programa Image J (NIH, USA).

5.9 Ensayos de migración

A los pericitos confluentes de segundo pasaje sembrados en placas de 35 mm, se les realizó un *scratch* manual con punta de pipeta estéril de 0.1-10 µL. Las células desprendidas se retiraron mediante lavados con PBS. Luego del *scratch*, las células que permanecieron adheridas fueron tratadas con GA (5mM), PBS (control), medio condicionado de astrocitos controles (MC-C) o de astrocitos previamente tratados con GA durante 24 h (MC-GA) en una dilución 1:1. Se tomaron fotos por contraste de fases del área total del *scratch* a las 0, 24 y 48 h con un microscopio invertido Olympus IX-81. Para determinar efectos diferenciales sobre la proliferación o migración con el ensayo de *scratch*, se cuantificó el área libre de células a las 0, 24 y 48h, y además se contabilizó el número de células BrdU y Hoechst positivas en la zona del *scratch*, a las 48h de realizado el mismo. Para todos los cálculos y análisis estadísticos comparando control y tratado, se relativizó el área total de cada placa a las 24 y 48h, respecto del área de la misma placa a tiempo 0. La variación en el área inicial del *scratch*, debido a la manipulación del operador, no fue superior al 10%.

5.10 Técnicas de inmunofluorescencia

5.10.1 Reclutamiento antigénico para inmunohistoquímica

Previo a la inmunomarcación de Anexina V, se realizó el reclutamiento antigénico sugerido por el fabricante del anticuerpo. El mismo consistió en la incubación de cortes de cerebro en una solución de citrato de sodio 10 mM (pH=6, en PBS 10 mM) en microondas (potencia baja, 10 ciclos de encendido-apagado (30 s - 30s, cada ciclo), las células se dejaron reposar en la misma solución durante 20 min y se lavaron varias veces en PBS antes de continuar con el protocolo de inmunohistoquímica. Para la inmunomarcación de NeuN, ZO-1 y PDGFR α , también se realizó reclutamiento antigénico de las muestras. Los cortes se incubaron en una solución de citrato de sodio 10mM, (pH=6, en PBS 10mM) y se calentaron sobre tela de amianto hasta alcanzar una temperatura cercana a la de ebullición. Se dejaron enfriar durante 30 min y se lavaron varias veces con PBS antes de comenzar el protocolo estándar de inmunomarcado. Para la inmunohistoquímica de laminina, el reclutamiento antigénico consistió en la incubación de los cortes con proteinasa K (0.25 µg/ml) durante 4 min a 37°C, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Luego, los cortes se lavaron exhaustivamente con PBS y se continuó con el protocolo estándar.

TABLA 1. LISTA DE ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS

Inmunohistoquímica						
Antígeno	Tipo	Dilución	Huésped	Cél/estructura "blanco"	Fabricante	Código
S100β	Monoclonal	1:500	Ratón	Astrocito	SIGMA	S2532
S100	Policlonal	1:300	Conejo	Astrocito	SIGMA	S2644
GFAP	Monoclonal	1:500	Ratón	Astrocito	SIGMA	G3893
AQP4	Policlonal	1:75	Conejo	Astrocito	Millipore	AB3594
NG2	Monoclonal	1:300	Ratón	CPO/PreOL/ Pericito	Millipore	MAB5384
PDGFR-β	Policlonal	1:100	Conejo	Pericito	abcam	ab32570
PDGFR-α	Policlonal	1:100	Conejo	CPO/PreOL	abcam	ab61219
MAG S/L	Policlonal	1:250	Conejo	OL maduro	Invitrogen	34-6200
Anexina V	Monoclonal	1:300	Ratón	Cél. apoptóticas	abcam	Ab54775
Laminina 1+2	Policlonal	1:1000	Conejo	Memb. basal	abcam	ab7463
NeuN	Monoclonal	1:200	Ratón	Núcleo neuronal	Millipore	MAB3777
Inmunocitoquímica						
NG2	Mono	1:250	Ratón	CPO/Pre- OL/Pericito	Millipore	MAB5384
MAG S/L	Policlonal	1:250	Conejo	OL maduro	Invitrogen	34-6200
SMA	Monoclonal	1:100	Conejo	Pericito	SIGMA	A7607
PDGFR-β	Policlonal	1:100	Conejo	Pericito	abcam	ab32570
Caspasa 3 clivada	Policlonal	1:500	Conejo	Cél. apoptóticas	Cell Signaling	9661
iNOS	Policlonal	1:400	Conejo		BD Biosciences	N32030
Factor de von Willebrand	Policlonal	1:100	Conejo	Cél. Endotelial	abcam	ab6994

5.10.2 Inmunohistoquímica

Se analizaron cinco cortes de regiones equivalentes, que comprendían al estriado, para cada animal y marcador de inmunotinción. Se tomó en cuenta el aspecto, tamaño y posición de la comisura anterior, cuerpo caloso, ventrículos laterales y el estriado para comparar a un mismo nivel, los parámetros cualitativos y cuantitativos estudiados entre el grupo inyectado con vehículo y el inyectado con GA. Todos los ensayos de inmunohistoquímica se realizaron, por flotación, en cortes de vibrátomo de 50 μm. Luego del reclutamiento antigénico, los cortes fueron lavados y permeabilizados con Tritón X-100 (0.05-0.3% en PBS, 20 min, temperatura ambiente). Posteriormente, se incubaron con BSA 5% en PBS durante 1 h, para bloquear los sitios de unión inespecíficos, antes de proceder a la incubación del anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C

en Tritón X-100 (0.05-0.3% en PBS). La tabla 1 indica los anticuerpos específicos (anticuerpos primarios) empleados para el estudio de las distintas poblaciones celulares. Luego de la incubación con el anticuerpo primario, se lavaron los cortes con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes, durante 90 min a temperatura ambiente (la tabla 2 muestra los anticuerpos secundarios utilizados). Luego de finalizada la incubación con el anticuerpo secundario, se lavaron los cortes con PBS y se montaron con glicerol-PBS (1:1) conteniendo Hoechst 1 µg/ml. Los cortes montados se visualizaron en un microscopio confocal Olympus FLUOVIEW FV300, provisto de láseres que emiten luz a 405, 488, 546 y 633 nm. Se realizaron controles negativos, omitiendo los anticuerpos primarios o secundarios.

5.10.3 Inmunocitoquímica y visualización de la actina cortical en células

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

TABLA 2. LISTA DE ANTICUERPOS SECUNDARIOS EMPLEADOS

Anticuerpo	Fluoróforo	Dilución	Fabricante	Código
<i>Cabra anti-ratón IgG</i>	Alexa Fluor 488	1:500	Molecular Probes® Invitrogen	A-11001
	Alexa Fluor 546			A-11003
<i>Cabra anti-conejo IgG</i>	Alexa Fluor 488	1:500	Molecular Probes® Invitrogen	A-11094
	Alexa Fluor 546			A-11035

5.11 Análisis semi-cuantitativo de los niveles de ARN mensajero (ARNm) por PCR en tiempo real

5.11.1 Extracción de ARN

Se extrajo el ARN total de los cultivos de astrocitos, controles y tratados con GA (5 mM, 24h), utilizando TRIzol® Reagent (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones. Brevemente, las células se lavaron con PBS y se agregó 1000 µl de TRIzol, para cada placa de 60 mm con astrocitos confluentes. Se colectó el lisado y se pipeteó para homogenizar. Se

centrifugó (12000g, 10 min) para remover restos insolubles y el sobrenadante, conteniendo ARN y proteínas solubles, se transfirió a un nuevo tubo. Se adicionó 200 µl de cloroformo y se dejó reposar 10 min. Se centrifugó (12000g, 15 min) y se transfirió cuidadosamente únicamente la fase acuosa, que contenía ARN, a otro tubo. Se adicionó 500 µl de isopropanol y se dejó, precipitando, 20 min a temperatura ambiente. Se centrifugó (12000g, 10 min) y se lavó el pellet de ARN con 500 µl de etanol 80%. Finalmente, el pellet se dejó secar 10 min al aire y se resuspendió en 20 µl de agua tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC). Se dejó en hielo 20 min y luego 5 min a 65°C. En cada extracción, se realizó un control negativo, sin ARN, que acompañó todas las etapas hasta la amplificación por PCR en tiempo real.

5.11.2 Determinación de la concentración y de la integridad del ARN

Se cuantificó la cantidad de ARN extraído midiendo la absorbancia a 260 nm (1 unidad de absorbancia (UA) = 40 µg/ml de ARN) con el espectrofotómetro NanoDrop 1000. Además, se cuantificó la absorbancia a 280 nm y se determinó la relación A_{260}/A_{280} , descartando las muestras que tuvieran este valor menor a 1.8. Para comprobar la integridad del ARN extraído, se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1% (150 mV, 60 min), utilizando para la visualización de las bandas, 1 µl de GoodView™ (Beijing SBS Genetech Co., Ltd) para 25 ml de la solución de agarosa. GoodView™ es un agente intercalante, que al unirse al ADN o ARN, emite fluorescencia verde cuando es excitado a una longitud de onda adecuada. La visualización de las bandas se realizó bajo un transiluminador UV. En todos los casos, menos el control negativo, se observaron únicamente dos bandas fuertemente marcadas, correspondientes al ARN ribosomal 28s y 18s y un “smear” de fondo correspondiente al ARNm, lo cual indicaría que se preservó la integridad del ARN durante la extracción.

5.11.3 Síntesis de ADN copia (ADNc)

Una vez corroborada la integridad del ARN, se realizó la retrotranscripción a ADNc para su estudio por PCR en tiempo real. Se utilizaron como cebadores para la reacción *random primers*, que son oligonucleótidos de 6 bases (hexámeros) que se sintetizan al azar. Estas secuencias cortas de ADN, se unirán por complementariedad de bases con el ARN total extraído y así la retrotranscriptasa procederá a la síntesis de ADNc. Se utilizó la enzima RevertAid™ H Minus M-Mul V (Fermentas). Brevemente, se agregó a un tubo estéril 2 µg de ARN total, 0.2 µg de *random primers* y 11 µl de agua tratada con DEPC, se incubó durante 5 min a 70°C y luego se transfirió a hielo. Se agregaron 4 µl de buffer de reacción 5x, 2 µl de dNTPs (10 mM), 20 unidades de inhibidor de ribonucleasas y agua DEPC hasta alcanzar 19 µl de volumen final. Se incubó a 25°C durante 5 min y se agregaron 200 unidades de la retrotranscriptasa. Se incubó el mix de reacción 10 min a 25°C y 60 min a 42°C. Se detuvo la reacción, inactivando la retrotranscriptasa, 10 min a 70°C y luego se dejó a -4°C.

5.11.4 Cuantificación relativa por PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real es una variante de la PCR convencional utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación del ADN. Para marcar el producto amplificado y ser detectado por el equipo de PCR, pueden utilizarse sondas marcadas con fluorescencia o agentes intercalantes como SYBR Green. En este trabajo se utilizó SYBR Green I, una molécula que cuando se une al ADN doble hebra, es capaz de emitir fluorescencia verde si es excitada a una longitud de onda adecuada, y el equipo es capaz de detectar la fluorescencia emitida

(entre 470-510 nm), en la fase exponencial de la reacción de PCR. El aumento de fluorescencia será proporcional a la cantidad de ADN producido en cada ciclo de PCR (Nolan et al., 2006). La cuantificación relativa por PCR en tiempo real, compara entre las diferentes muestras, en este caso control y tratado con GA (5 mM), la expresión del gen de interés respecto de un gen constitutivo cuya expresión no varía en las condiciones del tratamiento (control endógeno). En este trabajo utilizamos como control endógeno el ARN ribosomal (ARNr) 18s.

5.11.4.1 Elección y diseño de los cebadores

Los cebadores fueron seleccionados de publicaciones científicas o creados a partir de las secuencias de ADNc para los genes de interés de la especie *Rattus norvegicus*, publicadas en GenBank. Para la elección de los cebadores se tomaron en cuenta una serie de requisitos: el amplicón debía abarcar más de un exón, el porcentaje GC debía ser mayor o igual a 50%, ausencia de cuatro o más Gs continuas, no poseer en los últimos cinco nucleótidos en el extremo 3' más de 2 Gs y/o Cs; poseer un temperatura de fusión (T_m , del inglés, *melting temperature*) lo más cercana posible a 58-60°C. Todos los cebadores fueron analizados exhaustivamente para corroborar especificidad, T_m y tamaño del amplicón, utilizando los siguientes recursos web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>; <http://exon.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>. Los cebadores fueron proporcionados por Integrated DNA Technologies, Inc. La secuencia, T_m y contenido GC para cada par de cebadores, se detalla en la Tabla 3.

TABLA 3. LISTA DE CEBADORES UTILIZADOS PARA PCR EN TIEMPO REAL

Cebador	Secuencia 5'- 3'	T_m (°C)	Contenido GC (%)	Fuente
A2 18s <i>for</i>	GAGTCAAATTAAGCCGAGG	54.1	50	Vargas et al., 2006
A2 18s <i>rev</i>	CCGCAGCTAGGAATAATGGA	54.4	50	Vargas et al., 2006
CNTF <i>for</i>	GGAAGATTCGTTCCAGACCTGAC	58.8	50	Ozog et al., 2002
CNTF <i>rev</i>	CCCATCAGCCTCATTTCAGGG	61.3	54.5	Ozog et al., 2002
LIF <i>for</i>	CAGTGCCAATGCCCTCTTTA	54	50	Yoshino et al., 2003
LIF <i>rev</i>	GCATGGAAAGGTGGGAAATC	55	50	Yoshino et al., 2003
BMP-4 <i>for</i>	TTCCGTAGTGCCATTCCGAG	55	59.8	creado
BMP-4 <i>rev</i>	ACGACCATCAGCATTCCGTT	50	60	creado

5.11.4.2 Amplificación por PCR en tiempo real

En este trabajo se utilizó SYBR® Green PCR Master Mix (QIAGEN) que contiene SYBR Green I, nucleótidos trifosfato, $MgCl_2$ y ADN polimerasa (AmpliAq Glod®). La PCR en tiempo real se realizó en un termociclador Rotor-Gene 6000 (Corbett Research) en volúmenes finales de reacción de 20 μ l. Para cada gen se realizó una curva estándar, a partir de una mezcla de iguales cantidades de ADNc de astrocitos controles y tratados con GA, con las siguientes diluciones: 1/10, 1/100 y 1/1000. Se optimizaron las condiciones de PCR (temperatura de hibridación y concentración) para cada par de cebadores, buscando obtener una buena eficiencia de reacción (E) ($R^2 \geq 0.98$, valor de E cercano a 1) y un único producto de amplificación (Fig. 5). En cada tubo de PCR, se agregó: 10 μ l SYBR® Green PCR Master Mix, 0,6 μ l de cada cebador (*forward* y *reverse*), 2 μ l de ADNc y 5,4 μ l de agua de PCR. En total fueron once tubos para el gen de interés y gen referencia para cada corrida de PCR; control y tratado con GA a una dilución 1/10 y las tres diluciones de la curva estándar (1/10, 1/100 y

1/1000), todo esto por duplicado, más un control negativo que acompañó todas las etapas desde la extracción de ARN.

El protocolo de amplificación constó de tres pasos, variando las temperaturas de hibridación para cada par de cebadores. Previo a los ciclos de amplificación, se realizó un primer paso de desnaturalización del ADN que se configuró a 95°C durante 10 min. Luego se realizaron 40 ciclos, cada uno con tres pasos: uno de desnaturalización del ADN, otro de hibridación de los cebadores con el ADN molde y otro de elongación o de síntesis de la cadena de ADN a partir de la secuencia del cebador. Estos tres pasos se configuraron de la siguiente manera: 95°C durante 10 seg, temperatura de hibridación para cada juego de cebadores, durante 20 seg y 72°C durante 20 seg. La temperatura de hibridación para CNTF, BMP-4 y ARNr 18s fue 54°C y para LIF fue 56°C. Una vez concluidos los 40 ciclos, el equipo fue programado para realizar curvas de desnaturalización (“melting”) partiendo de 65°C hasta 95°C, de esta forma, mide la fluorescencia relativa en función de la temperatura. En la Fig. 7 se muestra la tasa de cambio de la fluorescencia (dF/dt) en función de la temperatura, para los cuatro genes.

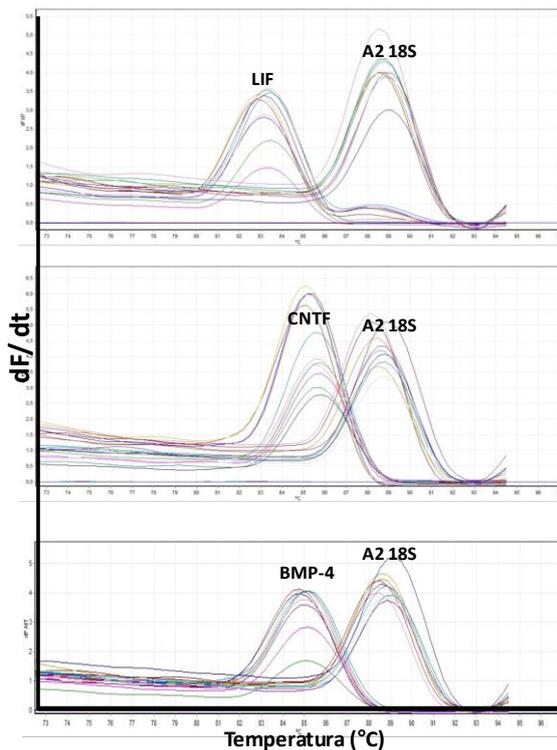
5.11.4.3 Especificidad del producto de PCR

Con las curvas de disociación se pudo identificar la presencia de un producto específico para cada juego de cebadores, con una temperatura de fusión característica (Fig. 7). La temperatura de fusión (T_m) se define como la temperatura a la cual el 50% de las moléculas de ADN doble hebra se desnaturalizaron y es característica de cada fragmento amplificado en función de su longitud y composición de bases. En algunos casos, con el producto de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa 3% (150 mV, 60 min) teñido con GoodView™ y se corroboró el tamaño del producto amplificado, utilizando como referencia un marcador de peso molecular (Hyperladder™, BIOLINE).

5.11.4.4 Método de cuantificación

Para calcular la concentración relativa del gen de interés respecto del gen de referencia para las muestras controles y tratadas con GA, se aplicó el método de la curva estándar (Applied Biosystems, 1997). Este método requiere de una curva estándar, con diluciones seriadas de ADNc para el gen de interés y el gen de referencia. Para ello, se calcula el ciclo umbral (CT) para cada dilución del estándar, se grafica este valor en función de la concentración conocida y se aplica una regresión lineal. Se interpolan los valores de CT con la recta y se obtienen los valores de concentración para cada muestra problema del gen de interés y gen de referencia. Finalmente, se normalizan los valores del gen de interés con los del gen de referencia para las muestras controles y tratadas. El análisis de datos, curvas de disociación, curvas estándar, cálculos de eficiencias de amplificación y la cuantificación relativa de los niveles de ARNm con el método de la curva estándar fue realizado por el *software* Rotor-Gene 6000 series 1.7.

A) Curvas de desnaturalización (“melting”)



B) Eficiencias de reacción

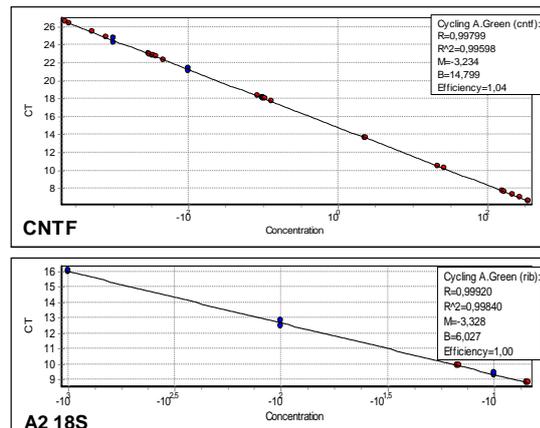


Figura 7. (A) Curvas de desnaturalización (dF/dt vs Temperatura) para LIF, CNTF, BMP-4 y A2 18s. Se observa un solo pico específico de cada producto amplificado por el par de cebadores correspondiente. (B) Cálculo de la eficiencia de reacción para CNTF y A2 18s. A partir de las gráficas de ciclo umbral (CT) vs concentración construidas con las tres diluciones del estándar, se obtuvo la mejor pendiente con un $R^2 \geq 0.98$. La eficiencia de reacción se calculó según esta ecuación: $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$. Para CNTF, $E = 1.04$ y para A2 18S, $E = 1.00$.

