

Montevideo, Setiembre 2013

**TESIS DE MAESTRÍA
PEDECIBA BIOLOGÍA
BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**

**Estudio sobre un marcador molecular de
astrocitos aberrantes en Esclerosis Lateral
Amiotrófica.**

**Lic. Natalia Puig
Orientador: Dr. Luis Barbeito**

RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas tienen una creciente incidencia y un alto costo socioeconómico en las sociedades modernas. No existen métodos para su diagnóstico temprano ni tratamientos curativos, por lo que urge investigar sobre biomarcadores genómicos o moleculares. El presente trabajo se ha enfocado en un modelo animal de Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), una enfermedad mortal causada por la degeneración progresiva de motoneuronas que cursa con parálisis muscular progresiva. La muerte neuronal está fuertemente influenciada por las células gliales que aparecen como actores claves en el progreso degenerativo y la progresión de la enfermedad. Recientemente nuestro laboratorio ha reportado un nuevo fenotipo astrocitario (referido como Astrocitos Aberrantes -AbA-) directamente asociado a la muerte de motoneuronas en ratas transgénicas SOD1^{G93A} que desarrollan parálisis progresiva. Estas células poseen una capacidad proliferativa aumentada y potente actividad neurotóxica para motoneuronas. También existe evidencia preliminar que las células AbAs existen en casos humanos de ELA, lo que sugiere que su identificación molecular podría tener importante valor diagnóstico y pronóstico. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue encontrar y caracterizar un marcador molecular específico de células AbAs que permita diferenciarlas de otros tipos de células astrocitarias. Para ello se utilizó la técnica de microarreglos para determinar el perfil transcripcional de las células AbAs en comparación con otros tipos de astrocitos (transgénicos SOD1^{G93A} y no transgénicos). Dicho estudio reveló diferencias relevantes entre las células AbAs y las otras dos poblaciones astrocitarias. Entre ellas, se identificó en las células AbAs la sobre-expresión en casi 20 veces de la “Proteína de Queratinocitos Rica en Prolina” (Keratinocyte Proline-rich Protein -KPRP-). Por esta razón, KPRP fue seleccionada como un marcador molecular de las células AbAs. Se diseñaron y desarrollaron anticuerpos específicos poli-clonales para KPRP de rata y sondas de ARN complementarias al ARN mensajero de *kprp* de rata. Estas herramientas permitieron demostrar por primera vez en la literatura la expresión de KPRP en la fase sintomática de la ELA en ratas SOD1^{G93A} mediante inmunohistoquímica (IHQ) e hibridación *in situ* fluorescente (FISH), y su localización en células AbAs. Los resultados obtenidos sugieren a KPRP como una nueva proteína asociada a la neurodegeneración, lo que representa un hallazgo original y con potencial aplicación diagnóstica.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer especialmente al Dr. Luis Barbeito por la generosidad con su tiempo y conocimientos, brindándome todas las herramientas necesarias para llevar a cabo este trabajo y crecer como investigador.

A Emiliano Trías y Pablo Díaz-Amarilla por su colaboración.

A Gabriela Libisch, Gonzalo Greiff y Carlos Robello por su colaboración con el estudio de microarreglos.

A Gonzalo Obal y Lorena Tomé por sus consejos técnicos.

A mis compañeros de laboratorio.

A la ANII por financiar los estudios.

A todo el personal de Institut Pasteur de Montevideo.

Y a mi esposo, padres y hermanos por ser mi pilar.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA).....	5
1.2 MODELOS MURINOS DE ELA: ANIMALES QUE SOBRE-EXPRESAN LA SOD1 ^{G93A} HUMANA (HSOD1 ^{G93A}).....	7
1.3 CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA MÉDULA ESPINAL DE RATONES HSOD1 ^{G93A}	8
1.4 TOXICIDAD SIN AUTONOMÍA CELULAR	9
1.5 ASTROCITOS FENOTÍPICAMENTE ABERRANTES EN UN MODELO MURINO DE ELA.....	12
1.6 PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LOS ASTROCITOS HSOD1 ^{G93A}	15
1.7 NEUROINFLAMACIÓN	16
1.8 ACTIVACIÓN GLIAL EN LA ELA	18
1.9 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA	20
1.10 CITOQUINAS	24
1.11 DESDE EL MODELO ANIMAL A ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS	25
2. HIPÓTESIS	28
3. OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GENERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
5.1 OBTENCIÓN DE ARN DE ASTROCITOS NO TRANSGÉNICOS, TRANSGÉNICOS Y ABERRANTES.....	48
5.2 MICROARREGLOS DE LOS TRES TIPOS ASTROCITARIOS Y ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.	49
5.3 IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES DE CÉLULAS AbA.....	62
5.4 DISEÑO Y SÍNTESIS DE HERRAMIENTAS MOLECULARES (ANTICUERPOS Y SONDAS DE ARN) QUE PERMITAN LA CARACTERIZACIÓN ESPECÍFICA DE CÉLULAS AbA.	65
5.5 VALIDACIÓN DE LOS MARCADORES DE CÉLULAS AbA MEDIANTE WESTERN BLOT, INMUNOCITOQUÍMICA E HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i>	71
5.5.a <i>Análisis de la expresión de KPRP en las células AbA mediante Western blot.</i>	71
5.5.b <i>Expresión de kprp en cultivo de células AbA y glias espinales SOD1^{G93A} -/-.</i>	73
5.5.c <i>Expresión de KPRP en cultivo de células AbA y glias espinales SOD1^{G93A} -/-.</i>	76
5.6. CARACTERIZACIÓN <i>IN SITU</i> DE CÉLULAS AbA MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA E HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> EN CORTES DE MÉDULA ESPINAL DE RATAS SOD1G93A+/- Y SOD1G93A +/-.....	78
5.6.a <i>Expresión de KPRP en la médula espinal de ratas SOD1^{G93A} +/- y -/-.</i>	78
5.6.b <i>Expresión de kprp en la médula espinal de ratas SOD1G93A +/- y -/-.</i>	80
6. CONCLUSIONES	86
7. PERSPECTIVAS	87
ANEXO I: CALIDAD DEL ARN UTILIZADO PARA EL ANÁLISIS POR MICROARREGLOS	89
ANEXO II: VALIDACIÓN DE LOS DATOS DE LOS MICROARREGLOS	91
ANEXO III: OBTENCIÓN DEL VECTOR PGEM LINEAL CON EXTREMOS COHESIVOS SPEI Y NCOI	99
ANEXO IV: SECUENCIA DEL INSERTO CLONADO EN EL VECTOR PGEM	100
8. BIBLIOGRAFÍA	101

1. INTRODUCCIÓN

Todavía se desconocen las causas últimas que llevan a la muerte progresiva de poblaciones neuronales en enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Huntington y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). Al mismo tiempo, no existen tratamientos efectivos para prevenir o curar estas patologías. Hasta recientemente, el foco principal de los estudios han sido precisamente las diferentes poblaciones de neuronas degenerantes, sin considerar su entorno celular incluyendo células gliales como astrocitos y microglia.

1.1 La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)

La ELA es una enfermedad paradigmática de otras enfermedades neurodegenerativas. Fue descrita por primera vez en 1869 por el clínico y neurobiólogo Jean-Martin Charcot (Charcot and Joffroy, 1869) quien observó una "palidez de mielina" distinta en las porciones laterales de la médula espinal.

En la ELA se ven afectadas principalmente las motoneuronas superiores e inferiores, de la corteza cerebral y de la médula espinal y tronco encefálico, respectivamente. La pérdida de motoneuronas resulta en debilidad, atrofia muscular, fasciculaciones, así como en hiper-reflexia con espasticidad. La progresión de la enfermedad culmina en la muerte del paciente por falla respiratoria pocos años después de haber realizado el diagnóstico. La incidencia mundial de la ELA es de 2 cada 100.000 individuos. El promedio de edad comienzo son los 55-60 años, con un curso normal de uno a dos años, y comúnmente afecta más a los hombres que a las mujeres (Ferraiuolo et al., 2011).

Tradicionalmente, la ELA ha sido considerada como un desorden puramente motor. Sin embargo, estudios recientes han puesto de manifiesto la participación de vías sensoriales y cerebelosas, como también grupos neuronales de la *Substancia nigra* y de la capa granular del dentado hipocámpal. Por lo tanto la ELA puede ser considerada una enfermedad de carácter sistémico, en la cual las motoneuronas tienden a ser afectadas tempranamente y de forma más severa. Si bien se han propuesto numerosas hipótesis para explicar la pérdida progresiva de motoneuronas, los mecanismos moleculares precisos que llevan a la ELA permanecen siendo desconocidos (Ilieva et al., 2009).

Aproximadamente el 90% de los casos de ELA se clasifican como esporádicos (SALS), definidos por carecer de antecedentes familiares de la enfermedad. Los casos restantes son heredados de una manera dominante, ELA familiar (FALS). La FALS y la SALS son clínicamente indistinguibles, afectando a las mismas poblaciones neuronales, pero inclusive dentro de las formas familiares, la aparición de los síntomas, así como la duración de la enfermedad varía considerablemente (Gurney et al., 1994, Buijn et al., 1997a, Howland et al., 2002a).

El 20% de los casos de FALS se asocian a mutaciones en la enzima Cu/Zn Superóxido Dismutasa 1 (SOD1- Rosen et al., 1993-). La enzima SOD1 se encuentra de forma soluble en el citoplasma celular y en el espacio inter-membrana de la mitocondria. Es de expresión ubicua y se encuentra en abundancia en todos los tejidos. La función de esta enzima es la desintoxicación mediante la conversión del radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$), un producto natural de la respiración mitocondrial, hacia agua o peróxido de hidrogeno (H_2O_2).

A la fecha, se han identificado, en pacientes de FALS, más de 160 mutaciones diferentes en la SOD1 (Cui et al., 2013). Las numerosas mutaciones de la SOD1 generan especies proteicas con un plegado anormal, que conllevan a una ganancia de función, sin pérdida de la actividad dismutasa. Se han señalado variados mecanismos patogénicos de las mutaciones SOD1 a nivel celular, incluyendo una actividad redox anormal que produce estrés oxidativo (Beckman et al., 2001) disfunción mitocondrial y estrés de retículo (Liu et al., 2004). Fundamentalmente, la toxicidad de las mutaciones en la SOD1 se reflejan en cambios en las interacciones celulares, lo que ha llevado al concepto de “toxicidad sin autonomía celular” del inglés “non-cell autonomous toxicity” que retomaremos más adelante (Clement et al., 2003, Ilieva et al., 2009).

Respecto a la SALS se desconocen aún las causas que llevan a la misma. Recientemente se ha observado que proteínas como la proteína de unión al ADN TAR 43 (TDP43) y la proteína fusionada en sarcoma (FUS), involucradas en el procesamiento y funcionamiento del ARN, forman agregados proteicos en casos de SALS, indicando nuevos mecanismos patogénicos a nivel celular (Ferraiuolo et al., 2011). Asimismo, se han observado, en muestras de médula espinal de pacientes SOD1 normales, cambios conformacionales en la SOD1 similares a los observados para las mutaciones en dicha enzima en FALS. Así como también hay evidencia que los pacientes de SALS presentan un nivel de ARNm SOD1 elevado respecto a los controles (Milani et al., 2013). Estos hallazgos sugieren que la SOD1 normal también contribuye al mecanismo patogénico de la enfermedad. Por lo que es altamente probable que los hallazgos en la FALS (modelos animales y pacientes humanos) sean relevantes para estudios en la SALS.

En base a las distintas mutaciones de la SOD1 se han desarrollado variados modelos murinos de ELA. Se utilizan extensamente ratones y ratas que sobre-expresan la proteína SOD1 humana mutante (Gurney, 1994, Nagai et al., 2001). El fenotipo de estos animales es similar al humano, con degeneración de motoneuronas, parálisis progresiva y muerte que ocurre entre los 4 y 7 meses de edad. Estos han sido ampliamente utilizados para pruebas pre-clínicas de drogas, algunas de las cuales han resultado en terapias que mejoran el transcurso de la enfermedad.

1.2 Modelos murinos de ELA: animales que sobre-expresan la SOD1^{G93A} humana (hSOD1^{G93A})

Los ratones y ratas que expresan las formas mutantes de la SOD1 humana o murina, desarrollan, al igual que los pacientes de ELA, una degeneración progresiva de motoneuronas (Gurney et al., 1994, Ripps et al., 1995, Bruijn et al., 1997b, Howland et al., 2002b, Sjoberg et al., 2004, Nagai et al., 2007). La mayor parte del conocimiento de los mecanismos de esta enfermedad provienen de estudios en estos modelos. El fenotipo de estos animales es muy similar al humano, con degeneración de motoneuronas, parálisis progresiva y muerte que ocurre entre los 4 y los 7 meses de edad.

Un modelo de ELA extensamente utilizado son las ratas transgénicas que sobre-expresan la mutación SOD1^{G93A} humana. La mutación G93A, donde el residuo 93 de la SOD1 correspondiente a una Glicina se sustituye por una Alanina, genera una proteína mutante con actividad dismutasa (Borchelt et al., 1994). Los pacientes portadores de dicha mutación exhiben un curso clínico clásico fulminante (Cudkowicz et al., 1997). Las ratas hSOD1^{G93A} desarrollan una enfermedad de motoneuronas siendo la disminución espontánea de la actividad motora el primer signo patológico (aproximadamente a los 110 días). Mas tarde, a los 122.9 ± 14.1 días aparece la debilidad clínica aparente, la cual comienza unilateralmente, denotada por el arrastre de un miembro inferior sin temblor con una pérdida de peso significativa que progresa de manera bilateral. A medida que la patología avanza, las ratas exhiben gran pérdida de masa muscular en las extremidades posteriores y por lo general se arrastran alrededor de la jaula con las patas delanteras. A partir de entonces, las extremidades delanteras también adquieren debilidad, en asociación con una mayor pérdida de peso. En la etapa final, las ratas afectadas no pueden beber agua lo que conlleva a la muerte. La duración promedio de la expresión clínica de la enfermedad es de 8.3 ± 0.7 días (Nagai et al., 2001).

1.3 Cambios en la expresión génica en la médula espinal de ratones hSOD1^{G93A}.

Se han realizado estudios comparativos entre la expresión génica en la médula espinal de ratones hSOD1^{G93A} y sus pares no transgénicos (Olsen et al., 2001, Yoshihara et al., 2002). En la etapa pre-sintomática de la enfermedad (11 semanas) se encuentran sobre-regulados genes de la respuesta inflamatoria como el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) concomitante al aumento de la expresión en genes relacionados a la apoptosis como la caspasa 1 (Yoshihara et al., 2002). Al comienzo de la parálisis (3 meses) se observa una extensa activación glial, seguida de la activación de genes involucrados en la regulación de iones metálicos (metallotioneína-I, metallotioneína-II, ferritina-H y ferritina-L) antes de la etapa final de la enfermedad (Olsen et al., 2001).

En comparación a la etapa pre-sintomática tardía (80 días), durante la fase sintomática de la enfermedad (120 días) se observa en la médula espinal una sobre-regulación de citoquinas incluyendo la interleuquina 1 alpha (IL1- α), interleuquina 1 beta (IL1- β) y el receptor antagonista de IL-1 (IL1-RA). Asimismo, se observa una sobre-expresión de genes relacionados a la apoptosis como caspasas y receptores de muerte celular (Hensley et al., 2002).

De acuerdo a la evidencia patológica, en los ratones hSOD1^{G93A} el sitio más afectado es la región lumbar de la médula espinal representado el sitio principal de pérdida de motoneuronas y proliferación de células microgliales y astrocitos. Al igual que los pacientes de ELA, estos ratones exhiben una parálisis o debilidad progresiva de ambas extremidades inferiores. Asimismo, la expresión de la SOD1 mutante en los ratones es mayor en la región lumbar de la médula espinal (Huifang et al., 2010).

La región lumbar de la médula espinal de ratones sintomáticos tempranos que sobre-expresan de manera sistémica la hSOD1^{G93A} (C57BL/6J-SOD1-G93A) presenta diferencias mayores a 2 (con un $p < 0.05$) respecto a sus pares no transgénicos en la expresión de 322 transcritos (correspondiente al 2.2% de los transcritos analizados). De estos transcritos, el 95.96% se encuentra sobre-regulado y el 4.04% sub-regulado en presencia de la SOD1 mutante. Estos resultados sugieren que la expresión de la SOD1 mutante en la región lumbar de la médula espinal tiene como consecuencia un marcado grado de aumento transcripcional al comienzo de la enfermedad (Huifang et al., 2010).

Principalmente el cambio se observa en genes involucrados en la adhesión celular, en la respuesta inflamatoria e inmunitaria, en la adhesión leucocitaria, en el complejo de integrinas, en la vía de señalización mediante integrinas y en la activación de la actividad MAPK (fig., 1). Coincidente a la activación microglial en etapas muy tempranas de la enfermedad, se observa una significativa sobre-regulación del marcador microglial CD68 (Huifang et al., 2010).

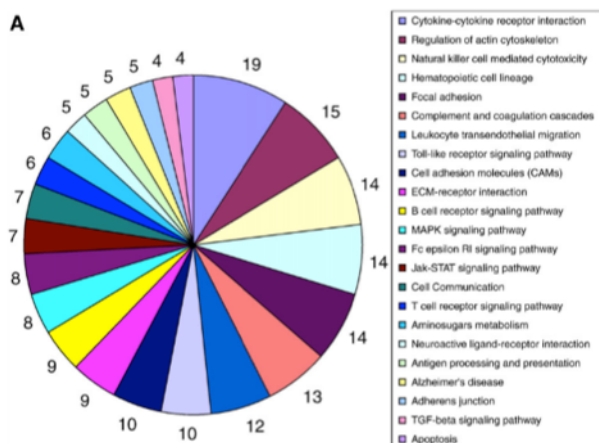


Figura 1. Genes diferencialmente expresados en la región lumbar de la médula espinal de ratones hSOD1^{G93A} al comienzo de los síntomas. Los números indican el número de genes implicados en la vía. Extraído de Huifang et al., 2010.

En concordancia a la evidencia que una dieta rica en grasas extiende la sobrevida y previene la muerte de moto neuronas en el modelo animal (Fergani et al., 2007) y en pacientes de ELA (Dupuis et al., 2008), en la región lumbar de la médula espinal de ratones hSOD1^{G93A} se observó un aumento significativo en la expresión de la Lipoprotein Lipasa (LPL). La LPL tiene un rol central en el catabolismo de triglicéridos, hidrolizando quilomicrones y VLDL. El aumento en su expresión indicaría un estado lipídico hiper-metabólico (Huifang et al., 2010).

1.4 Toxicidad sin autonomía celular

Si bien en los ratones SOD1 mutantes la expresión del transgen se da de manera sistémica, la degeneración celular ocurre casi únicamente en las motoneuronas. La expresión selectiva de la SOD1 mutante en las motoneuronas resulta únicamente en anomalías moderadas y no en la degeneración de las mismas (Pramatarova et al., 2001, Lino et al., 2002). Inversamente la expresión selectiva en astrocitos o microglías tampoco resulta en la degeneración de motoneuronas (Gong et al., 2000, Beers et al., 2006). Estos estudios ponen en evidencia que la expresión de la SOD1 mutante en motoneuronas es necesaria pero no suficiente para generar la patología, las células circundantes como los astrocitos y las microglías contribuyen de forma significativa a la degeneración de las mismas. A este concepto se le llama "Toxicidad sin autonomía celular".

Se desconoce en la actualidad cómo interaccionan funcionalmente las microglías y los astrocitos para acelerar la progresión de la enfermedad. Ambos tipos celulares liberan factores que pueden influenciar al otro (Boillee et al., 2006, Wang et al., 2010). Al presente la evidencia

sugiere que las proteínas mutantes en las motoneuronas determinan el comienzo y las etapas tempranas de la enfermedad, mientras que la SOD1 mutante en la microglia y los astrocitos determinan principalmente el progreso y duración de la misma (Yamanaka et al., 2008, Wang et al., 2010). La noción que la muerte de motoneuronas en la ELA es sin autonomía celular fue apoyada por un estudio utilizando ratones quiméricos en los cuales solo algunas de las células expresaban la SOD1 mutante (Clement et al., 2003). Asimismo la eliminación específica de la SOD1 mutante en motoneuronas retrasa el comienzo de la enfermedad pero no la detiene (Boillee et al., 2006, Yamanaka et al., 2008). Inversamente, la expresión de la SOD1 mutante en células no neuronales como las células mieloides o astrocitos conduce a una aceleración de los eventos neurodegenerativos de la patología, afectando de esta manera el progreso y no el comienzo de la enfermedad (Boillee et al., 2006, Yamanaka et al., 2008). La importancia de la microglia se justifica en los experimentos de trasplante. El trasplante de médula ósea en ratones mutantes SOD1 que expresan PU^{-/-}, por lo que carecen de células mieloides, células T y células B, resulta en una población de células mieloides normales mientras que el resto de las células expresan la SOD1 mutante. Esto disminuye significativamente la progresión de la enfermedad y mejora la supervivencia.

La contribución de la microglia a la degeneración de motoneuronas parece ser dependiente de las células T (Appel et al., 2010). Las células T (CD4⁺), independientemente si expresan o no la proteína mutante, son protectoras en el modelo murino de ELA mediante la promoción de la microglia M2 sobre la M1. En etapas tempranas de la enfermedad, las células T raramente se detectan en el SNC, pero se infiltran rápidamente en la médula espinal a medida que la enfermedad progresa (Beers DR, 2008). Cuando se eliminan las células T, el curso de la enfermedad, en ratones SOD1 mutantes, se acelera significativamente. La transferencia adoptiva de células T reguladoras o T efectoras de ratones donantes normales retrasa la pérdida de la función motora y extiende la supervivencia (Banerjee et al., 2008). La contribución de las células T puede cambiar a lo largo del tiempo. Las células T citotóxicas en la etapa final de la enfermedad pueden predominar, explicando porque la acción neuroprotectora falla a la larga.

Los astrocitos y las neuronas forman una unidad funcional altamente especializada. Mientras que las neuronas integran información y forman circuitos sinápticos, los astrocitos adyacentes proveen un soporte estructural, metabólico y neurotrófico a la neurona. Participan además modulando la excitabilidad neuronal y la neurotransmisión, incluyendo la función primordial de capturar el glutamato sináptico por transportadores específicos (Bosch and Robberecht, 2008, Rossi and Volterra, 2009). Los astrocitos activados con estímulos inflamatorios sufren una

transformación fenotípica duradera que los hace neurotóxicos para motoneuronas en condiciones de co-cultivo (Cassina et al., 2002, Cassina et al., 2005). Esto llevó a postular la hipótesis que los astrocitos contribuyen a la muerte de motoneuronas en la ELA. En condiciones de co-cultivo la toxicidad es mediada, por lo menos en parte, por el aumento en la producción de factor de crecimiento nervioso (NGF) y óxido nítrico (NO) en los astrocitos activados (Pehar et al., 2004, Pehar et al., 2007). Estudios posteriores demostraron que los astrocitos que expresan la mutación hSOD1^{G93A} ejercen toxicidad sobre motoneuronas, sin necesidad de ser estimulados por mediadores inflamatorios (Pehar et al., 2006, Vargas et al., 2006). Esta actividad tóxica para motoneuronas es sorprendente ya que los astrocitos se caracterizan en general por producir condiciones neurotróficas. Los astrocitos que expresan la mutación hSOD1^{G93A} exhiben una producción elevada de NO (Vargas et al., 2006) y de otras especies reactivas como superóxido y peroxinitrito (Cassina et al., 2008). Estas especies participan en la regulación de la respiración mitocondrial. De hecho, los astrocitos hSOD1^{G93A} presentan una reducción importante en la respiración mitocondrial y una pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Cassina et al., 2008). En este estudio se demostró además una asociación entre la disfunción mitocondrial y la toxicidad de los astrocitos, por cuanto la toxicidad pudo ser revertida por antioxidantes mitocondriales que normalizan la toxicidad mitocondrial.

La toxicidad de los astrocitos transgénicos fue replicada también por otros autores utilizando diversas aproximaciones experimentales, demostrando además que la toxicidad es específica para las motoneuronas (Di Giorgio et al., 2007, Nagai et al., 2007, Di Giorgio et al., 2008, Marchetto et al., 2008) y es mediada por factores secretados (Nagai et al., 2007, Di Giorgio et al., 2008).

Recientemente se ha demostrado que los astrocitos humanos derivados de la médula espinal de pacientes de SALS y FALS comparten una toxicidad sin autonomía celular en modelo de co-cultivo, que resulta en la muerte selectiva de las motoneuronas (Haidet-Phillips et al., 2011). Los mismos, en co-cultivo con motoneuronas, exhiben una sobre-expresión de genes inflamatorios y al igual que lo observado para los modelos murinos, dicha toxicidad específica es mediada por factores secretados. Este hallazgo lleva a importantes y relevantes conclusiones sobre la patogenia de la ELA:

- I. tanto los astrocitos de pacientes de ELA como aquellos de modelos murinos de la enfermedad son tóxicos para las motoneuronas, sugiriendo un factor de vulnerabilidad potencialmente importante en la progresión de la enfermedad.

II. la toxicidad de los astrocitos es independiente de mutaciones de la SOD1, lo que sugiere que el fenotipo astrocitario está asociado al entorno neurodegenerativo y no necesariamente a la expresión de una mutación deletérea.

La contribución de los astrocitos ha sido investigada también en estudios de trasplante. Las células normales destinadas a ser precursores gliales han sido trasplantadas en la región cervical de la médula espinal de ratas SOD1 mutantes (Lepore et al., 2008b). Estas células se diferencian en astrocitos GFAP positivos que rescatan a las motoneuronas, causando un aumento significativo en la supervivencia (Lepore et al., 2008b). Se postula que este beneficio puede ser consecuencia de un aumentado barrido del glutamato por las células precursoras.

Se desconoce si la toxicidad observada para motoneuronas en la ELA es mediada por toda la población de astrocitos presentes o por una subclase específica de los mismos. Dado que los astrocitos que expresan formas mutantes de la SOD1 son más propensos a entrar en un estado inflamatorio activado y meta-estable (Hensley et al., 2006) podría resultar que una subpoblación de astrocitos sufra una transición fenotípica deletérea para la supervivencia de las motoneuronas.

1.5 Astrocitos fenotípicamente aberrantes en un modelo murino de ELA.

La predicción de la existencia de una subpoblación de astrocitos, neurotóxicos e invasivos en la ELA concluyó con el aislamiento de los astrocitos aberrantes (AbA- Díaz-Amarilla et al., 2011-). Las células AbA son astrocitos de fenotipo aberrante, aislados de la médula espinal de ratas adultas que expresan la mutación hSOD1^{G93A} y que se encuentran en la fase sintomática de la enfermedad. Su aislamiento se basó en su marcada capacidad proliferativa y la falta de senescencia replicativa en cultivo, lo cual permitió la expansión oligoclonal durante meses. Al igual que los astrocitos neonatales, las células AbAs expresan la mayoría de los típicos marcadores astrocitarios como la Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP), la vimentina, la proteína de unión a calcio s100 β , la conexina 43 (Cx43) y la glutamina sintetasa (GS) pero carecen del transportador de aminoácidos excitatorios 2 (GLT1 en roedores o EAAT2 en humanos). Como se aprecia en la fig.,2 contrariamente al intenso marcaje filamentoso observado para GFAP en los astrocitos neonatales, las AbAs exhiben un marcaje de GFAP tenue, perinuclear y difuso. Además, mientras que s100 β tiene una señal débil en los astrocitos neonatales, en las células AbAs s100 β exhibe una marcación intensa. Las células AbAs no expresan marcadores de

progenitores gliales, de progenitores de oligodendrocitos ni de microglia fagocítica como la glicoproteína neuronal/glial 2 (NG2), el antígeno A2B5, el factor de transcripción oligodendrocitario, y CD68.

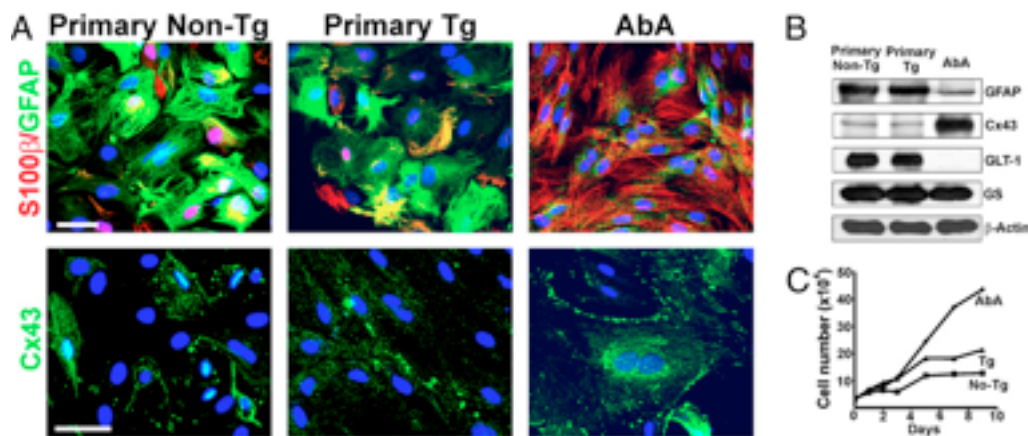


Figura 2. Expresión de marcadores típicamente astrocitarios y de proliferación en las AbA. Comparación de astrocitos neonatales hSOD1G93A +/- (Tg), hSOD1G93A -/- (N-Tg) y células AbA en cultivo. (A) Inmunotinción para: GFAP (verde superior) y s100β (rojo) y conexina 43 (verde inferior). (B) Análisis por western blot de marcadores astrocitarios: se observa una disminución en la expresión de GFAP en las AbA respecto a los astrocitos y una ausencia de GLT1 así como un aumento en la expresión de la Cx43. (C) Curva de crecimiento de células AbA y astrocitos primarios neonatales durante 9 días. La tasa de crecimiento de las células AbA casi duplica a los astrocitos. Extraído de Díaz-Amarilla et al., 2011.

Notablemente las células AbAs secretan factores que inducen la muerte de las motoneuronas, 10 veces la potencia de los astrocitos hSOD1^{G93A} neonatales (fig., 3).

Además, las células AbAs han sido identificadas por inmunohistoquímica tanto en ratas en fases sintomática de la enfermedad (Díaz-Amarilla et al., 2011, fig.,4), como en pacientes de ELA. En ambos casos, las células tipo AbAs se localizan cercanas a las motoneuronas en vías de degeneración y se identifican por inmunoreactividad para Cx43, s100β. En el modelo de la rata, una proporción significativa de células AbAs muestran marcadores de proliferación celular como Ki67. Por lo tanto, consideramos que las células AbA son una población de astrocitos desconocida hasta la fecha, que surgen con la progresión de la ELA con una capacidad proliferativa y neurotóxica sin precedentes, lo que sugiere un papel protagónico en la patogenia de la ELA.

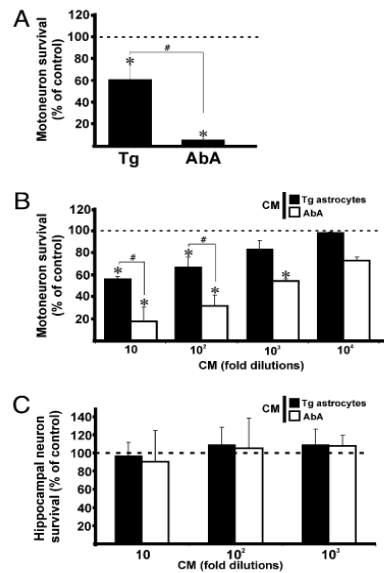


Figura 3. Las células AbA inducen de manera específica la muerte de moto neuronas. (A) Se sembraron motoneuronas embrionarias sobre una capa confluyente de astrocitos neonatales y células AbA. Luego de 48 horas se evaluó la sobrevivencia. La sobrevivencia de las motoneuronas mantenidas sobre las células AbA fue menor al 10% mientras que para las sembradas sobre astrocitos neonatales. N-Tg 100% y Tg 60%. (B) Luego de 24 horas de sembrar un cultivo puro de motoneuronas se les agregó medio condicionado de astrocitos neonatales y células AbA. El medio condicionado de los astrocitos neonatales N-Tg no induce la muerte de moto neuronas mientras que ya en la dilución 1:1000 del medio condicionado de las células AbA se puede notar el efecto nocivo del mismo en la sobrevivencia de las moto neuronas. (C) Falta de actividad neurotóxica del medio condicionado de AbA en neuronas hipocámpales. Extraído de Díaz-Amarilla et al., 2011.

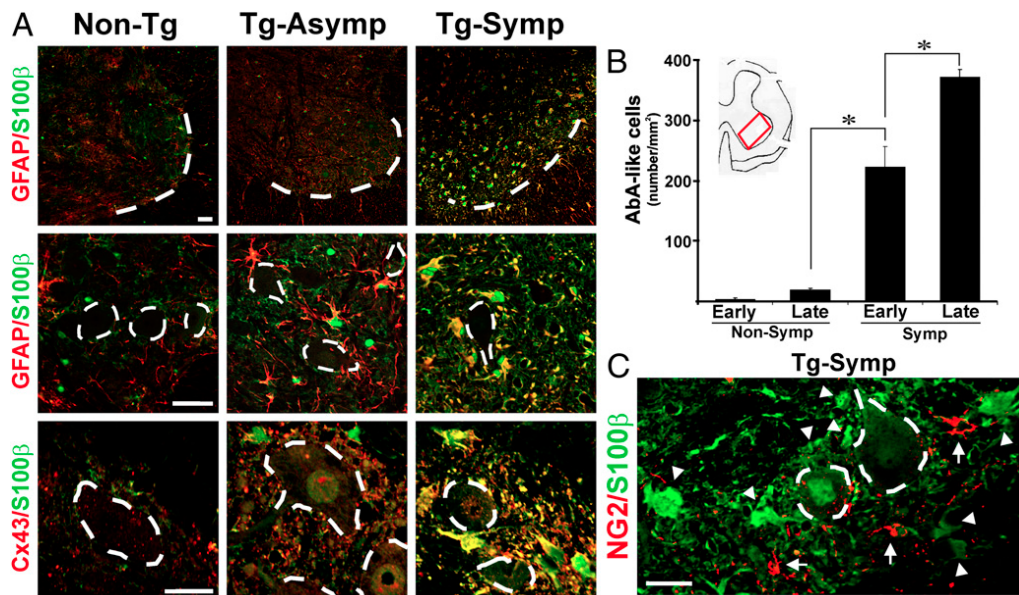


Figura 4. Identificación de células AbA en la médula espinal degenerante. (A) Inmunotinción para GFAP (rojo), s100β (verde) y conexina 43 (rojo) en secciones de médula espinal de ratas N-Tg asintomáticas y Tg sintomáticas. Menor aumento (superior) las líneas punteadas indican el borde entre la sustancia gris y la blanca, mayor aumento se delimita el perímetro de grandes moto neuronas. (B) Número de células AbA aumentado en el hasta ventral de ratas Tg durante el progreso de la enfermedad. Extraído de Díaz-Amarilla et al., 2011.

1.6 Perfil transcripcional de los astrocitos hSOD1^{G93A}.

El hallazgo sobre la característica apoptótica de los astrocitos que expresan la hSOD1^{G93A} sobre las motoneuronas en modelo de co-cultivo (Vargas et al., 2006, Nagai et al., 2007) condujo a un estudio comparativo del perfil de expresión génica entre los astrocitos hSOD1^{G93A} y los no transgénicos (Vargas et al., 2008). Los autores utilizaron el ARN proveniente de cultivos primarios de astrocitos neonatales hSOD1^{G93A} +/- y -/- (tres de cada uno) de pureza mayor a 98% luego de 21 días en cultivo. El estudio abarcó aproximadamente 28000 genes del transcriptoma de rata utilizando el Rat Genome 230 2.0 array (Affymetrix, Santa Clara, CA). En este trabajo no se observaron cambios importantes entre el patrón de expresión génica de las muestras (fig.,5). Se identificaron únicamente 81 genes con cambios en la expresión de al menos 1.2 veces entre las dos poblaciones astrocitarias (con un p<0.05). De estos, 55 genes se encontraron sobre-expresados y 26 sub-expresados en e los astrocitos hSOD1^{G93A} respecto

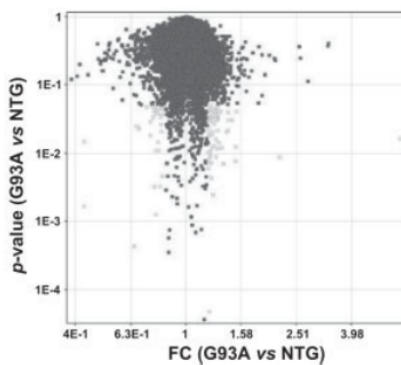


Figura 5. Menos del 0.5% de los genes examinados presentan diferencias en la expresión de al menos 1.2 veces entre los astrocitos tg y N-tg (con un p<0.05). Diagrama de dispersión de la veces de cambio (FC G93A vs. N-Tg) vs. el P valor. Extraído de Vargas et al., 2008.

a los no transgénicos (Vargas et al., 2008). A partir de estos resultados se deduce que si bien los astrocitos transgénicos exhiben diferencias funcionales notables respecto a los normales, no existe una diferencia prominente a nivel transcripcional.

Interesantemente, se encontró un único gen altamente inducido en los astrocitos hSOD1^{G93A}, el gen que codifica para la

Decorina (*Dcn*), así como también un único gen cuya sub-expresión presentó un cambio de al menos 2 veces entre los astrocitos transgénicos y no transgénicos, el gen que codifica para el Regulador de la Diferenciación (*Rod1*). Estos cambios

se observaron también en la expresión proteica de DCN y ROD1. Asimismo, los patrones de expresión génica y proteica

observados para *Dcn* y *Rod1* se condicen con el patrón observado en la médula espinal de ratas hSOD1^{G93A} asintomáticas y sintomáticas. Dado el rol regulador de la expresión de ROD1, la expresión de la hSOD1^{G93A} podría tener consecuencias funcionales en el procesamiento del ARN. La sobre-expresión de la proteína DCN podría interferir con el sistema de IGF-1/IGF-1R limitando la biodisponibilidad de IGF-1 y enmascarando la señalización vía IGF-1R en los astrocitos, afectando así su interacción con las motoneuronas y demás células vecinas (Vargas et al., 2008). El estrés oxidativo aumentado, como consecuencia de una mayor producción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, tiene un rol en el desarrollo de la ELA. Sin embargo

los astrocitos hSOD1^{G93A} no presentan aumento en la expresión de genes directamente involucrados con la producción de especies pro-oxidantes como tampoco disminución en la expresión de genes de defensas antioxidantes (Vargas et al., 2008).

1.7 Neuroinflamación

Una característica común de la ELA y otras enfermedades neurodegenerativas es la aparición de una reacción neuroinflamatoria. Recientemente esta reacción inflamatoria ha recibido especial atención como un inesperado potencial blanco terapéutico. En los últimos años se ha avanzado considerablemente en el conocimiento sobre la contribución de la microglia, los astrocitos y las células inflamatorias T a la degeneración de las motoneuronas en la ELA, resultando en pruebas clínicas de drogas dirigidas a los procesos inflamatorios en pacientes con ELA (Philips and Robberecht, 2011). Existe una amplia comunicación entre el sistema inmune y el SNC. En esta comunicación las citoquinas pro-inflamatorias tienen un papel clave. En particular, las células gliales constituyen una importante fuente de mediadores inflamatorios con una participación fundamental en otros trastornos del SNC.

