



Ministerio
**de Educación
y Cultura**



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR fcien.edu.uy



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Análisis de la respuesta de la glía mixta espinal neonatal al daño mecánico u oxidativo

Tesina de Grado para la Licenciatura en Bioquímica

Diciembre de 2025

Alanís Dalla Rosa

Tutora: Dra. Silvia Olivera-Bravo

Departamento de Neurobiología y Neuropatología (NBNP)
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

ÍNDICE

Agradecimientos.....	3
Resumen.....	4
1. Introducción.....	6
1.1 Células gliales del Sistema Nervioso Central.....	6
1.2 Respuesta astrocitaria y microglial al daño neural.....	6
1.2.1 Daño oxidativo.....	8
1.2.2 Daño mecánico.....	10
1.3 Reactividad astrocitaria y microglial.....	10
1.4 Esclerosis Lateral Amiotrófica.....	12
1.4.1 Papel de la mutación SOD1 en ELA.....	13
1.4.2 Papel de las células gliales en ELA.....	14
1.4.3 Daño mecánico en ELA.....	15
1.4.4 Dimorfismo sexual en ELA.....	16
2. Hipótesis.....	17
3. Objetivos.....	17
4 Estrategia experimental.....	18
5. Materiales y métodos.....	19
5.1. Aspectos éticos.....	19
5.2 Manejo de animales y formación de harenas.....	19
5.3. Marcado y genotipado de los animales.....	20
5.4. Manejo y cultivo de células C6.....	20
5.5. Preparación de los cultivos primarios.....	20
5.5.1. Mantenimiento y siembra de cultivos.....	21
5.6. Inducción de daño.....	21
5.6.1 Estrés oxidativo.....	21
5.6.2. Daño mecánico.....	21
5.8. Obtención y análisis de imágenes.....	24
5.9. Análisis estadístico.....	24
6. Resultados y discusión.....	25
6.1. RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 1.....	25
6.2. RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 2.....	31
7. Conclusiones.....	46
8. Perspectivas.....	47
9. Bibliografía.....	48
10- Anexos.....	52
9.1 ESTADÍSTICAS DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 1.....	52
9.2 ESTADÍSTICAS DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 2.....	53

Agradecimientos

A quienes forman parte del Laboratorio de Neurobiología y Neuropatología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, gracias por abrirme sus puertas y permitirme realizar mi tesina de grado allí.

A mi tutora, Silvia Olivera, por su tiempo, dedicación y enorme paciencia. Gracias por compartir generosamente tu conocimiento y enseñarme a pensar de forma crítica. Encontré una investigadora que me inspira y me llevo de este proceso una motivación que espero nos vuelva a cruzar prontamente en nuevos desafíos.

A José Pedro Prieto y José Manuel Verdes, por aceptar con entusiasmo la corrección y evaluación de esta tesina.

A la Facultad de Ciencias, por equilibrar caminos que no siempre comienzan desde los mismos lugares y condiciones y por darme la oportunidad de llegar hasta aquí.

A mis amigas de toda la vida, gracias por acompañarme incondicionalmente en cada momento. Por alentarme cuando las cosas se hicieron difíciles y por escucharme con paciencia.

A Shakti, por ser mi guía esencial en mi sendero y enseñarme la fuerza y la resiliencia que hicieron posible seguir siempre. Lo que soy y logré, lleva impresa la huella de tu amor.

A mi familia, abuelos y hermanas gracias por alentarme, por haber sido fieles expectantes y seguir de cerca cada paso de este recorrido.

A mi padre biológico, Fede, dondequiera que estés, sé que estarías orgulloso, te siento siempre cerca. Y a Martín, quien más allá de la sangre me apoyó incondicionalmente desde siempre, en cada gesto, incluso en los pequeños detalles que nadie ve y que sostienen cuando más se necesita.

A mi madre, mi pilar, tu ejemplo diario me enseñó que aun frente a las adversidades, siempre hay que seguir. Gracias por tu amor y confiar en mí.

A Nicolás, mi compañero, gracias por caminar conmigo desde el comienzo, por levantarme todas las veces que me caí y festejar todos mis logros como si fueran tuyos, por creer en mí incluso cuando yo dudaba y por estar siempre presente con paciencia y amor.

Resumen

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por la pérdida progresiva de motoneuronas y la parálisis de los músculos que inervan. Esta patología es una enfermedad mayoritariamente esporádica, donde las células gliales cumplen un papel esencial en la neuroprotección y en la propagación del daño. Entre las células gliales, los astrocitos y la microglía, en particular, participan activamente en los procesos de inflamación, estrés oxidativo y disfunción sináptica que acompañan el inicio y la progresión de la enfermedad y tienen un rol preponderante en la muerte selectiva de las motoneuronas. A su vez, aunque la evidencia obtenida sugiere que el sexo influye en el inicio y la progresión de la enfermedad, la forma en que el sexo y el genotipo condicionan la respuesta glial sigue siendo poco comprendida.

El objetivo de esta tesis fue analizar la respuesta de astrocitos y microglía del modelo preclínico de ELA, SOD1G93A en ratas, empleando machos y hembras transgénicas (SOD1G93A+/-) y sus hermanos/as no transgénicos (SOD1G93A-/-) frente al estrés oxidativo y al daño mecánico.

Para cumplir con este objetivo, en primer lugar, se optimizó un paradigma experimental de daño oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) durante 1 h, en ausencia o presencia de daño mecánico. Luego de determinar las condiciones experimentales, se realizaron cultivos de glía mixta de la médula espinal de neonatos transgénicos y no transgénicos, los que fueron sometidos a daño oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno durante 1 h o 48 h con y sin daño mecánico. Al cabo de 48 h, la viabilidad celular, el área libre de células y el porcentaje de células en el área rayada fueron analizados mediante el ensayo de sulforodamina B (SRB). Este colorante puede ser visualizado por microscopía óptica y confocal y su absorbancia óptica medida por espectrofotometría.

Los resultados obtenidos revelaron que el genotipo y el sexo influyen de manera diferenciada en la respuesta glial neonatal frente al daño oxidativo y mecánico. Los cultivos de animales no transgénicos presentaron gran vulnerabilidad al daño oxidativo agudo seguido de una estabilización a las 48 h, lo que sugiere la preservación de al menos parte de su capacidad antioxidante. En tanto, los cultivos de ratas transgénicas exhibieron una vulnerabilidad sostenida al estrés oxidativo, con un deterioro progresivo que podría reflejar la incapacidad de activar mecanismos compensatorios y, entendemos que podrían reproducir al menos en parte los fenómenos tempranos descritos en modelos de ELA. A su vez, la microglía mostró una susceptibilidad a ambos estímulos de daño más marcada y variable que los astrocitos que mantuvieron una mayor capacidad de migración y recuperación.

En cuanto a la variable sexo, los cultivos de animales no transgénicos mostraron diferencias leves o no significativas entre sexos. En cambio, estas diferencias se manifestaron en mayor medida en el modelo transgénico, donde las células obtenidas de las hembras mantuvieron mayor densidad celular tras el estrés oxidativo y mostraron un cierre del daño mecánico más eficiente. Los cultivos de células obtenidos de la médula espinal de machos, por el contrario, exhibieron peores resultados en todas las variables analizadas, incluyendo una pérdida casi completa de microglía a las 48 h de tratamiento con H_2O_2 . Esta diferencia sugiere que incluso en etapas neonatales las glías femeninas cuentan con una mayor estabilidad redox.

Estos hallazgos aportan evidencia inicial de que la interacción entre genotipo y sexo pueden condicionar la resiliencia glial y sientan las bases para profundizar en cómo estos factores podrían contribuir a la progresión diferencial de la ELA en pacientes hombres y mujeres.

1. Introducción

1.1 Células gliales del Sistema Nervioso Central

Se considera que las células más importantes que componen el sistema nervioso central (SNC) son las neuronas y las células gliales, de cuya interacción dinámica depende la homeostasis tisular, la plasticidad sináptica y la respuesta adaptativa frente a estímulos externos e internos¹⁻⁴.

Si bien históricamente se las consideraba como simples “células de soporte” (Figura 1), las células gliales cumplen funciones esenciales desde las primeras etapas del desarrollo: regulan el equilibrio iónico y metabólico, modulan la neurotransmisión, eliminan detritos celulares, coordinan las respuestas inmunes locales y participan activamente en los mecanismos de defensa y reparación tras una lesión. En particular, algunos autores proponen que los astrocitos y microglía constituyen los ejes principales de la comunicación neuroinmune y del mantenimiento del microambiente neuronal^{7, 8}.

Los astrocitos son células multifuncionales de la macroglía central que, además de proveer soporte metabólico, controlan la captación de glutamato y otros neurotransmisores, participan en la angiogénesis y forman parte de la unidad neurovascular². La microglía, en cambio, actúa como célula inmunitaria residente del SNC pues monitorea el entorno mediante receptores de reconocimiento de patrones, responde a alteraciones homeostáticas y elimina células dañadas por fagocitosis^{3, 4}. Se hará énfasis en estos dos tipos celulares, ya que los oligodendrocitos, responsables de la síntesis de mielina de los axones centrales, parecen desempeñar papeles menos activos en el daño al SNC, aunque su vulnerabilidad podría ser incluso mayor a la de las neuronas⁹.

1.2 Respuesta astrocitaria y microglial al daño neural

En condiciones fisiológicas, los astrocitos y microglía interactúan de manera cooperativa. Sin embargo, frente a distintas condiciones de daño, el diálogo entre ellas se altera, lo que contribuye a la adquisición de fenotipos reactivos que alteran su función homeostática y potencian la neuroinflamación⁷.

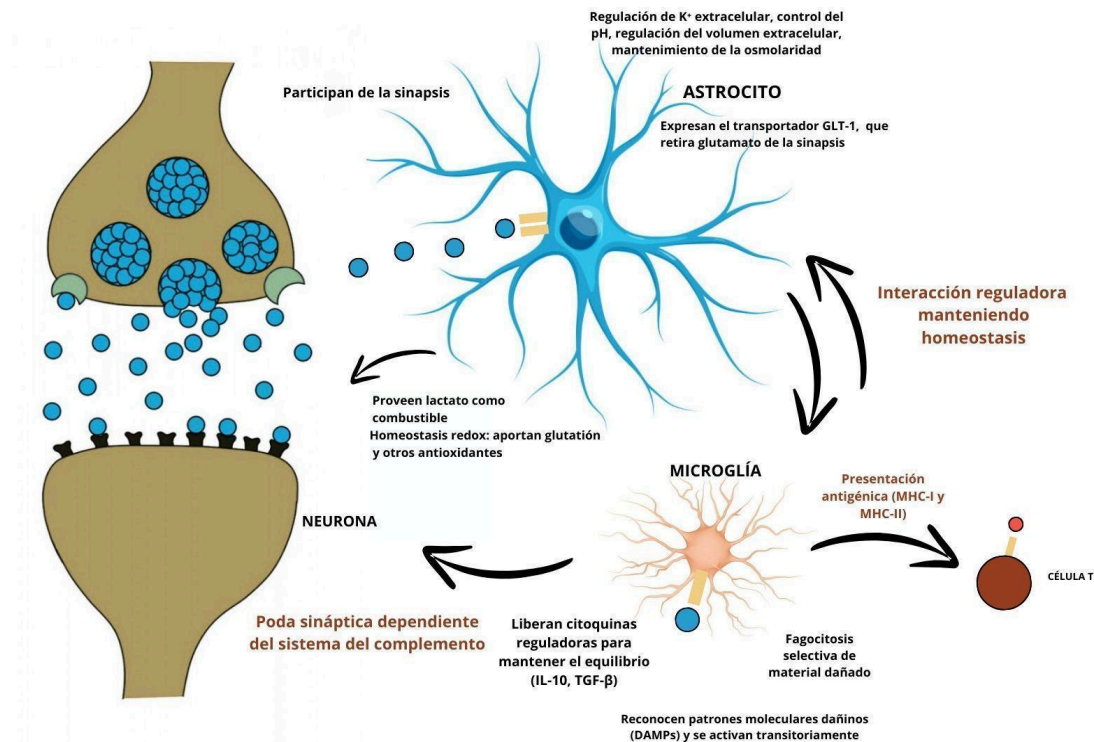


Figura 1. Papel de astrocitos y microglía en condiciones fisiológicas. El esquema representa la interacción funcional entre neuronas, astrocitos y microglía dentro del SNC, destacando los mecanismos esenciales de comunicación y mantenimiento de la homeostasis cerebral.

Ejemplo de este diálogo continuo entre las células gliales son los hallazgos que muestran que señales derivadas de la microglía activan astrocitos, como, por ejemplo, la interleuquina-1 alfa (IL-1 α), una citoquina proinflamatoria que regula respuestas inflamatorias y puede modular la actividad y supervivencia neuronal y glial; el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es otra citoquina proinflamatoria liberada por la microglía que resulta clave en la señalización inmune, así como el componente 1q del complemento (C1q) que inicia la vía clásica de activación inmune⁸. Todos estos mediadores pueden inducir en los astrocitos un fenotipo A1 que es proinflamatorio y se caracteriza por la pérdida de funciones tróficas y el aumento de la citotoxicidad¹⁰. Contrariamente, la inhibición de las vías dependientes de estos factores microgliales, favorece un perfil astrocitario A2 que es neuroprotector y está implicado en la reparación y la resolución de la inflamación^{8, 10} (Figura 2).

A su vez, los astrocitos, a través de mediadores solubles o a través de interacciones célula-célula son capaces de regular los fenotipos y las funciones microgliales desde la motilidad hasta la fagocitosis⁸.

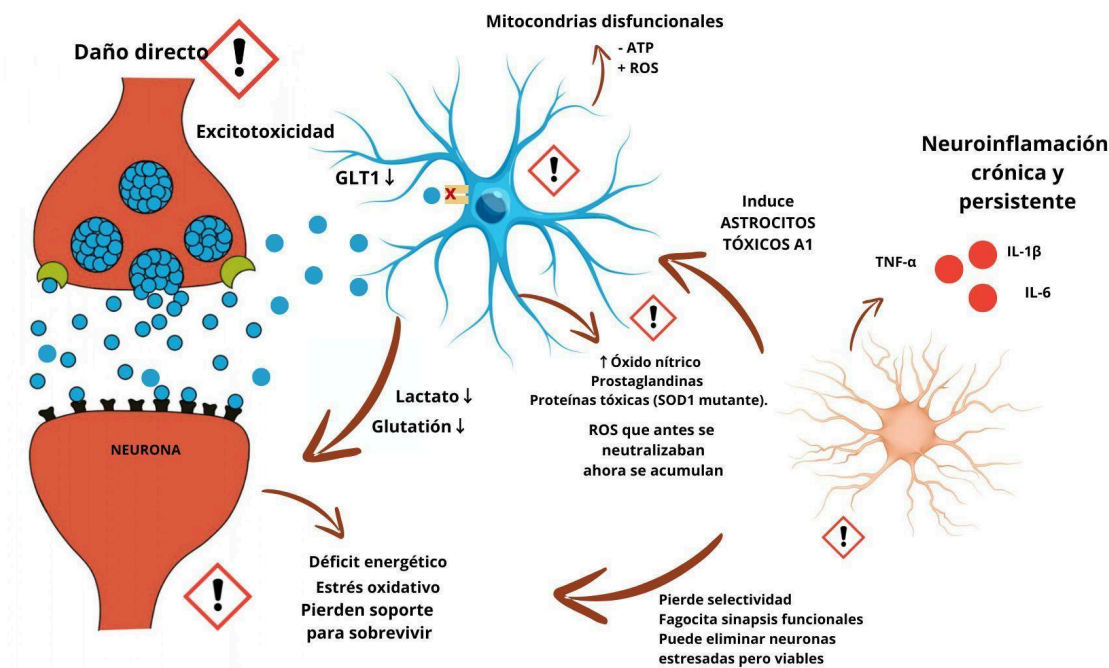


Figura 2. Alteraciones de las funciones tróficas de los astrocitos y microglía en condiciones de daño y sus posibles efectos negativos sobre la viabilidad de las neuronas. El esquema muestra como señales solubles liberadas por la microglía reactiva pueden favorecer la expresión de astrocitos A1 tóxicos.

Además, la activación de los estados gliales como los fenotipos A1 y A2 astrocitarios o la microglía reactiva no depende únicamente de señales inmunológicas, sino también del microambiente lesionado en el que estas células se encuentran. Entre los factores que moldean este microambiente, el estrés oxidativo ocupa un lugar central, ya que promueve tanto la activación microglial como cambios fenotípicos en los astrocitos⁸.

1.2.1 Daño oxidativo

Como se observa en la Figura 2, el estrés oxidativo surge por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o nitrógeno (RNS) y la capacidad antioxidante del sistema para neutralizarlas. Esta incapacidad se vuelve progresiva y favorece el daño molecular y la disfunción celular sostenida. Ello lleva a proponer que el estrés oxidativo es uno de los mecanismos patológicos más relevantes en el daño al SNC¹¹.

En condiciones fisiológicas, niveles moderados de ROS y RNS cumplen funciones esenciales en la señalización, plasticidad sináptica, regulación vascular e inmunidad¹¹. Sin embargo, cuando su producción aumenta o los mecanismos antioxidantes se ven comprometidos, estos compuestos altamente reactivos desencadenan procesos que pueden resultar particularmente perjudiciales¹¹.

La susceptibilidad al daño oxidativo es especialmente marcada en el SNC, debido a su elevada demanda metabólica, su alto consumo de oxígeno, la abundancia de lípidos poliinsaturados susceptibles a peroxidación y la relativa debilidad de sus sistemas endógenos de detoxificación¹¹. Como consecuencia, el exceso de ROS/RNS puede producir peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y daño al ADN, afectando la integridad estructural y funcional de las neuronas y de las células gliales. Este daño primario repercute de forma directa sobre las mitocondrias, que al volverse disfuncionales

no solo reducen la producción de ATP, sino que se convierten en fuentes adicionales de radicales libres, amplificando el círculo vicioso del estrés oxidativo¹¹. Asimismo, el aumento de ROS/RNS activa a los astrocitos y microglía, que adoptan fenotipos reactivos y liberan citoquinas proinflamatorias (Figura 2).

Por otra parte, el estrés oxidativo sostenido en el SNC activa una serie de programas celulares destinados a limitar el daño y a restaurar la homeostasis redox. Entre estos mecanismos, la vía Nrf2–ARE es uno de los ejes principales de la respuesta antioxidante. Bajo condiciones fisiológicas, Nrf2 se mantiene retenido en el citosol por su represor Keap1. El aumento de ROS permite la liberación y translocación nuclear de Nrf2, que se une a una secuencia reguladora específica del ADN denominada elementos de respuesta antioxidante (ARE en inglés). Esta unión induce la expresión de genes antioxidantes y protectores como superóxido dismutasa 1, catalasa, glutatión-S-transferasas que permiten ampliar la capacidad celular para neutralizar los radicales libres y reparar las moléculas dañadas¹¹ (Figura 3).

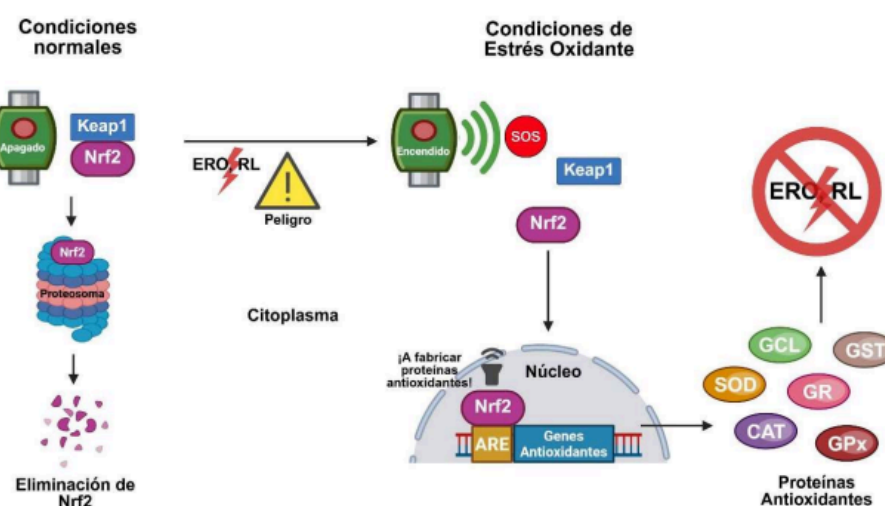


Figura 3. Activación de la vía Nrf2 bajo condiciones fisiológicas y de estrés oxidativo. El esquema muestra cómo ante un aumento de ROS/RNS, Nrf2 se libera de KEAP1, se estabiliza y migra al núcleo, donde induce la expresión de genes antioxidantes que refuerzan la defensa celular (figura 2 de Molina et al. 2025¹²).

La activación de Nrf2 tiene un impacto crítico en la glía ya que, en astrocitos, este programa es inducible y fortalece la estabilidad mitocondrial y sostiene rutas metabólicas esenciales para la síntesis de antioxidantes, en particular del glutatión, considerado el principal amortiguador redox del SNC. Los astrocitos poseen una elevada capacidad para sintetizar glutatión lo que permite, no solo proteger su propia viabilidad frente al estrés oxidativo, sino además suministrar glutatión a las neuronas, cuya capacidad de síntesis es muy limitada, lo que las hace especialmente dependientes del soporte astrocitario (Figura 1)^{2, 11}.

Si el daño oxidativo es sostenido, la respuesta inflamatoria central será sostenida en el tiempo y contribuirá además a la ruptura de la barrera hematoencefálica¹¹. Ello favorecerá el ingreso de células inmunes periféricas al SNC potenciando aún más el ambiente prooxidante e inflamatorio¹¹. A nivel neuronal, estos procesos generan la activación de vías apoptóticas y la pérdida progresiva de la viabilidad celular.

Además, el estrés oxidativo facilita la acumulación de proteínas mal plegadas y de agregados proteicos diversos que promueven una neurotoxicidad adicional¹¹.

