

PEDECIBA BIOLOGÍA
Subárea Biología Celular y Molecular
Tesis de Maestría

Caracterización ultraestructural de las células
AbAs obtenidas del modelo animal de esclerosis
lateral amiotrófica SOD1G93A

Lic. Marcie Jiménez Riani

Orientador: Silvia Olivera Bravo

Co-orientador (ANII): Luis Barbeito

Neurobiología Celular y Molecular (NBCM)

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

JUNIO 2014

INDICE

RESUMEN	5
1. ANTECEDENTES	6
1.1. <i>Astrocitos: generalidades</i>	6
1.2. <i>Funciones de los astrocitos</i>	9
1.3. <i>Respuesta de los astrocitos al daño del SNC y papel en la neurodegeneración</i>	11
1.4. <i>Células AbAs: aislamiento y caracterización inicial</i>	15
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	19
3. OBJETIVO GENERAL	19
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1. <i>Materiales</i>	20
6.2. <i>Animales</i>	21
6.3. <i>Cultivos primarios de astrocitos</i>	21
6.4. <i>Cultivos de células AbAs</i>	22
6.5. <i>Análisis de mitocondrias en células vivas</i>	23
6.6. <i>Inmunocitoquímica</i>	23
6.7. <i>Marcado del citoesqueleto de actina</i>	23
6.8. <i>Análisis de la expresión de proteínas por Western blotting</i>	24
6.8.1. <i>Extracción de proteínas de cultivos celulares</i>	24
6.8.2. <i>Cuantificación de proteínas</i>	25
6.8.3. <i>Desnaturalización de las muestras</i>	25
6.8.4. <i>Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida</i>	25
6.8.5. <i>Preparación de los geles de corrida</i>	26
6.8.6. <i>Siembra de muestras y corrida electroforética</i>	26
6.8.7. <i>Electrotransferencia de las proteínas a una membrana</i>	26
6.8.8. <i>Bloqueo e incubación con anticuerpos</i>	27
6.8.9. <i>Revelado con quimioluminiscencia enzimática aumentada (ECL, del inglés Enhanced ChemiLuminiscence)</i>	27
6.9. <i>Análisis de imágenes y de datos</i>	27
6.10. <i>Métodos empleados en MEB y MET</i>	28
6.10.1. <i>Procesamiento para MET en PLANO</i>	28
6.10.2. <i>Procesamiento para MET en plano: modalidad TOP</i>	30

6.10.3. Procesamiento para MET en plano: modalidad SIDE	30
6.10.4. Procesamiento para MET en pellet	30
6.10.5. Microtomía	30
6.10.6. Observación de muestras procesadas para MET	32
6.10.7. Procesamiento para MEB	32

7. RESULTADOS **32**

7.1. Análisis comparativo entre células AbAs y astrocitos	32
7.1.1. Los cultivos de AbAs no presentan inhibición por contacto y forman múltiples capas	33
7.1.2. Las AbAs y los astrocitos neonatales tienen similar expresión de vimentina y nestina	34
7.1.3. Las células AbAs tienen mitocondrias con apariencia diferente a las de los astrocitos neonatales	36
7.1.4. Presencia de marcadores de un “aparato secretor” en células AbAs	38
7.1.5. Las células AbAs tienen un alto estrés de retículo endoplásmico	39
7.2. Resultados de MEB: aportes al conocimiento de la topología de los cultivos de AbAs	40
7.3. Optimización de los métodos de siembra y de procesamiento de las células AbAs	43
7.4. Características ultraestructurales de las células AbAs	50
7.4.1. Organización general del cultivo	50
7.4.2. Núcleo	50
7.4.3. Citoplasma	50
7.4.4. Citoesqueleto de astrocitos neonatales y de AbAs	50
7.4.5. Retículo endoplásmico rugoso	52
7.4.6. Mitocondrias	54
7.4.7. Lípidos	54
7.4.8. Vesículas citoplasmáticas	57
7.4.9. Vesículas autofágicas	57
7.4.10. Gránulos o inclusiones densas	57

8. DISCUSIÓN **60**

8.1. Breve análisis de los abordajes empleados	61
8.2. Resumen de los resultados obtenidos	62
8.2.1. Las AbAs no presentan inhibición por contacto y se disponen en múltiples capas	62
8.3. Características morfológicas y ultraestructurales de las AbAs	64
8.3.1. Dimensiones, forma y núcleo	64

8.3.2. <i>Citoesqueleto</i>	64
8.3.3. <i>Organelos celulares</i>	65
8.3.4. <i>Retículo endoplásmico rugoso</i>	65
8.3.5. <i>Mitocondrias</i>	66
8.3.6. <i>Gotas de lípidos en el citoplasma de las AbAs</i>	67
8.3.7. <i>Agregados y formaciones citoplasmáticas</i>	68
8.3.8. <i>Evidencias morfológicas de una posible actividad secretoria aumentada en AbAs</i>	68
8.3.9. <i>Evidencias sobre actividad endocítica y autofágica en AbAs</i>	70
9. CONCLUSIONES	73
10. PERSPECTIVAS	74
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

RESUMEN

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa donde al menos parte de las células gliales, en particular los astrocitos, modifican su fenotipo protector por uno neurotóxico que tiene un papel activo en la muerte de motoneuronas característica de la enfermedad. Previamente, el grupo de trabajo había reportado el aislamiento de células gliales, altamente neurotóxicas de la médula espinal de ratas sintomáticas del modelo experimental de ELA SOD1G93A, cuyo número y cercanía con las motoneuronas sugiere que pueden tener un papel activo en la neurodegeneración (Díaz-Amarilla y cols., 2011). Estas células fueron denominadas AbAs (del inglés ***Ab***errant ***A***strocytes) dada su alta neurotoxicidad y su perfil atípico de marcadores astrocitarios, lo que sugiere el aislamiento de un fenotipo glial que no había sido reportado previamente. En este trabajo se realizó la caracterización morfológica y ultraestructural de este nuevo tipo celular. Mediante inmunocitoquímica, sondas fluorescentes, Western blotting y microscopía de fluorescencia, se observó que las AbAs se disponen en múltiples capas de células aplanadas, tienen un citoesqueleto pobre en filamentos intermedios, sus mitocondrias aparentan ser más pequeñas que la de los astrocitos, sufren un alto estrés de retículo endoplásmico y tienen una actividad secretoria significativa. Los resultados de microscopía electrónica de barrido confirmaron la disposición en múltiples capas de los cultivos de AbAs y la gran diferencia existente entre la apariencia de éstos cultivos que fueron obtenidos a partir de la médula espinal de animales adultos y los cultivos de astrocitos obtenidos de animales neonatales. Sin embargo, se evidenció una similitud morfológica significativa entre las AbAs y dichos astrocitos cuando se observaron las células individualmente. Luego de optimizar la forma de sembrado y procesamiento de las AbAs para microscopía electrónica de transmisión, se observó que las AbAs pueden crecer como agregados celulares donde coexisten células con diferentes formas y aparentemente diferentes estadios de diferenciación, que dentro y entre los agregados celulares hay una gran cantidad de matriz extracelular y un contenido lipídico importante que es evidenciado por una alta tinción con tetróxido de osmio. A mayor magnificación, las AbAs se presentan como células aplanadas con un núcleo prominente con parches de heterocromatina, no muestran una presencia significativa de los filamentos intermedios característicos de astrocitos, tienen un retículo endoplásmico desarrollado con vesículas muy dilatadas a las que se adhieren numerosos ribosomas en forma ordenada, las mitocondrias son pequeñas, de matriz oscura, parecen disponerse en una localización particular y hay gran cantidad de lípidos en forma de gotas que generalmente se encuentran cercanas a las mitocondrias. Se observó además una presencia importante de acúmulos, gránulos y formaciones de diferente electrondensidad que están distribuidas aleatoriamente en todo el citoplasma y que podrían indicar una actividad secretoria, endocítica y probablemente fagocítica y/o autofágica importante. El conjunto de resultados obtenidos y su análisis de acuerdo a la bibliografía existente sugiere que las AbAs tienen características ultraestructurales propias que difieren de las descritas para astrocitos considerados típicos. Sin embargo, es necesario un estudio comparativo detallado con astrocitos y microglía tanto de animales neonatales como de animales adultos para poder afirmar que las AbAs tienen un fenotipo no reportado anteriormente. De esta comparación pueden lograrse pistas para la búsqueda de marcadores específicos moleculares o bioquímicos que permitan el monitoreo de las AbAs tanto *in vitro* como *in vivo*.

1. ANTECEDENTES

1.1. *Astroцитos: generalidades*

Los astroцитos constituyen uno de los grupos celulares más numerosos del sistema nervioso central (SNC). Forman parte de la macroglía junto a los oligodendrocitos y células endimarias y podrían definirse como macroglía no mielinizante (Reichenbach, 1989, citado por Reichenbach y Wolburg, 2009). Aunque históricamente, los astroцитos han sido estudiados como un grupo celular homogéneo, la evidencia acumulada sugiere que conforman una población celular altamente heterogénea que puede diferir en localización, morfología, perfil de expresión génica, propiedades fisiológicas, función y respuesta al daño y la enfermedad (Zhang y Barres, 2010; Verkhratsky y cols., 2012). Pese a algunas excepciones como la Glía de Bergmann, la mayoría de los astroцитos, tanto los que están presentes en la sustancia gris (protoplasmáticos) como en la sustancia blanca (fibrosos) tienen una forma más o menos estrellada que difiere en el número y apariencia de los procesos celulares (Fig. 1). Los astroцитos protoplasmáticos tienen numerosos procesos radiales que extienden complejos lamelares muy finos que ocupan cerca del 50% del volumen y el 80% de la superficie celular. A su vez, la relación superficie:volumen aproximada de 10-20 μm^{-1} de los astroцитos protoplasmáticos permite un contacto efectivo con las superficies neuronales disponibles (Chao y cols., 2002). Los astroцитos fibrosos se encuentran en los tractos de sustancia blanca, el nervio óptico y la capa de fibras nerviosas de la retina vascularizada de mamíferos (Reichenbach y Wolburg, 2009). Generalmente se encuentran dispuestos en filas paralelas entre los procesos axonales, poseen numerosos pies perivasculares o subpiales y extienden sus procesos al espacio internodal entre axones adyacentes. Si bien sus procesos son más largos que los protoplasmáticos, son menos numerosos, lo que ocasiona una relación superficie:volumen menor ($\sim 5 \mu\text{m}^{-1}$). La densidad aproximada de astroцитos fibrosos es de 200000 por mm^3 mientras que la de astroцитos protoplasmáticos ronda entre 4000 y 30000 dependiendo de la región (Reichenbach y Wolburg, 2009).

En condiciones normales, los astroцитos se disponen formando sincitios comunicados por uniones comunicantes (conocidas en inglés como *gap junctions*), pero mantienen su territorio delimitado sin solaparse unos con otros. Su soma es usualmente más pobre en organelos que el de las neuronas, presenta un citoplasma claro y en la mayoría de los

casos, los paquetes de filamentos intermedios o los acúmulos de glucógeno son la característica más saliente (Peters y col., 1991; Maragakis y Rothstein, 2006; Pekny y Lane, 2007). Las mitocondrias no tienen un desarrollo prominente ni alta densidad, pero frente al daño, además de despolarizarse, disminuyen su tamaño y muestran diversos procesos degenerativos (Olivera y cols., 2008; 2011; Robert y Hervor., 2007; Kawamata y Manfredi, 2010). El núcleo de los astrocitos es prominente y puede adoptar formas diferentes. El nucleoplasma presenta generalmente cromatina laxa, excepto en las adyacencias a la envoltura nuclear, presenta nucléolos prominentes y se distribuye más uniformemente que en los oligodendrocitos y la microglía (Peters y cols., 1991; Reichenbach y Wolburg, 2009).

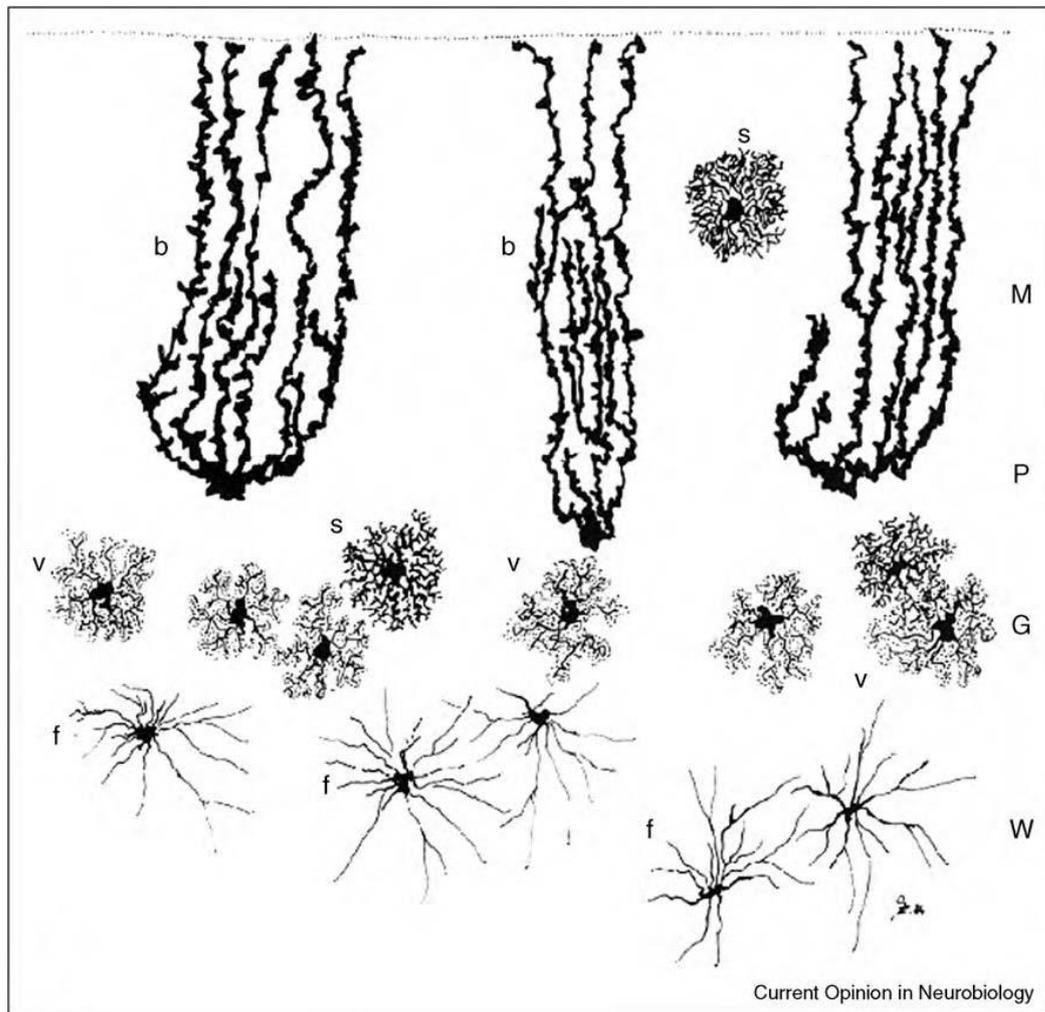


Figura 1: Un ejemplo de la heterogeneidad morfológica de los astrocitos. Esquema de astrocitos presentes en cerebelo humano realizados por Ramón y Cajal luego de emplear la tinción de Golgi. Las letras minúsculas indican los distintos tipos de astrocitos: b: Glía de Bergmann; s: astrocitos protoplasmáticos; v: astrocitos en vela; f: astrocitos fibrosos. M: capa molecular; P: capa de células de Purkinje; G: capa de granos; W: sustancia blanca. Tomado de Zhang y Barres (2010).

Los astrocitos presentan un citoesqueleto de actina que no ofrece particularidades significativas respecto de otras células, sin embargo presentan un repertorio variado y altamente modulable de proteínas de filamentos intermedios. La proteína principal de filamentos intermedios astrocitaria es la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, *del inglés Glial acidic fibrillar protein*), una proteína de tipo III codificada por un gen que se encuentra en el cromosoma 17 en humanos y cuya función principal es la protección de la estructura tridimensional de los astrocitos. La GFAP puede formar homodímeros o heterodímeros con vimentina, desmina y periferina, pero no puede ensamblarse con proteínas de tipos I y II por lo que las células que expresan ambos tipos de filamentos presentan redes separadas. La cantidad de GFAP que expresan los astrocitos está regulada por numerosos mecanismos entre los que se incluyen las citoquinas y las hormonas. Se ha descrito que su expresión se incrementa durante la "activación astrocitaria" y en diversas condiciones de daño (Maragakis y Rothstein, 2006; Sofroniew y Vinters, 2010; Verkhratsky y cols., 2012), sin embargo la falta de astrocitos GFAP positivos ha sido reportada como el único hallazgo significativo en la enfermedad de la sustancia blanca evanescente (Dietrich y cols., 2005), sugiriendo que la falta de GFAP puede estar asociada a condiciones de daño. La GFAP posee 5 sitios de fosforilación lo que produce una alteración de cargas que conduce a la desagregación y subsecuente ruptura de los filamentos intermedios que la contienen. Los filamentos intermedios de astrocitos presentan además niveles menores de nestina, vimentina y sinemina. La vimentina puede co-ensamblarse con la GFAP y se localiza junto con ésta en células gliales inmaduras o en cultivo, pero raramente está presente en astrocitos maduros. La nestina es una proteína de filamentos intermedios específicamente expresada en células troncales neurales y miogénicas, cuya expresión disminuye a medida que los astrocitos, neuronas u oligodendrocitos se van diferenciando. Su re-expresión en astrocitos es un indicador de daño al SNC (Pekny y Lane, 2007). La nestina no puede autoensamblarse ni co-ensamblarse con GFAP, por lo que únicamente forma heterodímeros con vimentina (Pekny y Lane, 2007). Los astrocitos sufren cambios característicos en la expresión de los filamentos intermedios en prácticamente todas las condiciones patológicas que afectan el cerebro, la médula espinal o la retina, incluyendo el neurotrauma, la isquemia y las enfermedades neurodegenerativas. Por ello, la existencia de cambios en la expresión de marcadores de filamentos intermedios astrocitarios podría dar pista sobre los procesos de daño donde estas células participan (Pekny y Lane, 2007; Sofroniew y Vinters, 2010).

Los astrocitos presentan además una poderosa inmunoreactividad para las tubulinas, la que puede modificarse frente a diversas condiciones físicas (Hesketh y cols., 1984), estrés oxidativo (Oliveira Loureiro y cols., 2013) o calcio libre (Sorci y cols., 2000), sin afectar necesariamente la forma de las células. Las proteínas de unión al Ca^{2+} de la familia S100 podrían tener un papel en la regulación del anclaje de los microtúbulos *in vivo*. Se ha reportado que S100 β puede asociarse a microtúbulos en astrocitos y líneas celulares astrocitarias, que es capaz de inhibir selectivamente el ensamblaje de GFAP sin afectar la estabilidad de los filamentos intermedios de vimentina y causar el desensamblaje de filamentos intermedios en una forma dependiente de Ca^{2+} , sugiriendo un rol importante en la regulación de la dinámica del citoesqueleto (Sorci y cols., 2000).

1.2. Funciones de los astrocitos

Los astrocitos son las células neurogliales más numerosas, morfológicamente heterogéneas y funcionalmente más diversas (Fig. 2). Participan en el control de la homeostasis del SNC en varios niveles, incluyendo el nivel molecular (regulan las concentraciones de iones, neurotransmisores y neurohormonas), metabólico (acumulan sustratos energéticos y suministran lactato a las neuronas), celular (están directamente involucrados en la neurogénesis), morfológico (definen la migración neural durante el desarrollo, controlan la sinaptogénesis y dan forma a la microarquitectura de la materia gris) y orgánico (la astroglia controla la formación y el mantenimiento de la barrera hematoencefálica) (Maragakis y Rothstein, 2006; Sofroniew y Vinters, 2010; Verkhratsky y cols., 2012). Además, los astrocitos parecen ser críticos para el censado químico ya que son capaces de detectar fluctuaciones sistémicas de CO_2 , pH y Na^+ y de iniciar la secuencia de programas comportamentales destinados a mantener la homeostasis. Los astrocitos también actúan como integradores en el SNC. En la sustancia gris, los astrocitos crean unidades neurovasculares relativamente independientes conectadas a los capilares a través de sus procesos perivasculares. Hallazgos recientes muestran que los astrocitos producen y liberan varios mediadores moleculares (prostaglandina E, óxido nítrico y ácido araquidónico) que pueden modular el diámetro de los vasos sanguíneos del SNC y el flujo de sangre de manera coordinada (Maragakis y Rothstein, 2006; Sofroniew y Vinters, 2010; Verkhratsky y cols., 2012).

Los astrocitos son además células altamente polarizadas que tienen un estrecho contacto con las neuronas y los vasos sanguíneos. Son componentes principales en las sinapsis y

en la unidad neurovascular. En condiciones normales, además del soporte metabólico y trófico a la neurona, regulan la excitabilidad neuronal y la neurotransmisión mediante el control de la disponibilidad de glutamato y GABA en la hendidura sináptica, el mantenimiento del reservorio de glutamato neuronal mediante el ciclo glutamato-glutamina que se realiza exclusivamente en el astrocito, la preservación de la homeostasis de potasio, por lo que además participan en la generación y el procesamiento de la información neural (Chao y cols., 2002; Araque y cols., 2014). Además, están dotados con múltiples receptores de neurotransmisores y secretan neurotransmisores y neurohormonas (ATP/purinas, glutamato, D-serina) que pueden regular la actividad de varias decenas de miles de sinapsis localizadas dentro de un dominio territorial astrogliar por diversas rutas parácrinas o a través del sincitio astrocitario. Este papel funcional, además del estructural clásicamente reconocido, ha llevado a que crecientemente se acepte que los astrocitos son actores cruciales en la sinapsis y que se vaya extendiendo y aceptando el concepto de “sinapsis tripartita” con el astrocito como tercer protagonista (Chao y cols., 2002; Araque y cols., 2014). Como se mencionó anteriormente, moléculas derivadas de astrocitos parecen jugar papeles críticos en la formación y mantenimiento de las sinapsis, en la migración neuronal así como en la poda sináptica durante la sinaptogénesis (Verkhratsky y cols., 2012).

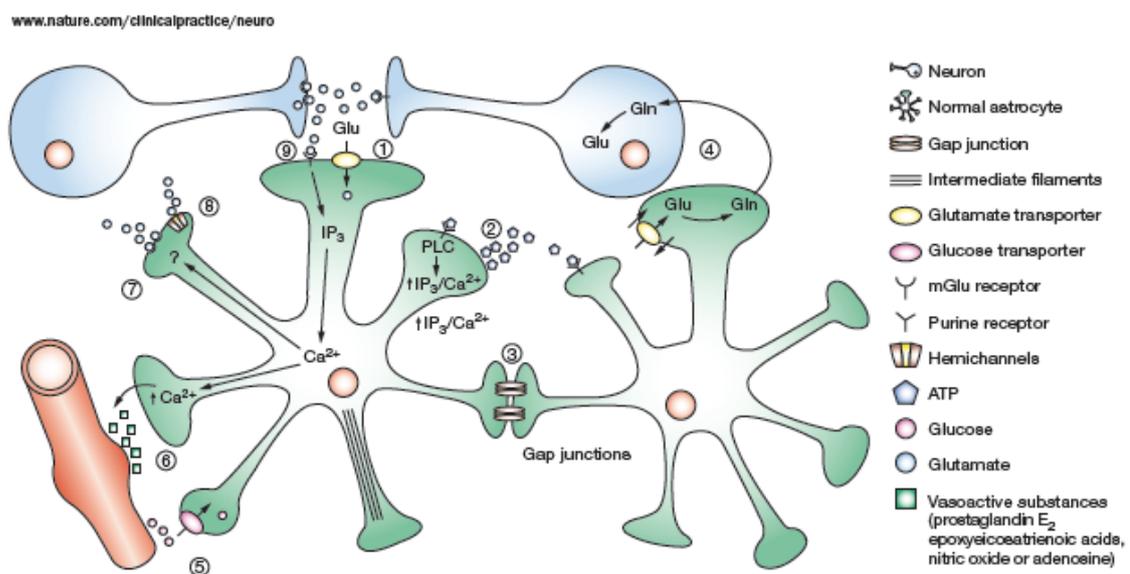


Figura 2: Resumen de las funciones normales de los astrocitos. Entre las principales funciones que los astrocitos realizan en condiciones normales se incluyen: modulación de la función sináptica a través de transportadores de glutamato (1), comunicación entre pares a través de la liberación de ATP que se une a receptores purinérgicos presentes en los astrocitos adyacentes (2), comunicación celular a través de uniones comunicantes (3), aporte de glutamato a las neuronas mediante el ciclo glutamato-glutamina (4), transporte de glucosa desde la vasculatura (5), liberación de sustancias que modulan la vasculatura (6), liberación de glutamato

o gliotransmisores (7), liberación de glutamato o gliotransmisores a través de los hemicanales (8), unión de glutamato a los receptores metabotrópicos que activan el calcio intracelular y producen liberación de sustancias vasodilatadoras (9). Tomado de Maragakis y Rothstein (2006).

Aunque tradicionalmente se aceptaba que los astrocitos eran células con un papel de soporte trófico y estructural pasivo a las neuronas, cuyas funciones se mantenían mayormente incambiadas, existe una creciente evidencia que muestra que los astrocitos tienen una participación activa en la progresión de enfermedades neurodegenerativas (Maragakis y Rothstein, 2006; De Keyser y cols., 2008; Sofroniew y Vinters, 2010; Verkhratsky y cols., 2012).

1.3. Respuesta de los astrocitos al daño del SNC y papel en la neurodegeneración

En respuesta al daño del SNC, los astrocitos responden adoptando un fenotipo reactivo (astrogliosis reactiva), caracterizado morfológicamente por hipertrofia de los núcleos y de los cuerpos celulares, aumento de la proliferación y desarrollo de procesos gruesos y largos con un alto contenido de GFAP (Fig. 3). La heterogeneidad astrogliar también se observa en respuesta al daño, pudiendo en algunos casos predominar los cambios morfológicos sobre la proliferación y en otros exacerbar la proliferación sin cambios morfológicos significativos. Además, los astrocitos de diferentes regiones del SNC no responden de la misma manera a un estímulo dado (Hill y cols., 1996) y dentro de una misma región las respuestas varían dependiendo del estímulo y de la cercanía de los astrocitos con dicho estímulo (Eddleston y Mucke, 1993; Sofroniew y Vinters, 2010). En tal sentido, se cree que la combinación de los diferentes mediadores producidos en el microambiente de la lesión va a determinar el fenotipo astrocitario reactivo final (Ridet y cols., 1997; Sofroniew y Vinters, 2010; Verkhratsky y cols., 2012).

Las alteraciones morfológicas que los astrocitos sufren en condiciones de daño son acompañadas además por cambios en la expresión de una amplia gama de proteínas del citoesqueleto, de superficie o de matriz extracelular, proteasas, factores de crecimiento y citoquinas, y de un cambio hacia una acción neurotóxica no protectora en muchas de las funciones homeostáticas que el astrocito normalmente realiza (Eddleston y Mucke, 1993; Maragakis y Rothstein, 2006; Verkhratsky y cols., 2012; Fig. 4) y que produce que los astrocitos tengan un papel activo en el daño del SNC.

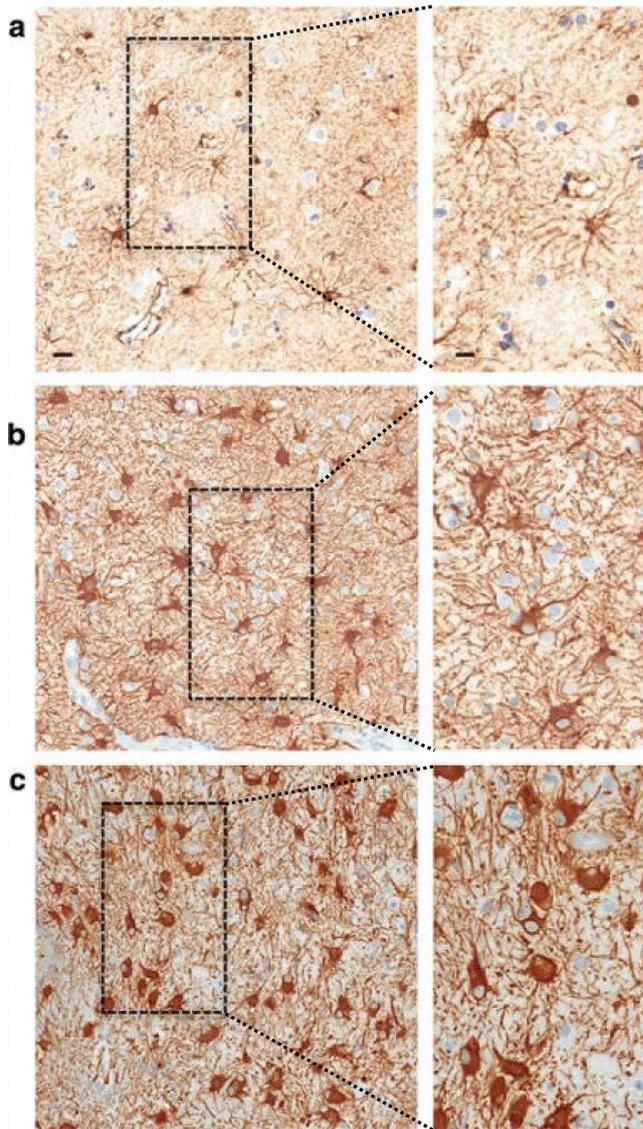


Figura 3: Diferentes grados de reactividad astrocitaria. Se muestran imágenes de inmunohistoquímica para GFAP y contratinción con hematoxilina en muestras autópsicas de pacientes humanos. **a)** Apariencia de astrocitos presumiblemente sanos, lejanos al sitio de lesión (con abundantes procesos finos); **b)** astrocitosis moderadamente reactiva caracterizada por una sobreexpresión de GFAP e hipertrofia del soma con acortamiento de procesos celulares; **c)** astrocitosis reactiva severa caracterizada por un gran aumento de GFAP, hipertrofia y proliferación de astrocitos en el núcleo de la lesión. Tomado de Sofroniew y Vinters (2010), con pequeñas modificaciones. Barras de calibración: izquierda = 25 μm , derecha = 10 μm .