Neuroinflamación es un término acuñado para describir los procesos celulares y moleculares que acompañan la activación de las microglías, de los astrocitos y la infiltración de células periféricas inmunitarias en el sistema nervioso. En el SNC ocurre en una variedad de condiciones patológicas y en enfermedades neurodegenerativas como la ELA y la atrofia muscular espinal, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington entre otras. Hasta recientemente la neuroinflamación se consideraba como un evento celular secundario al daño o muerte de neuronas, en un intento de limitar el daño celular y promover la regeneración del SNC. Sin embargo, existe evidencia suficiente para suponer que determinadas formas de respuestas inflamatorias también pueden provocar neurodegeneración, generando vías de activación auto-mantenido en el tiempo. Más aún, actualmente se postula que entre las células neuroinflamatorias, los astrocitos y las microglías pueden iniciar la neurodegeneración.

Las microglías constituyen la primera línea de defensa inmunitaria del SNC. De origen mesenquimal, son las únicas células del sistema inmune en el SNC, constituyendo los mediadores primarios de la inflamación. Si bien la densidad microglial es dependiente de la región, las mismas comprenden entre el 5 al 20% de todas las células en el cerebro humano comprendiendo el 20% de la población glial (Liao et al., 2012). Con procesos en continuo

movimiento, monitorean constantemente el ambiente extracelular y están en íntima interacción con los astrocitos y las neuronas. En el tejido del SNC sano, la microglia posee una morfología característica pequeña y ramificada, con un soma circular y numerosos procesos de ramificación. Si bien por mucho tiempo este fenotipo fue considerado como en "reposo", la evidencia reciente indica que la microglia ramificada tiene roles fisiológicos críticos, incluyendo la determinación del destino neuronal, la migración, el crecimiento axonal y la remodelación sináptica del cerebro y en el desarrollo de la médula espinal. Las contribuciones críticas de la microglia a la maduración del SNC pueden ser atribuidas a sus acciones en la fagocitosis de los desechos celulares, a la liberación de una variedad de factores de señalización celular incluyendo neurotrofinas y componentes de la matriz, y al contacto directo con las neuronas. Las microglías son los macrófagos residentes del SN y como tales pueden ejercer una función deletérea (microglia M1) y una función benigna (microglia M2) dependiendo de sus propiedades intrínsecas, la interacción con el microambiente celular, y la presencia de factores patogénicos.

En respuesta a eventos patológicos incluyendo la función neuronal anormal, la infección, la injuria, la isquemia y la inflamación, las microglías activan rápidamente mecanismos de inmunidad innata. La activación resulta en una transición de la morfología microglial a un estado ameboide que facilita la migración de estas células al sitio de dañado. La respuesta microglial a la patología del SNC también resulta en la iniciación de un número de funciones inmunológicas incluyendo la fagocitosis, el procesamiento y presentación de antígenos, y la producción tanto de factores citotóxicos como neurotróficos.

Tras la activación, la microglia secreta moléculas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF) α , interferón γ , e interleucina 1β . Asimismo liberan mediadores citotóxicos como radicales del oxígeno, óxido nítrico, metabolitos del ácido araquidónico (eicosanoides), glutamato, ácido quinólico e histamina. Normalmente esta reacción inflamatoria despeja las amenazas y repara cualquier daño, resolviéndose cuando las redes moleculares anti-inflamatorias superan las pro-inflamatorias, un proceso poco comprendido aún. La microglia también libera factores tróficos y anti-inflamatorios como el NGF, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 4-5 (NT4-5), el factor de crecimiento del tipo insulina 1 (IGF1), la interleuquina 4, e interleuquina 10 que contribuyen a la reparación y a limitar la inflamación. Los procesos anti y pro-inflamatorios de la microglia son influenciados por los astrocitos y las células inflamatorias T circundantes, que pueden afectar su capacidad fagocítica y su propiedad de célula presentadora de antígenos (fig.,6).

Además de las microglías y los astrocitos, existen varios otros tipos de células asociadas a la neuroinflamación. Entre ellas se encuentran las células T, las cuales son contribuyentes claves del proceso neuroinflamatorio. Dependiendo de la progresión de la enfermedad, las células T infiltran el SNC y modulan diferencialmente la reacción inflamatoria (Beers DR, 2008).

Finalmente, se desconoce el rol en la neuro-modulación de los precursores oligodendrogliales ampliamente distribuidos en el sistema nervioso adulto. Se sabe que estas células que expresan NG2 bajo ciertas circunstancias se diferencian en astrocitos y neuronas, por lo que podrían tener un rol en la neuroninflamación. Por otro lado también se desconoce el rol de las células endodimales y subendodimales (precursores) en la reacción glial y en la neurodegeneración (Chi et al., 2006).

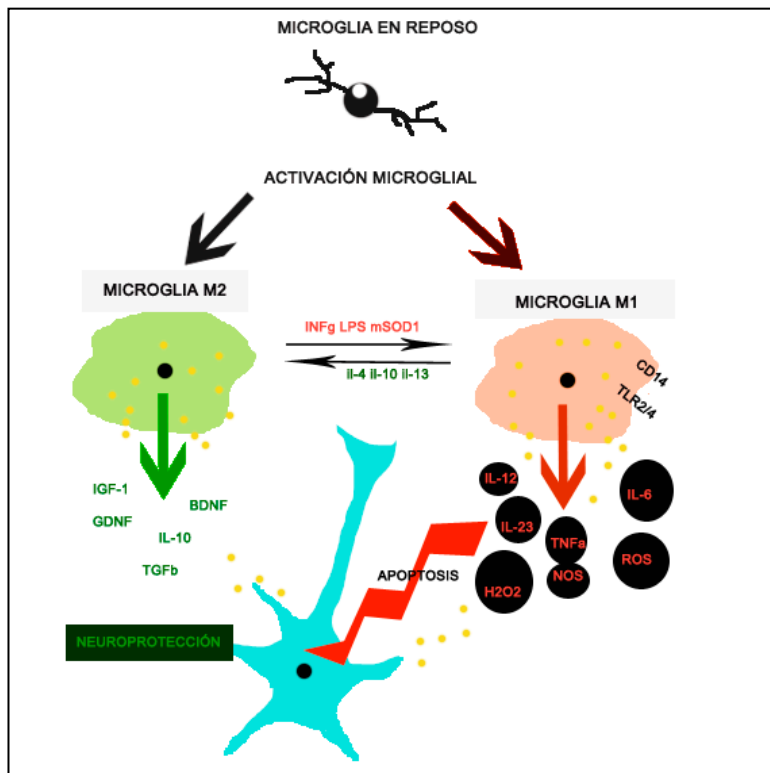


Figura 6. Microglías. Células de la inmunidad innata del SNC que median el equilibrio entre la neuroprotección y la citotoxicidad.

En las enfermedades neurodegenerativas la inflamación no es transitoria sino que es sostenida en el tiempo, probablemente por la presencia persistente del factor desencadenante. En las formas familiares dominantes de estas enfermedades se cree que el factor desencadenante son las proteínas mutantes y los agregados proteicos (por ejemplo, amiloide β 1–42 en la enfermedad de Alzheimer’s , la α -sinucleína mutante en la enfermedad de Parkinson y la SOD1 mutante en ELA). Se postula que en estas patologías la reacción inflamatoria, cuyo rol principal es combatir el factor desencadenante, se convierte en un proceso auto-mantenido y amplificado que contribuye al daño neuronal.

1.8 Activación glial en la ELA

En tejidos post-mortem de pacientes de ELA y en cortes de médula espinal de ratones transgénicos que sobre-expresan la SOD1 mutante humana, se ha observado astrogliosis y microgliosis como también infiltración de linfocitos T (Engelhardt et al., 1993, Alexianu et al.,

2001).

La activación microglial se asocia a la infiltración de linfocitos T colaboradores y T citotóxicos. Concomitante a la infiltración aumentada de células inflamatorias T, las microglías del parénquima adquieren propiedades de células presentadoras de antígeno, indicada por la sobre-expresión de CD11c, CD86 e ICAM, lo que sugiere que las microglías interactúan íntimamente con los linfocitos T infiltrantes (Gowing et al., 2008). En los modelos animales, la activación microglial en la región lumbar de la médula espinal comienza antes de la enfermedad clínica y de la desaparición de las motoneuronas (Alexianu et al., 2001). En comparación, la activación astrocitaria ocurre simultáneamente a la disminución de los cuerpos neuronales. Es de notar que la astrocitosis inicial es más prominente en el asta ventral. El número de microglías y astrocitos reactivos aumentan aún más en la etapa final de la enfermedad (Alexianu et al., 2001; Gowing et al., 2008).

Pero el aumento en el número y la activación de células mieloides no se restringe únicamente al SNC; en el nervio ciático de ratones mutantes SOD1 se detectan macrófagos activados en la etapa pre-sintomática de la enfermedad. Similarmente a lo observado en humanos, en los ratones hSOD1^{G93A}, concomitante a la activación microglial, se observa un aumento de células T (Beers DR, 2008).

Durante el proceso de activación, la microglia y los astrocitos, sobre regulan la expresión de todo un sub-conjunto de marcadores de superficie celular, las quemoquinas y citoquinas. Varios estudios han demostrado que un número aumentado de células microgliales resultan de la proliferación local de la microglia residente (Solomon et al., 2006, Gowing et al., 2008).

Estudios de trasplante de médula ósea en ratones mutantes SOD1 letalmente irradiados sugieren que las células precursoras mieloides son reclutadas de la sangre, infiltran la médula espinal, y se diferencian en la misma, contribuyendo así a la microgliosis (Corti et al., 2004, Solomon et al., 2006, Ohnishi et al., 2009).

A diferencia de la microglia, en los ratones mutantes SOD1, los astrocitos no proliferan con el progreso de la enfermedad (Gowing et al., 2008, Lepore et al., 2008a). Estas células se diferencian a partir de células precursoras GFAP negativas, o alternativamente, los astrocitos residentes sobre-regulan la expresión de este filamento por encima del límite de detección cuando se activan en condiciones patogénicas. Los precursores candidatos son las células

subependimales, la gila radial, y las células precursoras de oligodendrocitos que expresan NG2. Las células NG2 generan astrocitos *in vitro* y durante el desarrollo embrionario pero parecen carecer de esta función en el SNC adulto. Las células ependimales, que se alinean en el canal central de la médula espinal, tienen características del tipo célula madre y podrían contribuir al aumento en el número de astrocitos en los pacientes con ELA. Este aumento es similar a lo que ocurre en la isquemia experimental o en la lesión de médula espinal, donde las células ependimales que rodean el ventrículo lateral o el canal central, respectivamente, pueden dar origen a los astrocitos.

1.9 Factores que influyen en la respuesta neuroinflamatoria

Se han postulado varios factores como potenciales inductores de la respuesta neuroinflamatoria en pacientes de ELA (Glass et al., 2010). En la médula espinal de ratones SOD1 mutantes y pacientes con ELA se observa una marcada sobre-regulación de las quemoquinas como CCL2. De manera similar, el factor estimulante 1 (CSF1) está muy aumentado en la médula espinal de ratones SOD1 mutantes (Elliott, 2001). Estos factores pueden contribuir a la activación y elevada proliferación de la microglia. El tratamiento de ratones SOD1 mutantes con CSF1, el cual aumenta la proliferación microglial y la expresión de citoquinas pro-inflamatorias fagocíticas, exacerba la enfermedad. En contraste en un modelo de ratón APP(Swe)/PS1 de enfermedad de Alzheimer, el tratamiento con CSF1 disminuye la carga β -amiloide y la pérdida cognitiva, aumentando la neuroprotección. Estos hallazgos demuestran nuevamente el rol dual de la microglia en la neurodegeneración, mediando la acción neuroprotectora vs. la acción neurotóxica dependiente de la interacción con su entorno y del tiempo de activación.

Una suposición lógica es que las motoneuronas dañadas inician la respuesta inflamatoria. Un buen candidato para el posible mensajero asociado a la inducción del estado inflamatorio de la microglia y los astrocitos es la SOD1 mutante. La SOD1 mutante, pero no la SOD1 normal, es liberada por las motoneuronas a través de un proceso del tipo chaperona cromogranina. Los datos *in vitro* sugieren que la SOD1 mutante ejerce una acción tóxica en las motoneuronas, pero únicamente en la presencia de células microgliales mediante un mecanismo mediado por CD14-TLR (receptor del tipo toll), lo cual aumenta los niveles de las especies reactivas del oxígeno (ROS). La sobre-expresión *in vivo* de cromogranina A acelera la progresión de la enfermedad mediante el aumento de la cantidad de especies mal plegadas de la SOD1.

Microglías. Las microglías de la médula espinal de pacientes con ELA sobre-regulan la

expresión de marcadores de células dendríticas y de células presentadoras de antígeno, como CD86 y CD11c, posiblemente ligando la activación microglial a la activación de células T. La reducción en el número de células T resulta en un aumento sustancial de la expresión de moléculas neurotóxicas como Nox2 y TNF α , y una concomitante reducción en factores neurotróficos como IGF1, GDNF, BDNF y GLT1 y GLAST (también conocido como SLC1A3) (Beers DR, 2008); esto podría explicar el efecto beneficioso de las células T. Las células T CD4+ expresan altos niveles del factor anti-inflamatorio IL-4, la cual podría inducir el fenotipo neuroprotector en la microglia circundante. Es de destacar que la células T también influyen el comportamiento astrogial, reduciendo su expresión de GFAP en etapas tempranas de la enfermedad, pero no en la final, y modulando la contribución de los astrocitos a la respuesta inflamatoria mediante la modulación de los niveles de expresión de GLT1 y la liberación de factores neurotróficos.

La sobre-expresión de la SOD1 mutante parece hacer a la microglia más neurotóxica que la microglia normal o no transgénica. (Boillee et al., 2006). Muchos estudios han reportado expresión aberrante de un rango de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1 β y el TNF α mediante el cultivo de microglia que expresan la SOD1 mutante (Weydt et al., 2004). Similarmente en los pacientes de ELA y en los modelos murinos se encuentran aumentados muchos mediadores pro-inflamatorios (Elliott, 2001, Hensley et al., 2002). Adicionalmente, dado los niveles aumentados de NADPH oxidasa y NOS2, los niveles de superóxido y nitrito o nitrato pueden aumentar (Beers et al., 2006, Wu et al., 2006). Las ROS inducen la per oxidación de lípidos y la carbonilación de proteínas, impidiendo y comprometiendo la integridad y función de las neuronas y células gliales.

Se ha reportado que en los pacientes de ELA y en los ratones SOD1 mutantes la expresión de la ciclooxygenasa 2 (COX2), una enzima importante para la síntesis de prostanoïdes pro-inflamatorios, se encuentra aumentada (Almer et al., 2001). Los inhibidores de prostaglandinas, celecoxib y nimesulide, mostraron eficacia en retrasar el comienzo de la enfermedad y mejorar la supervivencia de ratones mutantes SOD1, mediante el bloqueo de la actividad COX2 (Almer et al., 2001, Drachman et al., 2002). Sin embargo estas drogas no afectan la progresión de la enfermedad, la cual es un parámetro más relevante al extrapolar los resultados de pruebas en ratones a estudios en humanos.

Otro mecanismo interesante es la vía de Fas, la cual vincula a la función microglial con moléculas oxidativas como el NO, y a una vía apoptótica a la cual las motoneuronas parecen

ser particularmente sensibles (Raoul et al., 2002). El papel de las subunidades de la NADPH oxidasa del complejo NADPH oxidasa es notable; la expresión de la SOD1 mutante aumenta la activación de la subunidad Nox2 (también conocido como GP91-PHOX) del complejo, el cual lleva a niveles elevados de ROS (Harrasz et al., 2008). La inhibición o depleción de la NADPH oxidasa lleva a retraso sustancial en la progresión de la enfermedad y un aumento en la supervivencia de los ratones mutantes SOD1, como ha sido reportado por algunos autores (Harrasz et al., 2008) pero no todos (Wu et al., 2006), posiblemente debido a las diferencias en el contexto genético entre los ratones utilizados para este último trabajo.

Muchos estudios se han enfocado en el papel de un factor pro-inflamatorio potencialmente relevante (usualmente único) asociado a la neurotoxicidad microglial. Generalmente la eliminación de un factor como por ejemplo TNF α , IL-1 β , o NOS2 (Martin et al., 2007) no resultaron en cambios significativos en la supervivencia (Nagai et al., 2001, Martin et al., 2007). Por tanto, es probable que flanquear un único factor sea insuficiente debido a la abundancia funcional y redundancia de mediadores inflamatorios. Por ejemplo, TNF α señala a través de diferentes receptores y su efecto funcional depende de la localización y el momento de su expresión. Estas diferencias podrían explicar porqué la eliminación de la expresión de TNF α en un modelo ratón SOD1 mutante (G37R) no afecta la enfermedad. Por otra parte, otros factores podrían compensar la ausencia de TNF α , como fue demostrado para la IL-1 β y el receptor de tipo toll 2 (TLR2), los cuales, tras la eliminación de TNF α , son sobre-regulados. A la inversa, se ha demostrado eficacia en el tratamiento de ratones SOD1 mutantes con drogas anti-inflamatorias que pueden tener efecto en varios aspectos de la respuesta inflamatoria.

Las microglías que expresan la SOD1 mutante pueden también aumentar la expresión de factores que confieren neuroprotección. Estas microglías pueden aumentar la expresión de IGF1 *in vivo* aunque *in vitro* liberan niveles menores (Xiao et al., 2007). También la microglía sobre-regula la expresión de la molécula neuroprotectora progranulina mientras progresa la enfermedad (Van Damme et al., 2007)

Astroцитos. Las vías mediante las cuales los astroцитos activados pueden contribuir a la muerte de las motoneuronas están comenzando a emerger. La expresión de la SOD1 mutante parece resultar en una pérdida de los efectos beneficiosos normales de los astroцитos en las motoneuronas, y en la liberación de factores tóxicos por los astroцитos activados (Días-Amarilla et al., 2011). Normalmente los astroцитos protegen a las motoneuronas de la excitotoxicidad, un mecanismo que se piensa tiene un rol patogénico tanto en la ELA humana como en los modelos

murinos.

Este rol protector parece estar involucrado en pacientes de ELA y en ratones SOD1 mutantes; hay una disminución significativa en la expresión del transportador de glutamato EAAT2 (GLT1 en ratón) (Rothstein et al., 1992, Rothstein et al., 1995, Bruijn et al., 1997, Howland et al., 2002). Las neuronas pre-sinápticas que funcionan normalmente pueden modular los niveles de GLT1 o EAAT2 en los astrocitos mediante la inducción del reclutamiento del factor KBBP al promotor de GLT1, aumentando la expresión de GLT1. La reducción de la señalización neuronal luego de una injuria neurodegenerativa resultará en una transcripción reducida del transportador de glutamato. Concentraciones aumentadas de glutamato e la hendidura sináptica que resultan de la pérdida de esta función limpiadora, podrían sobre-estimular los receptores AMPA y NMDA en las motoneuronas resultando en una entrada elevada de calcio en las motoneuronas y consecuentemente en la muerte celular. La sobre-expresión de GLT1 en los astrocitos (Guo et al., 2003) o el aumento de su expresión con ceftriaxona (Rothstein et al., 2005) afecta positivamente a la degeneración de las motoneuronas en ratones SOD1 mutantes. Un aumento en la función de EAAT2 también puede explicar los efectos beneficiosos del trasplante de células precursoras gliales restringidas en la médula espinal de ratas SOD1 mutantes (Lepore et al., 2008b). Además los astrocitos normalmente reducen la permeabilidad al Ca^{2+} de los receptores de glutamato del tipo AMPA mediante la inducción de la expresión de la subunidad Glur2 (también conocido como Gria2) en las motoneuronas. Esta acción es inhibida por la presencia de la SOD1 mutante, haciendo a las motoneuronas vulnerables a la excitotoxicidad. Estos estudios sugieren que los astrocitos protegen a las motoneuronas de la muerte celular excitotóxica, una función que se pierde en la presencia de la SOD1 mutante.

Los astrocitos modulan la integridad neuronal a través de la liberación de factores neurotróficos, de los cuales se han estudiado muy bien los siguientes ejemplos: GDNF, BDNF, IGF1 y VEGF. La administración exógena de estos factores aumenta la sobrevivencia de las motoneuronas en el modelo de SOD1 mutante.

Aparte de perder sus efectos beneficiosos normales en las neuronas, los astrocitos afectados por la ELA parecen también liberar factores que son peligrosos para las motoneuronas. In vitro, los astrocitos que expresan la SOD1 mutante, liberan más factores neurotóxicos que los astrocitos normales (Di Giorgio et al., 2007, Nagai et al., 2007;). Al igual que la microglia, los astrocitos sobre-regulan la expresión de NOS2, promoviendo la generación de ROS y NOS. El aumento en la expresión de moléculas relacionadas al estrés oxidativo puede ser contrarrestada

por la sobre-regulación astrocitaria del antioxidante Nrf2 (también conocido como NFE2L2) retrasando el comienzo de la enfermedad en los ratones SOD1 mutantes (Vargas et al., 2008).

1.10 Citoquinas

Las citoquinas comprenden un grupo de polipéptidos pequeños (8-30 kDa) de enorme diversidad en sus posibles acciones. Las citoquinas actúan en concentraciones muy bajas (de nano molar a pico molar) y señalizan autócrina o parácrinamente, modulando la actividad celular local influyendo en su supervivencia, crecimiento, y diferenciación. En respuesta a la enfermedad, a una injuria, a lesiones y a infecciones la concentración de citoquinas se eleva rápidamente y desempeñan un papel importante en la reparación de tejidos en estos estados patológicos agudos. Estos péptidos tradicionalmente han sido clasificados tanto como pro-inflamatorios o anti-inflamatorios dependiendo de su acción en el tejido periférico.

El TNF α es un mediador central de la neuroinflamación. Es mayoritariamente producido por la microglia y en menor medida por los astrocitos y las neuronas. El TNF α se presenta tanto como una proteína de 26kDa unida a la membrana y como una forma soluble de 17kDa generada por una actividad de la metaloproteasa (TACE; ADAM17). La señalización de TNF α es a través de receptores. El TNFR1 es expresado ubicuamente por todos los tipos celulares y TNFR2 presente en niveles menores en subtipos neuronales específicos y células gliales. TNFR1 parece estar implicado en promover la muerte a través de la activación de las proteínas pro-apoptóticas o la sobrevida neuronal mediante el incremento de la actividad de NF-kB. Tras la unión de TNF, la disociación de una proteína silenciadora permite al dominio de muerte intracelular interactuar con la proteína adaptadora del receptor de TNF asociado a la muerte (TRADD). Dependiendo del contexto celular, la asociación TRADD– TNFR1 permite el reclutamiento de distintos complejos de señalización, llevando a la muerte o sobrevida neuronal. La señalización a través de TNFR2 comparte varias cascadas iniciadas por TNFR1. Específicamente, TNFR2 actúa mediante un número diferente de vías de señalización que aumentan la transcripción de factores anti-apoptóticos y pro-inflamatorios mediante NF-kB. El TNFR2 responde preferencialmente a la unión del TNF unido a la membrana y no posee un dominio de muerte. Se lo asocia a la función protectora y reguladora del TNF α en el SNC.

La familia de IL-1 consiste de varios tipos diferentes de proteínas incluyendo, IL-1 α , IL-1 β e IL-1AR, participan en la neuroinflamación. La IL-1 α se encuentra principalmente como una proteína unida a la membrana que participa en la señalización autócrina y parácrina. La IL-1 β se

encuentra típicamente en una forma soluble secretada. Tanto IL-1 α como IL-1 β se sintetizan como pro-formas las cuales son luego escindidas por proteasas para generar las proteínas maduras. La señalización de las mismas es mediada por el mismo receptor IL-1RI. La unión del ligando a IL-1RI resulta en un cambio conformacional que permite su asociación con una cadena accesoria al receptor la IL-1RAcP. Este complejo de alta afinidad puede reclutar numerosas proteínas adaptadoras incluyendo MyD88 y TRAF6 y consecuentemente la activación de amplio espectro de quinasas como IRAK1, IRAK4, TAK, MAPK, p38, JNK y ERK1/2.

La interleuquina 6 también tiene un rol principal en la neuroinflamación. Se caracteriza como una glicoproteína de 26kDa que se une y activa un complejo receptor comprendido de un IL-6R y dos gp130. Además mediante splicing alternativo se puede formar una forma soluble del IL-6R (sIL-6R) que participa en la trans-señalización de IL-6. La IL-6 mediante su receptor activa múltiples vías de señalización incluyendo JAK1, JAK2 y TYK2 las cuales pueden fosforilar STAT1 y STAT2 los cuales se traslocan al núcleo para promover la transcripción de genes blanco. Entre ellos se encuentran los interferones involucrados en la respuesta inmune innata, y genes que modulan la supervivencia y la proliferación celular como la ciclina D1, c-myc, c-fos, survivin, c-IAP2, Bcl-xL, y Bcl-2. El receptor activado también puede iniciar señalización mediante MAPKs.

Las vías de señalización descritas anteriormente ilustran únicamente una pequeña porción de la complejidad de las acciones de las citoquinas pro-inflamatorias. Si bien se ha establecido un vínculo claro entre estas citoquinas y la neurodegeneración, sus mecanismos de señalización parecen involucrar un equilibrio entre la promoción de la supervivencia celular y la apoptosis y las respuestas pro-inflamatorias. Entre las vías conocidas se encuentra la modulación de la excitabilidad neuronal y la liberación de neurotransmisores. Evidencia reciente indica que la IL-1 puede mediar el aumento en la excitabilidad neuronal mediante las interacciones directas con el receptor de NMDA e inhibición de los canales inducibles de calcio y potasio. Las citoquinas pro-inflamatorias pueden también irrumpir el balance iónico neuronal mediante la alteración de la expresión de los canales ionotrópicos, la liberación y la expresión de receptores de neurotransmisores.

1.11 Desde el modelo animal a estrategias terapéuticas

Resultados de varios ensayos terapéuticos investigando los efectos beneficiosos de los compuestos inmuno-activos o anti-inflamatorios, y del trasplante de células mieloides, no han

mostrado efectos curativos de la ELA (Philips and Robberecht, 2011). La inmunosupresión total o la inmuno-modulación (utilizando ciclosporina, ciclosporina, interferón beta, entre otros) ha sido inefectiva. El fármaco minociclina que reduce la activación microglial no tiene efectos protectores en pacientes con ELA. El colexib un inhibidor de la COX2, también ha sido inefectivo. También han sido inefectivos los antioxidantes como la vitamina E, la coenzima Q10, utilizados como eliminadores de los mediadores tóxicos de la neuroinflamación.

En un intento de corregir el microambiente deletéreo alrededor de las motoneuronas, Appel y colaboradores, (Appel et al., 2008;) estudiaron pacientes sometidos a irradiación sistémica y seguido de trasplante de médula ósea, lo que permite cambiar el fenotipo de las microglia de origen sanguíneo por células del donante sano. Este protocolo no tuvo ningún beneficio en la supervivencia. Actualmente se encuentran en curso, estudios que investigan la factibilidad del trasplante de células astrogiales no ELA, mediante el trasplante de células precursoras destinados a glías (Philips and Robberecht, 2011). Por otro lado, la sub-regulación no genética de la expresión de la SOD1 mutante en la microglia podría ser posible. El tratamiento de ratones SOD1 mutantes con la proteína C activada mejora significativamente la supervivencia por la disminución de la concentración de la SOD1 mutante en las motoneuronas y otras células, incluyendo a la microglia (Zhong et al., 2009). Sin embargo, permanece por ser investigado si estas aproximaciones pueden ser terapéuticas en casos de ELA.

La reacción neuroinflamatoria crea oportunidades para la intervención. La fig.,7 muestra un esquema de los mecanismos involucrados en la patogenia de la ELA. Es crucial ahondar en la investigación de los efectos opuestos deletéreos y protectores de la neuroinflamación para diseñar tratamientos para la ELA y otras enfermedades neurodegenerativas.

SOPORTE ESTRUCTURAL, METABÓLICO Y NEUOTRÓFICO
MODULACIÓN DE LA EXCITABILIDAD Y NEUROTRANSMISIÓN

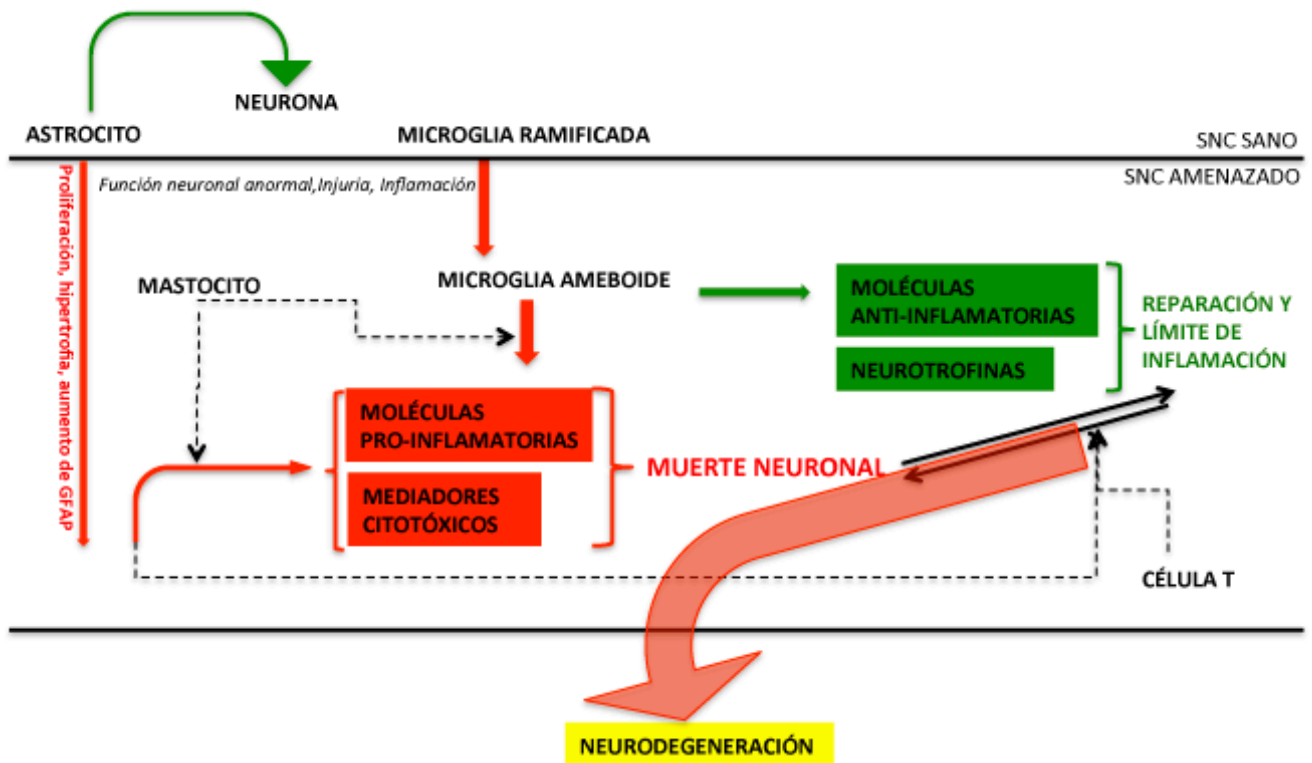


Figura 7. Esquema sobre los eventos inflamatorios que conllevan a la neurodegeneración.

2. HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis establece que los astrocitos juegan un papel significativo en la progresión de enfermedades neurodegenerativas, actuando en circunstancias patológicas como células pro-inflamatorias y haciendo intervenir indirectamente a otras células inflamatorias. Esta hipótesis se apoya en el reciente descubrimiento de una población específica de astrocitos fenotípicamente “aberrantes” (células AbAs) con alta capacidad proliferativa y capaces de inducir toxicidad neuronal. En este contexto surge la predicción que las células AbAs van a tener un perfil transcripcional diferente al de otros astrocitos no vinculados a la patología, que pueda proveer de nuevos biomarcadores de la enfermedad.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Encontrar y caracterizar un marcador molecular específico de células AbAs que permita diferenciarlas de otros tipos de células astrocitarias.

3.2 Objetivos específicos

1. Obtención de ARN de astrocitos no transgénicos, transgénicos y aberrantes.
2. Microarreglos de los tres tipos astrocitarios y análisis computacional de los resultados obtenidos.
3. Identificación de uno o más marcadores moleculares de células AbA.
4. Diseño y síntesis de herramientas moleculares (anticuerpos y sondas de ARN) que permitan la caracterización específica de células AbA.
5. Validación de los marcadores de células AbA mediante Western blot, inmunocitoquímica e hibridación *in situ*.
6. Caracterización *in situ* de células AbA mediante inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en cortes de médula espinal de ratas SOD1G93A^{+/-} y SOD1G93A ^{+/-} de 7 meses de la misma camada.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales. Los protocolos de experimentación utilizados para el mantenimiento de las colonias de ratas, sacrificio de neonatos y ratas adultas, utilizados para los posteriores protocolos, fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA). Las ratas transgénicas SpragueDawley SOD1G93A L26H fueron adquiridas en Taconic Farms Inc. y mantenidas en URBE (Facultad de Medicina, UdelaR). Se cruzaron ratas transgénicas con ratas normales para la obtención de neonatos transgénicos y no transgénicos.

Genotipado. Se realiza a partir de una muestra de la cola de ratas neonatas y se incubaron en buffer de lisis (28mM Tris-HCl; 72mM Tris base; 5mM EDTA; 7mM SDS; 200mM NaCl y 20µg/mL de proteínasa K) a 55°C por una hora. Se centrifugo a 10000g por 10 minutos y se utilizó 1µL del sobrenadante para realizar una PCR con los cebadores correspondientes a la SOD1 humana (s-CATCAGCCCTAATCCATCTGA y as-CGCGACTAACAATCAAAGTGA). El resultado de la reacción fue evaluado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% con tinción en base a nitrato de plata. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes : una desnaturalización de 5 minutos a 94°C seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 45 segundos a 60°, 30 segundos a 72° y una terminación de 10 minutos a 72°.

Cultivos primarios de astrocitos transgénicos y no transgénicos neonatales. Los cultivos primarios de astrocitos se prepararon a partir de la médula espinal de neonatos de rata de 1 a 2 días postnatales de acuerdo a los procedimientos de Saneto y De Vellis (1987) con modificaciones menores (Cassina et al., 2002). Brevemente, se disoció la médula espinal en tripsina 0.25% (Invitrogen) durante 30 minutos a 37°C. Las células se colectaron por centrifugación y se filtraron en un tamiz de disociación celular de malla de 70µm de poro (Becton Dickinson), y se sembraron a una densidad de aproximadamente 1.5×10^6 células por frasco de 25cm² en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-Invitrogen-) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS-Invitrogen-), 3.6g/litro de HEPES (Invitrogen), 100 IU/ml penicilina y 100µg/ml estreptomina (Invitrogen). Una vez alcanzada la confluencia los cultivos se agitaron a 250rpm durante 48hrs a 37°C y se incubaron otras 48hrs con 10µM arabinosido de citosina (Sigma). Se seleccionaron únicamente las mono-capas de astrocitos con una pureza mayor al 98%. Los mismos fueron incubadas en una estufa de atmosfera controlada (5% CO₂) a 37°C hasta alcanzar un 80% de confluencia. Para obtener astrocitos de ambos genotipos en cada preparación, los cultivos se realizaron a partir de ratas transgénicas hSOD1^{G93A} y no

transgénicas de la misma camada genotipadas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron ratas Sprague Dawley SOD1G93A L26H (Howland et al., 2002c).

Cultivos primarios de astrocitos de ratas adultas transgénicas sintomáticas (AbAs). Las AbA se obtuvieron a partir de la médula espinal de ratas SpragueDawley SOD1G93A L26H, heterocigotas, adultas sintomáticas (175 días) de acuerdo al protocolo de obtención de cultivo primario de astrocitos descrito por Saneto y De Vellis (1987) con modificaciones menores (Cassina et al., 2002; Diaz-Amarilla et al., 2011). Brevemente, los animales se sacrificaron por anestesia profunda y la médula espinal se disecó en hielo. Luego de remover cuidadosamente las meninges la médula espinal se cortó finamente y se disoció con tripsina 0.25% (Invitrogen) en buffer libre de calcio durante 5 minutos a 37°C. La tripsinización se detuvo con DMEM, 10%SFB en presencia de 50µg/ml DNasa I (Roche) y disgregación mecánica por pipeteo. El extracto resultante se pasó por una un tamiz de disociación celular de malla de 70µm de poro, y se sembró en un frasco de 25cm² en DMEM (Invitrogen) suplementado con 10% de FBS (Invitrogen), 3.6g/litro de HEPES (Invitrogen), 100 IU/ml penicilina y 100µg/ml estreptomina (Invitrogen). Luego de 24 horas se removió el medio de cultivo el cual fue remplazado cada 48 hrs. En el día 10 *in vitro* se agregó una capa de 3ml de una solución de 1% agarosa (Invitrogen) mantenida a 37°C de acuerdo a los procedimientos descritos en 2008 por Hassell et al. En el día 20 la capa de agarosa se retiró como una única pieza, y las células AbA se pasaron cada semana. Para ello las células se incubaron durante 5 minutos con 0.25% tripsina sin calcio (Invitrogen) a 37 °C, se colectaron en DMEM, 10% FBS y se centrifugaron a 250xg durante 10 minutos. El pellet celular resultante se re suspendió en DMEM, 10%FBS, 100 IU/ml penicilina y 100µg/ml estreptomina (Invitrogen) y las células se sembraron a una densidad de 1 x 10⁶ células por frasco de 25cm². Las células fueron incubadas en una estufa de atmosfera controlada (5% CO₂) a 37°C hasta alcanzar confluencia luego de lo cual fueron expandidas hasta el pasaje número 3. **Crio-preservación de células AbA.** Se congelaron 1.5 x 10⁶ células en 1ml de DMSO: FBS, 1:10, a razón de -1°C/minuto hasta alcanzar los -80% y fueron transferidas a nitrógeno líquido para su conservación a largo plazo.

Aislamiento de ARN. Al alcanzar una confluencia de aproximadamente el 90% de la botella de 25 cm² (aproximadamente 1.8 x 10⁶ células) el medio de cultivo se removió, y las células se lavaron rápidamente con DPBS (Invitrogen). Se aspiró el DPBS, se agregó 1 ml de TriZol (Invitrogen) y las células se lisaron mecánica y químicamente mediante pipeteo. Las células lisadas en TriZol se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. El TriZol inhibe la actividad ribonucleasa (RNasa) preservando la integridad del ARN contenido en

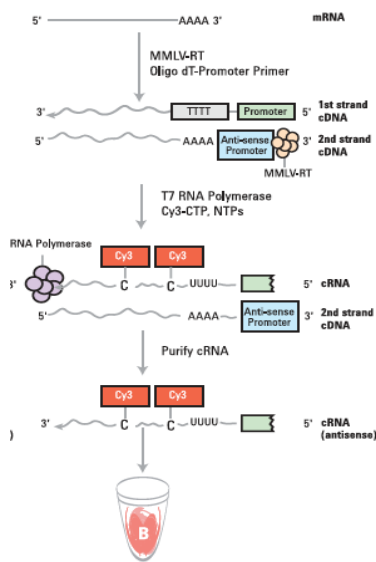


Figura 8. Diagrama de flujo de obtención del ARNc-Cy3.

