Pasantía de Grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas

Orientación Neurociencias

Facultad de Ciencias

EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN LA INTERACCIÓN ASTROCITO-NEURONA

Estudiante: Bach. Sebastián Darío Rodríguez Bottero

Tutor: Dra. Patricia Cassina

Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina.

Montevideo-Uruguay

Diciembre 2012

Agradecimientos

Un especial agradecimiento a la Dra. Patricia Cassina por abrirme las puertas de su laboratorio, por su confianza en mí y su incondicional apoyo.

A mis compañeros y ya amigos del laboratorio, Ernesto y Laura, por ayudarme y compartir el día a día.

A los amigos que conocí en la catedra de Histología.

A mi familia por el apoyo incondicional en este camino.

A los compañeros y amigos de la Facultad de Ciencias.

Por último, a Flo, Vale y Gaby, por estar siempre, en las buenas y en las malas.

INDICE

RESUMEN……5

INTRODUCCIÓN……..6

Los astrocitos…….6

El papel de los astrocitos en las enfermedades neurodegenerativas…….8

La mitocondria fuente y blanco de estrés oxidativo……9

Alteraciones mitocondriales en las enfermedades neurodegenerativas…11

Disfunción mitocondrial en los astrocitos……12

HIPÓTESIS DE TRABAJO……...13

OBJETIVOS……..13

Objetivo General…....13

Objetivos específicos……13

MATERIALES Y MÉTODOS……14

Animales……..14

Cultivo primarios de astrocitos……..14

Tratamiento de astrocitos con inhibidores mitocondriales……..16

Co-cultivos de neuronas hipocampales-astrocitos……...18

Análisis del potencial de membrana mitocondrial (ΔΨm) mediante ensayo de yoduro de 5, 5´, 6, 6´-tetracloro-1, 1-3, 1´-tetraetilbenzimidazol-carbocianina (JC-1)……18

Inmunofluorescencia……..20

Estudio de proliferación celular……21

Inmunoblot……...21

Procesamiento y análisis de datos……...30

RESULTADOS……31

Modificación del potencial mitocondrial por los inhibidores específicos….31

Acción de los inhibidores mitocondriales sobre la morfología astrocitaria..32

Acción de los inhibidores mitocondriales sobre la proliferación astrocitaria... ……34

Efectos del tratamiento con los inhibidores mitocondriales en la actividad trófica de los astrocitos……35
Evaluación de los niveles de expresión de GLT-1 en los astrocitos tratados con los inhibidores mitocondriales……36
DISCUSIÓN……...37
PERSPECTIVAS……..41
BIBLIOGRAFÍA……42

RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen una causa cada vez más frecuente de invalidez dado el aumento en la esperanza de vida de la población**.** Nuestro laboratorio ha proporcionado evidencias de que los astrocitos contribuyen al mantenimiento y progresión de las mismas. Los astrocitos portadores de la mutación SODG93A (ligada a formas familiares de la enfermedad neurodegenerativa humana Esclerosis Lateral Amiotrófica, ELA) presentan una actividad mitocondrial reducida, que se acompaña de daño oxidativo y una reducción de su capacidad trófica para las motoneuronas. Además, la inhibición de la actividad mitocondrial en astrocitos no transgénicos obtenidos de la medula espinal determina una disminución de la capacidad trófica para motoneuronas en co-cultivos.
Dado que se han reportado diferencias entre los astrocitos de diferentes regiones del SNC, en el presente trabajo evaluamos si la actividad mitocondrial de los astrocitos de corteza modula la capacidad trófica sobre neuronas hipocampales con el fin de determinar si es un efecto particular de los astrocitos de médula o es extensivo a otras poblaciones de astrocitos del Sistema Nervioso Central. El tratamiento de cultivos primarios de astrocitos corticales, con inhibidores mitocondriales [rotenona (1µM), fluorocitrato (100 µM), antimicina A (5 µM) y azida de sodio (5 µM)], redujo el potencial mitocondrial y se observaron modificaciones morfológicas con inmunofluorescencia para GFAP. Observamos que los astrocitos tratados con los inhibidores mitocondriales disminuyeron entre un 20 y un 70% dependiendo del inhibidor, la supervivencia de neuronas hipocampales posteriormente co-cultivadas sobre dichos astrocitos. Además, el tratamiento con los inhibidores no modificó de manera significativa la proliferación astrocitaria, pero alteró la expresión del transportador de glutamato GLT-1.Evidencias recientes indican que los astrocitos están involucrados en la progresión de las enfermedades neurodegenerativas. Estudiar como influye la actividad mitocondrial de astrocitos de diferentes regiones del sistema nervioso central en su interacción con las poblaciones neuronales circundantes, permitirá profundizar en el conocimiento sobre la patogenia de las mismas así como identificar posibles blancos terapéuticos para el tratamiento de estas enfermedades.