Estas alteraciones representan un punto común entre las enfermedades neurodegenerativas crónicas y las lesiones agudas del SNC, donde el estrés oxidativo cumple un rol en el daño inicial y en la progresión degenerativa secundaria. Por lo tanto, el desequilibrio redox no es solo un iniciador de daño sino un mediador de la neurodegeneración, capaz de generar inflamación, disfunción mitocondrial, pérdida neuronal y alteraciones en la homeostasis glial¹¹. En otras palabras, la cascada de daño iniciada por un desequilibrio redox que se mantiene lleva a la coexistencia de daño oxidativo, inflamación y disfunción mitocondrial, donde la respuesta de la glía adquiere un papel central.

1.2.2 Daño mecánico

El traumatismo craneoencefálico y el traumatismo medular son causas principales de morbilidad, discapacidad y mortalidad en todas las edades¹³ y una de las causas más recurrentes asociadas a enfermedades neurodegenerativas¹⁴.

Los daños inmediatos que ocasionan dependen del tamaño, la velocidad, la ruta y la fuerza del cuerpo externo que impacta sobre el SNC pudiendo llevar a la deformación del cerebro o la médula, creando una lesión generalizada en la sustancia gris y la blanca, lo que provoca muerte neuronal, lesión axonal, el compromiso de la barrera hematoencefálica, vasoespasmo y edema¹⁵.

La disfunción de la barrera hematoencefálica permite la invasión de leucocitos al parénquima lesionado¹⁶. Los leucocitos, la microglía y los astrocitos reactivos producen ROS y moléculas inflamatorias que contribuyen a la desmielinización y la alteración del citoesqueleto axonal, lo que provoca edema y acumulación de proteínas en las terminales axonales, lo que desembocará en neurodegeneración¹⁶. Además, la excitotoxicidad activará a los receptores de glutamato que permiten la entrada de calcio que fomenta la producción de ROS¹⁴. Estos mecanismos se retroalimentan progresando a daños secundarios retardados y prolongados que pueden ser permanentes. En los mismos, la reacción de las células gliales es preponderante¹⁷.

1.3 Reactividad astrocitaria y microglial

Si bien programas adaptativos como la activación de la vía Nrf2–ARE antes mencionada buscan restaurar la homeostasis celular y sistémica, la persistencia del estrés oxidativo y del ambiente proinflamatorio puede impulsar cambios profundos en el fenotipo astrocitario. De este modo, la reactividad astrocitaria constituye una respuesta común frente a múltiples formas de daño en el SNC, y se manifiesta a través de cambios morfológicos, moleculares y funcionales². Según Maragakis y Rothstein (2006)², la reactividad astrocitaria no es un estado uniforme, sino un continuo de fenotipos que varía según el tipo de daño, la intensidad del estímulo y el contexto celular.

Entre los rasgos centrales descriptos en la reactividad astrocitaria se destaca la emisión de procesos celulares engrosados y en los estados más dañinos, la hipertrofia del cuerpo celular con disminución de los procesos celulares, el aumento de la expresión de GFAP y otras proteínas del citoesqueleto, así como modificaciones en la comunicación intercelular, alteraciones en el transporte de glutamato y cambios en la capacidad antioxidante del astrocito⁵. Estos cambios se observan de forma consistente a lo largo de enfermedades

neurodegenerativas como Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) y enfermedades de Alzheimer, Huntington y Parkinson^{1,2}.

Existen varios fenotipos de astrocitos reactivos, que pueden ser neuroprotectores (A2) o neurotóxicos (A1) u otros intermedios. Algunos estados como el A2 son principalmente beneficiosos, ya que exhiben funciones neuroprotectoras mediante liberación de glutatión, contención de radicales libres y apoyo metabólico, su función principal es preservar la homeostasis y limitar la progresión del daño⁸. Sin embargo, hay también astrocitos reactivos (A1) que se caracterizan por la pérdida de funciones esenciales o por la adquisición de propiedades tóxicas como la disminución del transportador GLT-1⁹ que conduce a excitotoxicidad y la acumulación de proteínas mutadas o mal plegadas dentro del astrocito, como SOD1 en la ELA^{2,6,8}.

En general se considera que el resultado final de la reactividad astrocitaria, dada la coexistencia de fenotipos que divergen entre sí, puede inclinarse hacia la neuroprotección o la neurotoxicidad dependiendo del tipo de daño, la señalización del mismo que se active o reprima y fundamentalmente del entorno en el cual ocurre¹.

En cuanto a las células de la microglía, éstas constituyen la principal población inmunitaria residente del sistema nervioso central^{3,4}. Ante estímulos tales como daño tisular, infección, estrés metabólico o alteraciones en la actividad neuronal, la microglía transita desde un estado denominado “vigilante” o ramificado hacia estados reactivos caracterizados por profundos cambios morfológicos, funcionales y moleculares¹⁸. Si bien hasta hace un tiempo, se consideraban dos estados de la microglía: el “M1” resultante de la activación clásica, considerado proinflamatorio y neurotóxico y el “M2”, considerado antiinflamatorio y neuroprotector^{3,4}. Sin embargo, la evidencia reciente muestra que la respuesta de las células microgliales es mucho más amplia que esos dos estados, por lo que la clasificación ha caído en desuso^{3,4}.

No obstante, entre las características fenotípicas que se observan frente a la reactividad microglial se observa la retracción de los procesos celulares, el aumento del volumen celular y la activación de programas transcripcionales que regulan procesos como la fagocitosis, la presentación de antígenos y la producción de mediadores solubles, incluyendo citoquinas, quimioquinas y especies reactivas¹⁸.

De forma similar a los astrocitos, en condiciones fisiológicas o de daño agudo, la reactividad microglial puede ejercer funciones protectoras, contribuyendo a la eliminación de los detritos celulares, la resolución de la inflamación y la restauración de la homeostasis¹⁸. Sin embargo, cuando esta respuesta se vuelve persistente o desregulada, la microglía reactiva puede adquirir propiedades perjudiciales para el tejido nervioso, favoreciendo la inflamación crónica y alterando la función neuronal y glial^{3,4}. La respuesta de la microglía frente al daño, también depende del microambiente donde se produce. De este modo, la reactividad microglial se reconoce actualmente como un proceso altamente plástico y contexto dependiente, clave para comprender tanto la respuesta del sistema nervioso y como los mecanismos que subyacen a múltiples patologías neurológicas¹⁸.

Llamativamente, en las enfermedades del SNC asociadas a edad avanzada, ninguno de los mecanismos patológicos mencionados puede explicar por sí solos estas enfermedades. Más bien, el interjuego entre varios de ellos parece ser una de las características más comunes entre las enfermedades neurodegenerativas paradigmáticas⁸.

Además, uno de los hallazgos más relevantes refiere a que el microambiente de daño es una variable muy importante al momento de evaluar los efectos de las células gliales en dicho daño. Es así que la evidencia muestra que factores tales como el estado redox del entorno y la edad celular son factores determinantes en la función glial, incluso fuera del contexto estrictamente patológico¹².

1.4 Esclerosis Lateral Amiotrófica

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida progresiva de las motoneuronas superiores e inferiores, lo que conduce a debilidad muscular, parálisis y finalmente insuficiencia respiratoria. Aunque puede manifestarse con variabilidad clínica, su curso es típicamente rápido, con una supervivencia media de 1 a 5 años desde el inicio de los síntomas. La mayoría de los casos son esporádicos ($\approx 90\text{--}95\%$), mientras que un $5\text{--}10\%$ corresponde a formas familiares asociadas a mutaciones en genes como SOD1, TDP-43, FUS, entre otros^{1,8}.

En la investigación de Hardiman et al. (2017)¹⁹, estos autores proponen que la presentación clínica de la ELA suele ser insidiosa, con síntomas iniciales que incluyen debilidad focal, fasciculaciones o alteraciones bulbares, y que luego se extienden de manera regional conforme avanza la enfermedad. Según describen, la ELA afecta predominantemente a individuos entre la quinta y séptima década de la vida, con una predominancia masculina, y exhibe una notable heterogeneidad en su curso clínico, velocidad de progresión y patrones de inicio¹⁹.

A nivel diagnóstico, la ausencia de biomarcadores específicos y la superposición con otros trastornos del espectro motor continúan dificultando una identificación temprana, lo que contribuye a retrasos frecuentes en el diagnóstico. A pesar de los avances en la comprensión de su fisiopatología, la enfermedad sigue siendo fatal y las opciones terapéuticas actuales solo logran una ralentización modesta de la progresión, evidenciando la necesidad de continuar profundizando en sus bases biológicas y en los múltiples factores que condicionan su evolución¹⁹.

Más allá de la degeneración neuronal, hoy se reconoce que la ELA es un trastorno multicelular, donde las células gliales cumplen un papel esencial tanto en la neuroprotección como en la propagación del daño⁸. Diversos estudios postmortem y modelos experimentales han demostrado que astrocitos y microglía presentan alteraciones tempranas, incluso antes de la pérdida evidente de motoneuronas¹⁹.

Por lo tanto, aunque tradicionalmente el estudio de las enfermedades neurodegenerativas se ha centrado en la neurona como principal blanco de estudio, la evidencia actual señala que comprender las alteraciones tempranas de las células gliales es fundamental para descifrar los mecanismos iniciales del daño y anticipar la progresión patológica.

Las alteraciones de las células gliales en la ELA comprenden reactividad glial, disfunción metabólica, alteraciones en el manejo del glutamato, estrés oxidativo y neuroinflamación, todas contribuciones que amplifican la vulnerabilidad de las motoneuronas en lugar de protegerlas (figura 3)^{2, 6, 8}.

En conjunto, la evidencia actual posiciona a la ELA no solo como una enfermedad de las motoneuronas, sino como una patología sistémica del microambiente neural, en la cual la glía, lejos de tener un rol secundario, desempeña un rol preponderante en el inicio, la amplificación y la dirección de la degeneración neuronal. Este marco conceptual es fundamental para comprender la complejidad de la enfermedad y para orientar estrategias terapéuticas dirigidas no solo a las motoneuronas, sino también a los astrocitos y la microglía^{1-4, 8}.

1.4.1 Papel de la mutación SOD1 en ELA

Las mutaciones en el gen que codifica la enzima SOD1 representan una de las primeras y mejor caracterizadas causas genéticas de la ELA y han sido fundamentales para comprender los mecanismos moleculares que subyacen a la enfermedad²⁰.

SOD1 es una enzima citosólica ampliamente expresada cuya función fisiológica consiste en catalizar la dismutación del radical superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno, contribuyendo a la protección celular frente al estrés oxidativo²⁰. Sin embargo, las mutaciones asociadas a ELA no producen la enfermedad por una simple pérdida de función enzimática, sino que confieren a la proteína propiedades tóxicas adquiridas, conocidas como mecanismos de ganancia de función. Estas incluyen una mayor propensión al mal plegamiento y agregación proteica, alteraciones en la homeostasis redox, interacciones aberrantes con componentes celulares y disrupción de múltiples procesos intracelulares²⁰.

La identificación de mutaciones dominantes en SOD1 en pacientes con ELA familiar estableció un vínculo directo entre la toxicidad proteica y la degeneración selectiva de las motoneuronas, sentando las bases para el desarrollo de modelos animales transgénicos que reproducen rasgos clave de la enfermedad^{8, 20}.

Un aspecto central de la contribución glial a la progresión de la ELA, es la toxicidad directa de los astrocitos portadores de mutaciones en SOD1, como es el caso de SOD1G93A, uno de los modelos preclínicos más utilizados y mejor caracterizados. En la investigación de Cassina et al. (2008)²¹, demostraron que los astrocitos SOD1G93A presentan disfunción mitocondrial severa, en la que tienen una disminución del consumo de oxígeno, pérdida del control respiratorio y una producción aumentada de superóxido y daño nitrooxidativo en proteínas mitocondriales. Por lo tanto, en cultivos mixtos de astrocitos y motoneuronas estos astrocitos reducen un 50% la supervivencia de motoneuronas²¹. El pretratamiento de estos astrocitos con antioxidantes dirigidos a la mitocondria o inhibidores de NOS, restaura la supervivencia de las motoneuronas a niveles comparables a los controles, demostrando que el estrés oxidativo mitocondrial de los astrocitos es suficiente para inducir neurotoxicidad y es por ende un componente crítico para el proceso degenerativo²¹.

Asimismo, en estudios anteriores, demostraron que en animales terminales del modelo experimental de ELA SOD1G93A en ratas se pueden aislar células gliales aberrantes que presentan la mayor toxicidad hacia las motoneuronas espinales, perdieron marcadores de diferenciación, adoptaron características de células menos diferenciadas y tienen una respuesta funcional alterada²²⁻²⁵. Además, aumentan su número en paralelo a la progresión de la enfermedad, por lo que se ha postulado que podrían tener un rol relevante en la progresión de la misma²⁶.

Sin embargo, la ELA, como enfermedad multifactorial que es, no puede explicarse por una variable o factor y para complejizar aún más el contexto de la enfermedad, la evidencia obtenida sugiere que el sexo de los pacientes con ELA puede influenciar el comienzo y progresión de la enfermedad²⁷.

1.4.2 Papel de las células gliales en ELA

En la ELA, las células gliales desempeñan un rol central en la progresión de la degeneración de las motoneuronas a través de mecanismos interdependientes que comprometen la homeostasis del microambiente neuronal¹. Dentro de este marco, los astrocitos adquieren especial relevancia, ya que su identidad y funciones se establecen mediante programas de desarrollo finamente regulados que determinan su diversidad regional y su capacidad de sostener la maduración y el mantenimiento de circuitos neuronales¹.

En condiciones fisiológicas, los astrocitos contribuyen a la supervivencia neuronal a través del soporte metabólico, la regulación del microambiente iónico y la modulación de la neurotransmisión, particularmente mediante el control de la concentración de glutamato en las sinapsis¹. Además, secretan factores neurotróficos y participan activamente en el mantenimiento de la arquitectura sináptica, favoreciendo la estabilidad funcional de las redes neuronales¹ (figura 4).

En la ELA, sin embargo, los astrocitos sufren transformaciones fenotípicas que resultan en una pérdida de sus funciones homeostáticas y en la adquisición de propiedades deletéreas. En particular, se ha descrito una reducción en la capacidad de recaptación de glutamato, lo que favorece un microambiente excitotóxico que incrementa la vulnerabilidad de las motoneuronas^{6, 8}. De manera complementaria, los astrocitos asociados a ELA pueden secretar mediadores solubles neurotóxicos y proinflamatorios, contribuyendo de forma activa a la progresión de la degeneración motoneuronal⁸.

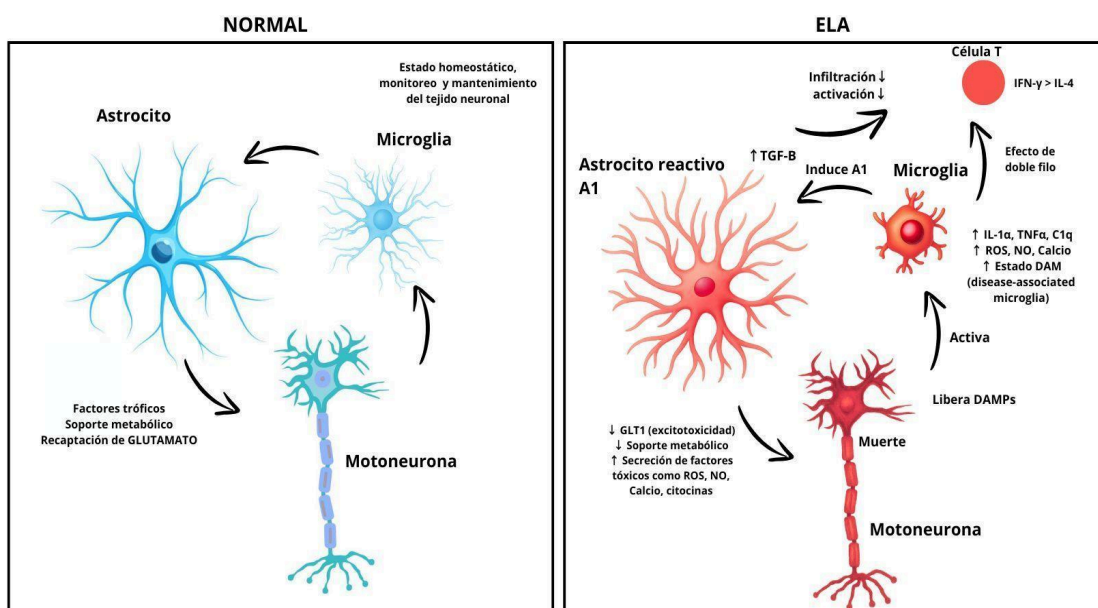


Figura 4. Funciones multidimensionales de las células gliales en la ELA. En condiciones normales (izquierda), los astrocitos sanos proporcionan factores neurotróficos, apoyo metabólico, controlan la concentración de glutamato en las sinapsis. En la ELA (derecha), los astrocitos pierden su función homeostática y no logran mantener la salud de las motoneuronas y secretan factores tóxicos que inducen su muerte. Las interacciones entre los astrocitos, la microglía y los linfocitos T están implicadas en la neurodegeneración. (Modificada de Yamanaka et al. 2018⁸).

La microglía también participa de manera determinante en este proceso. Si bien puede adoptar funciones neuroprotectoras en fases iniciales, con la progresión de la ELA tiende a un estado proinflamatorio que amplifica el daño mediante la liberación de citocinas y especies reactivas, promoviendo un entorno inflamatorio persistente^{6, 8}. En este escenario, la interacción patológica entre microglía y astrocitos fortalece el perfil neurotóxico del microambiente y acelera la degeneración neuronal^{6, 8}.

En conjunto, estas transformaciones convierten a astrocitos y microglía en fuentes activas de neurotoxicidad, promoviendo un microambiente excitotóxico e inflamatorio que acelera la vulnerabilidad y muerte de las motoneuronas^{6, 8}. Asimismo, la disfunción glial afecta la comunicación con el sistema inmunitario periférico: la alteración de la interacción con linfocitos T puede asociarse con la pérdida de señales neuroprotectoras, contribuyendo a un ambiente aún más desfavorable para las motoneuronas⁶.

Por otro lado, las motoneuronas dañadas liberan señales de peligro que perpetúan la activación glial, estableciendo un circuito de retroalimentación patológica que constituye uno de los mecanismos clave en la progresión de la ELA^{1, 6, 8}. Este bucle entre degeneración neuronal y activación glial sostiene el avance de la enfermedad y posiciona a las células gliales, especialmente a los astrocitos, como blancos terapéuticos emergentes en el diseño de estrategias para ralentizar la progresión de la ELA⁶.

1.4.3 Daño mecánico en ELA

Aunque clásicamente se considera que la ELA no es una enfermedad de origen traumático, su progresión se caracteriza por un estado crónico de daño tisular en el sistema nervioso central, en el que coexisten degeneración axonal, pérdida progresiva de motoneuronas, neuroinflamación persistente y alteraciones del microambiente glial⁸.

Sin embargo, la literatura más reciente muestra que podría haber una relación entre el traumatismo craneoencefálico o de la médula espinal con un mayor riesgo de ELA. En este sentido se ha identificado mayor riesgo de sufrir la enfermedad en personas propensas a sufrir traumatismo craneoencefálico (jugadores de fútbol, de fútbol americano y veteranos militares)^{28, 29}.

A nivel celular, el daño mecánico activa vías moleculares compartidas con la neurodegeneración crónica, incluyendo estrés oxidativo, desregulación del calcio intracelular, activación de rutas inflamatorias y remodelado del citoesqueleto, procesos que se encuentran alterados en astrocitos y microglía en modelos de ELA asociados a mutaciones en SOD1^{8, 30}.

El daño mecánico también parece inducir fenotipos patológicos latentes que resultan críticos bajo situaciones de estrés³¹.

1.4.4 Dimorfismo sexual en ELA

A pesar de que durante décadas la investigación en neurociencias se centró casi exclusivamente en modelos experimentales que empleaban animales machos, ha quedado en evidencia que el SNC de machos y hembras no es equivalente: presenta dimorfismos en su organización, actividad neuronal y regulación molecular.

Varios estudios previos evidenciaron que el dimorfismo sexual en el SNC se presenta a nivel estructural, funcional y molecular asociado a genes ligados al sexo (X/Y) o a hormonas gonadales, lo que influye en la incidencia y evolución de enfermedades neurodegenerativas^{10, 11, 33-35}. Se ha demostrado por ejemplo que los estrógenos, tienen efectos antioxidantes y antiapoptóticos, que potencian la activación de Nrf2 y limitan la producción de citocinas proinflamatorias. Mientras que, por otro lado, los andrógenos tienden a favorecer respuestas microgliales prooxidantes²⁶.

En la Figura 4, se resumen las principales diferencias sexo-específicas en la ELA. En varones (figura parte izquierda), se observa con mayor frecuencia un inicio espinal, progresión más rápida, niveles aumentados de TDP-43 en el líquido encéfalo raquídeo, peor deterioro respiratorio, un perfil metabólico desfavorable y posibles efectos perjudiciales de los andrógenos³³.

En contraste, las mujeres (figura parte derecha) con ELA tienden a presentar inicio bulbar más frecuente, una barrera hematoencefálica menos permeable y patrones transcriptómicos asociados a procesos inflamatorios y apoptóticos, además de un efecto neuroprotector atribuido a hormonas sexuales femeninas³³.

En el medio, se destacan las áreas donde las diferencias por sexo aún no han sido estudiadas, que incluyen función neurovascular, inmunidad periférica, metabolismo y propiedades musculares, señalando la importancia de profundizar en estudios que permitan entender el dimorfismo sexual y cómo el mismo influye en la evolución de la enfermedad³³.