La participación astrocitaria en la neurodegeneración ha sido claramente evidenciada en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), una enfermedad neurodegenerativa progresiva fatal, que afecta a las motoneuronas corticales y espinales, provocando una rápida degeneración muscular y parálisis progresiva que ocasiona la muerte entre 3 a 5 años tras el comienzo de los síntomas (Rowland y Schneider, 2001; Barbeito y cols., 2004). Aproximadamente un 10% de los casos de ELA son hereditarios y usualmente se comporta como un rasgo autosómico dominante. En un 10-20% de los casos hereditarios de ELA, la enfermedad es causada por mutaciones en el gen que codifica la enzima citosólica Cu/Zn Superóxido Dismutasa (SOD1; Rosen, 1993). Se han identificado más de 100 mutaciones en el gen que codifica para SOD1 que son capaces de generar la enfermedad. La identificación y aislamiento de estas mutaciones a partir de pacientes con ELA hereditaria ha permitido el desarrollo de modelos animales murinos de la enfermedad (Gurney y cols., 1994; Howland y cols., 2002). En estos

animales, la sobreexpresión de algunas mutaciones de SOD1 recapitulan fenómenos fisiopatológicos similares a los que ocurren en el ser humano, como la muerte de motoneuronas, la degeneración muscular y la subsiguiente parálisis progresiva hasta la muerte. Este proceso patológico no parece ser provocado por la pérdida de actividad catalítica de la SOD1 mutada sino que ha sido ligado a una ganancia de función neurotóxica que desencadena alteraciones en la química redox, la agregación proteica, la disfunción mitocondrial, el estrés de retículo, alteraciones en el transporte neuronal y la neuroinflamación (Boillee y cols., 2006).

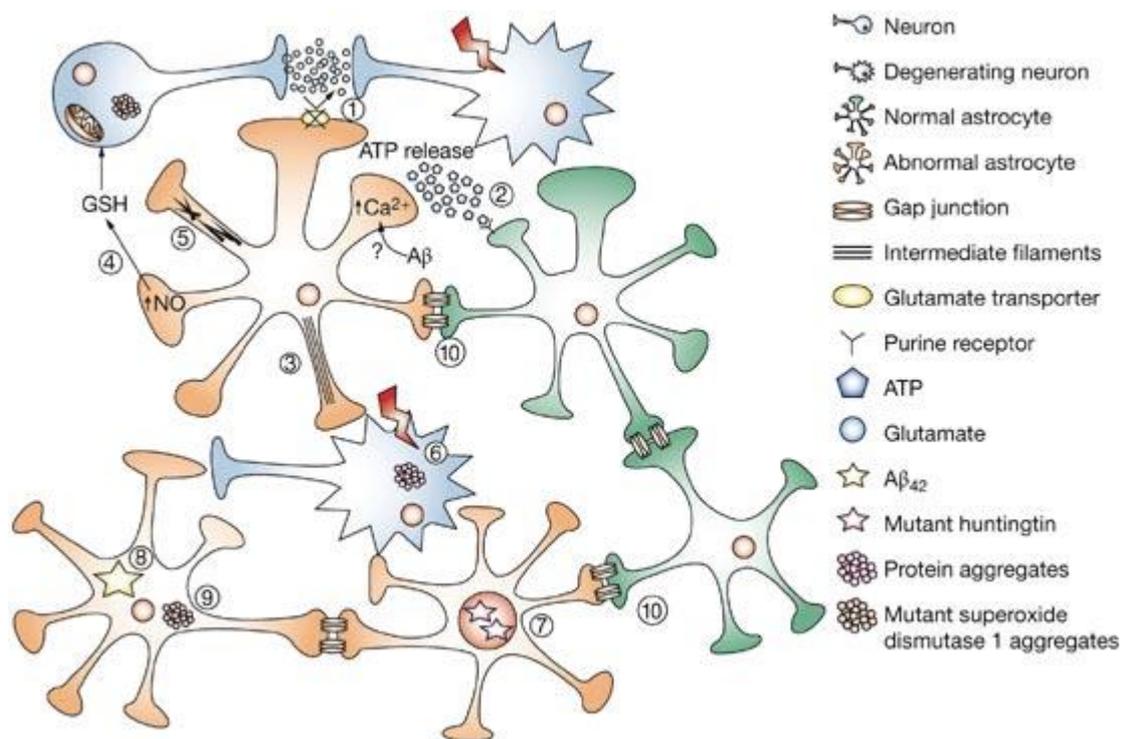


Figura 4: Disfunción astrocitaria en enfermedades neurodegenerativas. Entre las posibles alteraciones de los astrocitos se describen alteración de la función de los transportadores de glutamato con el consiguiente incremento de glutamato sináptico y riesgo de excitotoxicidad (1), cooperación del β -amiloide en el aumento de ATP liberado por astrocitos e interacción con uniones comunicantes (gap) para alterar la señalización de calcio y la comunicación glial (2), expresión aumentada de GFAP (3), liberación de glutatión (GSH) estimulada por óxido nítrico (4), mutaciones en GFAP relacionadas con el desarrollo de fibras de Rosenthal y desorganización de los filamentos intermedios (5), mayor susceptibilidad de las neuronas circundantes a los astrocitos y desarrollo de agregados proteicos y patología axonal en enfermedades neurodegenerativas (6), expresión de huntingtina mutada en astrocitos forma agregados intranucleares que influyen la muerte neuronal in vitro (7), abundancia de β -amiloide 42 en astrocitos reactivos en pacientes con Alzheimer (8), acumulación de SOD1 en astrocitos (9), comunicación entre astrocitos anómalos puede afectar la biología y función de los astrocitos normales (10). Tomado de Maragakis y Rothstein (2006).

Además, el desarrollo de ratones quiméricos obtenidos mediante la inyección de células embrionarias pluripotenciales salvajes en blástulas de ratones transgénicos SOD1G93A permitió obtener animales con diferentes relaciones entre células salvajes y células

portadoras de la mutación SOD1G93A. Con estos animales fue posible establecer que la sobrevida estaba directamente relacionada al número de células gliales que no presentaban la mutación ya que los ratones con menor número de células que expresaban la mutación tenían una sobrevida mayor (Clement y cols., 2003). Estos hallazgos permitieron demostrar que la toxicidad de la SOD1 mutada está mediada por un mecanismo “no-autónomo celular”. Este concepto implica que los mecanismos tóxicos que participan en la patología no afectan a un tipo celular en particular, sino que afectan varios tipos celulares. En el caso de la sobreexpresión de la SOD1 mutada, los efectos negativos se evidencian cuando la expresión de la mutación se produce en por lo menos dos tipos celulares, la neurona y la glía. Ni la sobre-expresión de la SOD1 mutada exclusivamente en neuronas (Pramatarova y cols., 2001; Lino y cols., 2002), ni exclusivamente en astrocitos (Gong y cols., 2000) fue capaz de desencadenar los eventos patológicos asociados a la ELA. Estos hallazgos fueron la base para hipotetizar que la pérdida o la alteración en la comunicación glia-neurona subyacen a los eventos neurodegenerativos reportados en la ELA (Clement y cols., 2003). En tal sentido, la eliminación de la SOD1 mutada específicamente en astrocitos realizada mediante ingeniería genética produjo un aumento de la sobrevida de ratones SOD1G93A, sin modificar el inicio de los síntomas, sugiriendo que el inicio de la enfermedad esta dictado por el daño neuronal y que las células gliales juegan un rol preponderante en la progresión. De acuerdo con este supuesto, los estudios *in vitro* han demostrado que los astrocitos que expresan mutaciones de la SOD1 presentan una toxicidad selectiva para las motoneuronas salvajes tanto en co-cultivo como a través de factores liberados (Vargas y cols., 2006; Nagai y cols., 2007; Cassina y cols., 2008). En el mismo sentido, se ha observado la presencia de astrocitos reactivos rodeando a las motoneuronas espinales degenerantes en etapas iniciales de la enfermedad, incluso antes de la fase sintomática (Kushner y cols., 1991; Schiffer y cols., 1996), sugiriendo que los astrocitos podrían tener un papel relevante en la muerte neuronal ulterior. En acuerdo con estas evidencias, en el asta ventral de la médula espinal de pacientes y en los modelos murinos de ELA se observan astrocitos hipertróficos que expresan altos niveles de GFAP y una batería de marcadores inflamatorios en forma progresiva y creciente a medida que la enfermedad avanza (Hirano, 1996). Por tal motivo, el estudio del papel de los astrocitos en la muerte neuronal en la ELA ha cobrado relevancia en estos últimos años. Por un lado, se ha reportado que astrocitos generados a partir de células madres neurales aisladas de pacientes con ELA (*post-mortem*) inducen la muerte de

motoneuronas en cultivo (Haidet-Phillips y cols., 2011). Esta es la primera evidencia de que los astrocitos de pacientes con ELA resultan tóxicos para las motoneuronas como había sido demostrado previamente en modelos animales (Vargas y cols., 2006; Nagai y cols., 2007; Cassina y cols., 2008). Por otro lado, se demostró que la inyección intraespinal de astrocitos SOD1G93A en ratas salvajes (no transgénicas) es capaz de inducir la muerte de motoneuronas desencadenando una disfunción respiratoria debido a la afección del nervio frénico (Papadeas y cols., 2011). En este sentido, aunque la expresión de las formas mutadas de la SOD1 exclusivamente en astrocitos no es suficiente para inducir la degeneración de las motoneuronas en ratones transgénicos SOD1 (Ridet y cols., 1997; Gong y cols., 2000), la escisión genética de las formas mutadas de SOD1 en astrocitos extendió la supervivencia de los animales y disminuyó la activación microglial (Mc Geer y Mc Geer, 2002). Se ha demostrado además, que los astrocitos que expresan formas mutadas de la SOD1 ejercen una toxicidad directa y selectiva a las motoneuronas mediante la secreción de factores solubles (Monsonero y Weiner, 2003; Hirsch y cols., 2003; Teismann y cols., 2003; Cassina y cols., 2008). Se ha demostrado además que astrocitos humanos derivados de médula espinal de personas con ELA esporádica pueden matar motoneuronas en cultivo, indicando que la toxicidad astrocitaria no está restringida a los modelos animales que expresan mutaciones de SOD1 (Mc Geer y Mc Geer, 2002). De esta forma, el estudio sobre la participación astrocitaria en el sufrimiento y/o muerte de las motoneuronas espinales en la ELA ha pasado a ser uno de los principales enfoques para comprender dicha patología neurodegenerativa. Sin embargo, aún faltan evidencias contundentes que muestren que todos los astrocitos son intrínsecamente neurotóxicos para las motoneuronas o si, en cambio, la toxicidad está restringida a una subclase específica de astrocitos.

1.4. Células AbAs: aislamiento y caracterización inicial

Trabajando para contestar esta pregunta, un primer trabajo del laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular (NBCM del IIBCE), reportó la identificación y aislamiento de una población astrocitaria con fenotipos diferentes al presentado por astrocitos prototípicos neonatales (Díaz-Amarilla y cols., 2011). Estas células fueron obtenidas de animales sintomáticos SOD1G93A (transgénicos, Tg) luego de aplicar el protocolo de rutina para obtener astrocitos espinales. En cambio, no pudieron obtenerse células que llegaran a confluencia de los hermanos no transgénicos (NoTg) de la misma edad (Díaz-Amarilla y cols., 2011). Las células aisladas de los animales Tg fueron

denominadas AbAs (del acrónimo en inglés *Aberrant Astrocytes*), presentaron un fenotipo diferente a los cultivos de astrocitos neonatales tomados como controles y una neurotoxicidad para motoneuronas espinales marcadamente mayor que la mostrada por astrocitos Tg neonatales portadores de la mutación SOD1G93A (Díaz-Amarilla y cols., 2011). Si bien en ese trabajo se muestra claramente que las AbAs SODG93A presentan algunos marcadores prototípicos de astrocitos neonatales, como la enzima glutamina sintasa y la proteína de unión a calcio S100 β , carecen de otros igualmente prototípicos como el transportador de glutamato astrocitario GLT-1 (Fig. 5).

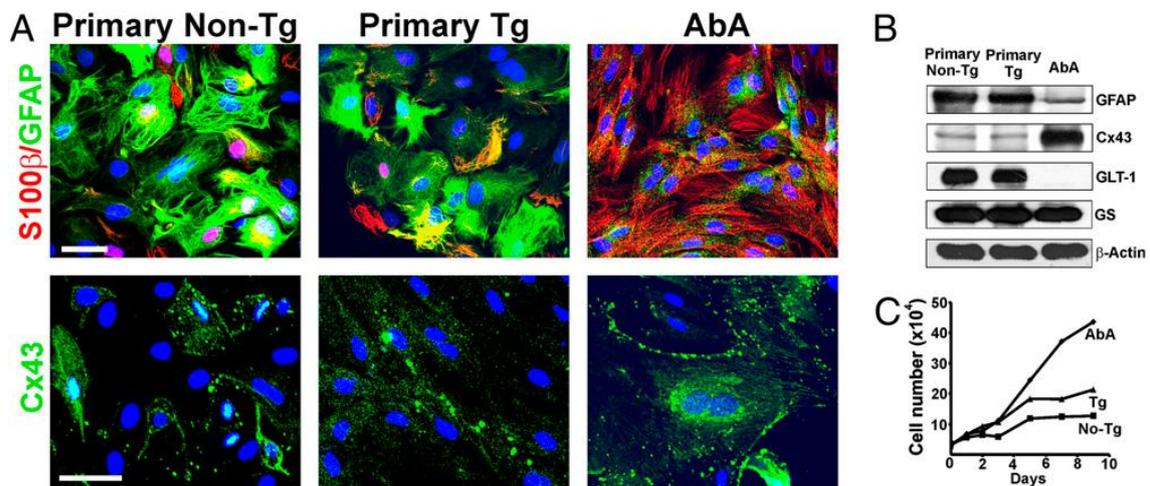


Figura 5: Expresión de marcadores astrocitarios y proliferación en cultivos de células AbAs. **A)** Inmunoreactividad para GFAP (verde) y S100 β (rojo) en cultivos confluentes de astrocitos neonatales NoTg, Tg y AbAs, evidenciando que las células AbAs presentan una disminución de GFAP fibrilar y una expresión perinuclear difusa y un aumento significativo de S100 β citoplasmática. Los paneles de abajo muestran un aumento significativo de la inmunoreactividad de otro marcador astrocitario: conexina 43 (Cx43) en las AbAs. **B)** Western blotting mostrando diferencias en la expresión de Cx43 y ausencia de expresión del transportador de glutamato GLT-1 en AbAs, además de un aumento significativo de la tasa de proliferación (**C**). Tomado de Díaz-Amarilla y cols. (2011).

Si bien las AbAs poseen escasa cantidad de GFAP, responden al desafío con forskolina de forma similar a los astrocitos típicos y muestran elevada expresión de conexina 43, la proteína que mayoritariamente forma las uniones comunicantes astrocitarias. Además, en tejidos de animales Tg se observaron células con características similares a las que muestran las AbAs y la existencia de una estrecha asociación entre la aparición de estas células y la fase sintomática de la enfermedad así como un aumento del número con el avance de los síntomas y la progresión de la enfermedad (Díaz-Amarilla y cols., 2011). Esto, sumado a la rápida progresión de los síntomas en el modelo animal SOD1G93A,

sugiere que las células AbAs podrían ser relevantes en la progresión de la ELA. La identificación de células similares a AbAs *in vivo* se basó fundamentalmente en la morfología, su cercanía con las motoneuronas y los diferentes niveles de expresión de los distintos marcadores astrocitarios. Sin embargo, hasta el momento no se identificó un marcador suficientemente selectivo que permita diferenciar las AbAs de los astrocitos reactivos, que posibilite además su identificación y monitoreo *in vivo* con un grado aceptable de certeza y reproducibilidad. Esto se hace particularmente necesario, ya que la presencia de células con características similares a las células AbAs también ha sido reportada en muestras autopsicas de pacientes con ELA (Migheli y cols., 1999), sugiriendo que la generación de células AbAs no sería una particularidad del modelo animal empleado, sino que células similares podrían desempeñar un papel en la enfermedad humana. Por ende, tanto en modelos experimentales de ELA como en pacientes humanos, las células AbAs podrían explicar algunos aspectos fisiopatológicos relevantes en la degeneración espinal característica de la ELA y constituir un blanco terapéutico novedoso para su tratamiento.

La caracterización inicial de las células AbAs mostró aspectos muy interesantes en cuanto a su comportamiento proliferativo, expresión de marcadores y toxicidad sobre la motoneuronas *in vitro*, sin embargo es necesario explorar el posible origen de estas células. En un trabajo reciente, nuestro grupo de trabajo del laboratorio de NBCM ha mostrado que éstas células provienen de una transdiferenciación desde el linaje microglial (Trías y cols., 2013; Fig. 6). En dicho trabajo, un cultivo de médula espinal de rata Tg sintomática preparado en condiciones estándares fue incubado con un marcador de microglía (CD11b) y todas las células positivas fueron seleccionadas por citometría de flujo antes de ser re-cultivadas. Al cabo de dos semanas en cultivo, las células seleccionadas perdieron la apariencia de microglía típica y adquirieron el fenotipo y los marcadores de las células AbAs. Estas características se mantuvieron en todos los pasajes posteriores. La co-expresión de marcadores de microglía y de astrogliosis en las células AbAs se muestra en la Fig. 6C, la que además muestra la respuesta a forskolina 10 μ M, considerada una característica propia de astrocitos (Díaz-Amarilla y cols., 2011). La adquisición del fenotipo astrocitario fue corroborada luego de incubar los cultivos ya transdiferenciados con leucín-metiléster que inhibe la proliferación de la microglía. Como lo muestra la Fig. 6D del trabajo de Trías y cols. (2013), este compuesto no afecta la supervivencia ni la proliferación de los cultivos transdiferenciados.

En cambio, cuando se exponen las células recién cultivadas -que son 99% CD11b positivas- a la misma concentración de leucín-metiléster no se observaron células viables.

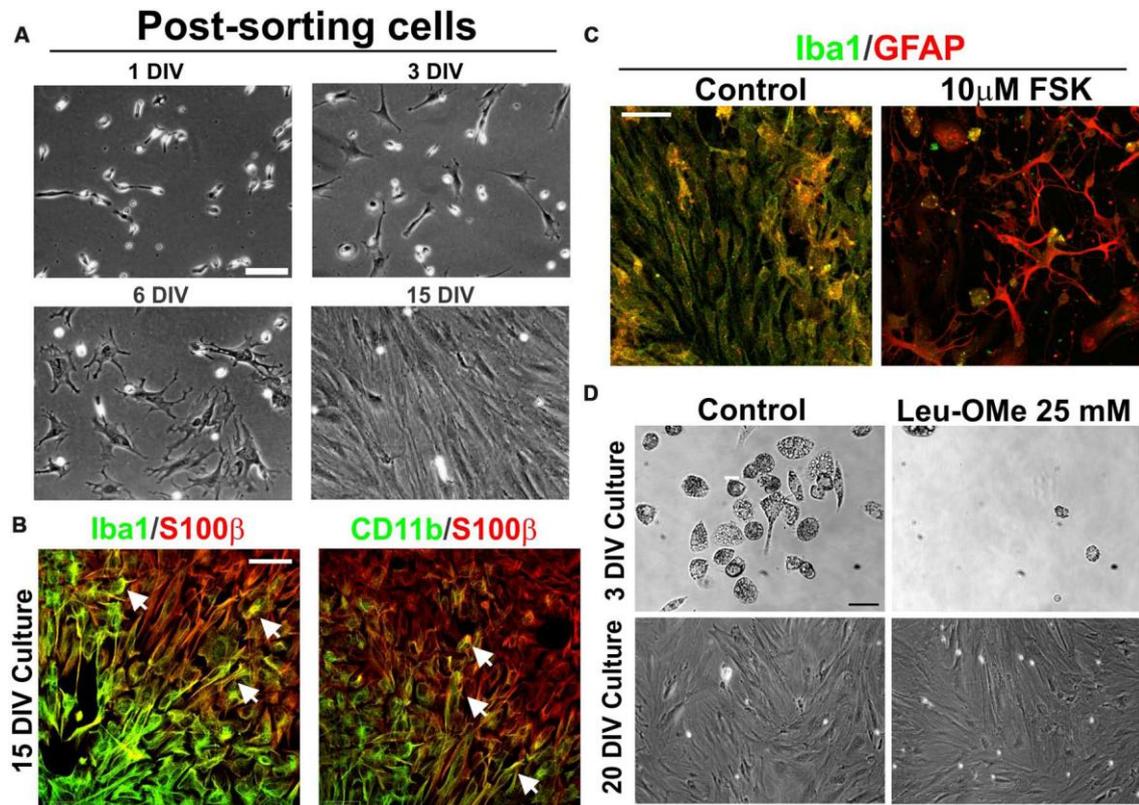


Figura 6: Transición fenotípica de la microglía en células AbAs en cultivo. **A)** Cultivos de microglía de médula espinal de animales SODG93A sintomáticos mostrando el cambio de morfología desde células microgliales típicas (1DIV) hasta células con un fenotipo muy similar a AbAs (15 DIV). **B)** Transición fenotípica evidenciando un continuo cambio en la expresión de los marcadores de microglía Iba1 y CD11b y del marcador astrocitario S100β. Las flechas muestran células doble marcadas. **C)** Se muestra el cambio de morfología en respuesta a forskolina 10 μM. **D)** Las imágenes de luz muestran como el Leucínmetilester (LeuOMe), un inhibidor de la proliferación y supervivencia de la microglía solo afecta la generación de las células AbAs antes de que la microglía se transdiferencie. Tomado de Trías y cols. (2013).

En las figuras de Trías y cols. (2013) también se evidencia como en el cultivo se va produciendo un desfasaje entre marcadores y la coexistencia de células con marcadores mixtos con otras que expresan marcadores de una sola estirpe celular. Por lo tanto, tomando en cuenta la evidencia generada por nuestro grupo que sugiere fuertemente que las células AbAs muestran marcadores de dos estirpes gliales lo que dificulta su identificación y búsqueda de marcadores específicos, es necesario un conocimiento profundo de estas células antes de proceder a su comparación con astrocitos considerados típicos. La exploración ultraestructural que planeamos puede dar aportes

valiosos no solo para entender e identificar la naturaleza de las células AbAs sino además para entender su estructura y función. El objetivo de este trabajo de tesis fue lograr una caracterización morfológica de dichas células como paso previo a un estudio morfológico comparativo con células neonatales y adultas de linaje astrocitario que parece ser el predominante luego de varios pasajes. Sin embargo, sería bueno realizar además una comparación con microglía adulta ya que éste parece ser el origen de las AbAs según sugieren Trías y colegas (2013). Por otra parte, si bien existen herramientas de biología molecular y proteómica que podrían colaborar con la identificación de los marcadores específicos de AbAs que permitan su diferenciación de los astrocitos, como las diferencias más notorias encontradas en los trabajos anteriores no son cualitativas sino que son cuantitativas y refieren a distintos niveles de expresión de marcadores prototípicos de astrocitos o microglía, creemos que el análisis de las células AbAs mediante diversos abordajes de microscopía aportará datos valiosos para su reconocimiento e identificación fiable tanto *in vitro* como *in vivo*.

El microscopio electrónico ha sido un instrumento esencial para el conocimiento de la morfología de células y tejidos, en particular para la investigación de la estructura fina del tejido nervioso. A modo de ejemplo, el empleo de MET en ELA ha permitido identificar las inclusiones hialinas similares a los cuerpos de Lewy en neuronas y astrocitos en el asta anterior de la médula espinal, las que son consideradas las características morfológicas distintivas de ELA a nivel celular. A nivel ultraestructural, ambos tipos de inclusiones muestran gránulos recubiertos de fibrillas y se ha demostrado que contienen SOD1 (Hirano, 2005).

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las células AbAs SOD1G93A presentan características celulares y ultraestructurales específicas que pueden permitir su clara identificación y diferenciación de astrocitos.

3. OBJETIVO GENERAL

Contribuir al mejor conocimiento de las características morfológicas de una población glial recientemente aislada e identificar las diferencias más notorias con respecto a las células consideradas controles típicos.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar y correlacionar las principales similitudes y diferencias morfológicas y de expresión de marcadores prototípicos entre células AbAs y astrocitos neonatales.
2. Identificar las características morfológicas y ultraestructurales más notorias de los cultivos establecidos de AbAs SOD1G93A.

5. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

Para cumplir con los objetivos previstos se utilizaron animales de la colonia SOD1G93A del NBCM, originada a partir de 4 casales de ratas Sprague Dawley portadoras de la mutación NTac:SD-TgN(SOD1G93A) que fueron compradas a Jackson Laboratories (USA). Este modelo, conocido como SOD1G93A, es uno de los modelos animales más aceptados y estudiados de ELA. Todos los estudios que forman parte de este trabajo se realizaron en cultivos primarios de astrocitos obtenidos de la médula espinal de ratas NoTg y Tg hermanas de un día de edad, que se obtuvieron de una madre NoTg y un padre heterocigoto portador de la mutación. Al momento de nacer, los animales fueron genotipados para determinar cuáles eran portadores de la mutación (Tg) y cuáles no (NoTg) y luego se realizaron cultivos en paralelo empleando 4 animales de cada grupo. Los cultivos de células AbAs se realizaron a partir de médula espinal de animales Tg SOD1G93A sintomáticos y se trabajó con cultivos establecidos entre los pasajes 4 a 10. Se realizaron 3-5 tandas de cultivo de cada tipo celular analizado. De cada tanda de experimentos se obtuvieron muestras para inmunocitoquímica, Western blotting, microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET). Para realizar el objetivo 1, los abordajes predominantes fueron inmunocitoquímica, empleo de sondas fluorescentes, western blotting, microscopía de fluorescencia y MEB. Todos los procedimientos fueron realizadas en simultáneo en cultivos confluentes de astrocitos NoTg, Tg y de AbAs entre el pasaje 4 y 10. Para llevar a cabo el objetivo 2, el abordaje empleado fue MET.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Materiales

El medio de cultivo (medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)), la tripsina y los antibióticos fueron comprados a GIBCO® (Invitrogen). El suero fetal bovino (FBS) fue comprado a PAA. El material plástico, botellas, placas de Petri y multipocillos fueron comprados a Corning y Greiner Bio-One. Otros reactivos como la albúmina sérica bovina (BSA), ADNasa y demás reactivos generales fueron comprados a Sigma, a menos que se especifique lo contrario. Los anticuerpos primarios fueron

adquiridos a Sigma, Santa Cruz Biotech o abcam. Los anticuerpos secundarios conjugados a sondas fluorescentes fueron comprados a Invitrogen.

Los insumos para microscopía electrónica (Aclar[®], medios de inclusión, grillas, cuchillas de vidrio, acetona, alcohol PPA) fueron adquiridos en Electron Microscopy Science (EMS). Las hojas de Aclar fueron cortadas en cuadrados de 1 cm² de área, limpiadas con etanol 70% y luego esterilizadas en autoclave a 1.1 atm durante 30 min. Luego fueron secadas en estufa y mantenidas estériles y secas a temperatura ambiente hasta su uso.

6.2. *Animales*

Se realizaron harenos con machos hemicigotos portadores de la mutación SOD1G93A (NTac:SD-TgN(SOD1G93A)L26H, Taconic, Jackson Laboratories desarrollados por Howland y cols. (2002) y ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley (SD) pertenecientes al bioterio del IIBCE. Al momento del nacimiento las crías fueron genotipadas y clasificadas como portadoras (Tg) o no portadoras (NoTg) de la mutación SOD1G93A y se mantuvieron con la madre hasta su utilización o el destete (21-23 días). Todos los animales fueron albergados en cajas con alimento y agua *ad libitum*, con un régimen controlado de temperatura y ciclos de 12 horas de luz/oscuridad. Se cumplieron con las normas institucionales de acuerdo a la Ley de Experimentación Animal (Ley N° 18.611). Todos los procedimientos experimentales realizados con animales fueron aprobados por el Comité de Ética del IIBCE.