INTRODUCCIÓN

Los astrocitos

Los astrocitos representan la población más abundante de células gliales del sistema nervioso central (SNC). Tradicionalmente, fueron descriptos como una población de células homogéneas, de morfología estrellada, con numerosos procesos y localizados alrededor de las células nerviosas con funciones de sostén. Sin embargo, la aparición de nuevos estudios y el desarrollo de herramientas electrofisiológicas, moleculares y genéticas, han posibilitado un concepto mucho más amplio de su fisiología, siendo actualmente concebidos como una población celular diversa, altamente especializada y con múltiples funciones (Wang y Bordey, 2008; Sofroniew y Vinters, 2010).

En base a su localización y morfología los astrocitos se pueden dividir en dos categorías: fibrosos, en la sustancia blanca, y protoplasmáticos, en la sustancia gris. Los astrocitos protoplasmáticos exhiben múltiples prolongaciones que se dividen en procesos cada vez más pequeños y ramificados asumiendo una distribución redondeada o esférica y cuyas terminales envuelven sinapsis y contactan vasos sanguíneos. Por su parte, los astrocitos fibrosos exhiben largas y finas proyecciones envolviendo típicamente los nodos de Ranvier. Tanto unos como otros presentan una organización anatómica con dominios bien definidos y no solapados, pudiendo, a través de sus procesos distales, contactar con astrocitos vecinos por medio de uniones en hendidura (en inglés, *gap junctions*) (Wang y Bordey, 2008; Sofroniew y Vinters, 2010).

Muchos datos en la literatura permiten sugerir que las poblaciones de astrocitos parecen exhibir heterogeneidad local de acuerdo a la región del SNC que se considere (Hewett, 2009). Los astrocitos en varias regiones anatómicamente distintas del SNC poseen singulares características fenotípicas que directamente pueden influir en las actividades neuronales específicas que definen estas regiones. Muchos rasgos fenotípicos del linaje de astrocitos responden a señales ambientales locales (es decir, son adaptables), lo que sugiere que la plasticidad contribuye a esta diversidad. Ejemplos de esto

constituyen la heterogeneidad en la expresión de canales específicos (Butt y Kalsi, 2006) o el transportador de glutamato GLT-1 (Regan y cols., 2007) entre otros.

Los astrocitos son responsables de una amplia variedad de complejas y esenciales funciones dentro del SNC, brindan soporte estructural, metabólico y trófico a las neuronas, participan activamente controlando la excitabilidad neuronal y la neurotransmisión y actúan en la formación y mantenimiento de la barrera hematoencefálica, contribuyendo a la homeostasis general del SNC (Maragakis y Rothstein, 2006).