Extraído de

http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/public/g4140-90041_one-color_tecan.pdf

las muestras. La extracción y purificación de ARN de los tres tipos celulares se realizó en paralelo en el mismo día para minimizar la varianza técnica. Para ello se utilizó un protocolo gentilmente brindado por la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo. Básicamente, se realiza la extracción con TriZol de acuerdo a especificaciones del fabricante y el ARN obtenido se purifica con el kit RNAeasy de Qiagen de acuerdo a especificaciones del fabricante. El ARN obtenido se almacenó a -80°C . La concentración de ARN se obtuvo por espectrofotometría midiendo la absorción de las bases nitrogenadas a 260nm. Para ello se utilizó el Nanodrop (Thermo) del Institut Pasteur de Montevideo. La integridad del ARN se evaluó mediante el "RNA Integrity Number" (Schroeder et al., 2006), el cual consiste en la medida de la relación de los picos ribosomales 18S y 28S. Cuanto más degradado este el ARN

más chico será el RIN. Para dicha evaluación se sometió una alícuota de cada una de las muestras a una separación electroforética en chips micro-fabricados que luego se analizó por fluorimetría en el Bioanalyzer (Agilent) del Institut Pasteur de Montevideo. Se seleccionaron las muestras con un RIN mayor a 8.

Análisis por microarreglos. Se sintetizó ARNc conjugado al fluoróforo Cianina 3 (ARNc-Cy3) a partir de 200ng de ARN de cada una de las muestras. Para ello se utilizó el kit Low Input Quick Amp Labeling Kit -One color (Agilent) siguiendo especificaciones del fabricante (http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/public/g4140-90041_one-color_tecan.pdf).

Básicamente, la reacción comienza con la síntesis de ADN copia (ADNc) a partir del ARN total contenido en la muestra utilizando un cebador de poli-desoxitimidinas unido a un promotor para la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (promotor T7) y una Transcriptasa Reversa (MMLV-RT). A partir del ADNc obtenido se sintetiza el ARNc con una ARN polimerasa T7 que incorpora al ARNc Citosina Tri-fosfato (CTP) conjugada al fluoróforo Cy3 en vez de CTP (fig., 8). El ARNc-Cy3 obtenido se purificó utilizando el kit RNA Easy Mini Spin Columns (Qiagen) siguiendo especificaciones del fabricante. El ARNc-Cy3 purificado se analizó utilizando el Nanodrop. Se evaluaron los siguientes parámetros:

-Concentración de Cy3 (pmol/ μl)

-Relación de absorbancia de ARN/proteína (260nm/280nm)

-Concentración de ARNc (ng/μl)

El análisis por microarreglos se realizó utilizando el Rat GE 4x44K v3 Microarray Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Se hibridaron un total de 8 arreglos divididos en 2 muestras de astrocitos no transgénicos, 3 muestras de astrocitos transgénicos y 3 muestras de AbAs. La hibridación y los lavados se realizaron siguiendo especificaciones del fabricante. El escaneo de los portaobjetos de vidrio se llevo a cabo en el Agilent microarray scanner GenPix 4000B utilizando el ajuste de parámetros por defecto. Los datos en bruto se extrajeron utilizando el Agilent Feature Extraction Software (FE software -Agilent Technologies, versión 11.0.1.1-). Como control de calidad de los microarreglos se utilizó el Agilent One Color RNA Spike-in kit (Agilent) y se genero el Quality Control Report (QC Report) con el FE software. Los datos extraídos se normalizaron con el algoritmo del 75 Percentil Shift utilizando el Gene-Spring GX 12.5 Expression Analysis Software (Agilent Technologies, Mississauga, ON, USA). Para comparar directamente los microarreglos se realizó una transformación de la media de la línea base. Se calculó para cada sonda, la media del logaritmo del resumen de valores de todas las muestras y se resto a cada una de las muestras. Además las sondas se filtraron de acuerdo a los siguientes criterios: señales positivas y uniformes, no saturadas, y por encima del ruido de fondo. Para el análisis estadístico de los datos se realizo un ANOVA de una vía con la corrección de Benjamini-Hochberg. Como criterio de selección de genes expresados de forma significativamente diferencial entre las muestras se utilizó un P-valor 0.05 para obtener un número razonable de genes regulados diferencialmente entre las muestras. Se consideraron genes con cambios en la expresión mayores a 2. A partir de los genes diferencialmente expresados se realizó un análisis de las vías involucradas en el Gene Spring GX 12.5 utilizando la opción Single Experiment Analysis. Las vías utilizadas por el software se importaron de: WikiPathways-Analysis, WikiPathways-Reactome, WikiPathways-GenMAPP, Wiki-Pathways-Other.

Retro Transcripción-Reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR). Se retro transcribieron al azar 2μg de ARN total de cada tipo celular (3 astrocitos no transgénicos, 3 astrocitos transgénicos y 3 AbAs) utilizando el SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) siguiendo especificaciones del fabricante. Se diseñaron cebadores específicos para kprp (s-GTATATCCTTGTGTCTATCTTAG y as-TGTTATGTATCTTCCTATTGTC -121pb-) y para la β-actina (s-TATGGAATCCTGTGGCATC as-GTGTTGGCATAGAGGTCTT-87pb-) como gen housekeeping utilizando el Software Beacon Designer de Primer Biosoft®. Los cebadores fueron adquiridos en Integrated DNA Technologies (IDT). Para las reacciones de PCR se utilizaron

2.5U de Taq DNA polimerasa recombinante (Invitrogen), 0.2mM de dNTP mix (Invitrogen), 1.5mM de MgCl₂ (Invitrogen) 1µl de cDNA en Buffer de PCR sin Mg²⁺ (Invitrogen). La PCR de *kprp* consto de un primer paso de desnaturalización a 94° durante 3 minutos seguido de los siguientes 35 ciclos: 45 segundos de desnaturalización a 94°, 30 segundos de apareamiento a 54.5° y 90 de elongación a 72°, finalizando con un últimos paso de extensión durante 10 minutos a 72°. La PCR de la β-actina consto de un primer paso de desnaturalización a 94° durante 3 minutos seguido de los siguientes 35 ciclos: 45 segundos de desnaturalización a 94°, 30 segundos de apareamiento a 50° y 90 de elongación a 72°, finalizando con un últimos paso de extensión durante 10 minutos a 72°. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.8% en buffer Tris-acetato-EDTA (TAE- 40mM Tris-acetato, 1mM EDTA, pH 8,2-8,4-) conteniendo 5µg/ml de Bromuro de etidio (BrEt). Como marcador de peso molecular se utilizó el 100pb ladder de Fermentas.

Anticuerpos anti KPRP de rata. Se seleccionó un epítoto antigénico (CRPQRLDRSPESSW) de la proteína KPRP para generar anticuerpos poli-clonales de conejo anti rata. Los anticuerpos fueron desarrollados por encargo en la empresa GenScript (EEUU).

Sondas de ARN sentido y anti-sentido de para *kprp* de rata.

1. *Diseño de cebadores para *kprp* con adaptadores.* Los cebadores se diseñaron de manera tal que el producto de PCR obtenido con los mismos sirviera como molde para la síntesis de una sonda de ARN complementaria al ARN mensajero (ARNm) de *kprp* de *Rattus norvegicus*. Para ello se obtuvo la secuencia del ARNm de *kprp* en el Gene Bank (NM_001002290.1) y se buscaron cebadores a una distancia entre 100 a 150 pb utilizando el software Primer Premier de Primer Biosoft®. Las secuencias obtenidas se alinearon utilizando el algoritmo Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) con la colección de nucleótidos de *Rattus norvegicus* y se seleccionaron los cebadores que hibridan única y específicamente a *kprp* dentro de la totalidad de los transcritos de rata. A modo de permitir el clonado direccional de dicha secuencia en un vector de transcripción, los cebadores fueron diseñados con secuencias blanco de las enzimas de restricción *SpeI* (cebador sentido) y *NcoI* (cebador anti-sentido) en sus extremos 5' (adaptadores-indicados en rojo en las secuencias-). Las secuencias de los cebadores fueron las siguientes:

Cebador sentido: **ACTAGTGTATATCCTTGTGTCTATCTTAG** (nt: 2676-2698)

Cebador anti-sentido: **CCATGGTGTATGTATCTTCCTATTGTC** (nt:2796-2775)

2. *Amplificación de la secuencia molde kprp.* La obtención de la secuencia molde para la síntesis de las sondas sentido y anti-sentido de *kprp* se realizó mediante amplificación por PCR a partir del cDNA de las células AbA. Se utilizó 1µl de cDNA por reacción, 0.2mM de dNTPs (Invitrogen), 1.5mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0.5µM de cada uno de los cebadores (s-
ACTAGTGTATATCCTTGTGTCTATCTTAG y as-
CCATGGTGTATGTATCTTCCTATTGTC) y 2.5U de Taq DNA polimerasa recombinante (Invitrogen) en PCR Buffer -Mg²⁺ (Invitrogen). Las condiciones de amplificación fueron: 3 minutos de desnaturalización a 94°C seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 54°C y 1 minuto 30 a 72°C, finalizado con una extensión de 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.8% en buffer TAE y 5µg/ml de BrEt utilizando como marcador de peso molecular el 100pb Ladder de Fermentas. La muestra se dividió en varios carriles, uno de los cuales se expuso a la luz ultravioleta (UV) como testigo para evitar daño en la secuencia de las bandas a ser purificadas y clonadas. Las bandas que no fueron expuestas al UV se recortaron y se purificaron utilizando el PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) siguiendo especificaciones del fabricante. Los productos purificados fueron concentrados en un evaporador centrífugo en vacío a 50°C hasta sequedad. El pellet se resuspendió en 5µl de agua libre de nucleasas.
3. *Ligación del amplicon molde kprp en el vector pCR2.1-TOPO.* Se utilizaron los 5µl del producto de PCR purificado (amplicon molde *kprp*) y concentrado (correspondientes a una relación inserto:vector 16:1), 50ng de pCR2.1 lineal (Invitrogen), 5 U de Express Link T4 DNA ligasa (Invitrogen) en Buffer de reacción T4 DNA ligasa (Invitrogen) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.
4. *Transformación de bacterias XI-1-Blue quimio-competentes con pCR2.1-kprp.* Se descongeló un vial de células XI-1 blue quimio-competentes de alta eficiencia (1 x 10⁸ ufc/µg de ADN) en hielo durante 5 minutos. Se agregaron 2 µl de reacción de ligación, se mezcló gentilmente y se incubó en hielo durante 30 minutos. Transcurridos los 30 minutos las células fueron sometidas a un choque térmico de 42° durante 45 segundos, seguido de 2 minutos en hielo. Se agregaron 500µl de medio líquido Luria Bertani (LB- 10g/l de triptona, 5g/l de extracto de levadura, 5g/l de NaCl-) y se sembraron 50, 100 y 200 µl en placas de LB agar (LB, 15g/l agar) conteniendo 100µg/ml de ampicilina, 0.5mM de IPTG y 80µg/ml de X-Gal.

5. *Secuenciación de clones recombinantes pCR2.1-Kprp.* Se picaron 14 colonias blancas a partir de las cuales se inocularon pre-cultivos que se dejaron crecer durante 12 a 16 horas a 37°C con 220 rpm de agitación constante en medio líquido LB conteniendo 100µg/ml de ampicilina. A partir de dichos cultivos se realizó la extracción de ADN plasmídico (ADNp) utilizando el kit NucleoSpin Plasmid de Macherey-Nagel siguiendo especificaciones del fabricante. La calidad del ADNp obtenido se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE conteniendo 5µg/ml de BrEt y en el Nanodrop del Institut Pasteur de Montevideo. En el nanodrop se cuantificó mediante la absorbancia a 260nm y se evaluó la contaminación proteica (índice A_{260nm}/A_{280nm}) y de solventes orgánicos (índice A_{260nm}/A_{230nm}) contenidos en la muestra. El ADNp se secuenció en el Servicio de Secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo.
6. *Purificación de ADNp pCR2.1-Kprp.* Se selecciono un clon recombinante cuya secuencia contenida en el SMC fuese la correspondiente al amplicon molde de *kprp*. A partir de dicho clon se realizó la purificación de ADNp (pCR2.1-kprp) mediante Maxipreparation con el kit QIAfilter Plasmid Maxi Kit siguiendo especificaciones del fabricante. La calidad del ADNp obtenido se evaluó en el Nanodrop y por separación electroforética en gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE conteniendo 5µg/ml de BrEt y.
7. *Digestión de pCR2.1-Kprp con NcoI y SpeI.* El inserto contenido en el clon recombinante pCR2.1-kprp fue liberado mediante digestión enzimática con NcoI y SpeI. Se digirieron 10 µg de ADNp (pCR2.1-kprp) obtenido mediante Maxipreparation, con 10U de NcoI (Fermentas), 10U de SpeI (Fermentas), en buffer de reacción Tango (Fermentas). Durante 16 horas a 37°C. El producto de digestión (SpeI-kprp-NcoI y SpeI-pCR2.1-NcoI) fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.8% en buffer TAE y 5µg/ml de BrEt utilizando el marcador de peso molecular 100pb Ladder de Fermentas.
8. *Purificación de SpeI-Kprp-NcoI.* El inserto liberado de pCR2.1-kprp, *SpeI-kprp-NcoI*, se purificó utilizando el kit PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen). La concentración y la calidad del ADN obtenido se evaluó en el Nanodrop y se concentró en un evaporador centrífugo en vacío a 50°C hasta sequedad. El pellet se resuspendió en 6µl de agua libre de nucleasas.
9. *Obtención de pGEM-T Easy circular.* Se ligó el inserto control provisto en el kit pGEM-T

Easy de Promega en el plásmido pGEM-T Easy lineal. El plásmido pGEM-T Easy lineal, al igual que el pCR2.1-TOPO, posee en sus extremos 3' una única dT, permitiendo la ligación de fragmentos de ADN con dA en sus extremos 3'. El inserto control posee en sus extremos 3', dA. Por lo tanto, la ligación del inserto control en el plásmido pGEM-T Easy (*pGEM-Inserto Control*) se realizó mediante el clonaje TA. Para esto se utilizaron 50ng del vector pGEM-T Easy (Promega), 8ng de inserto control (-Promega- correspondientes a una relación molar inserto:vector, 3:1), 3 U de T4 DNA ligase (Promega) en Buffer de ligación rápida T4 DNA ligase (Promega). La reacción se incubó 1 hora a temperatura ambiente.

10. *Transformación de células XI-1 blue quimio-competentes con pGEM-Inserto Control.* se procedió de igual manera que en el punto 4.
11. *Búsqueda de clones recombinantes pGEM-Inserto Control.* Se picaron 4 colonias blancas a partir de las cuales se inocularon pre-cultivos que se incubaron durante 12 a 16 horas a 37°C con 220 rpm de agitación constante en medio líquido LB conteniendo 100µg/ml de ampicilina. A partir de dichos cultivos se realizó la extracción de ADNp utilizando el kit NucleoSpin Plasmid de Macherey-Nagel siguiendo especificaciones del fabricante. La calidad del ADNp obtenido se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE conteniendo 5µg/ml de BrEt. La presencia del inserto control fue evaluada mediante digestión con las enzimas de restricción *NcoI* y *SpeI*. Para esto se utilizaron 1µg de ADNp, 5 U de *NcoI* (Fermentas), 5 U de *SpeI* (Fermentas) en buffer de reacción Tango (Fermentas). La reacción tuvo lugar a 37°C durante 2 horas. Los productos de digestión se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE y 5µg/ml de BrEt utilizando el marcador de peso molecular 100pb ladder de Fermentas.
12. *Obtención de ADNp pGEM-Inserto Control.* Se selecciono un clon recombinante pGEM-Inserto Control y se realizó la extracción del ADNp, *pGEM-Inserto Control*, mediante Midipreparation según Sambrook y Russell 2001. Brevemente, se pico una colonia recombinante y se realizó un pre-cultivo de 10ml de LB, 100µg/ml de ampicilina, durante 12 a 16 horas a 37°C con agitación constante a 220rpm. Las bacterias se colectaron mediante centrifugación a 2000xg durante 10 minutos a 4° y se re suspendieron en 200µl de Solución de Lisis Alcalina I (50mM Glucosa, 25mM Tris-Cl pH 8, 10mM EDTA pH 8, 20mg/ml de RNasa A libre de DNasas) fría. Se Agregaron 400µl de Solución de Lisis Alcalina II fresca (0.2N NaOH, 1% SDS), se mezcló y se agregaron 300µl de Solución de Lisis Alcalina III (3M acetato de potasio, 11.5% de ácido acético glacial). Se incubó 5

minutos en hielo. El lisado de bacterias se centrifugó en microcentrifuga a máxima velocidad durante 5 minutos a 4° y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo donde se agregó igual volumen de fenol:cloroformo para la extracción de proteínas. La emulsión se centrifugó a máxima velocidad durante 2 minutos a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo donde se precipitó el ADN con 600µl de 2-propanol a temperatura ambiente. Los ácidos nucleicos fueron recuperados por centrifugación a máxima velocidad durante 5 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con 1ml de etanol 70%. El pellet de ADNp se seco al aire y se resuspendió en 100µl de agua ultra pura. La concentración y calidad de la muestra fue evaluada mediante espectrofotometría utilizando el Nanodrop.

13. *Digestión de pGEM-Inserto Control con SpeI y NcoI.* Para obtener el vector pGEM-T Easy lineal con extremos cohesivos *SpeI* y *NcoI* se digirieron 8 µg de *pGEM-Inserto Control* con 10U de *NcoI*, 10U de *SpeI* en buffer Tango durante 4 horas a 37°C. Los productos de digestión (*SpeI-pGEM-NcoI* y *SpeI-Inserto Control-NcoI*) se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.8% en buffer TAE y 5µg/ml de BrEt. Como referencias se corrieron además el marcador de peso molecular 100pb Ladder de Fermentas y 2µl de una dilución 1:10 de *pGEM-Inserto Control*.
14. *Purificación de SpeI-pGEM-NcoI.* Los productos de digestión *pGEM-Inserto Control* se separaron electroforéticamente en gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE y 5µg/ml de BrEt. El fragmento correspondiente a *SpeI-pGEM-NcoI* se recorto del gel y se purificó de la agarosa utilizando el kit PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen). La concentración y calidad del ADN purificado se evaluó espectrofotométricamente utilizando el Nanodrop y se concentró en un evaporador centrífugo en vacío a 50°C hasta sequedad. El pellet se resuspendió en agua libre de nucleasas a una concentración de 50ng/µl.
15. *Ligación direccional de SpeI-kprp-NcoI en SpeI-pGEM-NcoI* El fragmento de extremos cohesivos *SpeI-kprp-NcoI* se ligó en el vector de extremos cohesivos *SpeI-pGEM-NcoI* 50ng de *SpeI-pGEM-NcoI*, 35ng de *SpeI-Kprp-NcoI* (correspondientes a una relación molar inserto:vector 16:1), 5 U de Express Link T4 DNA Ligasa (Invitrogen) en buffer de reacción T4 DNA ligase (Invitrogen). La reacción tuvo lugar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
16. *Transformación de células XI-1blue quimio-competentes con pGEM-Kprp.* se procedió de igual manera que en el punto 4.

17. *Búsqueda de clones recombinantes pGEM-kprp.* Se picaron 10 colonias blancas a partir de las cuales se largaron pre-cultivos durante 12 a 16 horas a 37°C con 220 rpm de agitación constante en medio líquido LB conteniendo 100µg/ml de ampicilina. A partir de dichos cultivos se realizó la extracción de ADNp utilizando el kit NucleoSpin Plasmid de Macherey-Nagel siguiendo especificaciones del fabricante. La calidad del ADNp obtenido se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE conteniendo 5µg/ml de BrEt y se cuantificó en el Nanodrop. El ADNp se secuenció en el Servicio de Secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo con los cebadores T7 y SP6.
18. *Obtención de ADNp de buena calidad de pGEM-kprp.* Una vez obtenidas las secuencias se seleccionó un clon recombinante *pGEM-kprp* y se amplificó y purificó mediante Maxipreparation utilizando el kit QIAfilter Plasmid Maxi Kit siguiendo especificaciones del fabricante. La calidad del ADNp obtenido se evaluó en el Nanodrop y por separación electroforética en gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE conteniendo 5µg/ml de BrEt.
19. *Obtención de pGEM-kprp-SpeI (molde anti-sentido) y pGEM-kprp-NcoI (molde sentido).* Para la síntesis de las sondas sentido y anti-sentido para *kprp* se utilizó como molde el plásmido *pGEM-kprp* linealizado con *NcoI* y *SpeI* respectivamente. Para ello se utilizaron 10µg de ADNp *pGEM-kprp*, 20U de *NcoI* (molde sentido -Fermentas-) o 20 U de *SpeI* (molde anti-sentido -Fermentas-) en buffer de reacción Tango (Fermentas). Las reacciones de digestión tuvieron lugar a 37°C durante 16 horas. Los productos de digestión (*pGEM-kprp-SpeI* y *pGEM-kprp-NcoI*) se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE conteniendo 5µg/ml de BrEt.
20. *Tratamiento de pGEM-kprp-SpeI y pGEM-kprp-NcoI con Proteinasa K.* Luego de verificar mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% la digestión completa de *pGEM-kprp* con *SpeI* y *NcoI*, los moldes *pGEM-kprp-SpeI* y *pGEM-kprp-NcoI* se sometieron paralelamente a un tratamiento con proteinasa K con el fin de eliminar la posible contaminación con ARNasas de las muestras. Para ello las muestras se incubaron durante 30 minutos a 50°C con 200µg/ml de Proteinasa K (Sigma) en 0.5% Dodecilsulfato sódico (SDS).
21. *Purificación de pGEM-kprp-SpeI y pGEM-kprp-NcoI.* Una vez finalizado el tratamiento con Proteinasa K, se agregó a las muestras 1 volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico

(25: 24: 1-Sigma-). Se mezclaron hasta formar una emulsión, la cual se centrifugó a 12000 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se recuperaron las fases acuosas y se realizaron dos extracciones sucesivas con cloroformo agregando igual volumen de cloroformo y centrifugando a 12000 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se recuperaron las fases superiores y luego de la segunda extracción se precipitó el ADN de cada muestra con etanol. Para la precipitación de los ácidos nucleicos contenidos en la muestra se utilizaron 3 volúmenes de etanol, 1/10 volúmenes de Acetato de Sodio 3M pH 5.2 (AcNa) y se incubó durante 30 minutos a -20°C. Se centrifugó a 14000 xg durante 15 minutos a 4°C y el pellet se lavo con 500µl de etanol 70%. El ADN se colecto mediante centrifugación a 14000 xg durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y el ADN se seco al aire. Una vez eliminada toda traza de etanol, el mismo se resuspendió en 10µl de agua libre de nucleasas. La concentración y calidad del ADN obtenido se evaluó en el Nanodrop.

22. *Síntesis y marcaje de as-kprp^{biot} y s-kprp^{biot}*. La síntesis de las sondas anti-sentido *kprp* (*as-kprp^{biot}*) y sentido *kprp* (*s-kprp^{biot}*), se sintetizaron a partir de *pGEM-kprp-SpeI* y *pGEM-kprp-NcoI* utilizando las ARN polimerasas T7 y SP6 y se marcaron con biotina. Para la síntesis de la sonda anti-sentido se utilizaron: 1.63 pmoles de *pGEM-kprp-SpeI*, 30 U de ARN polimerasa T7 (Ambion), 2mM ATP (Roche), 2mM CTP (Roche), 2mM GTP (Roche), 1.3mM UTP (Roche), 0.7mM UTP-16-biotina en Buffer de Transcripción (Ambion). Para la síntesis de la sonda sentido se utilizaron: 1.35 pmoles de *pGEM-kprp-NcoI*, 40 U de ARN polimerasa SP6 (Ambion), 1mM ATP (Roche), 1mM CTP (Roche), 1mM GTP (Roche), 0.65mM UTP (Roche), 0.35mM UTP-16-biotina en Buffer de Transcripción (Ambion). Las reacciones de transcripción tuvieron lugar a 37°C durante 16 horas. Finalizadas las transcripciones, se digirió el ADN molde, con 2U de DNasa I TURBO (Ambion) durante 15 minutos a 37°C.
23. *Análisis de las reacciones de transcripción*. La eficiencia de las reacciones de transcripción se estimó cuantificando el ARN obtenido en el Nanodrop. La especificidad de las mismas se evaluó mediante electroforesis desnaturizante en gel de agarosa al 1.8% conteniendo formaldehído. Para ello se calentaron 1.8 g de agarosa, 10ml de 10X Buffer de Gel de Agarosa Formaldehído pH 7 (200mM 3-[N-morpholino]propanesulfonic acid -MOPS-, 50mM acetato de sodio, 10mM EDTA) en 100ml de agua libre de nucleasas hasta disolver la agarosa. La mezcla se enfrió a 65°C y se agregaron 1.8ml de 37% (12.3M) de formaldehído y 1µl de BrEt 10mg/ml. Se mezcló bien y se enfrió en el soporte del gel. El

mismo se equilibró en 1X Buffer de Corrida de Gel de Agarosa Formaldehido (100ml 10X Buffer de Gel de Agarosa Formaldehido pH 7, 20ml 37% (12.3M) formaldehido, 880ml de agua libre de nucleasas) al menos 30 minutos antes de la corrida. Se utilizaron 5µl de cada reacción de transcripción disuelta en 116µl de agua libre de nucleasas, a los cuales se les agregó 1.25µl de 5X Buffer de carga (16µl de solución acuosa saturada de azul de bromo-fenol, 80µl 500mM EDTA pH 8, 720µl 37% (12.3M) formaldehido, 2ml 100% glicerol, 3.084ml formamida, 4ml 10X Buffer de Gel de Agarosa Formaldehido pH 7, agua libre de nucleasas c.s.p. 10ml) y se calentó a 65°C durante 5 minutos. La electroforesis se realizó a 7 V/cm en 1X Buffer de Corrida de Gel de Agarosa Formaldehido.

24. *Purificación de las sondas.* Una vez finalizada la digestión del ADN molde, las sondas se purificaron mediante extracción con fenol: cloroformo. Para ello, se agregaron 116µl de agua libre de nucleasas y se estimó la eficiencia de la reacción de transcripción en el Nanodrop. Se agregaron 15µl de AcNa 3M pH 5.2, se mezcló y se agregaron 150µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1-Sigma-). Se mezcló hasta formar una emulsión y se centrifugó a 12000 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió la fase acuosa y se agregó igual volumen de cloroformo. Luego de homogeneizado se centrifugó a 12000 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa y el ARN se precipitó con 2-propanol de la siguiente manera: se agregó 1 volumen de 2-propanol, se mezcló bien y se incubó durante 20 horas a -20°C. Transcurridas las 20 horas el ARN se precipitó a velocidad máxima en un micro centrífuga durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y el ARN se resuspendió en 200µl de agua libre de nucleasas. Las sondas *as-kprp^{biot}* y *s-kprp^{biot}* purificadas se cuantificaron utilizando el Nanodrop.

Extracción de proteínas totales de astrocitos N-Tg, Tg y AbA. Las células se cultivaron a 37°C en atmosfera controlada con 5%CO₂ hasta alcanzar el 80% de confluencia. Al alcanzar dicha confluencia las células se lavaron sobre hielo con PBS frío y se lisaron con 1ml de RIPA buffer (150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 50mM Tris pH 8) cada 10⁷ células, el cual solubiliza las proteínas de toda la célula. Las células se rasparon con un raspador de células, siempre sobre hielo. La suspensión celular se transfirió a un tubo de micro-centrífuga y se sometió a agitación durante 30 minutos a 4°C. El lisado se centrifugó a 12000 rpm en una micro-centrífuga a 4°C. Se recupero el sobrenadante conteniendo las proteínas solubilizadas.

Cuantificación de proteínas. La concentración de proteínas obtenida para los astrocitos N-Tg, Tg y AbA se determinó mediante un método derivado colorimétrico, el ensayo del Ácido Bicinconínico (BCA). El BCA es el método más sensible (0.5-10 μ g) y el que muestra menos interferencia. La sal sódica del ácido bicinconínico es un compuesto con la capacidad de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu^{1+} en un medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ion cuproso producido en la reacción entre las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret). En este caso se utilizó una curva estándar de Albúmina Sérica Bovina (BSA) de 2mg/ml, 1.5mg/ml, 1mg/ml, 0.75mg/ml, 0.5mg/ml, 0.25mg/ml, 0.125mg/ml, 0.025mg/ml. En una placa de 96 pocillos se sembró en cada pocillo 200 μ l de BCA: CuSO_4 50:1 y se le agregó 5 μ l de proteína. Se utilizaron diluciones 1/10 y 1/50 de la muestra. La reacción de Biuret tuvo lugar a 37°C durante 30 minutos. Se midió la absorbancia a 570nm. A partir de los valores obtenidos se realizó la curva estándar de BSA y se determinó la ecuación de la recta. La concentración de proteínas contenida en las muestras (x) se determinó como $x=(y/a)-b$, donde y es el valor de absorbancia, a es la pendiente y b el corte en el origen.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. Las proteínas provenientes de los astrocitos N-Tg, Tg y AbA (obtenidas de acuerdo a 4.8.1.a-c) se separaron en función de su peso, tamaño y forma mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes conteniendo SDS (SDS-Page). Para ello se desnaturizaron 40 μ g de proteínas de cada muestra en 2X Laemmli buffer (Laemmli, 1970- 4%SDS, 10% 2-mercaptoetanol, 20% Glicerol, 0.004% azul de bromo-fenol, 0.125 M Tris HCl, pH 6.8) a 98°C durante 5 minutos. Las proteínas desnaturizadas se mezclaron por vortex y se cargaron en un gel 10% de poliacrilamida (Gel separador: 9.67% acrilamida, 0.33% bis-acrilamida, 0.375M Tris HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% persulfato de amonio -APS-, 0.01% TEMED; Gel concentrador: 5.8% acrilamida, 0.2% bis-acrilamida, 0.125M Tris HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% APS, 0.01% TEMED) donde fueron sometidas a un diferencial de potencial eléctrico en buffer de corrida (25mM Tris, 0.192M Glicina, 0.1% SDS). Como marcador de peso molecular se utilizó el Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas).

Transferencia de proteínas a membrana de difluoruro de polivinilideno (PDVF). Una vez separadas las proteínas mediante SDS-Page, las mismas fueron transferidas a una membrana hidrofóbica Hybond-P de PDVF (Amersham). Para ello se removió el gel de concentración y el gel separador conteniendo las proteínas se incubó durante 20 minutos en buffer de transferencia (25mM Tris, 0.192M Glicina, 0.1% SDS, 20% etanol). La membrana de PDVF se

lavo 10 segundos en metanol, 5 minutos en agua destilada y se equilibró durante 10 minutos en buffer de transferencia. La membrana (polo positivo) y el gel (polo negativo) se pusieron en el casete de transferencia y se sometieron a una diferencia de potencial a corriente constante de 300mA durante 1.5 horas a 4°C en la unidad de transferencia TE22 MiniTank Transfer Unit (GE Healthcare). La eficiencia de la transferencia se chequeó mediante la tinción de la membrana con rojo PonceauS durante un minuto a temperatura ambiente con agitación suave. Seguidamente, la membrana se destiñó mediante lavados con agua destilada hasta que las bandas fueron visibles. Para desteñir totalmente la membrana se realizaron lavados sucesivos con agua destilada.

Inmuno-detección de KPRP mediante western blot. Una vez transferidas las proteínas a la membrana de PDVF (de acuerdo a 4.8.1.e) la misma se lavo con PBS. Los sitios inespecíficos de unión se bloquearon con 5% de leche descremada en TBS-T (50mM Tris, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20) durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se enjuagó 2 veces con y se lavo durante 5 minutos con TBS-T. La detección de KPRP en la membrana se realizó de manera indirecta mediante un reactivo quimio-luminiscente dependiente de la actividad de la peroxidasa de rábano (HRP). Para ello se incubó la membrana con 4µg/ml de anticuerpo primario producido en conejo anti-KPRP de rata (GenScript) en 5% de leche descremada TBS-T durante 16 horas a 4°C. El exceso de anticuerpo se lavó 3 veces con TBS-T durante 10 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo primario se reconoció con una dilución 1:4000 de anticuerpo de cabra anti IgG de conejo conjugado a la peroxidasa de rábano (HRP-Abcam-) en 5% de leche descremada TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo secundario se lavó 6 veces con TBS-T durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para la detección quimio-luminiscente de KPRP se utilizó el reactivo ECL Western Blotting Substrate (Pierce). La membrana se colocó sobre una superficie limpia, plana y no absorbente, se cubrió con el reactivo de detección (aprox. 0,125 ml de reactivo/cm² de membrana) y se incubó durante 1 min a temperatura ambiente. Finalmente, la membrana se expuso a placas de autorradiografía (Amersham Hyperfilm ECL), en el cassette de revelado (Amersham Hypercassettes) y se incubó durante 15 seg, 5 min y 30 min. Luego las placas de autorradiografía se revelaron sumergiéndolas solución de revelado AGFA y luego de enjuagarlas con agua, las placas se sumergieron en solución de fijación (Na₂S₂O₃ 2,3M, Na₂S₂O₅ 0,01 M).

Gelatinización de cubreobjetos. La gelatinización de cubreobjetos estériles utilizados para inmunocitoquímica (ICQ) se realizó de acuerdo a Fischer et al., (2008). Brevemente, los

portaobjetos se limpiaron con una solución de NaOH 2N durante 2 horas a temperatura ambiente, se enjuagaron con abundante agua, y se sumergieron en una solución 0.2% gelatina (Sigma), 0.02% de sulfato de potasio crómico (Sigma) durante 2 minutos a 4°. Los cubreobjetos se secaron durante toda la noche a temperatura ambiente y se esterilizaron 45 minutos con luz UV bajo un flujo laminar.

Obtención de cubreobjetos para FISH e ICQ de células AbA. Se descongeló un crio vial de células AbA, pasaje 2 de la siguiente manera: el tubo almacenado en nitrógeno líquido se incubó durante 5 minutos en un baño líquido a 37°C. Las células se transfirieron a un tubo de 15 ml y se les agregó 5ml de medio DMEM 10% FBS conteniendo penicilina (100 IU/ml), y estreptomicina 100µg/ml. Se centrifugó a 1.5 rpm durante 5 minutos, se aspiró el medio y se lavó con DPBS. Las células se sembraron en una botella de 25cm² y se incubaron en estufa de atmósfera controlada (5% CO₂) a 37°C hasta alcanzar el 90% de confluencia, cambiándoles el medio cada 48 horas. Una vez alcanzada la confluencia, se aspiró el medio, se lavó con DPBS y las células se desprendieron de la placa con 0.25% Tripsina, 0.02% EDTA a 37°C durante 3 minutos. Las células se recuperaron en un tubo de 15ml conteniendo 5 ml de medio DMEM 10% FBS conteniendo penicilina (100 IU/ml), y estreptomicina 100µg/ml. Se colectaron por centrifugación a 1.5 rpm durante 5 minutos y se lavaron con DPBS. Se re-suspendieron en medio DMEM 10% FBS conteniendo penicilina (100 IU/ml) y estreptomicina 100µg/ml y se sembraron en cubreobjetos gelatinizados en placas de 35mm. Se incubaron en estufa de atmósfera controlada (5% CO₂) a 37°C hasta alcanzar el 70% de confluencia cambiándoles el medio de cultivo cada 48 horas.

Obtención de portaobjetos para FISH e ICQ de células gliales provenientes de la médula espinal de ratas SOD1^{G93A} -/-. Con el fin de analizar la expresión de la proteína KPRP y el ARNm *kprp* en las diferentes poblaciones gliales de la médula espinal de ratas SOD1^{G93A} -/-, se realizaron cultivos primarios a partir de la médula espinal de ratas de 2 días post-natales siguiendo el siguiente protocolo: se sacrificaron mediante decapitación 4 neonatos SOD1G93A y se les extrajo la médula espinal en DPBS. Se removieron cuidadosamente las meninges para evitar la contaminación del cultivo con fibroblastos, y se trituró la médula espinal en DMEM 10% FBS conteniendo penicilina (100 IU/ml), y estreptomicina 100µg/ml. Luego de una breve centrifugación, se aspiró el medio y se sometió al tejido a una hidrólisis proteica con 0.25% tripsina, 0.02% EDTA durante 20 minutos a 37°C. Transcurridos los 20 minutos, la tripsina se aspiró y se agregó DMEM 10% FBS conteniendo penicilina (100 IU/ml), y estreptomicina 100µg/ml. Se centrifugó a 1000 rpm, durante 10 minutos y las células colectadas en el pellet se

re-suspendieron en 5 ml de medio DMEM 10% FBS conteniendo penicilina (100 IU/ml), y estreptomicina 100µg/ml. Las células se plaquearon en una botella de 25 cm² y se incubaron en una estufa de atmósfera controlada (5% CO₂) a 37°C. Se incubaron hasta que el cultivo alcanzó el 90% de confluencia, cambiándoles el medio cada 48 horas. Una vez alcanzada la confluencia, se aspiró el medio de cultivo y las células adherentes se lavaron con DPBS. Se desprendieron de la placa con 0.25% de tripsina, 0.02% EDTA durante 3 minutos a 37°C y se colectaron en 5 ml de medio de cultivo. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 1.5 rpm durante 5 minutos y se volvieron a sembrar en portaobjetos gelatinizados (de acuerdo a 4.8.2.a) en placas de 35mm en medio de cultivo DMEM 10%FBS conteniendo penicilina (100 IU/ml), y estreptomicina 100µg/ml y se incubaron en estufa de atmósfera controlada (5% CO₂) a 37°C hasta alcanzar el 70% de confluencia, cambiándoles el medio de cultivo cada 48 horas.

ICQ de KPRP y GFAP. Una vez alcanzado el 70% de confluencia, el medio de cultivo se aspiró y las células adheridas al cubreobjeto se lavaron con DPBS (Invitrogen). Las células se fijaron con una solución de para-formaldehído al 4% en PBS (PFA 4%) durante 30 minutos a temperatura ambiente. El PFA se lavó 3 veces con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente y se bloquearon los epítopes inespecíficos con solución de bloqueo (10% FBS - Invitrogen-, 0.1% Tritón 100X -Sigma-) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se descartó la solución de bloqueo, se agregaron 0.5µg/ml de anticuerpo de conejo anti-KPRP de rata y 1:200 de anticuerpo de ratón anti GFAP de rata en solución de bloqueo y se incubó durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios se lavaron 3 veces con 0.1% Tritón 100X en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente y se agregaron diluciones 1:800 de los anticuerpos secundarios Alexa 488 anti-conejo (Invitrogen) y Alexa 594 anti ratón (Invitrogen) en solución de bloqueo. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo secundario se lavó con 0.1% Tritón 100X en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron con DAPI 1:5000 en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron dos últimos lavados con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente y se montó en MOWIOL Mounting Media.