6.3. *Cultivos primarios de astrocitos*

Se realizaron cultivos enriquecidos en astrocitos de médula espinal de ratas Tg y NoTg de 1-2 días de vida, siguiendo el procedimiento descrito en Díaz-Amarilla y cols., (2011). Brevemente, se extrajo la médula en condiciones estériles, se retiraron las meninges cuidadosamente y el tejido resultante se cortó en trozos con bisturí. Se realizó una disgregación enzimática con tripsina-EDTA (0.05% en solución salina de buffer fosfato (PBS)) durante 25 min a 37°C y luego se bloqueó la tripsina con DMEM + 10% FBS. Se agregó ADNasa 50 µg/ml y se completó la disgregación del tejido por pipeteo repetido. La suspensión celular se filtró en una malla de 80 µm y luego se centrifugó a 1000 rpm (centrífuga Sigma Centra CL-2) durante 10 min. El pellet resultante se resuspendió en 1 ml de DMEM-FBS y en una dilución 1:20 se contaron las células con cámara de Neubauer. Se sembraron aproximadamente 1.5 x 10⁶ células por botella de 25 cm² a la que se adicionaron 4 ml de medio de cultivo de astrocitos consistente en 13.37 g/l de DMEM, 3.6 g/l HEPES, 1.2 g/l NaHCO₃, 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 10% de FBS. Las células se mantuvieron en estufa de cultivo

a 37°C, en una atmósfera saturada de agua, 95% aire/5% CO₂. El medio se cambió cada 48 h. Cuando el cultivo celular alcanzó confluencia, se agitó a 180 rpm durante 48 h para desprender la microglía y la oligodendroglía y obtener una pureza mayor a 98% de astrocitos. 5 a 7 días después, las células se lavaron con PBS hasta retirar todo el medio de cultivo y se trataron con tripsina-EDTA 0.05% durante 5 min en estufa. Se bloqueó con DMEM-10% FBS, la suspensión celular se recogió en tubos estériles de 15 ml y se centrifugó 10 min a 1000 rpm. El pellet se resuspendió en 1 ml de DMEM-10% FBS y las células se sembraron a una densidad de 2×10^4 células/cm² en placas de Petri de 35 mm o sobre trozos de 1cm² de Aclar[®] estéril. El cambio de medio se realizó día por medio y la confluencia se alcanzó a la semana aproximadamente.

6.4. Cultivos de células AbAs

Los cultivos de AbAs se obtuvieron de médula espinal de ratas Tg y NoTg de 180-200 días de vida, siguiendo el procedimiento descrito por Díaz-Amarilla y cols. (2011). Brevemente, en un ambiente limpio fuera del cuarto de cultivo, se dislocaron los animales, se extrajo la médula y luego se colocó en tubo conteniendo 50 ml de medio de cultivo de astrocitos. Bajo campana de flujo laminar, el tejido se pasó sucesivamente por tres tubos con PBS estéril y las meninges se retiraron cuidadosamente. El tejido limpio se incubó con tripsina-EDTA (0.05% en PBS, 25 min a 37°C), la tripsina se bloqueó con DMEM + 10% FBS y se agregó ADNasa 50 µg/ml. Se completó la disgregación del tejido con pipeteo repetido, se filtró en malla de 80 µm y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min. Se resuspendió el pellet resultante en DMEM-FBS y se sembró en botella de 25 cm² a la que se adicionaron 5 ml de medio de cultivo de astrocitos. A las 24 h se cambió todo el medio para retirar la mayor cantidad de lípidos posible. Las células se mantuvieron en estufa en atmósfera saturada de agua a 37°C y 95% aire/5% CO₂. El medio se cambió cada 48h. Cuando el cultivo celular alcanzó confluencia, se procedió a su digestión con tripsina-EDTA 0.05% durante 5 min, se centrifugó y volvió a sembrar en botella de 25 cm². Se repitió este paso hasta 25 veces. Para este trabajo se utilizaron células entre los pasajes 4 a 10. Durante cada pasaje, desde el 4 al 10, la mitad de las células tripsinizadas se sembró en placas de 35 mm para los estudios de fluorescencia. Las células que fueron utilizadas en MEB o MET se sembraron sobre Aclar estéril de dos formas: “a la gota” o diluida. La siembra a la gota consistió en sembrar 4-6 gotas separadas de 10 µl cada una con una alta densidad de células, se dejaba adherir las gotas durante 30 min a 37°C en estufa y luego se completaba el volumen con medio de cultivo. La siembra diluida consistió en tomar la misma cantidad de células sembradas a la gota, diluirlas en un volumen de sembrado y sembrar sobre toda la superficie del Aclar. Todas las células se emplearon luego de alcanzar la confluencia, excepto para los análisis de MEB donde se emplearon

mayormente en subconfluencia (50-70%).

6.5. Análisis de mitocondrias en células vivas

Se siguieron los protocolos reportados en Olivera y cols. (2008; 2011). Brevemente, una vez en confluencia, los cultivos de astrocitos NoTg, Tg y de células Abas se lavaron con PBS termostatizado conteniendo 20 mM de glucosa estéril y 1 mM de CaCl₂. Luego se incubaron con 20 μM de MitoFluor Green (Invitrogen) en estufa de cultivo. Se retiró el colorante y se observaron inmediatamente en el microscopio confocal directo (Olympus FV300) del IIBCE con un objetivo de inmersión en agua a 40 o 60x y con una longitud de onda de excitación de 488 nm.

6.6. Inmunocitoquímica

Las células en cultivo se fijaron con 4% de paraformaldehído (PAF) en PBS durante 20 min y luego se permeabilizaron con 0.1% de Tritón X-100 durante 20 min de acuerdo al protocolo empleado en Olivera y cols. (2008; 2011). Luego, las células se bloquearon con 5% de albúmina sérica bovina (BSA) en PBS durante 60 min. Todos los pasos anteriores se realizaron a temperatura ambiente. Luego del bloqueo, las células se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante una noche a 4°C y en cámara húmeda. Se lavaron las células con PBS (3x, 5 min cada lavado) y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 90 min a temperatura ambiente. Se repitieron los lavados con PBS y se montaron con glicerol al 50% conteniendo 1 μg/ml de diaminofenilindol (DAPI). En todos los casos, se realizaron controles negativos, omitiendo los anticuerpos primarios o secundarios. La tabla 1 indica los anticuerpos empleados en este trabajo.

La visualización y captura de las imágenes se realizó en el microscopio laser confocal directo Olympus FV300 que está equipado con láseres de 405, 488, 546 y 633 nm y una cámara Olympus a una resolución de 1024x1024 o 2048x2048 píxeles. Se tomaron entre 5 a 7 campos por condición manteniendo los parámetros de adquisición iguales a los controles.

6.7. Marcado del citoesqueleto de actina

La citoarquitectura y la disposición de los filamentos de actina fue visualizada con faloidina, un péptido bicíclico que pertenece al grupo de toxinas aisladas del hongo *Amanita phalloides* que se une a los filamentos de actina (F-actina), inhibiendo su despolimerización. La faloidina es capaz de unirse estequiométrica y selectivamente a la F-actina en células fijadas y permeabilizadas y a concentraciones de saturación, es muy utilizada para visualizar los microfilamentos de actina por microscopía de fluorescencia

(Cooper, 1987). En este caso, se empleó faloidina conjugada a isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) para observar la fluorescencia en rojo. Brevemente, las células fijadas y permeabilizadas como se indicó anteriormente se incubaron con una dilución 1:250 de faloidina-TRITC (Invitrogen) durante 20 min a temperatura ambiente. Luego se enjuagaron rápida y cuidadosamente con PBS y se montaron en glicerol-DAPI. La visualización se realizó en el microscopio confocal FV300.

Tabla 1: Lista de anticuerpos empleados para inmunocitoquímica

<i>Anticuerpos primarios</i>				
<i>Antígeno</i>	<i>Tipo</i>	<i>Dilución</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Código</i>
S100beta	Monoclonal	1:500	SIGMA	S2532
GFAP	Policlonal	1:500	SIGMA	G4546
Secretogranina II	Policlonal	1:200	Sta Cruz Biotech	sc-1491
Cromogranina A	Policlonal	1:200	Sta Cruz Biotech	sc-1888
GRP78	Policlonal	1:200	abcam	ab-21685
<i>Anticuerpos secundarios</i>				
<i>Antígeno</i>	<i>Fluoróforo</i>	<i>Dilución</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Código</i>
Cabra anti-ratón IgG	Alexa Fluor 488	1:500	Invitrogen	A-11001
Cabra anti-ratón IgG	Alexa Fluor 546	1:500	Invitrogen	A-11003
Cabra anti-conejo IgG	Alexa Fluor 488	1:500	Invitrogen	A-11094
Cabra anti-conejo IgG	Alexa Fluor 546	1:500	Invitrogen	A-11035
Burro anti-cabra IgG	Alexa Fluor 488	1:500	Invitrogen	A-11055

6.8. Análisis de la expresión de proteínas por Western blotting

La técnica de Western blotting consiste fundamentalmente en la separación de proteínas mediante una electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida y posteriormente la transferencia de las proteínas separadas desde el gel a una membrana para su posterior incubación con los anticuerpos específicos.

6.8.1. Extracción de proteínas de cultivos celulares

Los cultivos de astrocitos NoTg, Tg y AbAs sembrados en placas de 35mm se enjuagaron rápidamente con PBS 10 mM, pH 7.4 y luego se rastrillaron (“*scrapping*”) con 80 µl de buffer de lisis de células. Se trabajó sobre hielo para minimizar la acción de proteasas. Posteriormente, se sonicó cada muestra individualmente (4-5 pulsos de 3 segundos cada uno) en hielo para romper las membranas y liberar el contenido celular.

Las muestras sonicadas se mantuvieron en hielo hasta su posterior cuantificación y posterior desnaturalización.

6.8.2. Cuantificación de proteínas

Se empleó el método del ácido bicinconínico (BCA) que es capaz de detectar el cobre (Cu^{+1}) reducido por las proteínas (reacción de Biuret), formando un complejo violeta-púrpura intenso en medio alcalino. La estabilidad del reactivo y del cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, sensible y que permite el uso de compuestos que afectan a otros métodos de determinación de proteínas. Brevemente, la técnica consistió en los siguientes pasos: se prepararon seis diluciones desde 0.25 mg/ml hasta 2 mg/ml de una solución stock de 10 mg/ml de BSA para realizar una curva de calibración con 6 muestras de concentración de proteínas conocida. En una placa de 96 pozos se sembraron por triplicado, el mismo volumen final de todas las muestras y dos muestras “blanco” consistentes en buffer de lisis de células. A cada pozo se agregó una solución 1:50 de sulfato cúprico en BCA (Sigma) manteniendo una relación 1:8 entre el volumen de las muestras y el volumen de la solución (70-100 μl). La placa se protegió de la luz, se colocó en estufa a 37°C durante 30 min y luego se midió la absorbancia a 562 nm en un lector de microplacas (Varioskan® Flash, Thermo Scientific). Se graficaron los datos de la absorbancia en función de las concentraciones conocidas del estándar de BSA, se ajustaron los puntos del estándar a una recta y se determinó el coeficiente de regresión, estimándose una aceptabilidad mínima de $R^2 \geq 0.98$. Esa recta ajustada se utilizó para calcular las concentraciones de proteína en las muestras problema, las que se expresaron en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

6.8.3. Desnaturalización de las muestras

A las muestras enriquecidas en proteínas ya cuantificadas, se agregó buffer de carga 5x (15% SDS, 0.3 M Tris buffer a pH 6.8, 25 % de glicerol, 1.5 M β -mercaptoetanol, 0.01 % azul de bromofenol), de forma que la concentración final del buffer fuera 1x. Las muestras se dejaron 5 min a 95°C en termobloque y se guardaron a -20°C hasta su sembrado en el gel.

6.8.4. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida

La electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (del inglés, Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) permite la separación de proteínas en función del peso molecular una vez que tienen una carga superficial similar. Para ello, es esencial la desnaturalización de las proteínas por el dodecil sulfato de sodio (SDS), un detergente aniónico que se une a las proteínas de forma estequiométrica. Los complejos SDS-proteína están cargados negativamente de forma uniforme (valor carga/masa constante) y adoptan una forma única desplegada, por lo

que en un campo eléctrico, estos complejos SDS-proteínas van a migrar desde el cátodo hacia el ánodo a una velocidad relacionada con su peso molecular. Ocasionando que las proteínas más livianas migren primero y las pesadas lo hagan más lentamente en función de su peso molecular.

6.8.5. Preparación de los geles de corrida

La electroforesis se realizó en un sistema de gel discontinuo, utilizando un gel concentrador (“*stacking gel*”) y un gel separador (“*resolving o separating gel*”). El gel concentrador contiene 4% de acrilamida y un pH ligeramente ácido. En este gel las proteínas se concentran en una zona muy reducida entre los iones cloruro del gel y los iones glicina presentes en el buffer de corrida, permitiendo que todas las proteínas se distribuyan uniformemente e ingresen al gel separador en el mismo momento. El gel separador debe presentar un tamaño de poro adecuado para la separación de las proteínas en función de su peso molecular.

6.8.6. Siembra de muestras y corrida electroforética

El par de geles se colocó en un soporte dentro de la cuba de electroforesis (Bio-Rad), se añadió buffer de corrida y se quitaron los peines. Sobre Parafilm[®] se depositó el volumen de muestra correspondiente a 30-40 µg de proteína y además 5 µl de marcador de peso preteñido de amplio rango (Biorad). Se igualaron los volúmenes de cada muestra con buffer de corrida y luego se sembraron en cada pocillo con una jeringa Hamilton. La corrida se realizó a 40 mA y voltaje libre durante 3:30 o 4 h aproximadamente o hasta que el frente de corrida alcanzara el borde inferior del gel. Una vez finalizada la corrida, se desarmó el soporte conteniendo los geles, los geles se desprendieron de los vidrios soportes y se armó el “sándwich” para la transferencia, luego de activar la membrana de PVDF con metanol 100% durante 10 s y re-equilibrarla con buffer de transferencia durante 5 min.

6.8.7. Electrotransferencia de las proteínas a una membrana

Se armó un sándwich apilando sucesivamente sobre una esponja plana, varias capas de papel de filtro empapado en buffer de transferencia, encima y respetando siempre el mismo orden se colocó el gel de corrida, la membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF, Thermo Scientific) en contacto directo con el gel, otras capas de papel de filtro y finalmente una esponja plana para formar un sándwich bien compacto sin burbujas de aire entre las capas. Todo se recogió entre dos tapas de plástico perforado (*cassette*) y se introdujo en una cuba con buffer de transferencia y dos electrodos planos. El *cassette* se dispuso de forma que el gel quedara dispuesto hacia el cátodo y la membrana de transferencia hacia el ánodo, hacia donde se espera que se desplacen los complejos

SDS-proteínas de carga neta negativa y se unan a la membrana de PVDF por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas cargada positivamente. Para controlar el calentamiento de la solución, al *cassette* se adosó una pieza de hielo preformado y toda la cuba se mantuvo sumergida en un recipiente con hielo durante la transferencia. La recirculación del buffer de transferencia se favoreció agregando un agitador magnético a la cuba. La transferencia se realizó a 300 mA y voltaje libre por un tiempo estimado de 1:15 – 1:30 h. La eficacia de la transferencia se comprobó incubando la membrana con 0.2% de Rojo Ponceau en 3% de ácido tricloroacético. El Rojo Ponceau se une inespecíficamente a todas las proteínas presentes lo que permite visualizar las bandas de proteínas en la membrana. Para proceder a la incubación con los anticuerpos, se eliminó el Rojo Ponceau lavando la membrana con TBS-Tween 0.1% hasta la completa desaparición del color rojo.

6.8.8. Bloqueo e incubación con anticuerpos

La unión inespecífica se bloqueó incubando la membrana de PVDF con 5% de leche en polvo en TBS-Tween 0.1% durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se incubó con los anticuerpos primarios correspondientes (ver Tabla 2) en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Luego, cada membrana se lavó con TBS-Tween 0.1% y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con una dilución 1:3000 del anticuerpo secundario correspondiente. Se lavó con TBS-Tween 0.1% y se reveló.

6.8.9. Revelado con quimioluminiscencia enzimática aumentada (ECL, del inglés *Enhanced ChemiLuminescence*)

El método se basa en la oxidación de un sustrato luminiscente en presencia de peróxido de hidrógeno y de HRP. La HRP conjugada al anticuerpo secundario, cataliza la oxidación del luminol, el que al oxidarse, pasa a un estado excitado y retorna a su estado basal, emitiendo luz capaz de velar una placa fotográfica (AGFA). Brevemente, la membrana de PVDF conteniendo las proteínas transferidas es secada y expuesta a una mezcla de los reactivos 1 y 2 de ECL (Pierce ECL, Thermo Scientific) durante 2-3 min. Luego se envolvió en papel film, se expuso sobre placa fotográfica en oscuridad, se reveló y fijó con soluciones comerciales de fabricación nacional (Química Cenit, SA).

6.9. Análisis de imágenes y de datos

El procesamiento de todas las imágenes de microscopía de fluorescencia y de Western blotting, la cuantificación de las áreas, número de células e intensidades de fluorescencia, se realizó con el programa Image J (NIH, USA). Todos los resultados que se muestran han sido obtenidos por la realización de 2-5 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con el test *t* de Student utilizando el programa Sigma Stat 2.0. Las diferencias entre grupos con valores de $p < 0.05$ fueron consideradas

estadísticamente significativas. Los valores representados en las gráficas corresponden a la media \pm SEM (error estándar de la media).

Tabla 2: Anticuerpos empleados para Western blotting

<i>Anticuerpos primarios</i>				
<i>Antígeno</i>	<i>Tipo</i>	<i>Dilución</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Código</i>
Secretogranina II	Policlonal	1:1000	Sta Cruz Biotech	sc-1491
Cromogranina A	Policlonal	1:1000	Sta Cruz Biotech	sc-1888
GRP78	Policlonal	1:2000	abcam	ab-21685
α actina	Monoclonal	1:4000	Sigma	A7607
<i>Anticuerpos secundarios</i>				
<i>Antígeno</i>	<i>Enzima conjugada</i>	<i>Dilución</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Código</i>
Cabra anti-ratón IgG	HRP	1:3000	BioRad	170-6516
Cabra anti-conejo IgG	HRP	1:3000	BioRad	170-6515
Burro anti-cabra IgG	HRP	1:2000	Sta Cruz Biotech	sc-2020

6.10. Métodos empleados en MEB y MET

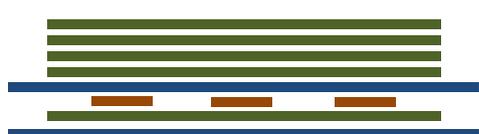
Para realizar estos abordajes se partieron de células en cultivo pertenecientes a una misma tanda o *batch*. Para cada condición, en cada placa de Petri de 35 mm se colocaron 4 trozos de Aclar sobre los que se realizó el sembrado de las células. Luego de la confluencia una parte de los cultivos se destinó al procesamiento en plano en sus dos modalidades. El resto se procesó como pellet. En algunas ocasiones, para el procesamiento en pellet las células se sembraron directamente sobre plástico.

6.10.1 Procesamiento para MET en PLANO

Las células sembradas sobre Aclar se procesaron en las placas multipocillo donde fueron cultivadas. Se retiró el medio de cultivo, se realizaron 3 lavados con PBS y se fijaron con glutaraldehído al 2.5% durante 24 a 48 h a 4°C. Luego, se realizaron 5 lavados con PBS de 5 minutos cada uno y se postfijó con tetróxido de osmio (OsO₄, Sigma) al 1% durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavó 5 veces con PBS y se procedió a la deshidratación en pasos sucesivos: 10 min en etanol 25°, 10 min en etanol 50°, 10 min en etanol 75°, 2 x 15 min en etanol 95° y 2 x 15 min en etanol 100°. Las piezas de Aclar sumergidas en etanol 100° se retiraron de las placas multipocillo y se

pasaron a material de vidrio teniendo especial cuidado que el Aclar quedara en la superficie basal en contacto con el vidrio y el cultivo expuesto hacia arriba. Se realizaron 3 pasajes de 5 min cada uno con acetona y luego se impregnó con araldita pasando la muestra sucesivamente por las siguientes mezclas: acetona-araldita 2:1; acetona-araldita 1:1 y acetona-araldita 1:2 por 20 min cada vez y luego en araldita pura. Las muestras se dejaron tapadas toda la noche, a 4°C.

En paralelo se prepararon los materiales para la inclusión en plano. Los portaobjetos de vidrio a ser empleados se lavaron cuidadosamente con etanol 70° y luego se pasaron por una solución de Liquid Release® (EMS). El mismo tratamiento fue realizado a tiras de Aclar limpias, de tamaño y forma similar a los portaobjetos de vidrio (para permitir que los bloques de araldita polimerizada se separaran del portaobjetos de vidrio). Se colocaron en Coplin y se dejaron polimerizando en estufa a 60°C durante toda la noche. Luego de 24 h, las muestras se sacaron de la heladera, se dejaron volver a temperatura ambiente y se retiraron de la estufa los materiales para armar los bloques en plano. Las muestras en Aclar se colocaron cuidadosamente sobre los portaobjetos de vidrio ya preparados, dejando siempre las células del lado opuesto al vidrio. Se colocaron unas gotas de araldita nueva encima de los cuadrados de Aclar que contienen las muestras y sobre ellos se colocan las tiras de Aclar preparadas anteriormente observando, bajo lupa, que no quedaran burbujas sobre la muestra. A continuación se colocaron 4 o 5 portaobjetos de vidrio para hacer peso sobre la muestra y se dejaron polimerizar en estufa a 60°C por 48 h. La cantidad de portaobjetos de vidrio que se coloque encima determinará el grosor del bloque: a más peso, más fino será el bloque obtenido (Esquema 1). Una vez polimerizados los bloques se retiraron todos los vidrios y las tiras de Aclar y los bloques de araldita en plano adheridos al Aclar sobre el portaobjetos de vidrio se procesaron de dos formas distintas: SIDE (cortes laterales, plano xz) y TOP (cortes horizontales, plano xy).



Portaobjetos
Aclar
Muestra
Soporte

Esquema 1. Muestra el armado de los materiales para obtener bloques de muestras en plano de células cultivadas sobre Aclar.

6.10.2. Procesamiento para MET en plano: modalidad TOP

El objetivo de este procesamiento fue observar cortes ultrafinos a varias alturas del cultivo, desde la parte más apical hasta la basal siguiendo los planos xy. Para ello, de los bloques planos obtenidos en el procesamiento anterior se recortaron con bisturí las zonas de interés y se pegaron horizontales en la punta de bloques ya polimerizados y se cortaron horizontalmente (esquema 2C).

6.10.3. Procesamiento para MET en plano: modalidad SIDE

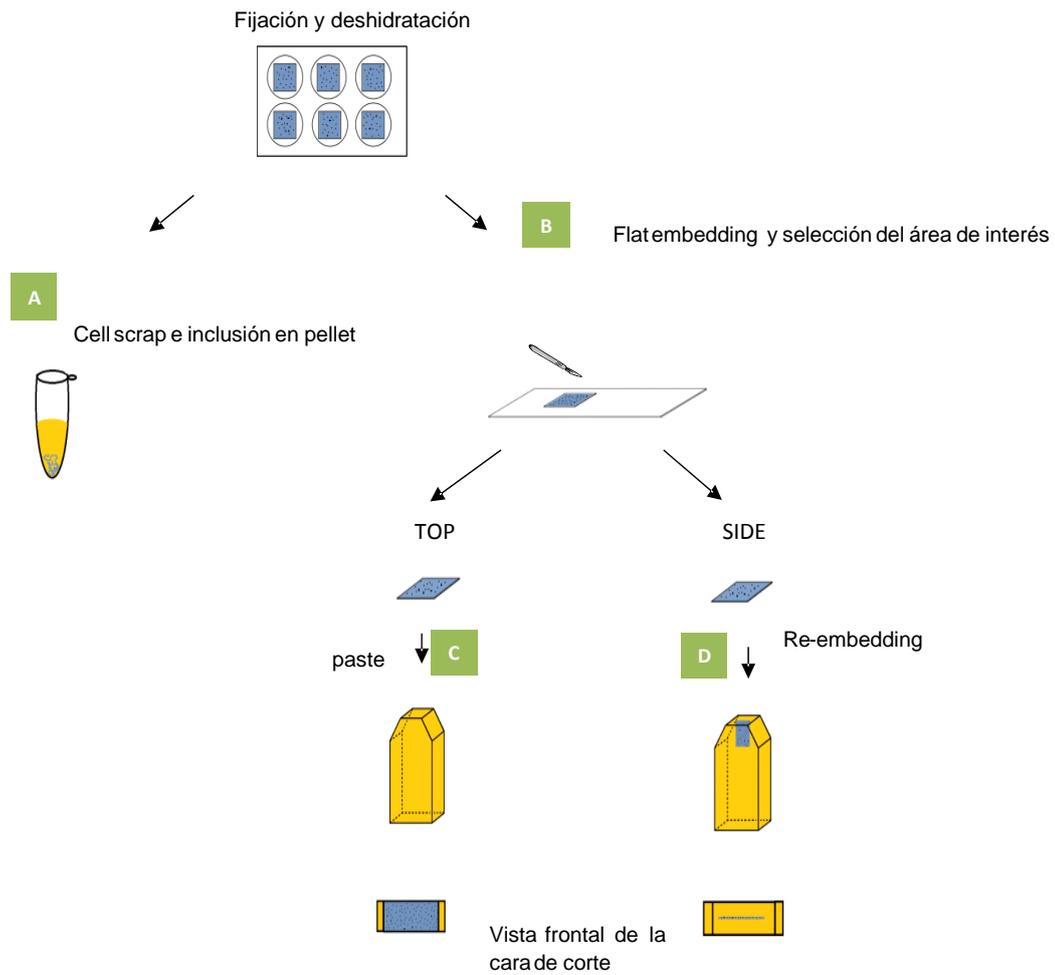
Este modo de procesamiento tuvo por objetivo observar cortes ultrafinos de la muestra de costado, desde la parte más basal del cultivo hasta la parte más apical en una misma imagen. Para ello se recortaron con bisturí tiras de la muestra incluida en araldita (la cual se despegó del Aclar y del vidrio mediante tratamientos con Liquid Release) y se colocaron en un molde de silicona de forma que la base que estaba sobre el Aclar quede en la base del molde. El resto del volumen se completó con araldita nueva y se dejó repolimerizar durante 48 h a 60°C (esquema 2D).

6.10.4. Procesamiento para MET en pellet

En este caso, la fijación y la posfijación fueron iguales que en el procesamiento en plano, pero luego de la posfijación con OsO₄ las células se levantaron del Aclar con un rastrillo (“*cell scrapper*”) y se pasaron a tubos eppendorf donde se realizó una centrifugación de 12000 g a 10 min. Todo el procesamiento del pellet, incluyendo lavados, deshidratación e inclusión se realizaron en los mismos tubos. El resultado final fue la formación de un pellet de células incluidas en araldita dentro de un tubo. Esta modalidad permitió obtener una mayor cantidad de células por corte y su observación en todas las direcciones (esquema 2A).

6.10.5. Microtomía

De todas las muestras para MET se obtuvieron secciones finas (100 µm) y ultrafinas (50-70 nm) con un micrótomo RMC MT-X. Las secciones semifinas se contrastaron con azul de metileno para elegir una zona de interés y realizar el retallado del bloque. Una vez localizada la zona de interés, se procedió a levantar cortes ultrafinos en grillas de cobre (de ventana y de retículo). Los cortes ultrafinos, se contrastaron con acetato de uranilo (2hs a 60°C) y citrato de plomo (10 minutos a temperatura ambiente en cámara libre de CO₂)



Esquema 2. Esquema del procesamiento de las diferentes muestras para MET en plano. Las células se siembran sobre una película de Aclar® film colocada en el fondo de cada pocillo. Las células son fijadas, osmificadas, lavadas, deshidratadas e incluidas en araldita “en plano” sobre el Aclar® film. A partir de ese momento tendrán distintos procesamientos. **A.** Las células son rastrilladas, colocadas en un tubo eppendorf e incluidas en araldita formando un bloque en pellet. **B.** las células son incluidas en plano sobre el Aclar® film. Este bloque plano es examinado y se seleccionan zonas de interés para su posterior procesamiento. **C.** La sección elegida se pega sobre la parte frontal de un bloque de araldita ya polimerizado (TOP) o **D.** La sección es reincluida en araldita y el bloque es repolimerizado (SIDE). Nótese en la parte inferior del esquema la vista frontal de la cara de corte de cada uno de estos bloques.

6.10.6. Observación de muestras procesadas para MET

Las imágenes se obtuvieron con un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM 1010, operando a 100kV, con cámara digital HAMAMATSU C4742-95 y software de control AMT ADVANTAGE. Se tomaron imágenes de todas las condiciones de tres cultivos diferentes de células AbAs y dos cultivos diferentes de astrocitos neonatales. El procesamiento y análisis de las imágenes se realizó empleando Photoshop CS6.

6.10.7. Procesamiento para MEB

La fijación de las células se realizó sobre Aclar con glutaraldehído al 2.5% como se explicó anteriormente para MET. Luego las células se lavaron con PBS y se realizó la deshidratación progresiva con soluciones de etanol de concentración creciente (50%, 70%, 90% y 100%), permaneciendo la muestra durante 10 min en cada solución. A continuación se realizó el secado de punto crítico (SPC) que permite conservar la estructura original sin colapso o deformación. El procedimiento realizado fue: las muestras se colocaron en el dispositivo de SPC (Denton Vacuum) utilizando una mezcla de etanol/CO₂ a presión y temperatura constante. Una vez eliminado el etanol, se fue aumentando la temperatura y la presión hasta llegar al punto crítico del CO₂, luego se liberó el remanente del gas disminuyendo la presión y las muestras secas se metalizaron con oro/paladio en el recubridor Sputter (*Sputter Coater*) a 30 mA, durante 120 segundos. Las muestras se observaron en el microscopio electrónico de barrido Jeol SSM-5900LV de la Unidad de Microscopía Electrónica de Barrido de Facultad de Ciencias (UdelaR) a una aceleración de voltaje de 20 kV.