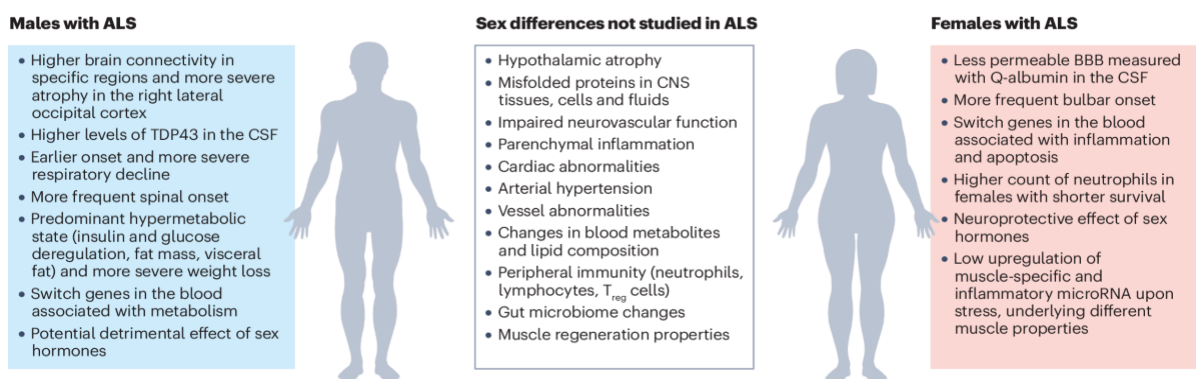


Figura 5. Dimorfismo sexual en la ELA: características clínicas y biológicas. A la izquierda, se muestran las características más frecuentes en varones con ELA. Al centro, se listan aspectos donde las diferencias por sexo aún no han sido investigadas. A la derecha, se resumen las características más comunes en mujeres con ELA (tomada de Jacob-Nguyen et al. 2024³⁴).

El dimorfismo sexual en la ELA no se observa únicamente en las diferencias clínicas o metabólicas, sino que también se manifiesta en las células gliales, afectando la forma en que astrocitos y microglía responden al daño neurodegenerativo³³.

En modelos SOD1G93A se ha demostrado que los astrocitos y microglía expresan de manera diferencial los receptores de esteroides sexuales, lo que modula tanto su reactividad como su perfil inflamatorio. En hembras, los astrocitos muestran una mayor expresión de receptores estrogénicos y enzimas relacionadas con el metabolismo glucocorticoide, lo cual favorece un fenotipo más antiinflamatorio, antioxidante y neuroprotector; en machos, en cambio, se observa una menor señalización estrogénica y una reducción temprana del receptor androgénico en motoneuronas, asociada a una glía más vulnerable y proclive a perfiles prooxidantes y proinflamatorios^{34, 35}.

Datos recientes refuerzan esta visión, Christoforidou et al. (2024)³⁵ demostró que la mutación altera de manera sexo-específica los microRNAs extracelulares liberados por microglía, moduladores claves de la comunicación glía-neurona. Los machos presentan un aumento de miRNAs asociados a inflamación, estrés oxidativo y muerte neuronal, mientras que las hembras muestran un perfil menos proinflamatorio y más regulado, coherente con un microambiente glial relativamente más protector. En resumen, revelan que las hormonas sexuales y la señalización dependiente del sexo moldean profundamente el comportamiento de astrocitos y microglía, contribuyendo a las diferencias sexo-específicas observadas en la incidencia, progresión y fenotipo de la ELA^{34, 35}.

En resumen, la ELA es una enfermedad multifactorial resultante de la coexistencia de mecanismos de daño comunes a otras enfermedades neurodegenerativas, donde astrocitos y microglía parecen desempeñar un papel relevante en la progresión de la enfermedad, la que a su vez, parece estar influida además por el sexo de los pacientes.

Sin embargo, aún se desconoce mayormente, la influencia del sexo en la respuesta de las células gliales al daño y como ello podría repercutir en la sobrevivencia neuronal. El trabajo propuesto en esta tesis, tiende a contribuir al conocimiento de la respuesta de la glía mixta proveniente de ratas machos y hembras del modelo preclínico de ELA SOD1G93A.

2. Hipótesis

En el modelo experimental de ELA SOD1G93A en rata, el genotipo y el sexo influyen en la respuesta de astrocitos y microglía frente al daño oxidativo y mecánico.

3. Objetivos

Objetivo general: Conocer si el genotipo y/o el sexo afectan la respuesta al daño oxidativo y/o mecánico de células gliales en cultivo.

Objetivos específicos:

1- Validar el paradigma experimental a emplear en cultivos primarios en la línea celular glial C6.

2- Análisis de la respuesta al daño oxidativo y/o mecánico de cultivos primarios de neonatos de diferente genotipo (SOD1G93A y controles) y sexo.

4 Estrategia experimental

Antes de ejecutar los objetivos se recibió formación específica para trabajar en condiciones de esterilidad y con cultivos celulares. Este entrenamiento inicial incluyó fundamentos teóricos y buenas prácticas en cultivos celulares, abarcando el manejo en cuartos y cabinas de cultivo, mantenimiento de condiciones estériles y aplicación de técnica aséptica. Durante este período se aprendió el manejo de la línea C6 de glioma de rata³⁹ que fue empleada para establecer el paradigma experimental. Este entrenamiento duró 3 semanas y estuvo bajo la responsabilidad de la tutora de tesis.

Luego se determinaron las condiciones experimentales en lo referente a concentración de peróxido de hidrógeno y duración total del experimento en células C6 de glioma de rata³⁹. Ello se debió a la cantidad de condiciones experimentales previstas para ejecutar los objetivos específicos, principalmente el objetivo específico 2.

La ejecución del objetivo específico 1 se realizó en células C6 que fueron expuestas a peróxido de hidrógeno (H_2O_2)³⁶ durante 1 o 48 horas. Luego, con el valor de concentración de H_2O_2 de trabajo determinado, se realizó el ensayo de rayado (o scratch en inglés) que consiste en el barrido manual de las células con una punta amarilla estéril¹². Este ensayo se utiliza ampliamente como modelo in vitro para simular la lesión mecánica y las respuestas celulares subsiguientes (p. ej., migración, proliferación, formación de cicatrices) que se producen tras un traumatismo craneoencefálico o espinal³⁷. La creación de un espacio libre de células en una monocapa confluyente de células cerebrales cultivadas imita algunos aspectos del daño traumático primario y permite estudiar los procesos biológicos posteriores (inflamación, migración y proliferación celular entre otros).

Luego de cada tratamiento, las células se mantuvieron en cultivo hasta 48 horas, para conocer si la superficie que quedó libre de células podría volver a ser cubierta por células migrantes o proliferantes.

Para realizar el objetivo específico 2, se realizaron cultivos de glía mixta de médula espinal de ratas machos y hembras neonatas SOD1G93A transgénicas (Tg) y de sus controles no transgénicos (No Tg), en forma simultánea. Luego de llegar a confluencia, las células se expusieron a H_2O_2 con o sin realización de rayado, en las mismas condiciones experimentales que el objetivo 1.

Así, las 16 condiciones experimentales analizadas para el objetivo específico 2 fueron las siguientes:

	Control	H ₂ O ₂	Rayado	H ₂ O ₂ /Rayado
Macho No Tg	+	+	+	+
Hembra No Tg	+	+	+	+
Macho Tg	+	+	+	+
Hembra Tg	+	+	+	+

Luego de cada tratamiento tanto en el Objetivo específico 1 como en el 2, las células fueron precipitadas con ácido tricloroacético (TCA) y teñidas con SRB. Se tomaron imágenes en microscopio de luz y microscopía confocal para análisis morfológico y finalmente se determinó la absorbancia óptica por espectrofotometría. Los datos se parametrizaron respecto del control sin tratamientos.

5. Materiales y métodos

5.1. Aspectos éticos

Todas las prácticas y procedimientos empleados en esta tesis, incluyendo el manejo de animales, fueron aprobados por el Comité de Ética en el Uso de Animales del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (CEUA-IIBCE). El manejo de animales fue realizado por integrantes del grupo que tienen certificación CHEA o CNEA o personal del bioterio del IIBCE.

5.2 Manejo de animales y formación de harenes

Todos los animales empleados en esta tesis se mantuvieron en el bioterio del IIBCE bajo condiciones estables de temperatura y ciclo luz/oscuridad (22±1; 12 horas luz/oscuridad) y acceso a alimento y agua *ad libitum*.

Para realizar los harenes se utilizaron ratas Sprague Dawley provenientes del bioterio del IIBCE o de la Unidad de Reactivos Biológicos de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina. En cada harén se empleó un macho transgénico (Tg) portador de la mutación dominante SOD1G93A y dos hembras no transgénicas (NoTg). Una vez identificadas, las hembras preñadas fueron alojadas individualmente hasta el momento del parto. Tras el nacimiento y luego de la limpieza y primera alimentación de la madre, se determinó el número y sexo de las crías.

5.3. Marcado y genotipado de los animales

El día del nacimiento, las crías empleadas en cultivo fueron marcadas y genotipadas según Vargas et al. (2006)³⁸, con modificaciones menores. La marca se realizó mediante una inyección subcutánea de tinta china en diferentes partes del cuerpo para asegurar el marcado específico y único de cada cría.

Para la obtención de ADN genómico, se limpió el extremo de la cola de cada animal con etanol al 70% y se realizaron cortes de 2-3 mm con bisturí estéril. Las muestras fueron recogidas en 200 µl de buffer GNTK que es una solución de digestión compuesta por 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 8.5, 0,01% gelatina, 0,45% Nonidet P-40, 0,45% Tween-20 y luego se adicionaron 100 µg/ml de proteinasa K. Las mezclas fueron incubadas a 56 °C en termobloque durante 6 horas y luego la enzima fue inactivada a 95 °C durante 15 minutos. El genotipado se realizó mediante PCR de tiempo final utilizando el kit Mango Mix 2X, que contiene ADN polimerasa MangoTaq, MgCl₂ y dNTP ultrapuros (Meridian Bioscience), mezcla de primers (10 µM) y 1 µl del lisado de cola de cada cría.

Los primers utilizados fueron:

Forward: 5'-GTGGCATCAGCCCTAATCCA-3'

Reverse: 5'-CACCAAGTGTGCGGCCAATGA-3'

El programa de PCR consistió en los siguientes pasos: activación inicial de la Taq polimerasa (95 °C, 2 min), 35 ciclos de desnaturalización (95 °C, 30 s), hibridación (60 °C, 30 s), elongación (72 °C, 30 s) y elongación final a 72 °C durante 5 minutos. Los productos amplificados se separaron en gel de agarosa al 1% y corrida electroforética a 100 V durante 30 minutos y fueron visualizados en el lector de geles iBright™ CL1500 (ThermoFisher).

5.4. Manejo y cultivo de células C6

Se plaquearon células C6³⁹ a una densidad de 50000 células/cm² en placas de pocillos múltiples y se mantuvieron en DMEM-alta glucosa (Capricorn) suplementado con 5% de suero fetal bovino (Capricorn) y 1% de antibiótico/antimicótico (Capricorn). Al llegar a confluencia, las células se pusieron en DMEM-2% FBS y se trataron durante 1 o 48 h con 100 mM de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)⁴⁰. El ensayo de rayado consistió en el barrido manual de las células con una punta amarilla estéril¹⁰. Finalizados los tratamientos de daño mecánico y estrés oxidativo, las células fueron sometidas a análisis de viabilidad celular mediante el ensayo de Sulforrodamina B (SRB), así como a estudios morfológicos y de adquisición de imágenes. Estos procedimientos fueron realizados de manera equivalente a los aplicados en cultivos primarios y se describen en detalle en las secciones siguientes.

5.5. Preparación de los cultivos primarios

Los cultivos primarios⁴¹ se obtuvieron a partir de crías recién nacidas (una macho y una hembra de cada genotipo) que fueron procesadas en forma secuencial (primero los no transgénicos y luego los transgénicos) el mismo día. En forma breve, cada animal fue sanitizado con agua destilada y con etanol 70% y luego fue decapitado con tijera. Se extrajo el cerebro para otros estudios y la parte lumbar de la columna vertebral, limpiándose toda la parte muscular visible y cortando las aponeurosis de las vértebras. La columna vertebral limpia fue sumergida en solución salina tamponada estéril (PBS, 10 mM, pH 7.4), se cortaron las vértebras lateralmente y se disecó la médula espinal lumbar. La misma se pasó a otra placa de Petri con PBS estéril para retirar las meninges cuidadosamente y bajo lupa. El tejido obtenido fue cortado en trozos de 2-3 mm y fue incubado con tripsina-EDTA 0,05% durante 25 minutos en baño de agua a 37 °C. Al cabo de ese tiempo, la enzima fue bloqueada con DMEM-10% FBS y el tejido fue disgregado por

pipeteo repetido. La suspensión celular se filtró en tamiz de 80 μm , se recolectó en tubos estériles y se centrifugó 10 minutos a 1000 rpm. El pellet obtenido fue resuspendido en 1 ml de medio fresco, las células se contaron en CellDrop (DeNovix) y se sembraron 1×10^6 células en 5 ml de DMEM-10% FBS en botellas de cultivo de 25 cm^2 .

5.5.1. Mantenimiento y siembra de cultivos

Los cultivos fueron mantenidos en estufas de cultivo a 37 °C con 5% de CO_2 , cambiando todo el volumen de medio cada 48 horas. Al alcanzar confluencia las células fueron lavadas con PBS, tripsinizadas con tripsina-EDTA 0.05% durante 7–10 minutos a 37 °C en estufa de cultivo y con botella cerrada. Luego, la tripsina fue bloqueada con medio completo, la suspensión celular homogeneizada por pipeteo repetido sin burbujas y centrifugada a 1000 rpm por 10 minutos. El pellet fue resuspendido, las células contadas, y se sembraron a una densidad de $2,8\text{--}3 \times 10^4$ células/ cm^2 . Los cultivos fueron mantenidos hasta alcanzar confluencia, momento en el que se cambió el medio a uno con 2% de FBS durante 24 horas antes de la realización de los tratamientos.

5.6. Inducción de daño

5.6.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se indujo mediante tratamiento con peróxido de hidrógeno (H_2O_2)⁴² a una concentración de 100 mM durante 1 hora o 48 horas⁴⁰.

5.6.2. Daño mecánico

El daño mecánico^{41,43} consistió en la realización de una raya con una punta de pipeta estéril amarilla en aproximadamente la mitad del cultivo (marcando previamente el área a dañar en la base del pocillo y del lado de afuera). Posteriormente, se reemplazó el medio para retirar detritos y se analizaron los cultivos 48 horas después¹⁰.

Este ensayo se utiliza ampliamente como modelo in vitro para simular la lesión mecánica y las respuestas celulares subsiguientes (p. ej., migración, proliferación, formación de cicatrices) que se producen tras un traumatismo craneoencefálico o espinal. Es un método de alto rendimiento, sencillo y económico para la investigación inicial y el cribado de fármacos.

La creación de un espacio libre de células en una monocapa confluyente de células cerebrales cultivadas imita aspectos del daño primario y permite estudiar los procesos biológicos posteriores incluyendo inflamación, migración y proliferación celular o cambios en la expresión génica

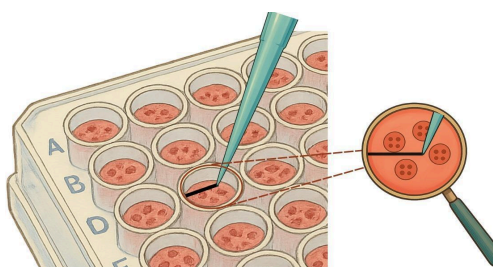
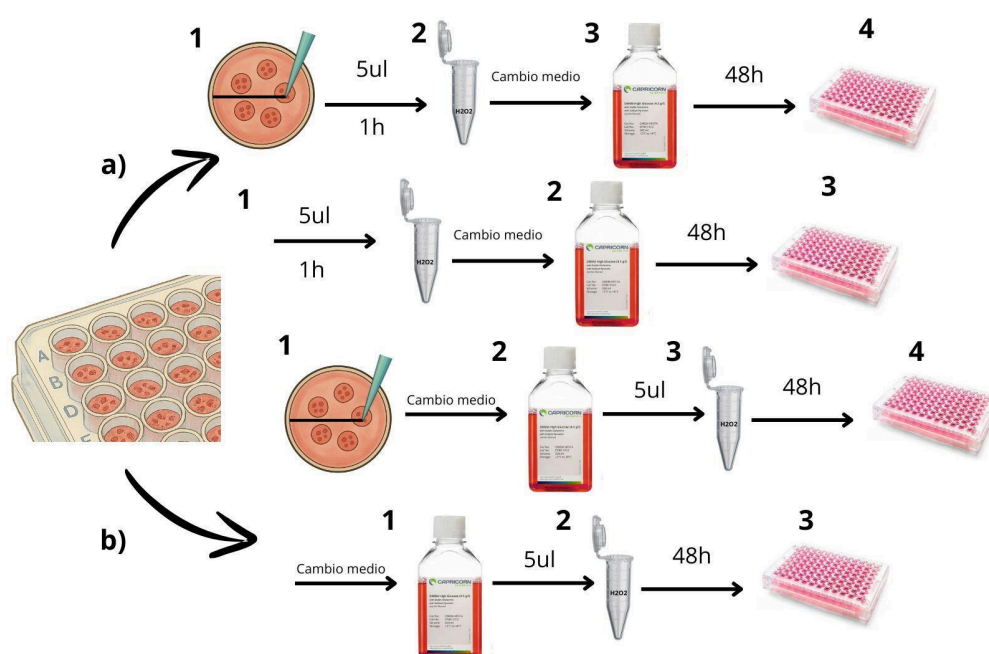
A**B**

Figura 6 A. Daño mecánico inducido por la realización de una raya en el cultivo efectuado con una punta de pipeta estéril. B. Inducción de estrés oxidativo mediante adición de H_2O_2 : a) tratamiento de 1h y b) tratamiento con 48hs con peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En el primer caso, luego del rayado se adicionó H_2O_2 durante 1 hora y luego se cambió el medio, procesándose las placas a las 47 horas siguientes. En b) se realizó el rayado, se cambió el medio y se adicionó H_2O_2 por 48 horas.

5.7. Ensayo de Sulforrodamina B (SRB)

Como ensayo de viabilidad celular, se utilizó el método de la Sulforrodamina B (SRB)⁴⁴, ensayo permite obtener una medida indirecta de la cantidad de células viables ya que cuantifica la masa proteica celular que permanece adherida a un sustrato luego de ser fijada y precipitada con ácido tricloroacético (TCA) y teñida con SRB⁴⁴. La cantidad de proteína celular adherida es proporcional a la densidad de las células que permanecen

adheridas al sustrato y la SRB se une a los residuos proteicos básicos⁴⁴. Este ensayo no depende de la actividad metabólica celular, lo que elimina las interferencias debidas a variaciones en la actividad mitocondrial que están presentes en situaciones de daño y esta ventaja lo convierte en un método de elección para estudios de citotoxicidad. Además, en comparación con otros ensayos de viabilidad celulares, es de alta sensibilidad, estabilidad y de bajo costo. En forma llamativa, la SRB puede observarse mediante microscopía de luz y microscopía fluorescente (emisión roja), además de ser posible de ser medida espectrofotométricamente al disolverla en Tris 10 mM, pH 8.5⁴⁴.

Protocolo empleado:

Las células de todas las condiciones experimentales fueron fijadas añadiendo ¼ de volumen de medio de cultivo de TCA al 10% y luego fueron incubadas durante 1 hora a 4 °C. Tras varios lavados con agua destilada para retirar el TCA remanente, las células se secaron al aire durante 24 h al menos y luego se incubaron con SRB al 0,05% durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se lavaron, se dejaron secar y se visualizaron al microscopio confocal empleando un láser que emite en rojo (excitación: 555 nm; emisión: 600 nm) y la herramienta ESID para ver las imágenes de luz en tonos de grises.

Luego de todo el análisis morfológico, a cada pocillo se agregó 120 µl de buffer Tris (10 mM, pH 10) y tras la disolución completa del colorante, se midió la absorbancia a 490 y 510 nm en espectrofotómetro Varioskan. Los valores se expresaron como porcentaje respecto al macho no transgénico control. Las medidas no se realizaron en el máximo de absorbancia de SRB (565-570 nm) para asegurar linealidad en la medida⁴⁹. Los valores de todas las condiciones experimentales se expresaron como porcentaje del macho no transgénico control.

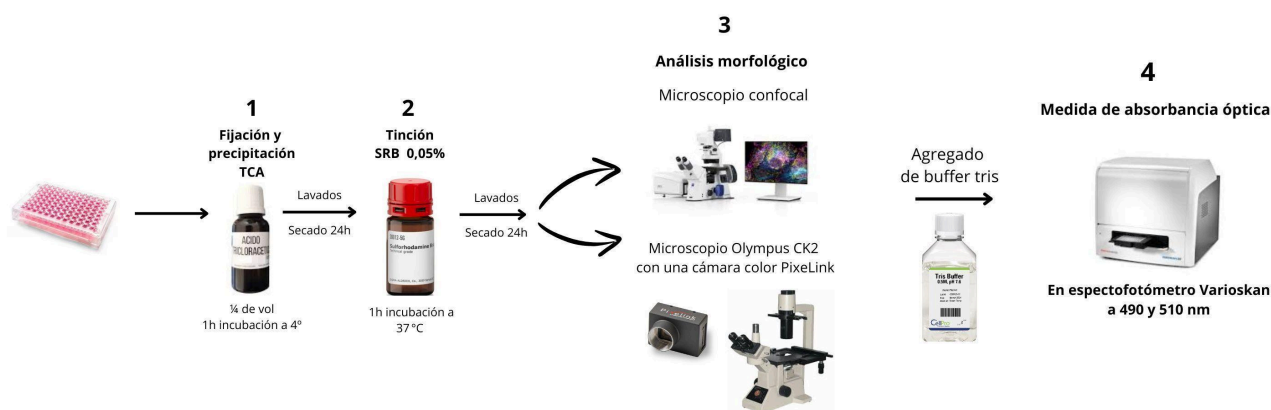


Figura 7. Ensayo de SRB

El esquema superior muestra los pasos a realizar para realizar el ensayo, mientras que las fotos de luz y de fluorescencia muestran la información que ambos métodos pueden proporcionar.

5.8. Obtención y análisis de imágenes

Para identificar la morfología y el linaje de las células gliales (en función de sus características morfológicas más recientes) se tomaron imágenes en un microscopio Olympus CK2 invertido con una cámara color PixeLink a una resolución de 1200 x 1300 dpi.

Las imágenes de fluorescencia fueron obtenidas con un microscopio confocal invertido Zeiss LSM 800, a 1200 dpi de resolución, velocidad de captura 5-7 y promediando 2 capturas por imágenes. Se tomaron fotos de entre 5 y 8 campos por condición experimental, manteniendo constantes los parámetros de adquisición en todas las condiciones.