5.12 Análisis de la expresión de proteínas por Western blotting

La técnica consiste fundamentalmente en dos pasos consecutivos, uno de separación de proteínas mediante una electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida y el otro de transferencia (“blotting”) de las proteínas del gel a una membrana para su posterior incubación con los anticuerpos específicos. En el Anexo I se adjunta la composición de los geles y de los buffers de lisis, de corrida y de transferencia empleados.

5.12.1 Obtención de muestras enriquecidas en proteínas

5.12.1.1 Extracción de proteínas de cultivos celulares

Placas de Petri de 35mm conteniendo oligodendrocitos en todas las condiciones experimentales se lavaron dos veces con PBS 10 mM, pH 7.4 y luego se rastrillaron (“scraping”) con 80 μ l de buffer de lisis para obtener una suspensión celular. Se trabajó sobre hielo para evitar la degradación de las proteínas debido a la acción de proteasas. Posteriormente, las muestras fueron sonicadas (4-5 pulsos de 3 segundos cada uno) para romper las membranas y liberar el contenido celular. Las muestras sonicadas se mantuvieron en hielo hasta su posterior cuantificación y desnaturalización.

5.12.1.2 Extracción de proteínas de tejidos

Ratas inyectadas con GA (2.5 μ mol/g) o PBS en P0, fueron anestesiadas con ketamina: xilacina (90:10 mg/kg) y sacrificadas por dislocación cervical. Se extrajo el cerebro y se disecó el estriado, sobre hielo. Se pesó el tejido y se colocó en un tubo con buffer de lisis de tejido. Las muestras fueron sonicadas (5-6 pulsos de 3 segundos cada uno) y centrifugadas (12000g, 10 min a 4°C). Se retiró el sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo, para luego proceder a la cuantificación.

5.12.2 Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se empleó el método del ácido bicinonínico (BCA, del inglés, *Bicinchoninic acid*). El fundamento de esta técnica se basa en la formación de un complejo Cu^{2+} -proteína, en condiciones alcalinas, con la consiguiente reducción del ión Cu^{2+} a Cu^+ (reacción de Biuret). El ión Cu^+ reacciona con el BCA formando un complejo púrpura intenso que presenta una absorbancia máxima a 562 nm. Brevemente, se prepararon seis diluciones desde 0.25 mg/ml hasta 2 mg/ml de una solución 10 mg/ml de BSA para realizar una curva de calibración con muestras de concentración conocida. Se colocó el mismo volumen final de todas las muestras, por duplicado o triplicado, más dos muestras “blanco” (buffer de lisis) en una placa de 96 pocillos. Se agregó una solución de BCA: sulfato cúprico (50:1, Novagen) manteniendo una relación 8:1 respecto del volumen de las muestras. La placa se protegió de la luz, se colocó en estufa a 37°C durante 30 min y luego se midió la absorbancia a 562 nm en un lector de microplacas (Varioskan® Flash, Thermo Scientific). Se graficaron los datos de la absorbancia en función de las concentraciones conocidas del estándar de BSA, se ajustaron los puntos a una recta y se determinó el coeficiente de regresión, estimándose una aceptabilidad mínima con un $R^2 \geq 0.98$. Esa recta fue la utilizada para calcular las concentraciones de proteína en las muestras problema

5.12.3 Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida

La electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida conocida como SDS-PAGE (del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) permite la separación de proteínas en función del peso molecular. Para ello, es esencial el paso de desnaturalización de las proteínas por acción de detergentes, agentes reductores, agentes caotrópicos y calor. El dodecil sulfato de sodio (SDS) es un detergente aniónico que desnaturaliza y se une a las proteínas de forma estequiométrica. Los complejos SDS-proteína están cargados negativamente de forma uniforme (valor carga/masa constante) y adoptan una forma única desplegada. Por lo tanto, en un campo eléctrico los complejos SDS-proteínas van a moverse desde el cátodo hacia el ánodo (polo positivo) a una velocidad relacionada con su peso molecular.

5.12.3.1 Desnaturalización de las muestras

A las muestras enriquecidas en proteínas ya cuantificadas, se agregó buffer de carga 5x (15% SDS, 0,3 M Tris (pH 6,8), 25 % glicerol, 1,5 M b-mercaptoetanol, 0,01 % azul de bromofenol), de forma que la concentración final del buffer fuera 1X. Las muestras se dejaron 5 min a 95°C en termobloque y se guardaron a -20°C hasta su sembrado en el gel.

5.12.3.2 Preparación de los geles

La electroforesis se realizó en un sistema de gel discontinuo, utilizando un gel concentrador (“*stacking gel*”) y un gel separador (“*resolving gel*”). El gel concentrador contiene 4% de acrilamida y un pH ligeramente ácido. En este gel las proteínas se concentran en una zona muy reducida entre los iones cloruro del gel y los iones glicina presentes en el buffer de corrida, permitiendo que todas las proteínas ingresen al gel separador en el mismo momento. El gel separador presenta un tamaño de poro adecuado para la separación de las proteínas en función de su peso molecular. Teniendo en cuenta el peso molecular de las proteínas que se analizaron, PDGFR- α (180 KDa), PDGFR- β (124KDa), ocludina (59 KDa) y β -actina (42 KDa), se preparó un gel separador con 10% de acrilamida. Se adjunta en Anexo I, la composición de los geles.

5.12.3.3 Corrida electroforética

Los geles se colocaron en un soporte dentro de la cuba de electroforesis (Bio-Rad) y se añadió buffer de corrida. Se sembraron en los pocillos del gel, con una jeringa Hamilton, el volumen correspondiente a 30 µg de proteína de cada muestra y 5 µl del marcador de peso preteñido (SM0441, Fermentas). La corrida se realizó a 40 mA y voltaje libre durante 3h 30 min aproximadamente o hasta que el frente de corrida alcanzara el borde inferior del gel. Una vez finalizada la corrida, se desarmó el soporte, se desprendió el gel y se procedió a armar el “sándwich” para la transferencia.

5.12.3.4 Electrotransferencia de las proteínas a una membrana

Las proteínas fueron transferidas desde el gel a la membrana electroforéticamente. Se armó un “sándwich” apilando sucesivamente sobre una esponja plana, papel de filtro empapado en buffer de transferencia, el gel, la membrana en contacto directo con el gel, más papel de filtro y finalmente una esponja plana que se recogió entre dos tapas de plástico perforado y se introdujo en una cuba con buffer de transferencia y dos electrodos planos. Se dispuso de forma que el gel quedara hacia el cátodo y la membrana hacia el ánodo. Dado que los complejos SDS-proteínas tienen carga neta negativa se espera que se desplacen hacia el ánodo y se unan por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas a la membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF, Thermo Scientific) cargada positivamente. Como el proceso provoca un fuerte calentamiento de la solución, se agregó un refrigerante congelado en la cuba y se hizo recircular el buffer por agitación. La transferencia se realizó a 300 mA y voltaje libre; el tiempo estimado fue de 1h 15 min. La eficacia de la transferencia se comprobó incubando la membrana de PVDF durante 4 min en Rojo Ponceau 0.2% (preparado en 3% de ácido tricloroacético). Este colorante se unió de forma inespecífica a todas las proteínas presentes y se eliminó lavando la membrana con TBS-Tween 0.1% hasta su completa desaparición.

5.12.3.5 Bloqueo e incubación con anticuerpos

Para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos con proteínas adheridas a la membrana de PVDF, ésta se incubó con 5% de leche en polvo en TBS-Tween 0.1% durante 1h a temperatura ambiente. Luego se incubó con los anticuerpos primarios, anti-PDGFR α (1:1000, abcam), anti-occludina (1:1000, abcam) y anti- β actina (1:4000, SIGMA) en solución de bloqueo toda la noche a 4°C. Luego, se lavó con TBS-Tween 0.1% y se incubó con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados a la enzima peroxidasa de rábano (HRP): anti-IgG conejo-HRP (1:4000, Millipore) y anti-IgG ratón-HRP (1:4000, Millipore), durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se repitieron los lavados con TBS-Tween 0.1% y se continuó con el revelado.

5.12.3.6 Revelado con quimioluminiscencia enzimática

El revelado por quimioluminiscencia se basa en la oxidación de un sustrato luminiscente en presencia de peróxido de hidrógeno y de la enzima HRP (del inglés, *Horseradish Peroxidase*). En este caso, HRP conjugada al anticuerpo secundario, cataliza la oxidación del luminol (reactivo ECL de detección 2), en presencia de peróxido de hidrógeno (reactivo ECL de detección 1). El luminol, al oxidarse, pasa a un estado excitado y luego retorna a su estado basal, emitiendo luz. Brevemente, se incubó la membrana con una mezcla de los reactivos 1 y 2 de ECL (del inglés, *Enhanced ChemiLuminescence*) (Pierce ECL, Thermo Scientific) durante 2-3 min. Se envolvió en papel film, se

expuso sobre una placa autorradiográfica (AGFA) en oscuridad y se reveló con soluciones reveladoras y fijadoras comerciales (Química Cenit, S.A.).

5.13 Análisis de imágenes

El procesamiento de todas las imágenes de microscopía y de *Western blotting*, la cuantificación de las áreas, número de células e intensidades de fluorescencia, se realizó con el programa Image J (NIH, USA). El análisis morfológico de oligodendrocitos en cultivo, se realizó cuantificando número de ramificaciones primarias y secundarias (de primer y segundo orden) manualmente.

5.14 Análisis Estadístico

Todos los resultados que se muestran han sido obtenidos por la realización de 2-5 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con el test *t* de Student utilizando el programa Sigma Stat 2.0 o GraphPad Prism® 3.0. Las diferencias entre grupos con valores de $p < 0.05$ fueron consideradas significativas desde un punto de vista estadístico. Los valores representados en las gráficas corresponden a la media \pm SEM (error estándar de la media).

6. RESULTADOS

6.1 Resultados I: Estudio de la BHE en un modelo de inyección perinatal de GA en ratas. Efectos sobre pericitos y astrocitos.

6.1.1 Aumento de la extravasación de EB en animales inyectados con GA

Animales inyectados con GA (2.5 $\mu\text{mol/g}$) o PBS, fueron fijados por perfusión con una solución de EB 1% en PAF 4%. En la Fig. 8A se muestra la vista dorsal de los cerebros aún cubiertos por las meninges e imágenes representativas de cortes coronales de cerebros con EB, en los que se observan vasos sanguíneos de color azul y regiones del parénquima cerebral del mismo color. En todas las edades y tratamientos, se observó EB a nivel de los plexos coroideos y órganos circumventriculares en los cuales no hay una BHE funcional. Los animales inyectados con GA a los 14 y 30 DPI, presentaron una mayor extravasación de EB a nivel del parénquima, con respecto a sus controles (Fig. 8B, C). Esto se evidenció cuantificando la fluorescencia roja (Ex: 633 nm, Em: 660-680 nm) de imágenes tomadas en las mismas condiciones de adquisición (misma intensidad del láser y nivel de fotomultiplicador) de cortes que abarcaron toda la región del estriado y parte de la corteza parietal. Se evidenció un aumento significativo ($p < 0.05$) de la fluorescencia roja en el estriado a los 14 y 30 DPI (Fig. 8D). Por otro lado, a los 14 DPI, aún en los controles, se observaron algunas regiones de corteza y de estriado con extravasación de EB a nivel del parénquima, esto podría deberse a que la BHE a esa edad aún no es completamente funcional (Fig. 8B). El análisis de los cortes, con microscopia de fluorescencia, a mayor aumento, permitió observar algunos vasos con fluorescencia roja, teñidos con EB (Fig. 9A), posiblemente debido a la unión del colorante con la albúmina u otras proteínas retenidas en la membrana basal o por la interacción con otras proteínas de membrana de las células endoteliales (del Valle et al., 2008). Con este grado de magnificación se evidencia mejor la extravasación del colorante en el parénquima, especialmente a 30 DPI.

6.1.2 Análisis de la expresión de ocludina

Como forma de evaluar componentes de la BHE, en particular, de las uniones estrechas, se analizó la expresión de ocludina por *Western blotting*, en muestras de estriado de animales a los 14 y 30 DPI (Fig. 9B). Se observó una disminución de ocludina exclusivamente a los 14 DPI, en animales inyectados con GA. La correlación de la expresión de ocludina con la expresión de β -actina, indicó que hubo una disminución de hasta 25% en animales inyectados con GA, respecto de animales controles (Fig. 9B). A los 30 DPI, no hubo cambios en los niveles de ocludina.

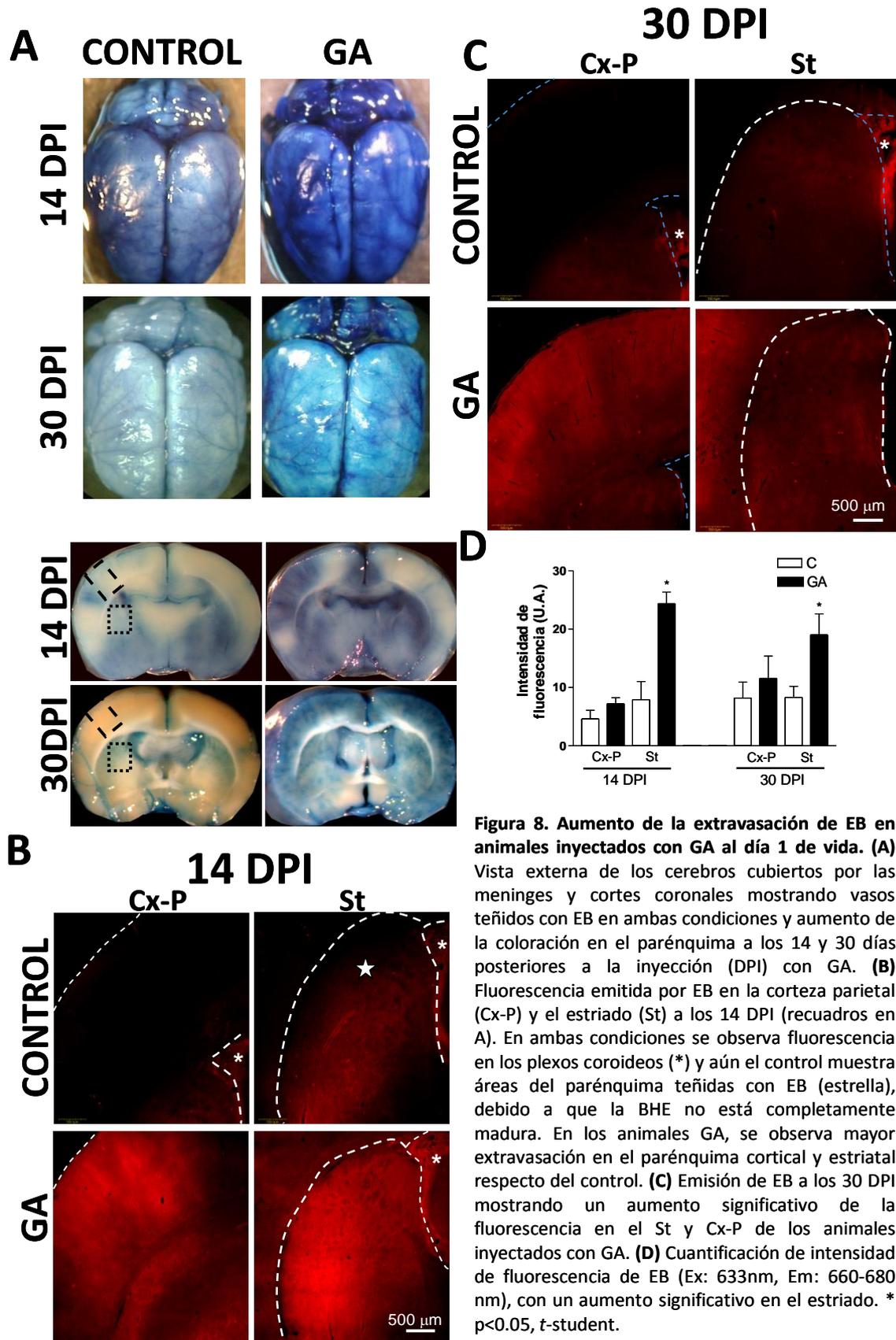


Figura 8. Aumento de la extravasación de EB en animales inyectados con GA al día 1 de vida. (A) Vista externa de los cerebros cubiertos por las meninges y cortes coronales mostrando vasos teñidos con EB en ambas condiciones y aumento de la coloración en el parénquima a los 14 y 30 días posteriores a la inyección (DPI) con GA. **(B)** Fluorescencia emitida por EB en la corteza parietal (Cx-P) y el estriado (St) a los 14 DPI (recuadros en A). En ambas condiciones se observa fluorescencia en los plexos coroideos (*) y aún el control muestra áreas del parénquima teñidas con EB (estrella), debido a que la BHE no está completamente madura. En los animales GA, se observa mayor extravasación en el parénquima cortical y estriatal respecto del control. **(C)** Emisión de EB a los 30 DPI mostrando un aumento significativo de la fluorescencia en el St y Cx-P de los animales inyectados con GA. **(D)** Cuantificación de intensidad de fluorescencia de EB (Ex: 633nm, Em: 660-680 nm), con un aumento significativo en el estriado. * $p < 0.05$, *t*-student.

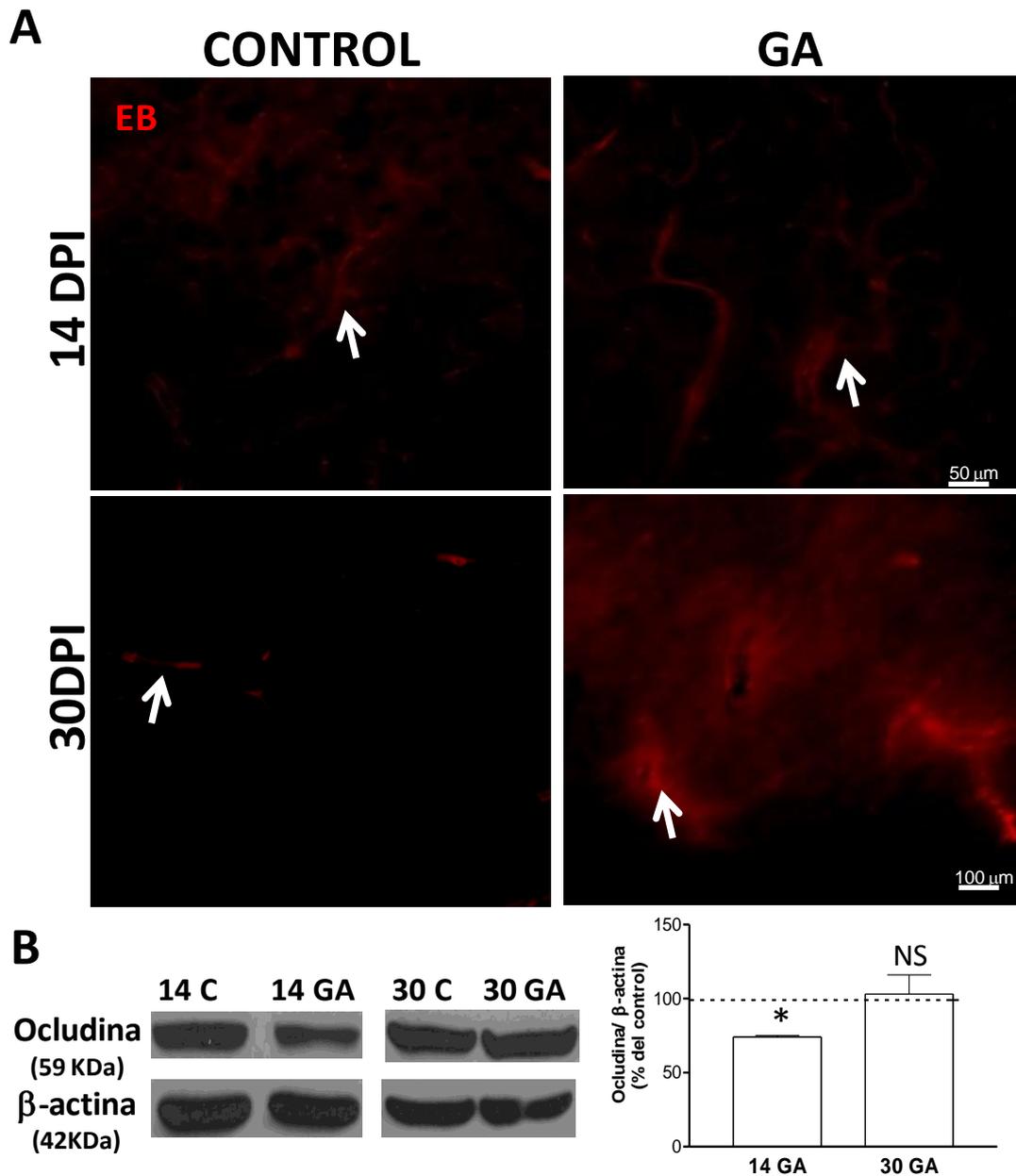


Figura 9. Tinción de vasos con EB y análisis de la expresión de ocludina en animales inyectados con GA. (A) Fluorescencia de EB en vasos sanguíneos del estriado y aumento de tinción en el parénquima (flechas blancas) de los animales inyectados con GA a 14 y 30 DPI. **(B)** *Western blotting* de ocludina en muestras de estriado a 14 y 30 DPI. La cuantificación respecto de la expresión del control de carga (β -actina) muestra una reducción en la expresión de ocludina solamente a los 14 DPI. NS: estadísticamente no significativo, * $p < 0.05$, t-Student.