7. RESULTADOS

7.1. Análisis comparativo entre células AbAs y astrocitos

La evidencia previa indica que pese a expresar marcadores astrocitarios típicos como GFAP y S100 β , las células AbAs muestran diferencias notorias en el nivel y en el patrón de expresión de estos marcadores, en la neurotoxicidad y en el comportamiento proliferativo cuando se comparan con astrocitos neonatales (Díaz-Amarilla y cols., 2011; Trías y cols., 2013). Sin embargo los primeros trabajos no pretendieron realizar una caracterización morfológica completa de las células AbAs, sino más bien dilucidar la relevancia de su presencia en el marco de la progresión de la ELA. En cambio, este trabajo de Tesis está dirigido a aportar más datos a la caracterización de las células AbAs para permitir su identificación tanto en cultivo como *in vivo*. Para lograr los

objetivos previstos, primero se realizó la comparación de las células AbAs con astrocitos neonatales, pues, pese a ser potencialmente producidas por una transdiferenciación de la microglía (Trías y cols., 2013); una vez en confluencia y luego de pasajes repetidos, las células AbAs pierden gran parte de los marcadores microgliales y adquieren el fenotipo y la expresión de marcadores astrocitarios.

Esta primera parte del trabajo se realizó empleando inmunocitoquímica, microscopía de fluorescencia, Western blotting y MEB como abordajes principales. Pretendió aportar datos a la comparación con los astrocitos neonatales en los aspectos que podrían tener mayor relevancia como causa o consecuencia de daño tales como inhibición por contacto, presencia de filamentos intermedios, mitocondrias y capacidad secretoria de las células AbAs. Todos estos aspectos sufren cambios en respuesta al daño y pueden ser factores que participen en su amplificación (Maragakis y Rothstein, 2006; Pekny y Lane, 2007; Sofroniew y Vinters, 2010; Verkhratsky y cols., 2012). En la segunda parte del trabajo, la MET fue el abordaje empleado para conocer en primer lugar las características ultraestructurales de las células AbAs relacionados fundamentalmente con los aspectos analizados en el objetivo 1 con vistas a iniciar la comparación con los astrocitos neonatales y de animales adultos en trabajos posteriores.

7.1.1. Los cultivos de AbAs no presentan inhibición por contacto y forman múltiples capas

El marcado con faloidina conjugada a un fluoróforo que emite en rojo permitió observar el citoesqueleto de las células en cultivo. Este abordaje permitió observar que los astrocitos neonatales forman monocapas unicelulares con territorios bien definidos donde las células no se solapan. En cambio, los cultivos de células AbAs no se disponen en monocapas (Fig. 7), sino más bien, que son células muy delgadas que se van entrecruzando y superponiendo en varias capas, cuyo número aumenta a medida que aumenta el grado de confluencia del cultivo. La delicada marca de la faloidina permite observar como los filamentos de las distintas células se entrecruzan unos con otros en distintas direcciones. El grado de solapamiento que se observa en los cultivos de células AbAs se evidencia en el inserto de la Fig. 7, donde el menor aumento permite observar una red de células superpuestas.

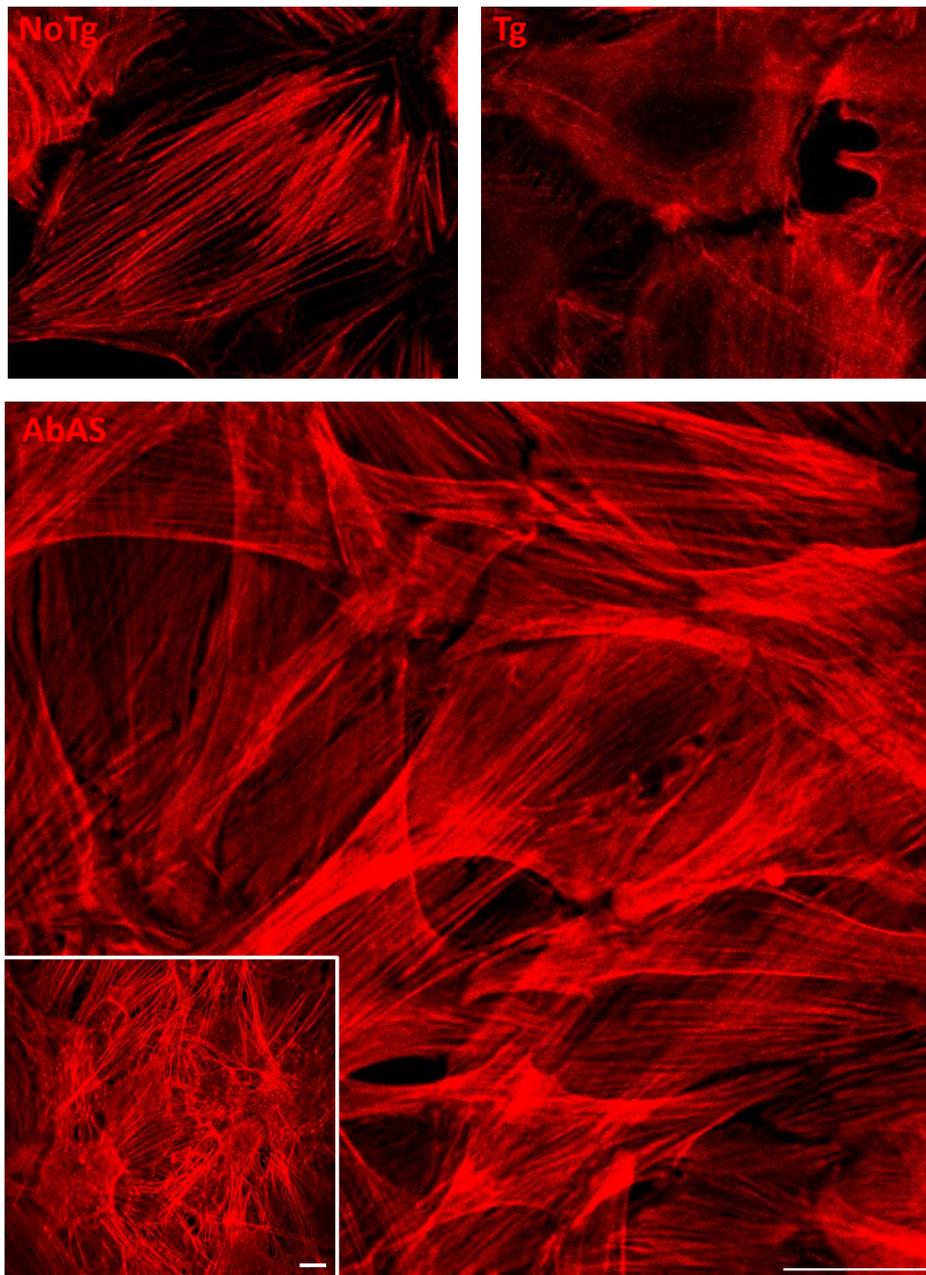


Figura 7: Las células AbAs no se disponen en monocapas como los astrocitos neonatales. Imágenes de microscopía confocal mostrando la tinción de los filamentos de actina con faloidina conjugada a TRITC en cultivos confluentes de astrocitos NoTg, Tg y AbAs. A diferencia de los astrocitos neonatales, las células AbAs forman diversas capas. El inserto muestra una visión panorámica de un cultivo de AbAs altamente confluyente. Las barras de calibración corresponden a 15 μm .

7.1.2. Las AbAs y los astrocitos neonatales tienen expresión similar de vimentina y nestina

Al analizar la expresión de GFAP en cultivos confluentes, se observó que las células AbAs presentaban una menor expresión de GFAP, una pérdida casi total de la inmunoreactividad fibrilar característica de astrocitos (Fig. 5) y una inmunoreactividad remanente en la zona perinuclear que era difusa no fibrilar que contrastaba con la marca clara del citoesqueleto en astrocitos neonatales. (Díaz-Amarilla y cols., 2011).

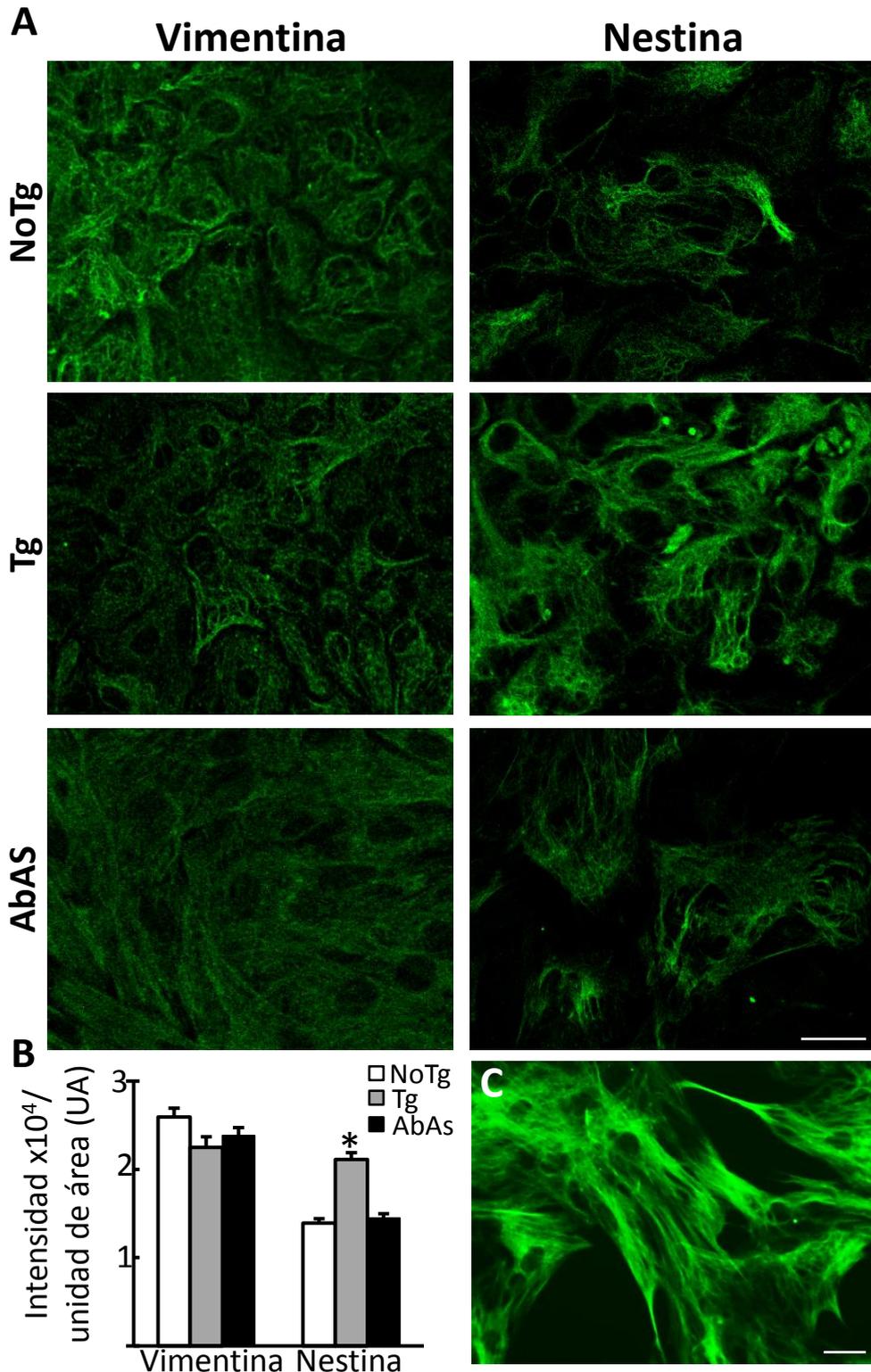


Figura 8: Las AbAs expresan vimentina y escasa nestina pero son ricas en tubulina.
A) Inmunoreactividad de vimentina y nestina en cultivos confluentes de astrocitos neonatales y células AbAs, mostrando ausencia de diferencias notorias en la inmunoreactividad de vimentina y un aumento de nestina en los astrocitos Tg donde la mayoría de las células son positivas, mientras que solo aproximadamente la mitad de astrocitos NoTg y AbAs son positivas. **B)** Cuantificación de la intensidad de las señales confirmando un aumento significativo de nestina en astrocitos Tg. **C)** Alta inmunoreactividad para α -tubulina en cultivos subconfluentes de AbAs. Las barras de calibración corresponden a 25 μ m.

Como los filamentos intermedios de astrocitos están compuestos además de GFAP por nestina y vimentina (Pekny y Lane, 2007), analizamos la inmunoreactividad de estos otros componentes de los filamentos intermedios de astrocitos. La inmunocitoquímica para vimentina realizada en cultivos confluentes de astrocitos NoTg, Tg y AbAs no mostró diferencias notorias en el nivel ni en el tipo de marcación obtenida (Fig. 8A). En cambio, el análisis de la inmunoreactividad para nestina mostró que los astrocitos Tg parecen tener una expresión mayor que los otros dos tipos celulares. Las AbAs presentaron una inmunoreactividad similar que los astrocitos NoTg, ambos casos, solo con algunas células del cultivo confluyente positivas a la nestina (Fig. 8A derecha). La cuantificación de la intensidad de la señal por unidad de área luego de tomar las imágenes en iguales condiciones de fotomultiplicación e intensidad de láser permitieron corroborar una ausencia de cambios significativos en la inmunoreactividad para vimentina en los tres cultivos analizados. Para nestina, no hubo cambios en la expresión en astrocitos NoTg ni en células AbAs. Los astrocitos Tg mostraron un aumento significativo en la expresión (Fig. 8B). Como era esperable, dada la escasez de proteínas de filamentos intermedios, las células AbAs presentaron una alta inmunoreactividad para la α -tubulina (Fig. 8C)

7.1.3. Las células AbAs tienen mitocondrias con apariencia diferente a las de los astrocitos neonatales

La disfunción mitocondrial astrocitaria se ha descrito en numerosas situaciones de daño al SNC (Cassina y cols., 2008; Olivera y cols., 2008, Kawamata y Manfredi., 2010) y puede evidenciarse por cambios que pueden ser observados mediante sondas mitocondriales adicionadas a células vivas. Los cultivos confluentes de astrocitos NoTg, Tg y de células AbAs se expusieron a MitoFluor Green (Invitrogen), una sonda fluorescente que evidencia las mitocondrias totales, independiente del potencial mitocondrial, y se observaron por microscopio confocal con un objetivo 60x de inmersión en agua. La Fig. 9 muestra como los astrocitos NoTg poseen mitocondrias alargadas cuya densidad mayor parece concentrarse alrededor del núcleo, aunque se observan abundantes mitocondrias en el resto del citoplasma más alejado de la región perinuclear. Los astrocitos Tg parecen tener una densidad de mitocondrias similar a los astrocitos NoTg pero parecen las mitocondrias de los astrocitos Tg tener un tamaño menor o una apariencia más fragmentada. Las células AbAs parecen tener mitocondrias de un tamaño similar a los astrocitos Tg, pero su presencia parece estar restringida a la zona perinuclear mayoritariamente, con escasa marcación en el resto del citoplasma.

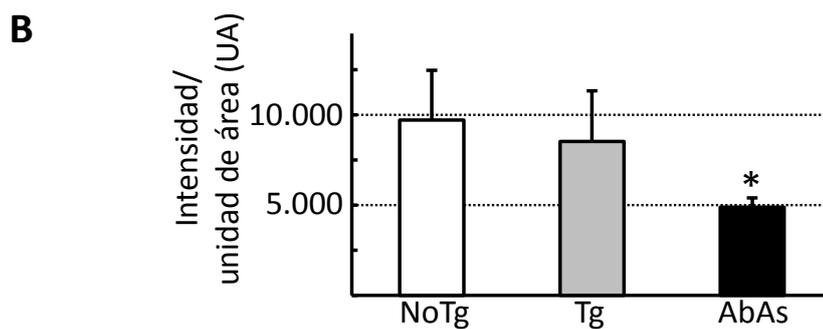
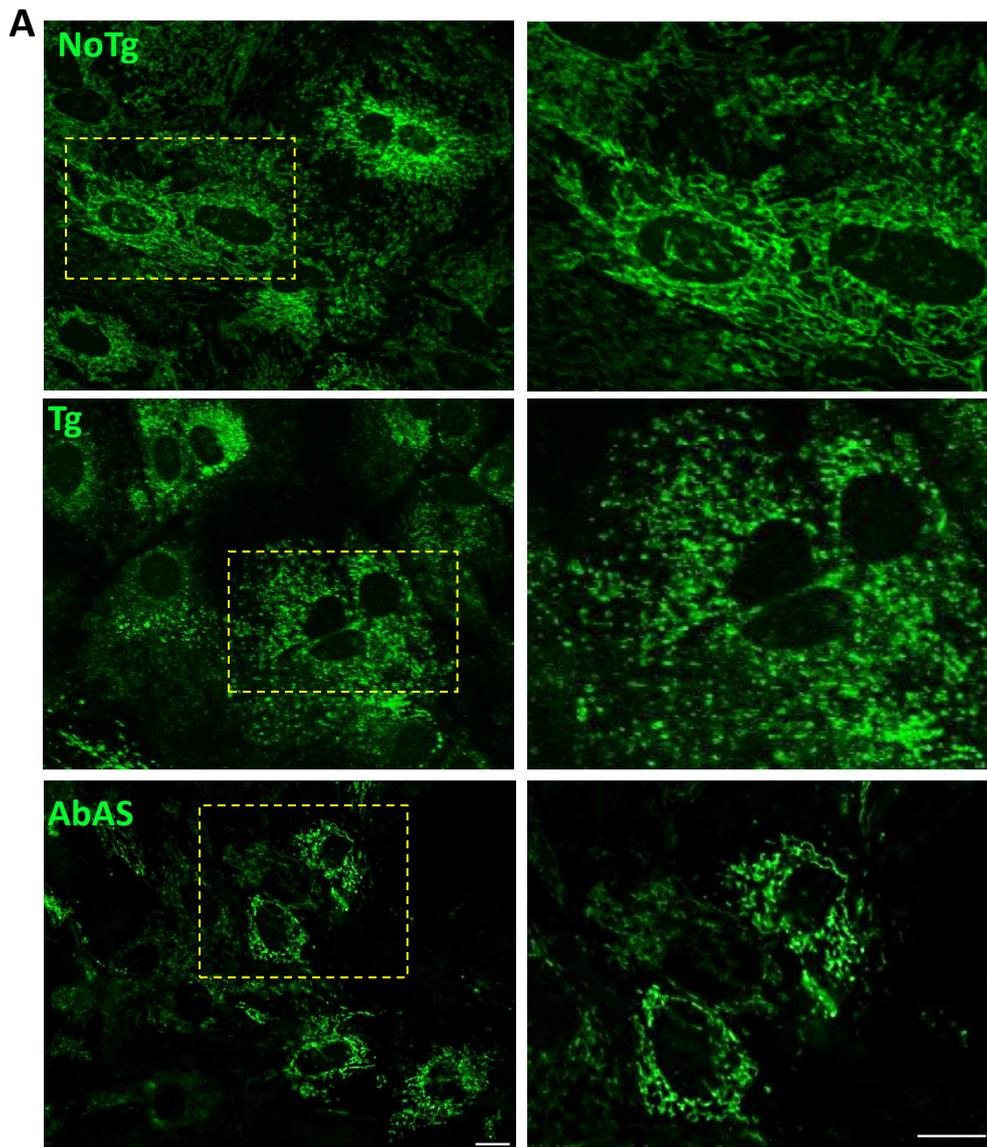


Figura 9: Las mitocondrias de las células AbAs parecen diferentes a las de los astrocitos neonatales: ¿son más pequeñas o las AbAs tienen menor masa mitocondrial? A) Imágenes representativas de microscopía confocal mostrando la tinción mitocondrial Mitofluor en cultivos confluentes de astrocitos vivos NoTg, Tg y AbAs. En los astrocitos neonatales se observa una marcación de mayor densidad rodeando el núcleo y mitocondrias dispersas en todo el citoplasma. Las AbAs muestran una marcación predominantemente perinuclear. Las mitocondrias de los astrocitos Tg y de las AbAs parecen tener un menor tamaño que las de los astrocitos NoTg como se observa en las imágenes a mayor aumento ubicadas a la derecha. **B)** Cuantificación de la intensidad de la señal de Mitofluor en cultivos confluentes captados manteniendo los parámetros iguales. * indica significación estadística para $p < 0.05$. Las barras de calibración corresponden a 12 μm .

Esta observación fue confirmada luego de medir el valor de intensidad de la señal por unidad de área luego de adquirir las imágenes en las mismas condiciones de adquisición (igual intensidad del láser e igual PMT) para todos los tejidos. La intensidad por unidad de área de Mitofluor es significativamente menor en los cultivos de células AbAs que en los cultivos de astrocitos neonatales (Fig. 9B) y los astrocitos Tg tienen en promedio una intensidad de señal menor que los NoTg cuya diferencia no alcanzó significación estadística. Como el Mitofluor es un marcador mitocondrial independiente del voltaje mitocondrial por lo que se considera un indicador de masa mitocondrial (Invitrogen, Olivera y cols., 2008), la menor marcación positiva que las AbAs tuvieron podría sugerir una menor masa mitocondrial, lo que debe analizarse con otras herramientas.

7.1.4. Presencia de marcadores de un “aparato secretor” en células AbAs

La altísima neurotoxicidad de las células AbAs mediada por factores solubles según Díaz-Amarilla y cols. (2011) sugería que estas células tenían una fuerte actividad secretoria, en las que incluso podrían secretarse formas mutadas de SOD1 como sugiere el grupo de Julien (Urushitani y cols., 2006). En ese mismo trabajo los autores reportan una co-localización parcial de las formas mutadas de SOD1 en la médula espinal de ratones modelos de ELA con las cromograninas. Sugieren además que estas proteínas pueden actuar como chaperonas para promover la secreción de las formas mutadas de SOD1 y proponen esta posibilidad como un nuevo mecanismo patogénico basado en la toxicidad de esas formas mutadas de SOD1. La presencia de dos marcadores típicos de granos secretorios como la cromogranina B y la secretogranina II (Sg II) (cromogranina C) fue reportada en las vesículas grandes de núcleo denso en astrocitos de muestras autópsicas de pacientes de ELA (Hur y cols., 2010). La expresión de SgII también fue reportada en astrocitos embrionarios y postnatales de hipocampo normales (Calegari y cols., 1999). Sin embargo no encontramos en la literatura, reportes de la presencia de graninas en astrocitos de médula espinal en cultivo.

La inmunocitoquímica para cromogranina A (Chr-A) y SgII no indicó ninguna inmunoreactividad positiva en cultivos confluentes de astrocitos neonatales espinales. En las células AbAs ambos marcadores mostraron una presencia citoplasmática difusa de ambas proteínas (Fig. 10A). Los experimentos de Western blotting mostraron un nivel de expresión modesto de ambas proteínas en todos los cultivos analizados (Fig. 10B) y la cuantificación de las áreas relativas a las áreas positivas para β -actina

muestran que comparado con los astrocitos neonatales, las células AbAs tienen una expresión relativa de SgII significativamente mayor. Los niveles de expresión de Chr-A fueron similares para los astrocitos y las células AbAs (gráfica de la Fig. 10B).

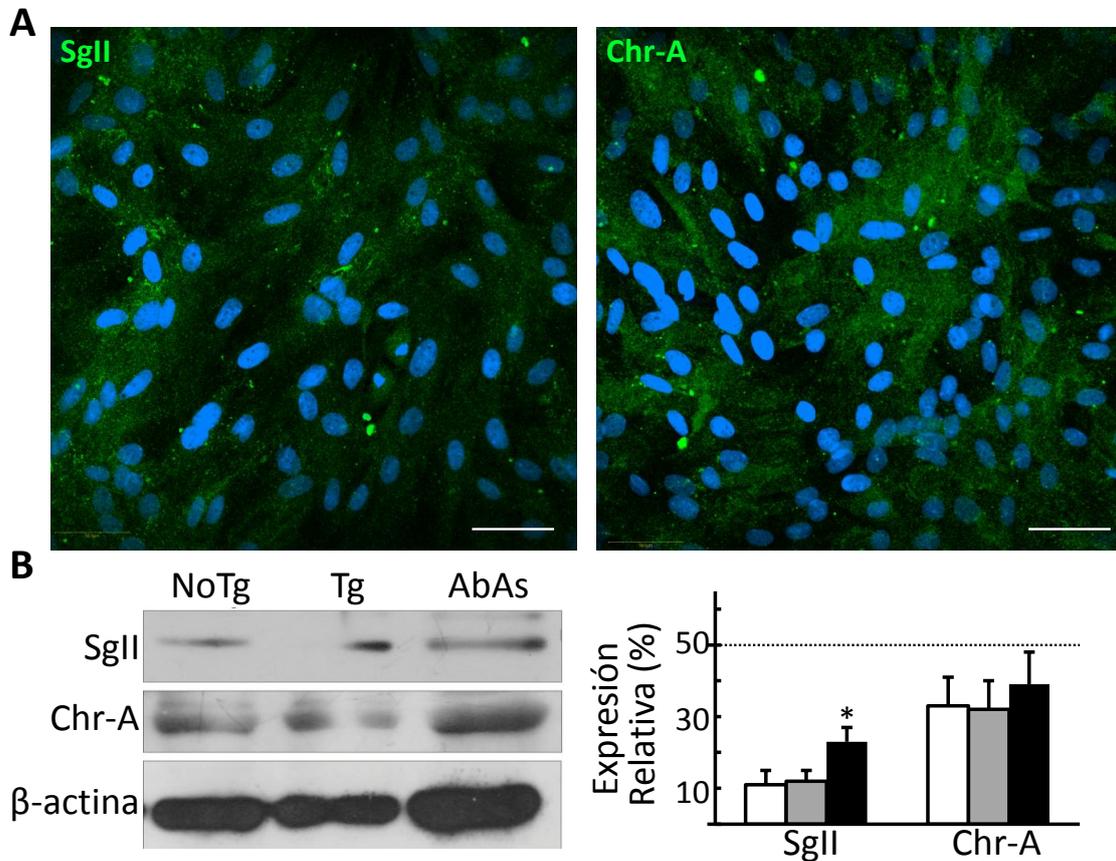


Figura 10: Las AbAs expresan secretogranina II (SgII) y cromogranina A (Chr-A). **A)** Imágenes de inmunofluorescencia mostrando una expresión difusa de SgII y Chr-A en cultivos confluentes de AbAs. No se muestran los resultados totalmente negativos en astrocitos NoTg y Tg. Las barras de calibración corresponden a 50 μ m. **B)** Western blotting evidenciando la presencia de SgII y Chr-A en cultivos de astrocitos neonatales y AbAs. La cuantificación de las áreas relativas a las áreas de β -actina muestran un aumento significativo de SgII en las AbAs cuando se compara con los de astrocitos. No hubo cambios significativos en la expresión relativa de Chr-A en ninguno de los cultivos analizados. * indica significación estadística para $p < 0.05$.

7.1.5. Las células AbAs tienen un alto estrés de retículo endoplásmico

El estrés de retículo endoplásmico (RE) es un mecanismo que podría participar en el daño realizado por los astrocitos que ha sido relativamente poco estudiado (Suzuli y Matsuoka, 2012; Walker y cols., 2013). Los tres sensores que traducen las señales del estrés de retículo permanecen inactivos mientras están unidos a la chaperona BiP/GRP78 (del inglés 78 *KDa glucose-regulated protein*), un regulador esencial de la homeostasis del RE, cuya expresión es vista como un marcador de estrés de RE debido a su regulación clave de la activación de los sensores de estrés (Mei y cols., 2013). El

análisis de Western blotting de la expresión de BiP muestra un aumento sumamente importante en las células AbAs (Fig. 11) cuando se compara con los niveles de expresión de astrocitos NoTg controles o tratados con Salubrinal, una sustancia utilizada experimentalmente para estudiar las respuestas de estrés celular asociado a la acción del factor 2 iniciador de la transcripción en eucariotas (eIF2; Fullwood y cols., 2012).

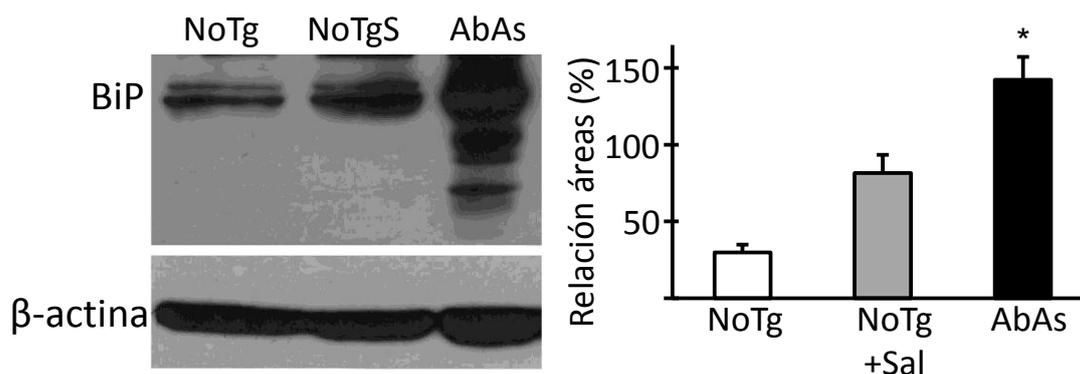


Figura 11: Las AbAs tienen una alta expresión del marcador de estrés de RE BiP7/GRP78. Se muestra un Western blotting evidenciando el gran aumento de la expresión de BiP en AbAs cuando se compara con los niveles observados en astrocitos neonatales NoTg controles o preincubados con 10 μ M de Salubrinal 003. La cuantificación relativa de áreas con respecto a las áreas de β -actina de cada muestra, indican la significación estadística del aumento observado en las células AbAs. * indica significación estadística para $p < 0.05$.