El procesamiento y análisis de las imágenes se realizó con el software ImageJ/Fiji que es capaz de abrir las fotos con formato Zeiss, seleccionándose los siguientes parámetros a evaluar¹⁰:

- Densidad celular (células/mm²): se determina el número de células mediante la herramienta Contador Celular que permite seleccionar todas las células seleccionadas a mano y dividir por la superficie luego de realizar la conversión previa de unidades de μm^2 a mm^2 , donde $1 \text{ mm}^2 = 1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$;

- Porcentaje de células con morfología clara de microglía: este valor fue obtenido al dividir el número de células con apariencia de microglías entre el total de las células contadas;

- Área relativa de rayado: este parámetro expresa el porcentaje del área de rayado respecto del área total del cultivo a las 48 horas de realizado el rayado;

- Porcentaje de células presentes en el rayado relativo al total de células en cada condición experimental.

Además del análisis cuantitativo de densidad y distribución, se realizó un análisis morfológico de las células en cada condición experimental. Este incluyó la evaluación del tamaño, forma y propiedades estructurales de las células gliales en las distintas condiciones experimentales.

5.9. Análisis estadístico

Se realizaron al menos tres experimentos independientes para cada condición experimental, manteniendo constantes los parámetros de cultivo con el fin de asegurar la homogeneidad y comparabilidad de los datos. En cada experimento se analizaron entre cinco y siete réplicas por condición experimental, tanto para la línea celular C6 como para los cultivos primarios.

Los datos se expresaron como media \pm desvío estándar. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software GraphPad Prism 8. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre dos grupos independientes mediante el test t de Student no apareado y bilateral, dado que las hipótesis evaluadas correspondieron a comparaciones dirigidas y

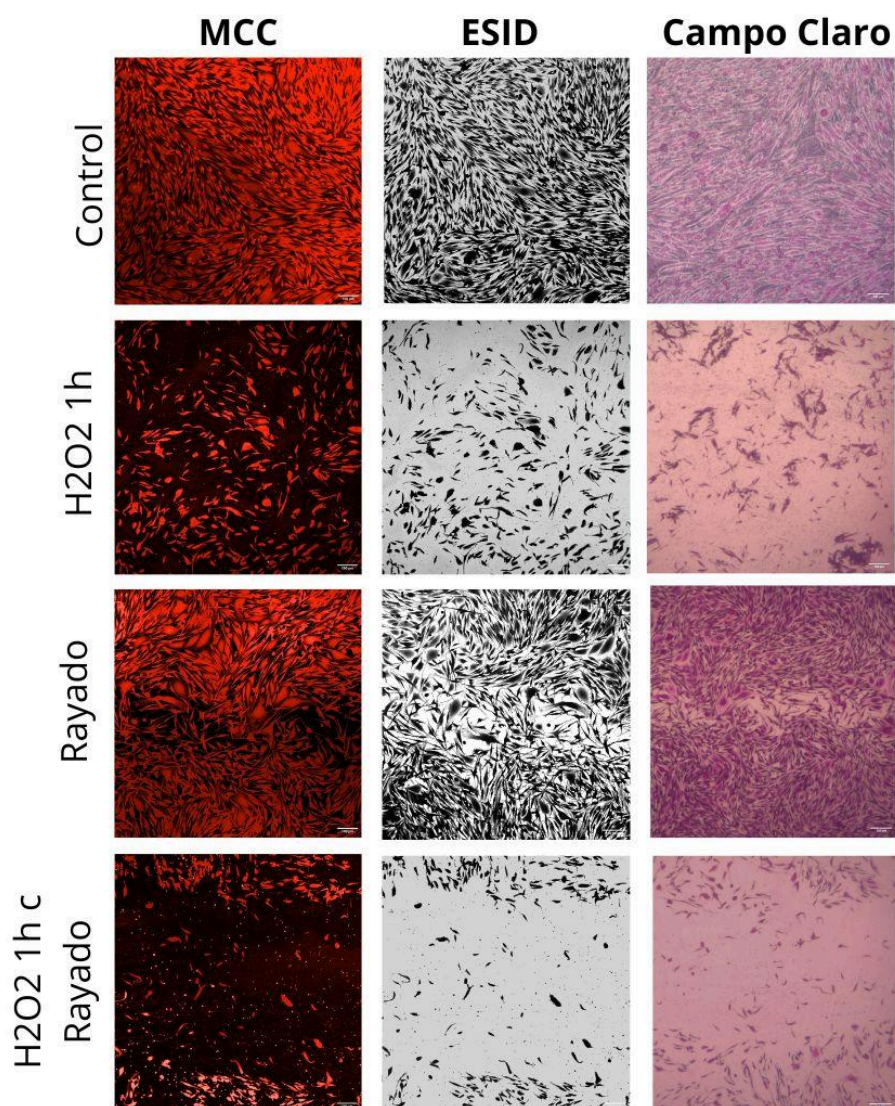
planificadas a priori entre pares específicos de condiciones experimentales (por ejemplo, control vs tratamiento dentro de un mismo sexo y genotipo, o comparaciones entre sexos o genotipos bajo una misma condición experimental).

Dado el tamaño muestral y la complejidad del diseño experimental, no se realizó un análisis multifactorial, ya que éste hubiera reducido la potencia estadística para detectar diferencias biológicamente relevantes. En aquellos casos en que no se asumió igualdad de varianzas, se aplicó la corrección de Welch. Se consideró significancia estadística para valores de $p < 0,05$.

6. Resultados y discusión

6.1. RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 1

A



B

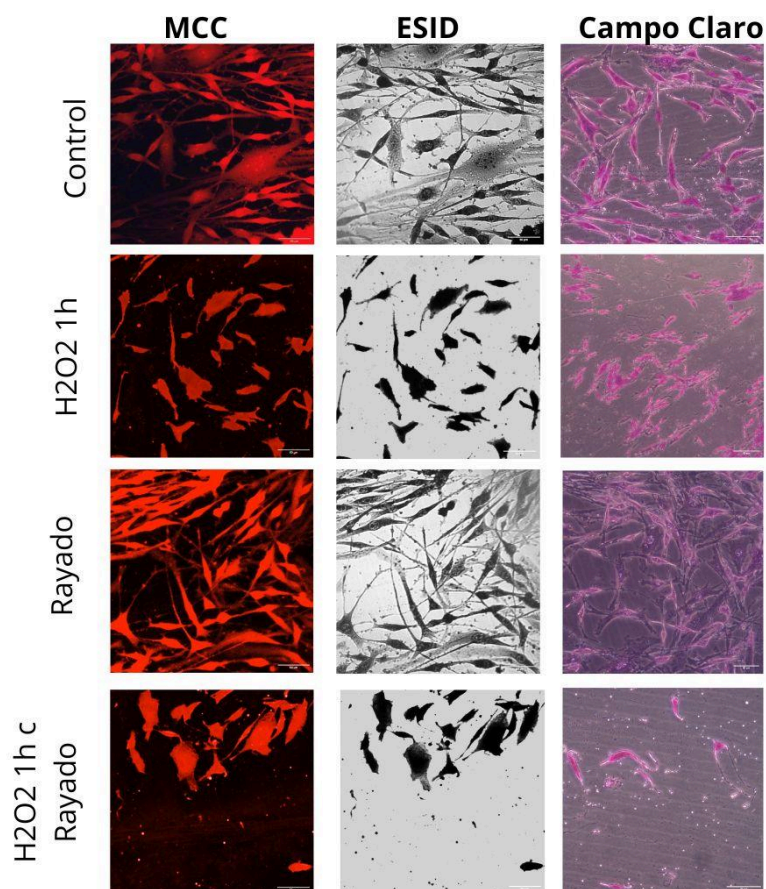


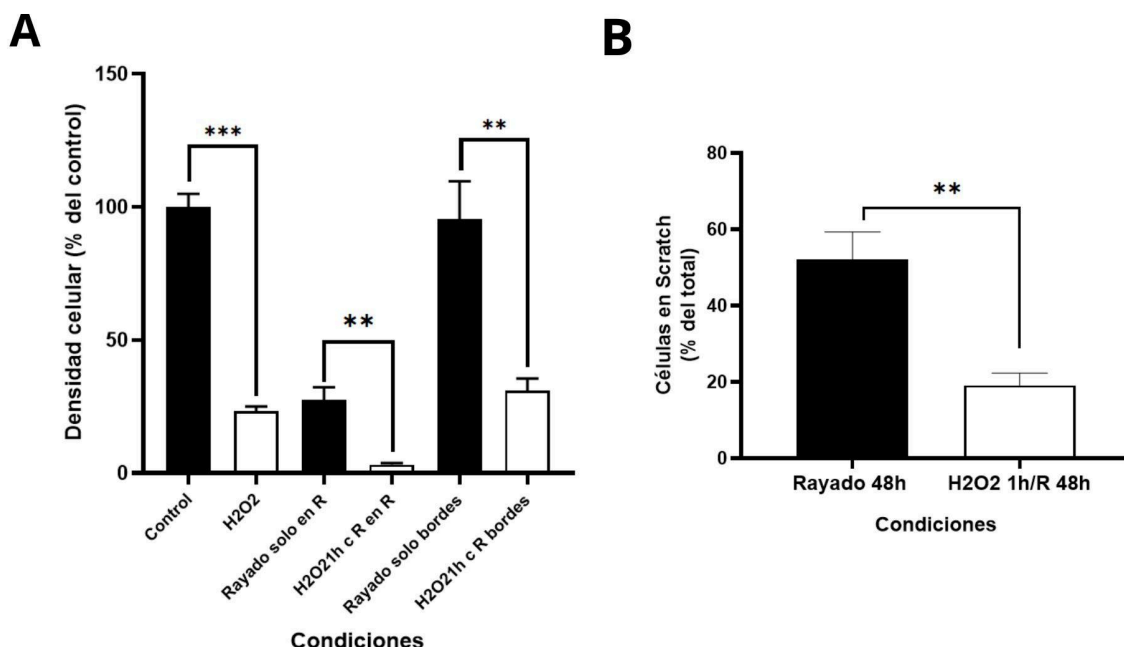
Figura 8. Análisis morfológico de la respuesta de células C6 a estrés oxidativo y/o daño mecánico. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal y desde el microscopio invertido con cámara digital Pixelink a bajo aumento (A, 5x) y aumento mayor (B, 20x) de las células en todas las condiciones experimentales. **A:** Imágenes panorámicas de los resultados obtenidos al tratar cultivos confluentes de células C6 con H_2O_2 , con rayado o ambas condiciones de daño. Grado de magnificación: 5x. **B:** Las mismas imágenes de A tomadas a mayor aumento para observar la morfología celular en las distintas condiciones experimentales. Aumento: 20x.

Las imágenes panorámicas de la figura 8A muestran que en condiciones control, las células C6 están confluentes, viables y presentan un citoesqueleto rico en proteínas tal como se observa luego de la tinción con la SRB, que se une a las proteínas que permanecen adheridas al sustrato luego de la precipitación con ácido tricloroacético. La exposición de 1 h a H_2O_2 fue suficiente para producir la muerte masiva y generalizada en todo el cultivo celular y la respuesta al daño mecánico muestra que 48 horas luego del mismo solo hay escasos lugares libre de células, indicando que las mismas son capaces de recuperarse del daño mecánico, no así del daño oxidativo. En acuerdo con esta posibilidad, cuando coexisten estrés oxidativo y daño mecánico, el área celular permanece mucho más grande que la observada en el daño mecánico solamente, las células no muestran indicios de recuperación y hay gran cantidad de detritos celulares que se tiñen con SRB, indicando un efecto cooperativo muy importante entre los dos estímulos de daño.

Las imágenes de la figura 8B muestran la morfología de las células luego de los distintos tratamientos. El efecto citotóxico del H_2O_2 se evidenció a nivel morfológico con pérdida de la apariencia característica, observándose células con retracción de los procesos celulares, algunas con formas redondeadas y con una especie de festoneado en la membrana. También se observó una alteración evidente del citoesqueleto, que aparece mucho más intensamente teñido con SRB (imágenes ESID).

Al observar las imágenes con la cámara PixeLink (que es una cámara color), se ve que luego del tratamiento con H_2O_2 , la SRB se concentra en el soma y los procesos celulares están alterados y no se tiñen, indicando escasa presencia de proteínas en los mismos. Además, las escasas células que se identifican aparecen como despegándose del sustrato, lo que podría sugerir efectos sobre la interacción matriz extracelular y sustrato. Aunque resta confirmar, estos datos podrían explicarse por los efectos del peróxido de hidrógeno sobre la “degradación de la cromatina de orden superior” que es la ruptura de los bucles de cromatina nuclear en los puntos de unión a la matriz. Además de ser un sello distintivo de la muerte celular programada, esta respuesta desmantela eficazmente el genoma y, por lo tanto, conduce irreversiblemente a la muerte celular⁴⁵.

En condiciones de daño mecánico (comparados con el control), las células presentan más procesos y aparecen con un tamaño promedio mayor. A 20x se muestra cómo las células extendieron prolongaciones hacia el centro del área lesionada, reorganizando activamente su citoesqueleto para avanzar y cerrar la herida. Esta respuesta obtenida a las 48 horas, podría confirmar que la duración del diseño experimental realizado es adecuada para analizar la respuesta celular frente al daño mecánico.



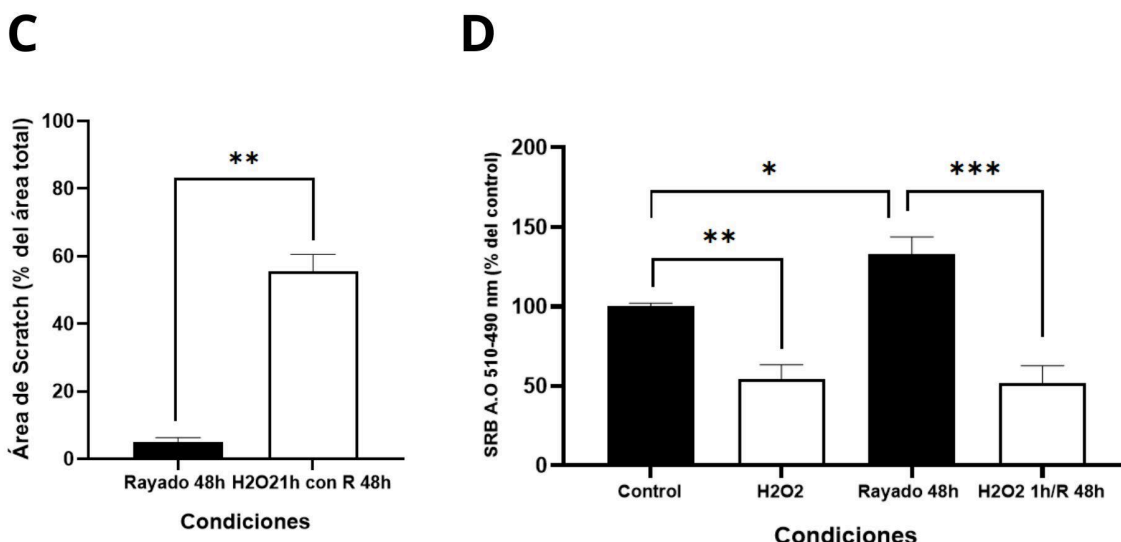


Figura 9. Análisis cuantitativo de la respuesta de las células C6 al daño oxidativo y mecánico. A: Densidad celular (células/mm²) en las distintas condiciones experimentales expresadas como porcentaje del control: control, H₂O₂, dentro del rayado y en los bordes del rayado, con y sin exposición a H₂O₂. Nótese la disminución de la densidad celular en todas las condiciones experimentales donde el H₂O₂ está presente. **B:** Número de células presentes dentro del rayado respecto del porcentaje de células totales en el control (tomado como 100%). **C:** Área del rayado expresada respecto del área total del cultivo tomada a 5x (1.6mm²). **D:** Gráfica de absorbancia de la SRB a 510 nm expresada como porcentaje del control (100%). Los datos presentados corresponden a 2 experimentos independientes, cada uno con 7-9 réplicas por cada condición en cada experimento. Los datos se expresan como media \pm DE. Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas por $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****) entre condiciones experimentales y $p < 0,05$ (#) entre sexos y genotipo. Las comparaciones se efectuaron entre dos grupos independientes mediante el test t de Student no apareado, bilateral.

Al analizar los valores obtenidos en las condiciones combinadas de rayado solo y H₂O₂ 1h con rayado (Figura 9A, B), se observa que la exposición al peróxido de hidrógeno disminuyó de forma considerable la capacidad de repoblación del área lesionada, y consecuentemente, que el área de rayado resultante fue mucho más grande en la coexposición de ambos estímulos (Figura 9C). Esto podría deberse no solo a toxicidad directa del peróxido de hidrógeno sino también a una inhibición de la capacidad proliferativa y/o migratoria de las células supervivientes como se ha reportado previamente⁴⁵.

En este sentido, es importante observar que luego del rayado solo, la densidad celular a las 48 horas es similar al control, por lo que, probablemente, las células C6 respondieron al daño mecánico proliferando y/o migrando. En respuesta al H₂O₂, las células C6 murieron en porcentaje similar (ver densidad celular en las condiciones H₂O₂ y H₂O₂ + rayado bordes, figura 9A, B), pero la coexistencia de ambos daños redujo muy significativamente la densidad celular, el número de células dentro del rayado y consecuentemente el área rayada fue significativamente más grande.

Los efectos del estrés oxidativo sobre la capacidad migratoria fueron previamente descritos para las células de glioma al analizar la morfología^{46 - 49}. El daño mecánico, activa

cascadas de señalización dependientes de Rho GTPasas, integrinas y metaloproteinasas de matriz. Dichas rutas favorecen la reorganización del citoesqueleto, la formación de lamelipodios y la degradación controlada de matriz extracelular, procesos fundamentales para el avance celular y el cierre de la herida⁴⁷⁻⁵⁰. En acuerdo con estos reportes, en la condición de rayado sin peróxido de hidrógeno, las células reaccionaron al estímulo mecánico migrando hacia el centro de la herida. Esto se reflejó en un mayor porcentaje de células dentro del área de rayado, una elevada densidad en los bordes y un área de herida menor que en la condición H_2O_2 con rayado.

La comparación entre las condiciones de daño mecánico con y sin H_2O_2 sugiere fuertemente que la capacidad migratoria depende del equilibrio redox intracelular. Mientras niveles fisiológicos de especies reactivas de oxígeno funcionan como segundos mensajeros esenciales para la señalización de migración, concentraciones elevadas producen oxidación de proteínas y deterioro de la motilidad. Este comportamiento bifásico del H_2O_2 ha sido descrito en múltiples modelos, donde un estrés oxidativo leve puede activar vías pro-migratorias, pero un exceso conduce al colapso citoesquelético y a la muerte celular⁴⁵⁻⁵⁰.

La presencia de células en el área libre de células 48 horas luego del daño mecánico, permite mostrar parte de la respuesta celular al daño mecánico. Sin embargo, con las herramientas usadas no podemos conocer si este fenómeno se debe a migración o a proliferación inducida por el estrés oxidativo. Para resolverlo sería necesario evaluar marcadores de proliferación, como Ki-67.

Otra variable a considerar para refinar el protocolo experimental aún más, es realizar el rayado y determinar el área libre de células a tiempo cero. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que debido al número muy alto de réplicas es muy difícil determinar el área a tiempo cero y la permanencia de un tiempo largo de fotografiado sería otra situación de daño a considerar. Para minimizar variaciones relacionadas con este punto, que la herida haya sido hecha por el mismo operador, de la misma forma y al mismo momento, permite decir que las áreas iniciales fueron similares en todas las condiciones experimentales.

Los resultados del análisis morfológico estuvieron respaldados por los valores de absorbancia que fueron leídos luego de disolver la SRB en buffer Tris HCl y expresar los datos como porcentajes del control (Figura 9D). Tras una hora de tratamiento y luego de 48 horas totales de cultivo, se observó una disminución significativa de la absorbancia en la condición con H_2O_2 , lo que indica una reducción de la masa proteica total y, por ende, del número de células viables. En contraste, luego de 48 horas de realizado el ensayo, la condición de rayado mostró diferencias significativas en la absorbancia respecto del control, que podrían asociarse a la respuesta proliferativa inducida por un daño mecánico en estas células.

Sin embargo, en la condición experimental H_2O_2 + rayado vs H_2O_2 (Figura 9D) no se observaron diferencias significativas en la absorbancia de SRB, sugiriendo que en las células C6, el daño mecánico no tiene gran influencia en la densidad celular total, sino más bien, en la distribución de las células respecto de la herida.

En resumen, para el objetivo 1, se aprendió a trabajar en condiciones de cultivo. Además se conoció la respuesta de la línea celular de glioma de rata C6 al estrés oxidativo en presencia y ausencia de daño mecánico. Las células C6 constituyen uno de los modelos más utilizados para el estudio de procesos relacionados con proliferación, invasión y

migración celular. Se ha demostrado que las C6 presentan una gran tasa proliferativa, gran plasticidad fenotípica y un marcado comportamiento migratorio e invasivo, características que las convierten en un control positivo ideal para estudios de migración⁵². Además, estas células expresan de forma aumentada múltiples genes asociados a adhesión, remodelación del citoesqueleto y mecanismos pro-invasivos, lo que confirma la presencia de un programa transcripcional que favorece la movilidad celular activa⁵². Al tratarse de una línea estable, homogénea y estandarizada, la variabilidad técnica y biológica se reduce considerablemente, permitiendo obtener un patrón de migración consistente y reproducible, adecuado como control positivo en ensayos de migración^{52,53}.

6.2. RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 2

Debido a la elevada cantidad de condiciones experimentales contempladas, los paradigmas de daño fueron definidos previamente en una línea celular ampliamente utilizada en neurociencias (OE 1). Luego de determinar estas condiciones, se procedió a realizar los cultivos de glía mixta de la médula espinal de neonatos transgénicos y no transgénicos del modelo preclínico de ELA en rata SOD1G93A.

El reconocimiento de los tipos celulares presentes mayoritariamente en un cultivo de glía mixta se realizó al microscopio de luz y luego el marcado con SRB. La figura 10 muestra la morfología plana, casi sin procesos celulares de los astrocitos y su citoesqueleto prominente donde se ven las llamadas líneas de estrés que corren en paralelo al eje mayor y el núcleo generalmente central con 2-4 formaciones intracelulares más oscuras. También se observa una zona perinuclear más oscura que parece corresponder a la zona de mayor concentración de mitocondrias y retículo endoplasmático (RE)²⁶. Tras la tinción con SRB, las microglías aparecen como células negras, muy condensadas, con cuerpos pequeños y con procesos celulares muy cortitos y escasos (Figura 10, células oscuras en la parte inferior).