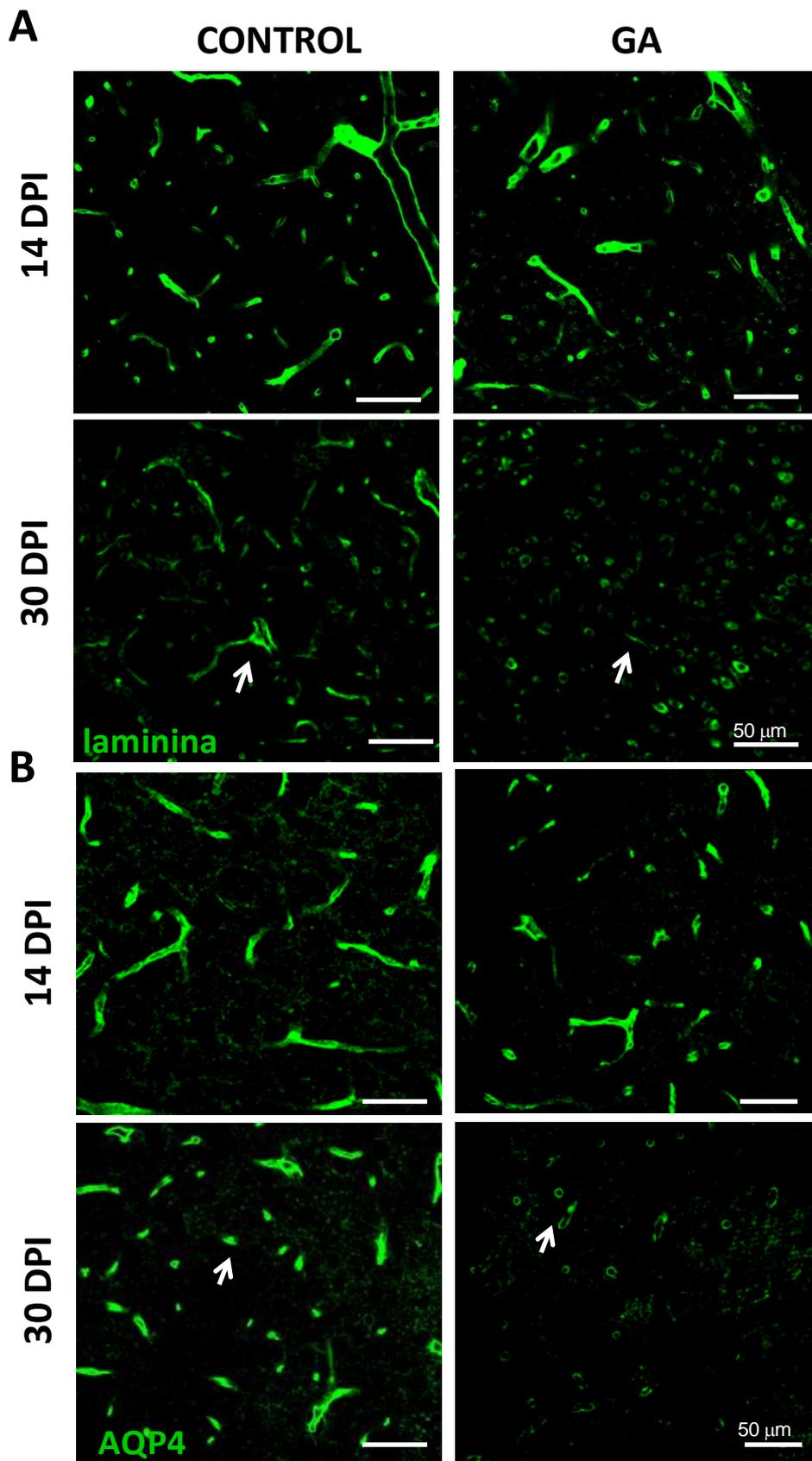
6.1.3 Cambios inmunohistoquímicos en células perivasculares y membrana basal en animales inyectados con GA

Para visualizar la membrana basal y las células perivasculares (pericitos y astrocito), se realizó inmunohistoquímica para laminina, AQP4 y PDGFR β , en el estriado de animales inyectados con GA o PBS (controles), a los 14 y 30 DPI (Fig. 10). Se evidenció una disminución de la inmunomarcación de laminina a nivel de los vasos sanguíneos del estriado, que es más evidente a los 30 DPI en animales inyectados con GA (Fig. 10A). También hubo marcaje intracitoplasmático de laminina en células no asociadas a la vasculatura, en ambas condiciones de tratamiento a los 14 y 30 DPI, siendo más evidente en los animales inyectados con GA. La inmunorreactividad de AQP4, canales permeables a moléculas de agua concentrados en podocitos astrocitarios, permitió delinear los perfiles de los vasos sanguíneos estriatales en forma selectiva (Fig. 10B) y evidenciar una disminución de la inmunotinción fundamentalmente en animales inyectados con GA a los 30 DPI. La inmunotinción remanente observada en animales GA a 30 DPI, parece concentrarse en las secciones transversales de los vasos que se muestran rodeados por un delgado borde AQP4 positivo. (Fig. 10B). En cuanto a la inmunoreactividad para PDGFR β , en el control a los 30 DPI, se observó un marcado de células con cuerpo redondo, pequeño y escasos procesos celulares lisos y una tinción que delinea vasos sanguíneos teñidos con EB (Fig. 10C). Esta imagen muestra claramente como la tinción de EB se restringe exclusivamente al vaso sanguíneo, indicando que en condiciones control, la BHE preserva su integridad. A los 30 DPI en la condición GA, parece disminuir el número de células PDGFR β + y la inmunomarcación perivascular en algunos vasos del estriado (Fig. 10C).

El conjunto de estos resultados sugiere que el modelo empleado ocasiona un aumento de la permeabilidad de la BHE que se evidencia con la extravasación de EB en el parénquima y que además, podría estar relacionado con una reducción de la laminina presente en la membrana basal, una disminución de AQP4 en los podocitos astrocitarios y una reducción de pericitos en algunos vasos del estriado, en animales inyectados con GA.

6.1.4 Vulnerabilidad de la población neuronal en el modelo de inyección neonatal de GA

Las células intensamente teñidas con EB, co-localizaron en la mayoría de los casos con el marcador pan-neuronal NeuN, indicando que estas neuronas presentan alteraciones de membrana suficientes como para permitir el flujo de colorante (Fig. 11A). Además, algunas de estas células co-localizaron con el marcador de membrana plasmática de células apoptóticas (Anexina V) (Fig 11B). El número de células apoptóticas en el estriado que presentaron morfología y tamaño de neuronas, contabilizadas en campos a 10x para cubrir toda la superficie del estriado, fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en animales inyectados con GA, a los 30 DPI (Fig. 11C). Estos resultados sugieren que la población neuronal es la más vulnerable en este modelo, ya que aumentaría la apoptosis neuronal en el estriado de animales de cuatro semanas, expuesto tempranamente a GA. Estos datos refuerzan nuestra hipótesis sobre una alteración neuronal retardada producida en forma posterior o concomitantemente con otras alteraciones como la observada hasta el momento en la BHE.



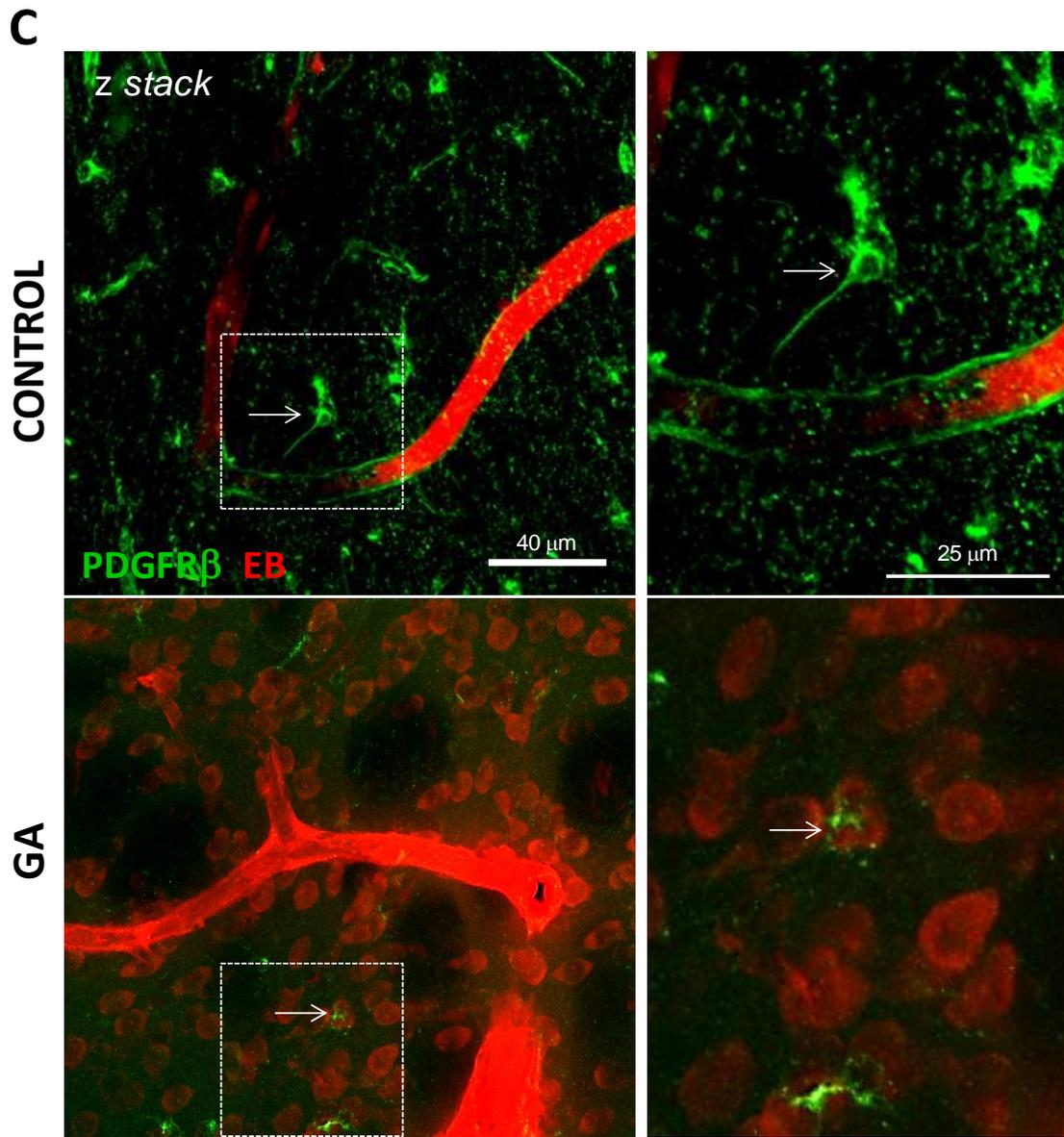


Figura 10. Alteraciones de la membrana basal y de células perivasculares en animales inyectados con GA. (A) Disminución de la inmunomarcación de laminina en vasos sanguíneos del estriado principalmente a los 30 DPI en animales GA (flechas blancas). Notar la inmunorreactividad intraneuronal para laminina en ambas edades (B) Disminución de la inmunorreactividad de AQP4, evidente en animales inyectados con GA a los 30 DPI (flechas blancas). (C) Inmunotinción para PDGFR β evidenciando reducción del número de células y del marcado perivascular en algunos vasos del estriado en animales inyectados con GA a los 30 DPI. Las células PDGFR β + presentan un cuerpo celular pequeño con escasas prolongaciones lisas asociadas a vasos sanguíneos. En animales GA, se observa un aumento de células EB positivas y células PDGFR β + pequeñas y cuyos procesos no están asociados a los vasos sanguíneos teñidos con EB. Las imágenes a la derecha de C son aumentos de las regiones indicadas y muestran pericitos en el animal control e inyectado con GA (flechas blancas).

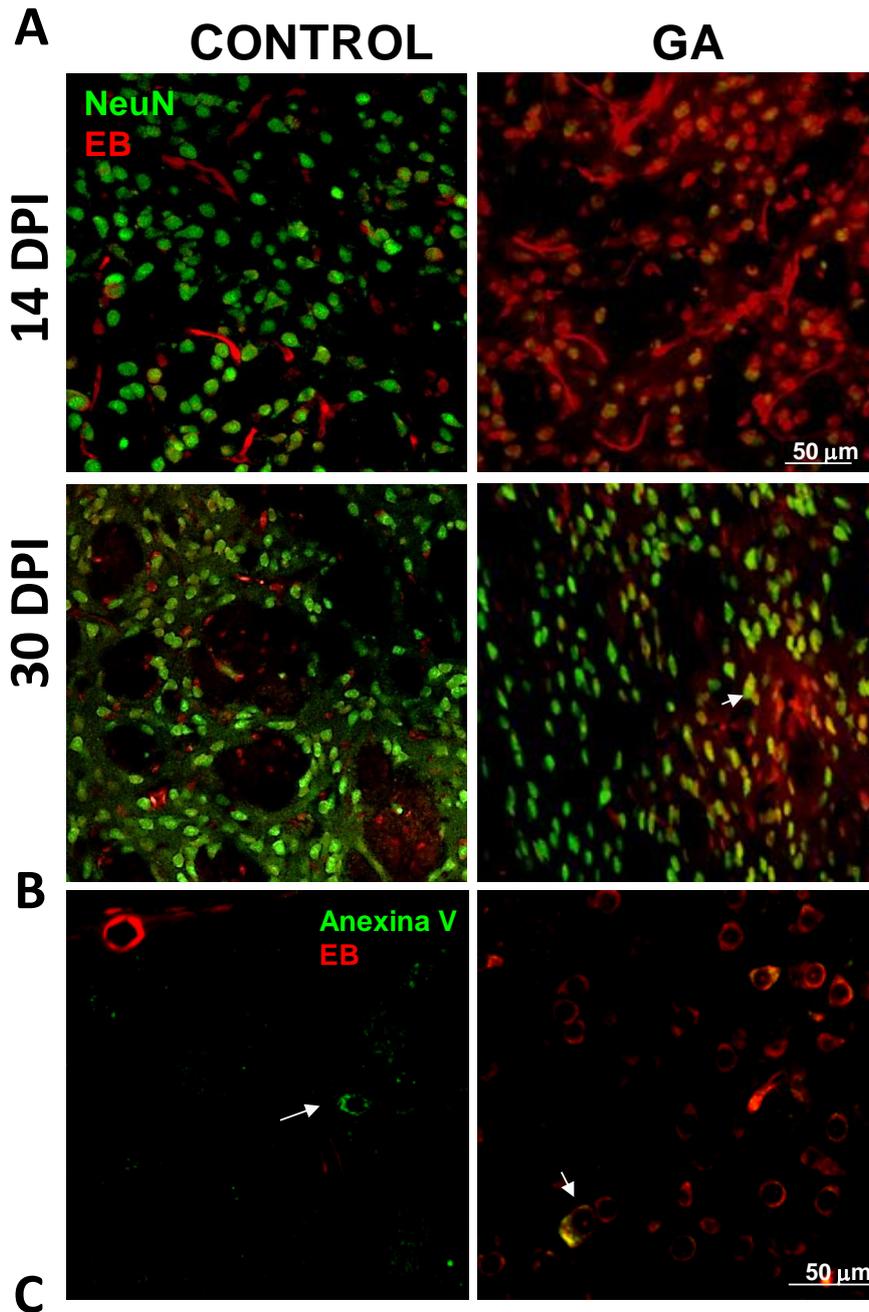


Figura 11. Vulnerabilidad de la población neuronal estriatal. (A) Imágenes representativas del estriado, mostrando la co-localización del marcador neuronal NeuN y EB (flechas blancas) en animales inyectados con GA. (B) Inmunomarcación de Anexina V (verde) y co-localización con EB (flechas blancas) en el estriado de animales GA a los 30 DPI. (C) Cuantificación de las células estriatales Anexina V+ (AV+), evidenciando aumento significativo para animales GA a los 30 DPI. NS: estadísticamente no significativo, * $p < 0.05$, *t*-student.

6.1.5 Caracterización de los cultivos primarios de pericitos aislados de la microvasculatura cerebral

Se obtuvo un cultivo enriquecido en pericitos a partir de fragmentos aislados de microvasos de cerebro de ratas de 2-3 semanas de vida (ver sección 4.6.3). Se caracterizó el cultivo de pericitos, de un segundo pasaje, mediante la expresión de marcadores prototípicos (NG2, α SMA y PDGFR β) por inmunocitoquímica (Fig. 12A). Los pericitos presentaron una morfología aplanada, elongada y polimórfica, dispuestos en estrecho contacto unos con otros y cubriendo toda la superficie, en diferentes capas, según se evidencia en las imágenes de inmunofluorescencia (Fig. 12A). El cultivo fue positivo para los tres marcadores analizados, los que evidenciaron un alto grado de homogeneidad celular y escasa presencia de otros tipos celulares como células endoteliales (1%vWF+) o astrocitos (<4% GFAP+). Cuando el cultivo de pericitos se trató con forskolina (FSK, 10 μ M, 2h), se observó un cambio dramático en su morfología, adoptando una forma estrellada con prolongaciones claramente visibles evidenciadas por inmunocitoquímica para PDGFR β y α SMA (Fig. 12B). El efecto de la FSK sobre los pericitos, evidencia una respuesta de esta célula a nivel de su citoarquitectura, frente al aumento del AMPc intracelular, como ha sido reportado en Kelley et al. (1998).

6.1.6 Ausencia de efectos directos de GA sobre pericitos en cultivo

Los cultivos de pericitos de un segundo pasaje, fueron tratados con GA (5mM) o PBS durante 24h. Frente al tratamiento con GA, los pericitos no mostraron cambios en su morfología ni en la disposición de los filamentos de actina evidenciados con faloidina fluorescente (Fig. 13A), Tampoco hubo cambios en la inmunorreactividad para marcadores prototípicos como α SMA (Fig. 13A). Además, a los pericitos confluentes de un segundo pasaje, se les realizó un *scratch* con punta de pipeta estéril y se adicionó GA (5mM) o PBS. No se observaron cambios significativos en el área libre de células cuantificada a las 0, 24 y 48h luego del *scratch* (Fig. 13B). Tampoco hubo cambios significativos en la tasa de proliferación (% BrdU+/Hoecht+) de los pericitos tratados con BrdU a tiempo 0 y fijados 48h luego del *scratch* (Fig. 13B). Por lo tanto, aún a altas concentraciones, no habrían efectos directos de GA sobre la morfología, proliferación y migración de pericitos.