7.2. Resultados de MEB: aportes al conocimiento de la topología de los cultivos de células AbAs

Se realizó un análisis comparativo somero de los cultivos de AbAs y de astrocitos NoTg y Tg en condiciones de subconfluencia con el objetivo de corroborar los datos observados mediante fluorescencia y MET. Como se observa en la Fig. 12A, en condiciones de subconfluencia las células AbAs se disponen unas sobre otras, lo que da una apariencia particular al cultivo cuando se observa panorámicamente. A mayor aumento se evidencian las diversas capas de células y a una magnificación aún mayor se muestra claramente como las AbAs son extremadamente delgadas y se disponen en capas superpuestas de forma tal que es posible divisar las que están abajo. En la Fig. 12B se muestra panorámicamente un cultivo de astrocitos neonatales en condiciones de subconfluencia. Tanto para astrocitos NoTg como Tg, las células intentan cubrir toda la superficie como una sábana extendida, lisa, con casi nula ocurrencia de superposición. En la figura 12C se muestra la apariencia de las células AbAs, astrocitos NoTg y Tg a mayor aumento. Aunque parece haber una similitud mayor entre células AbAs y

astrocitos Tg, ambas luciendo como células más aplanadas que los astrocitos NoTg, todas estas células tienen una apariencia similar que no difiere de la típica apariencia de astrocitos en cultivo, reconocidos por ser células adherentes delgadas, con una apariencia poliédrica regular. Aunque las dimensiones celulares no difieren significativamente, las AbAs tienen una forma más ovalada donde la dimensión mayor supera en hasta 15 μm a la menor, los astrocitos neonatales tienen una apariencia más poliédrica con dimensiones principales en torno a las 30-45 μm . Los núcleos de todas las células estudiadas tienen una apariencia elongada con una dimensión mayor que ronda las 15 ± 1 μm y una dimensión menor en 2 a 4 μm . A diferencia de los astrocitos neonatales, los núcleos de las células AbAs presentan entre 4 a 9 formaciones redondeadas que no siguen un patrón de localización específico pero que tienen un tamaño promedio de 1.6 ± 0.3 μm (Fig. 12C, flechas, inserto).

Las diferencias mostradas anteriormente complementan los datos previamente conocidos de las AbAs (Díaz-Amarilla y cols., 2011; Trías y cols., 2013) pero no aportan aún suficientes pistas que lleven a una identificación clara y a su diferenciación de astrocitos. Con la realización del segundo objetivo se pretende tener un conocimiento profundo de las células AbAs que lleve a la identificación de sus características más notorias. Se considera que este paso es crucial antes de proceder a una comparación detallada con astrocitos neonatales y/o adultos.

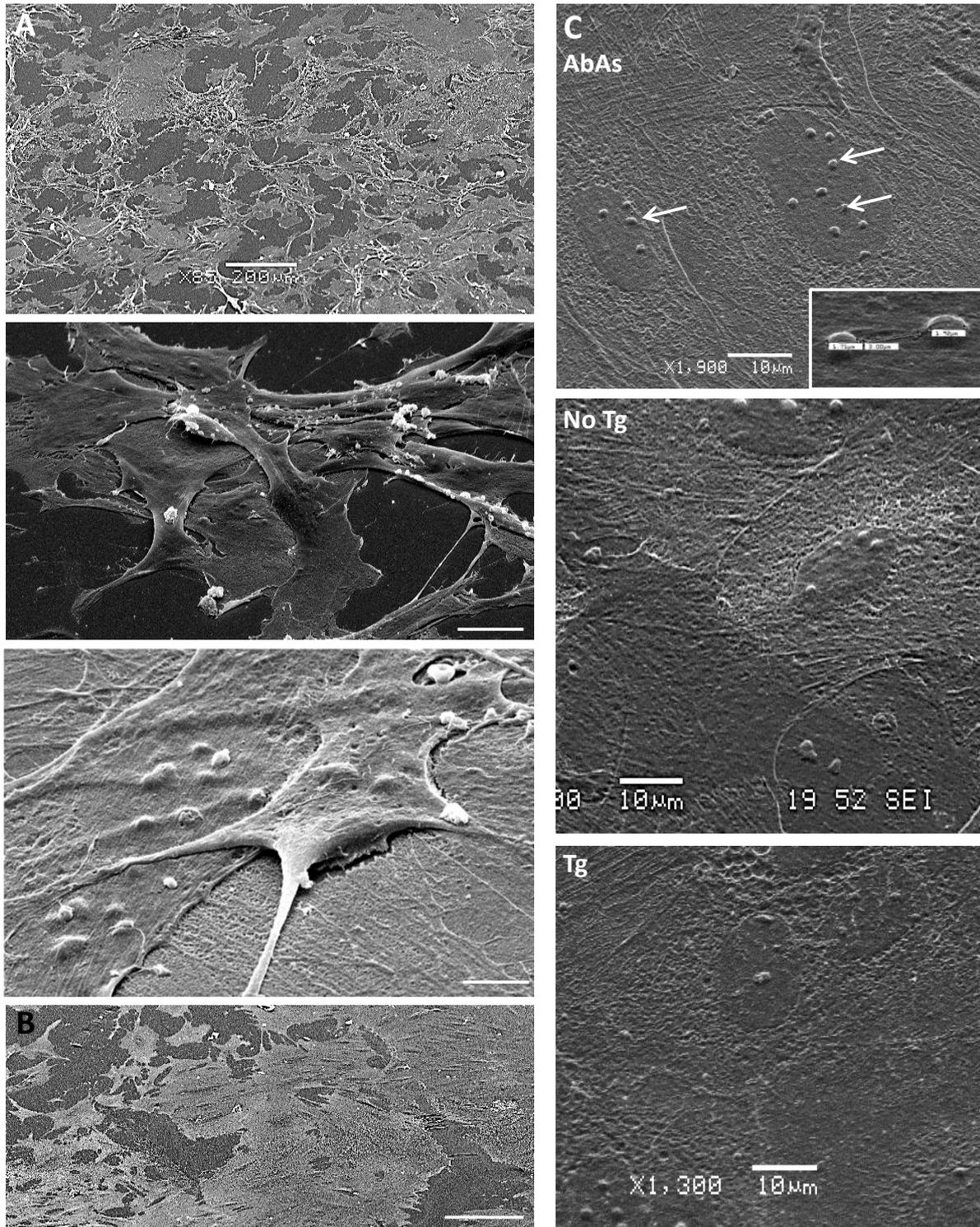


Figura 12: Resultados de MEB. A) Cultivos subconfluentes de células AbAs vistos a distintas magnificaciones. La vista panorámica superior muestra células superpuestas aun cuando hay espacios significativos no cubiertos por células. Las figuras del medio e inferior muestran células superpuestas en distintas direcciones. B) Vista panorámica de un cultivo subconfluyente de astrocitos Tg evidenciando como las células tienden a cubrir toda la superficie y a no disponerse en múltiples capas. C) Apariencia de las células AbAs y de astrocitos neonatales al MEB. Más allá de una apariencia más cercana a los astrocitos Tg, la apariencia de las AbAs no difiere significativamente de astrocitos neonatales. Las numerosas formaciones nucleares (flechas blancas, inserto) parecen ser un rasgo distintivo de las AbAs, aunque en Tg se ven en número menor.

7.3. Optimización de los métodos de siembra y de procesamiento de las células AbAs para su análisis por MET

Como en los estudios de MEB se observaron diferencias en las características generales del cultivo de células AbAs según la forma de, se decidió que para MET íbamos a trabajar con cultivos de células AbAs sembradas a la gota, ya que permitía obtener más células por batch y el cultivo presentaba características más interesantes para ser estudiadas mediante MET, como por ejemplo la formación de agregados celulares visibles a simple vista luego de preparado el bloque (Figs. 13 y 14).

Para realizar un análisis exhaustivo del cultivo, se realizaron tres modalidades de procesamiento: en plano modalidad TOP, en plano modalidad SIDE y en pellet. Cada abordaje realizado (Esquema 2) proporcionó información distinta y complementaria. Con la modalidad en plano TOP, el cultivo fue abordado desde la zona más apical hacia la región basal, a medida que se iban recogiendo distintos cortes. Esta opción permitió analizar la organización interna de cada célula y las zonas de interacción con las células vecinas, sin perder la disposición y relaciones espaciales que presentaban en el cultivo. Es decir permitió una visión del cultivo “desde arriba”, en el plano xy. Con la modalidad en plano SIDE, donde el plano de corte es perpendicular al cultivo, en una misma sección se pudo analizar la disposición de las células en capas desde la región apical a la basal. En cuanto al procesamiento en pellet, si bien en esta modalidad se pierde el ordenamiento de las células en el cultivo y sus relaciones espaciales, este tipo de abordaje permitió recoger más células por corte y en una misma sección permitió el análisis de diferentes perfiles celulares. La figura 13 muestra los distintos procesamientos realizados.

El procesamiento en plano permitió además identificar diferencias en el modo de crecimiento celular dependiendo del tipo de sembrado (diluido o a la gota). Aunque en ambos casos se observó el crecimiento en multicapa, en el sembrado a la gota se encontraron agregados celulares fácilmente visibles a simple vista luego del contraste con osmio (Figs. 13C y 14). Aunque los resultados previos de marcado de citoesqueleto de actina y de MEB mostraban que las células AbAs crecen en multicapa, la presencia de agregados celulares fue más evidente luego de la osmificación tal como se muestra en las imágenes de campo claro (Fig. 14A-E). Estos agregados celulares se hacen más

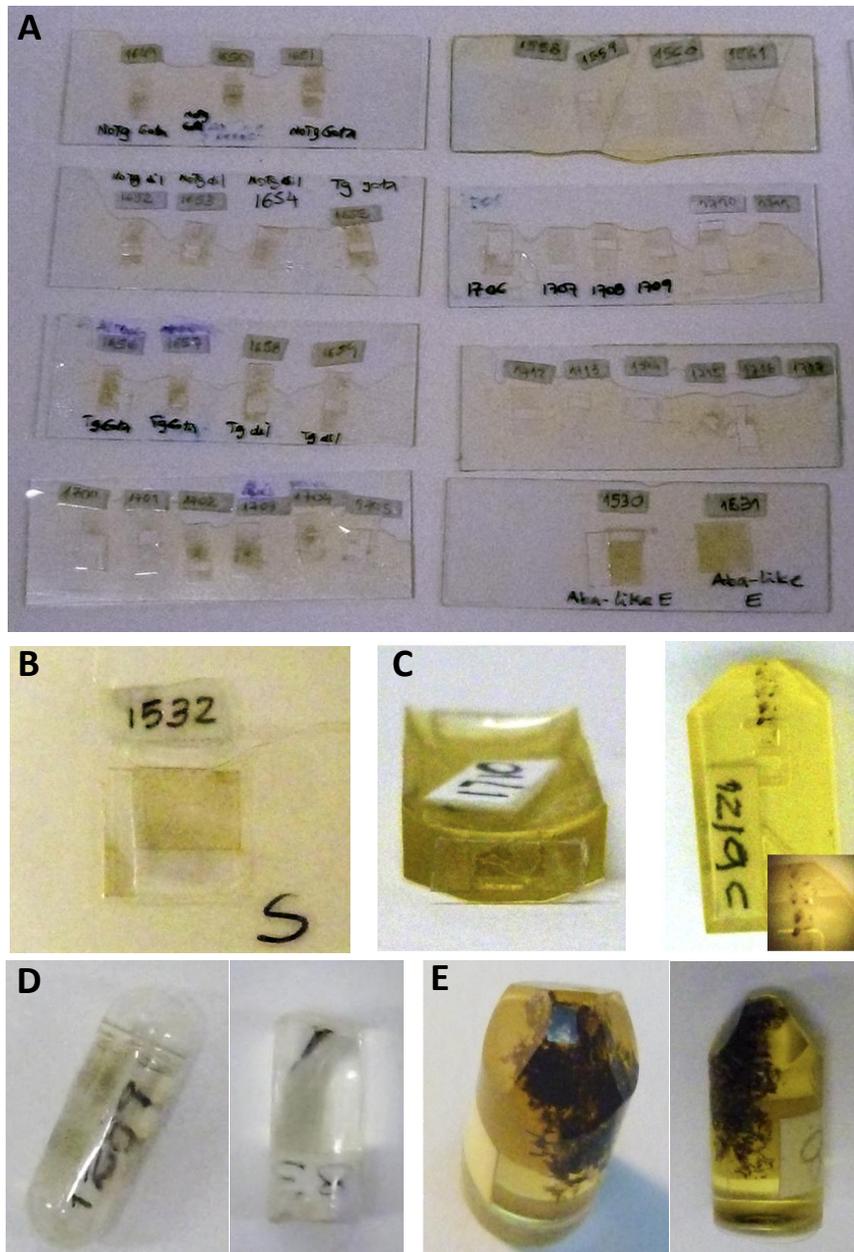


Figura 13: Bloques resultantes de los distintos procesamientos de los cultivos de células AbAs.
A) Imagen panorámica de varios cultivos de AbAs y astrocitos neonatales procesados en flat embedding e incluidos en araldita. Las zonas oscuras corresponden a las células osmificadas. **B)** Imagen a mayor aumento de A. Las zonas claras representan zonas donde el bloque en plano fue cortado para su posterior procesamiento (TOP o SIDE). **C)** Bloque flat TOP pegado sobre la punta de un bloque de araldita polimerizado (izquierda) y bloque flat SIDE repolimerizado dentro de otro bloque de araldita (derecha). El inserto muestra como se observan las células osmificadas en el bloque. **D)** Bloques en plano incluidos en LRWhite para procesamiento de immunoMET repolimerizados dentro de cápsulas beam. **E)** Células AbAs procesadas en pellet e incluidas en araldita.

pronunciados a medida que el cultivo envejece. Además, fue posible observar finas prolongaciones citoplasmáticas que irradian desde la periferia del agregado y permiten el contacto con otros agregados celulares. La tinción con OsO_4 y con azul de metileno permitió observar que cada agregado celular es heterogéneo, presenta un núcleo más bien central, más claro, rico en matriz extracelular, que es rodeado por células que van

formando un espiral que se va compactando hacia el borde exterior del acúmulo (Fig. 14A-F). La fuerte tinción con osmio indicó además una presencia significativa de lípidos en las células AbAs. La imagen panorámica de un agregado celular al MET muestra que el centro del agregado es escaso en células y rico en matriz y evidencia como el grado de empaquetamiento aumenta hacia la periferia donde las células aparecen como más enrolladas, más alargadas y juntas unas con otras (Fig. 14G). La tinción con azul de metileno de cortes semifinos del agregado confirma que éstos están formados por células que se disponen en espiral alrededor de un núcleo central acelular que está ocupado por matriz extracelular que se tiñe pobremente (Fig. 14F). Evidenció además que las células más excéntricas son más elongadas, muy finas y con núcleos que acompañan esa morfología. A medida que nos acercamos al centro del agregado, las células cambian su aspecto general, aumentando su diámetro y con núcleos más redondeados que presentan parches de heterocromatina. La observación al MET de dicho agregado celular confirmó lo observado en el corte semifino y permitió obtener información más detallada (Fig. 14C y 15). El análisis a mayor magnificación del agregado celular permitió observar con mayor detalle la matriz extracelular amorfa central rodeada de células y la presencia de acúmulos electrondensos heterogéneos en el citoplasma de las células más centrales (Fig. 15).

La presencia de estos agregados muestra que las células AbAs no ocupan toda la superficie sobre la que se siembran, lo que es una diferencia significativa respecto de los astrocitos que usualmente se disponen en monocapas hasta alcanzar confluencia, sufren inhibición por contacto y frenan su proliferación (Nakatsuji y Miller, 2001; Yang y cols., 2012).

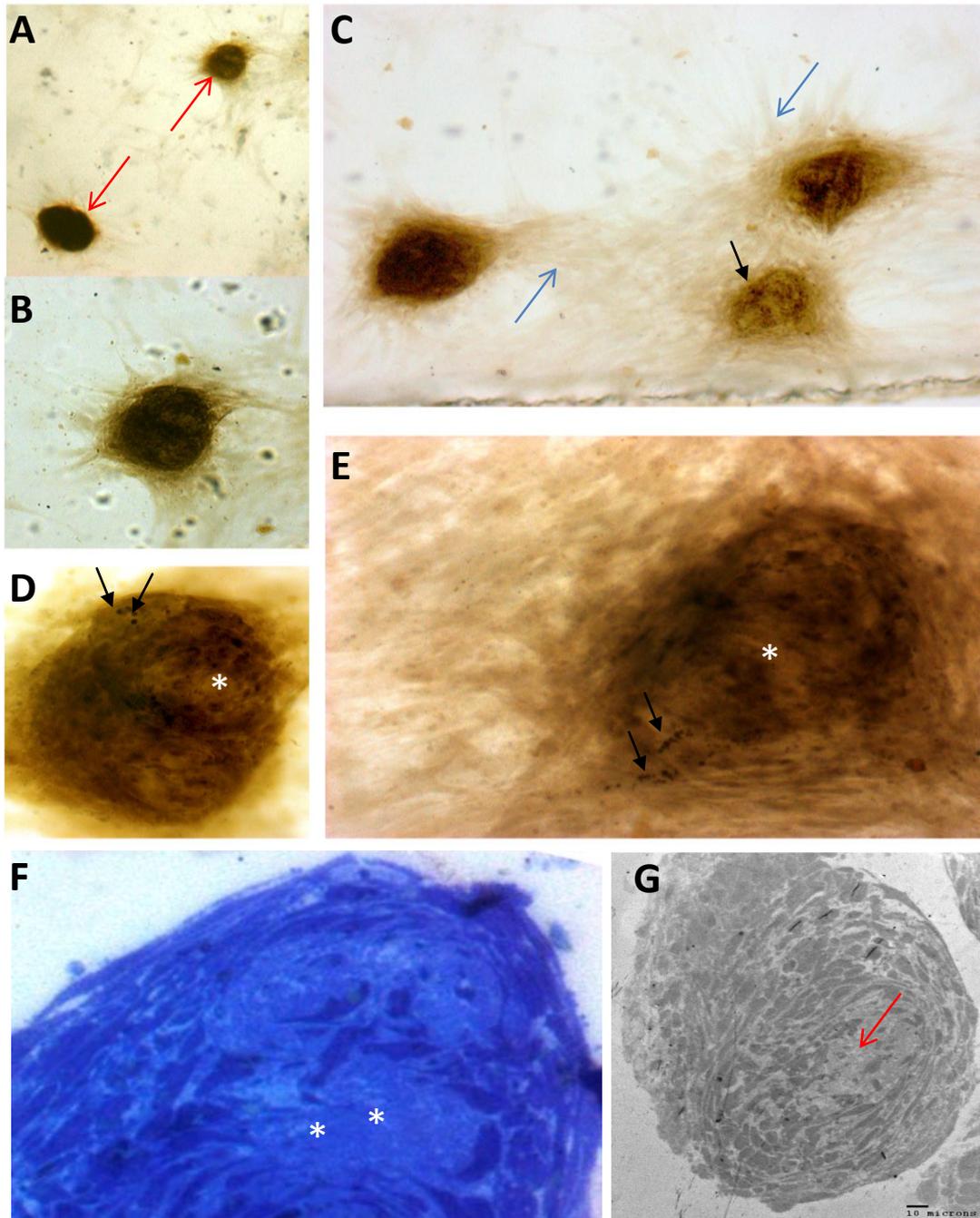


Figura 14: Bloques en plano de cultivo de células AbAs sembradas a la gota e incluidas en araldita. A-C) Imágenes a distintas magnificaciones de las células AbAs que formaron agregados (flechas rojas) y presentaron proyecciones que parecen ser comunicantes (flechas azules). **D-E)** La mayor magnificación de un agregado celular reveló una composición heterogénea con una porción central clara (*) y como las células tienden a formar un espiral en torno a dicha porción central. Nótese las esferas oscuras (flechas negras), que evidencian acúmulos lipídicos dada su alta afinidad por el OsO_4 . **F)** Corte semifino de un agregado celular teñido con azul de metileno. Las zonas desprovistas de células se observan más claras (*) mientras que las células se tiñen intensamente, especialmente sus núcleos en donde a veces es posible divisar un nucléolo prominente. **G)** Imagen panorámica de MET mostrando una sección ultrafina (50~70 nm) de un agregado celular donde se observan las zonas acelulares electronlúcidas (flecha roja) y las células arremolinadas periféricas electrondensas. Magnificación: A: 40X; B y C: 100X; D: 200X; E: 400X; F: 400X; G: barra: 10 micras.

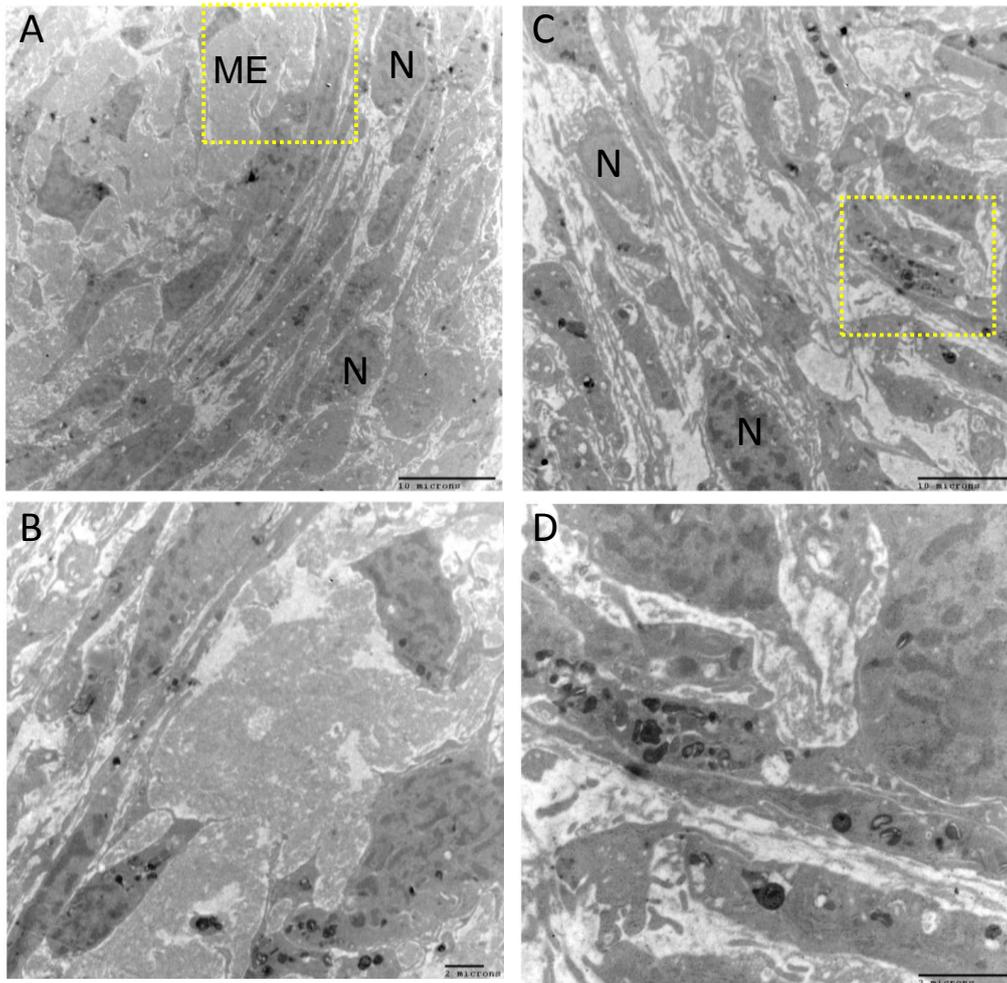


Figura 15: Matriz extracelular y disposición de las células en un agregado celular. A) Disposición de las células del agregado alrededor de una zona electronlúcida ocupada por matriz extracelular (ME). **B)** Mayor aumento del recuadro señalado en A. **C)** Región ocupada por abundante ME en la que se observan perfiles citoplasmáticos que muestran inclusiones y cuerpos electrondensos irregulares. **D)** Mayor aumento del recuadro mostrado en C. Barras: 10 micras para A y C; 2 micras para B y D.

Los bloques SIDE tuvieron un rendimiento más bajo ya que las células son muy delgadas y la mayoría de las veces en cada corte solo se observaba una o dos prolongaciones con escaso citoplasma. El procesamiento de las células sembradas a la gota procesadas en ésta modalidad, confirmó que las AbAs se disponen en múltiples capas y que son muy delgadas (Fig. 16). En la periferia de los agregados en capas múltiples (Fig. 16A) se observaron muy pocas capas de células que aparecen muy aplanadas, bien empaquetadas y con poco espacio intercelular ocupado por matriz. En esa región los núcleos aparecen bien definidos bastante homogéneos y muy alargados (Fig. 16A). Más cerca del centro del acúmulo hay un mayor número de capas, aumenta la cantidad de matriz extracelular translúcida y el eje longitudinal en los núcleos se hace

menos predominante (Fig. 16B). En las secciones más gruesas, coincidentes o cercanas al centro del agregado aparte de los núcleos (N) es posible observar algunos organelos prominentes como las vesículas hiperdilatadas del retículo endoplásmico rugoso (RER, Fig. 16C-D, #), además de una cantidad significativa de matriz extracelular (ME).

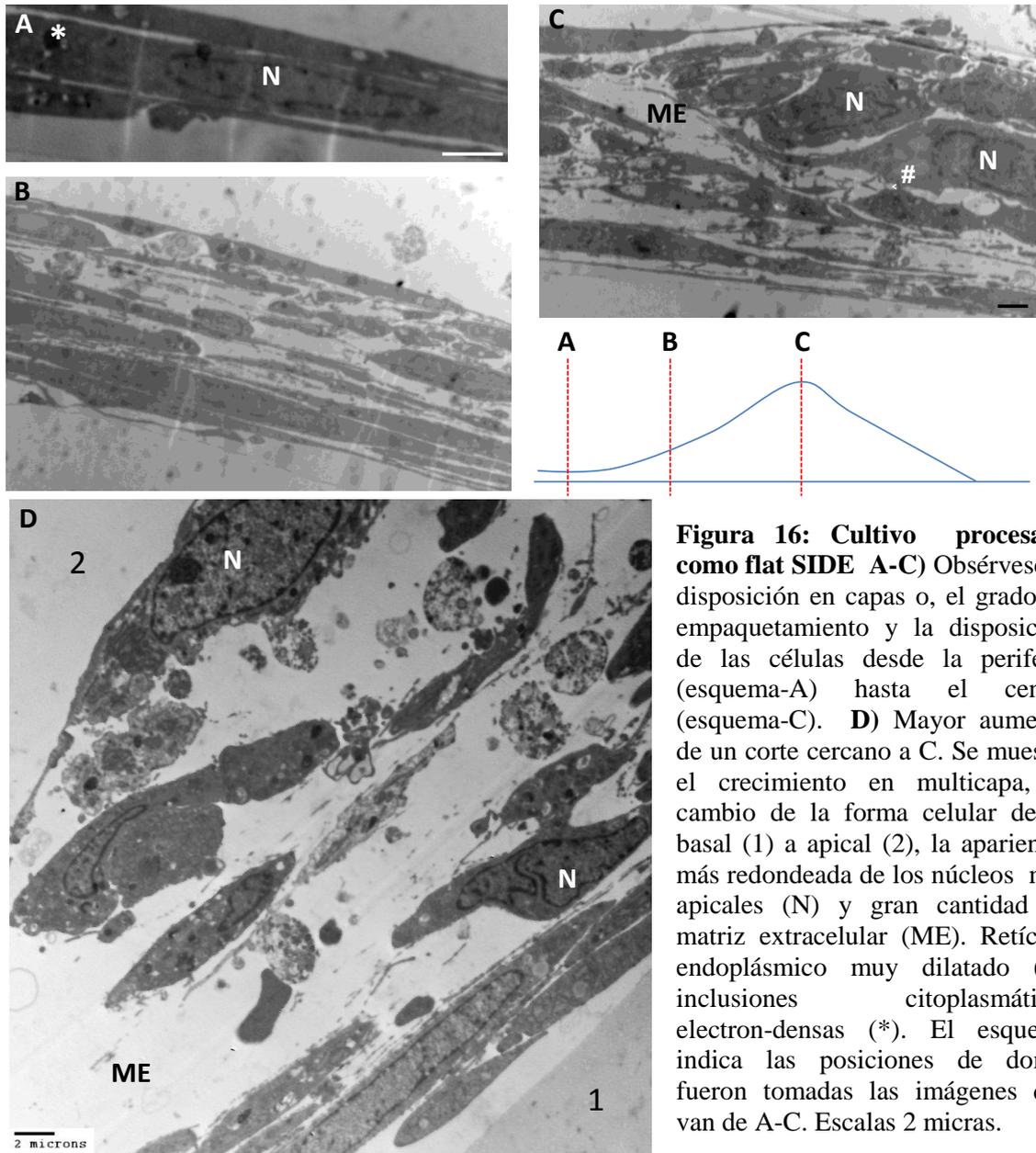


Figura 16: Cultivo procesado como flat SIDE A-C) Obsérvese la disposición en capas o, el grado de empaquetamiento y la disposición de las células desde la periferia (esquema-A) hasta el centro (esquema-C). D) Mayor aumento de un corte cercano a C. Se muestra el crecimiento en multicapa, el cambio de la forma celular desde basal (1) a apical (2), la apariencia más redondeada de los núcleos más apicales (N) y gran cantidad de matriz extracelular (ME). Retículo endoplásmico muy dilatado (#); inclusiones citoplasmáticas electron-densas (*). El esquema indica las posiciones de donde fueron tomadas las imágenes que van de A-C. Escalas 2 micras.