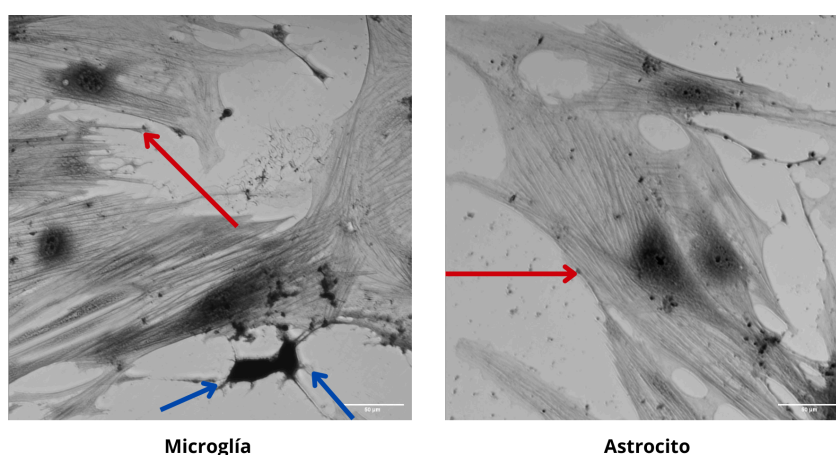


Figura 10. Reconocimiento de tipos gliales bajo microscopía de luz y en condiciones basales. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal a 20x. Los astrocitos (flechas rojas) se reconocen como células grandes de forma poliédrica con escasos procesos. Las denominadas fibras de estrés se reconocen como líneas más oscuras a lo largo del eje mayor. El núcleo es generalmente más oscuro y presenta entre dos y cuatro agregados nucleares prominentes. Las microglías (flecha azul) en cambio, se ven como células más pequeñas, mucho más oscuras y con procesos celulares escasos y cortos.

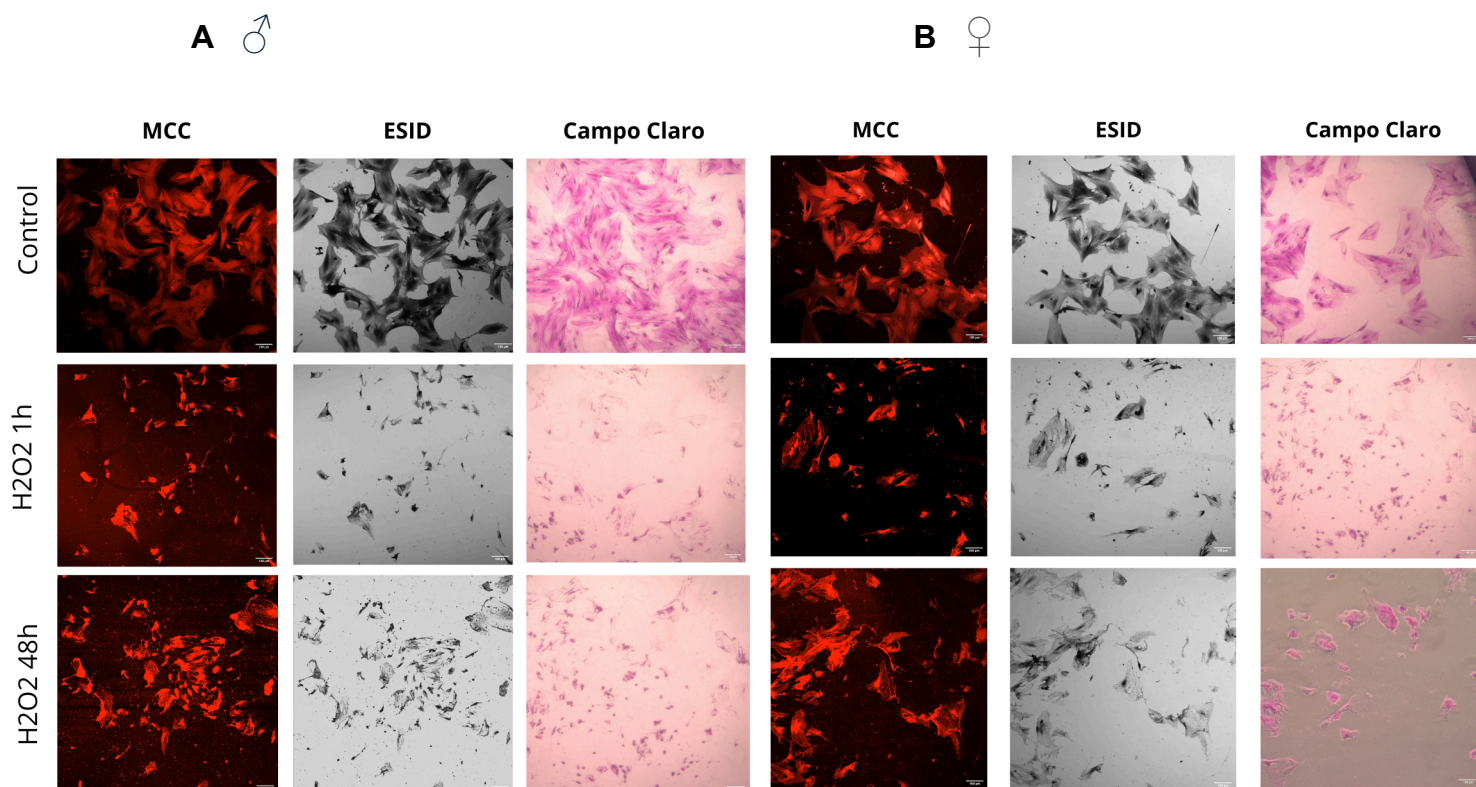


Figura 11. Efectos del estrés oxidativo agudo (1 h) y sostenido (48 h) inducido por H_2O_2 en cultivos gliales neonatales de machos (A) y hembras (B) no transgénicos. Se muestran imágenes panorámicas (5x) obtenidas por microscopía confocal (MCC), luz (ESID) y campo claro que permiten ver la señal fluorescente y visible de la SRB. Se observa la disminución de la densidad celular luego de la incubación con H_2O_2 .

En la Figura 11, las imágenes de las condiciones control, muestran una morfología similar de las células tanto en macho como en hembras e incluso un crecimiento en parches típico de los cultivos gliales primarios. La exposición a H_2O_2 produjo una disminución evidente en la densidad celular, acompañada de alteraciones morfológicas marcadas, como retracción celular, pérdida de prolongaciones y reducción en la adhesión al sustrato.

Estos cambios fueron similares tras 1 h y 48 h de exposición, lo que sugiere que el daño oxidativo inicial es lo suficientemente intenso como para generar un deterioro sostenido incluso después de retirado el oxidante. Sin embargo, se observan diferencias en el número de células entre 1h y 48 h que sugieren que el daño agudo ocasionado durante la primera hora es el más importante. Este patrón es consistente con la vida media corta del H_2O_2 que se descompone rápidamente en una solución acuosa y en forma dependiente de la temperatura⁵⁴. Por tal razón, su capacidad mayor parece ser inducir daño agudo severo e impedir las respuestas reparatorias tempranas.

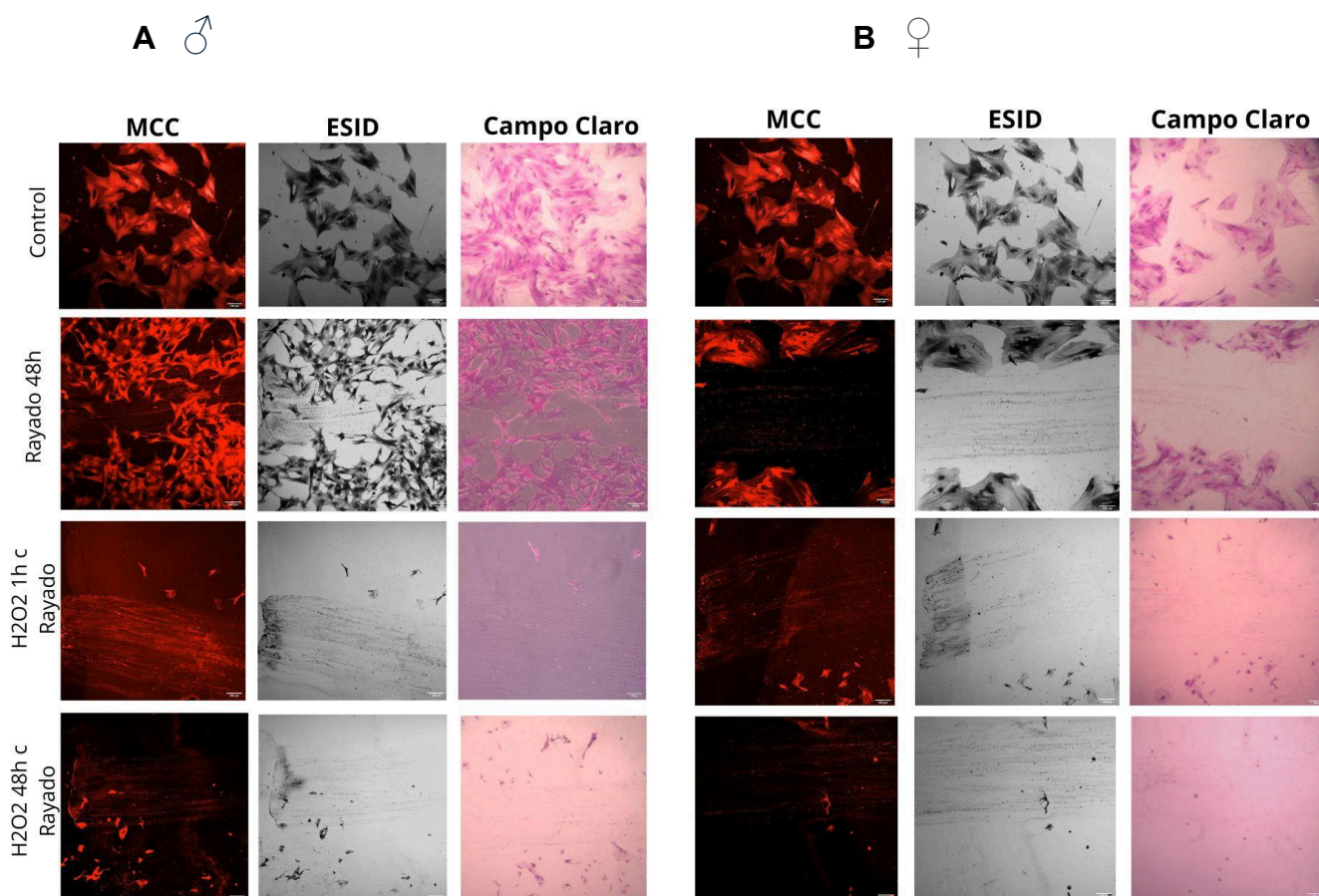


Figura 12. Efectos del daño mecánico (rayado) y del estrés oxidativo agudo y sostenido en cultivos gliales neonatales de machos (A) y hembras (B) no transgénicos. Imágenes panorámicas (5x) obtenidas por MCC, ESID y campo claro que muestran la respuesta diferente de células de machos y de hembras al daño mecánico.

Las imágenes de la primera fila de la figura 12 son las mismas que las de la figura 11, porque los experimentos se realizaron con todas las condiciones experimentales. Cuando se observa la segunda fila de la figura 12A y B muestran la respuesta de las células al rayado realizado 48 horas antes, notándose que mientras las células de los machos se estiran tratando de cerrar la herida, las de las hembras muestran una menor ocupación del área rayada en comparación con las de los machos. No obstante, las células de las hembras en el borde del rayado parecen muy similares a las de los controles, descartando al menos en parte reactividad celular significativa. Estas imágenes sugieren que, en machos, el rayado indujo cambios morfológicos moderados, manteniéndose una población celular capaz de organizar una respuesta migratoria y probablemente reparatoria. Esa capacidad de respuesta y tendencia a cubrir el área no fue observada en las células obtenidas de hembras.

La co/exposición de rayado con H_2O_2 , además de muerte significativa produjo una disminución marcada de la densidad celular dentro y fuera del rayado, junto con alteraciones morfológicas severas de las células que quedan que incluyen retracción del soma, pérdida de prolongaciones y disminución evidente de la adhesión al sustrato. El

estrés oxidativo generó un daño más rápido y profundo que el daño mecánico solo, produciendo alteraciones morfológicas severas y pérdida marcada de viabilidad celular incluso tras períodos cortos de exposición. La reducción más pronunciada observada bajo H_2O_2 sugiere que el daño oxidativo agudo compromete mecanismos tempranos de reorganización y reparación, superando la capacidad de respuesta de los cultivos gliales. Sin embargo, la magnitud del daño de ambos estímulos se asemeja mucho más al producido por H_2O_2 (Figura 11).

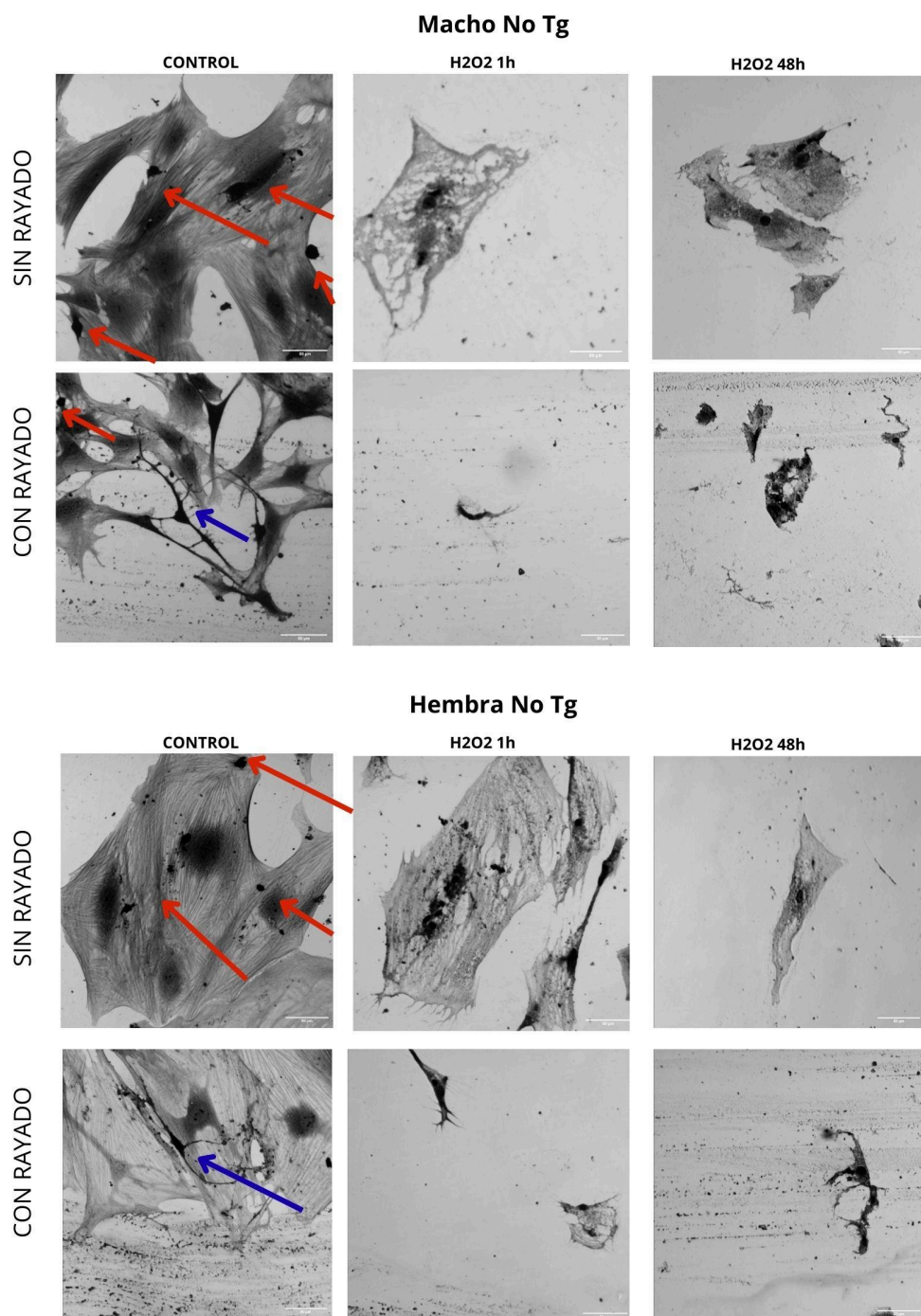


Figura 13. Cambios morfológicos inducidos por el rayado y estrés oxidativo en cultivos gliales neonatales de machos y hembras no transgénicos. Las imágenes de células teñidas con SRB fueron tomadas con ESID a 20x y muestran el deterioro producido por el estrés oxidativo agudo y la combinación de efectos negativos cuando coexisten ambos estímulos.

Las imágenes de la Figura 13, tomadas al microscopio confocal con la herramienta ESID, permiten observar a mayor aumento la morfología similar de células machos y hembras en condiciones control, con astrocitos bien extendidos, prolongaciones definidas y adhesión estable al sustrato. Es notoria la presencia de células grandes aplanadas (astrocitos) y de microglías que aparecen como células mucho más pequeñas, redondeadas e intensas cuando son coloreadas con SRB (flechas rojas).

También permiten observar cómo la incubación con H_2O_2 disrumpe el citoesqueleto de los astrocitos y dejan de apreciarse microglías en el cultivo. La exposición a H_2O_2 , tanto a 1 h como a 48 h, produjo una pérdida marcada de la morfología normal, con retracción celular, desprendimiento del sustrato y fragmentación, evidenciando una alteración profunda en la organización glial. Estas alteraciones se observaron de forma consistente en ambos sexos, indicando que el estrés oxidativo agudo compromete la estructura celular más allá de las diferencias propias del sexo. A 48 h, las células expuestas a H_2O_2 mostraron morfologías aún más deterioradas.

La fila inferior de imágenes de la Figura 13 muestra la morfología de las células en las distintas condiciones experimentales luego de realizar el rayado, dentro del mismo. En las imágenes de la izquierda (machos) se observa claramente que las células se alargan para tratar de cubrir el área rayada que aparece como un barrido horizontal y que algunas adoptan la apariencia de astrocitos reactivos (flecha azul), es decir emisión significativa de procesos celulares y retracción del soma. Las flechas rojas que señalan microglía son abundantes en las condiciones control sin rayado, pero más escasas en el rayado.

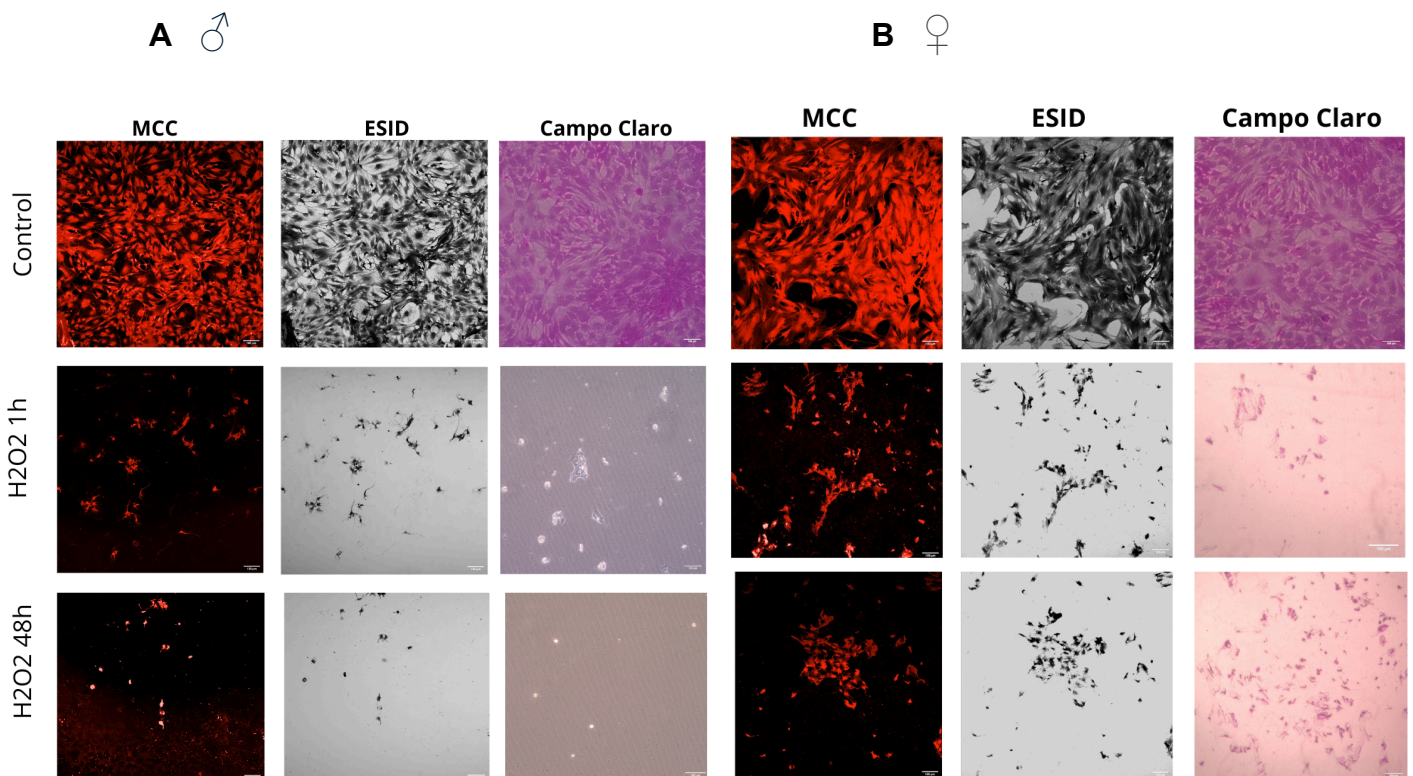


Figura 14. Efectos del estrés oxidativo agudo (1 h) y sostenido (48 h) inducido por H_2O_2 en cultivos gliales neonatales de machos transgénicos (A) y hembras transgénicas (B). Se muestran imágenes obtenidas por MCC, ESID y campo claro luego de la tinción con SRB. Se observa una gran densidad

celular en condiciones control y como la exposición a H₂O₂ produjo una disminución evidente en la densidad celular, acompañada de retracción celular, pérdida de prolongaciones y reducción en la adhesión al sustrato.