6.1.7. El medio condicionado de astrocitos tratados con GA retrasa el cierre del *scratch* en cultivos de pericitos

Para analizar la posible influencia de astrocitos disfuncionales en el comportamiento de los pericitos en cultivo, se trataron cultivos primarios de astrocitos con 5 mM de GA o PBS (controles) y se obtuvieron los medios condicionados (MC) correspondientes que luego fueron centrifugados para descartar células en suspensión. Se realizó un *scratch* manual en los cultivos de pericitos de segundo pasaje y se trataron con MC de astrocitos controles (MC-C) o de astrocitos tratados 24h con GA (5mM) (MC-GA). Se cuantificaron las áreas libres de células a las 0, 24 y 48h luego del *scratch*. Los pericitos tratados con MC-GA, respecto de pericitos del mismo cultivo tratados con la misma dilución de MC-C, retrasaron el cierre del *scratch* (Fig. 14A). Esta diferencia fue significativa ($p < 0.05$) cuando se midió el área libre de células a las 48 h luego de realizado el mismo (Fig. 14B). Por otro lado, el MC-GA no modificó la tasa de proliferación (%BrdU+/Hoecht+) de los pericitos cuando fue cuantificada 48h luego del *scratch*, respecto del MC-C (Fig. 14C,D). Esto sugiere que el efecto del MC-GA observado en el ensayo de *scratch*, podría deberse a una inhibición de la migración de los pericitos y no a una inhibición de su proliferación. Por lo tanto, es posible que algún o algunos factores solubles que no hemos identificado aún, sean liberados por los astrocitos, luego

del tratamiento con GA, y que estos factores inhiban parcialmente la migración de los pericitos. Por otra parte, si se compara el comportamiento proliferativo de los pericitos tratados con PBS y 5 mM GA (C y GA, Fig. 13) con el de los expuestos a medios condicionados (MC-C y MC-GA, Fig. 14), la tasa de proliferación es similar (~50%), por lo que podríamos descartar un efecto de los astrocitos en este parámetro. Sin embargo, si se comparan los ensayos de *scratch* de los pericitos C y GA (Fig. 13) con los expuestos a medios condicionados (MC-C y MC-GA) (Fig. 14), hay un aumento en el área libre de células a las 24 y 48h en los pericitos tratados con MC, lo cual sugiere que el MC, aún de astrocitos controles, podría retardar la migración de los pericitos.

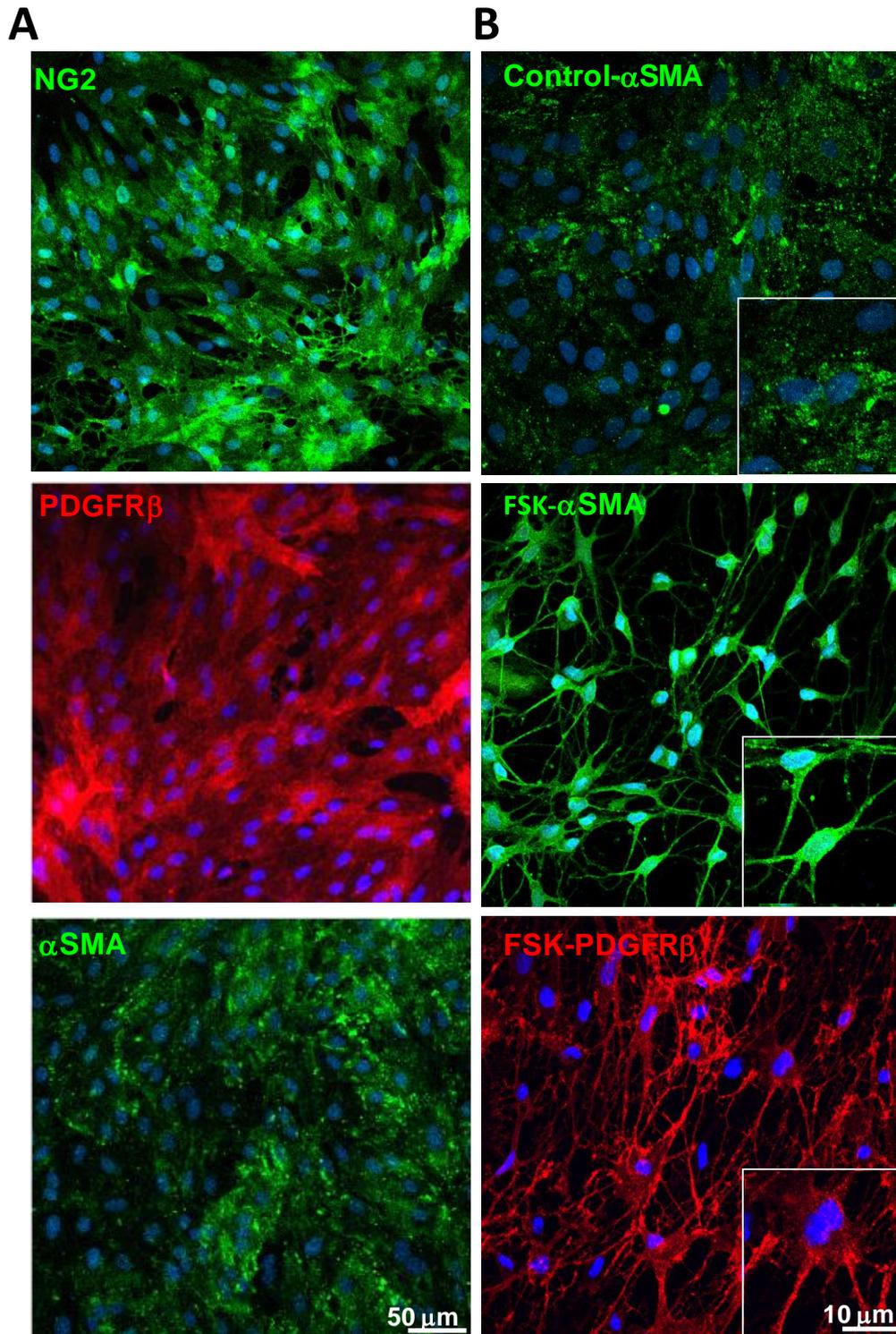


Figura 12. Caracterización de los cultivos de pericitos aislados de la microvasculatura cerebral. (A) Inmunotinción positiva para los marcadores prototípicos NG2, PDGFR β y α SMA en un altísimo porcentaje de células polimórficas, aplanadas y elongadas que se disponen en estrecha aposición hasta alcanzar confluencia. **(B)** Inmunofluorescencias para α SMA y PDGFR β en pericitos expuestos a forskolina (FSK, 10 μ M) o DMSO (control) durante 2h. Como era esperable, frente a FSK, las células adoptaron una morfología estrellada con retracción del soma y aparición de procesos celulares.

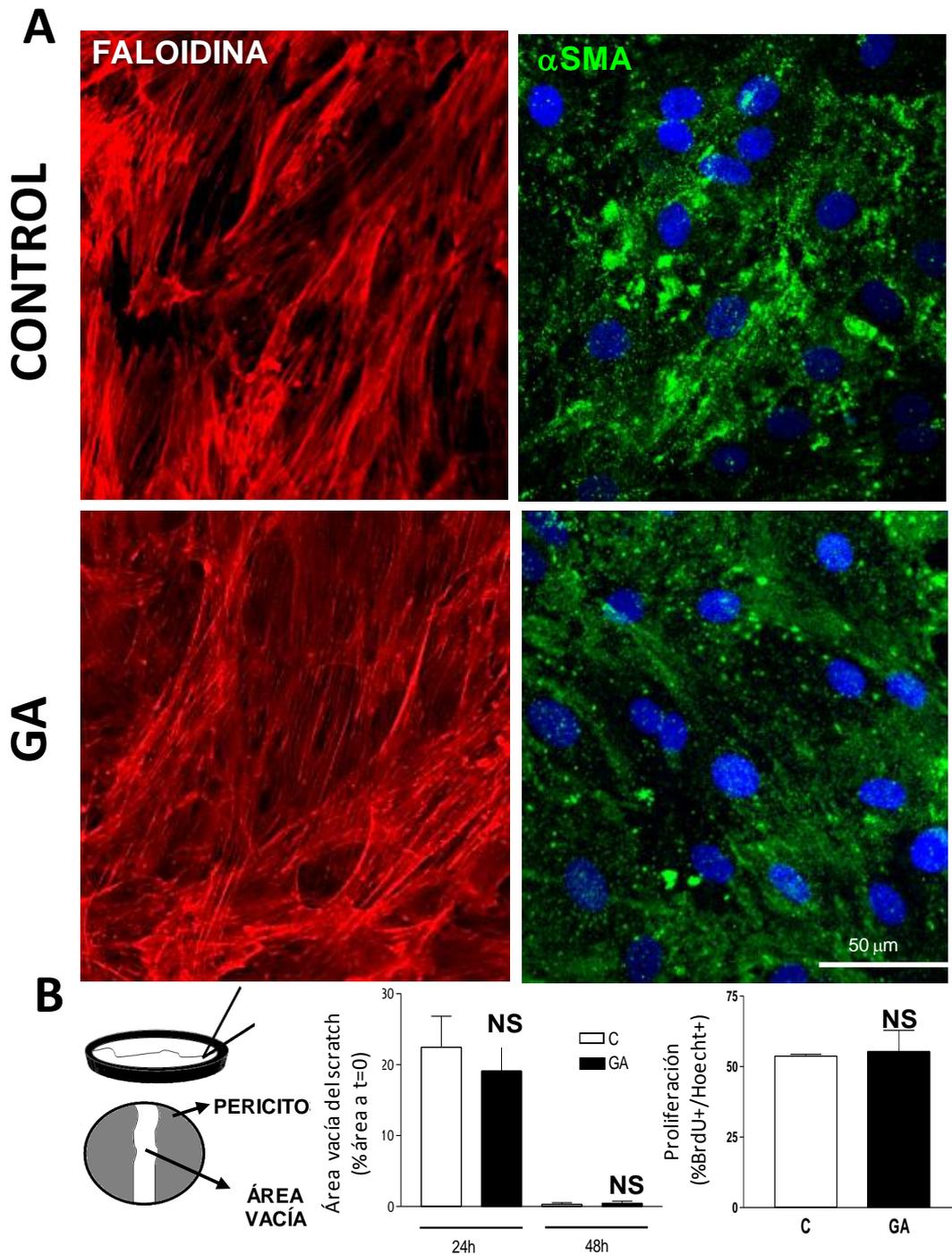
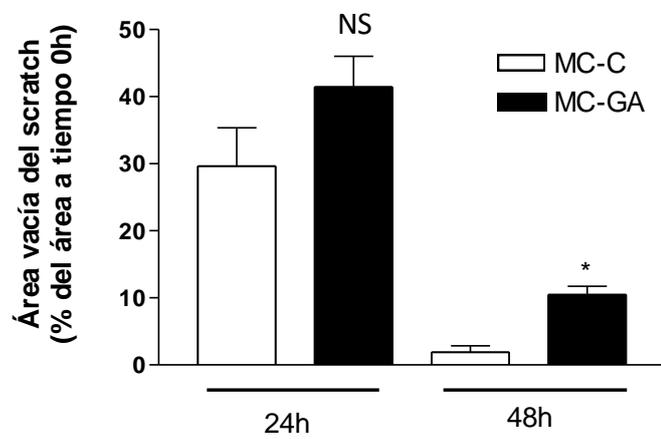
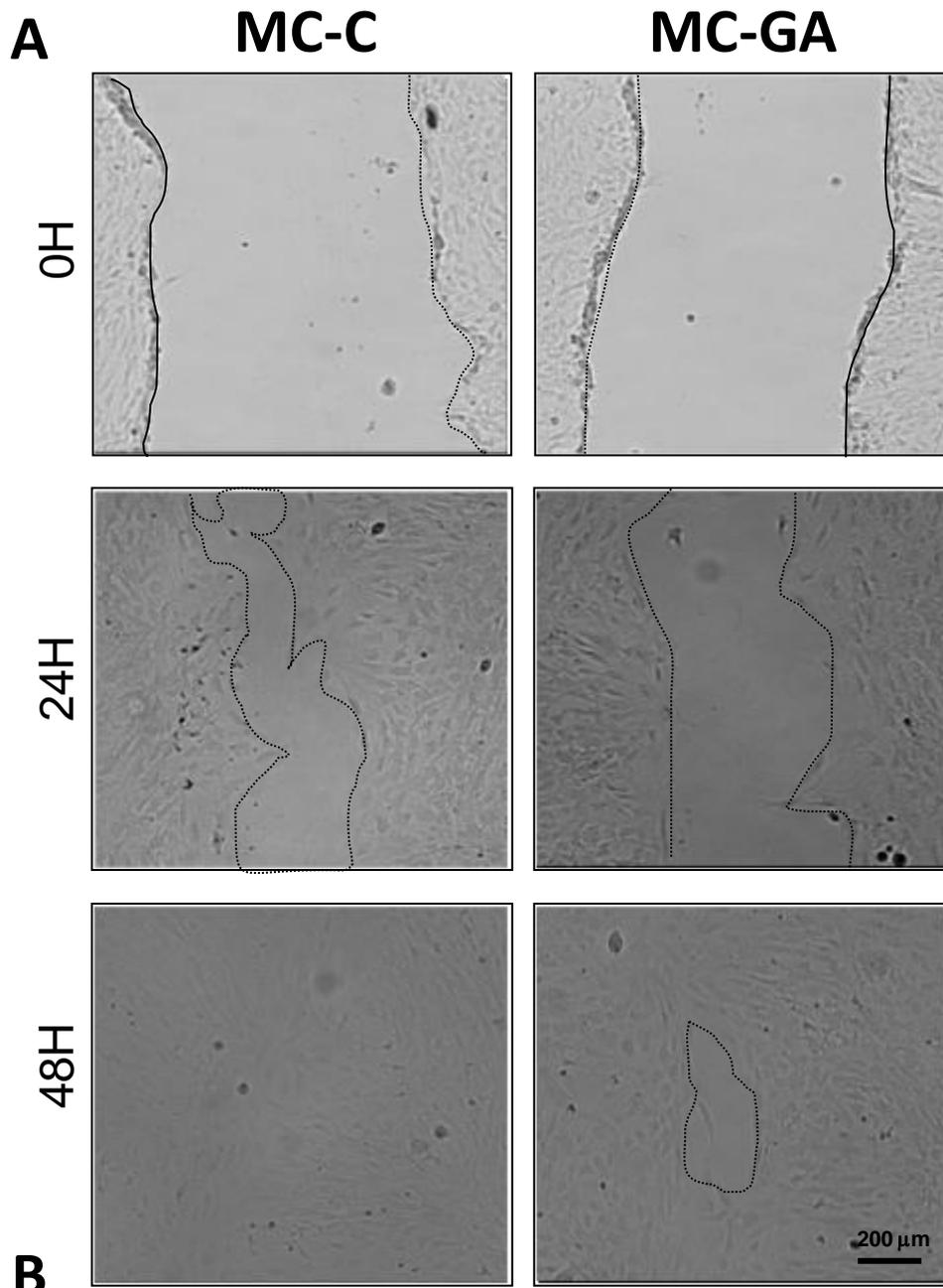


Figura 13. Ausencia de efectos directos de GA sobre pericitos en cultivo. (A) Ausencia de cambios en la disposición de los filamentos de actina evidenciados con faloidina fluorescente y en la inmunoreactividad para α SMA en pericitos de un segundo pasaje tratados durante 24h con GA 5mM o PBS (control). **(B)** Análisis del comportamiento migratorio y de la proliferación de pericitos controles o tratados con GA 5 mM en un ensayo de *scratch* manual realizado con una punta de pipeta, según muestra el esquema. La cuantificación de toda el área vacía o libre de células a las 24 y 48h tomando como control el área vacía a tiempo 0, indicó ausencia de cambios en presencia de GA. Igual resultado se observó luego de cuantificar la proliferación evaluando el % de células BrdU positivas a las 48 h del *scratch*. NS: estadísticamente no significativo, t-student.



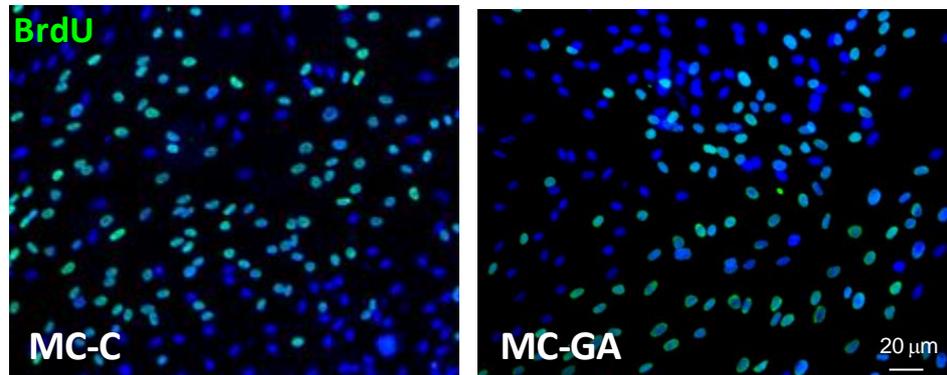
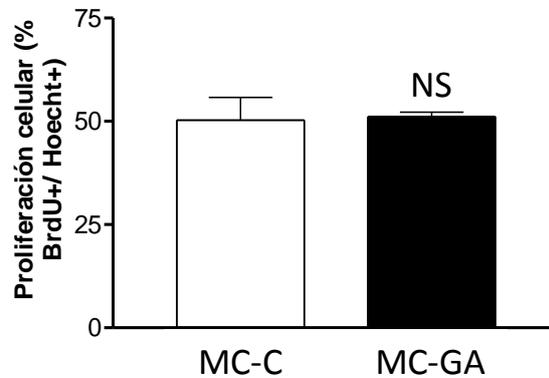
C**D**

Figura 14. El medio condicionado de astrocitos tratados con GA retrasa el cierre del *scratch* en cultivos de pericitos. **(A)** Imágenes representativas mostrando el *scratch* realizado en cultivos tratados con medio condicionado de astrocitos controles (MC-C) o de astrocitos tratados con GA (MC-GA). Las imágenes fueron tomadas a 0, 24 y 48 h luego del *scratch* por microscopía de luz y muestran mayor área libre de células en los pericitos tratados con MC-GA, a las 24 y 48h. La línea punteada muestra los límites del *scratch* para cada condición. **(B)** Cuantificación de las áreas sin células en los pericitos tratados con MC-C y MC-GA mostrando diferencia significativa entre ambos a las 48 h. **(C)** Estudio de la proliferación realizado 48h luego del *scratch* en cultivos tratados con MC-C y MC-GA. Se adicionó BrdU al cultivo a tiempo 0 luego del *scratch* y las células fueron fijadas 48h después para el reconocimiento por inmunocitoquímica de BrdU (verde). No se observan diferencias entre ambos tratamientos. **(D)** Cuantificación de la tasa de proliferación celular (%BrdU+/Hoecht+) en cultivos tratados con MC-C y MC-GA, mostrando ausencia de diferencias significativas entre ambas condiciones. * $p < 0.05$, NS: estadísticamente no significativo, t-student.

6.2 Resultados II: Efectos de GA sobre oligodendrocitos *in vitro* y su correlato *in vivo*. Rol de los astrocitos en la toxicidad de GA.

Una de las posibles causas de las alteraciones en la mielinización reportadas en GA-I podría ser la afectación de los oligodendrocitos maduros o de sus precursores por acción directa de GA. Para analizar esta posibilidad se estudiaron los efectos de este metabolito sobre cultivos enriquecidos en el linaje oligodendroglial.