El procesamiento en pellet de los cultivos confluentes de células AbAs permitió la obtención de un precipitado con un volumen celular apreciable (Fig. 13E) luego de haber perdido la topología del cultivo. Permitió además observar detalles importantes de la ultraestructura de las células (Fig. 17), sin embargo, la pérdida de la disposición en plano causó que en los cortes, las células y/o sus organelos aparezcan en distintas

orientaciones. Sin embargo, una ventaja de esta aproximación fue la facilidad de fijación y manipulación, así como el mantenimiento de la integridad de la estructura interna de las células, como se evidencia en la observación de las cisternas del RER (Fig. 17).

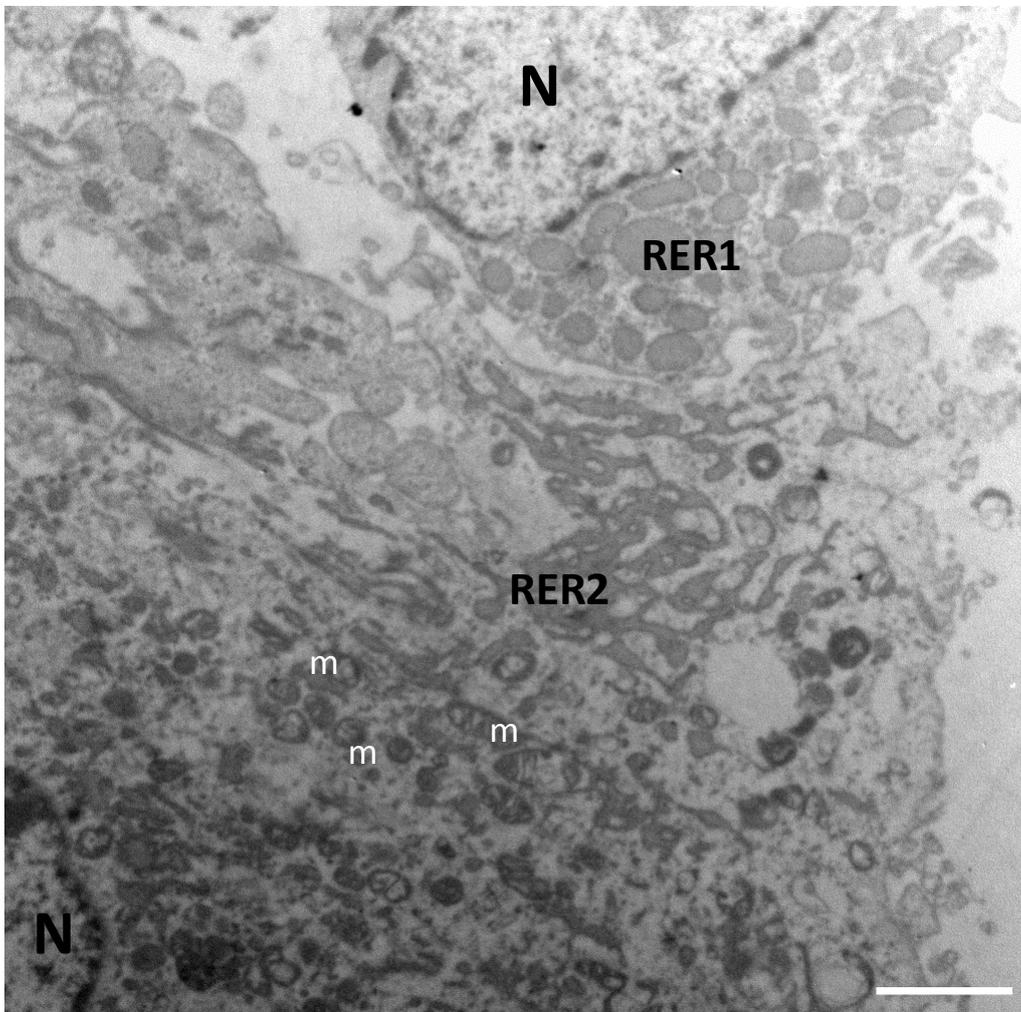


Figura 17: Micrografía electrónica de cultivos de AbAs confluentes procesados en pellet. Se muestran dos células que presentan núcleos eucromáticos (N) y un gran desarrollo de retículo endoplásmico rugoso (RER) cuyas cisternas se observan dilatadas en corte transversal (RER1) y oblicuo (RER2) y una luz electrodensa. En la célula inferior se observan abundantes mitocondrias pequeñas (m) Barra de calibración: 2 micras.

De acuerdo a lo mostrado anteriormente y a los problemas en cuanto a requerimientos de muestras y/o de tiempo de procesamiento, se decidió que para realizar el análisis ultraestructural de las células AbAs mediante MET se emplearían células sembradas a la gota que serían fijadas en plano y cortadas o células diluidas levantadas como pellet y luego procesadas de igual manera que la anterior (Fig. 18-25).

7.4. Características ultraestructurales de las células AbAs

7.4.1. Organización general del cultivo

Como se mencionó anteriormente, las células AbAs en cultivo crecen en multicapas. Las células más basales son más planas y elongadas y se van redondeando a medida que observamos el cultivo en sentido basal a apical. Los organelos, especialmente los núcleos, acompañaron estos cambios morfológicos. Los núcleos más apicales son más redondeados y presentaron parches heterocromáticos, mientras que los núcleos basales son más eucromáticos y presentan nucléolo prominente (Fig. 16). La presencia de gránulos densos también acompañó estos cambios. Las células más apicales son más ricas en dichos gránulos. A su vez, cuando las células son sembradas “a la gota”, en algunos casos estas forman agregados celulares visibles a simple vista luego de la osmificación (Fig. 14). Estos agregados no parecen ser entidades aisladas, ya que se observaron proyecciones que parecen unirlos físicamente entre sí (Fig. 14C).

7.4.2. Núcleo

El núcleo de las células AbAs es redondeado, pero se encontraron de formas diversas. En general, es bastante eucromático y con nucléolo prominente, similar a lo descrito para astrocitos neonatales. Sin embargo se encuentran núcleos hipotróficos y heterocromáticos, con parches de heterocromatina distribuidos en todo el núcleo, generalmente en coincidencia con una mayor desorganización general del contenido celular (Fig. 17)

7.4.3. Citoplasma

El citoplasma de las células AbAs es más oscuro que el observado para astrocitos neonatales, lo que dificulta su análisis general por cuestiones de contraste (Fig. 14-17). En cambio, el citoplasma de los astrocitos neonatales es muy electronlúcido, lo que permitió una clara observación de los filamentos intermedios y el citoesqueleto en general (Fig. 18).

7.4.4. Citoesqueleto de astrocitos neonatales y de células AbAs

El análisis de los astrocitos neonatales NoTg al MET permitió reconocer la presencia de filamentos intermedios ordenados de acuerdo al eje mayor de la célula (Fig. 18A) o formando redes (Fig. 18B), así como identificar mitocondrias (m) bien

definidas, de tamaño significativo, con crestas ordenadas y matriz más clara (Fig. 18).

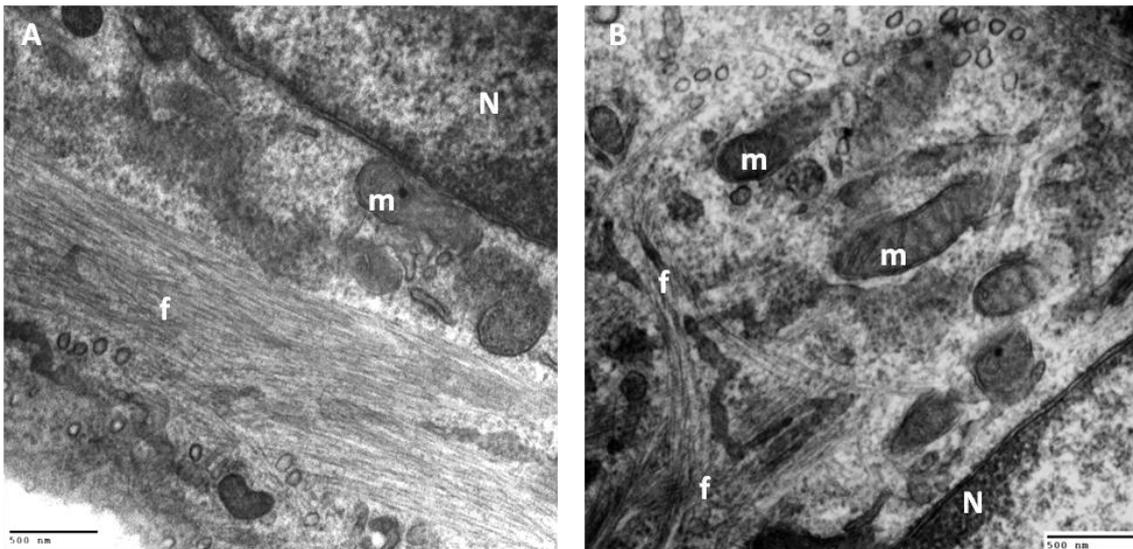


Fig. 18. Filamentos intermedios en astrocitos neonatales NoTg. Se observan haces de filamentos intermedios (f) paralelos al eje longitudinal de la célula (A) o formando redes alrededor de los distintos organelos. Mitocondrias: m; Núcleo: N.

El análisis mediante MET no permitió observar filamentos intermedios de forma clara en las células AbAs (Fig. 19). En cambio, se encontró abundante presencia de filamentos de actina y microtúbulos que se orientan formando redes y están distribuidos en todo el citoplasma incluyendo las prolongaciones. Dependiendo del ángulo de corte de la muestra, éstos pueden observarse en cortes transversales (Fig. 19A-B) o longitudinales (Fig. C-D).

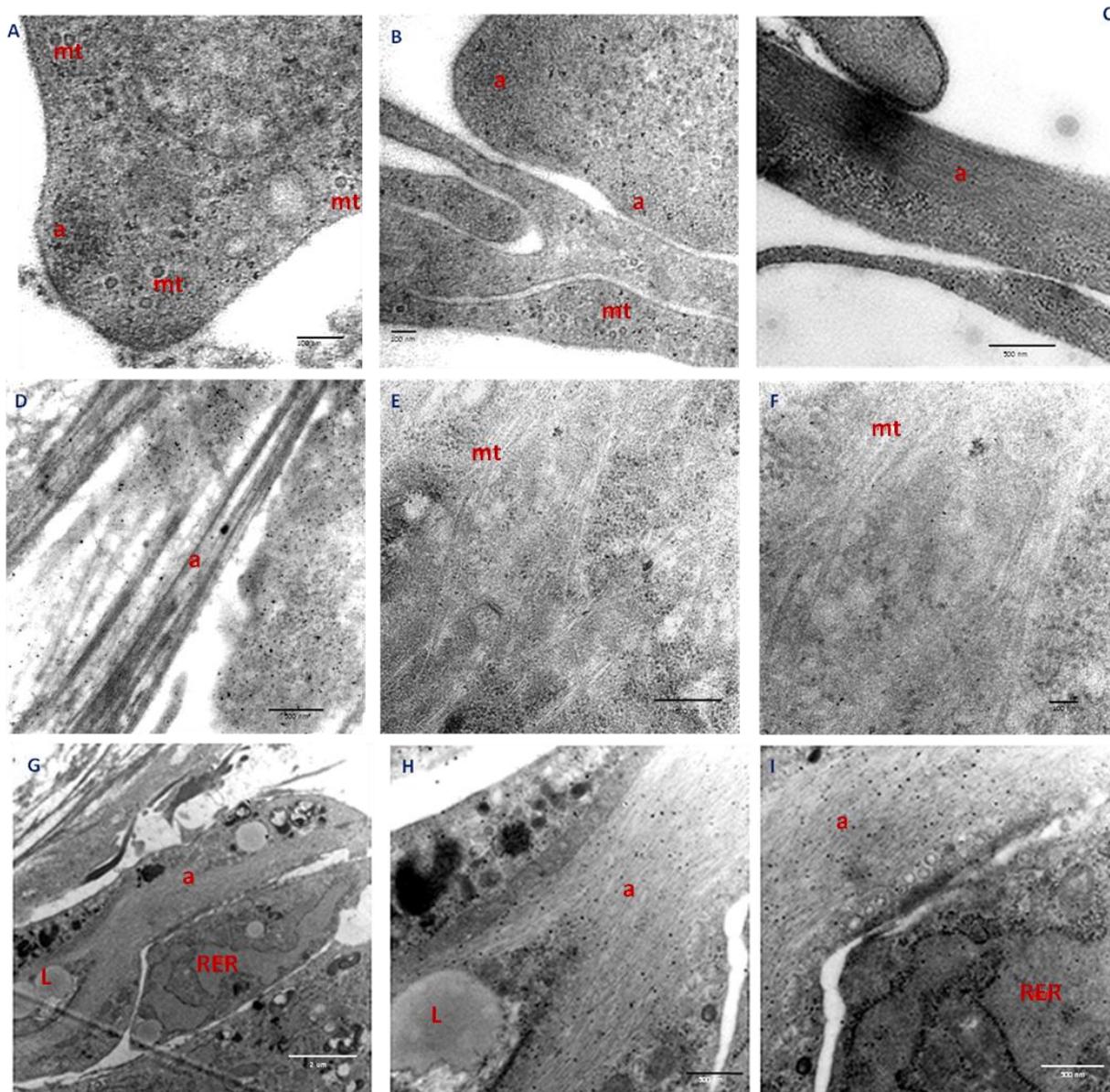


Fig. 19. Citoesqueleto de células AbAs. A-C) Procesamiento flat SIDE. D-I) Procesamiento flat TOP. Se observan filamentos de actina (a) y microtúbulos (mt) cortados en sección transversal (A y B) y en sección longitudinal (C-I). En (G e I) es posible observar cisternas de RER dilatadas y gotas lipídicas (L) en G y H.

7.4.5. Retículo endoplásmico rugoso

En todas las células AbAs, el RER se encuentra sumamente dilatado y se distribuye por todo el citoplasma celular (Fig. 20). Sin embargo, es llamativa la diferencia de contraste en el lumen del RER en células distintas. Algunas tienen el lumen más electronlúcido (Fig. 20A, C), mientras que otras lo tienen electrondenso (Fig. 20B, D, E). Hasta el momento no se encontró ninguna relación de este fenotipo con otros fenómenos acompañantes que permitan interpretar estas diferencias. Un resultado

notorio fue la no identificación de Aparatos de Golgi estructurados en los cultivos de células AbAs analizados, ni tampoco de cisternas que fueran similares a las de un Aparato de Golgi

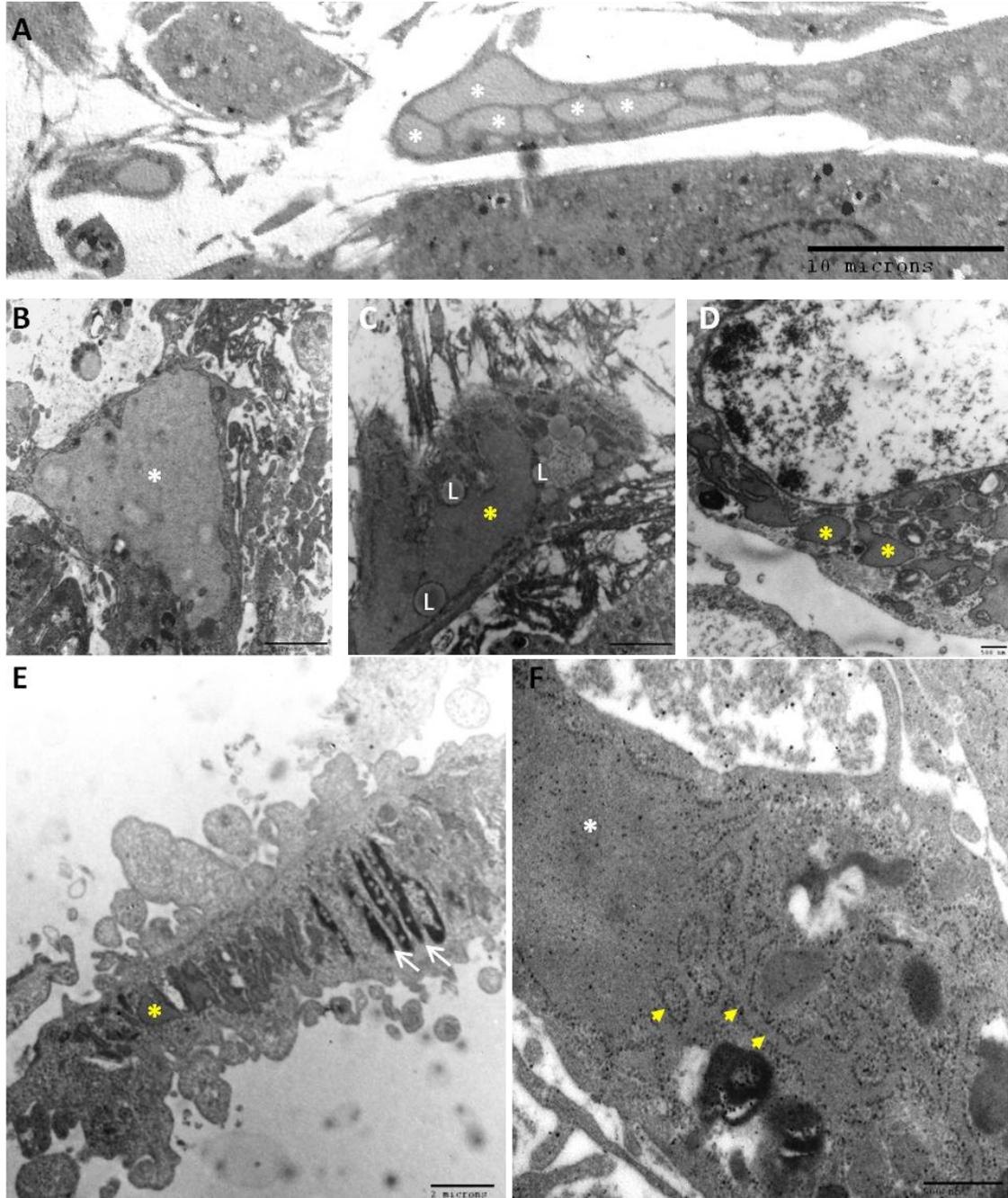


Fig. 20. Retículo endoplásmico rugoso de células AbAs observados luego del A) procesamiento en pellet (A) o flat TOP (B-F). A) Vista panorámica donde se observan cisternas de RER dilatadas y de lumen electrólucido (* blancos). B-F) Diversas imágenes que muestran RERs dilatados y desorganizados, de luz es electrondensa (* amarillos), de una electrondensidad similar al citoplasma. Algunas vesículas fueron muy oscuras y presentaron perfiles claramente anómalos (flechas blancas). N: núcleo; RER: retículo endoplásmico rugoso; L: gotas lipídicas. Las flechas amarillas muestran ribosomas adheridos a la membrana del RER.

7.4.6. Mitocondrias

Como se mostró en la Fig. 18, en los astrocitos neonatales NoTg fue posible distinguir mitocondrias de tamaño significativo, bien diferenciadas con crestas bien formadas y una matriz clara, todas características muy similares a las descritas en la literatura (Peters y cols., 1991). En AbAs en cambio, las mitocondrias aparecen más pequeñas, con una matriz densa y escasas crestas (Fig. 21). En las AbAs, fue llamativo además que la mayoría de las mitocondrias se encontraran en la zona perinuclear, aunque fue posible verlas también en las prolongaciones lamelares, presentando las mismas características descritas más arriba (Fig. 21D).

7.4.7. Lípidos

El análisis de MET evidenció que el citoplasma de las células AbAs es rico en gotas lipídicas de tamaño significativo (de 1-2 micras de diámetro; Fig. 22). En general, éstas gotas se encontraron formando grupos o parches (Fig. 22A-C) en distintas zonas del citoplasma, generalmente lejos del núcleo y próximas a los cuerpos densos, mitocondrias o RER en otras ocasiones. En otros casos, se encuentran como gotas prominentes únicas (Fig. 22D). La electrondensidad de las gotas también es variada, encontrándose gotas con contenido más claro (Fig. 22B) o más oscuro (Fig. 22A).

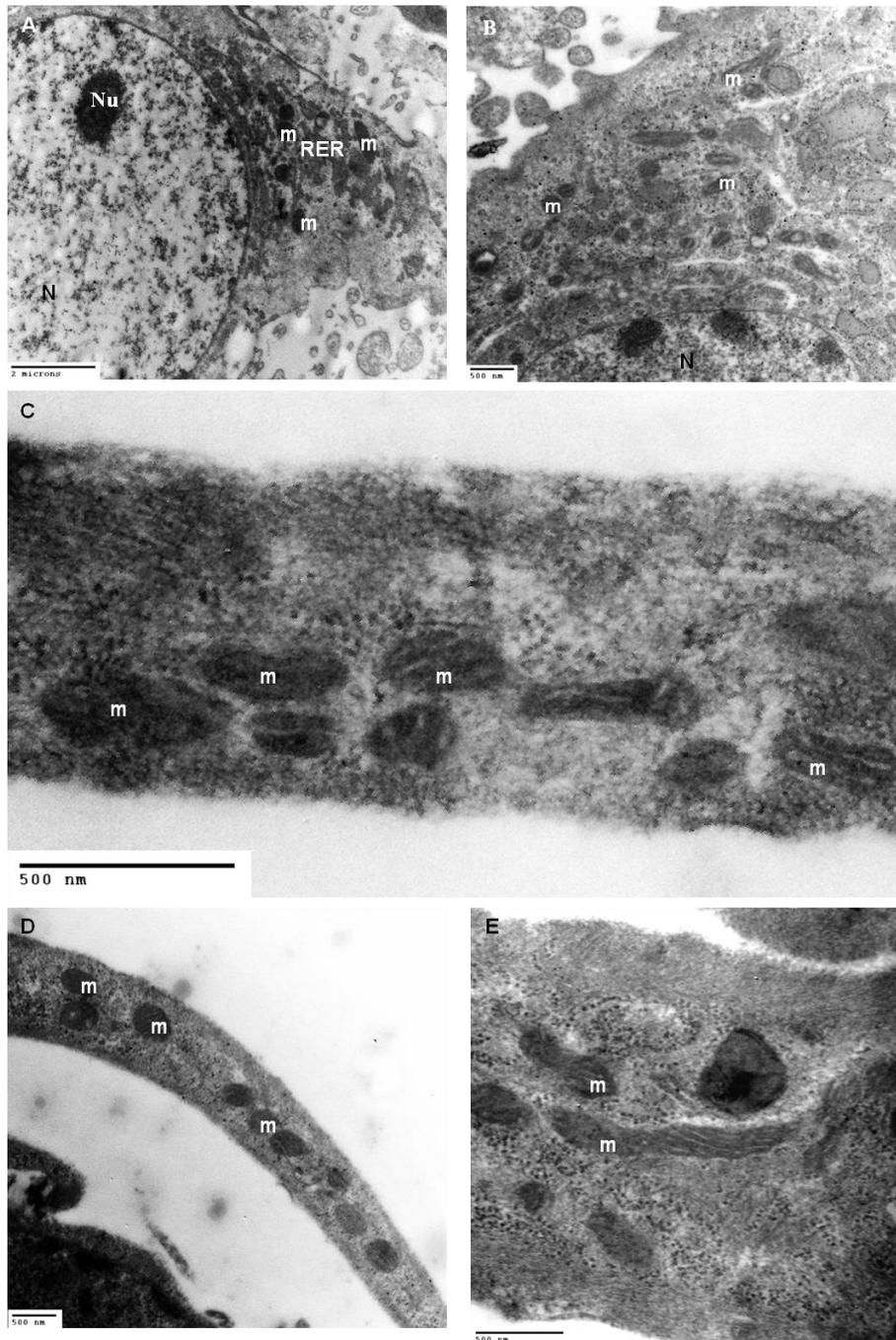


Fig. 21. Mitochondrias de las células AbAs. A-B) Procesamiento Flat TOP. Mitochondrias (m) con pocas crestas y matriz oscura presentes en células de núcleo eucromático (N). En A se destaca un nucléolo prominente (Nu) y en la proximidad de las mitocondrias un RER de luz electrodensa. **(C-E) Flat SIDE.** C-D) Mitochondrias como las descritas en una prolongación celular a alta magnificación (C) o en una visión más panorámica (D). E) Mitochondrias cortadas en sección transversal, longitudinal y oblicua. El citoesqueleto de actina dispuesto en varias direcciones se evidencia debajo de la membrana plasmática.

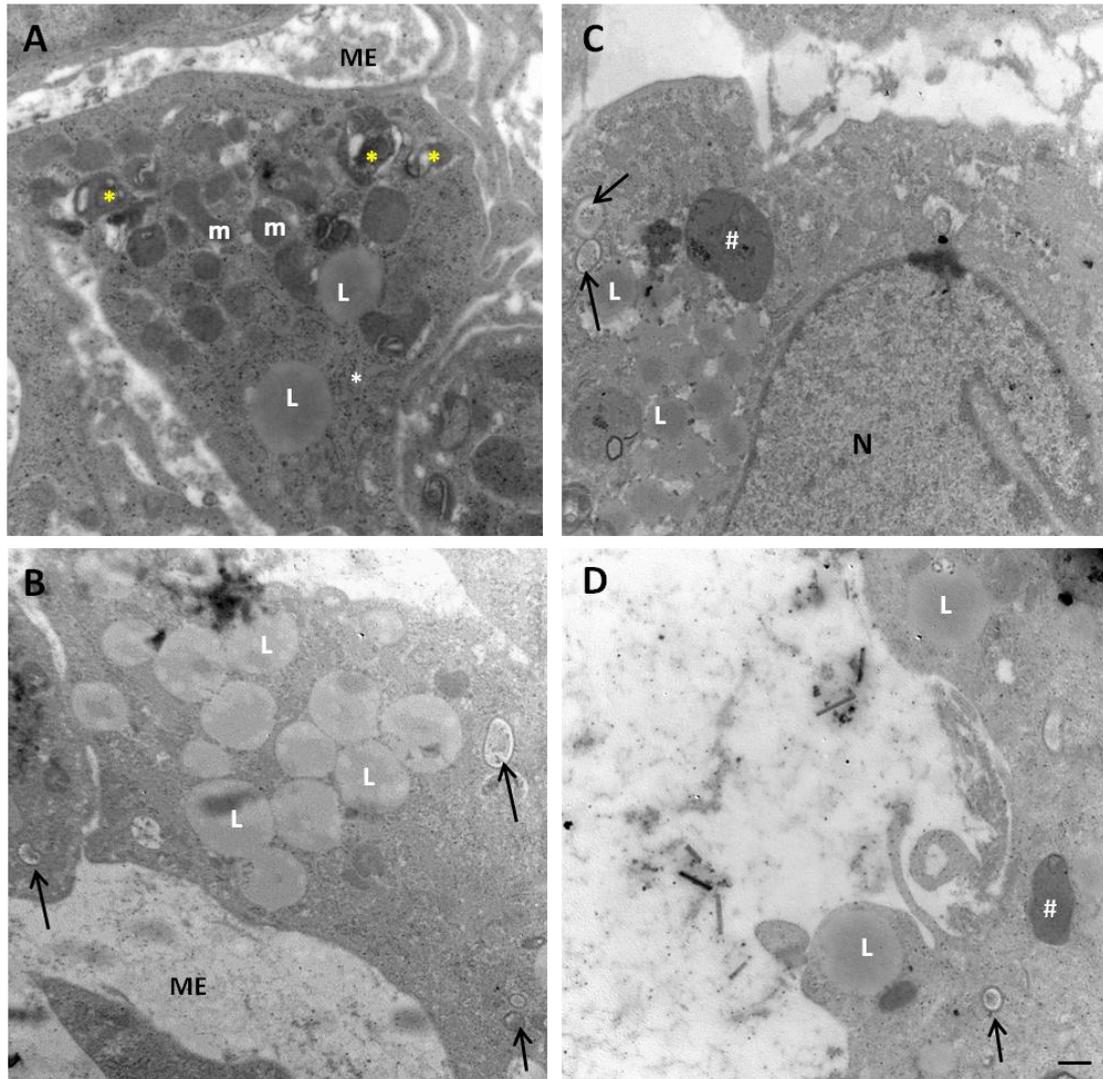


Figura 22: Alto contenido de lípidos en las AbAs. Procesamiento en pellet. A-B) Abundancia de gotas de lípidos (L) de contenido bastante homogéneo y de tamaño apreciable encontradas en las cercanías de mitocondrias (m) o de cuerpos membranosos (* amarillos). Se esbozan además vesículas del RER rodeadas de ribosomas (* blanco). Las flechillos negros indican vesículas autofágicas. **C-D)** Abundantes gotas de lípido en cercanías a las zonas claras ricas en matriz extracelular (ME), vesículas autofágicas y presencia de inclusiones electrondensas (#). A-B son modalidad flat TOP, C-D: pellet. Barra de calibración: 500 nm

7.4.8. *Vesículas citoplasmáticas*

En los cultivos de AbAs fue notoria la cantidad de vesículas recubiertas que se encontraron (Fig. 23), aunque también se observaron vesículas no recubiertas (Fig. 23F, flecha azul). Las vesículas observadas pueden encontrarse en distintas etapas de endocitosis, observándose aquellas que están en etapa de formación, formando invaginaciones a nivel de membrana plasmática (Fig. 23B, D, F) así como ya cerradas dispersas en el citoplasma (Fig. 23F, G). Es importante destacar que si bien las vesículas están recubiertas en la hemicapa de la membrana expuesta al citoplasma, es posible visualizar proyecciones electrondensas expuestas hacia su lumen, aparentando una proteína transmembrana (Fig. 23G), que podría estar indicando algún tipo de endocitosis mediada por algún receptor aún desconocido como se discutirá más adelante.