Una función astrocitaria fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del SNC es la recaptación del glutamato generado durante la actividad eléctrica neuronal por transportadores específicos presentes en la membrana astrocitaria. GLT-1 [equivalente EAAT2 humano; (Pines y cols., 1992)] es la forma más abundante de transportador de glutamato expresado en todo el SNC, especialmente en el cerebro anterior, el estriado, el hipocampo y la medula espinal (Kanai y Hediger, 2004; Tzingounis y Wadiche, 2007); A nivel celular, este transportador está presente tanto en los astrocitos fibrosos como en los protoplasmáticos (Berger y Hediger, 2000). El GLT1 es responsable de la recaptación del 90% del glutamato en el tejido nervioso adulto (Tanaka y cols., 1997).La alteración de este transportador conduce a un aumento en la concentración de glutamato extracelular y la neurodegeneración por excitotoxicidad subsecuente (Rothstein y cols., 1996; Mitani y Tanaka, 2003). Un ejemplo directo lo constituyen ratones transgénicos que carecen de GLT-1, los cuales presentan convulsiones espontáneas, una selectiva neurodegeneración del hipocampo y la exacerbación aguda de lesiones corticales (Tanaka y cols., 1997).

Ante condiciones patológicas dentro del SNC, ya sea infecciones, isquemia, trauma o enfermedades neurodegenerativas, los astrocitos experimentan un proceso conocido como astrocitosis o astrogliosis (Forman y cols., 2005; Maragakis y Rothstein, 2006; Barbeito y cols., 2004). Dicho proceso implica un

aumento de la proliferación astrocitaria y la adopción de un fenotipo reactivo caracterizado morfológicamente por la hipertrofia nuclear y del soma y desarrollo de ramificaciones largas y gruesas con un aumento en el contenido de la proteína acídica fibrilar glial (en inglés, *glial fibrillary acidic protein*, GFAP), nestina y vimentina. Se ha demostrado además, que la expresión génica de los astrocitos reactivos difiere del exhibido por los astrocitos normales. Los astrocitos reactivos expresan una variedad de marcadores entre los que se incluyen proteínas del citoesqueleto, moléculas de superficie, proteasas, inhibidores de proteasas, factores de crecimiento, citoquinas entre otros que podrían incidir directa e indirectamente sobre la vida de las neuronas (Barbeito y cols., 2004; Markiewicz y Lukosmska, 2006).

El papel de los astrocitos en las enfermedades neurodegenerativas

La ganancia de funciones que acompañan a la astrogliosis hacen de dicho proceso no solo una consecuencia, sino también un contribuyente de peso o el principal responsable de diversas patologías dentro del SNC (Maragakis y Rothstein, 2006; Sofroniew y Vinters, 2010).

En la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) se han proporcionado evidencias de que los astrocitos pueden contribuir a la pérdida neuronal en esta enfermedad. Los astrocitos portadores de la enzima superóxido dismutasa 1(SOD1) mutada resultan neurotóxicos para motoneuronas en co-cultivos tanto en rata (Vargas y cols., 2006) como en ratón (Nagai y cols 2007) o en humanos (Marchetto y cols., 2008). Aunque los mecanismos neurotóxicos no han sido completamente dilucidados, nuestro laboratorio ha proporcionado evidencias de que un aumento en la producción de óxido nítrico (NO) y de factor de crecimiento nervioso (en inglés, *nerve growth factor*, NGF) por parte de los astrocitos puede provocar la muerte de motoneuronas a través de su receptor p75 (Cassina y cols., 2002, 2005; Pehar y cols., 2004). Otro hallazgo que sugirió la participación de los astrocitos en la patogenia de la enfermedad fue la detección de una pérdida severa del transportador GLT-1 en cerebros y médulas espinales postmortem de pacientes con ELA. (Rothstein y cols., 1995). Esto conduce a una disminución en la recaptación de glutamato por