FICH (Fluorescence in cells hybridization) de kprp. Una vez alcanzado el 70% de confluencias las células adheridas al cubreobjeto se lavaron con PBS libre de nucleasas. Las células se fijaron en una solución fresca de 3% PFA en PBS libre de nucleasas durante 20 minutos a TA. Concluidos los 20 minutos se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS libre de nucleasas. Se bloqueó la peroxidasa endógena con 1.5% de H₂O₂ en buffer 4XSSC (Sigma) durante 15 minutos a TA y se realizaron 2 lavados de 5 minutos con 4X SSC libre de nucleasas.

Los cultivos de GDR fueron sometidos a una etapa de pre-hibridación incubándolos en Solución de Hibridación (4X SSC -Sigma-, 50% de formamida -Sigma-, 10% de dextran sulfato -Sigma-, 0.1mg/ml de tRNA -Invitrogen- y 0.5mg/ml de DNA de salmón -Sigma-) durante 2 horas a 60°C. Paralelamente la sonda se desnaturalizó térmicamente a 95°C durante 3 minutos. Inmediatamente después se colocó 5 minutos en hielo y se agregó Solución de Hibridación hasta una concentración final de la sonda de 5ng/μl. Se incorporaron 150μl de dicha solución a cada cubreobjetos y se incubó durante 2 horas a 60°C. Posteriormente se realizaron varios lavados sucesivos de astringencia creciente: 2 lavados con 30% formamida en 4X SSC de 5 minutos cada uno a 60°C, 2 lavados con 4X SSC de 10 minutos cada uno a TA, 2 lavados con 2X SSC de 5 minutos cada uno a TA, 2 lavados con 1X SSC de 5 minutos cada uno a TA y 2 lavados con 0.5X SSC de 5 minutos cada uno a TA. Las células se fijaron nuevamente con 3%PFA-PBS durante 5 minutos a TA. El reconocimiento de la sonda se llevo a cabo con el Tyramide Signal Amplification Kit Biotin-XX de Invitrogen siguiendo especificaciones del fabricante. Brevemente, los cubreobjetos se bloquearon con la solución de bloqueo provista en el kit, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se realizó el reconocimiento de la biotina conjugada al UTP de la sonda con estreptavidina conjugada a la peroxidasa de rábano (estreptavidina-HRP) provista en el kit durante 30 minutos a temperatura ambiente en solución de bloqueo. El exceso de estreptavidina se lavó 3 veces con PBS durante 5 minutos a 37°C y se agrego el sustrato de la HRP provisto en el kit durante 10 minutos a temperatura ambiente. La enzima HRP cataliza la hidrólisis del reactivo Tyramide generando en este caso una amplificación de la señal mediante el depósito de biotina. El exceso de reactivo se lavó 3 veces con PBS durante 5 minutos a 37°C. Se procedió entonces con la ICQ para GFAP de la siguiente manera: los cubreobjetos se incubaron durante toda la noche a 4° con 1:100 conejo anti-GFAP (Sigma) en solución de bloqueo. Las uniones inespecíficas se eliminaron mediante 3 lavados con PBS de 5 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios fueron reconocidos con 1:800 Alexa 594 anti-conejo (Invitrogen), y la sonda se reconoció con 1:800 de estreptavidina conjugada a Alexa 488 (Invitrogen) en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpos se lavo con PBS durante 5 minutos a temperatura y se tiñeron los núcleos con 15nM de DAPI durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último se realizaron 2 lavados con PBS de 5 minutos a temperatura ambiente y se montó en MOWIOL Mounting Media.

IHQ de KPRP, GFAP en la médula espinal de ratas SOD1G93A +/- y -/-. Los animales se anestesiaron profundamente y se realizó una perfusión transcardial con 0.9% salino en 4% PFA en 0.1M PBS (pH 7.2-7.4) a un flujo constante de 1ml/min. La médula espinal fijada se removió,

se post-fijo por inmersión durante 24 horas y se seccionó transversalmente en serie (30-50 μ m) en micrótopo de vibración. Las secciones seriadas se colectaron en 100mM PBS para inmunohistoquímica. Luego de recuperar los antígenos con citrato, los cortes libres en flotación se permeabilizaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con 0.1% Triton-X-100 en PBS, se lavaron con PBS, se bloquearon con 5% BSA:PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron durante toda la noche a 4° en una solución 0.1% Triton X-100 y PBS conteniendo los anticuerpos primarios, ratón anti GFAP (1:500, Sigma), conejo anti-KPRP (2,3 μ g/ml GenScript). Luego de lavar, las secciones se incubaron en diluciones 1:1000 de los anticuerpos secundarios conjugados a Alexa Fluor 488 anti conejo y Alexa Fluor 546 anti ratón (Invitrogen).

Obtención de tejido para FISH (Fluorescence in situ hybridization). Para el estudio de la expresión de *kprp in situ* se seleccionaron 2 ratas machos transgénicos con síntomas delanteros tardíos y 2 hermanos no transgénicos como control. Las ratas se anestesiaron y se sacrificaron por decapitación. Se extrajo por presión la médula espinal del canal vertebral sin las meninges y se congelaron segmentos cervicales, torácicos y lumbares en un baño de 2-Propanol y hielo seco. El tejido se almacenó a -80° hasta ser cortado. Para realizar los cortes los tejidos se transfirieron rápidamente a nitrógeno líquido y se transportaron al criostato. El tejido se transfirió al criostato (Leica) y se dejó equilibrar a la temperatura de corte (-20°C) durante 30 minutos. Se realizaron cortes transversales de 10 μ m en portaobjetos adhesivos HistoBond (Marienfeld) se transfirieron en cajas al nitrógeno líquido para ser transportados al frízer de -80°C donde se almacenaron hasta su utilización. Todo esto se realizó evitando la contaminación con ARNasas de las muestras.

FISH de *kprp* en la médula espinal de ratas *SOD1G93A +/-* y *-/-*. Los portaobjetos con los cortes de médula espinal se transfirieron de -80°C a temperatura ambiente durante 5 minutos y se calentaron a 50° durante 30 minutos. El tejido se fijó a temperatura ambiente durante 10 minutos con 4%PFA-PBS libre de nucleasas fresco. El fijador se lavó dos veces con PBS libre de nucleasas durante 5 minutos y el tejido se digirió con 1 μ g/ml de proteinasa K (Sigma) en proteinasa K buffer (5mM EDTA, 50mM Tris pH 7.5) durante 15 minutos a temperatura ambiente. El tejido se fijó nuevamente con 4% PFA-PBS libre de nucleasas durante 15 minutos a temperatura ambiente seguido de 2 lavados de 5 minutos con PBS libre de nucleasas a temperatura ambiente y un lavado de 5 minutos en agua destilada libre de nucleasas. Para neutralizar las cargas positivas del tejido y del vidrio los portaobjetos se sumergieron en una solución fresca de 0.1M triethanolamine-HCl pH8, se agregó 0.25% de anhídrido acético y se

incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron 2 veces con PBS libre de nucleasas a temperatura ambiente y se incubaron a 60° durante 2 horas en solución de hibridación (50% formamida, 5XSSC, 0.3mg/ml tRNA de levadura, 1X Denhardt's solution -Sigma-, 0.5mg/ml de DNA de salmón, 0.1% Tween 20, 5mM EDTA pH 8 y 10% de dextran sulfato). La solución de hibridación se lavó, se agregó 1ng/μl de sonda en solución de hibridación y se incubó durante 16 horas a 60°. El exceso de sonda se lavó con 5XSSC precalentado a 60°C durante 5 minutos, seguido de dos lavados con 0.2XSSC precalentado a 60° durante 30 minutos. Se realizó un último lavado de 5 minutos con 0.2XSSC a temperatura ambiente y se procedió al reconocimiento de la sonda con el Tyramide Signal Amplification Kit Biotin-XX de Invitrogen de igual manera que para la FICH. Los núcleos se tiñeron con 15nM de DAPI durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último se realizaron 2 lavados con PBS de 5 minutos a temperatura ambiente y se montó en MOWIOL Mounting Media.

Microscopía. Las imágenes de ICQ, IHQ, FICH y FISH se obtuvieron en los microscopios de epifluorescencia y confocal del Institut Pasteur de Montevideo. Las imágenes obtenidas en el microscopio de epifluorescencia se procesaron utilizando el software ImageJ 1.45s, Wayne Rasband, NIH. Las imágenes obtenidas en el microscopio confocal se procesaron en el software Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 Obtención de ARN de astrocitos no transgénicos, transgénicos y aberrantes.

Para la obtención del ARN de los distintos tipos astrocitarios se establecieron cultivos primarios de alta pureza (>98%) de cada tipo celular. Se realizaron 3 réplicas biológicas de cada tipo celular. La concentración, el índice $A_{260/280}$ y el RIN obtenidos para cada una de las muestras se indican en la tabla 1.

RNA procedente de:	RIN	$A_{260/280}$	Concentración (ng/ μ l)
Astrocitos hSOD1 ^{G93A} -/- (réplica 1-Wt1-)	9.40	2.12	134
Astrocitos hSOD1 ^{G93A} -/- (réplica 2-Wt2-)	9.50	2.14	134
Astrocitos hSOD1 ^{G93A} -/- (réplica 3-Wt3-)	9.00	2.04	241.1
Astrocitos hSOD1 ^{G93A} +/- (réplica 1-Tg1-)	9.70	2.13	212.3
Astrocitos hSOD1 ^{G93A} +/- (réplica 2-Tg2-)	9.20	2.12	145.2
Astrocitos hSOD1 ^{G93A} +/- (réplica 3-Tg3-)	9.00	2.11	340
AbA (réplica 1-AbA1-)	9.60	2.11	147
AbA (réplica 2-AbA-2-)	9.60	2.14	661
AbA (réplica 3-AbA-3-)	9.80	2.14	227

Tabla 1. Calidad y concentración del ARN utilizado para los microarreglos.

Como se puede apreciar, el ARN utilizado para el estudio de microarreglos fue de muy buena calidad (RIN>8 y $A_{260/280}$ >1.99- por detalles ver ANEXO I-).

Por lo tanto el ARN obtenido a partir de los cultivos primarios de astrocitos contó con la calidad y concentración adecuadas para ser utilizados en el estudio de perfil transcripcional mediante la técnica de microarreglos.

5.2 Microarreglos de los tres tipos astrocitarios y análisis computacional de los resultados obtenidos.

Para obtener resultados estadísticamente representativos el análisis por microarreglos se realizó con el ARN obtenido a partir de 2 preparaciones independientes de astrocitos neonatales no transgénicos (NTg2, NTg3), 3 preparaciones independientes de astrocitos neonatales transgénicos (Tg1, Tg2, Tg3) y 3 preparaciones independientes de células AbA (AbA1, AbA2, AbA3). Si bien el diseño experimental original constaba de la utilización de triplicados biológicos de cada tipo astrocitario, por razones de economía se redujo una réplica para optimizar los insumos. Basándonos en datos preliminares (Vargas et al., 2008) decidimos excluir una réplica de los astrocitos no transgénicos, en base a su pequeña variabilidad entre muestras.

A partir de 200ng de ARN total se sintetizó en paralelo para cada una de las muestras el ARN-Cy3. Luego de purificado, el ARN-Cy3 se analizó en el Nanodrop. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2. Para la hibridación en los microarreglos se utilizaron 1.65µg de ARNc-Cy3 de actividad específica Cy3 mayor a 9.0 pmolCy3/µg de ARNc-Cy3. La cantidad y la actividad específica del ARNc-Cy3 se determinaron utilizando las ecuaciones 1 y 2 respectivamente (ec.1, ec.2). En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las muestras.

$$\mu\text{g de ARNc} = \frac{(\text{concentración de ARN}) \times 30\mu\text{l (volumen de elución)}}{1000} \quad (\text{ec.1})$$

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{concentración de Cy3}}{\text{concentración de ARNc}} \times 1000 \quad (\text{ec.2})$$

Los análisis de expresión génica se pueden realizar en plataformas de microarreglos de un color (basados en la intensidad) o de dos colores (basados en la relación) dependiendo de la aplicación específica del experimento. Nuestro estudio se llevo a cabo utilizando la plataforma de microarreglos de un color. La alternativa de un solo color brinda la capacidad de comparar la expresión génica obtenida en un microarreglo directamente con la de otros microarreglos para generar nuevas y múltiples mediciones radiométricas. Además, las medidas basadas en la intensidad se pueden utilizar en un tipo de esquema de análisis de ANOVA donde se registran a lo largo de un experimentos los cambios en los valores de intensidad para un gen dado para determinar sub o sobre-regulación.

Muestra	Cy3 (pmol/ml)	Concentración (ng/μl)	ARNc-Cy3 μg	Actividad específica	A _{260/280}
NTg2	2.84	190	5.70	14.95	2.11
NTg3	2.6	175.25	5.26	14.84	2.05
Tg1	4.72	258.62	7.76	18.25	2.24
Tg2	1	88	2.64	11.36	2.33
Tg3	2.5	168.39	5.05	14.85	2.07
AbA1	1.38	119.67	3.60	11.50	2.30
AbA2	2.38	158.78	4.76	14.99	2.28
AbA3	2.71	172.3	5.17	15.73	2.28

Tabla 2. Concentración y calidad del ARNc-Cy3 obtenido para cada una de las muestras.

Para los experimentos de microarreglos se utilizan varios tipos de sondas fluorescentes. Las plataformas de expresión génica de un color de Agilent utilizan la sonda Cianina 3 (Cy3) debido a que, comparada a la Cy5, es menos susceptible a la degradación por factores ambientales como el ozono, el pH, y los solventes orgánicos.

Para el análisis estadístico de los datos se considero la siguiente hipótesis nula para cada gen:

H₀: El gen (x) no presenta diferencias en la media de intensidad de expresión entre las muestras. En otras palabras, el gen (x) tendrá medias iguales en todas los grupos de muestras.

La hipótesis nula se aplicó para cada uno de los 30422 genes presentes en el microarreglo. Por lo tanto, cada gen posee un p-valor independiente. Como se compararon más de dos grupos (Astrocitos no transgénicos vs. astrocitos transgénicos vs. astrocitos aberrantes) se utilizó un test ANOVA de una vía. El p-valor indica la probabilidad de obtener una diferencia de medias entre los grupos tan alta como la que se observa al azar. Cuanto menor es el valor de p, más significativa es la diferencia entre los grupos. Se estableció un nivel de significación de 0.05, esto se traduce en que los genes considerados diferencialmente expresados entre las muestras fueron los que presentaron un valor de p menor al 0.05. De los 30422 genes analizados si consideramos un nivel de significancia de 0.05, 1521 genes de los considerados diferencialmente expresados pueden ser falsos positivos. Para reducir los falsos positivos se realizó un corrección de múltiples ensayos (MTC). El propósito de una MTC es mantener la tasa de error global/falsos positivos menor que el punto de corte del p-valor especificado, incluso si

se están analizando miles de genes. En este trabajo los p-valores se ajustaron para múltiples ensayos utilizando la aproximación de la tasa de descubrimiento de falsos positivos (FDR) con el test Benjamini-Hochberg. Este procedimiento es el menos riguroso de los MTC pero proporciona un buen equilibrio entre el descubrimiento de las diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica y la protección contra falsos positivos. La rigurosidad de los MTC aumenta conforme a la cantidad de genes analizados.

Se filtraron 30422 (fig., 10A) genes, de estos, 1847 (fig., 10B) genes rechazaron la H_0 con un $p < 0.05$ dentro de los cuales 1553 presentaron diferencias en la expresión mayores a 2 ($FC > 2$) en las células AbA respecto a los astrocitos no transgénicos y transgénicos (fig., 10C y 11A).

De los 1553 genes que presentaron diferencias significativas mayores a 2 veces entre las AbA y los otros tipos astrocitarios (recuadro amarillo fig., 10C), 374 se encontraron sobre-expresados en las células AbA respecto a los astrocitos transgénicos y no transgénicos (308 sobre-expresados respecto a ambos fenotipos astrocitarios, 65 únicamente sobre-expresados respecto a los astrocitos no transgénicos y 1 únicamente sobre-expresado respecto a los transgénicos- fig., 11B) y 1245 sub-expresados (1179 sub-expresados en las AbA respecto a ambos tipos astrocitarios, 65 únicamente sub-expresados respecto a los transgénicos y 1 sub-expresado de acuerdo a los no transgénicos, fig., 11B).

Los resultados obtenidos indican que mientras los patrones de expresión génica de los astrocitos no transgénicos y transgénicos no presentan diferencias significativas (considerando un $p < 0.05$ y un $FC > 2$), el perfil transcripcional de las células AbA exhibe diferencias considerables respecto al de los otros tipos astrocitarios. Se encontró que aproximadamente el 6% de los genes estudiados se encuentra regulado de manera diferencial en las células AbA en comparación a los astrocitos transgénicos y no transgénicos. De este 6%, el 84% presentó cambios en la expresión con diferencias mayores a 2 en las células AbA, lo cual indica grandes diferencias entre la regulación génica de las células AbA y los otros tipos astrocitarios. A su vez, la mayoría de los genes que presentaron diferencias significativas mayores a 2 cambios en la expresión en las células AbA correspondieron a genes sub-regulados (76%).

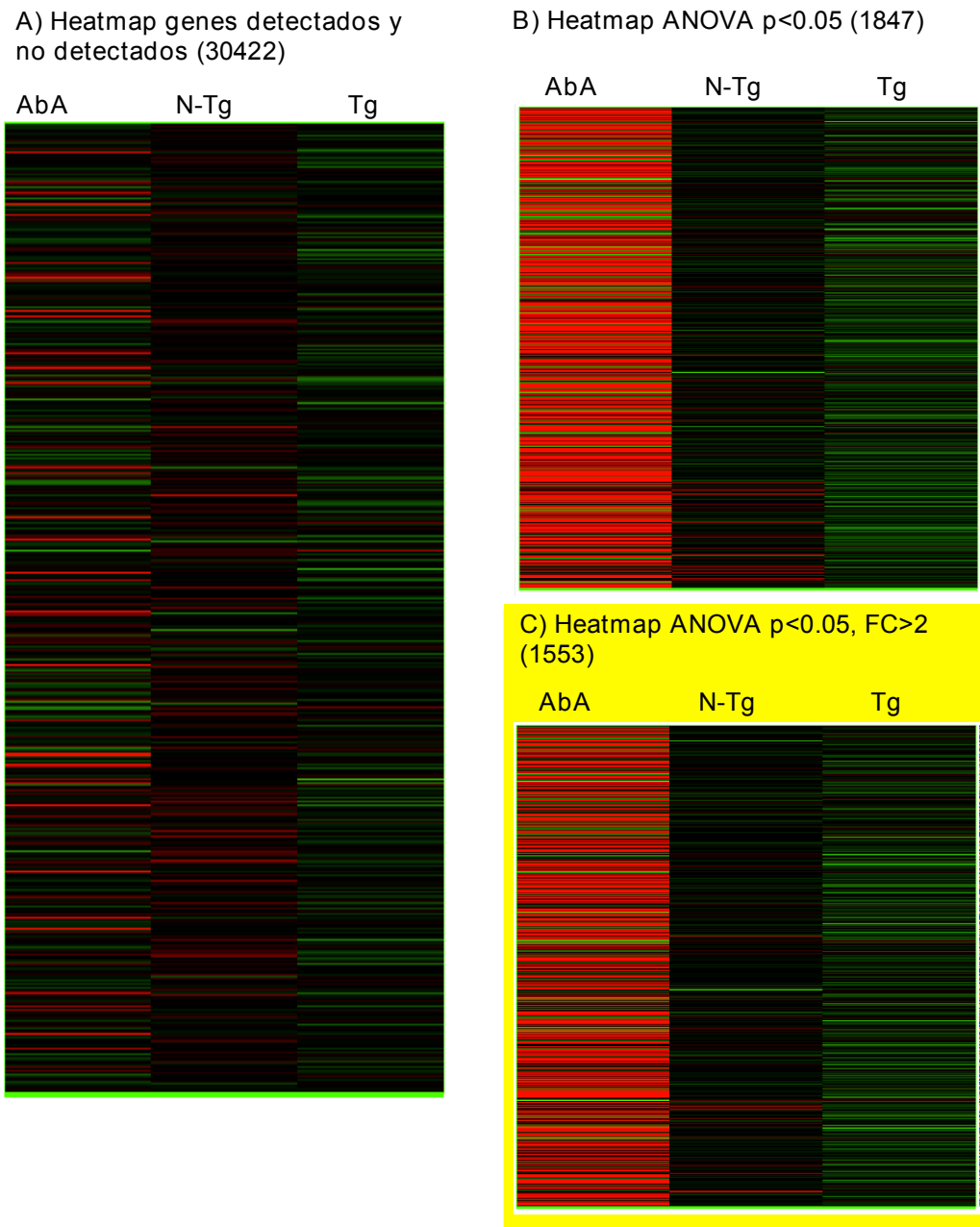


Figura 10. Las AbA presentaron 1847 genes diferencialmente expresados respecto a los astrocitos neonatales. Representación gráfica de los resultados de expresión génica obtenidos en los microarreglos. El rojo representa sub-regulación y el verde sobre-regulación en las AbA. A) Heatmap de los genes filtrados de acuerdo a la intensidad de señal (30422). B) Heatmap de los genes con diferencias en su expresión en las células AbA con un $p < 0.05$ (1847). C) Recuadrado en amarillo se representa el heatmap de genes con un cambio en la expresión mayor a 2 en las células AbA y un $p < 0.05$ (1553). Este listado de genes fue tenido en cuenta para los análisis posteriores.

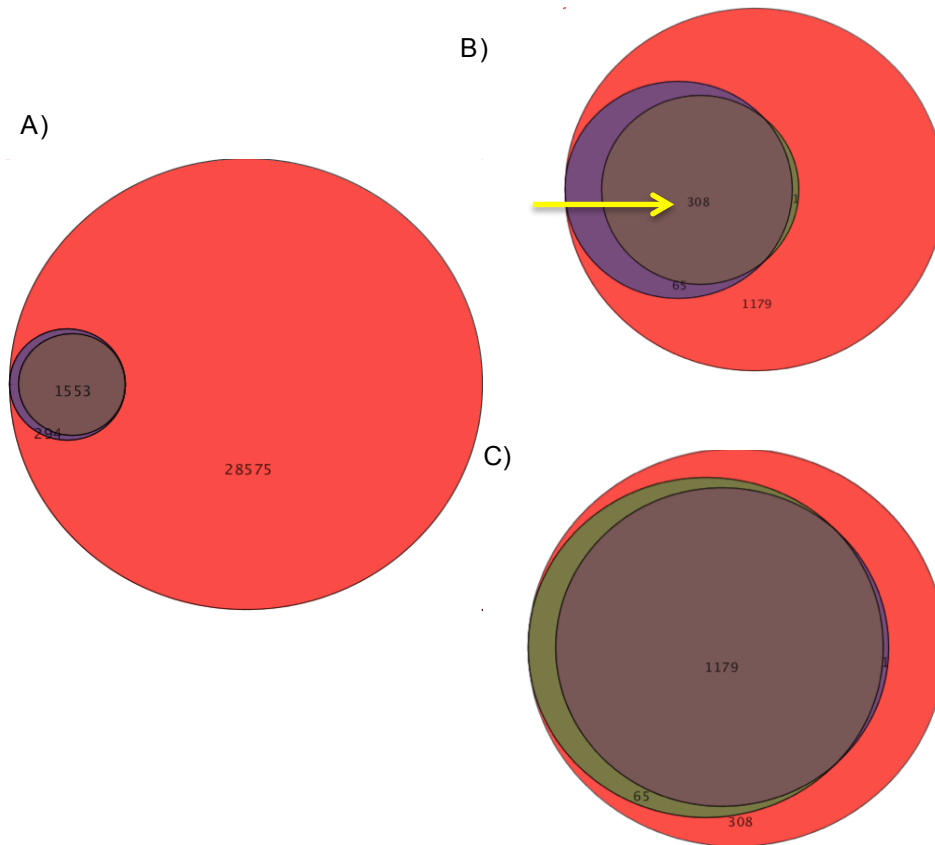


Figura 11. **Representación de la expresión diferencial de genes en células AbA en Diagrama de Venn.** Se encontraron 308 genes con niveles significativos de sobre-expresión mayor de 2 veces en las células entre las células AbA y los astrocitos neonatales. A) En rojo se indica la totalidad de genes filtrados (30422), en lila los genes que rechazan la H_0 con un $p < 0.05$ luego de realizado el ANOVA (1847) y en gris los genes con un cambio en su expresión mayor a 2 en las AbA (1553). B) En rojo se indica los genes diferencialmente expresados en AbA post-ANOVA con un $p < 0.05$ y un $FC > 2$ (1553), en verde los genes sobre-expresados en AbA respecto al transgénico (309) y en lila los genes sobre-expresados en AbA respecto al no transgénico (373). Los 308 genes sobre-expresados en AbA respecto a ambos tipos de astrocitos neonatales se indican con una flecha amarilla C) En rojo se indican los genes diferencialmente expresados en las células AbA post-ANOVA con un $p < 0.05$ y un $FC > 2$ (1553), en lila se representan los genes sub-expresados en las AbA respecto al no transgénico (1180) y en verde se representan los genes sub-expresados respecto al transgénico (1244).

A partir de los genes diferencialmente expresados en las células AbA ($p < 0.05$, $FC > 2$) se realizó un Análisis de las vías involucradas con un umbral de $p < 0.1$. En la tabla 3 se muestran las vías más significativas.

Pathway	p-value	Matched Entities	Pathway Entities
Rn_Cholesterol_Biosynthesis_WP461_41635	1.05E-04	6	15
Rn_Cholesterol_metabolism_WP632_58977	1.06E-04	7	23
Rn_DNA_Replication_WP484_41654	3.24E-04	9	40
Rn_Cell_cycle_WP429_41778	7.61E-04	13	88
Rn_Cholesterol_metabolism_WP659_41744	1.43E-03	6	23
Rn_Metapathway_biotransformation_WP1286_58518	1.94E-03	17	143
Rn_Fatty_Acid_Omega_Oxidation_WP133_60555	2.45E-03	4	12
Rn_Oxidative_Stress_WP173_41666	3.46E-03	6	27
Rn_Serotonin_and_anxiety_WP2132_58530	4.85E-03	4	13
Rn_G1_to_S_cell_cycle_control_WP348_47766	1.07E-02	9	66
Rn_Wnt_Signaling_Pathway_NetPath_WP375_41722	1.36E-02	12	106
Rn_Brain_derived_neurotrophic_factor_WP2148_58522	1.61E-02	3	10
Rn_Urea_cycle_and_metabolism_of_amino_groups_WP153_41771	1.66E-02	4	20
Rn_Calcium_Regulation_in_the_Cardiac_Cell_WP326_47775	1.87E-02	15	149
Rn_Matrix_Metalloproteinases_WP278_41770	1.92E-02	5	29
Rn_Cholesterol_metabolism_WP659_58964	2.86E-02	2	23
Rn_Hypothetical_Network_for_Drug_Addiction_WP1281_41681	2.88E-02	5	31
Rn_GPCRs_Class_B_Secretin-like_WP378_41762	3.31E-02	4	22
Rn_Keap1-Nrf2_WP1280_48260	3.38E-02	3	13
Rn_Monoamine_GPCRs_WP276_48267	3.67E-02	5	33
Rn_Tryptophan_metabolism_WP270_47755	4.83E-02	6	48

Tabla 3. Vías con genes diferencialmente expresados en las células AbA. En la primera columna se indica el nombre de la vía, en la segunda el p-valor correspondiente, en la tercera la cantidad de genes diferencialmente expresados en las células AbA involucrados en la vía y en la última columna la cantidad de genes que componen la vía.

Biosíntesis de colesterol. La vía más significativa es la vía de la biosíntesis del colesterol ($p=1.06E-04$), con un 40% de sus genes regulados diferencialmente en las células AbA (fig., 12A). Curiosamente todos estos genes se encuentran sobre-regulados en las células AbA respecto a los otros tipos astrocitarios (fig., 12B). La segunda vía más significativa fue la vía del metabolismo del colesterol ($p=1.06E-04$), con el 30% de los genes involucrados diferencialmente expresados en las células AbA (fig., 13A) En este caso 6 de los 7 genes involucrados en la vía presentan sobre-regulación en las células AbA (fig., 13B y C). El único gen sub-expresado en las AbA en esta vía es el gen de la Lecitina colesterol acil transferasa (LCAT). Además las vías de respuesta celular al colesterol ($p=1.43E-03$) y la vía de la omega oxidación de ácidos grasos ($p=2.45E-03$) también presentan genes diferencialmente regulados en las células AbA. Curiosamente los genes que presentaron diferencias en las células AbA involucrados en las vías de omega oxidación de ácidos grasos ($p=0.001$) se encontraron sub-expresados. Estos resultados indican que las células AbA presentan una regulación diferencial

en el metabolismo lipídico respecto a los astrocitos transgénicos y no transgénicos. Esto concuerda con resultados preliminares de imágenes de microscopía electrónica de las células AbA, en las cuales se observan abundantes depósitos de lípidos en su citoplasma.

Debido a la elevada toxicidad de las AbA específica para las motoneuronas en comparación con la observada para los astrocitos transgénicos neonatales y la evidencia del rol de los lípidos en el desarrollo de la patología (Cutler et al., 2002, Dupuis et al., 2008) se podrían considerar las diferencias observadas en el metabolismo lipídico de las AbA como una posible causa subyacente a dicha toxicidad. Por lo tanto, sería interesante profundizar en el conocimiento del rol de los lípidos en la relación AbAs-motoneuronas en la patología.

Replicación del ADN y ciclo celular. Por otra parte las vías de replicación del ADN ($p=3.24E-04$, fig., 14) y del ciclo celular ($p=7.61E-04$, fig., 15) presentaron genes con diferencias significativas en su expresión en las células AbA respecto a los otros tipos astrocitarios. Las diferencias encontradas radicaron en una sobre-expresión de estos genes en las células AbA. Podrían ser precisamente estas diferencias la base de la carencia de senescencia replicativa de las células AbA en cultivo.

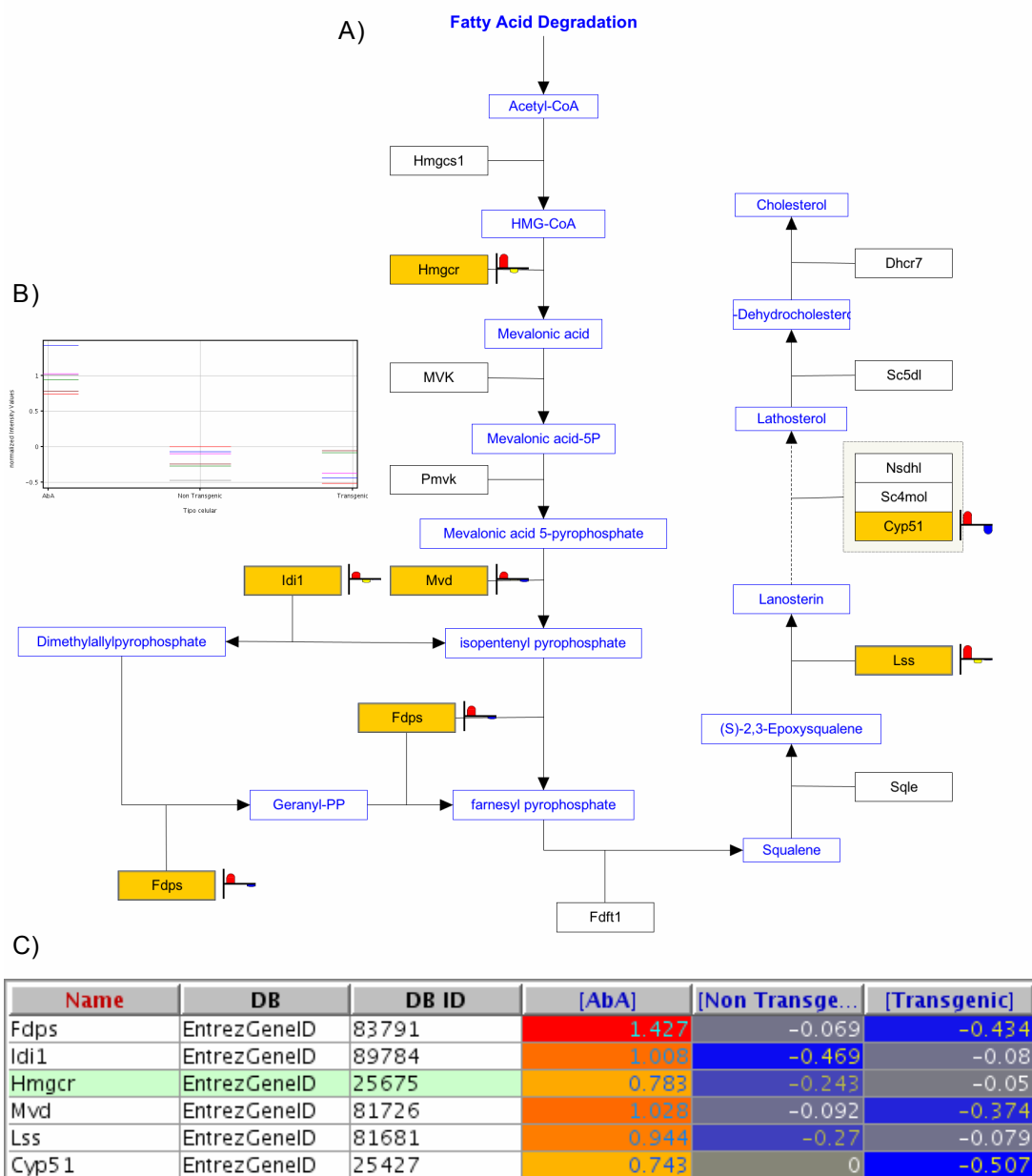


Figura 12. Vía de biosíntesis del colesterol. A) Esquema de la vía de síntesis del colesterol con los genes involucrados. Los genes diferencialmente expresados en las células AbA se indican en naranja. B) Profile Plot de los genes diferencialmente expresados en las células AbA involucrados en la vía del colesterol. Se indica el nivel de expresión comparativo para cada tipo celular. C) Tabla de valores de expresión normalizados de los genes diferencialmente expresados en las células AbA involucrados en la vía de biosíntesis del colesterol. En rojo se indican los genes sobre-expresados y en azul los sub-expresados.