7.4.9. *Vesículas autofágicas*

Las vesículas autofágicas se caracterizan por poseer doble membrana, ser de tamaño y forma variable aunque generalmente son redondeadas y su lumen presenta restos celulares claramente visibles (Herrera y cols., 2006). En los cultivos de AbAs se encontraron muchas vesículas con las características que se han mencionado, por lo que fueron identificadas como vesículas autofágicas, en distintos estadios de maduración (Fig. 24).

7.4.10. *Gránulos o inclusiones densas*

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de las células AbAs presentan inclusiones densas en su citoplasma. Éstas son muy heterogéneas en tamaño, forma y presencia/ausencia de membranas. Podrían ser gránulos de estrés, P-bodies, Hirano bodies y/o mitocondrias en degeneración (Fig. 25)

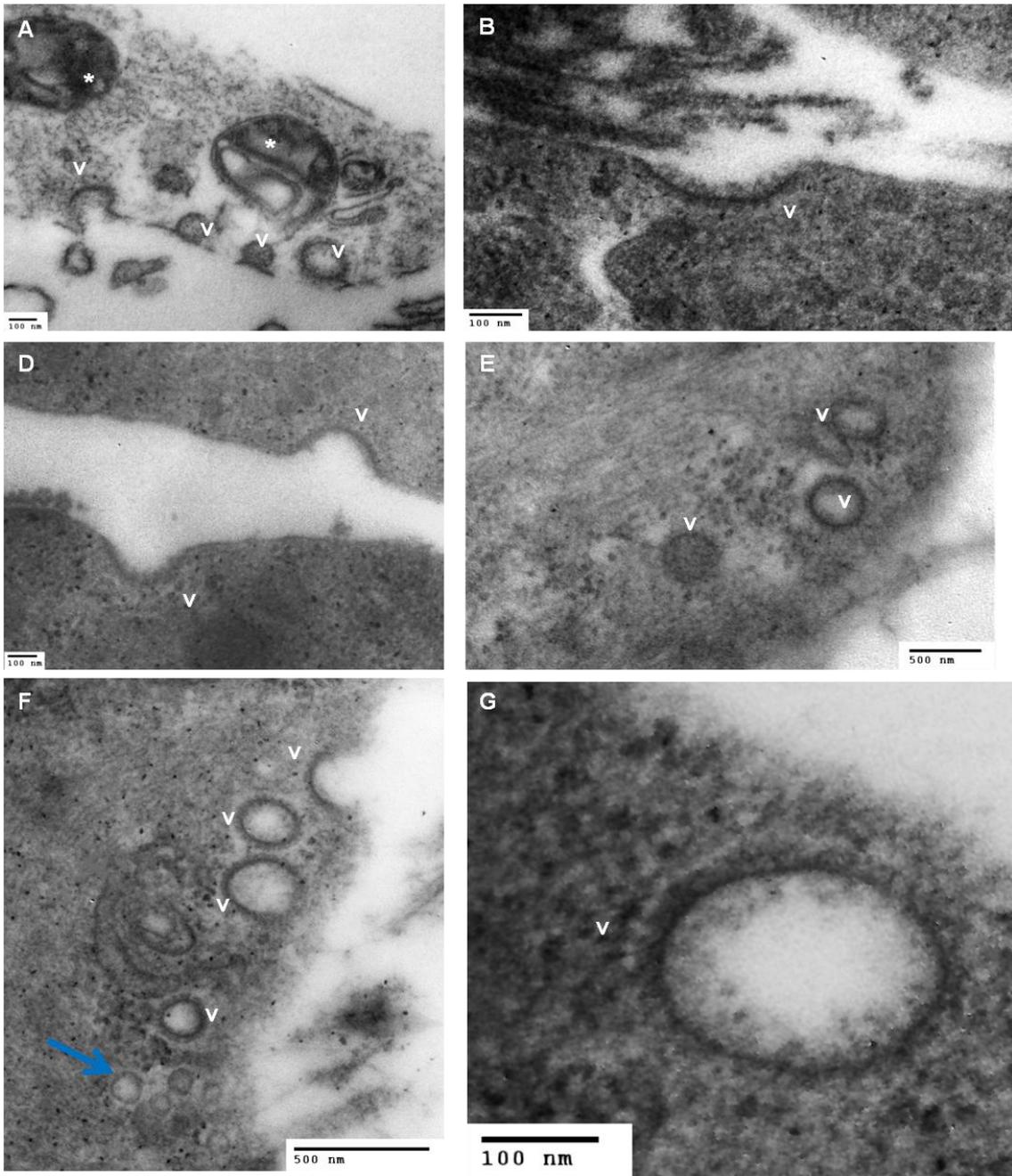


Fig. 23. ¿Endocitosis mediada por receptor? En las imágenes pueden observarse la formación de vesículas recubiertas en distintos estadios. Nótese la electrondensidad del borde citoplasmático de la vesícula, donde se observa que éstas están recubiertas (probablemente por clatrina), que luego se cierran y forman vesículas de aproximadamente 100-150 nm. Obsérvese en la parte inferior de la figura F la presencia de vesículas más pequeñas no recubiertas (flecha azul). En la figura B se muestra claramente que además del recubrimiento citoplasmático hay proyecciones hacia el lado extracelular o luminal de la vesícula. Las que luego son internalizadas y se observan en todo el citoplasma de la célula.

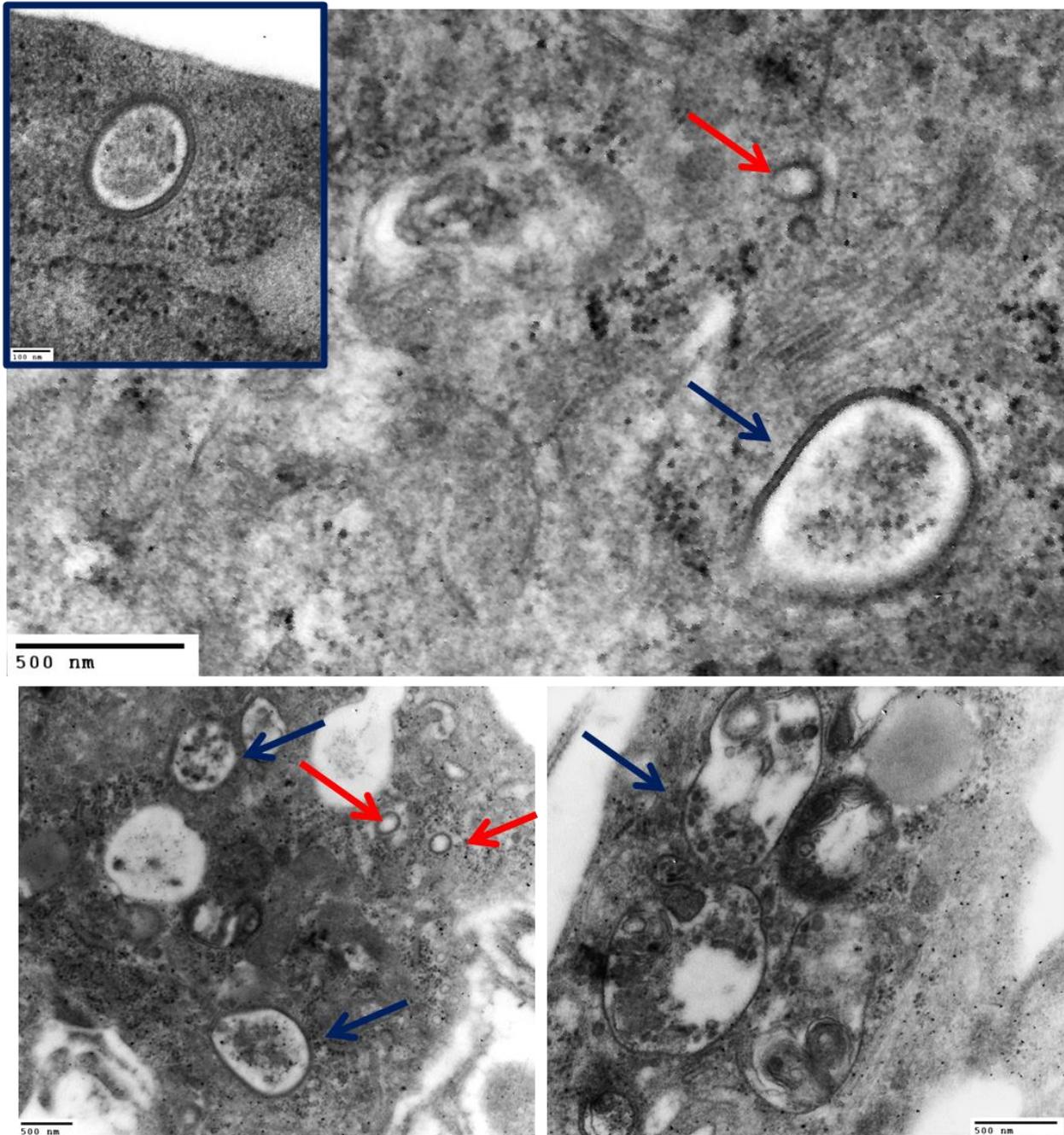


Fig. 24. Las células AbAs presentan abundantes vesículas autofágicas. Heterogeneidad de vesículas autofágicas (flechas azules) en un citoplasma electrodensito rico en ribosomas libres. Las flechas rojas indican vesículas recubiertas. Nótese la presencia de lípidos (L) en la cercanía. En el inserto (arriba a la derecha) puede observarse claramente la doble membrana que forma la vesícula autofágica.

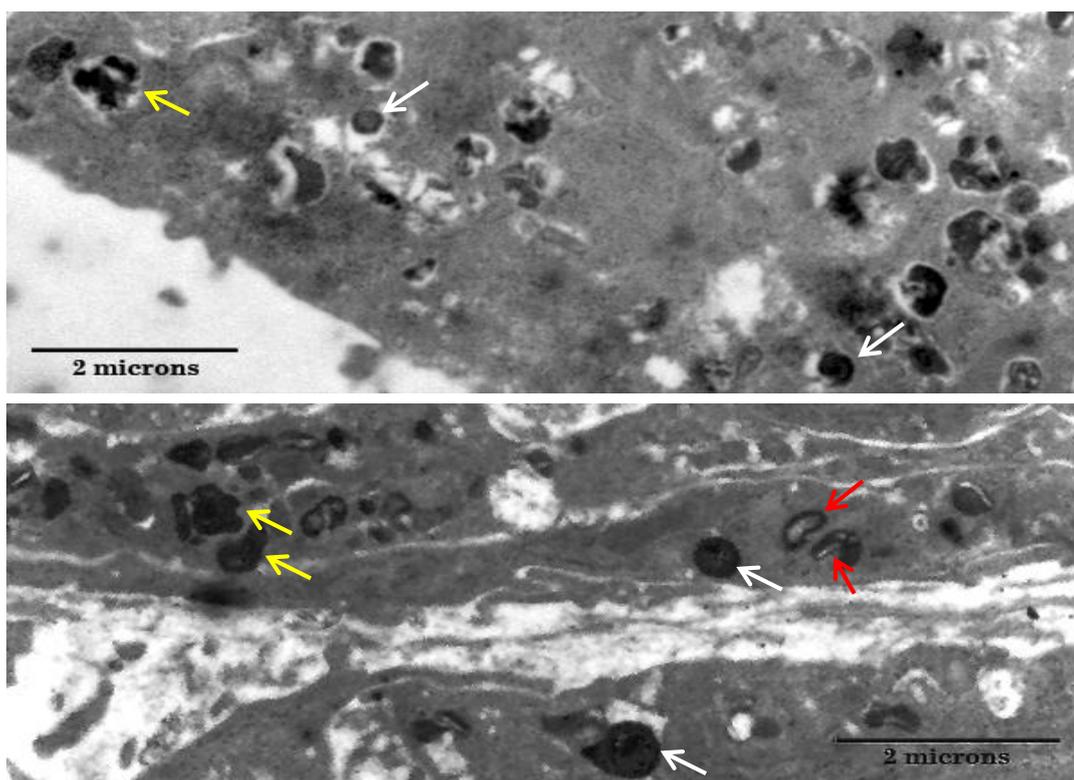


Fig. 25. Heterogeneidad de inclusiones citoplasmáticas en las AbAs. Las flechas de distinto color muestran la diversidad de formas, contenidos y tamaños de las inclusiones encontradas en el citoplasma de las AbAs.

8. DISCUSIÓN

En trabajos anteriores nuestro grupo de investigación reportó el aislamiento (Díaz-Amarilla y cols., 2011) e identificó el origen (Trías y cols., 2013) de un tipo de células gliales con características fenotípicas aberrantes (células AbAs) entre las que se destaca su altísima neurotoxicidad. A la luz, las AbAs son casi indistinguibles de los astrocitos neonatales primarios y presentan un conjunto de marcadores antigénicos característicos de astrocitos indiferenciados que incluyen una alta expresión de S100 β y de conexina 43 además de un bajo nivel de expresión de GFAP. A su vez, en ciertas etapas del cultivo, las AbAs presentaron marcadores de astrocitos y de microglía, lo que se evidenció además en la médula espinal de los animales sintomáticos portadores de la mutación SOD1G93A (Trías y cols., 2013). Estas características dificultaron el reconocimiento y la diferenciación de las células AbAs respecto de astrocitos considerados típicos. La primera parte de este trabajo de tesis tuvo como objetivo obtener más datos de la comparación entre las células AbAs y los astrocitos neonatales

para colaborar con la mejor identificación de éstas células. La segunda parte incluyó el análisis mediante MET para identificar las características morfológicas y ultraestructurales de las AbAs para utilizar los resultados posteriormente en un análisis comparativo más profundo con astrocitos neonatales y de animales adultos.

8.1. Breve análisis de los abordajes empleados

Los abordajes utilizados durante este trabajo proporcionaron información valiosa y complementaria, no observándose datos contradictorios cuando se aplicaron técnicas distintas. Las técnicas de inmunocitoquímica, microscopía de fluorescencia, Western blotting y MEB se emplearon con fines comparativos entre los distintos cultivos. Los resultados obtenidos fueron comparables y reproducibles en las distintas tandas analizadas, lo que permitió descartar que los datos obtenidos sean artefactos producidos por las técnicas. Esta primera experiencia de empleo de MEB en cultivos celulares fue muy fructífera y permitió un conocimiento mayor de la técnica, lo que será empleado en el futuro para hacerle “más y mejores preguntas” a la misma. Los datos obtenidos en esta parte del trabajo confirmaron que las AbAs muestran diferencias de niveles de expresión de diversos marcadores, a excepción de la confirmación de la disposición en cultivo en capas múltiples.

Las aproximaciones de MET en cambio, permitieron un conocimiento mayor a nivel ultraestructural de las células AbAs, lo que fue favorecido por un conocimiento profundo de la técnica que fue adquirido previamente al inicio de los estudios de Maestría. Este conocimiento previo permitió al estudiante un manejo independiente tanto en la preparación de la muestra como en la adquisición de las imágenes y en la discusión de los resultados. Los datos obtenidos mediante MET fueron valiosos y novedosos, sin embargo, esta técnica tiene grandes requerimientos de tiempo y de equipo que llevaron a priorizar el análisis descriptivo de las AbAs sobre el análisis cuantitativo y comparativo con astrocitos neonatales. Sin embargo, el inicio del análisis comparativo realizado para el citoesqueleto y las mitocondrias de astrocitos neonatales NoTg y AbAs proporcionó información valiosa relacionada con las características particulares del citoesqueleto y la disfunción mitocondrial que podrían sufrir estas últimas. Los resultados obtenidos serán utilizados en el análisis comparativo con los astrocitos neonatales y de animales adultos y creemos que deberán ser tenidos en cuenta a la hora de analizar la presencia de AbAs en muestras que sufren neurodegeneración.

8.2. Resumen de los resultados obtenidos

La realización de este trabajo de tesis permitió confirmar algunos resultados anteriores, aporta datos complementarios y brinda numerosos datos nuevos sobre las células AbAs. El resumen de los mismos permite afirmar que las células AbAs en cultivo:

- no presentan inhibición por contacto y se disponen en múltiples capas;
- presentan dimensiones y forma que pueden considerarse similares a los astrocitos neonatales en cultivo, con una tendencia a ser más achatadas;
- su núcleo no presenta características diferentes a lo referido en la literatura para astrocitos típicos, aunque la presencia de parches de cromatina condensada lejos de la envoltura nuclear y de formaciones regulares evidenciadas por MEB en mayor número que los astrocitos neonatales (Tg y NoTg) podría considerarse una característica particular;
- poseen un citoplasma oscuro que no presenta filamentos intermedios, mitocondrias pequeñas y oscuras, presenta abundantes gotas lipídicas y es particularmente rico en vesículas y formaciones de distinta electrondensidad, forma y presencia o ausencia de membranas, lo que sugiere una alta actividad secretoria, endocítica y/o fagocítica que podría estar aumentada respecto de los astrocitos neonatales.
- una característica peculiar son las cisternas muy dilatadas y de apariencia anormal del RER y la total ausencia de Aparatos de Golgi organizado en las muestras analizadas, que sugieren que toda la vía secretoria clásica está afectada en las AbAs.

8.2.1. Las AbAs no presentan inhibición por contacto y se disponen en múltiples capas

La disposición en capas múltiples de los cultivos de AbAs pudo observarse claramente mediante microscopía de fluorescencia (Fig. 7), MEB (Fig. 12) y MET (Fig. 14-16), a diferencia de lo que se ha demostrado en los cultivos de astrocitos que usualmente se presentan como monocapas de células con alta adhesión al sustrato (Nakatsuji y Miller, 2001; Yang y cols., 2012). Muchas células del cuerpo humano muestran inhibición por contacto. Las células diferenciadas adyacentes forman complejos de membrana estables constituidos por catenina-cadherina, cuya desestabilización ha sido implicada en el fenotipo migratorio de las células epiteliales durante el desarrollo, la remodelación de tejidos, los estadios neoplásicos donde la

pérdida de inhibición de contacto contribuye al fenotipo maligno de muchos tipos de cáncer y la reactividad astrocitaria (Yang y cols., 2012). La proliferación de astrocitos está fuertemente inhibida por contactos celulares homotípicos y es modulada por ciclinas e inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (Nakatsuji y Miller, 2001). Sin embargo, los niveles altos de estimulación mitogénica podrían anular transitoriamente la inhibición de la proliferación dependiente del contacto en astrocitos. Nakatsuji y Miller (2001) mostraron que la adición del factor de crecimiento epidérmico aumentó la proliferación de astrocitos aún en alta densidad y llevó a la formación de múltiples capas de células. Recientemente, Yang y cols. (2012) mostraron que una lesión mecánica en astrocitos provoca no solo la pérdida de la inhibición por contacto sino también la desregulación de las vías moleculares implicadas, lo que podría conducir a un estado celular agresivo asimilable a la neoplasia. La lesión de los astrocitos por un rasguño (*scratch*) interrumpió y desestabilizó los complejos cadherina-catenina en la membrana celular lo que condujo a la translocación nuclear de β -catenina y a cambios característicos asociados con la activación de astrocitos, a un estado proliferativo y a un aumento de motilidad. Los autores sugieren que la desconjugación de β -catenina de los complejos de adhesión de la membrana celular probablemente sirve como un sensor molecular de lesión de los astrocitos y que su translocación al núcleo es fundamental para los cambios asociados con la activación. Cuando las interacciones célula- célula se ven comprometidas por lesión, o cuando ocurre la activación de quinasas asociadas a la membrana, tales como src o EGFR, la fosforilación de β -catenina podría interrumpir su interacción con los constituyentes de los complejos de la membrana, llevando al aumento de β -catenina citoplasmática y nuclear lo que ocasionaría aumento de la transcripción de genes y proliferación. La inducción de esta cascada molecular después de una lesión a los astrocitos produce diversas poblaciones de astrocitos reactivos, con un patrón de crecimiento desincronizado donde los patrones normales de los astrocitos reactivos se perdieron y propiedades, tales como la proliferación y la migración, se producen de manera caótica, no regulada, en un entorno donde conviven los distintos tipos celulares sometidos a una señalización también desregulada. En este contexto, parece que la proliferación exacerbada de las AbAs está estrechamente relacionada con la pérdida de la inhibición por contacto que se observa.

8.3 Características morfológicas y ultraestructurales de las AbAs

8.3.1. Dimensiones, forma y núcleo

Las distintas aproximaciones empleadas permiten afirmar que las AbAs en cultivo se disponen como células aplanadas, elongadas, con dimensiones entre 30 y 40 μm , con un núcleo prominente con formaciones redondeadas numerosas de entre 1 y 2 μm de tamaño. En el cultivo diluido, la forma de los núcleos fue bastante regular, mientras que en los acúmulos, la apariencia más redondeada o aplanada del núcleo dependía de la posición de la célula en el acúmulo. En algunos casos, la MET evidenciaba parches de cromatina condensada distribuidas en todo el núcleo (Fig. 15-16). Sin embargo, Peters y cols., (1991), una de las referencias más conocidas en análisis ultraestructural de astrocitos, y Reinchenbach y Wolburg (2009) indican que tanto en los astrocitos fibrosos como los protoplasmáticos, el carioplasma tiene una densidad bastante uniforme con algunos grumos de cromatina ubicados solamente en las adyacencias más cercanas a la envoltura nuclear. Esta característica fue observada en astrocitos neonatales NoTg cuando se analizaron comparativamente el citoesqueleto y las mitocondrias (Fig. 18), sugiriendo que es una característica de los astrocitos que parece mantenerse en cultivo.

8.3.2. Citoesqueleto

El citoesqueleto de actina no parece ser significativamente diferente en las AbAs respecto de los astrocitos neonatales (Fig. 7), sin embargo, las AbAs claramente no presentan una presencia significativa de filamentos intermedios (Fig. 19), a diferencia de los astrocitos fibrosos y protoplasmáticos donde en gran medida, la riqueza en filamentos o fibrillas es descripta como el componente citoplasmático más prominente (Peters y cols., 1991; Pekny y Lane, 2007; Reinchenbach y Wolburg, 2009). La falta de filamentos intermedios en AbAs parece correlacionarse directamente con su carencia de GFAP (Díaz-Amarilla y cols., 2011) y podría además visualizarse como un signo de participación en el daño dada la vinculación que Dietrich y cols. (2005) realizan entre la falta de GFAP y el daño celular en la enfermedad de la sustancia blanca evanescente. Las AbAs presentan además un robusto citoesqueleto rico en α -tubulina lo que fue observado mediante inmunocitoquímica (Fig. 8C) y en algunas imágenes de MET (Fig. 19). Aunque no se hizo la comparación en este trabajo, tomando como referencia la literatura (Hesketh y cols., 1984; Sorci y cols., 2000; Oliveira-Loureiro y cols., 2012), pareciera que las AbAs presentan una inmunoreactividad mucho mayor que los

astrocitos neonatales. Por otra parte, en astrocitos maduros, Peters y cols. (1991) describen escasa presencia de microtúbulos interpuestos entre las fibrillas del citoplasma. Los mismos autores reportan que los astrocitos neonatales de ratas son ricos en microtúbulos, los que van decreciendo a medida que la maduración ocurre y se van adquiriendo los filamentos intermedios típicos que son casi totalmente ausentes al nacimiento (Peters y cols., 1991). No se observó una presencia significativa de microtúbulos cuando se analizaron astrocitos NoTg al MET (Fig. 18). Por ello, aunque se reconoce como muy prematuro y que debe ser estudiado en profundidad, la riqueza de microtúbulos en las AbAs junto a su escasez de filamentos intermedios, podría apoyar la idea de que éstas células sean menos diferenciadas que los astrocitos maduros y que las características antedichas que muestran las AbAs recapitulan algunas de las características de los estadios astrocitarios más inmaduros.

8.3.3. *Organelos celulares*

Peters y cols. (1991) afirman que en los astrocitos, los organelos usuales aparecen dispersos en un citoplasma claro aunque están principalmente confinados a la región perinuclear, a excepción de las mitocondrias. Todos los componentes citoplasmáticos están en los procesos más importantes, pero los menores carecen de mitocondrias, RER y microtúbulos. Las AbAs mostraron en general citoplasmas oscuros que dificultaban en ocasiones el reconocimiento de los organelos presentes.

8.3.4. *Retículo endoplásmico rugoso*

Las AbAs presentaron niveles extremadamente elevados del marcador de estrés de retículo GRP78/BiP (Fig. 11). Además, los resultados de MET, tanto los producidos en *pellet* como procesados en plano *flat* TOP (Figs. 17 y 20), muestran que las AbAs tienen un RER prominente con vesículas extremadamente dilatadas a las que se adhieren numerosos ribosomas en su cara externa. En algunas imágenes de MET también fue posible observar la presencia de polisomas. Estas características fueron encontradas en todos las tandas de cultivos de AbAs y en todas las condiciones de siembra y procesamiento y difiere con lo descrito para los astrocitos típicos. Peters y cols. (1991) afirman que el RER de los astrocitos está representado por un número relativamente pequeño de cisternas cortas irregulares, prominentemente tachonadas con ribosomas. La superficie citoplasmática de la membrana nuclear externa está tachonada desigualmente con ribosomas y el pericarion contiene escasos ribosomas libres

dispuestos como granos individuales, rosetas o espirales. Esta diferencia entre las células AbAs y lo que la literatura reporta en astrocitos tiene una relevancia funcional enorme. La dilatación anormal de las cisternas del RER además de los niveles extremos de GRP78/BiP indican que las AbAs tienen un estrés de RE importante, lo que podría jugar un rol importante en la fisiopatología de la ELA (Walker y cols., 2013). Se ha descrito que el estrés de RE precede la aparición de las manifestaciones clínicas en los modelos animales de ELA que sobreexpresan SOD1 mutada y que la manipulación genética de los mediadores de estrés de RE modula la progresión de la enfermedad en esos modelos animales. El estrés de RE también está presente en los casos esporádicos de ELA y en las formas familiares asociadas a alteraciones en otras proteínas como la TDP-43 (del inglés *TAR DNA-binding protein 43*) (Walker y cols., 2013). El estrés de RE causa fragmentación de TDP-43 y a su vez, la sobreexpresión de esta proteína provoca cambios en la señalización de los mediadores de estrés lo que potencia un círculo negativo que se retroalimenta (Suzuki y Matsuoka, 2012).

8.3.5. Mitocondrias

El uso de la sonda mitocondrial Mitofluor en células AbAs vivas (Fig. 9) y las imágenes de MET (Fig. 21) muestran que las AbAs poseen mitocondrias que parecen ser más pequeñas que las presentes en los astrocitos y que además, a diferencia de lo que Peters y cols. (1991) reportan, están localizadas predominantemente en una región del citoplasma y son menos abundantes en los procesos principales. El tamaño pequeño y apariencia oscura y pobre en crestas de las mitocondrias de AbAs se diferencia claramente de las mitocondrias que muestran los astrocitos neonatales NoTg (Fig. 18) que presentaron características similares a las descritas en la literatura en cuanto a morfología (generalmente elongada), tamaño y estructura fina (Peters y cols., 1991). Ni en las AbAs ni en los astrocitos, se reconocieron mitocondrias ramificadas o en forma de X como describen Robert y Hervor (2007) en astrocitos sometidos a concentraciones altas de antibióticos. Más bien, las alteraciones reportadas tienen que ver con el tamaño y número menor y la mayor electrodensidad que presentan las mitocondrias de AbAs.

Por otra parte, era esperable que las células AbAs presentaran mitocondrias atípicas ya que se han reportado diversas anomalías mitocondriales (alteraciones en la forma, grado de dilatación y presencia de vacuolas) en los modelos murinos de ELA que

sobreexpresan SOD1 mutada y en los tejidos de la ELA esporádica humana (Sasaki e Iwata, 1996, 2007, citados por Kawamata y Manfredi, 2011). Estas alteraciones mitocondriales aparecen antes de la parálisis y de la degeneración de las motoneuronas, lo que sugiere una participación activa de la disfunción mitocondrial en la patogénesis de la ELA (Kawamata y Manfredi, 2011). Se ha descrito además que en el inicio de la enfermedad, la respiración mitocondrial y la síntesis de ATP son defectuosas en el cerebro y la médula espinal de ratones SOD1G93A, pero las mitocondrias además pueden estar involucradas en la ejecución apoptótica de las motoneuronas enfermas. Además, la alteración de la localización de las mitocondrias en sitios celulares cruciales como la sinapsis o los nodos de Ranvier puede contribuir a la denervación (Kawamata y Manfredi, 2011). La disfunción mitocondrial astrocitaria tiene además un papel preponderante para la sobrevida neuronal. Los astrocitos tienen rutas metabólicas alternativas que les proveen energía a costa de causar una privación del suministro trófico y de intermediarios energéticos a las neuronas. Por otra parte, la disfunción mitocondrial astrocitaria produce un aumento de estrés oxidativo que también participa en la muerte neuronal (Barbeito y cols., 2004; Olivera y cols., 2011).