parte de los astrocitos con la consecuente excitotoxicidad que conduce a muerte neuronal lo cual podría contribuir al desarrollo de la enfermedad. Hallazgos recientes sugieren que el péptido β-amiloide (Aβ) disminuye la captación de glutamato en astrocitos en cultivo, lo que aumenta el estrés oxidativo y la activación de las cascadas de quinasas activadas por mitógenos (Matos y cols., 2008; Agostinho y cols., 2010) indicando que el mecanismo neurotóxico de los astrocitos podría ocurrir en otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. Estudios previos indican que los astrocitos reactivos están estrechamente asociados con placas de Aβ en la capa molecular de la corteza cerebral (DeWitt y cols., 1998), lo que sugiere una correlación entre estas proteínas y las alteraciones posteriores de los astrocitos. Además, altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias tales como interleuquina 1β, interleuquina 6 y el factor de necrosis tumoral-α (en inglés, *tumor necrosis factor-α*, TNF-α), producidos principalmente por astrocitos reactivos, son detectados en los cerebros de pacientes con Alzheimer (Veerhuis, 2011).

La mitocondria fuente y blanco de estrés oxidativo

Localizada en el citoplasma celular, y con un tamaño medio de 1 por 10 µm, la mitocondria constituye un organelo esencial en la vida y muerte de la célula, hecho sustentado en el gran número de funciones que alberga. Estas abarcan desde la generación de energía a través de la fosforilación oxidativa, hasta funciones que incluyen buena parte del metabolismo intermediario, la regulación de cascadas de señalización intracelular, la integración de señales extracelulares, la homeostasis de hierro y el calcio, y la regulación de la apoptosis (Ernster y Schatz, 1981; de Moura y cols., 2010).

La estructura mitocondrial consta de una doble membrana lipídica que divide al organelo en dos sectores bien definidos, el espacio intermembrana y un espacio interno denominado matriz mitocondrial, cada uno de los cuales presenta proteínas altamente especializadas. La membrana externa contiene canales iónicos dependientes del voltaje que hacen a la mitocondria permeable a metabolitos y pequeños péptidos (≤ 3 kDa). Por su parte, la membrana

interna, la cual se pliega formando largas invaginaciones denominadas crestas, constituye una barrera prácticamente impermeable que previene el pasaje de toda molécula a excepción del oxígeno, el anhídrido carbónico y el agua (Ernster y Schatz, 1981). La membrana interna aloja el sistema proteico responsable de la fosforilación oxidativa. La cadena de transporte de electrones, también llamada cadena respiratoria, está formada por cinco complejos multiproteicos localizados en las membranas de las crestas mitocondriales que atraviesan la doble capa lipídica y sobresalen hacia la matriz y el espacio intermembrana. El complejo I (NADH ubiquinona oxidoreductasa o también llamado NADH deshidrogenasa) es el de mayor tamaño y se compone de 42 polipéptidos. Su función es catalizar la transferencia de electrones desde el NADH a la ubiquinona (UQ) o coenzima Q (CoQ). El complejo II (succinato UQ oxidoreductasa) se compone de 4 péptidos y cataliza la oxidación de succinato a fumarato (en el ciclo de Krebs), transfiriendo los electrones a la ubiquinona. El complejo III (UQ citocromo c reductasa), de aproximadamente 10 subunidades recibe el poder reductor de UQ y lo traspasa al citocromo c. Éste, localizado en el espacio intermembrana, participa en la transferencia de electrones entre los complejos III y IV. El complejo IV (citocromo c oxidasa o también conocido como COX), compuesto de 13 subunidades, transfiere 4 electrones desde el citocromo c al oxígeno molecular, dando lugar a la formación de una molécula de agua. El transporte de electrones a lo largo de la cadena respiratoria libera energía favorable que es usado por los complejos I, III y IV para bombear protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana, lo cual genera un gradiente de protones y un gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna. Dicho gradiente es conocido como el potencial de membrana mitocondrial y se emplea para llevar a cabo la fosforilación de ADP a ATP por la F_0F_1-ATP sintasa, también llamada complejo V (Ernster y Schatz, 1981; Rich y Marechal, 2010).