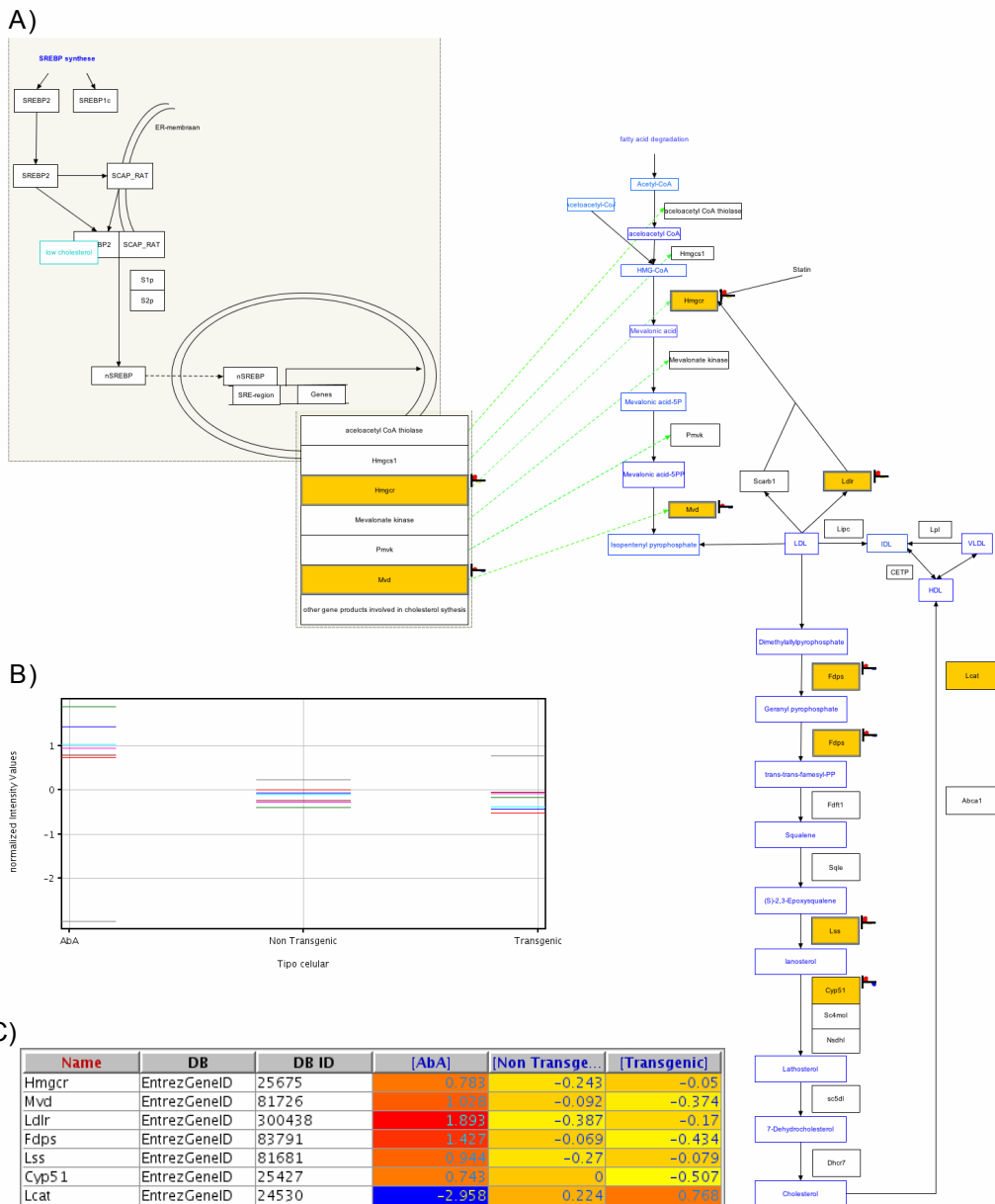
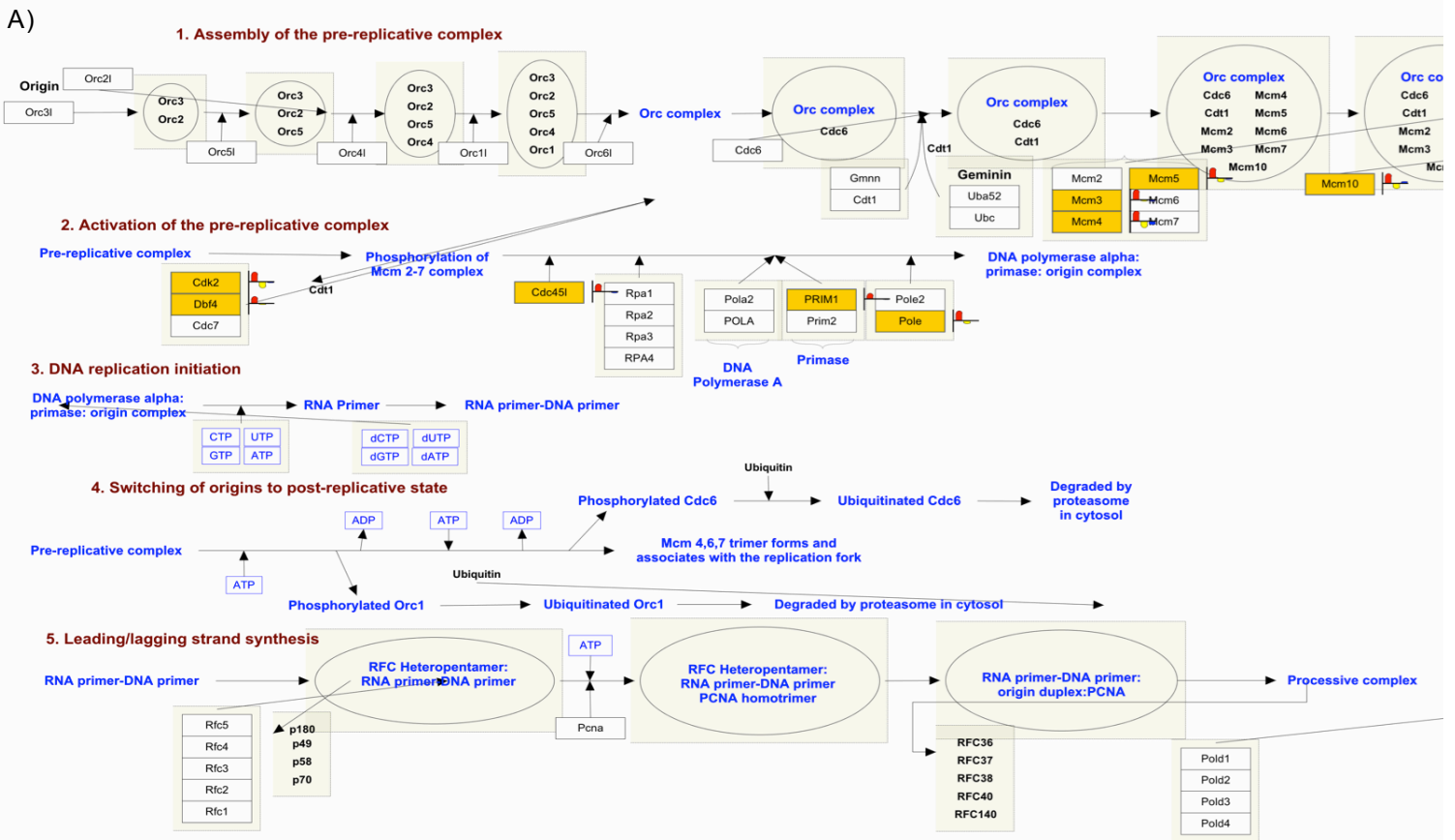


Figura 13. Vía del metabolismo del colesterol. A) Esquema de la vía del metabolismo del colesterol con los genes lucrados. Los genes diferencialmente expresados en las células AbA se indican en naranja. B) Profile Plot de los genes diferencialmente expresados en las células AbA involucrados en la vía del metabolismo del colesterol. Se indica el nivel de expresión comparativo para cada tipo celular. C) Tabla de valores de expresión normalizados de los genes diferencialmente expresados en las células AbA involucrados en la vía del metabolismo del colesterol. En rojo se indican los genes sobre-expresados y en azul los sub-expresados



B)

Name	DB	DB ID	[AbA]	[Non Transge...]	[Transgenic]
PRIM 1	EntrezGeneID	246327	1.059	0	-0.106
Pole	EntrezGeneID	304573	0.829	-0.261	-0.012
Mcm5	EntrezGeneID	291885	0.77	-0.296	-0.075
Mcm4	EntrezGeneID	29728	0.675	-0.439	-0.229
Mcm3	EntrezGeneID	316273	0.858	-0.131	-0.127
Mcm10	EntrezGeneID	307126	0.904	-0.497	0.177
Cdk2	EntrezGeneID	362817	0.819	-0.54	-0.079
Dbf4	EntrezGeneID	312046	1.315	-0.221	-0.095
Cdc45I	EntrezGeneID	287961	1.414	-0.119	-0.274

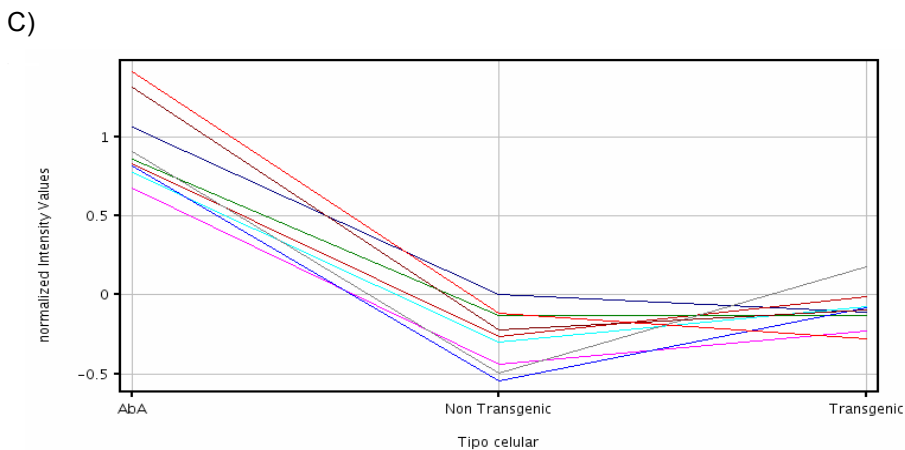
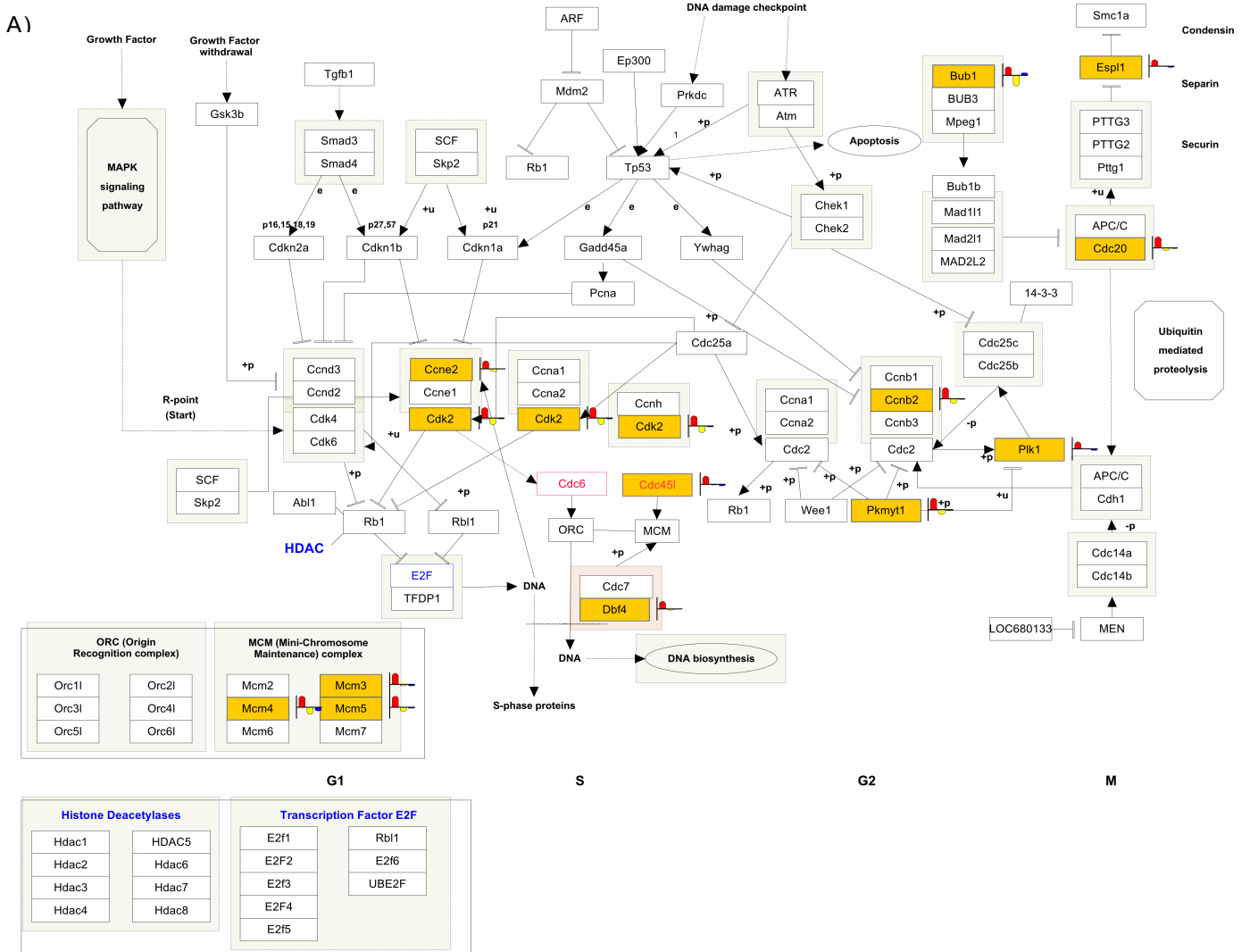


figura 14. Vía de la replicación del ADN. A) Esquema de la vía de replicación del ADN con los genes involucrados. Los genes diferencialmente expresados en las células AbA se indican en naranja. B) Profile Plot de los genes diferencialmente expresados en las células AbA involucrados en la vía de la replicación del ADN. Se indica el nivel de expresión comparativo para cada tipo celular. C) Tabla de valores de expresión normalizados de los genes diferencialmente expresados en las células AbA involucrados en la vía de la replicación del ADN. En rojo se indican los genes sobre-expresados y en azul los sub-expresados.



B)

Name	DB	DB ID	[AbA]	[Non Transge...]	[Transgenic]
Mcm5	EntrezGeneID	291885	0.72	-0.296	-0.075
Mcm4	EntrezGeneID	29728	0.575	-0.439	-0.229
Mcm3	EntrezGeneID	316273	0.858	-0.131	-0.127
Bub1	EntrezGeneID	296137	0.595	-0.77	0.169
Cdk2	EntrezGeneID	362817	0.819	-0.54	-0.079
Ccnb2	EntrezGeneID	363088	0.867	-0.376	-0.066
Dbf4	EntrezGeneID	312046	1.315	-0.221	-0.095
Cdc45l	EntrezGeneID	287961	1.414	-0.119	-0.274
Pkmyt1	EntrezGeneID	287101	0.867	-0.392	-0.055
Esp1	EntrezGeneID	315330	1.119	-0.101	-0.232
Plk1	EntrezGeneID	25515	1.198	-0.079	-0.291
Ccne2	EntrezGeneID	362485	1.403	-0.511	-0.057
Cdc20	EntrezGeneID	64515	0.868	-0.204	-0.051

C)

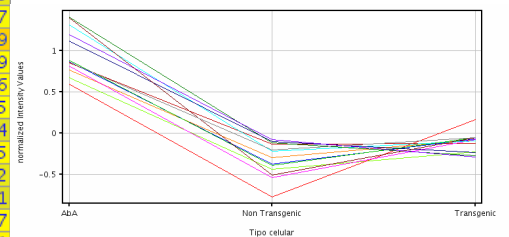


Figura 15. Ciclo celular. A) Esquema de los genes involucrados en el ciclo celular. Los genes diferencialmente expresados en las células AbA se indican en naranja. B) Profile Plot de los genes diferencialmente expresados en las células AbA involucrados en el ciclo celular. Se indica el nivel de expresión comparativo para cada tipo celular. C) Tabla de valores de expresión normalizados de los genes diferencialmente expresados en las células AbA involucrados en el ciclo celular. En rojo se indican los genes sobre-expresados y en azul los sub-expresados.

Análisis comparativo con resultados previos. Para comparar los resultados obtenidos en los microarreglos con los resultados de Vargas et al., 2008 se realizó un Welch t-test no apareado con la corrección de Benjamini-Hochberg para evaluar las diferencias en el perfil transcripcional

entre los astrocitos no transgénicos y transgénicos. No se encontraron diferencias en la expresión con un $p < 0.05$ y un $FC > 1.5$. Entonces, se realizó un Welch t-test no apareado sin corregir el *p-valor* con un MTC. Se consideraron diferencias en la expresión en genes con un $p < 0.05$. Se encontraron diferencias en la expresión de 2467 genes entre los astrocitos transgénicos y no transgénicos (1737 con un $FC > 1.5$), 3012 genes entre las AbA y los astrocitos no transgénicos (2209 con un $FC > 1.5$) y 6569 genes entre las AbA y los astrocitos transgénicos (5537 con un $FC > 1.5$).

En la tabla 4 se muestra la comparación de las diferencias de expresión entre los distintos tipos celulares obtenidas por Vargas et al., 2008 y en este trabajo. Como se puede apreciar, la totalidad de los genes que presentaron diferencias significativas en su expresión ($p < 0.05$) entre los astrocitos transgénicos y no transgénicos en este trabajo, exhiben la misma regulación que la obtenida en Vargas et al., 2008. En total, el 72% de los genes comparados muestran la misma tendencia en la regulación entre los dos genotipos astrocitarios en ambos trabajos. Las diferencias encontradas pueden atribuirse tanto a la variación biológica como técnica de los experimentos. Considerando que los cultivos primarios presentan variación intrínseca entre sí, que el tratamiento previo a la extracción del ARN no fue el mismo (mientras que en este trabajo la extracción de ARN se realizó una vez alcanzado el 98% de pureza y un 90% de confluencia de los cultivos primarios de astrocitos, en Vargas et al., 2008 la extracción de ARN se realizó luego de 24 horas de incubación de los mono-capas astrocitarias en medio suplementado L15 y que en este trabajo se utilizaron únicamente 2 réplicas de astrocitos no transgénicos se pueden aceptar diferencias entre los perfiles de expresión obtenidos en ambos trabajos. Asimismo la utilización de distintas plataformas (Affimetrix vs. Agilent) para los distintos análisis de microarreglos introduce variación en los resultados obtenidos. Por lo tanto, consideramos que nuestros resultados son válidos ya que concuerdan de acuerdo a lo esperado con los obtenidos en Vargas et al., 2008.

Estudios de microarreglos					
	Hallazgos previos Vargas et al., 2008	Hallazgos actuales			
Nombre del Gen	ATg vs. ANTg	ATg vs. A NTg	AbA vs. ATg	AbA vs. ANTg	No detectado
<i>Dcn</i>	UP	UP*	DOWN	DOWN	en 1 AbA
<i>Reln</i>	UP	UP	DOWN*	DOWN*	en 3 AbA
<i>Efnb1</i>	UP	UP	DOWN	DOWN	-
<i>Nrcam</i>	UP	UP*	DOWN*	DOWN*	en 3 AbA
<i>Gabrg1</i>	UP	UP*	DOWN*	DOWN*	en 3 Aba
<i>Neuropilin 2</i>	UP	UP	UP	UP	-
<i>Arrestin, beta 2</i>	UP	UP	DOWN*	DOWN	-
<i>Scg3</i>	UP	UP*	DOWN*	DOWN*	en 3 AbA
<i>Cnksr3</i>	UP	UP	UP*	UP	-
<i>Olfml1</i>	UP	UP	DOWN	DOWN	en 1 AbA
<i>Klf9</i>	UP	UP	UP	UP	-
<i>Nfyc</i>	UP	DOWN	UP	DOWN	-
<i>Brsm1</i>	UP	DOWN	UP	UP	-
<i>Aprataxin</i>	UP	DOWN	DOWN	DOWN	-
<i>Hspa2</i>	UP	DOWN	DOWN	DOWN	-
<i>Aldh1a2</i>	UP	UP	DOWN	DOWN	-
<i>Slc7a3</i>	UP	DOWN	DOWN*	DOWN*	-
<i>Abhd8</i>	UP	UP	DOWN	DOWN	-
<i>Rad52</i>	UP	UP	DOWN	DOWN	-
<i>Dlg2</i>	DOWN	UP	DOWN*	DOWN	-
<i>Fgf1</i>	DOWN	UP	DOWN	UP	-
<i>Igf1r</i>	DOWN	UP	DOWN	UP	-
<i>Limd1</i>	DOWN	DOWN	UP	UP	-
<i>Rod1</i>	DOWN	DOWN	UP	UP	-
<i>Ddx27</i>	DOWN	DOWN*	UP*	UP	-
<i>Gpx7</i>	DOWN	DOWN	UP*	UP	-
<i>Coq4</i>	DOWN	DOWN	UP	DOWN	-
<i>Tap1</i>	DOWN	DOWN	DOWN	DOWN	-

Tabla 4. Comparación de resultados obtenidos en los microarreglos con los obtenidos en Vargas et al., 2008.

Los genes sobre-regulados se indican como UP y los sub-regulados como DOWN. Las diferencias de expresión pertenecientes a Vargas et al., 2008 tienen un $p < 0.05$. Las diferencias de expresión entre los astrocitos no transgénicos y transgénicos con un $p < 0.05$ luego de realizar el Welch t-test se indican con asterisco (*).

Validación de los datos. Todas las muestras analizadas superaron los controles de calidad (por detalles ver ANEXO II), validando de esta manera el procedimiento del experimento y la plataforma. Los resultados obtenidos a partir de los datos extraídos de estos microarreglos son reproducibles y altamente sensibles. Por lo tanto el estudio de la expresión génica entre las muestras representa precisamente a la biología de las mismas y no a artefactos técnicos.

5.3 Identificación de marcadores moleculares de células AbA.

Con el objetivo de encontrar un marcador genético de las células AbA, los genes estudiados en los microarreglos se filtraron de acuerdo a las siguientes condiciones:

1. Genes cuyo *p-valor* fuese menor a 0.05 luego de realizado un ANOVA comparando los 3 tipos celulares.
2. Genes cuya diferencia en la expresión fuese al menos 2 veces mayor en las células AbA respecto a los astrocitos transgénicos y no transgénicos.

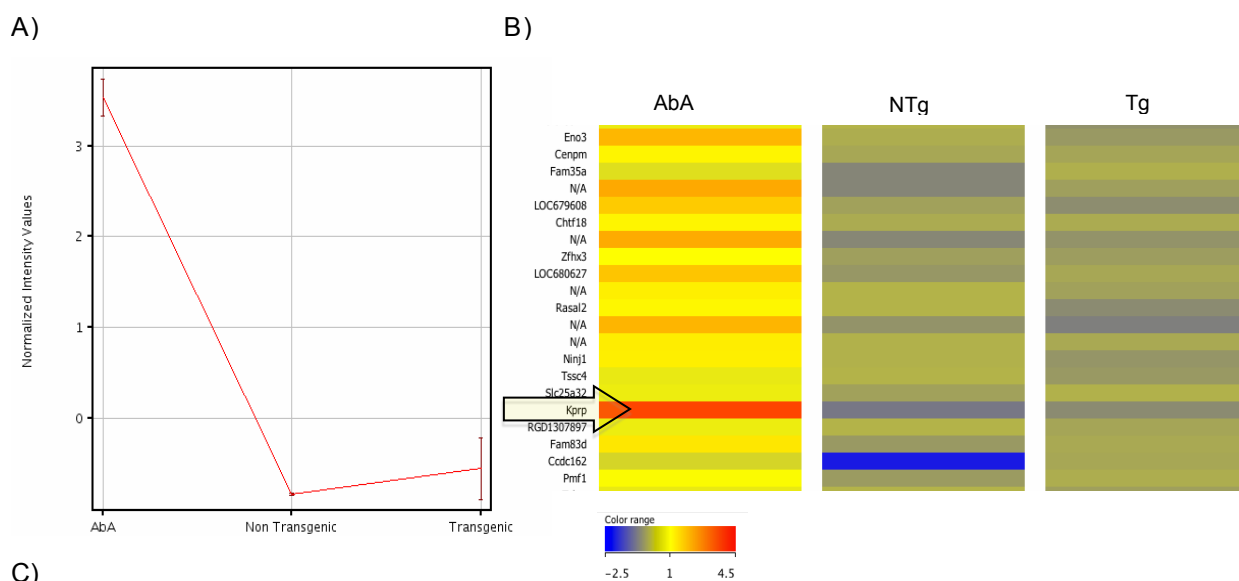
Por lo tanto la lista de genes candidatos como marcadores de las células AbA se redujo a los 308 genes sobre-expresados en las células AbA respecto a ambos genotipos astrocitarios. De estos se buscó un gen cuyo FC en las AbA estuviese dentro del rango mayor y además apareciese categorizado como detectado únicamente en las células AbA. En la tabla 5 se muestran los 19 genes correspondientes a los 308 genes sobre-regulados en las células AbA respecto a ambos tipos astrocitarios que presentaron cambios mayores en la expresión (FC).

FC [AbA] vs [Non Transgenic]	FC [AbA] vs [Transgenic]	GeneSymbol
14.7797575	30.321873	<i>Shroom1</i>
14.679299	18.889193	<i>Tnfrsf26</i>
9.942743	18.596018	<i>Dmrt2</i>
20.646353	16.963926	<i>Kprp</i>
17.413568	16.900274	<i>LOC641520</i>
10.721375	14.092779	<i>Got1l1</i>
5.97501	12.847217	<i>Ydjc</i>
5.6244884	10.393155	<i>Tll1</i>
30.380438	8.358163	<i>Cyss</i>
5.638027	8.3186	<i>Smtn</i>
6.125137	8.010608	<i>Wisp2</i>
5.8614063	8.005721	<i>Nmnat3</i>
10.962497	7.8106413	<i>RGD1565779</i>
8.069507	7.734569	<i>Filip1</i>
4.7222104	7.587235	<i>Tgfb2</i>
9.481434	7.136029	<i>Snai2</i>
10.222152	6.7763195	<i>Rasl11a</i>
12.450424	6.659391	<i>Gzmb13</i>
6.8746476	6.477903	<i>LOC363337</i>

Tabla 5. Genes sobre-expresados en células AbAs y selección del gen *kprp* como posible biomarcador. Listado de selección de genes sobre-expresados en AbA respecto a los astrocitos transgénicos y no transgénicos.

Se seleccionaron los 19 genes con mayor nivel de cambio en la expresión en las células AbA respecto a los otros tipos astrocitarios ($p < 0.05$, $FC > 2$). En la primera columna se muestra el FC de la expresión en las AbA respecto a los astrocitos no transgénicos, en la segunda el FC de la expresión en las AbA respecto a los astrocitos transgénicos y en la tercera el símbolo del gen. En amarillo se resalta el gen seleccionado como marcador de células AbA, *kprp*.

Como marcador de las células AbA se selecciono el cuarto gen de la lista, el gen de la Proteína de Queratinocitos rica en Prolina, KPRP. Si bien *kprp* no es el gen que presenta mayores diferencias de regulación en la expresión entre los fenotipos astrocitarios, sus cambios en la expresión son considerablemente elevados y su expresión se detectó únicamente en las tres réplicas biológicas de las células AbA (fig., 16)



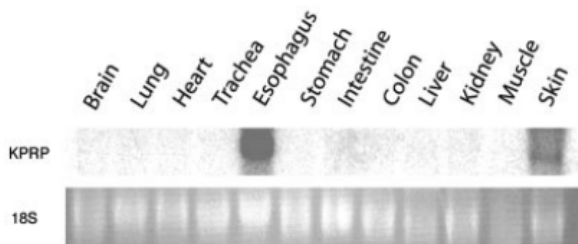
C)

Sample	Normalized(L...	Raw	Flag	Tipo celular
AbA1.txt	3.590716	93.40728	Detected	AbA
AbA2.txt	2.805884	47.487774	Detected	AbA
AbA3.txt	4.214126	215.24864	Detected	AbA
Wt2.txt	-0.8508768	7.270448	Not Detected	Non Transgenic
Wt3.txt	-0.810936	6.1255174	Not Detected	Non Transgenic
Tg1.txt	0.810936	7.9777265	Not Detected	Transgenic
Tg2.txt	-1.2117662	2.8830807	Not Detected	Transgenic
Tg3.txt	-1.2416391	4.4308395	Not Detected	Transgenic

Figura 16. Expresión de *kprp* en los tres tipos astrocitarios Datos extraídos de los microarreglos. A) Profile plot de la expresión de *kprp*, tipos celular vs. valores de intensidad de *kprp* normalizados. Las barras están formadas por los valores de intensidad de cada réplica biológica. B) Amplificación de la región del heatmap de los 308 genes sobre-expresados en AbA respecto a los otros tipos astrocitario donde se muestra la expresión de *kprp* (flecha). C) Tabla de valores de la expresión de *kprp*: logaritmo de la intensidad de fluorescencia normalizada, valores crudos de intensidad de fluorescencia (Raw) y clasificación (Flag) para todas las réplicas de cada tipo celular (Sample).

La proteína KPRP de rata es un marcador de la maduración de la epidermis durante el desarrollo fetal de la piel. Es expresada por los queratinocitos dérmicos fetales durante la gestación tardía y por todas las capas del epitelio escamoso estratificado de la piel, la lengua y esófago a partir del comienzo del desarrollo fetal. Su cDNA de aproximadamente 2.8-Kb

codifica una proteína insoluble de 699 aminoácidos con alto contenido en Prolinas (19%). El análisis de la proteína mediante inmuno-blot muestra dos bandas de aproximadamente 76 y 55 KDa de tamaño. En cultivos de queratinocitos dérmicos la KPRP se distribuye de manera difusa a lo largo de todo el citoplasma acentuándose adyacente a las membranas nuclear y plasmática. Durante el desprendimiento de los queratinocitos del sustrato plástico (indicativo de diferenciación) se observa una inmuno-reactividad intracelular en forma de gránulos. Kong et al. (2003) proponen a KPRP como una proteína asociada a la diferenciación terminal de la epidermis expresada al epitelio escamoso estratificado. Los autores llevaron a cabo el estudio



de la expresión del ARNm de *kprp* en distintos tejidos de ratas en E21 y adultas mediante Northern Blot (fig., 17). Los tejidos estudiados comprendieron el cerebro, pulmón, corazón, tráquea, esófago, estomago, intestino, colon, hígado, riñón, músculo y piel. De todos estos lo

Figura 17. Expresión del ARNm de *kprp* en diferentes tejidos. Figura extraída de Kong et al., 2003. Análisis mediante Northern Blot de cerebro, pulmón, corazón, tráquea, esófago, estomago, intestino, colon, hígado, riñón, músculo y piel de ratas en E21. El mismo resultado se obtuvo para ratas adultas.

únicos que demostraron expresión de *kprp* tanto en el estadio embrionario como en los adultos fueron el esófago y la piel (Kong et al, 2003). Estos resultados fueron replicados para la *kprp*

humana (Lee et al., 2005). Si bien la médula espinal no fue estudiada, los patrones de expresión tisular y las características estructurales y funcionales de KPRP indican que no hay evidencias para suponer que *kprp* se expresa en la médula espinal.

En resumen, los valores elevados de sobre-expresión de *kprp* en las células AbA respecto a los otros tipos astrocitarios, la detección de la expresión de *kprp* únicamente en las 3 réplicas biológicas de las AbAs, y el patrón de expresión tisular exclusivamente epidérmico (Kong et al., 2003) de *kprp* postulan a este gen como un excelente candidato como marcador molecular de las células AbA.

Dado los resultados de los microarreglos indicaron que *kprp* se expresa únicamente en las células AbA, la validación de los resultados obtenidos para *kprp* en los microarreglos se realizó mediante PCR convencional. En la fig., 18 se muestra el resultado obtenido de la PCR de *kprp* para los distintos tipos astrocitarios. Como control negativo de dicha reacción se realizó la PCR en las mismas condiciones que para las muestras pero sin molde de cDNA y como control positivo se amplificó la β -actina. La amplificación de *kprp* para las distintas muestras resultó de acuerdo a lo esperado en un producto de 121pb únicamente en las células AbA. La

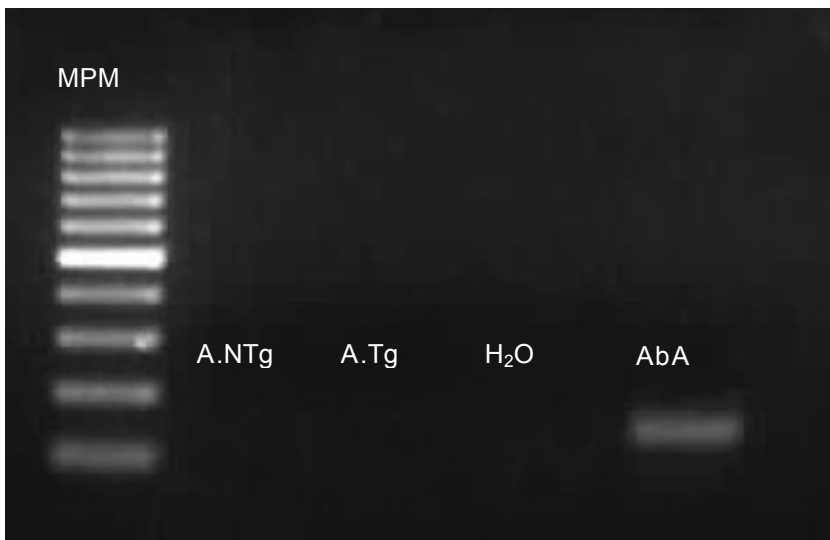


Figura 18. Expresión de *kprp* en los distintos tipos celulares. Fotografía del resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1.8% de los productos de PCR de *kprp* en los distintos tipos astrocitarios. Carril 1: MPM 100pb Ladder (Fermentas), Carril 2: Producto de PCR astrocitos NTg, Carril 3: Producto de PCR astrocitos Tg, Carril 4: Producto de PCR del Agua (control negativo) Carril 5: Producto de PCR AbAs.

amplificación de la β -actina resultó en un producto de 87pb de igual intensidad para todas las muestras, indicando que se utilizó la misma concentración de cDNA molde en todas las muestras. El control negativo no presentó producto de amplificación descartando la posibilidad de contaminación alguna y de amplicones inespecíficos.

Los resultados obtenidos para el control negativo y positivo de la reacción confirman que el producto

de amplificación de la PCR fue específico, *kprp*, y que las diferencias observadas entre las muestras reflejan la biología de las mismas. Por lo tanto, se pudo confirmar que *kprp* se expresa en las células AbA y no en los otros tipos astrocitarios estudiados.

5.4 Diseño y síntesis de herramientas moleculares (anticuerpos y sondas de ARN) que permitan la caracterización específica de células AbA.

La sonda anti-sentido de *kprp* consistió en una mono-hebra de ARN biotinilada de 133nt complementaria a la región comprendida entre los nucleótidos 2676 y 2796 del ARNm de *kprp* de rata. La secuencia correspondiente fue la siguiente:

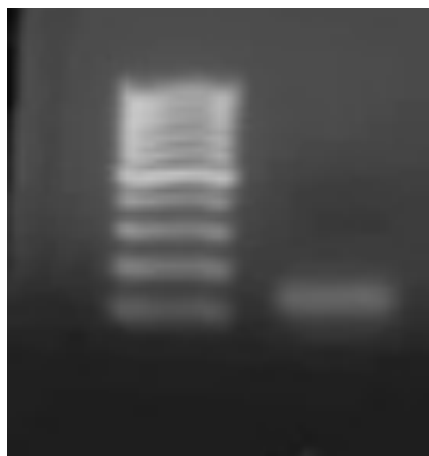
TGATCACATATAGGAACACAGATAGAATCCAGTCCATTATTA ACTTGTTC AATACCAACCGT
CGAACTCTTACGAGACAGGACAACCCTTTCATGTCCTTGACA**CTGTTATCCTTCTATGTATT**
GTGGTACC

La sonda sentido utilizada como control de especificidad consistió en una mono-hebra de ARN biotinilada de 133nt de igual secuencia a la comprendida entre los nucleótidos 2676 y 2796 del ARNm de rata. La secuencia correspondiente fue la siguiente:

ACTAGTGTATATCCTTGTGTCTATCTTAGGTCAGGTAATAATTGAACAAGGTTATGGTTGGCA

GCTTGAGAATGCTCTGTCCTGTTGGGAAAGTACAGGAACTGTGACAATAGGAAGATACATA
ACACCATGG.

En rojo y en azul se indican las secuencia sitio de corte para las enzimas de restricción *SpeI* y *NcoI* respectivamente. En amarillo se resaltan las secuencias de los cebadores para la obtención del amplicon molde *kprp*.



La amplificación por PCR de la secuencia comprendida entre los nucleótidos 2676 y 2796 del ARNm de *kprp* de rata con adaptadores para las enzimas de restricción *SpeI* y *NcoI* en sus extremos 5'y 3' resultó en un único producto de 133pb (amplicon molde *kprp*, fig., 19) El amplicon molde *kprp* se purificó de la matriz de agarosa y se ligó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) con una relación molar inserto:vector 16:1.

Figura 19. Amplicon *SpeI-kprp-NcoI* (amplicon molde *kprp*). Fotografía del resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1.8% del producto de PCR *kprp* con adaptadores. Carril 1: MPM 100pb Ladder (Fermentas), Carril 2: *SpeI-kprp-NcoI*.

Para el sub-clonado del molde para la síntesis de la sonda de *kprp* se seleccionó el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) el cual permite el clonaje TA. La Taq ADN polimerasa utilizada en este trabajo (Taq polimerasa recombinante de Invitrogen) posee actividad terminal transferasa independiente del molde que adiciona una desoxi-adenina (dA) al extremo 3' del producto de PCR. Para clonar directamente este producto en un vector, el mismo debe ser lineal y contener una única desoxi-timidina (dT) en sus extremos 3'. El pCR2.1-TOPO vector (Invitrogen, fig., 20) es un vector lineal con dT en sus extremos 3'. Por lo tanto, el amplicon molde *kprp* se ligó en el vector pCR2.1 utilizando la complementariedad de bases entre las dAs y dTs. Esto resulta el circularización del vector conteniendo el amplicon molde *kprp* en su SMC.

Además, el vector pCR2.1-TOPO contiene la secuencia del gen de la β -lactamasa y en su SMC la secuencia del gen *lacZ*. Estos genes le confieren a las bacterias recombinantes propiedades selectivas. La β -lactamasa es una enzima que hidroliza la ampicilina, inactivándola. Por lo tanto las bacterias recombinantes serán resistentes a dicho antibiótico. El gen *lacZ* codifica para la enzima β -galactosidasa la cual hidroliza el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) en galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol, el cual es oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble. Este gen se interrumpe al clonar en el SMC por lo que las colonias con el inserto serán blancas mientras que las que no posean el inserto serán azules.

Estas propiedades permitieron seleccionar colonias recombinantes de acuerdo a dos parámetros: resistencia a la ampicilina y desarrollo de color azul en la placa.

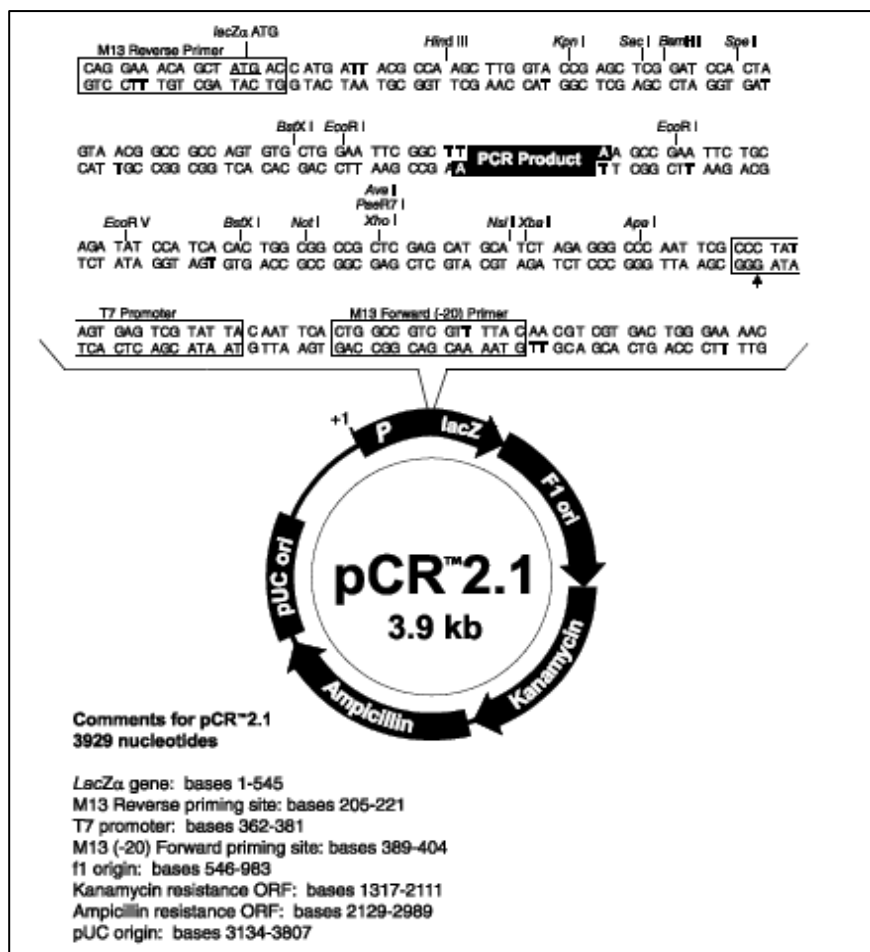


Figura 20. Primer vector de clonaje al azar: Vector pCR2.1. Vector linealizado con desoxi-timidinas en sus extremos 3'en el SMC, resistente a kanamicina y ampicilina con origen de replicación rápida y selección mediante la interrupción del gen *lacZ* en su SMC. Corriente arriba y corriente abajo del SMC contiene secuencias de cebadores M13 que permiten su secuenciación.

Se transformaron bacterias quimio competentes XI-1 Blue con el *pCR2.1-krrp* y se obtuvieron aproximadamente 100 colonias por placa, 20 de las cuales desarrollaron color azul. Por lo tanto la eficiencia de transformación fue de aproximadamente 1×10^8 ufc/ μ g de ADN. Se picaron 14 colonias azules que se expandieron para luego purificar el plásmido mediante minipreparation alcalina y mandarlo a secuenciar. Se seleccionó un clon cuya secuencia contenida en el SMC fuera el amplicon molde *krrp* (fig., 21)

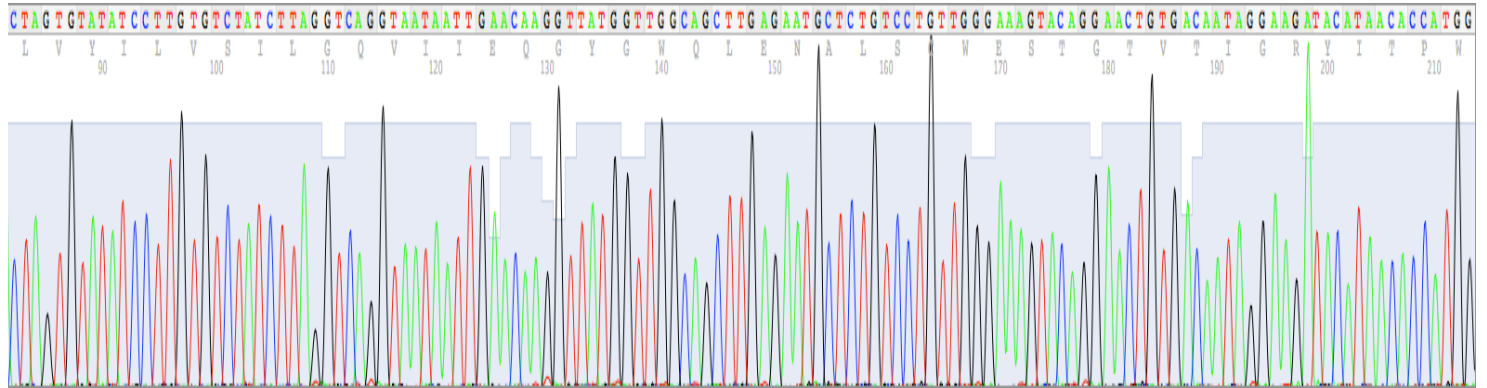


Figura 21. Secuencia SpeI-Krrp-NcoI contenida en el SMC del vector pCR2.1. Resultado de la reacción de secuenciación utilizado el cebador M13.