6.2.1 Ausencia de efectos directos de GA sobre número y morfología de células precursoras de oligodendrocitos (CPO).

Los cultivos de CPO mantenidos durante dos días en presencia de PDGF-AA fueron tratados al tercer día *in vitro* (DIV) con GA (5mM) o PBS durante 24h. El tratamiento con GA no produjo cambios significativos ni en el número de células observadas por microscopía de luz (Fig. 15A), ni en la morfología de las mismas cuantificando número de ramificaciones primarias y secundarias. El análisis de inmunocitoquímica para NG2 permitió reconocer las células NG2 positivas (Fig. 15B), en su mayoría multipolares, con una morfología esperable para oligodendrocitos inmaduros, que representaron alrededor del 50% de las células Hoechst positivas. El tratamiento con GA tampoco modificó el % de células NG2 positivas en los cultivos (Fig. 15C).

6.2.2 GA no afecta la proliferación, ni la inmunoreactividad para iNOS o caspasa 3 clivada en las CPO.

Dado que la microscopía de luz y la inmunocitoquímica anti-NG2 solo permitió observar número, morfología y presencia del marcador de las células en cultivo, se analizaron indicadores del estado funcional. Para conocer si GA podía causar algún efecto sobre la capacidad proliferativa, inducción de enzimas pro-oxidantes o muerte apoptótica de CPO, se realizó inmunocitoquímica para iNOS, caspasa 3 clivada (Casp3) y BrdU (Fig. 16 A-D). GA no produjo cambios significativos en los parámetros observados, incluyendo porcentaje de proliferación (~30% en control y GA), porcentaje de células Casp3 positivas (~2% en control y GA) y porcentaje de células iNOS positivas (~ 5% en control y GA), indicando que no tiene ningún efecto sobre la viabilidad, proliferación o estado oxidativo de las CPO.

6.2.3 Efectos del medio condicionado de astrocitos controles (MC-C) y de astrocitos tratados con GA (MC-GA) sobre la morfología de los oligodendrocitos.

Los cultivos de CPO fueron mantenidos durante 3 días con PDGF-AA y 3 días más en ausencia de factores tróficos para permitir la diferenciación de un porcentaje de CPO. Al sexto DIV, los cultivos se trataron con GA (5mM), PBS (control), MC-C (diluído ¼) o MC-GA (diluído ¼) durante 24h. Al final del tratamiento, se contabilizó el número de células y de ramificaciones primarias y secundarias en imágenes obtenidas por microscopía de luz. No se observaron efectos directos de GA sobre el número de células o la morfología, en cambio, las células tratadas con MC-GA, mostraron un patrón morfológico más simple, caracterizado por un menor número de ramificaciones primarias y secundarias, en promedio (Fig. 17 A, B). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto del MC-C (Fig. 17B). Datos preliminares de inmunocitoquímica para NG2 y *western blotting* para PDGFR- α en cultivos de oligodendrocitos tratados con MC-C o MC-GA, nos indicarían que las CPO no están afectadas en número o morfología, lo que supone una vulnerabilidad al efecto del MC-GA, de los oligodendrocitos en estadios más diferenciados (datos que no se muestran en la figura).

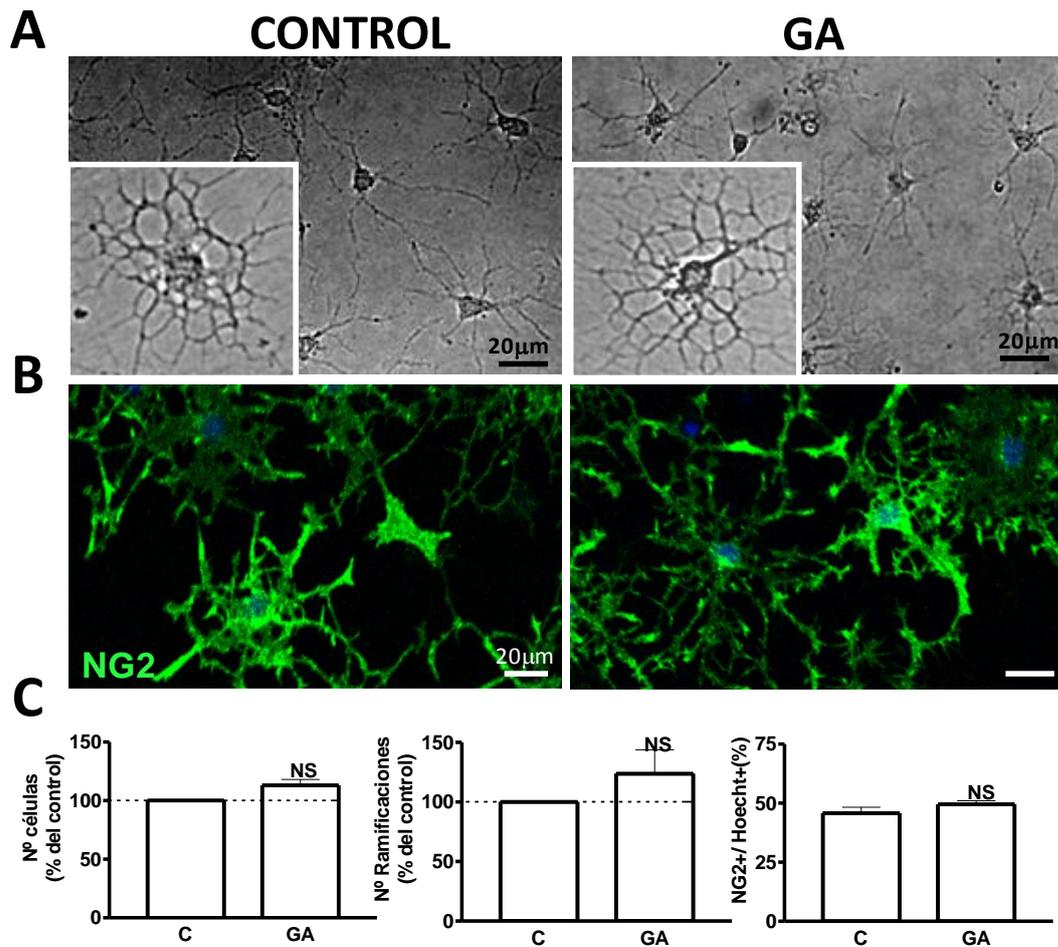


Figura 15. Ausencia de efectos directos de GA sobre el número y morfología de células precursoras de oligodendrocitos (CPO) en cultivo. (A) Imágenes de microscopía de luz mostrando CPO mantenidas 2 DIV en presencia de PDGF-AA y tratadas con PBS (control) o GA (5mM) durante 24h, sin observarse efectos sobre el número o la morfología. **(B)** Inmunocitoquímica para NG2 mostrando ausencia de efectos sobre el número o la morfología de las células NG2+. **(C)** Cuantificación del número de células, ramificaciones primarias y secundarias o porcentaje de células NG2+ indicando ausencia de efectos directos de GA. NS: estadísticamente no significativo, t-student.

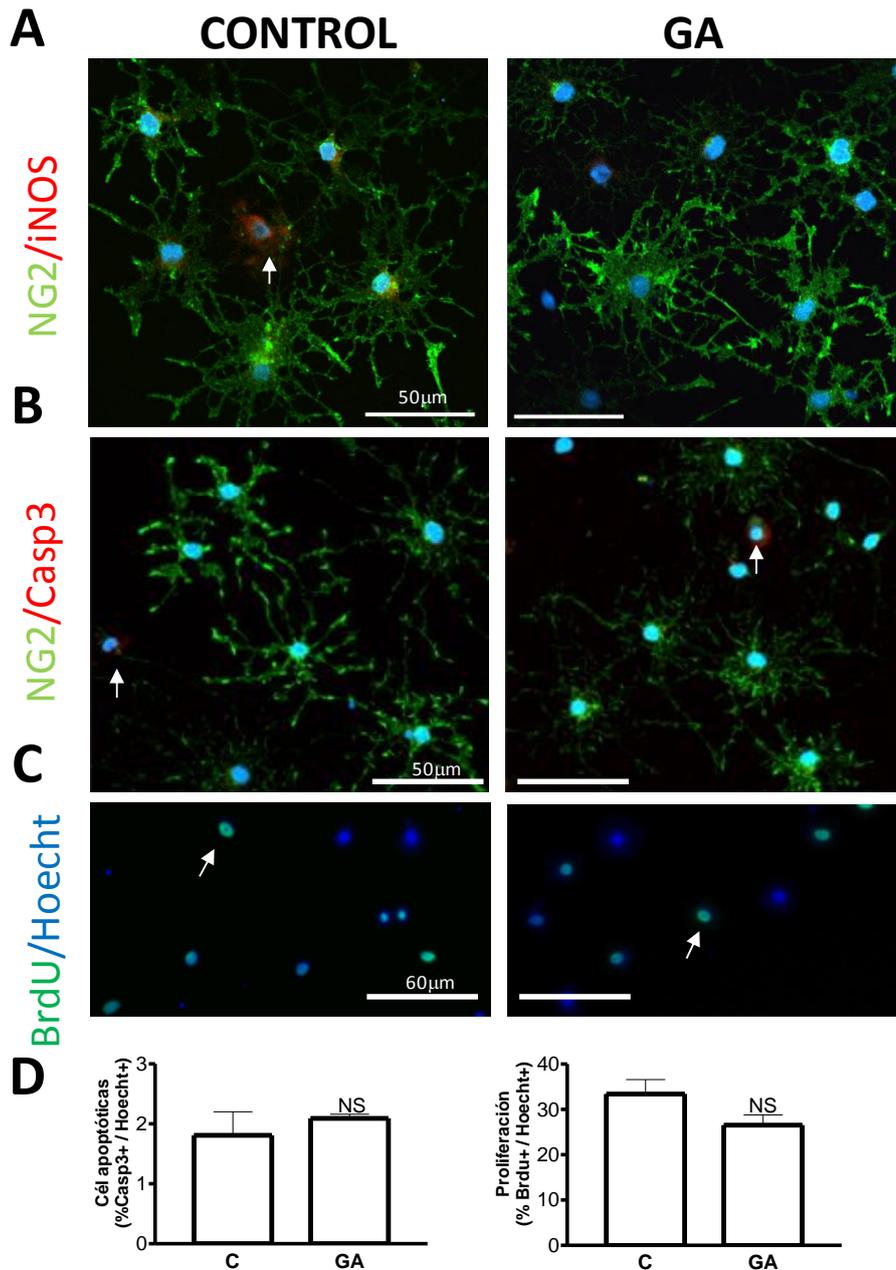


Figura 16. Ausencia de efectos directos de GA sobre la proliferación, inducción de iNOS o apoptosis de células precursoras de oligodendrocitos (CPO). (A) Inmunofluorescencia para NG2 e iNOS indicando ausencia de efectos en el estado oxidativo de las CPO luego de ser tratadas 24 h con GA (5mM). La flecha muestra una célula positiva en el control. El número de células iNOS positivas fue cercano al 5% en cultivos controles y tratados con GA. (B) Inmunocitoquímica para evaluar la expresión del marcador de apoptosis caspasa 3 clivada (Casp3), mostrando ausencia de cambios significativos en las CPO tratadas con GA con respecto a las tratadas con PBS (las flechas indican células positivas en ambas condiciones). (C) Análisis de proliferación celular mediante reconocimiento de BrdU que fue adicionado a los cultivos al momento del tratamiento con PBS o GA. Las flechas muestran núcleos proliferantes doble marcados con Hoecht. (D) Cuantificación del porcentaje de células apoptóticas y proliferantes en las condiciones control y GA. No se observan cambios significativos entre ambas condiciones observándose en el cultivo un 2% de células apoptóticas y aproximadamente 30% de células en proliferación. NS: estadísticamente no significativo, t-student.

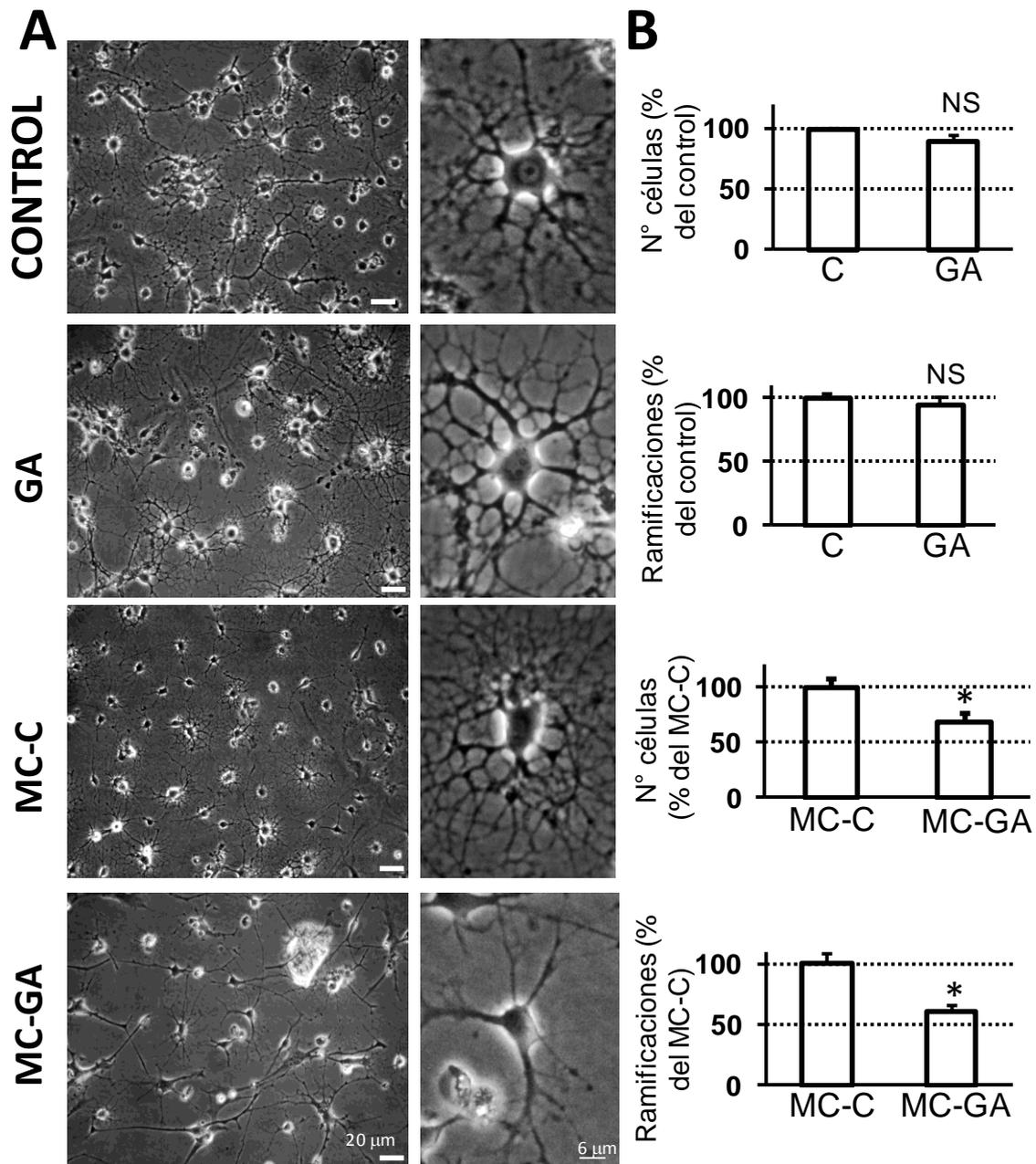


Figura 17. El medio condicionado de astrocitos tratados con GA (MC-GA) reduce el número de células y cambia la morfología de los oligodendrocitos. (A) Imágenes de microscopía de luz mostrando oligodendrocitos mantenidos 3DIV en presencia de PDGF-AA y 3 DIV más en ausencia de factores tróficos que fueron tratados con PBS (control), GA (5mM) o una dilución 1:4 de medio condicionado de astrocitos controles (MC-C) o de astrocitos tratados durante 24h con GA (MC-GA). Se evidencia ausencia de efectos de GA sobre los cultivos y disminución del número y simplificación de la morfología en las células tratadas con MC-GA. **(B)** Cuantificación del número de células y de ramificaciones de primer y segundo orden, verificando la ausencia de efectos de GA sobre los cultivos y los efectos significativos del MC-GA. NS: estadísticamente no significativo, * $p < 0.05$, t-student.

6.2.4 Efectos agudos de la inyección neonatal de GA sobre CPO y astrocitos

Se analizó el efecto agudo de GA sobre la población de CPO 24h luego de la inyección en neonatos *Sprague Dawley*, para ello, los cerebros fueron procesados para la inmunohistoquímica de NG2 y PDGFR- α (marcadores prototípicos de CPO). Simultáneamente se analizó la inmunoreactividad para S100 β (marcador de astrocitos inmaduros). La inmunoreactividad de NG2 mostró células con somas pequeños y procesos abundantes y ramificados cercanos a los paquetes axonales y algunos vasos del estriado positivos para el marcador. No se observaron cambios en la morfología ni en el número de células NG2 positivas cuando se compararon animales controles e inyectados con GA (Fig. 18A). El inmunomarcado de PDGFR- α mostró células de soma pequeño y escasas prolongaciones, localizadas en la periferia de los paquetes axonales, sin cambios evidentes en el número o la morfología entre animales controles e inyectados con GA. No se observó marcado de vasos a diferencia de NG2 (Fig. 18B). Sin embargo, a nivel del estriado, 24 h luego de inyección con GA se observó una astrocitosis significativa, caracterizada por un aumento de la expresión de S100 β (Fig. 18C). En presencia de GA, las células S100 β aparecen agrandadas y con procesos más visibles, respecto de los animales controles donde aparece tinción principalmente a nivel del cuerpo celular (Fig. 18C). La cuantificación de los marcadores analizados indica que hubo cambios significativos solamente en el número de células S100 β + del estriado (Fig. 18D). De acuerdo con este resultado, el análisis del Western blotting indicó que no hay diferencias en los niveles de expresión de PDGFR α (Fig. 18D), por lo que podemos afirmar que no se observaron cambios en la población estriatal de precursores de oligodendrocitos, 24 h luego de la inyección de GA. El conjunto de estos resultados sugiere que el efecto agudo de la inyección neonatal de GA, se restringe a los astrocitos sin afectar la población de células precursoras de oligodendrocitos.

6.2.5 Estudio de la expresión de ARNm de LIF, BMP-4 y CNTF en astrocitos controles y tratados con GA.

Dada la ausencia de efectos directos de GA, *in vitro* e *in vivo*, sobre el linaje oligodendroglial y los efectos del medio condicionado de astrocitos tratados con GA sobre la morfología de estas células, pensamos que este ácido puede producir cambios en el repertorio de señales astrocitarias que afectan la comunicación astrocito-oligodendrocito. En la búsqueda de cambios en los factores solubles sintetizados por astrocitos tratados con GA, que pudieran explicar los efectos observados en los cultivos de oligodendrocitos, se determinaron los niveles de ARNm de LIF, CNTF y BMP-4, tres factores solubles, relacionados con la supervivencia y/o diferenciación de los oligodendrocitos (Moore et al., 2011). El análisis cuantitativo de los niveles de ARNm realizados en muestras obtenidas de cultivos de astrocitos controles y tratados con 5 mM de GA durante 24 h, evidenció un aumento del mensajero (dos veces, respecto del control) para CNTF; sin producir cambios en la expresión del mensajero para LIF o BMP-4 (Fig. 19).

Estos resultados indican que el GA es capaz de inducir cambios en el repertorio molecular de los astrocitos y se debe continuar con el análisis de las moléculas señalizadoras capaces de incidir sobre la mielinización, para identificar cuál o cuáles podrían mediar los efectos observados sobre los oligodendrocitos.