Las imágenes de la Figura 14 en condiciones control muestran cultivos casi-confluentes de células gliales obtenidas de neonatos transgénicos machos y hembras, que fueron realizados simultáneamente a los cultivos de sus hermanos no transgénicos (Figuras 11 y 12). La diferencia en el grado de confluencia puede explicarse por la mayor tasa de proliferación de las células transgénicas respecto de las no transgénicas en el modelo SOD1G93A en ratas⁵⁶. Aunque no realizamos análisis de tasa de proliferación en este caso, podemos concluir que estos valores mayores se deben a mayor proliferación porque las células se sembraron a la misma densidad celular estandarizada (2.8×10^4 células/cm²)^{55, 56}.

Sin embargo, la respuesta frente a H₂O₂ que muestra un daño masivo, parece ser similar a la observada en las células de los animales no transgénicos, independientemente del sexo de los animales. A diferencia de lo observado en los cultivos no transgénicos, donde a las 48 h se sugiere una recuperación parcial de la densidad celular, en los cultivos transgénicos no se evidenció dicha recuperación, observándose un deterioro progresivo. Esto sugiere que la glía SOD1G93A presenta una menor capacidad de recuperación frente al estrés oxidativo, en comparación con la glía no transgénica.

La exposición a H₂O₂ también produjo alteraciones morfológicas severas, fundamentalmente en el tamaño de las células y en la disposición de las mismas respecto al cultivo en condiciones control.

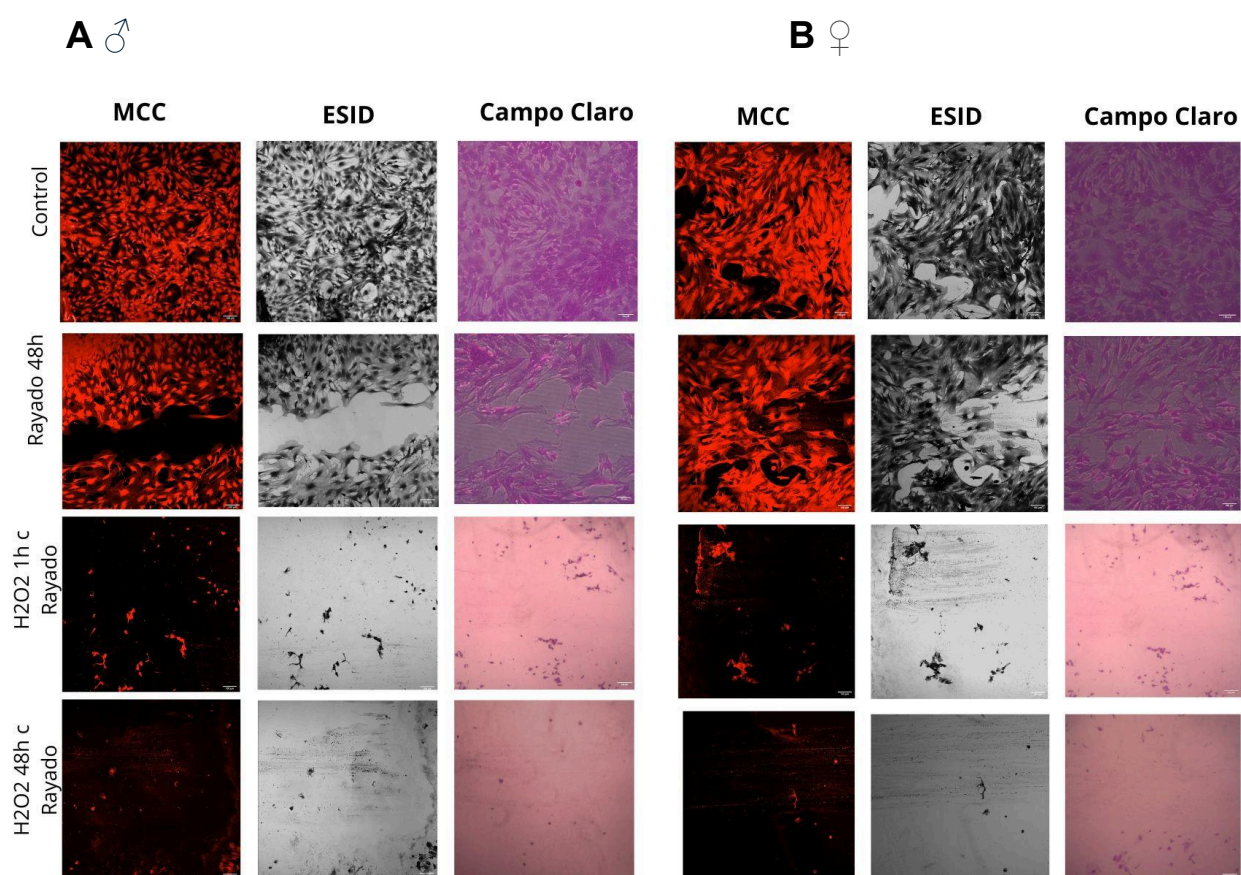
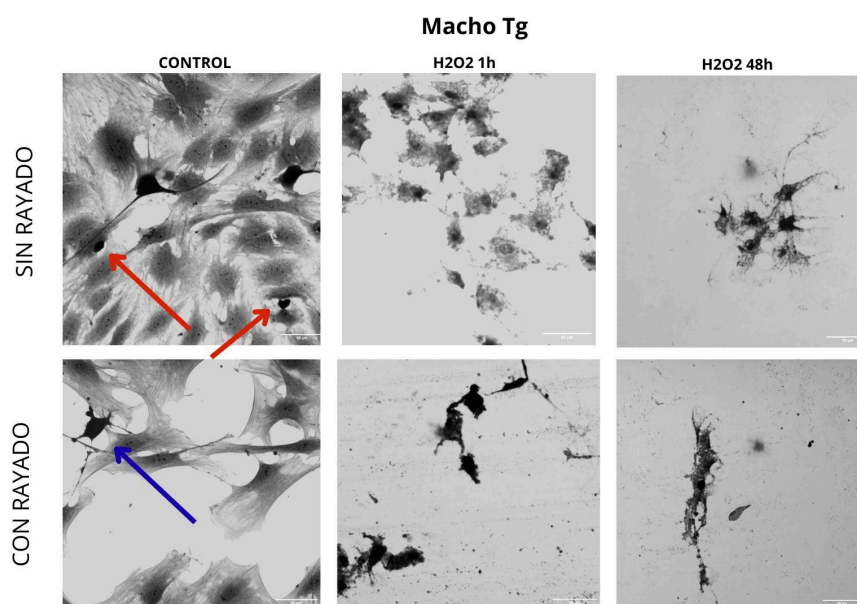


Figura 15. Efectos del daño mecánico, del estrés oxidativo agudo y sostenido en cultivos gliales neonatales de machos transgénicos (A) y de hembras transgénicas (B). Se muestran imágenes de MCC, ESID y campo claro de células teñidas con SRB con células confluentes en 80% en control, buena respuesta al daño mecánico y daño masivo frente a H_2O_2 . Magnificación: 5x.

La figura 15 muestra la respuesta de las células de los animales Tg al daño mecánico en presencia y ausencia de H_2O_2 . Al igual que en las figuras 11 y 12, los controles en las figuras 14 y 15 son iguales, porque todas las condiciones experimentales se realizaron al mismo tiempo.

La segunda fila de la Figura 15, muestra la respuesta al daño mecánico solo a las 48 horas de haber sido realizado se observa una disminución del área de rayado con células dentro del mismo y ausencia significativa de cambios en la morfología de los astrocitos. También puede observarse que el estrés oxidativo generó un daño más rápido y profundo que el daño mecánico solo, dejando a las células visiblemente devastadas incluso tras el período corto de exposición.

Estos aumentos llevan a proponer que el rayado indujo cambios morfológicos moderados, manteniéndose una población celular capaz de organizar una respuesta migratoria y reparatoria, tal como es esperable fundamentalmente para astrocitos²³. La reducción más pronunciada observada bajo H_2O_2 sugiere que el daño oxidativo agudo parece comprometer esos mecanismos tempranos de reorganización y reparación y superar la capacidad de respuesta de estos cultivos.



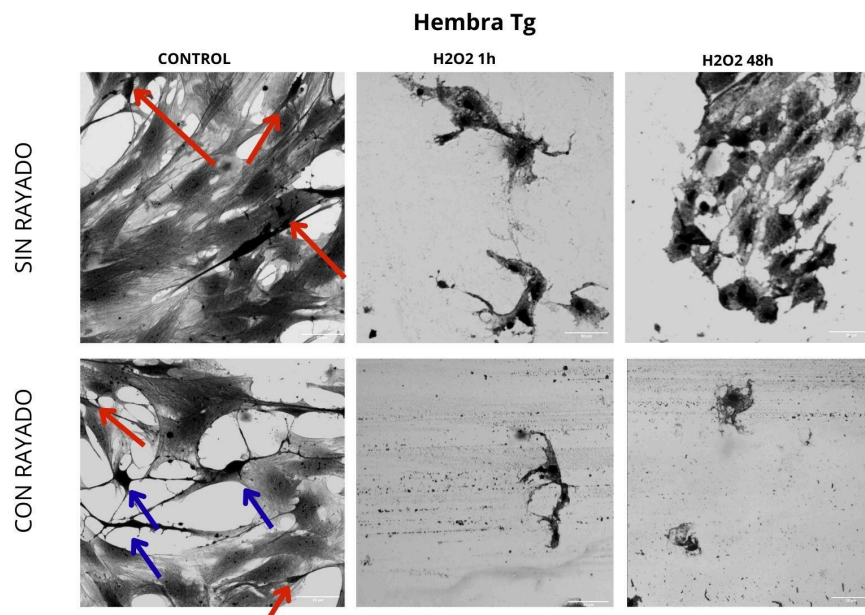


Figura 16. Cambios morfológicos inducidos por daño mecánico y estrés oxidativo en cultivos gliales neonatales transgénicos SOD1G93A de machos y hembras. Las imágenes de células teñidas con SRB fueron tomadas con ESID a 20x y muestran el deterioro producido por el estrés oxidativo agudo y la combinación de efectos negativos cuando coexisten ambos estímulos. Las imágenes a estos aumentos, muestran respuesta similar en machos y hembras y el efecto de daño significativo producido por H_2O_2 .

La figura 16 muestra que en las condiciones control, tanto machos como hembras transgénicas mostraron astrocitos con morfología extendida y adherencia al sustrato, así como una presencia menor de microglía identificable por su tamaño reducido y prolongaciones cortas (flechas rojas). El tratamiento con H_2O_2 por 1 h y por 48 h generó un deterioro morfológico severo en ambos sexos, con células retraídas, fragmentadas y con pérdida marcada de adhesión, sugerida por las formas anómalas que se observan. A 48 h, el daño oxidativo produjo agrupamientos celulares irregulares y estructuras colapsadas. De manera consistente con observaciones previas, las células provenientes de hembras transgénicas mostraron una preservación morfológica relativamente mayor a las 48 h de exposición al estrés oxidativo en comparación con los machos.

El daño mecánico realizado en células de ambos sexos mostró una excelente respuesta que tendió a ocupar el área libre de células inicial. Sin embargo, la combinación de ambos estímulos de daño (oxidativo y mecánico) produjo una muerte masiva, solo dejando detritos celulares, independientemente de la duración del estímulo oxidativo.

Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, la respuesta morfológica de los astrocitos frente al daño oxidativo y mecánico presenta similitudes entre cultivos no transgénicos y transgénicos, a pesar de las diferencias funcionales previamente descritas para la glía SOD1G93A en relación con la supervivencia de motoneuronas²¹ en condiciones basales y parte de esta toxicidad se propone que sea debido a cierta respuesta reparativa en condiciones de daño, lo que incluso permitiría la emergencia de fenotipos aberrantes⁵⁵.

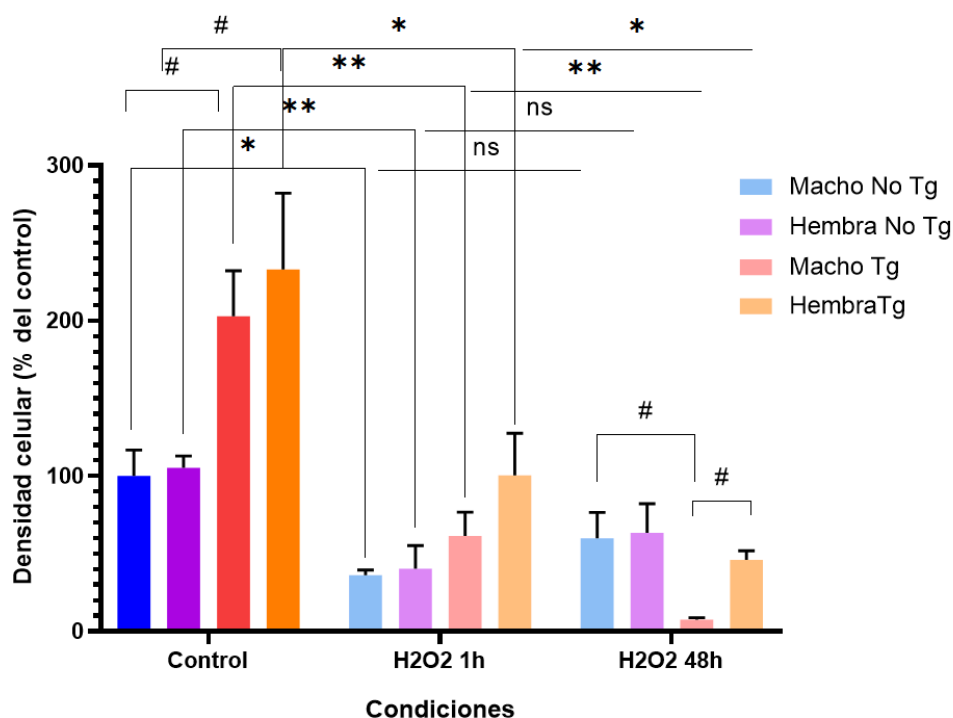


Figura 17. Cuantificación de los efectos del tiempo de exposición a H_2O_2 sobre la densidad de las células gliales provenientes de animales de distinto sexo y genotipo. Esta gráfica, como las que siguen, reúne los datos cuantitativos obtenidos en todas las condiciones experimentales. Los mismos fueron expresados como porcentajes de los valores obtenidos en los cultivos de machos no transgénicos tomados como 100%. Estos datos son resultados de al menos tres experimentos independientes con 5-7 réplicas por cada condición experimental. Las barras de error indican DE. Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas por $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****) entre condiciones experimentales y $p < 0,05$ (#) entre sexos y genotipo. Las comparaciones se efectuaron entre dos grupos independientes mediante el test t de Student no apareado, bilateral.

La figura 17 muestra que en condiciones control, la densidad celular de los cultivos de los animales transgénicos es significativamente mayor que la de los no transgénicos, sin embargo, no hay cambios significativos en condiciones basales entre los sexos, cuando el genotipo es el mismo.

Este resultado, coincide con descripciones previas que indican que, incluso en ausencia de estímulos, las glías portadoras de mutaciones en SOD1 exhiben alteraciones basales en su organización, reactividad temprana y proliferación aumentada, asociadas a la disfunción mitocondrial característica del modelo. La mayor densidad inicial podría reflejar un estado proliferativo o reactivo intrínseco, consistente con el fenotipo proinflamatorio temprano documentado en modelos SOD1^{6,8}.

El tratamiento con peróxido de hidrógeno generó una disminución significativa de la densidad celular en todos los genotipos y sexos a 1h reflejando la sensibilidad de las células gliales al estrés oxidativo. El hecho de que no se hayan observado diferencias entre sexos dentro del mismo genotipo sugiere que a 1 h, cuando el daño oxidativo es severo como el que se ocasiona, la respuesta está dominada por mecanismos redox rápidos que predominan sobre respuestas reparativas, incluso donde el sexo podría presentar diferencias⁴¹. Por otra parte, si bien tras el tratamiento con H_2O_2 los valores de densidad

celular disminuyeron significativamente en todos los grupos, se observó una tendencia a que las células de los ratones Tg mantuvieran valores relativamente superiores respecto a los controles no transgénicos, lo que puede atribuirse principalmente al hecho de que partían de un valor basal mayor.

A las 48 h de tratamiento con H_2O_2 se observó un patrón diferente al observado en 1h en los animales no transgénicos, hubo un aumento en la densidad hasta alcanzar valores no significativos con el control, lo que sugiere una recuperación parcial de la densidad celular tras el daño oxidativo inicial. Este comportamiento es consistente con el conocimiento de que el H_2O_2 exógeno posee una vida media limitada en medios biológicos y es rápidamente degradado por catalasa, peroxidasas y sistemas dependientes de glutatión^{42, 57, 58, 55}. Así, el estrés oxidativo inicial es intenso pero transitorio, permitiendo que las células no transgénicas restablezcan su homeostasis durante las 48 h posteriores, ya que tienen un sistema antioxidante óptimo o fisiológico y tienden por lo tanto a buscar reestablecer su equilibrio redox.

En los cultivos SOD1G93A hubo diferencias significativas en la condición H_2O_2 respecto del control y una tendencia a la disminución de la densidad celular a las 48 h respecto del tratamiento de 1 hora. Este resultado es consistente con la idea de que la mutación SOD1G93A compromete la capacidad de respuesta frente al estrés oxidativo^{6, 8}.

La incapacidad de restaurar la homeostasis redox constituye un rasgo característico de la glía en la ELA y contribuye a la generación de un ambiente crónicamente dañino para las motoneuronas. La persistencia de la vulnerabilidad oxidativa en las células provenientes de animales Tg encontrada en esta tesis coincide con lo descrito en la literatura, donde la disfunción glial y mitocondrial se manifiesta tempranamente y progresa de forma acelerada^{2, 6, 8}.

Además, a las 48 h, dentro del grupo transgénico, las hembras mostraron una mayor densidad celular que los machos, sugiriendo una resistencia relativa superior. Esta observación es coherente con estudios que describen una mayor capacidad antioxidante de las glías de hembra, mediada por una activación más eficiente de la vía Nrf2–ARE, una menor propensión a la respuesta proinflamatoria y efectos protectores vinculados a genes del cromosoma X^{59, 60}. Lo interesante es que incluso en etapas neonatales, antes de la maduración hormonal, estas diferencias pueden manifestarse a través de mecanismos epigenéticos que favorecen una mayor estabilidad redox en hembras⁶⁰.

Sin embargo no debemos dejar de hacer notar, que la densidad celular a las 48 h de tratamiento es muy menor, y el dato de densidad celular, solo refiere a proteína presente en células adheridas (vida o muerte) y no indica nada respecto del grado de daño celular.

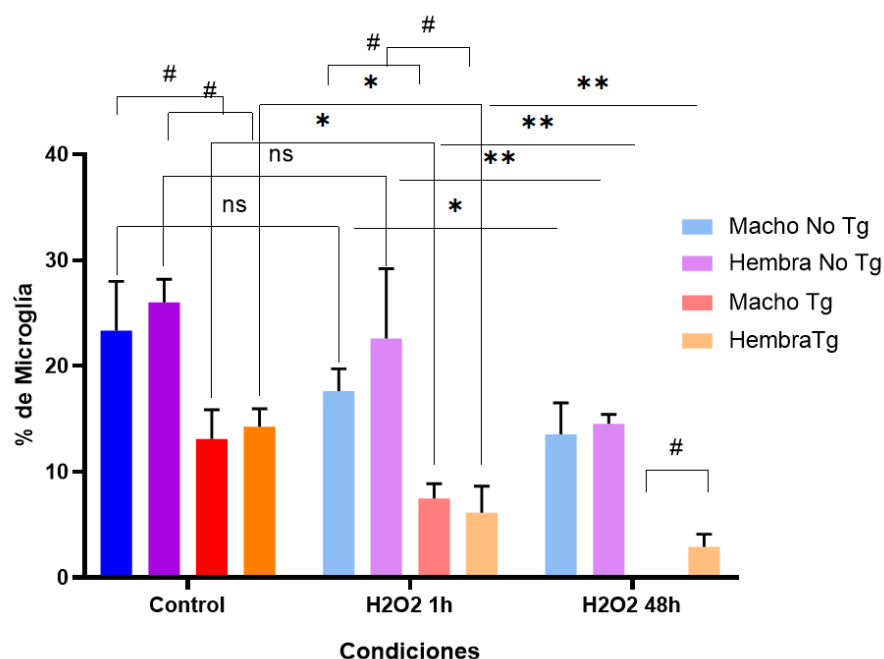


Figura 18. Cuantificación de los efectos del tiempo de exposición a H₂O₂ sobre la densidad de células microgliales en los cultivos provenientes de animales de distinto sexo y genotipo. Se grafica el porcentaje de microglía respecto de las células totales para cada tipo de cultivo en condiciones control y luego del tratamiento con peróxido de hidrógeno. Los valores son expresados como porcentajes \pm DE. Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas por $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****) entre condiciones experimentales y $p < 0,05$ (#) entre sexos y genotipos. Las comparaciones se efectuaron entre dos grupos independientes mediante el test t de Student no apareado, bilateral.

La parte izquierda de la figura 18 muestra que, en condiciones basales, el porcentaje de microglía en los cultivos de animales no transgénicos es significativamente mayor que en los cultivos de animales transgénicos. Este resultado resulta relevante en el contexto de la ELA, dado que diversas evidencias indican que la microglía presenta alteraciones tempranas incluso antes de la pérdida evidente de motoneuronas en modelos preclínicos de la enfermedad, sin embargo no encontramos en la literatura datos respecto de estas diferencias, por lo que entendemos que es un resultado a analizar en el futuro.