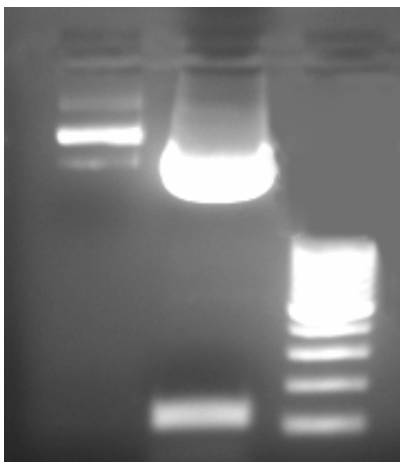


Figura 22. Digestión de pCR2.1-krrp con SpeI y NcoI. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa 1.8% de liberación del amplicon molde krrp. Carril 1: pCR2.1-krrp (1:100 maxiprep) Carril 2: Digestión pCR2.1-krrp con SpeI y NcoI (50µl), Carril 3: MPM 100pb ladder (Fermentas).

La inserción del amplicon molde *krrp* en el vector pCR2.1 se da de manera azarosa (en cualquier sentido) por lo tanto, para la síntesis de las sondas es necesario liberar el inserto y clonarlo en otro vector de manera direccional. Para ello, el amplicon molde *krrp* contenido en el SMC del vector pCR2.1 se liberó utilizando las enzimas de restricción *SpeI* y *NcoI* (el amplicon molde *krrp* contiene en sus extremos 5' y 3' secuencias de corte para dichas enzimas). Los productos de la digestión se separaron electroforéticamente en una matriz de agarosa al 1.8% y se utilizó el agente intercalante BrEt para su posterior visualización en luz UV. El resultado obtenido se muestra en la fig., 22. Como se puede apreciar en la misma, la digestión del pCR2.1-*krrp* con *SpeI* y *NcoI* resultó en la linealización del plásmido y liberación de un fragmento de aproximadamente 133pb. Como el fragmento liberado tiene un tamaño correspondiente al del amplicon molde *krrp* asumimos que se trataba de este y procedimos a clonarlo en el vector pGEMT-Easy previamente linealizado con *SpeI* y *NcoI*.

El vector del segundo clonado y de la transcripción, el pGEMT-Easy (Promega, fig., 23) posee un único sitio de corte para *SpeI* (nt64) y *NcoI* (nt37), contenidos en su SMC. Esto permite el clonaje direccional del amplicon molde *krrp*. La digestión del vector con dichas enzimas resulta en un vector lineal con un extremo cohesivo para *SpeI* y otro para *NcoI* al igual que el amplicon molde *krrp* liberado con dichas enzimas del vector pCR2.1-*krrp*. Por lo tanto la ligación de ambos fragmentos de ADN se dará, únicamente en una dirección, utilizando la complementariedad de bases de sus extremos cohesivos *SpeI* y *NcoI*. Al igual que el vector

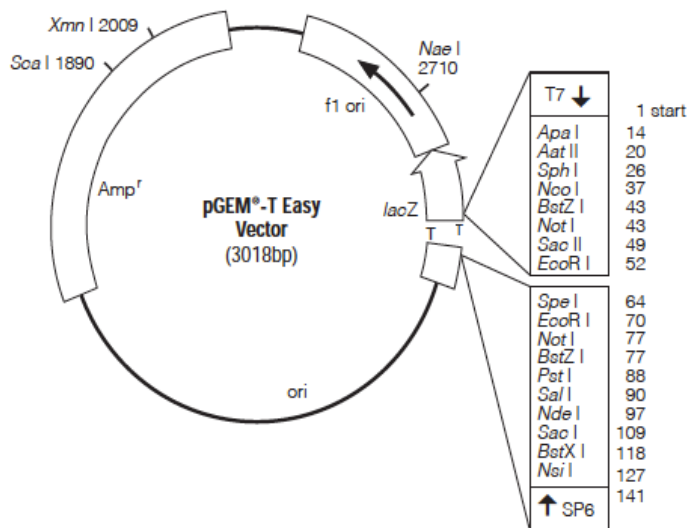


Figura 23. Vector utilizado para el clonado direccional de kprp molde: Vector pGEM-T Easy. Vector linealizado con desoxi-timidinas en sus extremos 3' en el SMC, resistente a ampicilina con origen de replicación rápida y selección mediante la interrupción del gen lacZ en su SMC. Corriente arriba y corriente abajo del SMC contiene los promotores para las ARN polimerasa T7 y SP6 respectivamente.

pCR2.1-TOPO, el vector pGEMT-Easy contiene el gen e la β-lactamasa y en su SMC el gen lacZ. Por lo tanto la selección de clones recombinantes se realizó por ampicilina y desarrollo de color azul. Además, el vector pGEMT-Easy posee corriente arriba del SMC un promotor para la ARN polimerasa T7 y corriente abajo del SMC un promotor para la ARN polimerasa SP6. Esto permite la síntesis de ARN utilizando como molde ambas hebras del ADNp.

Para realizar el clonaje direccional de *SpeI-kprp-NcoI* en el vector pGEMT-Easy fue necesario un paso previo de circularización del plásmido, debido a que el mismo se provee por el fabricante de forma lineal lo cual dificulta su digestión con las enzimas de restricción seleccionadas. Para ello, se ligó el inserto control provisto en el kit y se seleccionó un clon recombinante para ser digerido con las enzimas de restricción *SpeI* y *NcoI* y obtener así el vector pGEMT lineal con extremos cohesivos (*SpeI*-pGEM-*NcoI* - por detalles ver ANEXO III-)

La transformación de bacterias XI-1 Blue con el producto de ligación de *SpeI-kprp-NcoI* con *SpeI*-pGEM-*NcoI* tuvo una eficiencia de transformación de 1×10^8 ufc/μg de ADN obteniéndose aproximadamente un 15% de colonias azules por placa. Se picaron 10 colonias azules que se expandieron para luego purificar el plásmido mediante minipreparation alcalina y mandarlo a secuenciar. Se realizó la secuenciación de ambas hebras de ADN con los cebadores T7 y SP6 del vector para verificar la presencia de la secuencia amplicon molde *kprp* en ambos sentidos y se seleccionó un clon con estas características para la síntesis de las sondas (por detalles ver ANEXO IV)

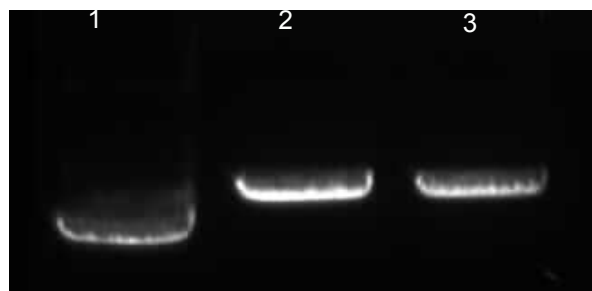
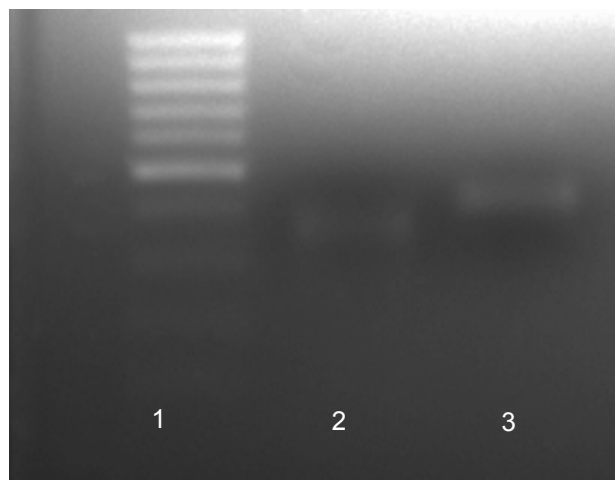


Figura 24. Moldes para la síntesis de las sondas anti-sentido y sentido de kprp. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Carril 1: maxiprep pGEM-kprp (1:10) Carril 2: digestión maxiprep pGEM-kprp con *SpeI* (1:10) Carril 3: digestión maxipresp pGEM-kprp con *NcoI*.

Las digestiones de pGEM-*kprp* con *SpeI* y *NcoI* resultaron en dos fragmentos únicos de ADN lineal de aproximadamente 3Kb (fig., 24). Los mismos se trataron con proteinasa K para eliminar la posible contaminación con nucleasas y se purificaron mediante extracción con fenol:cloroformo seguido de una precipitación de etanol del ADN. Se obtuvieron 5µg de pGEM-*kprp-SpeI* y 3µg de pGEM-*kprp-NcoI*.

La síntesis de las sondas anti-sentido y sentido se realizó a partir de pGEM-*kprp-SpeI* y pGEM-*kprp-NcoI* utilizando las ARN polimerasas T7 y SP6 respectivamente. Las reacciones de transcripción resultaron en 74µg de *as-kprp^{biot}* y 31µg de *s-kprp^{biot}*.

La especificidad de las reacciones de transcripción electroforesis desnaturizante en gel de agarosa al 1.8% conteniendo formaldehído (fig., 25). Dado que no contábamos con un marcador de peso molecular de ARN se utilizó como referencia un marcador de peso molecular de ADN. Si bien este no puede ser utilizado para evaluar el tamaño de los productos de



transcripción, dado el ARN y el ADN tienen patrones de migración distintos en las matrices de agarosa, el mismo se utilizó como referencia del rango de tamaño. La presencia de una única banda en el gel indicó que las reacciones de transcripción fueron

Figura 25. *as-kprp^{biot}* y *s-kprp^{biot}*. Fotografía de electroforesis desnaturizante en gel de agarosa al 1.8%. Carril 1: MPM 100pb Ladder (Fermentas), Carril 2: Producto de transcripción con T7 (*as-kprp^{biot}*) Carril 3: Producto de transcripción SP6 (*s-kprp^{bio}*).

específicas. La reacción de transcripción con T7 tuvo como único producto el ARN *as-kprp^{biot}* y la reacción de transcripción con SP6 tuvo como único producto el ARN *s-kprp^{biot}*.

Las sondas se purificaron obteniéndose 16.44 µg de sonda anti-sentido a una concentración de 82.23 ng/µl y 11µg de sonda sentido a una concentración de 54.82ng/µl.

5.5 Validación de los marcadores de células AbA mediante Western blot, inmunocitoquímica e hibridación *in situ*.

5.5.a Análisis de la expresión de KPRP en las células AbA mediante Western blot.

La concentración de proteína en las muestras se realizó por el método de BCA, luego de realizar una curva estándar con BSA. La concentración de proteínas en una muestra dada se determinó en base a la fórmula:

$$[\text{concentración de proteínas } \mu\text{g/ml}] = (A_{570} - 7.59\text{E-}02) / 1.83\text{E-}04$$

A partir de dicha ecuación se calculó la concentración de proteínas obtenida para las células AbA los astrocitos no transgénicos y transgénicos. La concentración de las muestras fue la siguiente: Astrocitos NTg: 1mg/ml, Astrocitos Tg: 1.1mg/ml, AbAs: 2 mg/ml. Se separaron mediante electroforesis en gel 10% de poliacrilamida 40 μ g de proteínas totales de cada tipo celular y se transfirieron a una membrana PDVF. Se realizó la inmunodetección de KPRP en la membrana utilizando el anticuerpo anti-KPRP de rata. Los resultados obtenidos se muestran en la fig., 26A. En las células AbA se observaron 3 grandes bandas de aproximadamente 76, 55 y 45KDa. En los astrocitos transgénicos y no transgénicos se observó una única banda de aproximadamente 45KDa.

Como se mencionó anteriormente Kong et al., (2003) reportaron que la detección mediante inmuno blot de KPRP resulta en dos bandas de aproximadamente 76 y 55KDa (fig., 26B). El único fenotipo astrocitario estudiado que presento bandas correspondientes a 76 y 55KDa fueron las AbAs. Consideramos entonces, que las bandas presentes únicamente en las células AbA cuyos pesos moleculares corresponden a los reportados para KPRP representan la reactividad específica del anticuerpo con KPRP. Contrariamente, y basándonos en la evidencia de la literatura, consideramos que la banda observada para los tres tipos astrocitarios a la altura de 45KDa corresponde a la detección del anticuerpo de una proteína inespecífica distinta a KPRP.

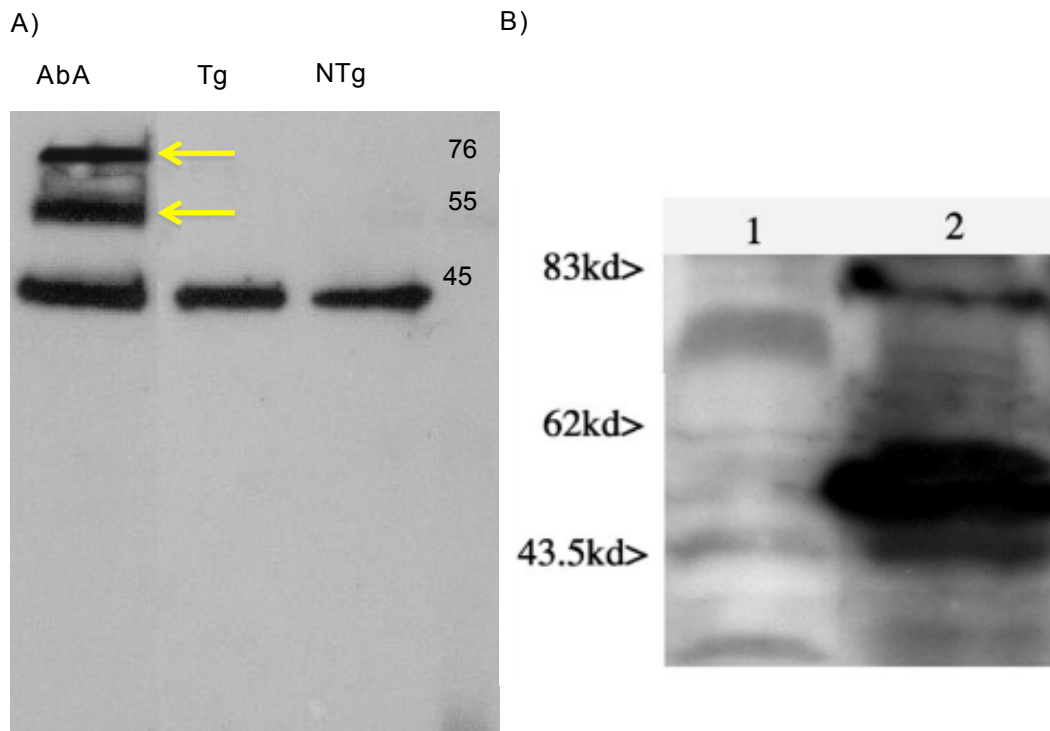


Figura 26. La proteína KPRP se expresa en las células AbA. Inmunodetección de KPRP mediante western blot. A) Imagen de la placa fotográfica obtenida luego de revelado el western blot anti-KPRP por bioluminiscencia. Carril 1: proteínas AbAs, las flechas amarillas indican las bandas correspondientes a KPRP Carril 2: proteínas astrocitos Tg , Carril 3: proteínas astrocitos NTg.Carril 4: MPM SM0441 (Fermentas). B) Extraído de Kong et al., (2003). Inmunodetección de KPRP en proteínas provenientes de fibroblastos de piel de rata (carril 1) y queratinocitos de rata (Carril 2).

Teniendo en cuenta las suposiciones anteriormente mencionadas, se podría decir, que los resultados obtenidos indican que *kprp* se expresa únicamente en las células AbA tanto a nivel transcripcional como traduccional. Esto llevaría a considerar a la proteína KPRP como un nuevo marcador molecular putativo de las células AbA.

Debido a que este anticuerpo ha sido diseñado por nosotros, siendo esta su primera utilización, no existe bibliografía disponible que avale su especificidad para KPRP. Por lo tanto no podemos afirmar que las bandas a las alturas de 76 y 55 KDa correspondan al reconocimiento de KPRP. Previamente, es necesario caracterizar la identidad de las bandas observadas mediante espectrometría de masas. Para ello, se realizará en un mismo gel de poliacrilamida la separación por SDS-PAGE de las proteínas provenientes de los tres tipos celulares por duplicado y en espejo. Una vez finalizada la corrida, el gel se cortará a modo de obtener dos geles idénticos. Uno de ellos será transferido a la membrana de PDVF para el reconocimiento posterior de las proteínas con el anticuerpo anti-KPRP mediante western blot, y el otro será

teñido con azul de Coomasie. Utilizando como referencia el resultado del western blot se recortarán las bandas correspondientes en el gel teñido con Coomasie. Las proteínas contenidas en dichas bandas de poliacrilamida serán identificadas mediante espectrometría de masas. Todo esto será realizado en condiciones libres de queratina dado la abundancia de esta proteína puede enmascarar los resultados esperados.

La banda observada para los tres tipos astrocitarios de un peso molecular distinto al de KPRP, indica que el anticuerpo diseñado no sería 100% específico para KPRP. En caso de confirmar la inespecificidad de dicha banda mediante espectrometría de masas, la utilización del anticuerpo diseñado en este trabajo como marcador específico de células AbA quedaría invalidada. De ser así se procederá a la búsqueda de epítopes más específicos de KPRP para diseñar anticuerpos nuevos cuyo rango de especificidad para KPRP permita la utilización de los mismos como marcador molecular específico de células AbA. Los epítopes específicos podrán ser identificados utilizando el Thermo Scientific Antigen Profiler. El Thermo Scientific Antigen Profiler es una herramienta bioinformática que permite diseñar y crear péptidos antigénicos de alta especificidad.

5.5.b Expresión de *kprp* en cultivo de células AbA y glías espinales SOD1^{G93A} -/-.

La herramienta molecular para la identificación específica de células AbA, la sonda anti-sentido de *kprp* generada en este trabajo se evaluó mediante FISH de AbAs y astrocitos no transgénicos.

Dado no se pudo detectar expresión de *kprp* en ninguno de los dos genotipos astrocitarios ni por microarreglos ni por PCR, como tampoco se detectó expresión de KPRP mediante Western Blot consideramos ambos genotipos equivalentes como controles de la validación de la sonda *kprp*. Debido a que los astrocitos transgénicos se obtienen a partir de neonatos SOD1^{G93A}+/- y que hemos tenido problemas en el mantenimiento y expansión de la colonia de ratas SOD1^{G93A} decidimos realizar los controles únicamente con los astrocitos no transgénicos que son más fáciles de obtener.

Además, si bien los microarreglos se realizaron comparando a las AbAs únicamente con los astrocitos, por considerarse una población astrocitaria aberrante que surge en la patología, el estudio in vitro de la expresión de *kprp* se extendió a las demás poblaciones gliales provenientes de la médula espinal de neonatos SOD1^{G93A} -/- con el objetivo de validar la

utilización de la sonda *kprp* como herramienta de caracterización de las células AbA ante otros tipos gliales. Los resultados obtenidos se muestran en la fig., 27.

Como se puede apreciar en la fig., 26 el estudio de la expresión de *kprp* en cultivo de células AbAs y glías provenientes de neonatos no transgénicos mediante FICH resultó en señal positiva (verde) únicamente en las células AbA (fig., 27A y B). La especificidad de la sonda fue confirmada a través de la ausencia de señal en las células AbA y en las glías SOD1^{G93A} -/- luego de realizada en paralelo y en las mismas condiciones que la FICH con la sonda anti-sentido, la FICH con la sonda sentido (fig., 27C, F). La presencia de astrocitos en el cultivo de células gliales se confirmó mediante la señal positiva para GFAP de la inmunohistoquímica (fig., 27 D, E).

La presencia de señal para la sonda anti-sentido de *kprp* exclusivamente en las células AbA indica que dentro de la población glial estudiada, *kprp* se expresa únicamente en las células AbA. Por lo tanto, consideramos validada la herramienta generada para identificar a las células AbA, la sonda anti-sentido para *kprp*, al menos dentro de las poblaciones gliales estudiadas.

Si bien basándonos en los resultados obtenidos, no se esperan cambios, es necesario realizar el control con las glías espinales provenientes de neonatos SOD1^{G93A} +/- para descartar la expresión de *kprp* en otros tipos gliales como producto de la expresión de la SOD1 mutada y validar de esta manera la utilización de la sonda como marcador de células AbA respecto a otros tipos gliales transgénicos.

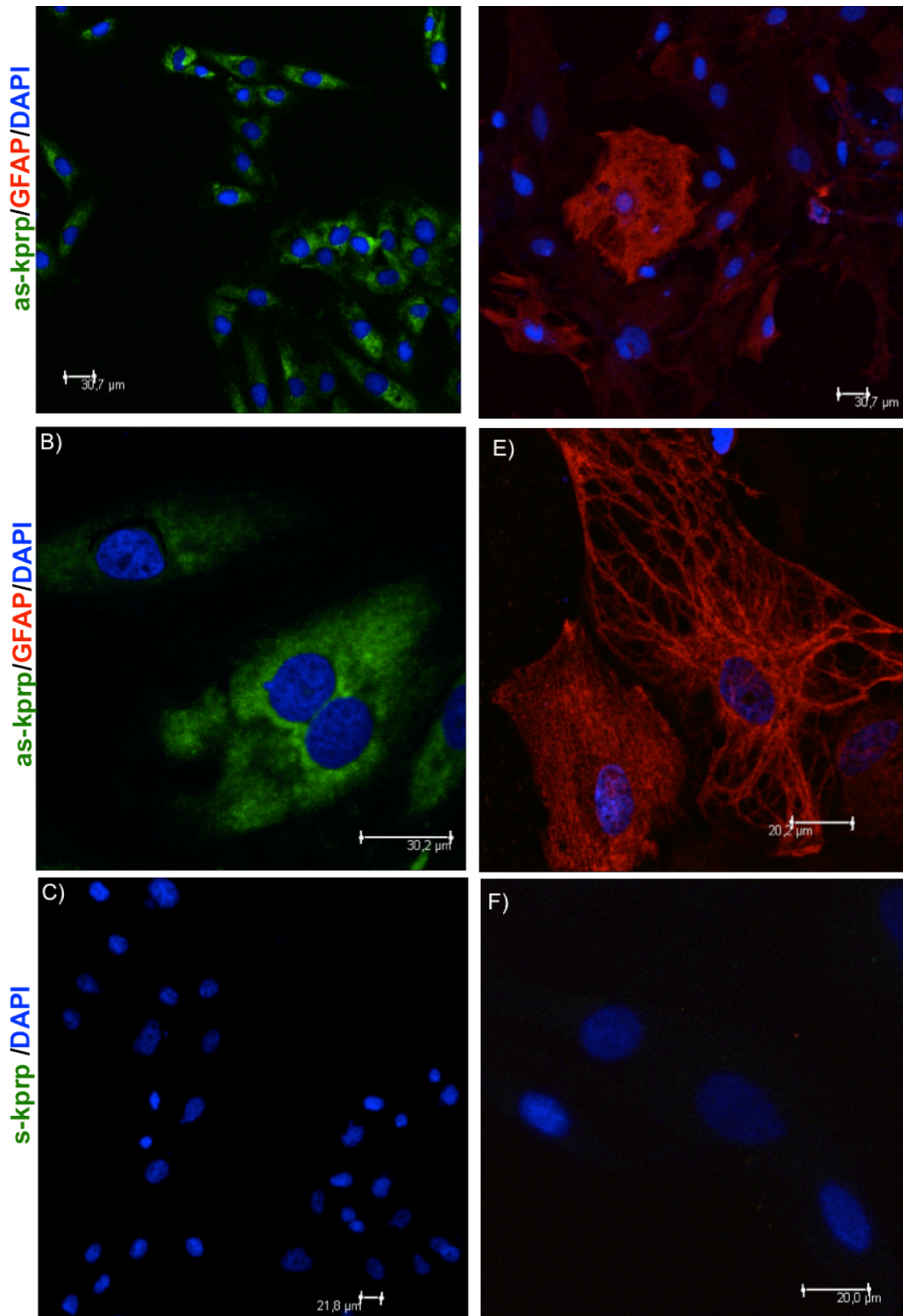


Figura 27. *Kprp* se expresa en células AbA en cultivo. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de FICH (*kprp*) e inmunohistoquímica (GFAP) en AbAs y células gliales provenientes de la médula espinal de neonatos $SOD1^{G93A}^{-/-}$. En verde se muestran las sonda de *kprp* y en rojo GFAP. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). A,B) FICH e IHQ sonda anti-sentido *kprp* en células AbA pasaje 3. D,E) FICH e IHQ con sonda anti-sentido de *kprp* en células gliales. C,F) FICH e IHQ con sonda sentido *kprp* en células AbA y glias no transgénicas respectivamente .

5.5.c Expresión de KPRP en cultivo de células AbA y glias espinales $SOD1^{G93A} -/-$.

Si bien el anticuerpo anti-KPRP resultó no ser 100% específico, basándonos en las diferencias de reconocimiento observadas para los distintos tipos celulares decidimos evaluarlo de todas maneras, como posible marcador específico de células AbA, mediante ICQ.

Debido a que los diferentes genotipos astrocitarios neonatales exhibieron el mismo patrón de señal inespecífico en el western blot para KPRP, asumimos que el estudio de la expresión de KPRP mediante ICQ revelaría el mismo patrón de señal para ambos genotipos. Por lo tanto y debido a las adversidades afrontadas en la expansión y mantenimiento de la colonia de ratas $SOD1^{G93A}$ decidimos utilizar únicamente astrocitos no transgénicos en vez de ambos genotipos para los estudios comparativos de ICQ de KPRP utilizando el anticuerpo anti-KPRP.

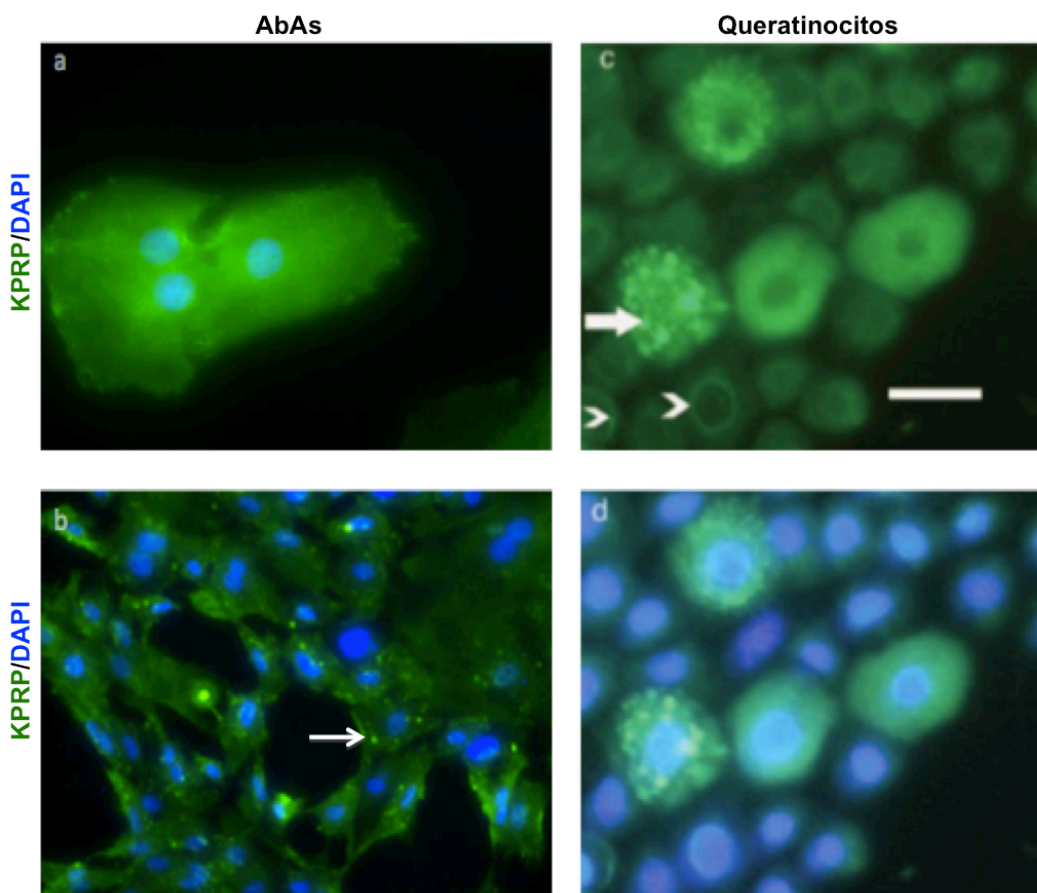


Figura 28. Localización intracelular de KPRP. a,b) ICQ de células AbA en cultivo, en verde se muestra KPRP y en azul el núcleo. La flecha indica los gránulos de KPRP en el citoplasma de las células AbA c,d) Extraído de Kong et al., (2003). Cultivo primario de queratinocitos, en verde KPRP y en azul núcleos.

En la fig., 28a,b se muestran las imágenes obtenidas para la ICQ de KPRP en las células AbA. Como se puede apreciar en las imágenes, al igual que en los queratinocitos en diferenciación (fig., 28c,d), la KPRP en las células AbA presenta una distribución citoplasmática con un leve patrón granular.

En la fig., 29 se muestran las imágenes obtenidas para la ICQ de las células gliales provenientes de la médula espinal de ratas $SOD1^{G93A} -/-$. Como marcador astrocitario se utilizó la proteína GFAP. Como se puede apreciar en la figura la ICQ para KPRP resultó en ausencia de señal en todas las células gliales presentes en el cultivo primario proveniente de la médula espinal de neonatos no transgénicos.

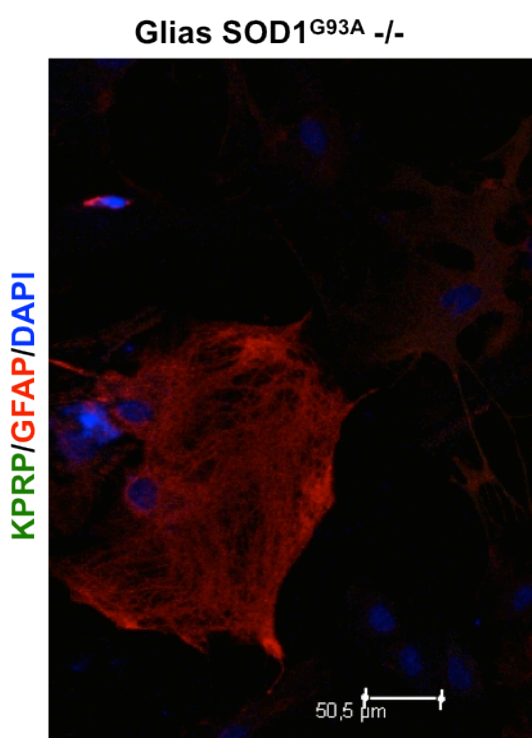


Figura 29. KPRP no se expresa en glias neonatales $SOD1^{G93A} -/-$. Imagen obtenida mediante microscopía confocal de ICQ de KPRP (verde) y GFAP (rojo) en cultivo primario de células gliales provenientes de la médula espinal de ratas neonatas $SOD1^{G93A} -/-$. En azul se indican los núcleos teñidos con DAPI.

Debido a la diferencia de señal observada para KPRP entre las células gliales y las células AbA (ausencia vs. presencia de señal respectivamente) se podría deducir que la concentración del anticuerpo anti KPRP utilizada para los mencionados estudios de ICQ fue sub-umbral al límite de detección del método de estudio para la señal inespecífica observada mediante western blot en los astrocitos neonatales. Por lo tanto, consideramos que a dicha concentración el anticuerpo anti-KPRP podría ser utilizado como herramienta molecular para la discriminación de células AbA de otros tipos gliales mediante ICQ.

5.6. Caracterización *in situ* de células AbA mediante inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en cortes de médula espinal de ratas SOD1^{G93A} +/- y SOD1^{G93A} +/-.

5.6.a Expresión de KPRP en la médula espinal de ratas SOD1^{G93A} +/- y -/-.

Si bien en el western blot utilizando el anticuerpo anti-KPRP diseñado para rata, se detectó señal inespecífica en los astrocitos no transgénicos y transgénicos (fig., 26A, banda de aproximadamente 45KDa), la ausencia de señal para KPRP en el cultivo de células gliales provenientes de la médula espinal de neonatos SOD1^{G93A} -/- utilizando el mismo anticuerpo (fig., 29), condujo a evaluar a dicho anticuerpo como una posible herramienta molecular para la caracterización de células AbA *in situ*.

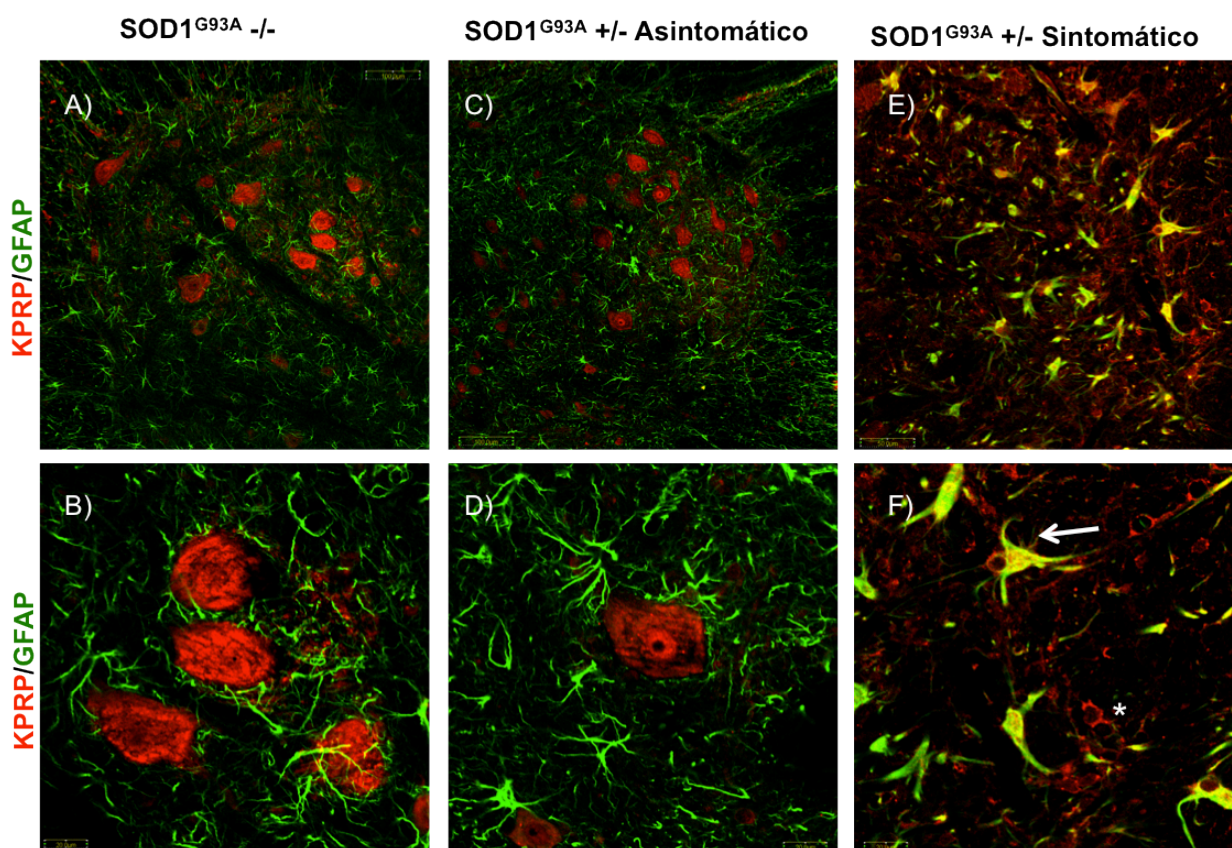


Figura 30. KPRP se expresa en la médula espinal de ratas transgénicas sintomáticas. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de IHQ en cortes de médula espinal provenientes de ratas SOD1^{G93A} -/- (A y B), SOD1^{G93A} +/- asintomáticas (C,D), y SOD1^{G93A} +/- sintomáticas (E,F). En rojo se muestra KPRP y en verde GFAP. Nótese que en animales no-transgénicos o en animales transgénicos asintomáticos la inmunotinción solo se observa en los cuerpos celulares de neuronas y motoneuronas. En comparación, el anticuerpo marca células gliales exclusivamente en animales transgénicos sintomáticos. En amarillo se observa la co-localización de GFAP con KPRP (flecha) en células que tienen la localización y morfología de células AbAs. Con asterisco se indica una sub-población de células gliales más pequeñas que son KPRP positivas y GFAP negativas.

La evaluación del anticuerpo como herramienta de caracterización de células AbA *in situ* se llevó a cabo mediante IHQ en cortes de la médula espinal de ratas transgénicas sintomáticas tardías, asintomáticas y sus pares no transgénicos. Los resultados obtenidos se muestran en la fig., 30. En esta figura se aprecia la IHQ para KPRP en los cortes de médula espinal resultó en una señal en el soma de las motoneuronas tanto en los animales transgénicos como en los no transgénicos asintomáticos y sintomáticos tardíos. Además, se pudo apreciar señal en células aparentemente no neuronales únicamente en los animales transgénicos sintomáticos. Debido a que la señal neuronal para KPRP se observa tanto en los animales transgénicos como en los no transgénicos, se podría considerar a la señal observada independiente de la expresión de la SOD1 mutada. Basándonos en la evidencia existente que *kprp* no se expresa en motoneuronas (Lobsiger et al., 2007), consideramos a esta señal como inespecífica. De las células no neuronales que muestran señal para KPRP se pueden distinguir al menos dos poblaciones distintas, una GFAP positiva y otra GFAP negativa. Es importante señalar que las células *Kprp+/GFAP+* presentan una localización en el asta ventral y un tamaño (>40um) idénticos a las células AbAs descritas previamente (Díaz-Amarilla et al, 2011).

Finalmente, debido a la inespecificidad exhibida para motoneuronas, los resultados obtenidos no fueron suficientemente contundentes como para validar la utilización del anticuerpo anti-KPRP como herramienta molecular de caracterización de células AbA *in situ*. Pero las diferencias observadas en los animales en estado terminal de la patología indican que el reconocimiento de células no neuronales es dependiente de la expresión de la SOD1 mutante. Por lo tanto, podría considerarse a la señal no neuronal del anticuerpo anti-KPRP como una herramienta molecular de caracterización de células presentes únicamente en la patología.

Es posible que concentraciones menores del anticuerpo anti-KPRP resulten en la pérdida de la señal inespecífica de las motoneuronas, por lo tanto es necesario optimizar las condiciones de la IHQ para poder validar o descartar de manera más asertiva la utilización de dicho anticuerpo como marcador molecular de células AbA *in situ*.

5.6.b Expresión de *kprp* en la médula espinal de ratas SOD1^{G93A} +/- y -/-.