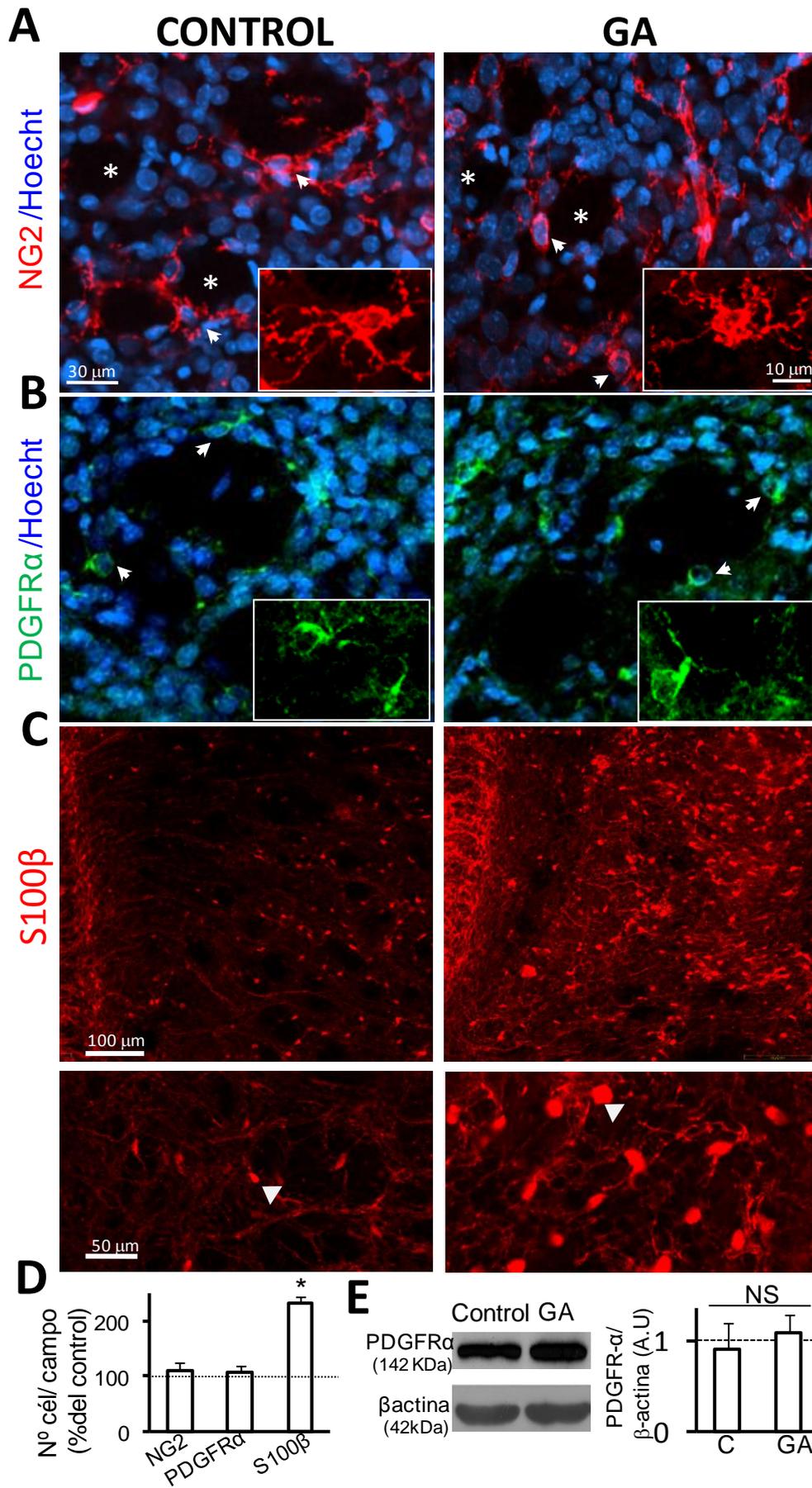


Figura 18. Ausencia de un efecto agudo de GA sobre CPO e inducción de astrocitosis S100β+ a las 24h post-inyección. (A) Inmunofluorescencia anti-NG2 mostrando en el estriado de animales controles e inyectados con GA, células multipolares pequeñas con prolongaciones ramificadas (flechas blancas, inserto) que se ubican cerca de los paquetes axonales (asteriscos blancos). . **(B)** Inmunotinción para PDGFR-α evidenciando células similares (flechas) en número, tamaño y morfología en animales controles e inyectados con GA. **(C)** Inmunoreactividad de S100β mostrando un fuerte aumento en los animales GA respecto del control. Es evidente además el aumento de tamaño y la aparición de esbozos de procesos celulares (flechas). **(D)** Cuantificación de los marcadores analizados, confirmando el aumento significativo del número de células S100β. **(E)** *Western blotting* para PDGFR-α en muestras de estriado de animales controles e inyectados con GA Se observan bandas similares en ambas condiciones. La cuantificación respecto del control de carga (β-actina) indica ausencia de diferencias estadísticamente significativas. NS: estadísticamente no significativo. * p<0.05, t-student.

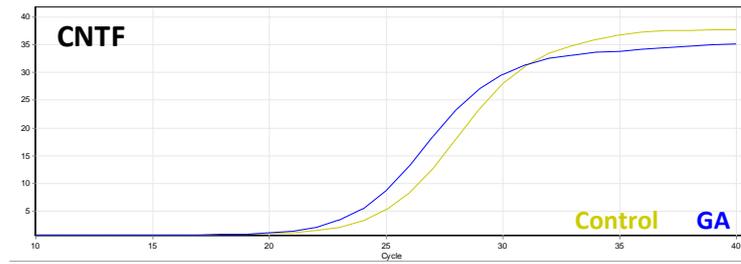
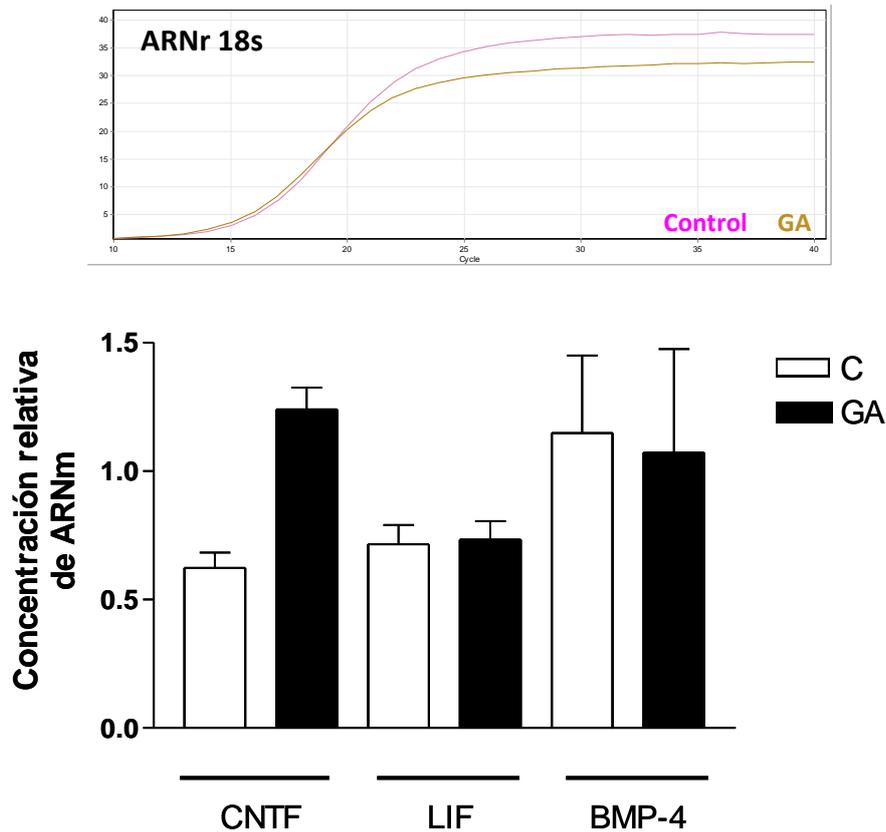
A**B**

Figura 19. (A) Curvas representativas de fluorescencia en función del ciclo, para CNTF y ARNr 18s, de astrocitos controles y tratados con GA. (B) Cuantificación de los niveles de expresión de ARNm de CNTF, LIF y BMP-4 en astrocitos controles y tratados con GA. Se muestra la cuantificación de los ARNm extraídos de astrocitos controles y tratados 24h con GA (5mM), respecto de la expresión de un mensajero de expresión constitutiva (ARNr 18s). Hay un aumento de la expresión de CNTF (dos veces respecto del control) en astrocitos tratados con GA. No se observan cambios para LIF o BMP-4. N=2.

7. DISCUSIÓN

7.1 Discusión I- Estudio de la BHE en un modelo de inyección perinatal de GA en ratas. Efectos sobre pericitos y astrocitos.

El aumento de la extravasación de EB a nivel del parénquima en animales inyectados con GA, a los 14 y 30 DPI, evidencia un retraso en la maduración o disrupción de la BHE. Es esperable que a los 14 DPI, la BHE aún no sea completamente funcional, sin embargo, a los 30 DPI se ha reportado que ya está totalmente establecida y la resistencia eléctrica transendotelial alcanza su máximo valor (Xu & Ling, 1993; Butt et al., 1990). La disrupción de la BHE por EB, también fue observada en ratones *Gcdh*^{-/-} de cuatro semanas que recibieron una dieta alta en lisina durante tres días (Zinnanti et al., 2006). Además, estos ratones presentaron hemorragias subaracnoideas y dilatación de algunos vasos. Según los autores, la ruptura de la BHE es un evento fisiopatológico temprano en ratones jóvenes *Gcdh*^{-/-} expuestos a una dieta alta en lisina (Zinnanti et al., 2006). Por otro lado, cuando comparamos los niveles de fluorescencia en el estriado y en la corteza parietal de animales controles e inyectados con GA, únicamente en el estriado de animales GA el aumento de EB fue estadísticamente significativo, respecto del control. Estos resultados están en línea con los experimentos de Zinnanti et al. (2006) que muestran un aumento significativo de la permeabilidad de los microvasos aislados del estriado, pero no de la microvasculatura cortical, cuando se tratan con 3,3mM de GA o 3-OHGA, demostrando así una mayor vulnerabilidad de la vasculatura en el estriado.

Con respecto a la ocludina, proteína integral de membrana que forma parte de las uniones estrechas, observamos una reducción de su expresión a los 14 DPI en animales inyectados con GA, sin cambios a los 30 DPI. Creemos que si bien los niveles de ocludina podrían estar afectados inicialmente y luego re-establecerse, otras proteínas de las uniones estrechas como las claudinas 1 y 5, proteínas de anclaje como ZO-1 y ZO-2, entre otras, también podrían estar afectadas, ya sea en su nivel de expresión, modificaciones post-traduccionales o localización celular, tal como ha sido reportado en otros modelos de disrupción de la BHE (Förster et al., 2008). Hasta el momento, desconocemos si los animales inyectados con GA, tienen estas proteínas alteradas y si esto podría explicar el aumento de la permeabilidad de la BHE observado.

Por otro lado, presentamos evidencias de que en nuestro modelo de inyección intracerebroventricular de GA en neonatos, las alteraciones en la vasculatura del estriado evidenciadas a los 30 DPI, están asociadas a una reducción en la inmunoreactividad de laminina (membrana basal), AQP4 (podocitos astrocitarios) y PDGFR β (pericitos) rodeando la vasculatura. La asociación entre la laminina y la distribución de AQP4 en los podocitos astrocitarios ya ha sido reportado en otros trabajos como en el modelo murino de delección genética de las isoformas β 2 y γ 3 de laminina, el cual muestra una reducción de la expresión y función de AQP4 y Kir 4.1 en la glía de Muller (Hirrlinger et al., 2011). Este trabajo evidencia la importancia de la membrana basal y de la laminina en la expresión y funcionalidad de canales asociados a los podocitos astrocitarios. Por otra parte, creemos que la disminución de la inmunoreactividad de PDGFR β en el estriado podría estar asociada, no solo con una BHE disfuncional, sino también con una dilatación capilar y alteraciones del flujo sanguíneo. En este sentido, Zinnanti et al. (2006) muestra que el ratón *Gcdh*^{-/-} con dieta alta en lisina presenta dilatación capilar en el estriado. Por otro lado, Strauss et al. (2010) muestra

alteraciones hemodinámicas cerebrales, con reducción del flujo sanguíneo y aumento del volumen cerebral en pacientes GA-I. Además, cambios en la densidad de pericitos y en la relación número de pericitos: número de células endoteliales ha sido relacionado con una función vascular alterada en diversas condiciones patológicas como trauma, infarto cerebral, esclerosis múltiple, retinopatía diabética, envejecimiento, enfermedad de Alzheimer, entre otras (Bonkowsky et al., 2011).

Con respecto a los mecanismos celulares que subyacen a las alteraciones vasculares, Mulhausen et al. (2006) reporta inhibición de la migración y disrupción del citoesqueleto de actina en células endoteliales cuando son tratadas con altas concentraciones de 3-OHGA (mayores a 4mM), sin cambios evidentes con GA (6mM). Estos resultados presentan, a nuestro criterio, poca relevancia en la fisiopatología de GA-I, ya que nunca se han reportado concentraciones tan altas de 3-OHGA en muestras de cerebro post-mortem de pacientes o en el modelo murino genético de la enfermedad (Strauss et al., 2003; Funk et al., 2005; Zinnanti et al., 2007). Basándonos en estos resultados, parecería que las células endoteliales no son un blanco celular directo de la acción de GA y por lo tanto tampoco habría una toxicidad aguda sobre las mismas en el modelo de inyección intracerebroventricular de GA. Por lo tanto, evaluamos el efecto de GA sobre otro componente de la unidad neurovascular, nunca antes explorado en GA-I: el pericito. Observamos que el tratamiento con GA (5mM) durante 24h, no tiene efectos sobre la viabilidad, morfología, proliferación y migración de este tipo celular, *in vitro*. Sin embargo, el medio condicionado de astrocitos tratados con GA, inhibió la migración de los pericitos en cultivo, respecto del medio condicionado de astrocitos controles. Por lo tanto, los astrocitos tratados con GA, a través de factores solubles no identificados aún, podrían inhibir la migración de los pericitos. Desconocemos la relevancia de estos resultados en el contexto de la patología *in vivo*, en GA-I, pero podríamos pensar que la migración defectuosa y un reclutamiento deficiente de los pericitos durante la angiogénesis en el periodo postnatal, podría tener consecuencias en la estabilidad vascular y permeabilidad de la BHE. En este sentido, un trabajo de Robertson et al. (1985) señala que la proliferación endotelial y por lo tanto la angiogénesis, a nivel de la corteza cerebral de la rata está aumentada durante el periodo postnatal, habiendo un pico de proliferación (~12%) entre P6 y P9 y decayendo a 0.3% en la rata adulta. En este contexto, son remarcables los hallazgos de Mulhausen et al. (2004) donde se reporta un aumento de la expresión de genes (por análisis de microarreglos de ADN) relacionados con la angiogénesis (VEGF A, C y angiogeninas) en el cerebro de ratones *Gcdh*^{-/-}, respecto de ratones salvajes. Si bien el autor no analiza la expresión proteica de estos genes, ni explica este hecho en el contexto de la enfermedad, podemos inferir que la angiogenesis podría tener algún rol importante en la patología GA-I. Por lo tanto, la disfunción astrocitaria inducida por GA que fue reportada en otros trabajos (Olivera et al., 2008; 2011), podría modificar el repertorio de señales moleculares y afectar no solamente la migración de los pericitos, sino también a la célula endotelial, influyendo en la patología vascular de GA-I en su conjunto.

Por último, en este trabajo mostramos un aumento de células teñidas con EB, a nivel estriado, y la co-localización de algunas de estas células con anexina V. Además, observamos un aumento significativo de células apoptóticas (anexina V+) en el estriado de animales inyectados con GA a los 30 DPI. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en este modelo, mostrando una neurodegeneración progresiva y significativa a partir de los 21 DPI (Olivera et al., 2011). Creemos que las células EB+ que co-localizaron con marcadores neuronales representan una población celular

cuya membrana plasmática no está intacta. Estas células EB+ han sido descritas en otros modelos de daño como el de daño cerebral inducido por frío (Rakós et al., 2007).

7.2 Discusión II- Efectos de GA sobre oligodendrocitos *in vitro* y su correlato *in vivo*. Rol de los astrocitos en la toxicidad de GA.

En el presente trabajo se mostró que GA (5mM) no afectó la supervivencia, morfología, proliferación ni expresión de iNOS en cultivos primarios de células precursoras de oligodendrocitos corticales de rata. Por lo tanto, descartamos un efecto directo sobre las CPO del metabolito que se acumula en mayor cantidad en GA-I. Estos hallazgos no concuerdan con el único estudio realizado con metabolitos de GA-I sobre oligodendroglía en cultivo, publicado por Gerstner et al. (2005), en el cual se describe que GA y 3-OHGA (0.1-10mM) inducen apoptosis en una línea celular de oligodendrocitos inmaduros OLN-93. Esta línea celular se obtuvo por transformación espontánea de un cultivo primario glial de rata (Richter-Landsberg & Heinrich, 1996), y a pesar de presentar varios de los marcadores prototípicos de oligodendroglía inmadura, no logra diferenciarse en oligodendrocitos con capacidad mielinizante. Según las imágenes mostradas en el trabajo de Gerstner, la gran mayoría de las OLN-93 tratadas presentaron una morfología bipolar evidenciando un estadio inmaduro o indiferenciado, de apariencia diferente a las células que obtuvimos en los cultivos primarios de oligodendrocitos. A pesar de esto, el trabajo de Gerstner et al. menciona, en el texto, que células OLN-93 en estadios más diferenciados también sufrieron apoptosis en presencia de estos ácidos (sin mostrar figuras ni tablas que hagan referencia a ello). Por lo tanto, creemos que nuestro cultivo primario enriquecido en células precursoras de oligodendrocitos corticales, presenta características diferentes a las de la línea celular OLN-93, y esto podría explicar, en parte, los diferentes resultados obtenidos. Por otra parte, el reciente trabajo de Jafari et al. (2013) está en línea con nuestras observaciones sobre la ausencia de efectos tempranos en oligodendrocitos. Estos autores argumentan que en su sistema de cultivo organotípico donde coexisten células gliales y neuronas, los oligodendrocitos inmaduros (que expresan GalC) no se afectan significativamente en presencia de GA o 3-OHGA. Además, la concentración que se utiliza en este trabajo (1mM durante 6 días consecutivos) es superior a la mínima dosis que Gerstner reporta como inductora de apoptosis en las OLN-93. Por lo tanto, nuestras evidencias y las de Jafari et al. (2013) indicarían que los oligodendrocitos inmaduros no son blancos celulares directos de los metabolitos acumulados en GA-I.

En lo concerniente a los astrocitos, Jafari et al. (2013), al igual que nuestro grupo, muestra que los astrocitos serían las células más vulnerables al efecto de estos ácidos y provee además un posible mecanismo de daño neuronal y oligodendroglial ocasionado por una hiperamonemia producida por disfunción inicial y muerte secundaria de astrocitos. En trabajos previos de nuestro grupo, se aportaron evidencias acerca de que los astrocitos son una población celular que se afecta tempranamente en presencia de GA o 3-OHGA (Olivera et al., 2008; 2011). En este sentido, la evidencia de que GA no afecta la proliferación celular de las CPO, es un dato relevante y pone de manifiesto un efecto diferencial del ácido entre los oligodendrocitos y los astrocitos, ya que en trabajos previos se constató un aumento cercano al 30% de la proliferación celular en cultivos primarios de astrocitos corticales de rata expuestos a GA y 3-OHGA (Olivera et al., 2008).

En el presente trabajo se mostró el efecto del medio condicionado de astrocitos previamente tratados con GA o controles, sobre la morfología y número de oligodendrocitos. Los efectos más importantes fueron sobre la morfología celular y se evidenciaron como una simplificación y

reducción de los procesos celulares de primer y segundo orden. Resta por analizar si este cambio responde a una menor diferenciación de los oligodendrocitos ocasionado por mecanismos aún no identificados o a un daño celular de entidad suficiente como para alterar el citoesqueleto y posteriormente las funciones y/o sobrevivencia de los oligodendrocitos. Creemos que GA induce un cambio fenotípico sobre los astrocitos que se manifiesta en el repertorio de señales solubles secretadas al medio de cultivo. En trabajos previos, se ha demostrado que los medios condicionados de astrocitos afectan la viabilidad neuronal, por mecanismos aún no dilucidados (Olivera et al., 2011).