Además, a la primera hora de exposición al peróxido de hidrógeno, el porcentaje de microglía mostró un comportamiento diferencial según el genotipo. Mientras que en los cultivos no transgénicos no se observaron cambios significativos en los valores, en los transgénicos SOD1G93A se evidenció una disminución marcada del porcentaje de la microglía, sugiriendo que podrían ser más vulnerables al estrés oxidativo agudo. Esta mayor susceptibilidad temprana de la microglía portadora de SOD1G93A se alinea con la noción de que la disfunción glial constituye un componente temprano y activo en la fisiopatología de la ELA.

Este resultado podría concordar con estudios previos que muestran la susceptibilidad de la microglía al estrés oxidativo agudo, dado que estas células poseen una capacidad limitada para manejar aumentos bruscos de ROS y pueden transitar rápidamente hacia estados disfuncionales o de muerte celular ante una sobrecarga oxidativa, reafirmando el resultado de la densidad celular⁶¹. Además, está evidenciado que la microglía portadora de mutaciones en la enzima SOD1 presentan alteraciones basales en su metabolismo redox y

un aumento en la vulnerabilidad mitocondrial, lo que reduce su capacidad para sostener un fenotipo homeostático bajo condiciones de estrés.

Visto de esta manera, los resultados muestran que en los cultivos provenientes de animales no transgénicos los porcentajes de microglía se mantienen estables tras 1 h de tratamiento con H_2O_2 , lo que sugiere que, en esta condición, microglía y astrocitos presentan una vulnerabilidad comparable al estrés oxidativo inducido.

Sin embargo, luego de 48 h de exposición se observan diferencias significativas, indicando que la microglía sería más vulnerable al daño oxidativo prolongado que los astrocitos. En contraste, en los cultivos derivados de animales transgénicos se observó una marcada diferencia entre sexos: los machos mostraron una ausencia casi total de microglía, mientras que las hembras conservaron un porcentaje residual pero detectable de estas células.

Este comportamiento parece coherente con la evidencia de un dimorfismo sexual en la respuesta microglial al estrés. Las microglías de hembras transgénicas, incluso en estadios neonatales, tienden a presentar perfiles menos proinflamatorios, menor susceptibilidad a la disfunción mitocondrial y una activación más eficiente de rutas antioxidantes dependientes de Nrf2 y de factores ligados al cromosoma X^{58, 59, 60}. Este dimorfismo sexual en la microglía adquiere particular relevancia en la ELA, una enfermedad que presenta diferencias sexo-dependientes en su inicio, progresión y severidad clínica.

Sin embargo, la densidad celular muy baja en estas condiciones, lleva a relativizar parte de estos resultados y sugerir paradigmas experimentales menos severos para analizar la posible existencia de respuestas sexo-específicas.

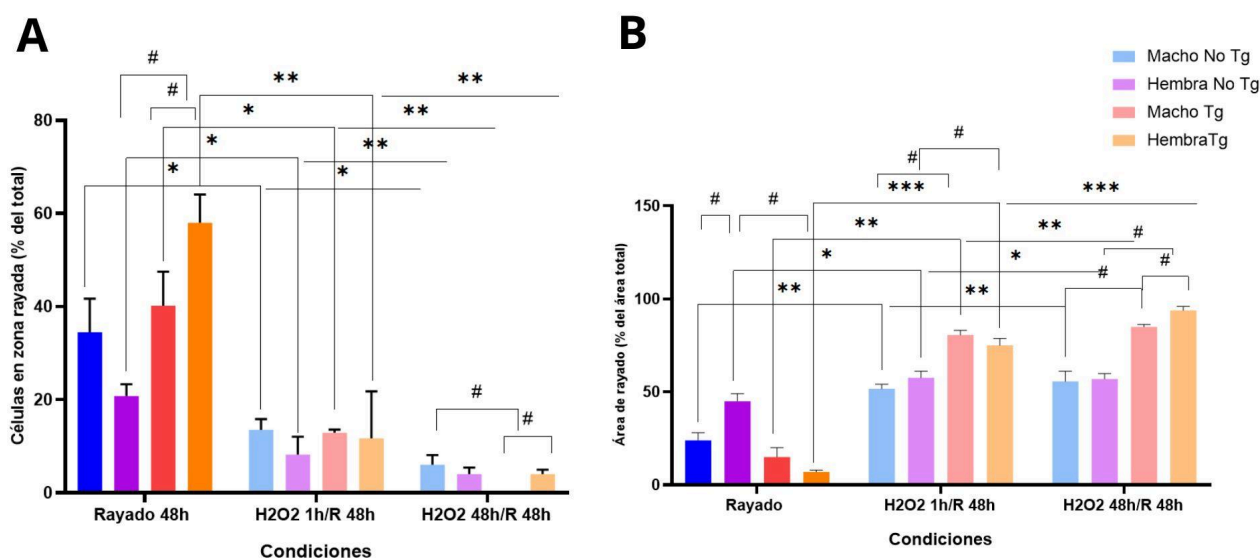


Figura 19. Cuantificación de la respuesta celular al daño mecánico en cultivos provenientes de animales de distinto sexo y genotipo (en presencia y ausencia de H_2O_2). A: Número de células presentes en el rayado. Las gráficas muestran el porcentaje de células dentro de la herida, luego de 48 horas de realizada. Las barras de error indican DE. **B: Área de rayado.** Los valores muestran el porcentaje de área libre de células respecto del área total de cada campo de cada imagen. Las barras son el promedio \pm DE. Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas por $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****) entre condiciones experimentales y $p < 0,05$ (#) entre sexos y genotipo. Las comparaciones se efectuaron entre dos grupos independientes mediante el test t de Student no apareado, bilateral.

La figura 19 muestra que en condiciones de solo rayado hay un porcentaje significativo de células tendientes a llenar la herida producida por el rayado con una punta de pipeta. Este paradigma de daño mecánico permite modelar aspectos de la respuesta glial frente a un daño, relevantes para el estudio del microambiente alterado que caracteriza a la ELA.

Como era esperable dada su mayor tasa de proliferación, las células provenientes de los animales transgénicos mostraron un porcentaje mayor de células dentro de la herida. Consistentemente, el área de rayado solo (Figura 19B), muestra áreas libres de células menores en los cultivos que mostraron mayor número de células dentro de la herida. Estos resultados muestran una buena respuesta del cultivo y una adecuada capacidad de proliferación y/o migración⁴⁷. Dentro de los cultivos no transgénicos, las hembras mostraron un porcentaje de células en el rayado mayor que las hembras no transgénicas y también superior a los machos transgénicos. Este patrón sugiere que, en etapas iniciales, las hembras transgénicas podrían conservar una mejor capacidad de reorganización y migración bajo condiciones basales, respecto al macho⁴⁹. Además, en los cultivos provenientes de animales no transgénicos, el rendimiento fue mayor en los cultivos de machos que en los de hembras, lo cual podría coincidir con observaciones previas donde los astrocitos de machos no transgénicos presentan una activación migratoria inicial más intensa frente a un daño mecánico⁴⁷.

Tras 1 h de exposición a H_2O_2 , la disminución en el porcentaje de células presentes en el rayado fue uniforme y significativa en todos los grupos, sin diferencias entre genotipos ni sexos mostrando que el daño oxidativo ocasionado fue muy severo y que interfiere de manera equivalente con los mecanismos tempranos de migración glial, inhibiendo la reorganización del citoesqueleto^{46, 47}. La homogeneidad de la respuesta sugiere que, en esta fase inicial, la sensibilidad al peróxido de hidrógeno supera las diferencias basales entre modelos y sexos, lo cual es coherente con la naturaleza altamente reactiva del H_2O_2 y con su capacidad de afectar rápidamente proteínas estructurales y vías de señalización esenciales para el movimiento celular^{47, 48}. También permite mostrar que las células de los animales transgénicos fueron más vulnerables (en proporción a los no transgénicos) a la co-exposición de daño oxidativo y mecánico.

A 48 h, se vio una respuesta similar en la que todos los cultivos no transgénicos y transgénicos disminuyeron su número de células en el rayado con la exposición de H_2O_2 . A su vez, dado que el porcentaje de microglía disminuye significativamente a las 48 h, podría sugerir que los astrocitos son quienes tienen capacidad de reparación y migración a pesar de estar igualmente heridos por el estrés oxidativo⁴⁷. Este resultado refuerza la noción de que los astrocitos desempeñan un rol central en los intentos de reparación tisular en el contexto de la ELA, aun cuando estas respuestas puedan resultar insuficientes o disfuncionales.

Dentro de los transgénicos, las células provenientes de las hembras mostraron valores superiores a los machos en la condición control como en H_2O_2 con rayado. A pesar de que estos valores últimos son muy pequeños, los valores encontrados en las condiciones de rayado solo podrían sugerir un patrón de resiliencia también observado en los análisis de densidad celular y porcentajes de microglía.

En concordancia con los datos presentados en la Figura 19A, la Figura 19B muestra las áreas libres de células correspondientes al rayado en las distintas condiciones experimentales, evidenciando el mismo patrón de respuesta. Dado que esta variable cuantifica directamente el área remanente de la herida, expresada en valores absolutos,

permite una estimación más robusta y precisa de la capacidad de cierre del daño mecánico en comparación con parámetros relativos. Esta medida resulta particularmente informativa para evaluar la eficiencia de la respuesta glial frente a daño, un proceso alterado en la ELA.

La figura 19B muestra que en condiciones de rayado solo hay diferencias sexo-específicas dentro de los genotipos y diferencias entre los genotipos. En los cultivos de no transgénicos, las células de los machos migran más, mientras que, en los transgénicos, las de las hembras migran más. En los cultivos de animales no transgénicos, los machos presentaron un área de rayado menor que los de las hembras, lo que indica un cierre más eficiente y concuerda con la tendencia observada en los porcentajes de células en la herida, donde los cultivos de machos no transgénicos mostraron una migración inicial más activa⁴⁷.

No se encontraron datos disponibles en la literatura referentes a diferencias en el comportamiento de células migrantes, probablemente, porque la posibilidad de diferencias sexo-específicas en cultivos de neonatos se consideraba que no era una variable importante, pese a que no se descarta la presencia de posibles dimorfismos funcionales tempranos que puedan influir en la capacidad migratoria^{58, 59, 60}. Esta falta de conocimiento refuerza la relevancia de los resultados obtenidos en el contexto de la ELA.

Luego de 1 h de tratamiento con H_2O_2 se encontraron diferencias en todos los genotipos y sexos. El área del rayado fue significativamente menor que en la condición tratada con H_2O_2 , lo que refleja un impedimento al cierre de la lesión debido al estrés oxidativo. Sin embargo, los cultivos de los animales no transgénicos tuvieron áreas menores que los cultivos de los animales transgénicos en ambos sexos, lo que indica que tal vez conservaron una mayor capacidad de cierre pese al estrés oxidativo.

Después de 48 h de tratamiento con H_2O_2 , el comportamiento general reproduce el patrón observado en las figuras previas, aunque con efectos más pronunciados por la prolongación del estrés. Los machos no transgénicos siguieron mostrando un cierre mayor que las hembras no transgénicas en control, mientras que dentro de los transgénicos se mantuvo la superioridad de las hembras SOD1 sobre los machos SOD1, reforzando el dimorfismo funcional observado en todas las variables previas.

En resumen, podría decirse que las diferencias entre genotipos se acentuaron luego del tratamiento con H_2O_2 : los cultivos de animales transgénicos mostraron un área significativamente mayor (peor cierre) que los cultivos de los animales no transgénicos en ambos sexos, lo que confirma que la mutación SOD1G93A exacerba el deterioro asociado al estrés oxidativo sostenido^{6, 8}. La comparación entre células provenientes de machos y hembras transgénicas revela nuevamente que las hembras mantienen una capacidad de cierre relativamente mejor en tiempos prolongados^{59, 60}.

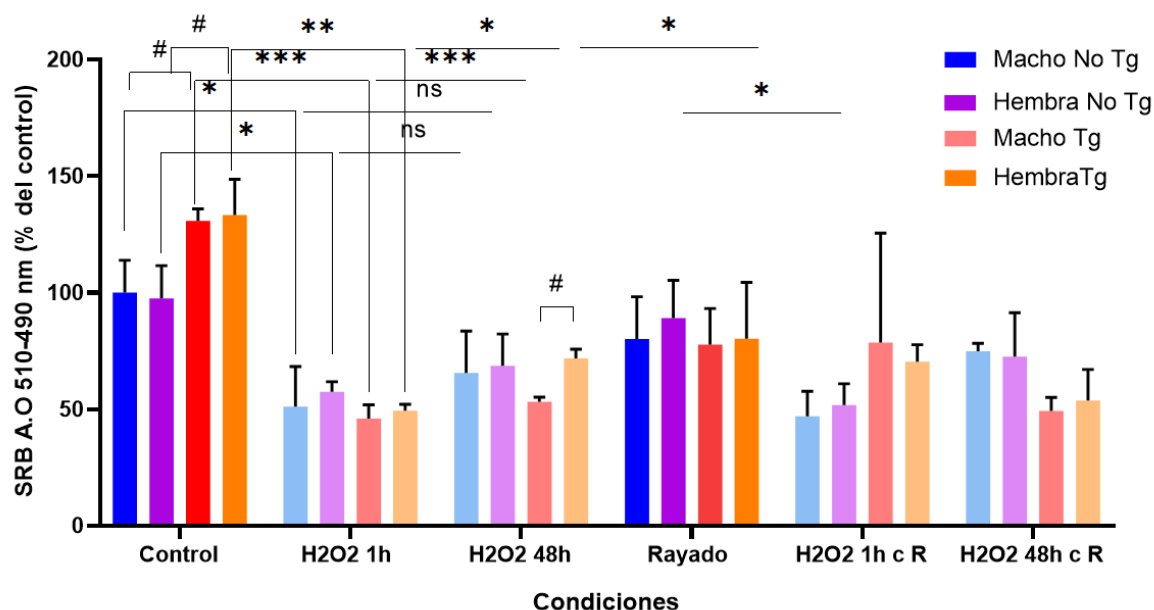


Figura 20. Cuantificación de la absorbancia óptica (AO) de SRB en cultivos provenientes de animales de distinto sexo y genotipo en las distintas condiciones experimentales. La medida de absorbancia se realizó en espectrofotómetro en los mismos cultivos de los cuales se tomaron fotos. Las imágenes muestran el promedio \pm DE de todos los experimentos tomando el cultivo de células gliales de macho no transgénico como control. Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas por $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****) entre condiciones experimentales y $p < 0,05$ (#) entre sexos y genotipo. Las comparaciones se efectuaron entre dos grupos independientes mediante el test t de Student no apareado, bilateral.

La figura 20 muestra que en condiciones basales (control), la AO de la SRB fue significativamente mayor en los cultivos de animales transgénicos, lo que es consistente con una proliferación celular mayor, que no fue medida, pero puede deducirse ya que todos los cultivos fueron sembrados a la misma densidad celular. En estas condiciones no se observaron diferencias sexo-específicas dentro de cada genotipo. Este aumento basal de la viabilidad celular en el modelo SOD1G93A refuerza la idea de que las células gliales portadoras de la mutación presentan un estado proliferativo y reactivo alterado desde etapas tempranas, un rasgo característico de los modelos preclínicos de ELA.

En forma coherente con los resultados mostrados de densidad celular luego del tratamiento de 1 hora y 48 horas con peróxido de hidrógeno, el daño oxidativo provocado fue de entidad tal que produjo la muerte de aproximadamente el 50% de las células provenientes de animales no transgénicos y aproximadamente 70% en las obtenidas de animales transgénicos. Por tanto, podría decirse que la primera hora de exposición al peróxido de hidrógeno produjo un descenso uniforme de la viabilidad celular, sin diferencias entre células de machos y de hembras, confirmando que este compuesto actúa como un agente oxidante agudo cuya citotoxicidad inicial afecta de forma equivalente a las glías neonatales, independientemente del dimorfismo sexual y del genotipo. Este comportamiento es coherente con los resultados obtenidos por imagenología y concuerda con la literatura que describe que el H_2O_2 genera daño inmediato mediante oxidación de proteínas estructurales y disrupción del citoesqueleto⁴², sin permitir aún la activación de mecanismos diferenciales asociados al sexo.

Además, como se observó antes a 48h los no transgénicos, los datos de sobrevivencia proporcionados por espectrofotometría, muestran que la duración del tratamiento no

produjo efectos significativamente diferentes. Tal como se expresó anteriormente ello podría deberse a la baja vida media del peróxido de hidrógeno en los sistemas biológicos.

Los datos de AO de SRB en condiciones de daño mecánico no mostraron diferencias entre los grupos, indicando que los datos obtenidos por análisis imagenológico brindan información complementaria que al momento de analizar el todo, parecen tener escasa relevancia estadística y que el daño oxidativo infligido es de magnitud tal que predomina sobre las otras condiciones experimentales. Este resultado sugiere que, en el contexto del modelo SOD1G93A, el estrés oxidativo constituye un factor dominante en la disfunción glial, en concordancia con su rol central en la progresión de la ELA.

En conjunto, los resultados cuantitativos y morfológicos del objetivo específico 2 indican que el estrés oxidativo constituye el principal determinante de la disfunción glial en este modelo, modulada tanto por el genotipo como por el sexo. Mientras que los cultivos no transgénicos muestran una capacidad parcial de recuperación tras el daño oxidativo, los cultivos SOD1G93A exhiben una vulnerabilidad sostenida, particularmente en microglía y en células provenientes de machos. Estas diferencias sexo- y genotipo-dependientes emergen incluso en etapas neonatales, sugiriendo que la resiliencia glial podría constituir un factor temprano en la progresión diferencial de la ELA.

7. Conclusiones

Los resultados de esta tesis permiten evaluar la influencia del genotipo, el sexo y el estrés oxidativo en la respuesta de la glía mixta espinal neonatal, aportando evidencia temprana sobre procesos celulares relevantes en el contexto de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).

El estrés oxidativo emergió como el principal determinante del daño glial, induciendo alteraciones morfológicas profundas, disminución de la densidad celular y reducción de la viabilidad, efectos que predominaron sobre los observados tras el daño mecánico. En este marco, los cultivos provenientes de animales transgénicos SOD1G93A mostraron una mayor vulnerabilidad al estrés oxidativo, consistente con una alteración temprana en la capacidad de respuesta frente al daño redox, característica de los modelos preclínicos de ELA. En contraste, los cultivos no transgénicos mostraron una recuperación parcial de la densidad celular a tiempos prolongados, lo que sugiere una mayor capacidad de restablecer el equilibrio celular tras un daño oxidativo agudo.

El análisis conjunto de astrocitos y microglía permitió evidenciar respuestas diferenciales entre ambos tipos celulares. Mientras que los astrocitos conservaron una mayor capacidad de reorganización y participación en el cierre del daño mecánico, la microglía mostró una vulnerabilidad más marcada frente al estrés oxidativo, particularmente en los cultivos transgénicos, donde su pérdida fue más evidente tras exposiciones prolongadas.

Un hallazgo relevante de este trabajo fue la manifestación de dimorfismo sexual en el modelo SOD1G93A. Las células provenientes de hembras transgénicas mostraron una mayor densidad celular residual, una preservación parcial de la microglía y una mejor capacidad de cierre del rayado tras el estrés oxidativo sostenido, en comparación con los cultivos provenientes de machos. En los cultivos no transgénicos, en cambio, las diferencias entre sexos fueron leves o no significativas.

En conjunto, estos resultados son consistentes con la hipótesis planteada y sugieren que la interacción entre la mutación SOD1G93A, el estrés oxidativo prolongado y el sexo modula de manera diferencial la respuesta glial desde etapas tempranas del desarrollo. Estas diferencias tempranas en la resiliencia glial podrían contribuir, al menos en parte, a las diferencias sexo-específicas observadas en la progresión de la ELA.

A nivel personal, este trabajo, aunque parcial y en desarrollo, abre nuevos caminos para continuar explorando. Estudiar a la glía, y en especial a los astrocitos, me permitió descubrir que, incluso en los contextos más adversos, existen mecanismos de protección, comunicación y resiliencia que reflejan la complejidad del Sistema Nervioso y reafirma mi convicción y entusiasmo sobre el valor de la neurociencia como puente entre la curiosidad y el conocimiento. Este trabajo, me permitió entender que, al hacer ciencia, cada respuesta hallada es también el inicio de una nueva pregunta.

8. Perspectivas

Las perspectivas propuestas incluyen:

- Optimizar el modelo experimental para lograr un grado de estrés oxidativo menor que permita el análisis más detallado de las distintas variables.

- Profundizar en las diferencias sexo-específicas en los distintos cultivos celulares. La inclusión de cultivos de ambos sexos representa un avance conceptual ya que anteriormente, al estudiar neurociencias solo se incluían machos.

- Realizar estos estudios en cultivos de animales adultos transgénicos y no transgénicos de forma de comprobar si las diferencias sexo-específicas cambian y para tener datos más cercanos a la edad de los pacientes.

- Aumentar el número de réplicas biológicas en cada condición experimental para consolidar la robustez estadística.

- Incorporar inmunomarcadores del tipo de célula glial (GFAP⁺, Iba1⁺) con el fin de vincular morfología, identidad celular y capacidad antioxidante.

- Incorporar ensayos complementarios como MTT que podría permitir diferenciar pérdida de biomasa de disfunción metabólica.

- Determinar si las diferencias en el área de rayado se deben a cambios en la migración o la proliferación celular incorporando marcadores de proliferación como Ki-67, una proteína expresada únicamente en células que están en ciclo activo. Su cuantificación permitiría determinar si el estrés oxidativo disminuye la proliferación y, por lo tanto, si este factor contribuye a la menor eficiencia en el cierre del rayado.