Una vez validada, en cultivo celular, la sonda anti-sentido de *kprp* como marcador molecular de células AbA se procedió a la caracterización *in situ* de las células AbA utilizando dicha herramienta.

Debido a que las células AbA provienen de la médula espinal de ratas SOD1^{G93A} +/- en el estado terminal de la patología, la caracterización *in situ* de las células AbA se llevó a cabo mediante FISH utilizando la sonda anti-sentido para *kprp* en cortes de médula espinal provenientes de ratas SOD1^{G93A} +/- cursando la etapa final de la enfermedad. Como control se utilizaron cortes de médula espinal de ratas SOD1^{G93A} -/- de la misma camada a igual edad post-gestacional. Los animales transgénicos se encontraban en el estado terminal de la patología, presentando síntomas delanteros severos mientras que sus pares no transgénicos gozaban de buena salud.

La caracterización *in situ* de las células AbA mediante FISH utilizando la sonda anti-sentido de *kprp* en cortes de médula espinal provenientes de ratas SOD1^{G93A} +/- cursando el estadio terminal de la patología resultó en señal positiva para la sonda anti-sentido de *kprp* en las dos ratas estudiadas (fig., 31). La distribución y el patrón de la señal se corresponden para ambos animales. Esta señal pudo apreciarse en un elevado número de células presentes en el asta ventral de las regiones cervical torácica y lumbar de la médula espinal. Se observó un aumento en el número de células positivas en los cortes provenientes de la región cervical. Asimismo, también se observó señal en algunas células del hasta dorsal y en algunas células de la sustancia blanca (fig., 32).

Contrariamente a lo observado para la FISH en los cortes de médula espinal de las ratas transgénicas cursando la última etapa de la patología, en los cortes provenientes de sus pares no transgénicos no se apreció señal positiva para la sonda anti-sentido de *kprp* (fig., 33B) en ninguna de las regiones de la médula espinal estudiadas (cervical, torácica y lumbar).

SOD1^{G93A} +/- Sintomáticos

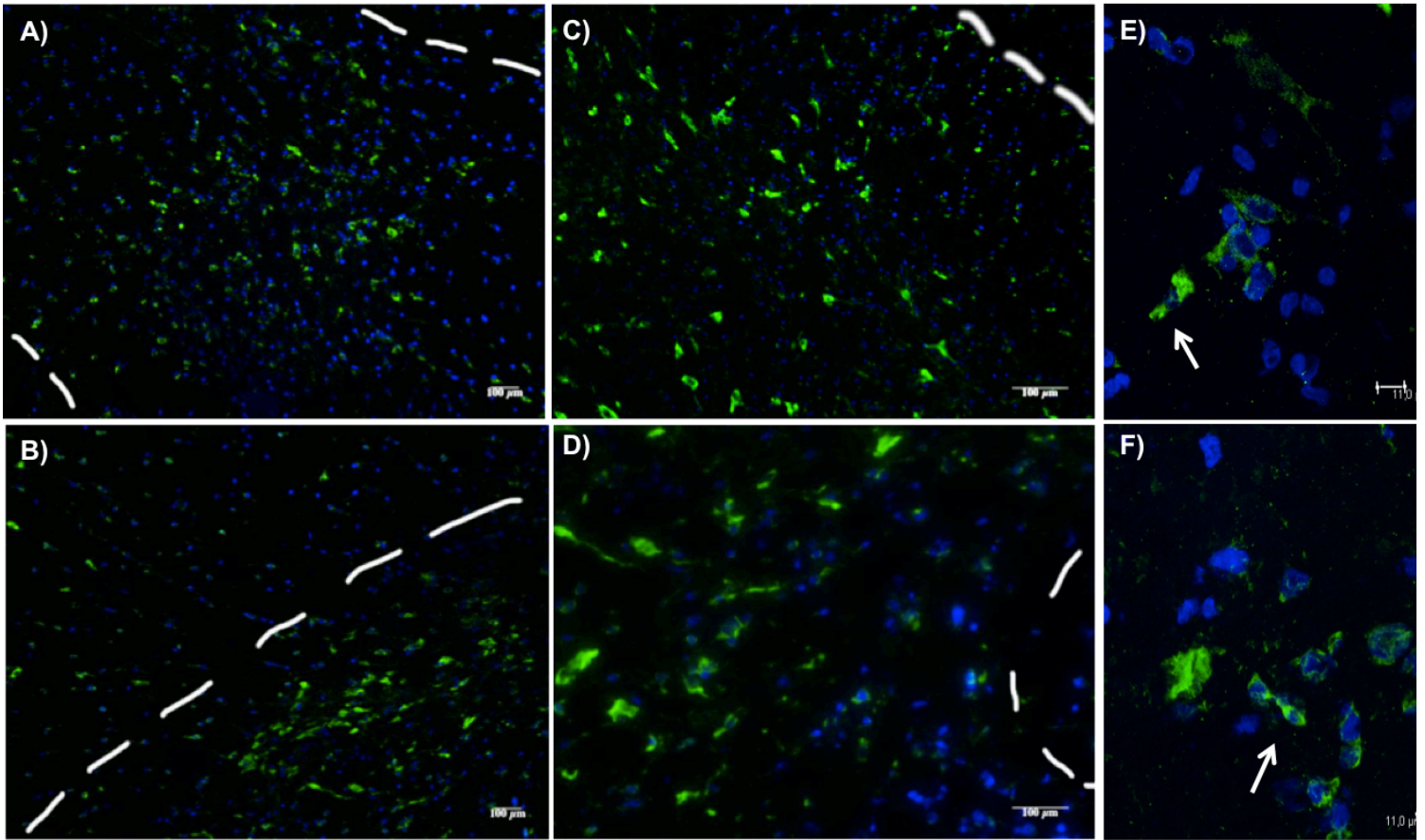


Figura 31. *kprp* se expresa en la médula espinal de ratas SOD1^{G93A} +/- sintomáticas. Imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia de la FISH para *kprp* en el asta ventral de cortes de médula espinal cervical de ratas transgénicas con tomas tardías. En azul se indican los núcleos celulares teñidos con DAPI y en verde la señal correspondiente a la sonda anti-sentido de *kprp*. A,B,C,D) Imágenes obtenidas a una magnificación de 10X en el microscopio de epifluorescencia. Las líneas blancas delimitan la sustancia gris. E,F) Imágenes obtenidas a una magnificación de 20X en el microscopio de epifluorescencia. Las flechas indican las células que podrían ser AbA.

Para confirmar la especificidad de la señal observada se realizó, al igual que para los cultivos celulares, la FISH con la sonda sentido de *kprp*. Como se puede apreciar en la fig., 34A no se detectó señal por lo tanto confirmamos nuevamente que la secuencia de la sonda anti-sentido es específica para *kprp* también en el tejido. Como control de la reacción de revelado de la sonda, se realizó la FISH sin sonda. En la fig., 33B se aprecia la ausencia de señal, indicando que la señal observada para la sonda anti-sentido se debe exclusivamente a la hibridación de la misma con su blanco en el tejido y no a una actividad inespecífica de la peroxidasa endógena o a la biotina presente en el tejido.

Los resultados negativos obtenidos para la sonda sentido para *kprp* tanto a nivel celular (FISH) como a nivel tisular (FISH) validan los resultados de señal positiva obtenidos con la sonda anti-sentido de *kprp*, indicando una alta especificidad de la secuencia de dicha sonda con su gen blanco (*kprp*) tanto en las células como en el tejido. Sumado a los resultados obtenidos para la

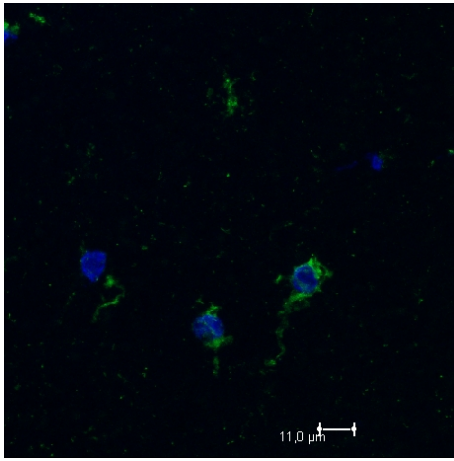


Figura 32. Expresión de *kprp* en la sustancia blanca de la médula espinal de ratas $SOD1^{G93A}$ +/- sintomáticas tardías. Imagen obtenida por microscopía confocal de FISH (*kprp*) en la sustancia blanca de la médula espinal transgénica. En azul se indican los núcleos teñidos con DAPI.

hibridación sin sonda, podría considerarse entonces, que la señal observada con la sonda anti-sentido corresponde pura y exclusivamente a la expresión de *kprp*. Por lo visto y considerando la inespecificidad exhibida por el anticuerpo anti-KPRP tanto mediante western blot como mediante IHQ, consideramos a la sonda anti-sentido para *kprp* un indicador más asertivo de la expresión de *kprp*.

Basándonos en la especificidad observada para la sonda anti-sentido para *kprp* decidimos realizar el estudio de la expresión de GFAP en las células AbA tisulares utilizando como marcador de las mismas la sonda anti-sentido de *kprp*. Debido a que la sonda es específica para *kprp* mientras que el anticuerpo anti-KPRP demostró no serlo consideramos que los resultados obtenidos mediante la FISH utilizando la sonda anti-

sentido para *kprp* reflejan de manera más apropiada la realidad biológica que los obtenidos mediante IHQ utilizando el anticuerpo anti-KPRP.

De acuerdo a lo esperado, la expresión de *kprp* pudo apreciarse únicamente en la médula espinal proveniente de animales transgénicos con síntomas tardíos. Basándonos en los resultados obtenidos para la expresión de *kprp* en el estudio por microarreglos, confirmada por PCR y demostrada por FISH, a partir de estos resultados podríamos decir que pudimos evidenciar por primera vez *in situ* a las células AbA mediante un marcador específico. Sin embargo, los resultados obtenidos no son suficientes para afirmar que la expresión de *kprp* observada en el tejido enfermo sea producto únicamente de las células AbA. Podrían haber otras células que en condiciones patológicas expresen *kprp* y formen parte de la población *kprp* positiva observada en la médula. Habría que hacer estudios de co-localización con anticuerpos específicos para las diferentes poblaciones celulares de la médula espinal para conocer exactamente las células que conforman a esta población.

SOD1^{G93A} ^{-/-} adultos.

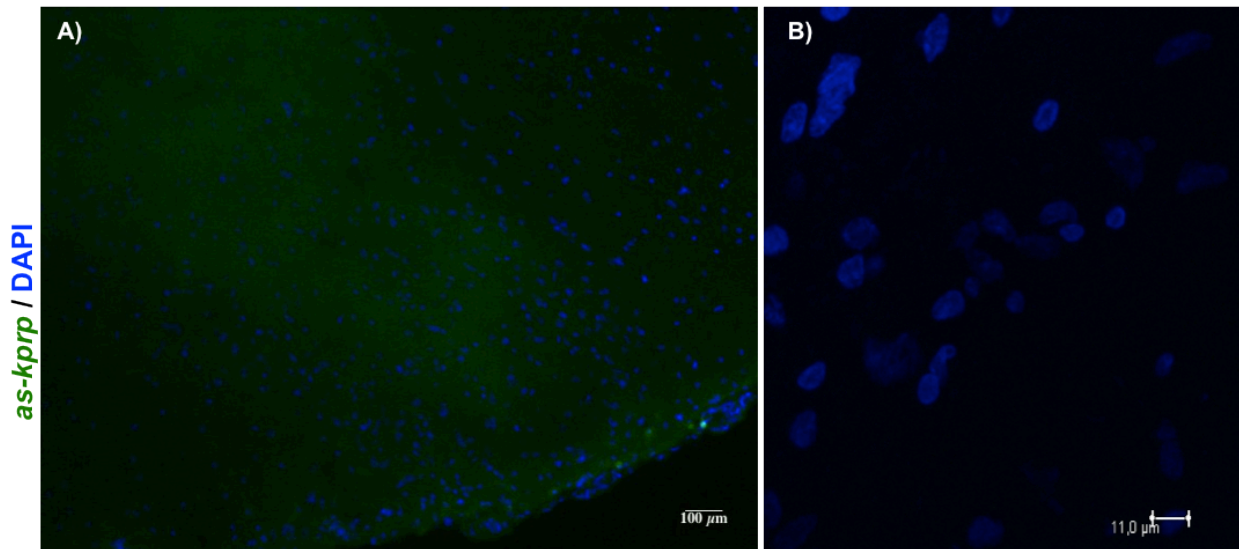


Figura 33. *kprp* no se expresa en la médula espinal de ratas SOD1^{G93A} ^{-/-} adultas. Imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia (izquierda magnificación 10X) y confocal (derecha magnificación 20X) de la FISH para *kprp* en cortes de médula espinal de ratas adultas no transgénicas. A) asta ventral y sustancia blanca de la región lumbar de la médula espinal, B) asta ventral región cervical de la médula espinal.

SOD1^{G93A} +/- sintomáticos

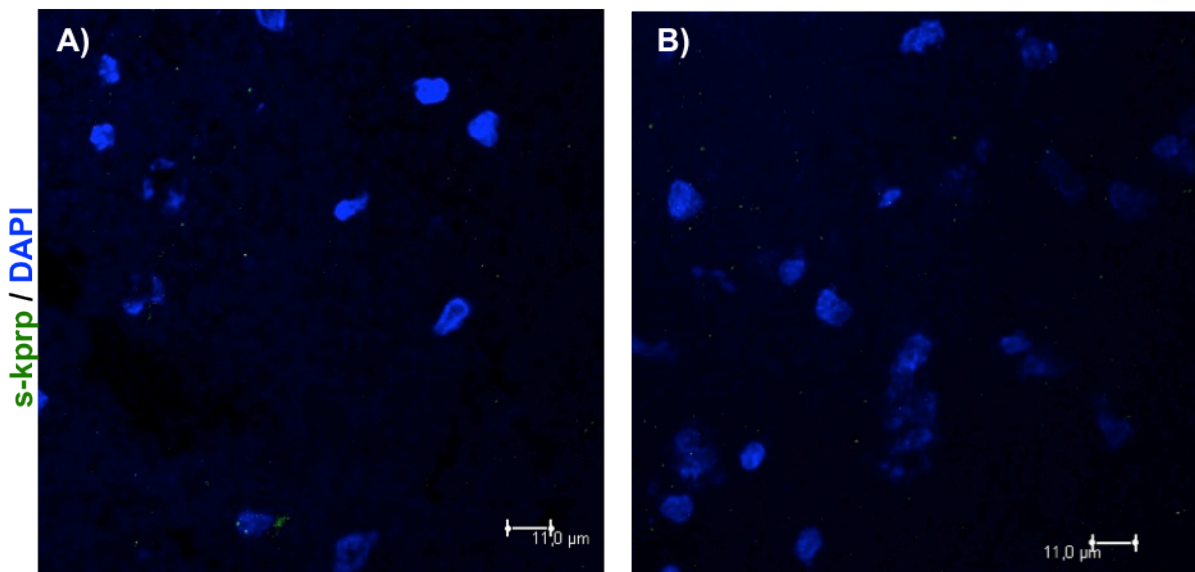


Figura 34. Controles para determinar la especificidad de la sonda *as-kprp*. Imágenes obtenidas por microscopía confocal a una magnificación de 63X. En azul se muestran los núcleos. A) FISH con la sonda sentido de *kprp* del hasta ventral de la médula espinal de ratas transgénicas en el estado terminal de la patología. B) FISH sin sonda del hasta ventral de la médula espinal de ratas transgénicas en el estado terminal de la patología.

Finalmente y a modo de resumen en la Tabla 6 se listan los marcadores de células AbA conocidos al momento. La misma está compuesta por marcadores proteicos de células AbA reportados en Díaz-Amarilla et al., (2012) y *kprp* aportado a raíz de este trabajo. Se indican los valores de expresión comparativa obtenidos para los mismos en el estudio por microarreglos.

Para las proteínas GFAP, Cx43, Vimentina, GLT1, Olig2, Iba1 la relación de expresión proteica entre los distintos tipos astrocitarios coincide con la relación de expresión a nivel transcripcional observada en el estudio por microarreglos. Respecto a las diferencias observadas para s100 β podrían atribuirse a inespecificidad del anticuerpo utilizado dado que s100a si se encuentra sobre-expresado a nivel transcripcional en las células AbA. Las diferencias observadas para la Glutamina sintetasa y NG2 pueden deberse a niveles de regulación post-transcripcional diferentes en las células AbA.

Nombre	Expresión Proteica			Expresión génica				
	Astrocitos N-Tg	Astrocitos Tg	AbAs	FC AbA vs. NTg	FC AbA vs. Tg	FC Tg vs. NTg	No detectado	p-valor
GFAP	XXX (patrón filamentoso)	XX (filamentoso)	X (difuso)	-85.64	-139.73	0.71	en dos réplicas AbA	<0.05
Cx43	X	X	XXX	1.88	1.47	1.28	-	0.291
s100 β	X	X	XXX	-551.41	-854.04	1.55	-	<0.05
VIMENTINA	X	X	XX	1.07	1.22	-1.14	-	0.717
GLT1	XX	XX	-	-59.99	-93.28	1.58	en las 3 réplicas AbA	<0.05
GS	XX	XX	XX	-3.55	-3.73	1.05	-	0.07
NG2	X	X	-	2.12	4.28	-2.02	-	0.491
OLIG2	-	-	-	-137.57	-212.23	1.54	en las 3 réplicas AbA	<0.05
ED1	-	-	-	-1.61	-2.87	1.78	-	0.179
IBA1	-	-	-	-6.52	-57.58	8.85	en 3 réplicas AbA y 1 N-Tg	0.266
<i>kprp</i>	-	-	XXX	20.6	16.9	1.22	en 3 réplicas Tg y NTg	<0.05

Tabla 6. Marcadores moleculares de células AbA conocidos al momento. En color se resalta el marcador *kprp* descrito por primera vez en este trabajo. Los resultados de expresión proteica fueron extraídos de Díaz-Amarilla, 2011.

Curiosamente, además de la sub-regulación en *gfap* las AbA exhibieron sub-regulación también en la expresión de otros genes utilizados como marcadores proteicos típicamente astrocitarios como son la Glutamina Sintetasa, el transportador de glutamato (GLT1), el transportador de glutamato aspartato (GLAST), y la proteína B de unión a calcio (s100 β). Si bien los niveles de expresión del ARNm, debido a la regulación post-transcripcional, no reflejan necesariamente el

nivel de expresión proteica los datos previos indican que en las AbA existe una sub-regulación también a nivel proteico de GFAP y GLT1.

El rol del GLT1 como regulador de la excitotoxicidad en el desarrollo de la patología ha sido ampliamente estudiado en los últimos años (Rothstein et al., 1992, Maragakis et al., 2005, Pardo et al., 2006, Lepore et al., 2008). Tanto en ELA como en otras enfermedades neurodegenerativas se ha observado una pérdida significativa en la expresión de este transportador (Rothstein et al., 1996, Danbolt, 2001). Por lo tanto la presencia de células AbA en la médula espinal sin expresión de GLT1 podría tener un rol importante en el desarrollo de la patología.

La evidencia indica que en estas patologías la regulación de la expresión de GLT1 se da mediante mecanismos epigenéticos como la hipermetilación de islas CpGs en su promotor (Yang et al., 2010). Por otra parte, un estudio llevado a cabo por Yoo et al., (2011) en ratones SOD1^{G93A} demostró que el tratamiento con tricostatina A luego de iniciados los síntomas, aumentó significativamente el promedio de duración de sobrevivida y prolongó la expectativa de vida un 7%. La tricostatina A es un agente inhibidor de la deacetilación de histonas, por lo tanto tiene el potencial de revertir la inhibición de la expresión de genes regulados por deacetilación. Sería interesante estudiar si la sub-regulación de GLT1 en las células AbA es debido a una regulación epigenética de su promotor ya sea por deacetilación de histonas o por hipermetilación de islas CpGs. De ser así la pérdida de expresión de GLT1 en este tipo astrocitario podría revertirse con tricostatina A (en caso de encontrarse regulada a nivel de histonas) o 5-aza-2'-deoxycytidine (en caso de estar regulada por metilación de su promotor). Ambas drogas han sido aprobadas por la FDA para tratar diversas enfermedades, en su mayoría diversos tipos de cáncer, y han demostrado resultados satisfactorios. Por lo tanto la evaluación de los efectos de estas drogas en el desarrollo de la patología en el modelo de ratas SOD1^{G93A} podría tener implicancias terapéuticas relevantes para la enfermedad en humanos.

6. CONCLUSIONES

El estudio comparativo de perfil transcripcional utilizando la técnica de microarreglos reveló diferencias importantes y significativas en la expresión de diversos genes entre las células AbA y los astrocitos neonatales transgénicos y no transgénicos. Entre los genes cuya regulación de la expresión fue significativamente mayor en las células AbA, se identificó el gen que codifica para la proteína de queratinocitos rica en Prolina (KPRP). La proteína KPRP es una proteína específica de queratinocitos, cuya expresión ha sido señalada en la literatura como limitada a la epidermis tanto en humanos como en ratas. La expresión de KPRP en el SNC se reporta por primera vez en este trabajo. La función de esta proteína permanece siendo desconocida. Dadas sus características estructurales, en la literatura se la postula o bien como una proteína estructural de la capa córnea de la epidermis o como una proteína funcional perteneciente a la familia de proteínas asociadas a los filamentos intermedios (IFAPs). Las IFAPs afectan la dinámica de los filamentos intermedios, actuando como eslabones críticos en el ensamblaje del citoplasma que brinda estabilidad mecánica a las células y al tejido. Por lo tanto la expresión de KPRP en las células AbA podría significar una ventaja competitiva. De ser así, KPRP surgiría como un nuevo blanco terapéutico de la ELA. La expresión de *kprp* en las AbAs se detectó tanto a nivel transcripcional como a nivel traduccional. Contrariamente, no pudo detectarse expresión del mensajero ni de la proteína de KPRP en los dos genotipos astrocitarios neonatales estudiados. Estos resultados llevaron a postular a *kprp*/KPRP como un nuevo marcador molecular específico de células AbA. Por lo tanto, se diseñaron y desarrollaron anticuerpos específicos poli-clonales para KPRP de rata y sondas de ARN complementarias al ARN mensajero de *kprp* de rata. Mientras que el anticuerpo para KPRP diseñado no pudo validarse debido a que mostró inespecificidad tanto en el western blot como en la IHQ, sí se pudo validar la especificidad de la sonda de ARN para *kprp*. Dicha herramienta permitió demostrar por primera vez la expresión de *kprp* en la fase sintomática de la ELA en ratas SOD1^{G93A} +/- y su localización en células AbA. Los resultados obtenidos hacen emerger a *kprp* como un nuevo gen asociado a la neurodegeneración. Existe evidencia que las AbA están presentes en el tejido en etapas anteriores al desarrollo de los síntomas, esto conlleva a postular a *kprp* como un posible marcador diagnóstico de la ELA.

7. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo serán publicados en una revista internacional. Previamente, los datos de los microarreglos serán depositados en las bases de datos internacionales. Para validar de manera más amplia a *kprp* como marcador específico de células AbA es necesario profundizar en el estudio de los tipos celulares de la médula espinal que expresan *kprp*. Para ello se realizará la FISH utilizando la sonda para *kprp* e IHQ utilizando anticuerpos marcadores de astrocitos (GFAP, s100b, GLAST), motoneuronas (ChAT), microglías (Cx43, Iba1, Cd11b), oligodendrocitos (Olig 2) y progenitores gliales (NG2) en la médula espinal de ratas transgénicas en etapas tardías de la patología. Estos estudios revelarán de manera más específica la identidad de las células que conforman la población *kprp* positiva considerada en este trabajo como células AbA. Asimismo, para confirmar la identidad de la señal observada para KPRP en la ICQ de células AbA y en la IHQ de la médula espinal de ratas transgénicas, se realizará mediante espectrometría de masas la identificación de las proteínas reconocidas por KPRP en el western blot.

Debido a que no existen al momento marcadores que permitan el diagnóstico temprano de la ELA, es de suma relevancia estudiar el potencial diagnóstico y pronóstico de *kprp*. Para ello se estudiara mediante FISH la expresión de *kprp* en la médula espinal de ratas SOD1^{G93A} +/- a partir de los 2 meses de edad hasta la aparición de los síntomas. En caso de observar señal positiva para *kprp* anterior al comienzo de los síntomas se procederá con la síntesis de una sonda de ARN para *kprp* de humanos y se realizarán estudios de la expresión de *kprp* en muestras de médula espinal de pacientes de ELA.

Además con perspectivas a la aplicación diagnóstica de *kprp*, se estudiará la presencia de *kprp* en el líquido cefalorraquídeo de las ratas transgénicas en comparación a las no transgénicas tanto a nivel de mensajero (qPCR) como a nivel proteico (Western blot). Para ello es necesario encontrar un anticuerpo anti KPRP de rata más específico al diseñado en este trabajo. Se buscarán epítopos antigénicos más específicos para la síntesis de anticuerpos que puedan ser utilizados como herramientas moleculares específicas para la detección de KPRP.

Como objetivo a largo plazo se propone estudiar las propiedades funcionales de la expresión de KPRP en las células AbA. Para ello, se podría comenzar con el

silenciamiento de *kprp* con ARN de interferencia (ARNi) y evaluar la capacidad proliferativa y neurotóxica de las mismas. En caso de observar diferencias con el fenotipo original *kprp* debería ser evaluado como un nuevo blanco terapéutico en la ELA.

Finalmente, el haber encontrado un gen de expresión específica en las células AbA permite la evaluación de manera más asertiva de la existencia de células AbA en otros modelos de neurodegeneración como la Enfermedad de Alzheimer o Enfermedad de Huntington.

ANEXO I: Calidad del ARN utilizado para el análisis por microarreglos

La evaluación de la integridad del ARN es un paso crítico para la obtención de datos válidos de expresión génica, siendo un requisito clave la utilización de ARN intacto. El 2100 Bioanalyzer de Agilent y sus kits asociados RNA 600 Nano y Pico LabChip se han vuelto el estándar en la evaluación de la calidad y cuantificación del ARN. Basándose en una separación electroforética en chips micro-fabricados, las muestras de ARN son separadas y subsecuentemente detectadas mediante una fluorescencia inducida por laser. El software del Bioanalyzer genera un electroferograma con una imagen del tipo gel y exhibe los resultados como concentración de la muestra y el ratio ribosomal. El electroferograma proporciona una evaluación visual detallada de la calidad de la muestra de ARN, lo que puede llevar a errores de apreciación. La degradación del ARN es un proceso gradual. A medida que avanza la degradación del ARN hay una disminución en la relación de las bandas ribosomales 18S y 28S y un aumento en las señales de fondo entre los dos picos ribosomales. El bioanalyzer genera automáticamente la relación ribosomal de las subunidades 18S y 28S. A fin de estandarizar el proceso de interpretación de la integridad del ARN, Agilent Technologies introdujo una nueva herramienta para la evaluación de la calidad del ARN. El RNA Integrity Number (RIN), fue desarrollado para remover la interpretación individual en el control de calidad del ARN. Toma en cuenta la corrida electroforética completa. El algoritmo del software RIN permite la clasificación del ARN eucariota total, basado en un sistema de numeración del 1 al 10, siendo 1 el perfil más degradado y 10 el más íntegro. La herramienta RIN es independiente de la variabilidad instrumental y de la variabilidad en la concentración, por lo que facilita la comparación de muestras de instrumento a instrumento y de laboratorio a laboratorio. Facilitándose así, la interpretación de un electroferograma y permitiendo la comparación de muestras que aseguran la repetitividad de los experimentos. Para realizar el estudio de microarreglos las muestras deben presentar un RIN mayor a 8 y una concentración mínima de 133.33ng/μl de ARN total. Además la contaminación proteica de las muestras debe ser mínima dado que puede interferir negativamente en las reacciones de síntesis y marcaje del ARNc. El grado de proteínas presentes en las muestras se evalúa mediante espectrofotometría midiendo la absorbancia a de los grupos aromáticos a 280nm. Paralelamente se mide la absorbancia de las bases nitrogenadas a 260nm y se evalúa el índice de la absorbancia a 260 sobre la absorbancia a 280. Como mínimo valor aceptable se considera un índice de 1.99 correspondiente a un 95% de ácidos nucleicos

y un 5% de proteínas presentes en la muestra. Los resultados obtenidos mediante el bioanalyzer del ARN de las muestras de astrocitos se muestran en la fig., A1.

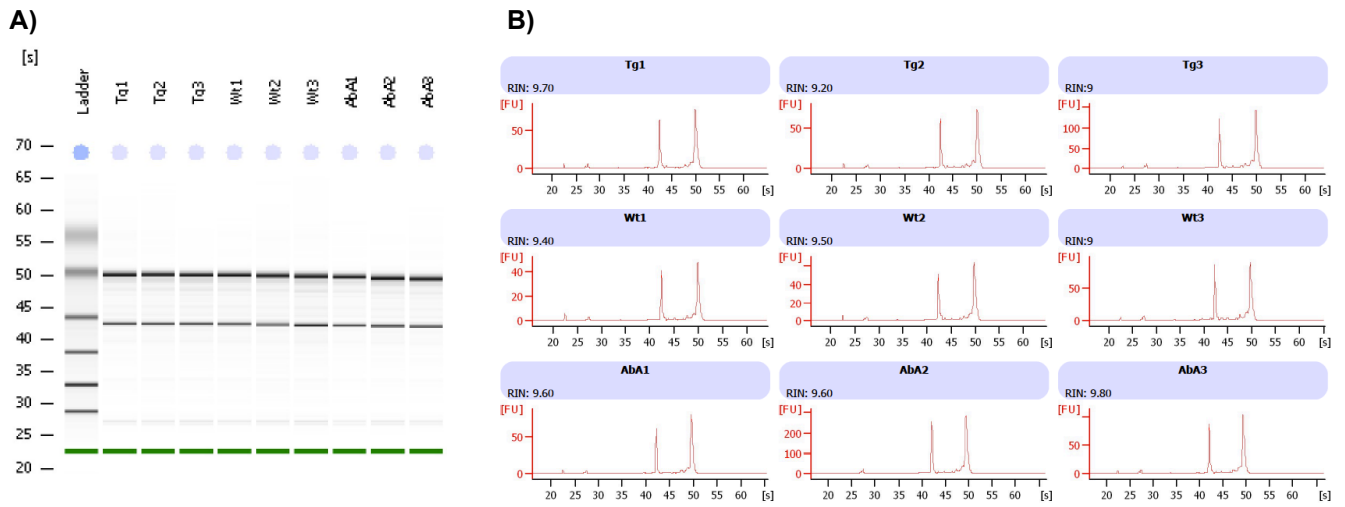


Figura A1. Análisis cualitativo del ARN utilizado en los microarreglos. A) Imagen de la separación electroforética del ARN contenido en las diferentes poblaciones astrocitarias. Se observan dos bandas mayoritarias correspondientes al ARNr 18S y 28S. B) Resumen del electroferograma obtenido para cada una de las muestras. Los picos observados corresponden a los ARNr 18S y 28S.

ANEXO II: Validación de los datos de los microarreglos

Dos principales requisitos para cualquier plataforma de microarreglos son la reproducibilidad y alta sensibilidad del sistema. La reproducibilidad provee los medios para experimentos de alta confianza y la comparación precisa de múltiples muestras y la alta sensibilidad permite la detección de cambios significativos en la expresión génica, incluyendo los cambios pequeños entre múltiples conjuntos de genes. Estos dos requerimientos son satisfactoriamente alcanzados en cualquier plataforma de un solo color de Agilent.

Las cualidades técnicas de una plataforma de microarreglos se evalúan a través de la reproducibilidad de la intensidad de señal, el límite mínimo de detección, el rango dinámico lineal y la precisión de la relación logarítmica.

Los experimentos de microarreglos de expresión génica son procedimientos de varios pasos en los cuales pequeñas diferencias entre las muestras, procesos o variaciones inducidas por el usuario pueden afectar la reproducibilidad de los datos de las señales del microarreglo. La reproducibilidad y calidad de los microarreglos se evalúa a través de métricas. Estas métricas se pueden utilizar para evaluar: el proceso de preparación de los microarreglos, la estadística de la señal de cada gen en cada arreglo (%CV), la estadística de la señal de cada gen entre los microarreglos marcados con la misma muestra (%CV), las estadísticas de relación logarítmica (SD) para cada gen entre los microarreglos y las métricas de las réplicas biológicas

Para evaluar el flujo de trabajo de los microarreglos de un color de Agilent, desde la amplificación de la muestra al marcado y procesamiento del microarreglo, se utilizó como control positivo el Agilent One Color RNA Spike-In kit. Este control positivo consiste en un conjunto de transcritos conocidos optimizados para reconocer sondas complementarias en el microarreglo de expresión génica de Agilent con mínima auto-hibridación e hibridación cruzada. Dicho conjunto de sondas está diseñado de modo que no posee complementariedad alguna con las muestras biológicas utilizadas en los microarreglos. Los transcritos control corresponden a 10 transcritos poli-adenilizados sintetizados *in vitro* derivados del gen E1A de adenovirus. Estos transcritos se encuentran pre-mezclados a concentraciones que abarcan 6 logaritmos de intensidad de señal y difieren por incrementos logarítmicos de uno o medio. El análisis de estas

espigas se realiza en el FE software el cual genera un QC Report. El QC Report incluye resultados estadísticos que ayudan a evaluar la reproducibilidad y confianza de los datos del microarreglo. Estos son las métricas cuantitativas de cada microarreglo: porcentaje de características marcadas como valores atípicos no uniformes¹, porcentaje de características marcadas como saturadas, promedio de la señal neta² promediada sobre todo el microarreglo, promedio del ruido de fondo local neto de la señal³ promediado sobre todo el microarreglo y la desviación estándar (DS) del ruido de fondo local neto de la señal sobre todo el microarreglo.

El primer resultado que se reporta en el QC Report como la figura de localización de puntos de las 4 esquinas del microarreglo, indicativo del posicionamiento del mismo en la cuadrícula. Se analiza la distribución de los puntos centroides de las 4 esquinas del microarreglo. Si los mismos están descentrados en una de las esquinas el microarreglo se posicionó de manera incorrecta en la cuadrícula, invalidando los datos arrojados por el microarreglo. En la Fig. A2 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las muestras. Como se puede apreciar, se observan puntos centroides en cada una de las esquinas de los microarreglos para todas las muestras por lo tanto, los microarreglos se posicionaron de manera correcta en la cuadrícula.

Para evaluar los procesos de hibridación y lavados se utiliza el análisis de la distribución de las poblaciones no uniformes y el número de poblaciones atípicas. Estos parámetros se reportan en el QC Report. Valores elevados de poblaciones atípicas son indicativos de fallas en la hibridación, mientras que una distribución significativamente no uniforme de las poblaciones son indicio de fallas en los lavados. Las muestras analizadas presentaron una distribución uniforme de sus poblaciones y un porcentaje de poblaciones atípicas aceptable validando así, los procesos de hibridación y lavados realizados en el experimento.

Valores atípicos no uniformes: son características marcadas por el FE software si la población de pixeles dentro de un punto característica utilizado para calcular el promedio de la señal posee una elevada desviación estándar (DS) de la señal. Generalmente estas características llevan a erróneos resultados de relación logarítmica por lo que no se utilizan en los análisis estadísticos.

Señal Neta: es la señal media menos la compensación del escáner, por lo que la estadística de la señal neta es independiente de la posición del escáner.

Ruido de fondo local: la estadística del ruido de fondo local del anillo alrededor de la característica se calcula utilizando el ruido de fondo local de todas las características del tipo control.

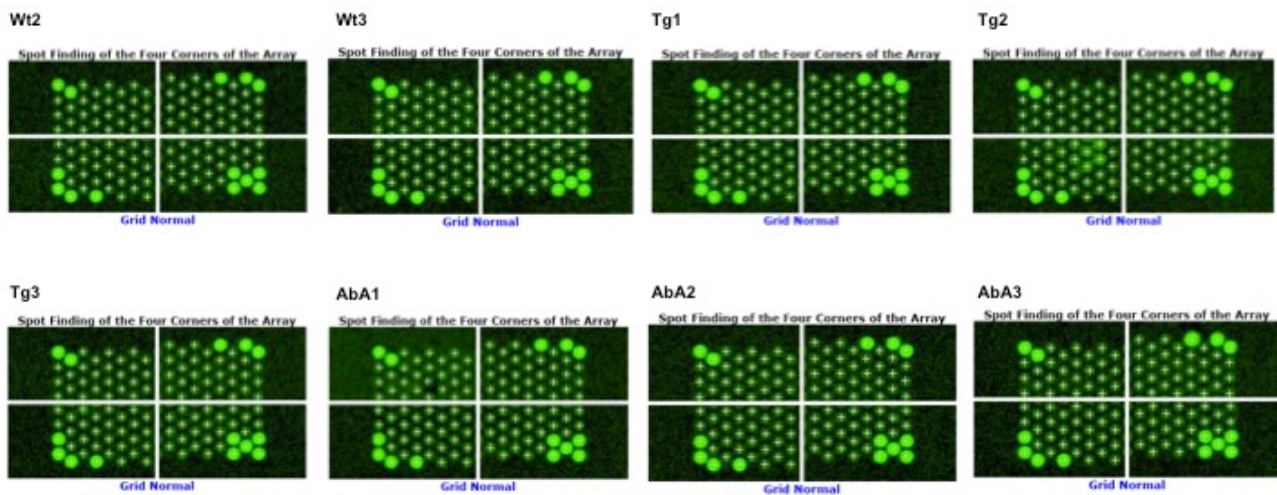


Figura A2. Posicionamiento de los microarreglos para cada una de las muestras. Las figuras se extrajeron del QC Report de cada una de las muestras. Se indica la distribución de puntos en las 4 esquinas de cada uno de los microarreglos.

A los datos de expresión génica provenientes de los microarreglos comúnmente se los percibe como imprecisos (ruido de fondo) debido las imperfecciones inherentes a la tecnología. El ruido de fondo es causado cuando el laser de escaneo se refleja por una superficie y no se puede eliminar completamente. Ocasionalmente, los altos niveles de ruido pueden ser causado por desechos o sales remanentes de la hibridación, o por el aumento de la sensibilidad del escáner. El ruido de fondo se estima aproximadamente en el QC Report mediante las estadísticas de los controles negativos (Negative Control Stats). Las estadísticas de los controles negativos incluyen el promedio y SD de las señales netas y las señales menos el control. Las muestras presentaron niveles tolerables de ruido de fondo.

Otro parámetro importante a tener en cuenta es el rango dinámico de la señal en el microarreglo. El rango dinámico de la señal define los límites de la intensidad de señal obtenida en el microarreglo reflejando de manera precisa las diferencias en la cantidad de transcritos de interés presentes en la muestra. La evaluación del rango dinámico de la señal de las sondas de interés y de las espigas control en el microarreglo se realiza con la estadística de la señal neta. En la Fig A3 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las muestras.