En la búsqueda de factores solubles secretados por astrocitos, importantes en la sobrevivencia y diferenciación del oligodendrocito, se cuantificaron los niveles de ARNm para CNTF, LIF y BMP-4. Sorprendentemente, constatamos un aumento de CNTF en astrocitos tratados 24h con GA. Si bien aún resta comprobar el aumento de los niveles de la proteína a nivel celular y si ésta es efectivamente liberada al medio de cultivo, creemos que el aumento de CNTF por sí solo no podría explicar ningún efecto negativo sobre oligodendrocitos en cultivo. CNTF ha sido reportado en varias publicaciones como un factor trófico que favorece la sobrevivencia y diferenciación de oligodendrocitos (Mayer et al., 1994; Barres et al., 1996; Moore et al., 2011). Sin embargo, otros autores no han observado un efecto directo de CNTF en la sobrevivencia de oligodendrocitos *in vitro* y postulan un acción indirecta, mediada por astrocitos (Albrecht et al., 2007). Frente a condiciones injuriantes, como trauma cerebral o isquemia, diversos autores han demostrado un aumento de la expresión de CNTF en astrocitos reactivos (Park et al., 2000; Asada et al., 1995). Por último, otros trabajos muestran que CNTF, liberado por astrocitos tipo I, induce la diferenciación de astrocitos tipo 2 (GFAP+) en cultivo, a partir de progenitores O2A (Hughes et al., 1988; Lillien et al., 1988). Nuestros cultivos de oligodendrocitos controles y tratados con GA, al DIV6, presentaron un 5% de células GFAP+ con morfología de astrocitos tipo 2. Sin embargo, desconocemos la proporción de astrocitos tipo 2 luego del tratamiento con MC-GA o MC-C. Dado que contabilizamos número y morfología de células “tipo oligodendrocitos” por microscopía de contraste de fases, sin diferenciar astrocitos tipo 2 de oligodendrocitos, no podemos descartar que el efecto sobre la morfología de las células en cultivo, se deba a una mayor diferenciación de CPO en astrocitos tipo 2. Cabe destacar que los astrocitos tipo 2 presentan prolongaciones largas y poco ramificadas, siendo imposible diferenciarlos a simple vista de oligodendrocitos. En suma, la disfunción astrocitaria inducida por GA, produce un aumento de la expresión del ARNm de CNTF. Se desconoce si la proteína de este factor es sintetizada y liberada al medio y si contribuye o no a los efectos observados en cultivos de oligodendrocitos tratados con MC-GA. Se desconoce, además, si el efecto diferenciador de CPO hacia el linaje de astrocitos tipo 2, inducido por CNTF, ocurre en nuestro sistema. Creemos que se impone analizar otros factores tróficos relevantes en la sobrevivencia del oligodendrocito como FGF-2 y PDGF-AA (Moore et al., 2011), también sintetizados y liberados por los astrocitos.

La inyección intracerebroventricular de GA en animales neonatos al día 1 de vida no afectó el número ni la morfología de CPO (NG2+ y PDGFR- α +) en el estriado a las 24h post-inyección. Esto confirma los resultados obtenidos *in vitro*, que descartan un efecto directo del ácido sobre esta población de oligodendrocitos. Creemos que las CPO no son un blanco directo de la acción de estos ácidos, en cambio, los astrocitos responden a las altas concentraciones de GA, proliferando y aumentando la expresión de S100 β (marcador de astrocitos inmaduros). Creemos que la respuesta astrocitaria, evidenciada por un aumento de la proliferación y de la inmunorreactividad de S100 β sostenida en el tiempo, podría conducir a un proceso neurodegenerativo retardado en el tiempo y

alteraciones de la mielinización (Olivera et al., 2011; 2013 no publicado). Por lo tanto, el astrocito podría acumular GA intracelularmente, a través del transportador NaC3 (Lamp et al., 2011; Mulhausen et al., 2008) o eventualmente a través de GLT1 o GLAST y ser un blanco celular de la acción directa de GA. En línea con nuestras evidencias, diversos autores ya han demostrado la relevancia de la disfunción astrocitaria en patologías de la sustancia blanca como la enfermedad de Alexander, *Vanishing White Matter*, Esclerosis Múltiple, entre otras (Barnett & Linington, 2012; Moore et al., 2011).

La proporción de células precursoras de oligodendrocitos a P2 en la rata, es cercana a un 70% del total de células del linaje oligodendroglial (Craig et al., 2003) y estas células son especialmente vulnerables al estrés oxidativo y daño hipóxico/isquémico (Back et al., 2001), por lo tanto, el período de máxima vulnerabilidad al daño de la sustancia blanca en la rata coincide con el momento de inyección de GA, en nuestro modelo. Sin embargo, a diferencia de los modelos de daño de la sustancia blanca neonatal en ratas, que buscan reproducir enfermedades humanas como la leucomalacia periventricular o la encefalopatía hipóxica/isquémica (Silbereis et al., 2010), nuestros resultados sugieren que altas concentraciones de GA no afectan directamente la sustancia blanca en el periodo neonatal.

8. CONCLUSIONES

El modelo de inyección intracerebroventricular de GA en animales neonatos, es un modelo en el que se observa una disfunción astrocitaria inicial sostenida en el tiempo y una dismielinización y neurodegeneración que acontecen más tardíamente y se evidencian a los 12 y 21 DPI, respectivamente. El presente trabajo mostró que este modelo animal, presenta alteraciones en la permeabilidad de la BHE que están asociadas a cambios en las células perivasculares, en particular, pericitos y astrocitos, así como también a cambios en la expresión de laminina en la membrana basal. Por primera vez, se analizaron los efectos de GA sobre los pericitos *in vitro*, pudiendo descartar un efecto directo del ácido sobre la viabilidad, proliferación y migración de este tipo celular. Además, se evidenció que hay una inhibición de la migración de los pericitos *in vitro*, asociada a factores solubles secretados por astrocitos tratados con GA. Esto supone una interrelación entre estos dos tipos celulares, nunca antes explorada, que podría tener relevancia en la patología vascular de GA-I.

Respecto de la patología de la sustancia blanca presente en pacientes GA-I cuyos mecanismos son desconocidos, los resultados *in vitro* indicarían que GA no tiene efectos sobre la viabilidad, morfología o proliferación de CPO o de oligodendrocitos en estadios más diferenciados. Tampoco se observó una toxicidad aguda de GA sobre las CPO en neonatos inyectados. En cambio, sí se observó una astrocitosis en el estriado, evidenciada por un aumento de la inmunorreactividad para S100 β , 24h luego de la inyección de GA. Estos resultados confirman un efecto directo de GA sobre la población astrocitaria, pero no sobre la población oligodendroglial mayoritaria que está presente en el cerebro de ratas P1-P2. Aportamos evidencias acerca del rol de los astrocitos en la morfología y posible diferenciación de las CPO *in vitro*. Creemos que factores solubles secretados por astrocitos tratados con GA, podrían inhibir la diferenciación de CPO, por mecanismos aún no dilucidados. Evaluamos niveles de ARNm de CNTF, LIF y BMP-4 en astrocitos controles y tratados con GA, constatando un aumento del mensajero de CNTF. El aumento de CNTF podría correlacionarse con

una mayor diferenciación de CPO tratadas con MC-GA, hacia astrocitos tipo 2, que aún debe confirmarse. Resta por explorar otros factores solubles secretados por astrocitos y esenciales en la señalización del oligodendrocito, como FGF-2 y PDGF-AA, así como también el efecto directo de GA o medios condicionados sobre la mielinización de neuronas *in vitro*.

9. PERSPECTIVAS

Para profundizar en los mecanismos que conducen a la disrupción de BHE en el modelo de inyección neonatal de GA, pensamos evaluar la localización y expresión de otras proteínas que conforman las uniones estrechas o uniones adherentes como la ZO-1, claudinas, cadherinas, entre otras. Eventualmente, buscaremos evaluar *in vitro*, la expresión de proteínas de las uniones estrechas, en cultivos de células endoteliales tratados con medios condicionados de astrocitos, pericitos o ensayos de co-cultivo o triple cultivo. Por otra parte, esperamos extender el análisis de las células perivasculares, de pericitos y astrocitos, en los ratones Gcdh *-/-* que reciben una dieta alta en lisina, en colaboración con el grupo de Moacir Wajner del Dpto. de Bioquímica, Universidad Federal de Río Grande del Sur. Más adelante, nos gustaría extender el estudio de los pericitos y los astrocitos, en relación con la integridad de la unidad neurovascular, la regulación del flujo sanguíneo cerebral y la angiogénesis, a otros modelos de neurodegeneración.

Respecto del rol de los astrocitos disfuncionales sobre la población oligodendroglial *in vitro*, nos resta por explorar marcadores de astrocitos tipo 2 y de oligodendrocitos maduros en los cultivos tratados con medios condicionados para profundizar en el efecto del MC-GA sobre la diferenciación de las CPO. Y, por último, evaluar la capacidad mielinizante de oligodendrocitos expuestos a GA y medios condicionados. Para ello, estamos poniendo a punto ensayos de mielinización *in vitro*, con tejido de corteza cerebral de embriones E15. Con respecto a los factores solubles secretados por astrocitos, pensamos cuantificar la expresión de ARNm de FGF-2 y PDGF-AA y en una segunda instancia evaluar niveles de proteínas en células o medios condicionados. En función de los resultados obtenidos se evaluará si los cambios en alguno de estos factores tróficos o el aumento de CNTF ya constatado, puede explicar los resultados obtenidos en cultivos de oligodendrocitos tratados con MC-GA. Luego, evaluaremos la relevancia de estos hallazgos en el fenómeno de dismielinización observado *in vivo*, en modelos animales de GA-I. Más adelante, nos gustaría profundizar en en la relación astrocito-oligodendrocito en otros modelos de dismielinización como el de Encefalitis Autoinmune Experimental o el modelo de hipomielinización por deficiencia dietaria de hierro.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott NJ (2002) Astrocyte–endothelial interactions and blood–brain barrier permeability. *J Anat* 200:629-638.
- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7: 41–53.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ (2010) Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol Dis* 37:13–25.
- Albrecht PJ, Enterline JC, Cromer J, Levison, SW (2007) CNTF-activated astrocytes release a soluble trophic activity for oligodendrocyte progenitors. *Neurochem Res* 32(2): 263-271.
- Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP (2003) The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci*. 4(12):991-1001.
- Applied Biosystems (1997) Relative Quantitation Of Gene Expression: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System: User Bulletin #2: Rev B.
- Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C (2005) Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 97(6):512-523.
- Armulik A, Genove G, Mae M, Nisancioglu MH, Wallgard E et al. (2010) Pericytes regulate the blood–brain barrier. *Nature* 468:557–561.
- Arai K, Lo EH (2010) Astrocytes protect oligodendrocyte precursor cells via MEK/ERK and PI3K/Akt signaling. *J Neurosci Res* 88(4):758-763.
- Asada H, Ip NY, Pan L, Razack N, Parfitt MM, Plunkett RJ (1995) Time course of ciliary neurotrophic factor mRNA expression is coincident with the presence of protoplasmic astrocytes in traumatized rat striatum. *J Neurosci Res* 40(1):22-30.
- Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Levine JM, Volpe JJ et al. (2001). Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury. *J Neurosci* 21:1302–1312.
- Bähr O, Mader I, Zschocke J, Dichgans J, Schulz JB (2002) Adult onset glutaric aciduria type I presenting with a leukoencephalopathy. *Neurology* 59(11):1802-1804.
- Balabanov R, Beaumont T, Dore-Duffy P (1999) Role of central nervous system microvascular pericytes in activation of antigen-primed splenic T-lymphocytes. *J Neurosci Res* 55:578 –587.
- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16(1):1-13.
- Baric I, Wagner L, Feyh P, Liesert M, Buckel W, Hoffmann GF (1999) Sensitivity and specificity of free and total glutaric acid and 3-hydroxyglutaric acid measurements by stable-isotope dilution assays for the diagnosis of glutaric aciduria type I. *J Inherit Metab Dis* 22(8):867-881.
- Barnett SC, Linington C (2012) Myelination: Do Astrocytes Play a Role? *Neuroscientist*. Nov 6. [Epub ahead of print]
- Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT et al. (1992) Cell death in the oligodendrocyte lineage. *J Neurobiol*. 23(9):1221-1230.
- Barres BA, Raff MC (1994) Control of oligodendrocyte number in the developing rat optic nerve. *Neuron*. 12(5):935-942.
- Barres BA, Burne JF, Holtmann B, Thoenen H, Sendtner M, Raff MC (1996) Ciliary neurotrophic factor enhances the rate of oligodendrocyte generation. *Mol Cell Neurosci* 8(2/3):146–156.
- Barres BA (2008) The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60: 430–440.

- Basinger AA, Booker JK, Frazier DM, Koeberl DD, Sullivan JA, Muenzer J (1996) Glutaric acidemia type 1 in patients of Lumbee heritage from North Carolina. *Mol Genet Metab* 88(1):90-2.
- Bauer J, Bradl M, Klein M, Leisser M, Deckwerth TL (2002) Endoplasmic reticulum stress in PLP-overexpressing transgenic rats: gray matter oligodendrocytes are more vulnerable than white matter oligodendrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol* 61(1):12-22.
- Baumann N, Pham-Dinh D (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81(2):871-927.
- Beauchamp MH, Boneh A, Anderson V (2009) Cognitive, behavioural and adaptive profiles of children with glutaric aciduria type I detected through newborn screening. *J Inherit Metab Dis* 32 Suppl 1:S207-S213.
- Bondjers C, He L, Takemoto M, Norlin J, Asker N et al. (2006) Microarray analysis of blood microvessels from PDGF-B and PDGF-Rbeta mutant mice identifies novel markers for brain pericytes. *FASEB J* 20(10):1703-1705.
- Bonkowski D, Katyshev V, Balabanov RD, Borisov A, Dore-Duffy P (2011) The CNS microvascular pericyte: pericyte-astrocyte crosstalk in the regulation of tissue survival. *Fluids Barriers CNS* 8(1):8.
- Bjugstad KB, Zawada WM, Goodman SI, Freed CR (2001). IGF-1 and bFGF reduce glutaric acid and 3-hydroxyglutaric acid toxicity in striatal cultures. *J Inherited Metab Dis* 24:631– 647.
- Bradl M, Lassmann H (2010) Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119(1):37-53.
- Brenner M, Johnson AB, Boespflug-Tanguy O, Rodriguez D, Goldman JE, Messing A (2001) Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat Genet.* 27(1):117-120.
- Butt AM, Jones HC, Abbott NJ (1990) Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol* 429:47-62.
- Cooper JA (1987) Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* 105:1473-1478.
- Craig A, Ling Luo N, Beardsley DJ, Wingate-Pearse N, Walker DW et al. (2003) Quantitative analysis of perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. *Exp Neurol* 181(2):231-240.
- Christensen E, Ribes A, Merinero B, Zschocke J (2004) Correlation of genotype and phenotype in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 27(6):861-868.
- Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA (2010) Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* 468: 562–566.
- Das AM, Lücke T, Ullrich K (2003) Glutaric aciduria I: creatine supplementation restores creatinephosphate levels in mixed cortex cells from rat incubated with 3-hydroxyglutarate. *Mol Genet Metab* 78(2):108-111.
- Dawson MR, Polito A, Levine JM, Reynolds R (2003) NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol Cell Neurosci* 24(2):476-488.
- de Castro F, Bribián A (2005) The molecular orchestra of the migration of oligodendrocyte precursors during development. *Brain Res Brain Res Rev* 49(2):227-241.
- da Costa Ferreira G, Schuck PF, Viegas CM, Tonin A, Ribeiro CA (2008) Chronic early postnatal glutaric acid administration causes cognitive deficits in the water maze. *Behav Brain Res* 187(2):411-416.

- de Mello CF, Kölker S, Ahlemeyer B, de Souza FR, Figuera MR et al. (2001) Intrastriatal administration of 3-hydroxyglutaric acid induces convulsions and striatal lesions in rats. *Brain Res* 916(1-2):70-75.
- de Oliveira Marques F, Hagen ME, Pederzoli CD, Sgaravatti AM, Durigon K (2003) Glutaric acid induces oxidative stress in brain of young rats. *Brain Res* 964(1):153-158.
- del Valle J, Camins A, Pallàs M, Vilaplana J, Pelegrí C (2008) A new method for determining blood–brain barrier integrity based on intracardiac perfusion of an Evans Blue–Hoechst cocktail. *J Neurosci Methods* 174: 42–49.
- Dente CJ, Steffes CP, Speyer C, Tyburski JG (2001) Pericytes augment the capillary barrier in in vitro co-cultures. *J Surg Res* 97:85–91.
- Dong XX, Wang Y, Qin ZH (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin* 30(4):379-387.
- Dore-Duffy P, Katychew A, Wang X, Van Buren E (2006) CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 613-24.
- Dore-Duffy P, LaManna JC (2007) Physiologic angiodynamics in the brain. *Antioxid Redox Signal* 9(9):1363-1371.
- Dore-Duffy P (2008) Pericytes: pluripotent cells of the blood brain barrier. *Curr Pharm Des* 14(16):1581-1593.
- Dubois-Dalcq M, Behar T, Hudson L, Lazzarini RA (1986) Emergence of three myelin proteins in oligodendrocytes cultured without neurons. *J Cell Biol* 102(2):384-392.
- Dugas JC, Mandemakers W, Rogers M, Ibrahim A, Daneman R, Barres BA (2008) A novel purification method for CNS projection neurons leads to the identification of brain vascular cells as a source of trophic support for corticospinal motor neurons. *J Neurosci* 28: 8294–8305.
- Engelhardt B & Sorokin L (2009) The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol* 31(4):497-511.
- Ferreira Gda C, Viegas CM, Schuck PF, Tonin A, Ribeiro CA et al. (2005) Glutaric acid administration impairs energy metabolism in midbrain and skeletal muscle of young rats. *Neurochem Res* 30(9):1123-1131.
- Förster C (2008) Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol* 130:55–70.
- Frank RN, Dutta S, Mancini MA (1987) Pericyte coverage is greater in the retinal than in the cerebral capillaries of the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28:1086–1091.
- Freudenberg F, Lukacs Z, Ullrich K (2004) 3-Hydroxyglutaric acid fails to affect the viability of primary neuronal rat cells. *Neurobiol Dis* 16: 581–584.
- Funk CB, Prasad AN, Frosk P, Sauer S, Kolker S et al. (2005) Neuropathological, biochemical and molecular findings in a glutaric academia type 1 cohort. *Brain* 128: 711–722.
- Gerstner B, Gratopp A, Marcinkowski M, Siffringer M, Obladen M et al. (2005) Glutaric acid and its metabolites cause apoptosis in immature oligodendrocytes: a novel mechanism of white matter degeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 57:771-776.
- Gitiaux C, Roze E, Kinugawa K, Flamand-Rouvière C, Boddaert N et al. (2008) Spectrum of movement disorders associated with glutaric aciduria type 1: a study of 16 patients. *Mov Disord* 23(16):2392-2397.
- Goodman SI, Markey SP, Moe PG, Miles BS, Teng CC (1975) Glutaric aciduria; a “new” disorder of amino acid metabolism. *Biochem Med* 12: 12–21.