9. Bibliografía

- [1] Sloan, S. A., & Barres, B. A. (2014). Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders. *Current Opinion in Neurobiology*, 27, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.03.004>
- [2] Maragakis, N. J., & Rothstein, J. D. (2006). Mechanisms of disease: Astrocytes in neurodegenerative disease. *Nature Clinical Practice Neurology*, 2(12), 679–689. <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0355>
- [3] Colonna, M., & Butovsky, O. (2017). Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. *Annual Review of Immunology*, 35, 441–468. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>
- [4] Masuda, T., Sankowski, R., Staszewski, O., & Prinz, M. (2022). Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron*, 110(21), 3458–3483. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.09.018>
- [5] Guttenplan, K. A., Weigel, M. K., & Barres, B. A. (2020). Knockout of reactive astrocyte activating factors slows disease progression in an ALS mouse model. *Nature Neuroscience*, 23(7), 925–936. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0637-8>
- [6] Izrael, M., Slutsky, S. G., & Revel, M. (2019). Rising stars: Astrocytes as a therapeutic target for ALS disease. *Trends in Neurosciences*, 42(5), 420–432. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.03.001>
- [7] Upadhyay, R., Zingg, W., Shetty, S., & Shetty, A. K. (2020). Astrocyte-derived extracellular vesicles: Neuroreparative properties and role in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Journal of Neurochemistry*, 154(6), 623–645. <https://doi.org/10.1111/jnc.15096>
- [8] Yamanaka, K., & Komine, O. (2018). The multi-dimensional roles of astrocytes in ALS. *Neuroscience Research*, 126, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.07.003>
- [9] Nave, K.-A., Werner, H. B., & Castillo, P. E. (2023). Expanding the function of oligodendrocytes to brain energy metabolism. *Current Opinion in Neurobiology*, 83, 102782. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2023.102782>
- [10] Otero, G., Bolatto, C., Isasi, E., Cerri, S., Rodríguez, P., Boragno, D., Marco, M., Parada, C., Stancov, M., Cuitiño, M. N., & Olivera-Bravo, S. (2024). Adult aberrant astrocytes submitted to late passage cultivation lost differentiation markers and decreased their pro-inflammatory profile. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 18, 789456. <https://doi.org/10.3389/fncel.2024.789456>
- [11] Labhasetwar, A. (2022). Antioxidant therapy in oxidative stress-induced neurodegenerative diseases: Role of nanoparticle-based drug delivery systems in clinical translation. *Journal Name Pending / Review Article*.
- [12] Landa-Moreno, C. I., & Saavedra-Molina, F. A. (2025). Nrf2: Un salvavidas celular. *Revista / Capítulo en preparación*.
- [13] Maas, A. I. R., Marmarou, A., Murray, G. D., Teasdale, S. G., & Steyerberg, E. W. (2010). Clinical trials in traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*, 7(1), 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2009.10.003>

- [14] Brett, B. L., Gardner, R. C., Godbout, J., Dams-O'Connor, K., & Keene, C. D. (2022). Traumatic brain injury and risk of neurodegenerative disorder. *Biological Psychiatry*, 91(5), 498–507. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2021.05.025>
- [15] Cernak, I., & Noble-Haeusslein, L. J. (2010). Traumatic brain injury: An overview. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 30(2), 255–266. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.203>
- [16] Ng, S. Y., & Lee, A. Y. W. (2019). Traumatic brain injuries. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 528. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00528>
- [17] Anjum, F., et al. (2020). Molecular mechanisms of traumatic brain injury-induced neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7533. <https://doi.org/10.3390/ijms21207533>
- [18] Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological Reviews*, 91(2), 461–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>
- [19] Santos-Galindo, M., et al. (2011). Sex differences in the inflammatory response of primary astrocytes. *Biology of Sex Differences*, 2(7). <https://doi.org/10.1186/2042-6410-2-7>
- [20] Rosen, D. R., et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene. *Nature*, 362(6415), 59–62. <https://doi.org/10.1038/362059a0>
- [21] Cassina, P., et al. (2008). Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration. *Journal of Neuroscience*, 28(14), 4115–4122. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5184-07.2008>
- [22] Díaz-Amarilla, P., et al. (2011). Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(44), 18126–18131. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110689108>
- [23] Sofroniew, M. V. (2020). Astrocyte reactivity: Subtypes, states, and functions in CNS innate immunity. *Trends in Immunology*, 41(9), 758–770. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.003>
- [24] Santos-Galindo, M., et al. (2011). Sex differences in the inflammatory response of primary astrocytes. *Biology of Sex Differences*, 2(7). <https://doi.org/10.1186/2042-6410-2-7>
- [25] Hardiman, O., et al. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17071. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.71>
- [26] Jiménez-Riani, M., et al. (2017). Ultrastructural features of aberrant glial cells. *Cell and Tissue Research*, 370, 391–401. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2678-6>
- [27] Caldi Gomes, L., et al. (2024). Multiomic ALS signatures highlight subclusters and sex differences suggesting the MAPK pathway as therapeutic target. *Nature Communications*, 15(1), 4893. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-4893-x>
- [28] Valdés, J. L., & Garbosa-Davies, A. (2013). Neuroinflammation and traumatic brain injury. *Open Journal of Neuroscience*, 3(1), 33–42.
- [29] Martin, A. J., et al. (2024). Mechanisms linking traumatic brain injury to long-term neurodegeneration. *Journal / Review in press*.
- [30] Liddelow, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive astrocytes: Production, function, and therapeutic potential. *Immunity*, 46(6), 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>

- [31] Nagai, M., et al. (2007). Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release toxic factors. *Nature Neuroscience*, 10(5), 615–622. <https://doi.org/10.1038/nn1876>
- [32] Bede, P., Elamin, M., Byrne, S., & Hardiman, O. (2014). Sexual dimorphism in ALS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, 15(3–4), 235–243. <https://doi.org/10.3109/21678421.2013.865749>
- [33] Jacob, C., & Nguyen, M. D. (2024). Brain–body mechanisms contribute to sexual dimorphism in amyotrophic lateral sclerosis. *Trends in Neurosciences*.
- [34] McLeod, V. M., et al. (2020). Dysregulation of steroid hormone receptors in ALS mice. *Endocrinology*, 161(9), 1–20. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa104>
- [35] Christoforidou, E., et al. (2024). An ALS-associated mutation dysregulates microglia-derived extracellular microRNAs in a sex-specific manner. *Frontiers in Cellular Neuroscience*.
- [36] Desagher, S., et al. (1996). Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *Journal of Neuroscience*, 16(8), 2553–2562. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-08-02553.1996>
- [37] Hanz, S., et al. (2014). Axonal regeneration and functional recovery following traumatic brain injury. *Brain Research*, 1582, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.07.005>
- [38] Vargas, M. R., et al. (2006). Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 97(3), 687–696. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03781.x>
- [39] Benda, P., et al. (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, 161(3839), 370–371. <https://doi.org/10.1126/science.161.3839.370>
- [40] Desagher, S., et al. (1996). Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *Journal of Neuroscience*, 16(8), 2553–2562. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-08-02553.1996>
- [41] Isasi, E., et al. (2019). Glutaric acid affects pericyte contractility and migration. *Molecular Neurobiology*, 56(11), 7694–7707. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1568-4>
- [42] Hamdi, Y., et al. (2011). Protective effect of the octadecanoneuropeptide on hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Journal of Neurochemistry*, 118(3), 416–428. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07333.x>
- [43] Olivera-Bravo, S., et al. (2022). Neuroprotective effects of violacein in a model of inherited ALS. *Scientific Reports*, 12(1), 4439. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08439-3>
- [44] Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay. *Nature Protocols*, 1(3), 1112–1116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>
- [45] Konat, G. W., Mouzannar, R., & Bai, H. (2001). Higher order chromatin degradation in glial cells. *Neurochemistry International*, 39(3), 179–186. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(01\)00016-6](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(01)00016-6)
- [46] Li, Z., et al. (2022). Alleviating oxidative damage-induced telomere attrition. *Molecular Neurobiology*, 59(1), 590–602. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02592-7>
- [47] Friedl, P., & Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration. *Nature Reviews Cancer*, 10(8), 445–457. <https://doi.org/10.1038/nrc2870>

- [48] Desgrosellier, J. S., & Cheresh, D. A. (2010). Integrins in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10(1), 9–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2748>
- [49] Ridley, A. J. (2015). Rho GTPase signalling in cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 36, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.08.005>
- [50] Rao, J. S. (2003). Molecular mechanisms of glioma invasiveness. *Glia*, 39(3), 217–233. <https://doi.org/10.1002/glia.10118>
- [51] Chitnis, T., & Weiner, H. L. (2017). CNS inflammation and neurodegeneration. *Journal of Clinical Investigation*, 127(10), 3577–3587. <https://doi.org/10.1172/JCI90609>
- [52] Liddel, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive astrocytes. *Immunity*, 46(6), 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>
- [53] Giakoumettis, D., et al. (2018). C6 cell line: The gold standard in glioma research. *Hippokratia*, 22(3), 105–112.
- [54] Gunnersen, J. M., et al. (2000). Growth and migration markers of rat C6 glioma cells. *Journal of Neurochemistry*, 75(3), 1108–1117. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0751108.x>
- [55] Tsuneda, T., & Taketsugu, T. (2018). Hydrogen peroxide decomposition in aqueous systems. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20(38), 24992–24999. <https://doi.org/10.1039/C8CP04793A>
- [56] Díaz-Amarilla, P., et al. (2011). Phenotypically aberrant astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(44), 18126–18131. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110689108>
- [57] Ueki, R., et al. (2020). Factors controlling hydrogen peroxide degradation. *Science of the Total Environment*, 728, 138705. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138705>
- [58] Wagner, B. A., Venkataraman, S., & Buettner, G. R. (2013). Rate of removal of extracellular hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 60, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.019>
- [59] Labib, D., et al. (2023). Sex differences in astrocyte and microglia reactivity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 17, 1157892. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1157892>
- [60] Barreto, G., et al. (2007). Sex differences in oxidative stress. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 265–266, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.12.032>
- [61] McCarthy, M. M., & Arnold, A. P. (2011). Reframing sexual differentiation of the brain. *Nature Neuroscience*, 14(5), 677–683. <https://doi.org/10.1038/nn.2834>
- [62] Qian, L., & Hong, J. S. (2006). Systemic inflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*, 55(4), 453–462. <https://doi.org/10.1002/glia.20364>

10- Anexos

9.1 ESTADÍSTICAS DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 1

Tabla 1: Datos de la absorbancia de la SRB a 510 nm expresada como porcentaje del control (100%):

Condición experimental	Media \pm SD	Comparación	p-valor
Control	100 \pm 2.10	C vs H ₂ O ₂	0.00207 (**)
H ₂ O ₂	54,61 \pm 8,72		
Rayado 48 h	133,01 \pm 10,74	Sc vs H ₂ O ₂ 1h/Sc 48h	0.000796 (***)
H ₂ O ₂ 1h / Rayado 48h	51,72 \pm 11,03		
Control vs Rayado 48h	“ “	C vs Sc	0.037 (*)

Tabla 2: Densidad celular (células/mm²) en las distintas condiciones experimentales expresadas como porcentaje del control: control, H₂O₂, dentro del rayado (rayado) y en los bordes del rayado, con y sin exposición a H₂O₂:

Condición experimental	Media \pm SD	Comparación	p-valor
Control	100 \pm 4,98	vs H ₂ O ₂	0.000438 (***)
H ₂ O ₂	23,18 \pm 1,80		
Rayado solo (Sc)	27,47 \pm 2,76	vs H ₂ O ₂ 1h + Sc	0.00306 (**)
H ₂ O ₂ 1h + Rayado (Ss)	3,18 \pm 0,60		
Rayado bordes	95,38 \pm 8,31	vs H ₂ O ₂ 1h + Sc (bordes)	0.00108 (**)
H ₂ O ₂ 1h + Rayado (bordes)	30,92 \pm 4,64		

Tabla 3: Número de células presentes dentro del rayado respecto del porcentaje de células totales en el control (tomado como 100%):

Condición experimental	Media \pm SD	Comparación	p-valor
Rayado 48 h	52,2 \pm 7,15	vs H ₂ O ₂ 1h/Sc 48h	0.00678 (**)
H ₂ O ₂ 1h / Rayado 48 h	19,1 \pm 3,23		

Tabla 4: Área del rayado expresada respecto del área total del cultivo tomada a 5x (1.6mm²):

Condición experimental	Media ± SD	Comparación	p-valor
Rayado 48 h	5,06 ± 1,25	vs H ₂ O ₂ 1h/Sc 48h	0.0022 (**)
H ₂ O ₂ 1h / Rayado 48h	55,44 ± 5,13		

9.2 ESTADÍSTICAS DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 2

Tabla 5: Cuantificación de los efectos del tiempo de exposición a H₂O₂ sobre la densidad de las células gliales provenientes de animales de distinto sexo y genotipo:

Condiciones experimentales	Control	vs H ₂ O ₂ 1 h	vs H ₂ O ₂ 48h
Machos control No Tg (100% de viabilidad)	----	36,12 ± 3,27 p=0.01842 (*)	62,82 ± 16,84 p = 0.05326 (ns)
Hembras control NoTg	105 ,41± 7,53	40,24 ± 14,98 p = 0.00705 (**)	65,35 ± 18,82 p = 0.0511 (ns)
Machos control Tg	202,92 ± 29,32	61,50 ± 15,20 p = 0.0050 (**)	7,53 ± 1,18 p = 0.0073 (**)
Hembras control Tg	233,14 ± 49,28	100,47 ± 27,11 p= 0.025 (*)	46,12 ± 5,65 p = 0.027 (*)

Tabla 6: Comparación de la densidad de células gliales entre machos y hembras de distinto genotipo (No Tg y Tg) bajo condiciones control y tras 1 h o 48 h de exposición a H₂O₂:

Condiciones experimentales	M NoTg vs H NoTg	M NoTg vs M Tg	M Tg vs H Tg	H NoTg vs H Tg
Control	p=0.6475 (ns)	p=0,01140 (*)	p= 0,425 (ns)	p = 0,04349 (*)
H ₂ O ₂ 1h	p = 0.683 (ns)	p = 0.0956 (ns)	p = 0.114 (ns)	p = 0.0410 (*)
H ₂ O ₂ 48h	p = 0.438 (ns)	p= 0,0014 (**)	p= 0,0054 (**)	p = 0,0415 (*)

Tabla 7: Cuantificación de los efectos del tiempo de exposición a H₂O₂ sobre la densidad de la microglía en células provenientes de animales de distinto sexo y genotipo bajo condiciones control y tras 1 h o 48 h de exposición a H₂O₂.

Condiciones experimentales	Control	vs H ₂ O ₂ 1 h	vs H ₂ O ₂ 48h
Machos control No Tg (100% de viabilidad)	23,34 ± 3,66	17,63 ± 2,09 p=0.0957 (ns)	13,54 ± 2,06 p=0.0248 (*)
Hembras control NoTg	26,01 ± 2,21	22,61 ± 6,63 p = 0.473 (ns)	14,52 ± 0,89 p = 0.0057 (**)

Machos control Tg	13,10 ± 2,77	5,48 ± 1,39 p = 0.01458 (*)	0,0001 ± 0,0001 p = 0.00145 (**)
Hembras control Tg	14,25 ± 1,72	6,12 ± 2,52 p = 0.0132 (*)	2,90 ± 1,21 p = 0.00121(**)

Tabla 8: Comparación sobre la densidad de la microglía entre machos y hembras de distinto genotipo (No Tg y Tg) bajo condiciones control y tras 1 h o 48 h de exposición a H₂O₂.

Condiciones experimentales	M NoTg vs H NoTg	M NoTg vs M Tg	M Tg vs H Tg	H NoTg vs H Tg
Control	p = 0,4403 (ns)	p = 0,0415 (*)	p = 0,00234 (**)	p = 0,579 (ns)
H ₂ O ₂ 1h	p = 0,3214 (ns)	p = 0,0036 (**)	p = 0,471 (ns)	p = 0,0362 (*)
H ₂ O ₂ 48h	p = 0,6305 (ns)	p = 0,05261 (ns)	p = 0,0526 (ns)	p = 0,00028 (***)

Tabla 9: Cuantificación de la respuesta celular al daño mecánico en cultivos provenientes de animales de distinto sexo y genotipo (en presencia y ausencia de H₂O₂: Número de células presentes en el rayado.

Condiciones experimentales	vs rayado solo	vs H ₂ O ₂ 1 h/rayado 48 h	vs H ₂ O ₂ 48 h/rayado 48 h
Machos control No Tg (100% de viabilidad)	34,59 ± 7,21	13,55 ± 2,27 p = 0.02802 (*)	6,68 ± 2,10 p = 0.01555 (*)
Hembras control NoTg	20,81 ± 2,54	8,21 ± 3,86 p = 0.01297 (*)	4.13 ± 1.40 p = 0.001838 (**)
Machos control Tg	40,29 ± 7,32	12,95 ± 0,7 p = 0.0222 (*)	0.0001 ± 0.0001 p = 0.01082 (*)
Hembras control Tg	58,91 ± 6,12	11,75 ± 10,19 p = 0.004725 (**)	4.76 ± 0.98 p = 0.003515 (**)

Tabla 10: Comparación sobre el número de células presentes en el rayado entre machos y hembras de distinto genotipo (No Tg y Tg) bajo condiciones control y tras 1 h o 48 h de exposición a H₂O₂:

Condiciones experimentales	M NoTg vs H NoTg	M NoTg vs M Tg	M Tg vs H Tg	H NoTg vs H Tg
Rayado solo	0.0677 (ns)	0.3901 (ns)	0.0331 (*)	0.00365 (**) **
H ₂ O ₂ 1h/Rayado 48h	0.1236 (ns)	0.675 (ns)	0.856 (ns)	0.6201 (ns)
H ₂ O ₂ 48h/Rayado 48h	0.117 (ns)	0.00881 (**)	0.0494 (*)	0.0641 (ns)

Tabla 11: Cuantificación de la respuesta celular al daño mecánico en cultivos provenientes de animales de distinto sexo y genotipo (en presencia y ausencia de H₂O₂: Área de Rayado:

Condiciones experimentales	Rayado solo	vs H ₂ O ₂ 1 h/rayado 48 h	vs H ₂ O ₂ 48 h/rayado 48 h
Machos control No Tg (100% de viabilidad)	24,17 ± 4,21	51,63 ± 2,51 p = 0.001625 (**)	55,63 ± 5,44 p=0.001765 (**)
Hembras control NoTg	45,28 ± 4,03	57,63 ± 3,53 p = 0.0168 (*)	57,21 ± 2,88 p = 0.01722 (ns)
Machos control Tg	15,02 ± 5,44	80,63 ± 2,52 p = 0.000464(***)	85,01 ± 1,25 p = 0.001276 (**)
Hembras control Tg	7,41 ± 1,10	75,01 ± 3,759 p = 0.000447 (***)	93,75 ± 2,19 p = 0.0000114 (***)

Tabla 12: Comparación sobre los efectos del daño mecánico en cultivos provenientes de animales de distinto sexo y genotipo (evaluación de área de rayado a las 48 horas luego de 1 hora y 48 h de exposición a H₂O₂) bajo condiciones rayado solo y tras 1 h o 48 h de exposición a H₂O₂:

Condiciones experimentales	M NoTg vs H NoTg	M NoTg vs M Tg	M Tg vs H Tg	H NoTg vs H Tg
Rayado solo	p= 0.003316 (**)	p = 0.08674 (ns)	p = 0.1313 (*)	p = 0.002188(**)
H ₂ O ₂ 1h/Rayado 48h	p = 0.08136 (ns)	p = 0.0001459 (**)	p = 0.1073 (ns)	p = 0.004354 (**)
H ₂ O ₂ 48h/Rayado 48h	p = 0.6864 (ns)	p = 0.008537 (**)	p = 0.007838 (**)	p = 0.0001016 (**)

Tabla 13: Cuantificación de la AO de SRB en cultivos provenientes de animales de distinto sexo y genotipo en las distintas condiciones experimentales:

Condiciones experimentales	Control	H ₂ O ₂ 1h	H ₂ O ₂ 48h	vs Rayado solo	Sc vs H ₂ O ₂ 1 h/rayado 48 h	Sc vs H ₂ O ₂ 48 h/rayado 48 h
Machos control No Tg (100% de viabilidad)	100 ± 14,96	51,2 ± 17,1 p = 0.0200 (*)	65,6 ± 17,99 p = 0.0627 (ns)	107,62 ± 27,79 p = 0.532 (ns)	47,01 ± 10,76 p = 0.0649 (ns)	74,9 ± 3,39 p = 0.6608 (ns)
Hembras control NoTg	97,5 ± 14,13	57,5 ± 4,28 p = 0.0303 (*)	68,69 ± 13,65 p = 0.0639 (ns)	106,22 ± 16,9 p = 0.532 (ns)	51,79 ± 9,23 p = 0.0370 (*)	72,6 ± 18,8 p = 0.315 (ns)
Machos control Tg	114,8 ± 7,17	46,1 ± 5,89 p = 0.00005423 (***)	53,21 ± 1,94 p = 0.0004327 (***)	82,32 ± 15,58 p = 0.0509 (ns)	78,66 ± 46,89 p = 0.977 (ns)	49,3 ± 5,76 p = 0.07148 (ns)
Hembras control Tg	133,3 ± 15,4	49,4 ± 2,79 p = 0.00928	71,79 ± 3,98 p = 0.01549	87,64 ± 18,3 p = 0.0310 (*)	70,41 ± 7,27 p = 0.557 (ns)	53,8 ± 13,3 p = 0.191 (ns)

		(**)	(*)			
--	--	------	-----	--	--	--

Tabla 14: Comparación de la AO de SRB en cultivos provenientes de animales de distinto sexo y genotipo en las distintas condiciones experimentales:

Condición experimental	M NoTg vs H NoTg	M NoTg vs M Tg	M Tg vs H Tg	H NoTg vs H Tg
Control	p=0.843 (ns)	p=0.0486 (*)	p=0.811 (ns)	p=0.0416 (*)
H ₂ O ₂ 1 h	p=0.592 (ns)	p=0.665 (ns)	p=0.448 (ns)	p=0.0609 (ns)
H ₂ O ₂ 48 h	p=0.825 (ns)	p=0.355 (ns)	p=0.00602 (**)	p=0.737 (ns)
Rayado solo	p=0.563 (ns)	p=0.864 (ns)	p=0.885 (ns)	p=0.633 (ns)
H ₂ O ₂ 1h/Sc 48h	p=0.591 (ns)	p=0.363 (ns)	p=0.791 (ns)	p=0.0548 (ns)
H ₂ O ₂ 48h/Sc 48h	p=0.853 (ns)	p=0.00548 (**)	p=0.632 (ns)	p=0.238 (ns)

Parte del proceso de edición del presente documento contó con el apoyo de herramientas de inteligencia artificial (ChatGPT, OpenAI), utilizadas exclusivamente con fines de mejora estilística y organización del texto. La interpretación de los resultados, el contenido científico, el análisis y las conclusiones son íntegramente de mi autoría.