8.3.6. Gotas de lípidos en el citoplasma de las AbAs

Las células AbAs en cultivo mostraron una alta afinidad por el compuesto lipofílico tetróxido de osmio (Fig. 14) y cuando fueron expuestas a MET se evidenciaron gotas lipídicas redondeadas en un número y tamaño importante (Fig. 22). En algunas situaciones eran gotas únicas pero en otras se presentaban en un número entre 8 y 15 con una cercanía importante a las inclusiones, vesículas del RER o a las mitocondrias (Fig. 22). Se ha reportado que las células expuestas a estrés de diferentes orígenes, son capaces de sintetizar triglicéridos y generar gotas de lípidos (Cabodevilla y cols., 2013). Aunque la relevancia fisiológica de esta respuesta es incierta, podría jugar un rol protector frente a la privación de nutrientes, ya que la inhibición de la generación de gotas de lípido o su depleción llevó a la muerte a cultivos privados de astrocitos o glioblastoma (Cabodevilla y cols., 2013). Estos autores sostienen que durante la privación de nutrientes, la viabilidad celular se mantiene por β -oxidación de los ácidos grasos lo que requiere la biogénesis y la movilización de las gotas de lípido. En este sentido, las gotas lipídicas en las AbAs podrían actuar como reservorio energético ya que éstas células tienen una disfunción mitocondrial significativa que ocasionaría que utilicen otras vías alternativas a la fosforilación oxidativa para producir ATP (P.

Cassina, comunicación personal).

8.3.7. *Agregados y formaciones citoplasmáticas*

Las AbAs presentaron formaciones citoplasmáticas diversas, abundantes y heterogéneas en mayor número y cualitativamente muy diferentes a las referidas en astrocitos típicos. Peters y cols., (1991) describen en astrocitos normales: cuerpos densos homogéneos y heterogéneos, algunos lisosomas que fueron reconocidos en las fotografías como inclusiones muy electrondensas, irregulares y de tamaño significativo, escasos peroxisomas que contienen catalasa, granos de glucógeno (densos con diámetros de 20 a 30 nm) y de lipofucsina. Con las herramientas empleadas no pudimos identificar granos de glucógeno ni de lipofucsina ni lisosomas. En cambio, observamos que las AbAs presentan agregados que son escasamente descritos en astrocitos, entre los que se encuentran gotas de lípidos y formaciones diversas que podrían estar relacionadas a una posible actividad secretoria, autofágica y/o endocítica. Estas formaciones se discuten a continuación.

8.3.8. *Evidencias morfológicas de una posible actividad secretoria aumentada en AbAs*

Las AbAs parecen tener una actividad secretoria significativa dada la presencia de secretogranina II y cromogranina A determinada por inmunocitoquímica y por Western blotting (Fig. 10). En los astrocitos neonatales solo fue posible detectar un nivel moderado de estas proteínas por Western blotting. Estos hallazgos fueron reforzados por la presencia de numerosas vesículas citoplasmáticas evidenciadas por MET que podrían estar relacionadas con la secreción (Fig. 23).

Los astrocitos secretan moléculas de señalización que participan en la comunicación célula-célula que implica neuronas y células gliales en un proceso reconocido como gliotransmisión que es regulado y dependiente de calcio (Araque y cols., 2014). Los gliotransmisores son almacenados en vesículas secretoras similares a las vesículas sinápticas. Sin embargo, los astrocitos también presentan vesículas grandes de núcleo denso que han mostrado contener una variedad de moléculas pequeñas y grandes implicadas en la secreción (Calegari y cols., 1999; Hur y cols., 2010) y que se describen como responsables de más del 70 % de la liberación de calcio inducida por inositol trifosfato (IP₃) en astrocitos (Hur y cols., 2010). Las vesículas densas grandes presentan

inmunoreactividad positiva para secretogranina II y cromogranina B, dos proteínas marcadoras típicas de gránulos secretores y para las tres isoformas de receptores de IP₃, lo que parece indicar la presencia y funcionamiento de un mecanismo secretorio dependiente de Ca²⁺ y modulado por IP₃ en astrocitos (Hur y cols., 2010; Fig. 26).

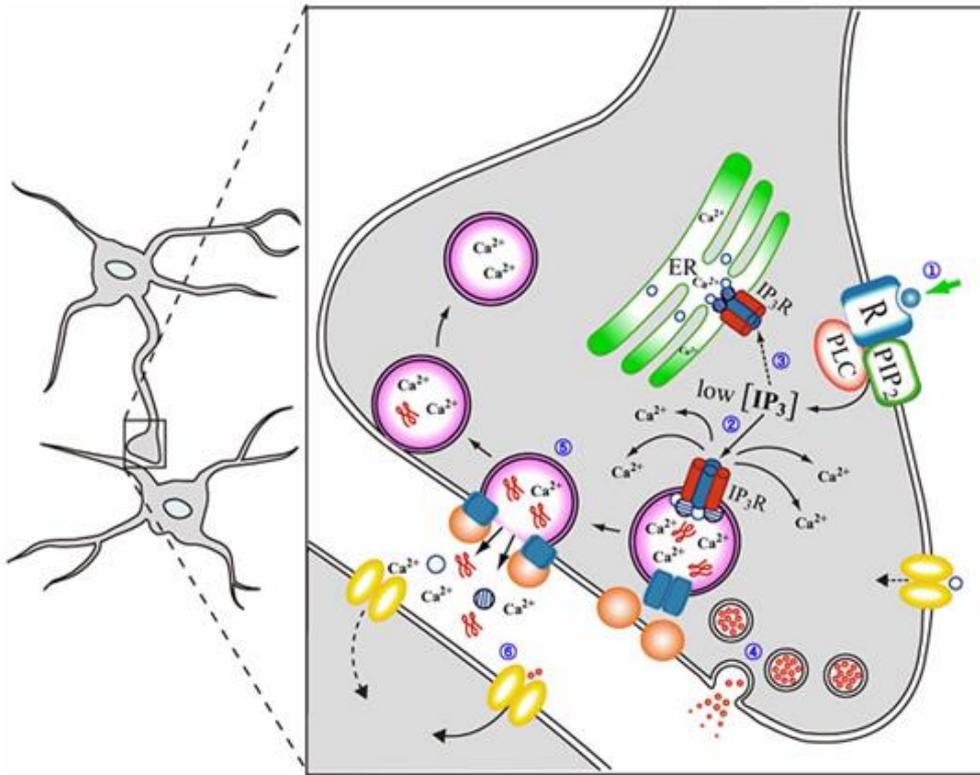


Fig. 26. Actividad secretoria en astrocitos. El esquema muestra la vía secretoria en astrocitos y los distintos estadios de las vesículas secretorias. Nótese la similitud con las distintas formas observadas en los cultivos de AbAs (Fig. 23). Tomado de Hur y cols., 2010.

Como se dijo anteriormente, en los cultivos empleados en este trabajo, solo fue posible observar inmunoreactividad positiva para secretogranina y cromogranina A en cultivos de AbAs, lo que podría indicar una actividad secretoria mayor en éstas células. La inmunoreactividad negativa podría deberse además a que los astrocitos de médula espinal no expresen estas proteínas. En este sentido, Calegari y cols. (1999) demostraron que los astrocitos de hipocampo expresaron secretogranina II en las vesículas grandes de núcleo denso, pero esta proteína no se encontró en astrocitos de corteza o cerebelo, lo que podría implicar que la presencia del mecanismo de secreción podría depender de la región cerebral de donde provengan los astrocitos.

Los análisis de inmunoMET podrían arrojar luz para identificar no solo la presencia de secretogranina II o cromogranina A en AbAs y para comenzar a evaluar la importancia de su actividad secretoria, fundamentalmente en vista de los reportes que indican que la secreción regulada en astrocitos puede jugar un papel en la diferenciación neuronal, en la modulación de la adhesión celular al sustrato (Calegari y cols., 1999; Hur y cols., 2010) y/o eventualmente en la liberación de factores tóxicos. En este sentido, las células AbAs poseen una toxicidad sin precedente para las motoneuronas a través de mecanismos aún desconocidos. A diferencia de los astrocitos NoTg que proporcionan un soporte trófico excelente y de los astrocitos Tg que son capaces de inducir la apoptosis de aproximadamente el 50% de motoneuronas en cultivo (Barbeito y cols., 2004; Nagai y cols., 2007), la neurotoxicidad del medio condicionado de las AbAs es de aproximadamente el 90%. Esta neurotoxicidad marcadamente mayor, permite descartar que los efectos sobre la viabilidad neuronal que producen las AbAs sean causados únicamente por disminución de la actividad trófica típica de los astrocitos. Más bien parece que las AbAs son una subclase de células que producen factores solubles que matan activamente a las motoneuronas (Díaz-Amarilla y cols., 2011). Una evidencia que aporta esta posibilidad fue dada por Urushitani y cols. (2006) que mostraron que los astrocitos Tg eran capaces de secretar las formas mutadas de SOD1. Es interesante acotar al respecto, que estos autores muestran que la secreción de la SOD1 mutada se produce en estrecha asociación con la cromogranina A. Más aún, un reporte de Li y cols. (2013) sostiene que la actividad secretoria en particular de los granos (gránulos) de estrés es crucial en la patogénesis de la ELA.

8.3.9. Evidencias sobre actividad endocítica y autofágica en AbAs

El análisis ultraestructural de las AbAs mostró la presencia de numerosas vesículas autofágicas (Fig. 24) y diversas inclusiones /formaciones citoplasmáticas (Fig. 25). Además se observaron formaciones, con una o varias membranas más o menos concéntricas y cuerpos formados por múltiples vesículas rodeadas por una estructura membranosa -a los que Robert y Hevor (2007)- refieren como cuerpos multivesiculares mieloides (Fig. 24). Estos autores, reportaron que los astrocitos en cultivo tienen una actividad endocítica potenciada que lleva a un aumento de la actividad lisosomal y a la formación de vesículas intracitoplasmáticas producidas por la imposibilidad de las enzimas lisosomales de hidrolizar los complejos creados con la acumulación consecuente de las membranas en las formaciones citoplasmáticas. Esto podría estar

ocurriendo en las células AbAs en forma potenciada dada la abundancia de acúmulos o formaciones diversas. Por otra parte, la presencia de formaciones electrondensas, irregulares en forma y tamaño en las células AbAs (Figs. 24 y 25) parece recordar a los autofagosomas y a los denominados cuerpos residuales de los procesos autofágicos (Herrera y cols., 2006). La autofagia es un proceso estrechamente regulado de degradación y reciclado de constituyentes celulares que proporciona a la célula resistencia a la inanición o privación de aminoácidos esenciales antes de entrar en apoptosis y una fuente de energía a partir de la renovación fisiológica de sus componentes (Herrera y cols., 2006). Hasta el momento, la identificación más fiable de la autofagia se produce por análisis ultraestructural en el que se reconocen diversos estadios. El proceso autofágico comienza con la formación de vacuolas autofágicas membranosas que contienen componentes citoplasmáticos, a la que acompañan generalmente la dilatación de mitocondrias y RE. Estas vacuolas se fusionan luego con los lisosomas. La digestión de los componentes secuestrados y la compactación de las membranas, resulta en las estructuras electrondensas llamadas cuerpos residuales. La coexistencia de distintas formaciones citoplasmáticas membranosas y de electrondensidad diferente (Fig. 24) parecen evidenciar la presencia de autofagia activa en las AbAs. Este hallazgo parece estar de acuerdo con la presencia de autofagia aumentada en diversas condiciones neurodegenerativas incluyendo ELA y Alzheimer, donde la acumulación de lisosomas intraneuronales es una característica patognomónica según Nixon y cols. (2005, citados por Herrera y cols., 2006).

Por otra parte, aunque menos conocido y reportado más recientemente, los astrocitos participan activamente en la remodelación continua de los circuitos neurales durante la vida adulta, mediante procesos fagocíticos específicos que son fuertemente dependientes de la actividad neural (Chung y cols., 2013). Los autores proponen que esta nueva función tiene indudable importancia para la comprensión del proceso de deterioro neurológico, donde una actividad fagocítica aumentada por parte de los astrocitos podría colaborar con el retiro de las sinapsis antiguas o innecesarias y dejar espacio a nuevas conexiones. Alternativamente, podría convertirse en un mecanismo activo de destrucción de sinapsis y neuronas. El contexto de donde se obtienen las AbAs (en un animal sintomático donde la muerte neuronal abunda y el ambiente inflamatorio se potencia) parece ser adecuado entonces para que estas células tengan una actividad fagocítica importante.

En suma, la posible actividad endocítica, autofágica y fagocítica propuesta para las AbAs concuerda con la idea de que éstas células son surgidas de una transdiferenciación de microglía activa y que pueden preservar algunas características de la estirpe que les dio origen. En este sentido, los hallazgos de Trías y cols. (2013) muestran que las células *AbA-like* presentes en la médula espinal de animales sintomáticos SODG93A co-expresan GFAP astrocitaria y dos marcadores diferentes de microglía como Iba1 o CD163. Ejemplos de esta co-expresión son raros pero se han descrito en células neoplásicas de glioblastoma multiforme (Huysentruyt et al, 2011; Persson y Englund, 2012), que parecen adquirir propiedades fagocíticas como consecuencia de las condiciones inflamatorias dramáticas en que se producen los tumores (Persson y Englund, 2012). Otros trabajos han mostrado características aberrantes de las células microgliales en ratas SOD1G93A sintomáticas, las que incluyen la formación de *clusters* (Howland et al., 2002) y células gigantes multinucleadas (Fendrick y cols., 2007). Como se ha dicho anteriormente, las AbAs en cultivo, no solo se agrupan en monocapas, sino que además forman acúmulos, sin embargo, no hemos observado células multinucleadas en las muestras analizadas, lo que podría haber sido un sustento fuerte para la hipótesis de una actividad fagocítica aumentada.

Finalmente, debe tenerse en cuenta que la suma de las distintas alteraciones que presentan las células AbAs puede tener una significación fisiológica mucho más importante que al considerar estas alteraciones individualmente. Por ejemplo, el estrés de RE que las AbAs presentan puede estar asociado a la disfunción mitocondrial, la alteración del metabolismo lipídico y la actividad autofágica. El estrés de RE y la disfunción mitocondrial pueden interactuar para facilitar y perpetuar el desarrollo de la enfermedad (Mei y cols., 2014) ya que ambos desempeñan un papel fundamental en la fisiología y la homeostasis celular, incluyendo el transporte de lípidos, la señalización de Ca^{2+} y la apoptosis. El estrés de RE puede inducir disfunción mitocondrial en forma dependiente de Ca^{2+} o por la producción de especies reactivas de oxígeno, alterando el metabolismo de Ca^{2+} e induciendo la permeabilización de la membrana mitocondrial externa que se vuelve vulnerable a la apoptosis (Mei y cols., 2014). Por otra parte, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo resultante también inducen estrés de RE (Mei y cols., 2014). Por otra parte, las tres principales vías de estrés de RE están involucradas en la activación de la autofagia (Li y cols., 2008; citado por Mei y cols., 2014), un proceso cuya desregulación se asocia con el envejecimiento y la

neurodegeneración y que dependiendo del contexto, su activación aumenta la supervivencia celular u ordena a la célula a someterse a una muerte no apoptótica en condiciones de estrés de RE. Sin embargo, por otro lado, la autofagia es un mecanismo estrechamente ligado a la disfunción mitocondrial y es uno de los mecanismos empleados por los astrocitos para la remoción de las mitocondrias dañadas en un intento de recuperación de la homeostasis y de la funcionalidad mitocondrial (Motori y cols., 2013).

Además, las AbAs son altamente ricas en matriz extracelular que puede ser responsable en parte de su toxicidad elevada. La completa ausencia de motoneuronas que sobreviven sobre una capa confluyente de AbAs reportada por Díaz-Amarilla y cols. (2011), sugiere que éstas células crean un microambiente no permisivo que podría estar mediado en parte por la acumulación de proteínas de la matriz extracelular que se sabe están reguladas en más en los modelos de ELA en ratas (Vargas y cols., 2008). En este sentido, la siembra a la gota de los cultivos de AbAs que favoreció la formación de agregados celulares, permitió observar una gran cantidad de matriz extracelular, que producía una delimitación muy marcada de dichos acúmulos y la ausencia de células entre los mismos. Esta observación parece indicar, que en cierto punto, la matriz extracelular de las AbAs puede restringir además, su propia migración, ya que las células optan por “amontonarse” antes que extenderse y cubrir toda la superficie. Es de esperar que de haber una matriz extracelular poco permisiva, el crecimiento neuronal sea muy impedido dada la alta dependencia de sustrato que presentan las neuronas y en particular las motoneuronas dado su gran tamaño.

9. CONCLUSIONES

El presente estudio trató de realizar la caracterización morfológica de una nueva población glial surgida luego de cultivar células provenientes de la médula espinal de animales sintomáticos de un modelo experimental de ELA. Estas células presentan características celulares y ultraestructurales propias que parecen ser significativamente diferentes a las que muestran los cultivos de astrocitos neonatales, por lo que se cree que el trabajo realizado ha hecho aportes significativos al conocimiento de las células recientemente aisladas y puede contribuir a su identificación y monitoreo.

10. PERSPECTIVAS

Como pasos futuros, desde una perspectiva morfológica está previsto:

- 1) Caracterizar la presencia de la ruta de las cateninas mediante inmunocitoquímica, Western blotting y MET en las AbAs, así como reguladores del ciclo celular como p27Kip1 y las ciclinas A y D y vincularla con la formación de multicapas y un posible comportamiento invasivo de las células AbAs.

- 2) Complementar los datos de MET con inmunoelectromicroscopía, en particular con marcadores que permitan determinar la capacidad secretoria, endocítica y/o autofágica de las AbAs, dada la importancia de estos mecanismos en la progresión de la enfermedad.

- 3) Realizar un análisis detallado mediante MEB de los cultivos subconfluentes y confluentes de AbAs luego de la fijación (sin secado de punto crítico ni metalado) para realizar el análisis elemental y correlacionar las particularidades observadas en las células AbAs con la sobrecarga de SOD1 mutada.

- 4) Realizar una comparación detallada de las células AbAs con los astrocitos neonatales en cultivo en condiciones basales y frente a un contexto que se asimile al que existe cuando las AbAs parecen generarse (por ejemplo luego del desafío con un desencadenante de inflamación como LPS o aumento de estrés oxidativo).

- 5) Realizar una comparación similar con astrocitos obtenidos de animales adultos Tg y NoTg, así como microglía en condiciones basales y frente a reactividad, ya que la edad puede ser una variable que incida sobre las propiedades de las células gliales (Tichauer y cols., 2014).

- 6) Extender los estudios a muestras de médula espinal de animales Tg y NoTg y determinar si las células *Aba-like* previamente descritas como cercanas a las motoneuronas en degeneración y con marcadores astrocitarios y microgliales simultáneos (Díaz-Amarilla y cols., 2011; Trías y cols., 2013), presentan algunas de las características que las células AbAs muestran en cultivo.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araque A y cols. (2014) *Gliotransmitters travel in time and space*. *Neuron*, **81**(4): 728-739.
- Barbeito L y cols. (2004) *A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis*. *Brain Res Brain Res Rev*, **47**(1): 236-274.
- Boillee S y cols. (2006) *ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors*. *Neuron*, **52**(1): 39-59.
- Calegari F y cols (1999) *A regulated secretory pathway in cultured hippocampal astrocytes*. *J Biol Chem*, **274**: 22539-22547.
- Cassina P y cols. (2008) *Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants*. *J Neurosci*, **28**(16): 4115-4122.
- Cabodevilla AG y cols (2013) *Cell survival during complete nutrient deprivation depends on lipid droplet-fueled β -oxidation of fatty acids*. *J Biol Chem*, **288**(239): 27777-27788.
- Chao TI y cols. (2002) *The synapse-astrocyte boundary: anatomical basis for an integrative role of glia in synaptic transmission*. En: *Tripartite synapses: synaptic transmission with glia* (pp 3-23).
- Chung WS y cols. (2013) *Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways*. *Nature* **504**(7480): 394-400.
- Clement AM y cols. (2003) *Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice*. *Science*, **302**(5642): 113-117.
- Cooper JA (1987) *Effects of cytochalasin and phalloidin on actin*. *J Cell Biochem* **105**: 1473-1478.
- De Keyser J y cols. (2008) *Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders*. *J Neurol Sci*, **267**(1-2): 3-16.
- Díaz-Amarilla P y cols. (2011) *Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**(44): 18126-18131.
- Dietrich J y cols. (2005) *EIF2B5 mutations compromise GFAP+ astrocyte generation in vanishing white matter leukodystrophy*. *Nat Med*, **11**(3): 277-283.
- Eddleston M y Mucke L (1993) *Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease*. *Neuroscience*, **54**(1): 15-36.
- Fendrick SE y cols. (2007) *Formation of multinucleated giant cells and microglial degeneration in rats expressing a mutant Cu/Zn superoxide dismutase gene*. *J. Neuroinflammation* **4**: 9.
- Fullwood MJ y cols. (2012) *Targeting phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 α to treat human disease*. *Prog Mol Biol Transl Sci* **106**: 75-106.
- Gong YH y cols. (2000). *Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration*. *J Neurosci*, **20**(2): 660-665.

- Gurney ME y cols. (1994) *Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation*. Science, **264**(5166): 1772-1775.
- Haidet-Phillips AM y cols. (2011) *Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons*. Nat Biotechnol, **29**(9): 824-828.
- Herrera F y cols. (2006) *Tryptamine induces cell death with ultrastructural features of autophagy in neurons and glia: possible relevance for neurodegenerative disorders*. Anat Record, **288A**: 1026-1030.
- Hill SJ y cols. (1996) *Regional heterogeneity in the response of astrocytes following traumatic brain injury in the adult rat*. J Neuropathol Exp Neurol, **55**(12): 1221-1229.
- Hirano A (1996) *Neuropathology of ALS: an overview*. Neurology, **47**(4 Suppl 2): S63-66.
- Hirsch EC y cols. (2003) *The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease*. Ann N Y Acad Sci, **991**: 214-228.
- Hesketh JE y cols. (1984) *Cold-stable microtubules and microtubule-organizing centres in astrocytes in primary culture*. Neurosci Lett, **51**(2): 155-160.
- Hirano A (2005) *The role of electron microscopy in neuropathology: a personal historical note*. Acta Neuropathol **109**: 115-123.
- Howland DS y cols. (2002) *Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS)*. Proc Natl Acad Sci U S A, **99**(3): 1604-1609.
- Hur SH y cols. (2010) *Evidence for the existence of secretory granule (dense-core vesicle)-based inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca²⁺ signaling system in astrocytes*. PLoSone **5**(8): e11973.
- Huysentruyt LC y cols. (2011) *Hypothesis: are neoplastic macrophages/microglia present in glioblastoma multiforme?* ASN Neuro **3**(4): e00064.
- Kawamata H y Manfredi G (2010) *Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS*. Mech Ageing Dev, **131**(7-8): 517-526.
- Kushner PD y cols. (1991) *Reactive astrogliosis is widespread in the subcortical white matter of amyotrophic lateral sclerosis brain*. J Neuropathol Exp Neurol **50**(3): 263-277.
- Li YR y cols. (2013). *Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis*. J Cell Biol. **201**(3):361-372
- Lino MM y cols. (2002) *Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease*. J Neurosci, **22**(12): 4825-4832.
- Maragakis NJ y Rothstein JD (2006) *Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease*. Nat Clin Pract Neurol **2**(12): 679-689.
- Mc Geer PL y Mc Geer EG (2002) *Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis*. Muscle Nerve, **26**(4): 459-470.
- Mei Y y cols. (2014) *Endoplasmic reticulum stress and related pathological processes*. J Pharmacol Biomed Anal **1**(2): 1000107–1000123.
- Migheli A y cols. (1999) *S-100beta protein is upregulated in astrocytes and motor neurons*

in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. Neurosci Lett, **261**(1-2): 25-28.

- Monsonego A y Weiner HL (2003) *Immunotherapeutic approaches to Alzheimer's disease.* Science, **302**(5646): 834-838.
- Motori E y cols. (2013) *Inflammation-induced alteration of astrocyte mitochondrial dynamics requires autophagy for mitochondrial network maintenance.* Cell Metabolism, **18**: 844-859.
- Nagai M y cols. (2007) *Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons.* Nat Neurosci **10**(5): 615-622.
- Nakatsuji Y y Miller RH (2001) *Density dependent modulation of cell cycle protein expression in astrocytes.* J Neurosci Res, **66**(3): 487-496.
- Oliveira Loureiro S y cols. (2013) *Cytoskeleton of cortical astrocytes as a target to proline through oxidative stress mechanisms.* Exp Cell Res, **319**(3): 89-104.
- Olivera S y cols. (2008) *Astrocytic proliferation and mitochondrial dysfunction induced by accumulated glutaric acidemia I (GAI) metabolites: possible implications for GAI pathogenesis.* Neurobiol Dis, **32**(3): 528-534.
- Olivera-Bravo S y cols. (2011) *Neonatal astrocyte damage is sufficient to trigger progressive striatal degeneration in a rat model of glutaric acidemia-I.* PLoSone, **6**: e20831.
- Papadeas ST y cols. (2011) *Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) mutation induce wild-type motor neuron degeneration in vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A, **108**(43): 17803-17808.
- Pekny M y Lane EB (2007) *Intermediate filaments and stress.* Exp Cell Res, **313**: 2244-2254.
- Persson A y Englund E (2012) *Phagocytic properties in tumor astrocytes.* Neuropathology **32**: 252-260.
- Peters A y cols. (1991) *The fine structure of the nervous system. Neurons and their supporting cells.* 3ra Ed.
- Pramatarova A y cols. (2001) *Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment.* J Neurosci, **21**(10): 3369-3374.
- Reichenbach A y Wolburg H (2009) *Astrocytes and ependymal glia.* En: Neuroglia (**Cap2**, pp. 19-35).
- Ridet JL y cols. (1997) *Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function.* Trends Neurosci, **20**(12): 570-577.
- Robert F y Hervor TK (2007) *Abnormal organelles in cultured astrocytes are largely enhanced by streptomycin and intensively by gentamicin.* Neurosci, **144**: 191-197.
- Rosen DR (1993) *Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis.* Nature, **364**(6435): 362.
- Rowland LP y Shneider NA (2001) *Amyotrophic lateral sclerosis.* N Engl J Med, **344**(22): 1688-1700.

- Schiffer D y cols. (1996) *Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis*. J Neurol Sci **139** Suppl: 27-33.
- Sofroniew MW y Vinters HV (2010) *Astrocytes: biology and pathology*. Acta Neuropathol **119**(1): 7-35.
- Sorci G y col. (2000) *Effects of S100A1 and S100B on microtubule stability. An in vitro study using triton-cytoskeletons from astrocyte and myoblast cell lines*. Neurosci, **99**(4): 773-783.
- Suzuki H y Matsuoka M (2012) *TDP-43 toxicity is mediated by the unfolded protein response-unrelated induction of C/EBP homologous protein expression*. J Neurosci Res, **90**(3): 641-647.
- Teismann P y cols. (2003) *Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease*. Mov Disord, **18**(2): 121-129.
- Tichauer JE y cols. (2014) *Age-dependent changes on TGF β 1 Smad3 pathway modify the pattern of microglial cell activation*. Brain Behav Immun **37**: 187-196.
- Trías E y cols. (2013) *Phenotypic transition of microglia into astrocyte-like cells associated with disease onset in a model of inherited ALS*. Frontiers in Cell Neurosci, **7**: 1-8.
- Urushitani M y cols. (2006) *The endoplasmic reticulum-Golgi pathway is a target for translocation and aggregation of mutant superoxide dismutase linked to ALS*. FASEB J, **22**(7): 2476-2487.
- Vargas MR y cols. (2006) *Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR-dependent motor neuron apoptosis*. J Neurochem **97**(3): 687-696.
- Vargas MR y cols. (2008) *Transcriptional profile of primary astrocytes expressing ALS-linked mutant SOD1*. J Neurosci Res, **86**(16): 3515-3525.
- Verkhatsky A y cols. (2012) *Neurological diseases as primary gliopathies: a reassessment of neurocentrism*. ASN Neuro **4**(3): e00082.
- Walker AK y cols. (2013) *ALS-Associated TDP-43 Induces Endoplasmic Reticulum Stress, Which Drives Cytoplasmic TDP-43 Accumulation and Stress Granule Formation*. PLoSone **8** (11): e81170.
- Yang Ch y cols. (2012) *β -Catenin signaling initiates the activation of astrocytes and its dysregulation contributes to the pathogenesis of astrocytomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, **109**(18): 6963-6968.
- Zhang Y y Barres BA (2010) *Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology*. Curr Opin Neurobiol, **20**(5): 588-594.