- Goodman SI, Stein DE, Schlesinger S, Christensen E, Schwartz M et al. (1998) Glutaryl-CoA dehydrogenase mutations in glutaric acidemia (type I): review and report of thirty novel mutations. *Hum Mutat* 12(3):141-144.
- Greenberg CR, Reimer D, Singal R, Triggs-Raine B, Chudley AE et al. (1995) A G-to-T transversion at the +5 position of intron 1 in the glutaryl CoA dehydrogenase gene is associated with the Island Lake variant of glutaric acidemia type I. *Hum Mol Genet* 4(3):493-495.
- Harting I, Neumaier-Probst E, Seitz A, Maier EM, Assmann B et al. (2009) Dynamic changes of striatal and extrastriatal abnormalities in glutaric aciduria type I. *Brain* 132:1764-1782.
- Haseloff RF, Blasig IE, Bauer HC, Bauer H (2003) In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol* 25(1):26-39.
- Hawkins BT, Davis TP (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 57(2):173-185.
- Haworth JC, Dilling LA, Seargeant LE (1991) Increased prevalence of hereditary metabolic diseases among native Indians in Manitoba and northwestern Ontario. *CMAJ* 145:123-129.
- Hed J, Dahlgren C, and Rundquist, I (1983) A Simple Fluorescence Technique to Stain the Plasma Membrane of Human Neutrophils. *Histochemistry* 79 (1): 105-110.
- Hellstrom M, Gerhardt H, Kalen M, Li X, Eriksson U et al. (2001) Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 153:543-553.
- Heyes MP (1987) Hypothesis: a role for quinolinic acid in the neuropathology of glutaric aciduria type I. *Can J Neurol Sci* 14 (3 Suppl):441-443.
- Hirrlinger PG, Pannicke T, Winkler U, Claudepierre T, Varshney S, Schulze C, Reichenbach A, Brunken WJ, Hirrlinger J (2011) Genetic deletion of laminin isoforms $\beta 2$ and $\gamma 3$ induces a reduction in Kir4.1 and aquaporin-4 expression and function in the retina. *PLoS One* 6(1):e16106.
- Hoffmann GF, Athanassopoulos S, Burlina AB, Duran M, de Klerk JB et al. (1996) Clinical course, early diagnosis, treatment, and prevention of disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neuropediatrics* 27:115-123.
- Hu JG, Fu SL, Wang YX, Li Y, Jiang XY (2008) Platelet-derived growth factor-AA mediates oligodendrocyte lineage differentiation through activation of extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Neuroscience* 151(1):138-147.
- Hughes SM, Lillien LE, Raff MC, Rohrer H, Sendtner M (1988) Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture. *Nature.* 335(6185):70-3.
- Ishibashi T, Dakin KA, Stevens B, Lee PR, Kozlov SV et al. (2006) Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron* 49:823-832.
- Jafari P, Braissant O, Bonafé L, Balhausen D (2011) The unsolved puzzle of neuropathogenesis in glutaric aciduria type I. *Mol Genet Metab* 104(4):425-437.
- Jafari P, Braissant O, Zavadakova P, Henry H, Bonafé L, Balhausen D. (2013) Ammonium accumulation and cell death in a rat 3D brain cell model of Glutaric Aciduria Type I. *PLoSOne* 8(1): e53735.
- Jakovcevski I, Filipovic R, Mo Z, Rakic S, Zecevic N (2009) Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Front Neuroanat.*3:5.
- Kamouchi M, Ago T, Kitazono T (2011) Brain pericytes: emerging concepts and functional roles in brain Homeostasis. *Cell Mol Neurobiol* 31:175-193.

- Keirstead HS, Levine JM, Blakemore WF (1998) Response of the oligodendrocyte progenitor cell population (defined by NG2 labelling) to demyelination of the adult spinal cord. *Glia*. 22(2):161-170.
- Kelley C, D'Amore P, Hechtman HB, Shepro D (1988) Vasoactive hormones and cAMP affect pericyte contraction and stress fibres in vitro. *J Muscle Res Cell Motil* 9(2):184-194.
- Kessarlis N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD (2006) Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci* 9(2):173-179.
- Keyser M, Glatzel F, Stellmer B, Kortmann Z, Lukacs S et al. (2008) Transport and distribution of 3-hydroxyglutaric acid before and during induced encephalopathic crises in a mouse model of glutaric aciduria type 1. *Biochim Biophys Acta* 1782(6):385-390.
- Knapp JF, Soden SE, Dasouki MJ, Walsh IR (2002) A 9-month-old baby with subdural hematomas, retinal hemorrhages, and developmental delay. *Pediatr Emerg Care* 18: 44-47.
- Koehler RC, Roman RJ, Harder DR (2009) Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci* 32(3):160-169.
- Koeller DM, Woontner M, Crnic LS, Kleinschmidt-DeMasters B, Stephens J et al. (2002) Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I. *Hum Mol Genet* 11:347-357.
- Koeller DM, Sauer S, Wajner M, de Mello CF, Goodman SI et al. (2004) Animal models for glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 27(6):813-818.
- Kofuji P, Newman EA (2004) Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129(4):1045-1056.
- Kokovay E, Li L, Cunningham LA (2006) Angiogenic recruitment of pericytes from bone marrow after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 26(4):545-555.
- Kölker S, Ahlemeyer B, Krieglstein J, Hoffmann GF (1999) 3-Hydroxyglutaric and glutaric acids are neurotoxic through NMDA receptors in vitro. *J Inherit Metab Dis* 22:259-262.
- Kölker S, Ahlemeyer B, Krieglstein J, Hoffmann GF (2000) Cerebral organic acid disorders induce neuronal damage via excitotoxic organic acids in vitro. *Amino Acids* 18:31-40.
- Kölker S, Ahlemeyer B, Krieglstein J, Hoffmann GF (2001) Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neurotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *Pediatr Res* 50:76-82.
- Kölker S, Okun JG, Ahlemeyer B, Wyse AT, Hörster F et al. (2002) Chronic treatment with glutaric acid induces partial tolerance to excitotoxicity in neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *J Neurosci Res* 68: 424-431.
- Kölker S, Hoffmann GF, Schor DS, Feyh P, Wagner L (2003) Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency: region-specific analysis of organic acids and acylcarnitines in post mortem brain predicts vulnerability of the putamen. *Neuropediatrics* 34(5):253-260.
- Kölker S, Christensen E, Leonard JV, Greenberg CR, Boneh A, et al. (2011) Diagnosis and management of glutaric aciduria type I—revised recommendations. *J Inherit Metab Dis* 34: 677-694.
- Krueger M, Bechmann I (2010) CNS pericytes: concepts, misconceptions, and a way out. *Glia* 58(1):1-10.
- Külkens S, Harting I, Sauer S, Zschocke J, Hoffmann GF et al. (2005) Late-onset neurologic disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neurol* 64:142-2144.
- Lai CH, Kuo KH. (2005) The critical component to establish in vitro BBB model: Pericyte. *Brain Res Rev* 50: 258 – 265.

- Lamp J, Keyser B, Koeller DM, Ullrich K, Braulke T, et al. (2011) Glutaric aciduria type 1 metabolites impair the succinate transport from astrocytic to neuronal cells. *J Biol Chem.* 286(20):17777-17784.
- Latini A, Ferreira GC, Scussiato K, Schuck PF, Solano AF, et al. (2007) Induction of oxidative stress by chronic and acute glutaric acid administration to rats. *Cell Mol Neurobiol* 27:423–438.
- Lima TT, Begnini J, de Bastiani J, Fialho DB, Jurach A et al. (1998) Pharmacological evidence for GABAergic and glutamatergic involvement in the convulsant and behavioral effects of glutaric acid. *Brain Res* 802(1-2):55-60.
- Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C (1997) Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 277:242–245.
- Lipkin PH, Roe CR, Goodman SI, Batshaw ML (1988) A case of glutaric acidemia type I: effect of riboflavin and carnitine. *J Pediatr* 112(1):62-65.
- Luissint AC, Artus C, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud PO (2012) Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS* 9(1):23.
- Lund TM, Christensen E, Kristensen AS, Schousboe A, Lund AM (2004) On the neurotoxicity of glutaric, 3-hydroxyglutaric, and trans-glutaconic acids in glutaric acidemia type 1. *J Neurosci Res* 77:143–147.
- Magni DV, Furian AF, Oliveira MS, Souza MA, Lunardi F et al. (2009) Kinetic characterization of L-[(3)H]glutamate uptake inhibition and increase oxidative damage induced by glutaric acid in striatal synaptosomes of rats. *Int J Dev Neurosci.* 27(1):65-72.
- Maier O, Hoekstra D, Baron W (2008) Polarity development in oligodendrocytes: sorting and trafficking of myelin components. *J Mol Neurosci* 35(1):35-53.
- Makita T, Sucov HM, Garipey CE, Yanagisawa M, Ginty DD (2008). Endothelins are vascular-derived axonal guidance cues for developing sympathetic neurons. *Nature* 452: 759–763.
- Marín-Padilla M. (2012) The human brain intracerebral microvascular system: development and structure. *Front Neuroanat* 6:38.
- Mark KS, Davis TP (2002) Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 282(4):H1485-494.
- Matyash V, Kettenmann H (2010) Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev* 63(1-2):2-10.
- Mayer M, Bhakoo K, Noble M (1994) Ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor promote the generation, maturation and survival of oligodendrocytes in vitro. *Development* 120:143–153.
- Mi H, Haeberle H, Barres BA (2001) Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *J Neurosci* 21(5):1538-1547.
- Monavari AA, Naughten ER (2000) Prevention of cerebral palsy in glutaric aciduria type 1 by dietary management. *Arch Dis Child* 82(1):67-70.
- Moore CS, Abdullah SL, Brown A, Arulpragasam A, Crocker SJ (2011) How factors secreted from astrocytes impact myelin repair. *J Neurosci Res.* 89(1):13-21.
- Morton DH, Bennett MJ, Seargeant LE, Nichter CA, Kelley RI (1991) Glutaric aciduria type I: a common cause of episodic encephalopathy and spastic paralysis in the Amish of Lancaster County, Pennsylvania. *Am J Med Genet* 41: 89–95.
- Mühlhausen C, Ergün S, Strauss KA, Koeller DM, Crnic L et al.(2004) Vascular dysfunction as an additional pathomechanism in glutaric aciduria type I. *J Inherit Metab Dis* 27(6):829-834.

- Mühlhausen C, Ott N, Chalajour F, Tilki D, Freudenberg F et al. (2006) Endothelial effects of 3-hydroxyglutaric acid: implications for glutaric aciduria type I. *Pediatr Res* 59(2):196-202.
- Mühlhausen C, Burckhardt BC, Hagos Y, Burckhardt G, Keyser B et al. (2008) Membrane translocation of glutaric acid and its derivatives. *J Inherit Metab Dis* 31(2):188-193.
- Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T (2009) A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int.* 54(3-4):253-263.
- Nash B, Thomson CE, Lington C, Arthur AT, McClure JD et al. (2011) Functional duality of astrocytes in myelination. *J Neurosci* 31:13028-31308.
- Neumaier-Probst E, Harting I, Seitz A, Ding C, Kölker S. Neuroradiological findings in glutaric aciduria type I (glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency) *J Inherit Metab Dis* 27:869–876.
- Nicolay DJ, Doucette JR, Nazarali AJ (2007) Transcriptional control of oligodendrogenesis. *Glia* 55(13):1287-1299.
- Noble M, Murray K (1984) Purified astrocytes promote the in vitro division of a bipotential glial progenitor cell. *EMBO J* 3(10):2243-2247.
- Noble M, Mayer-Pröschel M, Miller RH (2005) The Oligodendrocyte. En *Developmental Neurobiology*. Mahendra S Rao, Marcus Jacobson, eds. 4th Ed. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.
- Oldendorf WH, Cornford ME, Brown WJ (1977) The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol* 1(5):409-417.
- Olivera S, Fernandez A, Latini A, Rosillo JC, Casanova G, et al. (2008) Astrocytic proliferation and mitochondrial dysfunction induced by accumulated glutaric acidemia I (GAI) metabolites: possible implications for GAI pathogenesis. *Neurobiol Dis* 32: 528–534.
- Olivera-Bravo S, Fernández A, Sarlabós MN, Rosillo JC, Casanova G et al. (2011) Neonatal astrocyte damage is sufficient to trigger progressive striatal degeneration in a rat model of glutaric acidemia-I. *PlosOne* 6: e20831-20840.
- Ozog MA, Bechberger JF, Naus CC (2002) Ciliary neurotrophic factor (CNTF) in combination with its soluble receptor (CNTFRalpha) increases connexin43 expression and suppresses growth of C6 glioma cells. *Cancer Res* 62(12):3544-3548.
- Pardridge WM (2005) Molecular biology of the blood-brain barrier. *Molec Biotech* 30:57-68.
- Park CK, Ju WK, Hofmann HD, Kirsch M, Ki Kang J (2000) Differential regulation of ciliary neurotrophic factor and its receptor in the rat hippocampus following transient global ischemia. *Brain Res* 861(2):345-353.
- Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. (2006) Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* 443:700–704.
- Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD (2006) Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol.* 1(3):223-236.
- Peters A, Palay SL, Webster HF. (1991) The neuroglial cells. En *The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells*. A. Peters, S.L. Palay & H. de F. Webster, eds. 3rd Ed. Oxford University Press.
- Rákos G, Kis Z, Nagy D, Lur G, Farkas T (2007) Evans Blue fluorescence permits the rapid visualization of non-intact cells in the perilesional rim of cold-injured rat brain. *Acta Neurobiol Exp* 67:149-154.

- Richter-Landsberg C, Heinrich M (1996) OLN-93: a new permanent oligodendroglia cell line derived from primary rat brain glial cultures. *J Neurosci Res* 45(2):161-173.
- Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386(6626):671-674.
- Robertson PL, Du Bois M, Bowman PD, Goldstein GW (1985) Angiogenesis in developing rat brain: an in vivo and in vitro study. *Brain Res* 355(2):219-223.
- Rosa RB, Dalcin KB, Schmidt AL, Gerhardt D, Ribeiro CA et al. (2007) Evidence that glutaric acid reduces glutamate uptake by cerebral cortex of infant rats. *Life Sci* 81(25-26):1668-1676.
- Rubin LL, Hall DE, Porter S, Barbu K, Cannon C (1991) A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol* 115(6):1725-1735.
- Sauer SW, Okun JG, Fricker G, Mahringer A, Muller I, et al. (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. *J Neurochem* 97:899–910.
- Sauer SW, Opp S, Mahringer A, Kamiński MM, Thiel C et al. (2010) Glutaric aciduria type I and methylmalonic aciduria: simulation of cerebral import and export of accumulating neurotoxic dicarboxylic acids in in vitro models of the blood-brain barrier and the choroid plexus. *Biochim Biophys Acta* 1802(6):552-560.
- Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y et al. (2004). Endothelial cells stimulate selfrenewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304: 1338–1340.
- Shepro D, Morel NM (1993) Pericyte physiology. *FASEB J* 7(11):1031-1038.
- Silbereis JC, Huang EJ, Back SA, Rowitch DH (2010) Towards improved animal models of neonatal white matter injury associated with cerebral palsy. *Dis Model Mech* 3(11-12):678-688.
- Singh P, Goraya JS, Ahluwalia A, Saggarr K (2011) Teaching NeuroImages: Glutaric aciduria type 1 (glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency). *Neurology* 77(1):e6.
- Sofroniew MV (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32(12):638-647.
- Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119(1):7-35.
- Stevens B, Porta S, Haak LL, Gallo V, Fields RD (2002) Adenosine: a neuron-glial transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. *Neuron* 36(5):855-868.
- Strauss KA, Puffenberger EG, Robinson DL, Morton DH (2003) Type I glutaric aciduria, part 1: natural history of 77 patients. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 121C:38–52.
- Strauss KA, Donnelly P, Wintermark M (2010) Cerebral haemodynamics in patients with glutaryl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Brain* 133:76-92.
- Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Libionka W et al. (2006) Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci* 9(2):260-267.
- Tao-Cheng JH, Nagy Z, Brightman MW (1987) Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *J Neurosci* 7(10):3293-3299.
- Tigges U, Welser-Alves JV, Boroujerdi A, Milner R (2012) A novel and simple method for culturing pericytes from mouse brain. *Microvasc Res* 84(1):74-80.
- Trapp BD, Nishiyama A, Cheng D, Macklin W (1997) Differentiation and death of premyelinating oligodendrocytes in developing rodent brain. *J Cell Biol* 137(2):459-468.
- Trushina E and McMurray CT (2007) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Neuroscience* 145:1233-1248.
- Twomey EL, Naughten ER, Donoghue VB, Ryan S (2003) Neuroimaging findings in glutaric aciduria type 1. *Pediatr Radiol* 33:823–830.

- Ullrich K, Flott-Rahmel B, Schluff P, Musshoff U, Das A et al. (1999) Glutaric aciduria type I: pathomechanisms of neurodegeneration, *J Inherit Metab Dis* 22:392–403.
- Varadkar S, Surtees R (2004) Glutaric aciduria type I and kynurenine pathway metabolites: a modified hypothesis. *J Inherit Metab Dis* 27(6):835-842.
- Vargas MR, Pehar M, Cassina P, Beckman J, Barbeito L (2006) Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR – dependent motor neuron apoptosis. *J Neurochem* 97:687-696.
- von Tell D, Armulik A, Betsholtz C (2006) Pericytes and vascular stability. *Exp Cell Res* 312(5):623-639.
- Wasseff SK, Scherer SS (2011) Cx32 and Cx47 mediate oligodendrocyte:astrocyte and oligodendrocyte:oligodendrocyte gap junction coupling. *Neurobiol Dis* 42(3):506-513.
- Watkins TA, Emery B, Mulinyawe S, Barres BA (2008) Distinct stages of myelination regulated by gamma-secretase and astrocytes in a rapidly myelinating CNS coculture system. *Neuron* 60: 555-569.
- Willis CL (2011) Glia-induced reversible disruption of blood-brain barrier integrity and neuropathological response of the neurovascular unit. *Toxicol Pathol* 39(1):172-185.
- Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV (2011) Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat Neurosci* 14(11): 1398-1405.
- Xu J, Ling E (1993) Studies of the ultrastructure and permeability of the blood-brain barrier in the developing corpus callosum in postnatal rat brain using electron dense tracers. *J Anat* 184:227-237.
- Yang Z, Watanabe M, Nishiyama A (2005) Optimization of oligodendrocyte progenitor cell culture method for enhanced survival. *J Neurosci Methods* 149:50-56.
- Yoshino J, Monkawa T, Tsuji M, Hayashi M, Saruta T (2003) Leukemia inhibitory factor is involved in tubular regeneration after experimental acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 14(12):3090-101.
- Young IS and Woodside JV (2001) Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 54:176- 186.
- Zhang Y, Barres BA (2010) Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Curr Opin Neurobiol* 20(5):588-594.
- Zinnanti WJ, 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(Pt 4):899-910.
- Zinnanti WJ, Lazovic J, Housman C, LaNoue K, O'Callaghan JP et al. (2007) Mechanism of age-dependent susceptibility and novel treatment strategy in glutaric acidemia type I. *J Clin Invest* 117(11):3258-3270.
- Zlokovic BV, Apuzzo ML (1998) Strategies to circumvent vascular barriers of the central nervous system. *Neurosurgery* 43(4):877-878.
- Zlokovic BV (2008) The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57(2):178-201.

Anexo I

Soluciones y geles utilizados en *Western Blotting*

Buffer de lisis para células (100 ml)

50mM HEPES, 50mM NaCl, 0.5% Tritón X-100, 1 pastilla de inhibidores de proteasas SIGMAFAST™ (S8830, SIGMA).

Búffer de lisis para tejido (100 ml)

4mM EDTA, 1 pastilla de inhibidores de proteasas SIGMAFAST™ (S8830, SIGMA) en PBS 0.01M (pH=7.4).

Buffer de corrida (10x, 1L, pH=8.2)

30.3 g Tris, 14.4 g glicina, 10 g SDS, diluir en 1000ml de agua destilada.

Buffer de transferencia (1L)

3.03 g Tris, 14.4 g glicina, 200ml de etanol 95% o metanol, diluir en 800 ml de agua destilada.

Buffer TBS (10x, 1L)

24.2 g Tris, 87.66 NaCl, diluir en 1L de agua destilada.

Gel separador (“resolving”) 10% (25 ml)

10 ml H₂O MiliQ, 8.3 ml de la mezcla de acrilamida 30% (acrilamida: bisacrilamida, 30:1), 6.3 ml Tris 1M (pH=8.8), 0.25 ml SDS 10%, 0.25 ml persulfato de amonio 10%, 0.015 ml TEMED (N, N,N,N'-tetrametilendiamina).

Gel concentrador (“stacking”) 4% (8ml)

5.5 ml H₂O MiliQ, 1.3 ml mezcla acrilamida 30% (acrilamida:bisacrilamida, 30:1), 1 ml Tris 1M (pH=6.8), 0.08 ml SDS 10%, 0.08 ml APS 10%, 0.08 ml TEMED.