Wt2		Wt3		Tg1		Tg2	
Net Signal Statistics		Net Signal Statistics		Net Signal Statistics		Net Signal Statistics	
Agilent SpikeIn:		Agilent SpikeIn:		Agilent SpikeIn:		Agilent SpikeIn:	
	Green		Green		Green		Green
# Saturated Features	0	# Saturated Features	0	# Saturated Features	0	# Saturated Features	0
99% of Sig. Distrib.	249711	99% of Sig. Distrib.	246271	99% of Sig. Distrib.	129846	99% of Sig. Distrib.	170859
50% of Sig. Distrib.	824	50% of Sig. Distrib.	843	50% of Sig. Distrib.	482	50% of Sig. Distrib.	613
1% of Sig. Distrib.	103	1% of Sig. Distrib.	109	1% of Sig. Distrib.	91	1% of Sig. Distrib.	104
Non-Control probes:		Non-Control probes:		Non-Control probes:		Non-Control probes:	
	Green		Green		Green		Green
# Saturated Features	1	# Saturated Features	5	# Saturated Features	1	# Saturated Features	2
99% of Sig. Distrib.	146231	99% of Sig. Distrib.	183982	99% of Sig. Distrib.	85076	99% of Sig. Distrib.	124070
50% of Sig. Distrib.	624	50% of Sig. Distrib.	770	50% of Sig. Distrib.	449	50% of Sig. Distrib.	664
1% of Sig. Distrib.	105	1% of Sig. Distrib.	110	1% of Sig. Distrib.	97	1% of Sig. Distrib.	110

Tg3		Aba1		Aba2		Aba3	
Net Signal Statistics		Net Signal Statistics		Net Signal Statistics		Net Signal Statistics	
Agilent SpikeIn:		Agilent SpikeIn:		Agilent SpikeIn:		Agilent SpikeIn:	
	Green		Green		Green		Green
# Saturated Features	0	# Saturated Features	0	# Saturated Features	0	# Saturated Features	0
99% of Sig. Distrib.	234951	99% of Sig. Distrib.	147644	99% of Sig. Distrib.	248808	99% of Sig. Distrib.	248808
50% of Sig. Distrib.	886	50% of Sig. Distrib.	674	50% of Sig. Distrib.	823	50% of Sig. Distrib.	823
1% of Sig. Distrib.	106	1% of Sig. Distrib.	98	1% of Sig. Distrib.	115	1% of Sig. Distrib.	115
Non-Control probes:		Non-Control probes:		Non-Control probes:		Non-Control probes:	
	Green		Green		Green		Green
# Saturated Features	2	# Saturated Features	1	# Saturated Features	3	# Saturated Features	3
99% of Sig. Distrib.	196823	99% of Sig. Distrib.	143723	99% of Sig. Distrib.	182845	99% of Sig. Distrib.	182845
50% of Sig. Distrib.	410	50% of Sig. Distrib.	377	50% of Sig. Distrib.	589	50% of Sig. Distrib.	589
1% of Sig. Distrib.	106	1% of Sig. Distrib.	103	1% of Sig. Distrib.	115	1% of Sig. Distrib.	115

Figura A3. Estadística de la señal neta. Tablas extraídas del QC Report de cada una de las muestras. Se muestra el rango dinámico de intensidad de señal neta tanto para las espigas control como para las sondas no control.

Los controles positivos en el microarreglo son los correspondientes a los de las espigas control previamente mencionadas. El Agilent One color Agilent One Color RNA Spike-In kit se diluye, se amplifica y se marca en conjunto con la muestra de interés. En el QC Report se muestran los valores intensidad de fluorescencia verde en función de la concentración relativa de los transcritos control. A partir de la transformación logarítmica de los datos se obtiene el rango de linealidad del experimento. Idealmente las dos concentraciones menores de los transcritos control debes caer fuera del rango de linealidad, correspondiendo a ruido de fondo. Además las dos concentraciones mayores deben poseer una pendiente distinta a la del rango lineal debido a la saturación del escáner. En el QC report este control de calidad de los transcritos control se reporta como un gráfico y como tablas con los valores correspondientes de valores máximos y mínimos de concentración e intensidad de la señal del rango lineal con su desvío estándar correspondiente.

En la fig., A4 se muestran los gráficos de log intensidad de señal en función del log de la concentración relativa de los transcritos control obtenidos para cada una de las muestras. Como se puede apreciar en la fig., A4, todas las muestras presentaron el rango de linealidad deseado.

Finalmente, el conjunto de resultados de la métrica del control de calidad se resume en una tabla al final del QC report. En la misma se indican los valores mínimos aceptables de los parámetros. Los resultados obtenidos para cada una de las muestras se encuentran en las tablas de la fig., A5. Como se puede apreciar la mayoría de los valores para cada una de las muestras se encentraron dentro del rango bueno. Los datos indicados a evaluar corresponden a una falla en la fabricación del lote de slides utilizado por lo que carece de significancia.

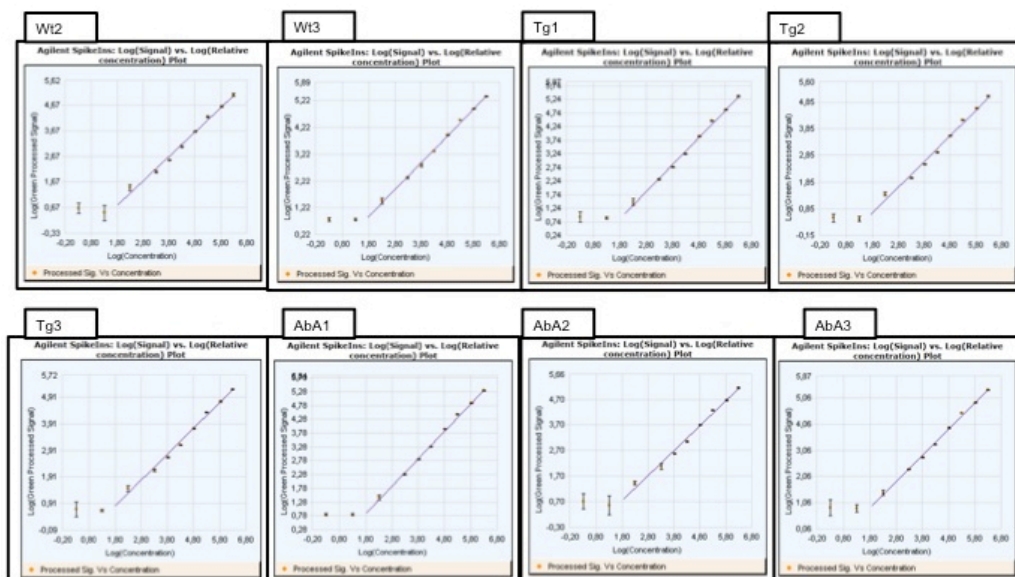


Figura A4. QC Report del Agilent Spike-In One color. Grafico del Log de la señal verde procesada para cada transcripto en función del Log de la concentración relativa. A niveles de señales elevados las barras de error son pequeñas debido a saturación del escáner. Las mayores barras de error observadas para las señales de menor intensidad indican que las mismas están dentro del ruido de fondo.

Normalización. La hipótesis subyacente al análisis de microarreglos es que las intensidades medidas para cada gen arreglado representan el nivel de expresión relativa del mismo. Los patrones de expresión biológicamente relevantes se identifican típicamente comparando los niveles medidos de expresión entre diferentes muestras en una base de gen por gen. Debido a que en los experimentos de microarreglos existen muchas fuentes de variación sistemática (cantidades iniciales distintas de ARN, diferencias en la hibridación entre chips, diferencias en la fabricación de los chips, etc) para poder realizar dicha comparación es necesario transformar los datos obtenidos para minimizar las diferencias no biológicas y revelar las verdaderas diferencias entre las muestras. Es decir, los microarreglos se estandarizan uno con otro para permitir la comparación cruzada entre los mismos. Esto se conoce como **normalización** de los datos. La normalización se realizó utilizando el Gene-Spring GX 12.5 Expression Analysis Software (Agilent Technologies, Mississauga, ON, USA). Brevemente, se seleccionó un umbral de señal de las muestras igual a 1, se transformaron los datos en log base 2 y se aplicó el algoritmo de normalización del Corrimiento de Percentil 75. El percentil 75 es un valor de intensidad robusto para normalizar los datos. Dentro de cualquier muestra que se analice siempre hay cierto porcentaje de genes que no se expresan. Aunque un gen no se exprese, en el microarreglo hay una sonda para ese gen que reportará de todas

maneras un valor de intensidad. Estos valores de intensidad seguramente se encuentren dentro del rango inferior del percentil. Utilizando un percentil elevado como el 75, estos valores se consideran ruido y son menos fiables. Luego de la corrección de la línea de base media se realizó el control de calidad de las muestras en el Gene Spring GX 12.5. En la fig., A6 se muestran los resultados obtenidos para el análisis de los componentes principales (PCA) y el gráfico de las métricas del control de calidad. El PCA calcula las puntuaciones de los componentes principales y los representa visualmente en un gráfico de dispersión 3D.

Estos datos se utilizan para comprobar la calidad de los datos. En el gráfico se representa un punto por microarreglo y se colorea de acuerdo a su categoría. Esto permite evaluar la separación de las réplicas entre grupos. Idealmente las réplicas dentro de un grupo se deben agrupar juntas y separadas de los microarreglos de los otros grupos. Como se puede apreciar en la fig., A6 las réplicas de cada tipo celular se agrupan dentro del mismo conjunto y se distinguen entre sí. Por lo tanto se puede decir que los tres tipos celulares presentan diferencias significativas que los diferencian entre sí y que además cada grupo se encuentra representado adecuadamente de acuerdo a sus réplicas. El gráfico de las métricas del control de calidad permite visualizar los valores obtenidos en las tablas del QC Report. Como se mencionó anteriormente los valores obtenidos indican que los resultados obtenidos a partir de los microarreglos realizados son reproducibles y confiables.

Metric Name	Value	Excellent	Good	Evaluate
IsGoodGrid	1.00		>1	<1
AnyColorPrntFeatNonUn...	0.01		<1	>1
gNegCtrlAveNetSig	85.94		<40	>40
gNegCtrlAveBGSubSig	-6.27		-10 to 5	<-10 or >5
gNegCtrlSDevBGSubSig	2.90		<10	>10
gSpatialDetrendRMSFilt...	2.86		<15	>15
gNonCntrlMedCVProcSign...	5.45		0 to 8	<0 or >8
gE1aMedCVProcSignal	5.47		0 to 8	<0 or >8
absGE1E1aSlope	0.95		0.90 to 1.20	<0.90 or >1.20
DetectionLimit	1.40		0.01 to 2	<0.01 or >2
gDDN	2.00		-15 to 15	<-15 or >15
rDDN	-		-15 to 15	<-15 or >15

◆ Excellent ◆ Good ◆ Evaluate

Wt3

Metric Name	Value	Excellent	Good	Evaluate
IsGoodGrid	1.00		>1	<1
AnyColorPrntFeatNonUn...	0.01		<1	>1
gNegCtrlAveNetSig	107.40		<40	>40
gNegCtrlAveBGSubSig	-9.86		-10 to 5	<-10 or >5
gNegCtrlSDevBGSubSig	4.38		<10	>10
gSpatialDetrendRMSFilt...	6.10		<15	>15
gNonCntrlMedCVProcSign...	2.34		0 to 8	<0 or >8
gE1aMedCVProcSignal	2.12		0 to 8	<0 or >8
absGE1E1aSlope	1.00		0.90 to 1.20	<0.90 or >1.20
DetectionLimit	0.80		0.01 to 2	<0.01 or >2
gDDN	1.00		-15 to 15	<-15 or >15
rDDN	-		-15 to 15	<-15 or >15

◆ Excellent ◆ Good ◆ Evaluate

Tg1

Metric Name	Value	Excellent	Good	Evaluate
IsGoodGrid	1.00		>1	<1
AnyColorPrntFeatNonUn...	0.01		<1	>1
gNegCtrlAveNetSig	110.71		<40	>40
gNegCtrlAveBGSubSig	-12.87		-10 to 5	<-10 or >5
gNegCtrlSDevBGSubSig	5.01		<10	>10
gSpatialDetrendRMSFilt...	7.59		<15	>15
gNonCntrlMedCVProcSign...	3.01		0 to 8	<0 or >8
gE1aMedCVProcSignal	2.82		0 to 8	<0 or >8
absGE1E1aSlope	1.00		0.90 to 1.20	<0.90 or >1.20
DetectionLimit	1.31		0.01 to 2	<0.01 or >2
gDDN	1.00		-15 to 15	<-15 or >15
rDDN	-		-15 to 15	<-15 or >15

◆ Excellent ◆ Good ◆ Evaluate

Tg2

Metric Name	Value	Excellent	Good	Evaluate
IsGoodGrid	1.00		>1	<1
AnyColorPrntFeatNonUn...	0.00		<1	>1
gNegCtrlAveNetSig	94.29		<40	>40
gNegCtrlAveBGSubSig	-6.37		-10 to 5	<-10 or >5
gNegCtrlSDevBGSubSig	3.12		<10	>10
gSpatialDetrendRMSFilt...	2.93		<15	>15
gNonCntrlMedCVProcSign...	4.20		0 to 8	<0 or >8
gE1aMedCVProcSignal	5.02		0 to 8	<0 or >8
absGE1E1aSlope	0.96		0.90 to 1.20	<0.90 or >1.20
DetectionLimit	0.74		0.01 to 2	<0.01 or >2
gDDN	2.00		-15 to 15	<-15 or >15
rDDN	-		-15 to 15	<-15 or >15

◆ Excellent ◆ Good ◆ Evaluate

Metric Name	Value	Excellent	Good	Evaluate
IsGoodGrid	1.00		>1	<1
AnyColorPrntFeatNonUn...	0.02		<1	>1
gNegCtrlAveNetSig	108.54		<40	>40
gNegCtrlAveBGSubSig	-9.39		-10 to 5	<-10 or >5
gNegCtrlSDevBGSubSig	4.39		<10	>10
gSpatialDetrendRMSFilt...	4.45		<15	>15
gNonCntrlMedCVProcSign...	4.13		0 to 8	<0 or >8
gE1aMedCVProcSignal	4.58		0 to 8	<0 or >8
absGE1E1aSlope	0.97		0.90 to 1.20	<0.90 or >1.20
DetectionLimit	1.34		0.01 to 2	<0.01 or >2
gDDN	2.00		-15 to 15	<-15 or >15
rDDN	-		-15 to 15	<-15 or >15

◆ Excellent ◆ Good ◆ Evaluate

AbA1

Metric Name	Value	Excellent	Good	Evaluate
IsGoodGrid	1.00		>1	<1
AnyColorPrntFeatNonUn...	0.01		<1	>1
gNegCtrlAveNetSig	108.84		<40	>40
gNegCtrlAveBGSubSig	-11.26		-10 to 5	<-10 or >5
gNegCtrlSDevBGSubSig	4.78		<10	>10
gSpatialDetrendRMSFilt...	6.61		<15	>15
gNonCntrlMedCVProcSign...	3.50		0 to 8	<0 or >8
gE1aMedCVProcSignal	2.88		0 to 8	<0 or >8
absGE1E1aSlope	1.00		0.90 to 1.20	<0.90 or >1.20
DetectionLimit	0.51		0.01 to 2	<0.01 or >2
gDDN	1.00		-15 to 15	<-15 or >15
rDDN	-		-15 to 15	<-15 or >15

◆ Excellent ◆ Good ◆ Evaluate

AbA2

Metric Name	Value	Excellent	Good	Evaluate
IsGoodGrid	1.00		>1	<1
AnyColorPrntFeatNonUn...	0.00		<1	>1
gNegCtrlAveNetSig	99.51		<40	>40
gNegCtrlAveBGSubSig	-8.51		-10 to 5	<-10 or >5
gNegCtrlSDevBGSubSig	3.51		<10	>10
gSpatialDetrendRMSFilt...	3.64		<15	>15
gNonCntrlMedCVProcSign...	3.91		0 to 8	<0 or >8
gE1aMedCVProcSignal	4.82		0 to 8	<0 or >8
absGE1E1aSlope	0.97		0.90 to 1.20	<0.90 or >1.20
DetectionLimit	1.59		0.01 to 2	<0.01 or >2
gDDN	2.00		-15 to 15	<-15 or >15
rDDN	-		-15 to 15	<-15 or >15

◆ Excellent ◆ Good ◆ Evaluate

AbA3

Metric Name	Value	Excellent	Good	Evaluate
IsGoodGrid	1.00		>1	<1
AnyColorPrntFeatNonUn...	0.00		<1	>1
gNegCtrlAveNetSig	114.97		<40	>40
gNegCtrlAveBGSubSig	-11.96		-10 to 5	<-10 or >5
gNegCtrlSDevBGSubSig	4.82		<10	>10
gSpatialDetrendRMSFilt...	6.96		<15	>15
gNonCntrlMedCVProcSign...	2.38		0 to 8	<0 or >8
gE1aMedCVProcSignal	2.92		0 to 8	<0 or >8
absGE1E1aSlope	1.00		0.90 to 1.20	<0.90 or >1.20
DetectionLimit	1.60		0.01 to 2	<0.01 or >2
gDDN	1.00		-15 to 15	<-15 or >15
rDDN	-		-15 to 15	<-15 or >15

◆ Excellent ◆ Good ◆ Evaluate

Figura A5. Tablas de resumen de resultados del reporte de control de calidad.

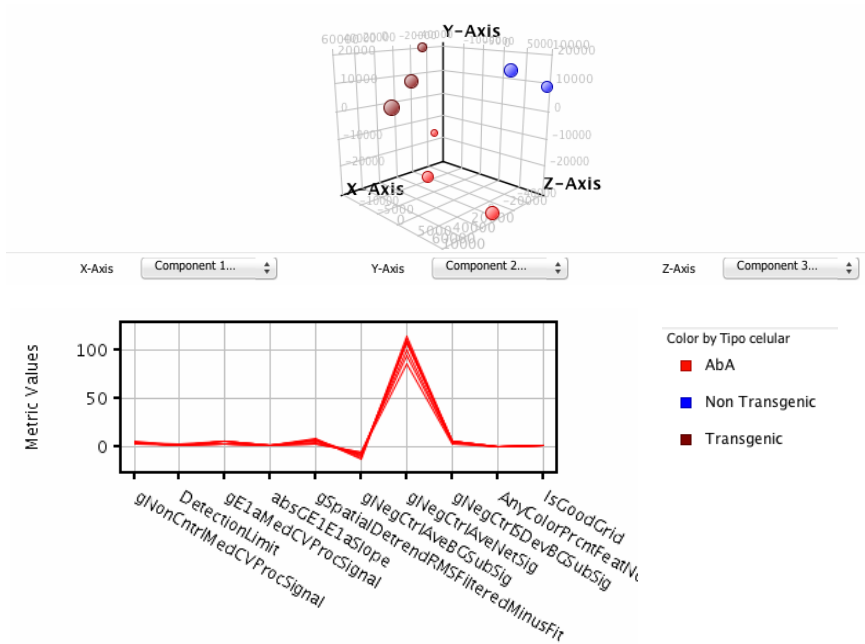
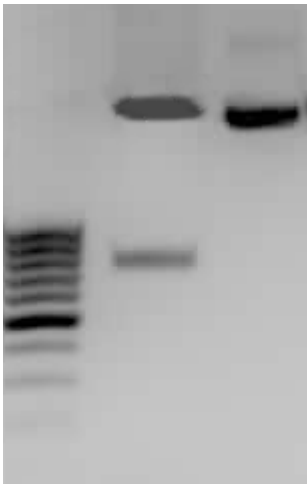


Figura A6. Control de Calidad de los microarreglos en el Gene Spring GX 12.5. Superior: 3D PCA Inferior: Gráficos de las métricas del QC Report del FE software.

ANEXO III: Obtención del vector pGEM lineal con extremos cohesivos *SpeI* y *NcoI*



En la fig., A7 se muestran los resultados obtenidos de la digestión de la midipreparation de pGEM-Inserto Control con *SpeI* y *NcoI*. Como se puede apreciar, la digestión de pGEM-Inserto Control resultó en el plásmido lineal y en un único fragmento de ADN de tamaño correspondiente al inserto control. Por lo tanto, asumimos que el fragmento correspondiente al plásmido lineal corresponde al vector pGEM con extremos cohesivos *SpeI* y *NcoI* y procedimos así con su purificación de la matriz de agarosa y su posterior ligación con *SpeI-kprp-NcoI*.

Figura A7. Linealización de pGEM-Control Insert con *SpeI* y *NcoI*.
Fotografía de electroforesis en gel de agarosa al 1.8%. Carril 1: MPM 100pb Ladder (Fermentas), Carril 2: Productos de digestión de pGEM-Control Insert con *SpeI* y *NcoI* (50µl), Carril 3: midiprep pGEM-Control Insert (dilución 1:10)

ANEXO IV: Secuencia del inserto clonado en el vector pGEM.

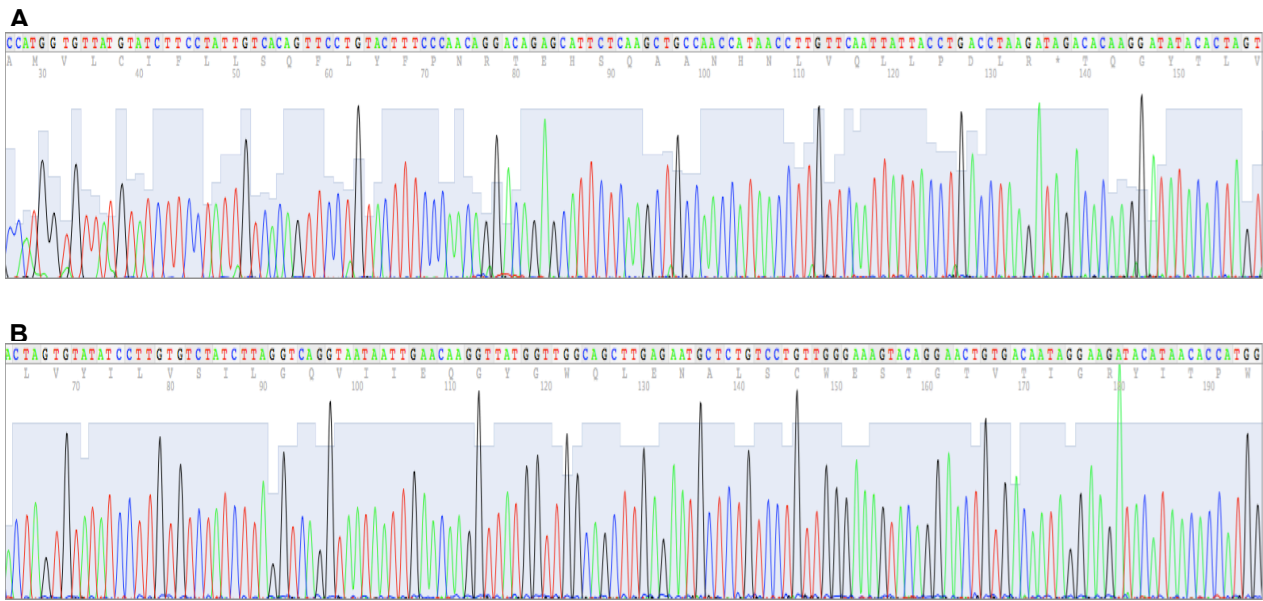


Figura A8. Secuencia correspondiente al amplicon molde *krp* contenida en el SMC del vector pGEM. Resultados obtenidos de la secuenciación de un clon recombinante pGEM-*krp*. A) Secuencia obtenida con el cebador T7 B) Secuencia obtenida con el cebador SP6.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alexianu M, Kozovska M, SH. (2001) Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology* 57:1282–1289.
- Almer G, Guegan C, Teismann P, et al., (2001) Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 49:176–185.
- Appel S, Beers D, Henkel J (2010) T cell-microglial dialogue in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis: are we listening? . *Trends Immunol* 31:7–17.
- Appel S, Engelhardt J, Henkel J, et al., (2008) Hematopoietic stem cell transplantation in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 71:1326–1334.
- Banerjee R, Mosley R, Reynolds A, et al., (2008) Adaptive immune neuroprotection in G93A-SOD1 amyotrophic lateral sclerosis mice. *PLoS One* 3:e2740.
- Beckman JS, Estevez AG, Crow JP, Barbeito L (2001) Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS. *Trends Neurosci* 24:S15-20.
- Beers D, Henkel J, Xiao Q, et al., (2006) Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:16021–16026.
- Beers DR HJ, Zhao W, Wang J, Appel SH. (2008) CD4+ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:15558–15563.
- Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger C, et al.,(2006) Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312:1389–1392.
- Borchelt D, Lee M, Slunt H, Guarnieri M, Xu Z, Wong P, Brown R, Price D, Sisodia S, Cleveland D (1994) Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:8292-8296.
- Bosch LVD, Robberecht W (2008) Crosstalk between astrocytes and motor neurons: What is the message? *Experimental Neurology* 211.
- Bruijn L, Becher M, Lee M, al e (1997) ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18:327–338.

- Cleveland DW (1997b) ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18:327-338.
- Cassina P, Cassina A, Pehar M, Castellanos R, Gandelman M, de Leon A, Robinson KM, Mason RP, Beckman JS, Barbeito L, Radi R (2008) Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *J Neurosci* 28:4115-4122.
- Cassina P, Pehar M, Vargas MR, Castellanos R, Barbeito AG, Estevez AG, Thompson JA, Beckman JS, Barbeito L (2005) Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 93:38-46.
- Cassina P, Peluffo H, Pehar M, Martinez-Palma L, Ressia A, Beckman J, Estévez A, Barbeito L (2002) Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. *Journal of neuroscience research* 67:21-30.
- Charcot JM, Joffroy A (1869) Deux cas d atrophie musculaire progressive avec de lesion de la substance grise et des faisceaux antero-lateraux de la moelle espinere. *Arch Physiol Neurol Path* 2:744-754
- Chavany C, Vicario-Abejón C, Miller G, Jendoubi M (1998) Transgenic mice for interleukin 3 develop motor neuron degeneration associated with autoimmune reaction against spinal cord motor neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:11354-11363.
- Chi L, Ke Y, Luo C, et al.,(2006) Motor neuron degeneration promotes neural progenitor cell proliferation, migration, and neurogenesis in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis mice. *Stem Cells* 24:34–43.
- Chiang C, Powell H, Gold L, Samimi A, Campbell I (1996) Macrophage/microglial-mediated primary demyelination and motor disease induced by the central nervous system production of interleukin-3 in transgenic mice. *The Journal of clinical investigation* 97:1512-1536.
- Clement A, Nguyen M, Roberts E, et al.,(2003) Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302:113–117.
- Corti S, Locatelli F, Donadoni C, et al.,(2004) Wild-type bone marrow cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice and contribute to CNS, heart and skeletal muscle tissues. *Brain Res* 127:2518–2532.

- Cudkowicz M, McKenna-Yasek D, Sapp P, Chin W, Geller B, Hayden D, Schoenfeld D, Hosler B, Horvitz H, Brown R (1997) Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 41:210-221.
- Cui F, Cai W, Wang Z, Ren Y, M. L, Sun Z, Huang X (2013) New mutation in the SOD1 (copper/zinc superoxide dismutase-1) gene in a Chinese amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patient. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*.
- Cutler R, Pedersen W, Camandola S, Rothstein J, Mattson M (2002) Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress-induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 52:448-457.
- Danbolt N (2001) Glutamate uptake. *Progress in neurobiology* 65:1-105.
- Di Giorgio F, Boulting G, Bobrowicz S, Eggan K (2008) Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation. *Cell stem cell* 3:637-685.
- Di Giorgio F, Carrasco M, Siao M, Maniatis T, Eggan K (2007) Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* 10:608–614.
- Díaz-Amarilla P, Olivera-Bravo S, Trias E, Cragolini A, Martínez-Palma L, Cassina P, Beckman J, Barbeito L (2011) Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:18126-18157.
- Drachman D, Frank K, Dykes-Hoberg M, et al.,(2002) Cyclooxygenase 2 inhibition protects motor neurons and prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Ann Neurol* 52:771–778.
- Dupuis L, Corcia P, Fergani A, Gonzalez De Aguilar JL, Bonnefont-Rousselot D, Bittar R, Seilhean D, Hauw JJ, Lacomblez L, Loeffler JP, Meininger V (2008) Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 70:1004-1009.
- Elliott J (2001) Cytokine upregulation in a murine model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Mol Brain Res* 95:172–178.
- Engelhardt J, Tajti J, Appel S (1993) Lymphocytic infiltrates in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 50:30–36.

- Fergani A, Oudart H, Gonzalez De Aguilar J-L, Fricker B, Renv√© Fdr, Hocquette J-Fo, Meininger V, Dupuis L, Loeffler J-P (2007) Increased peripheral lipid clearance in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of lipid research* 48:1571-1580.
- Ferraiuolo L, Kirby J, Grierson A, Sendtner M, Shaw P (2011) Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature reviews Neurology* 7:616-646.
- Galli S, Nakae S, Tsai M (2005) Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6:135–142.
- Glass C, Saijo K, Winner B, Marchetto M, FH. G (2010) Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140:918–934.
- Gong Y, Parsadanian A, Andreeva A, Snider W, Elliott J (2000) Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *J Neurosci* 20:660–665.
- Gowing G, Philips T, Van Wijmeersch B, et al.,(2008) Ablation of proliferating microglia does not affect motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase. *J Neurosci* 28 10234–10244.
- Graves M, Fiala M, Dinglasan L, Liu N, Sayre J, Chiappelli F, van Kooten C, Vinters H (2004) Inflammation in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord and brain is mediated by activated macrophages, mast cells and T cells. *Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders : official publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases* 5:213-222.
- Gurney M (1994) Transgenic-mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 331:1721–1722.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264:1772-1775.
- Haidet-Phillips A, Hester M, Miranda C, Meyer K, Braun L, Frakes A, Song S, Likhite S, Murtha M, Foust K, Rao M, Eagle A, Kammesheidt A, Christensen A, Mendell J, Burghes A, Kaspar B (2011) Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nature biotechnology* 29:824-832.
- Harraz M, Marden J, Zhou W, et al.,(2008) SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *J Clin Invest* 118:659–670.
- Hensley K, Abdel-Moaty H, Hunter J, Mhatre M, Mou S, Nguyen K, Potapova T, Pye Q, Qi, Rice H, Stewart C, Stroukoff K, West M (2006) Primary glia expressing the

G93A-SOD1 mutation present a neuroinflammatory phenotype and provide a cellular system for studies of glial inflammation. *Journal of neuroinflammation* 3:2.

- Hensley K, Floyd R, Gordon B, Mou S, Pye Q, Stewart C, West M, Williamson K (2002) Temporal patterns of cytokine and apoptosis-related gene expression in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry* 82:365-374.
- Hensley K, Floyd R, Gordon B, Mou S, Pye Q, Stewart C, West M, Williamson K (2002) Temporal patterns of cytokine and apoptosis-related gene expression in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry* 82:365-374.
- Howland D, Liu J, She Y, et al. (2002a) Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1604–1609.
- Howland D, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis N, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro L, Cleveland D, Rothstein J (2002b) Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:1604-1613.
- Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD (2002c) Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1604-1609.
- Huifang C, Yansu G, Ming H, Weisong D, Geng C, Chunyan L (2010) Differential expression and alternative splicing of genes in lumbar spinal cord of an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Brain research* 1340.
- Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland D (2009) Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *The Journal of cell biology* 187:761-833.
- Lambracht-Hall M, Dimitriadou V, Theoharides T (1990) Migration of mast cells in the developing rat brain. *DevBrain Res* 56:151–159.
- Lee W-H, Jang S, Lee J-S, Lee Y, Seo E-Y, You K-H, Lee S-C, Nam K-I, Kim J-M, Kee S-H, Yang J-M, Seo Y-J, Park J-K, Kim C, Lee J-H (2005) Molecular cloning and expression of human keratinocyte proline-rich protein (hKPRP), an epidermal marker

isolated from calcium-induced differentiating keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 125:995-1000.

- Lepore A, Dejea C, Carmen J, et al.,(2008a) Selective ablation of proliferating astrocytes does not affect disease outcome in either acute or chronic models of motor neuron degeneration. *Exp Neurol* 211:423–432.
- Lepore A, Rauck B, Dejea C, et al.,(2008b) Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease. *Nat Neurosci* 11:1294–1301.
- Liao B, Zhao W, Beers D, Henkel J, Appel S (2012) Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Experimental neurology* 10.1016/j.expneurol.2012.06.011.
- Lino M, Schneider C, Caroni P (2002) Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J Neurosci* 22:4825–4832.
- Liu J, Lillo Cn, Jonsson P, Vande Velde C, Ward C, Miller T, Subramaniam J, Rothstein J, Marklund S, Andersen P, Brannstrom T, Gredal O, Wong P, Williams D, Cleveland D (2004) Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron* 43:5-22.
- Lobsiger C, Boille Sv, Cleveland D (2007) Toxicity from different SOD1 mutants dysregulates the complement system and the neuronal regenerative response in ALS motor neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:7319-7326.
- Maragakis N, Rao M, Llado J, Wong V, Xue H, Pardo A, Herring J, Kerr D, Coccia C, Rothstein J (2005) Glial restricted precursors protect against chronic glutamate neurotoxicity of motor neurons in vitro. *Glia* 50:145-159.
- Martin L, Liu Z, Chen K, et al.,(2007) Motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mutant superoxide dismutase-1 transgenic mice: mechanisms of mitochondriopathy and cell death. *J Comp Neurol* 500:20–46.
- Milani P, Amadio M, Laforenza U, Dell'orco M, Diamanti L, Sardone V, Gagliardi S, Govoni S, Ceroni M, Pascale A, Cereda C (2013) Posttranscriptional regulation of SOD1 gene expression under oxidative stress: Potential role of ELAV proteins in sporadic ALS. *Neurobiology of disease*.

- Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, et al. (2001) Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J Neurosci* 21:9246–9254.
- Nagai M, Re D, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell T, Wichterle H, Przedborski S (2007) Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nature neuroscience* 10:615-637.
- Nagai M, Re D, Nagata T, et al.,(2007) Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 10:615–622.
- Ohnishi S, Ito H, Suzuki Y, et al.,(2009) Intra–bone marrow–bone marrow transplantation slows disease progression and prolongs survival in G93A mutant SOD1 transgenic mice, an animal model mouse for amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res* 1296:216–224.
- Olsen M, Roberds S, Ellerbrock B, Fleck T, McKinley D, Gurney M (2001) Disease mechanisms revealed by transcription profiling in SOD1-G93A transgenic mouse spinal cord. *Annals of neurology* 50:730-740.
- Pardo A, Wong V, Benson L, Dykes M, Tanaka K, Rothstein J, Maragakis N (2006) Loss of the astrocyte glutamate transporter GLT1 modifies disease in SOD1(G93A) mice. *Experimental neurology* 201:120-130.
- Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Castellanos R, Viera L, Beckman JS, Estévez AG, Barbeito L (2004) Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry* 89.
- Pehar M, Vargas MR, Robinson KM, Cassina P, Diaz-Amarilla PJ, Hagen TM, Radi R, Barbeito L, Beckman JS (2007) Mitochondrial Superoxide Production and Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Activation in p75 Neurotrophin Receptor-Induced Motor Neuron Apoptosis. *Journal of Neuroscience* 27.
- Pehar M, Vargas MR, Robinson KM, Cassina P, England P, Beckman JS, Alzari PM, Barbeito L (2006) Peroxynitrite transforms nerve growth factor into an apoptotic factor for motor neurons. *Free Radical Biology and Medicine* 41.
- Philips T, Robberecht W (2011) Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurology* 10:253-316.
- Powell H, Garrett R, Brett F, Chiang C, Chen E, Masliah E, Campbell I (1999) Response of glia, mast cells and the blood brain barrier, in transgenic mice

expressing interleukin-3 in astrocytes, an experimental model for CNS demyelination. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 9:219-254.

- Pramatarova A, Laganier J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau G (2001) Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci* 21 3369–3374.
- Raoul C, Estevez A, Nishimune H, et al.,(2002) Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* 35:1067–1083.
- Ripps ME, Huntley GW, Hof PR, Morrison JH, Gordon JW (1995) Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:689-693.
- Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan J, Deng H (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59-121.
- Rossi D, Volterra A (2009) Astrocytic dysfunction: Insights on the role in neurodegeneration. *Brain Research Bulletin* 80.
- Rothstein J, Dykes-Hoberg M, Pardo C, Bristol L, Jin L, Kuncl R, Kanai Y, Hediger M, Wang Y, Schielke J, Welty D (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686.
- Rothstein J, Martin L, Kuncl R (1992) Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 326:1464–1468.
- Rothstein J, Patel S, Regan M, et al.,(2005) Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433:73–77.
- Rothstein J, Van Kammen M, Levey A, Martin L, Kuncl R (1995) Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 38:73–84.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology* 7:3.
- Sjoberg T, Mzezewa S, Jonsson K, Salemark L (2004) Immune response in burn patients in relation to HIV infection and sepsis. *Burns* 30:670-674.
- Sjoberg T, Mzezewa S, Jonsson K, Salemark L (2004) Immune response in burn patients in relation to HIV infection and sepsis. *Burns* 30:670-674.

- Solomon J, Lewis C, Ajami B, Corbel S, Rossi F, Krieger C (2006) Origin and distribution of bone marrow-derived cells in the central nervous system in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 53:744–753.
- Van Damme P, Bogaert E, Dewil M, et al.,(2007) Astrocytes regulate GluR2 expression in motor neurons and their vulnerability to excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:14825–14830.
- Vargas M, Johnson D, Sirkis D, Messing A, Johnson J (2008) Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:13574-13655.
- Vargas M, Pehar M, Cassina P, Beckman J, Barbeito L (2006) Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR-dependent motor neuron apoptosis. *Journal of neurochemistry* 97:687-783.
- Vargas M, Pehar M, Cassina P, Beckman J, Barbeito L (2006) Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR-dependent motor neuron apoptosis. *Journal of neurochemistry* 97:687-783.
- Vargas M, Pehar M, Davila-Amarilla P, Beckman J, Barbeito L (2008) Transcriptional profile of primary astrocytes expressing ALS-linked mutant SOD1. *Journal of neuroscience research* 86:3515-3525.
- Wang L, Gutmann D, Roos R (2010) Astrocyte loss of mutant SOD1 delays ALS disease onset and progression in G85R transgenic mic. *Hum Mol Genet* 20:286–293.
- Weydt P, Yuen E, Ransom B, Moller T (2004) Increased cytotoxic potential of microglia from ALS-transgenic mice. *Glia* 48:179–182.
- Wu D, Re D, Nagai M, Ischiropoulos H, Przedborski S (2006) The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:12132–12137.
- Xiao Q, Zhao W, Beers D, et al.,(2007) Mutant SOD1(G93A) microglia are more neurotoxic relative to wild-type microglia. *J Neurochem* 102:2008–2019.
- Yamanaka K, Boillee S, Roberts E, et al.,(2008) Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:7594–7599.
- Yang Y, Gozen O, Vidensky S, Robinson M, Rothstein J (2010) Epigenetic regulation of neuron-dependent induction of astroglial synaptic protein GLT1. *Glia* 58:277-286.

- Yoshihara T, Ishigaki S, Yamamoto M, Liang Y, Niwa J-i, Takeuchi H, Doyu M, Sobue G (2002) Differential expression of inflammation- and apoptosis-related genes in spinal cords of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry* 80:158-167.
- Zhong Z, Ilieva H, Hallagan L, et al. (2009) Activated protein C therapy slows ALS-like disease in mice by transcriptionally inhibiting SOD1 in motor neurons and microglia cells. *J Clin Invest* 119:3437–3449.