Las mitocondrias no solo constituyen la central energética celular, sino que también controlan la señalización celular para la apoptosis. Muchas proteínas que se encuentran en la mitocondria inician o regulan la muerte celular. Por ejemplo el daño o disfunción de la mitocondria puede resultar en un cambio de

la permeabilidad de la membrana mitocondrial y producir la liberación de proteínas pro-apoptóticas como el citocromo c. El citocromo c en el citosol celular se une Apaf 1 activando el apoptosoma iniciando la muerte celular a partir de la activación de las caspasas (Burhans y Heintz, 2009).

El flujo de electrones en la cadena respiratoria se asocia a la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Las mitocondrias constituyen un sitio principal de producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, incluyendo el superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y peroxinitrito (ONOO), y por lo tanto una de las principales fuentes de estrés oxidativo en las células (Xu, 2004; Radi y cols., 2002).

El estrés oxidativo puede dañar al ADN o las proteínas mitocondriales lo cual altera la función bioenergética de las mitocondrias y favorece la agregación de proteínas alteradas (Radi y cols., 2002). Las mitocondrias poseen defensas antioxidantes como las SODs (para el superóxido), la glutatión peroxidasa (para el peróxido de hidrógeno) y las peroxiredoxinas (Prx) 3 y 5 (para el peróxido de hidrógeno y el peroxinitrito). Estos sistemas antioxidantes endógenos pueden verse comprometidos en condiciones patológicas lo que produce un aumento de los procesos oxidativos en proteínas y lípidos llevando a una disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y señalización para la apoptosis. Estas alteraciones están implicadas en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas. En efecto, la sobrexpresión de las enzimas antioxidantes mitocondriales en modelos de enfermedades conduce a una neuroprotección, mientras que el silenciamiento aumenta la susceptibilidad a la muerte neuronal (De Simoni y cols., 2008).

Alteraciones mitocondriales en las enfermedades neurodegenerativas

Los mecanismos patogénicos postulados para las enfermedades neurodegenerativas involucran a las mitocondrias (Schon y Manfredi, 2003; Schon y Przedborski, 2011; Karbowski y Neutzner, 2012). En los casos de ELA se han detectado anormalidades morfológicas, ultraestructurales y funcionales de las mitocondrias (Dupuis y cols., 2004; Manfredi y Xu, 2005). Hallazgos

similares han sido reportados en modelos de otras enfermedades neurodegenerativas, concretamente la disfunción mitocondrial está involucrada en el inicio y la progresión de la enfermedad de Alzheimer (Mao y Reddy, 2011) y de la enfermedad de Parkinson (Zhu y Chu, 2010). Todas estas patologías comparten la presencia de agregados proteicos en las diferentes regiones del SN y en particular en las mitocondrias (Patten y cosl., 2010). En el caso de la ELA los agregados incluyen formas mutadas de la enzima SOD1 y se han encontrado en las mitocondrias (Jaarsma y cols., 2001; Higgins y cols., 2002; Liu y cols., 2004), tanto en el espacio intermembrana como adheridas al lado citosólico o incluso en la matriz mitocondrial (Vijayvergiya y cols., 2005). Además se ha sugerido que la SOD1 mutada puede alterar la asociación del citocromo c con la membrana interna facilitando la apoptosis (Vijayvergiya y cols., 2005) o que puede agregarse luego de ser dañada por ROS o especies reactivas del nitrógeno (RNS) (Deng y cols., 2006). Recientemente la expresión de la enzima mutada exclusivamente en la mitocondria demostró ser suficiente para la disfunción mitocondrial (Magrané y cols., 2009). En paralelo otros estudios muestran que la interacción entre el Aβ y la mitocondria induce menor capacidad de síntesis de ATP y estrés oxidativo (Tillement y cols., 2011) demostrando que existen mecanismos patogénicos comunes en las enfermedades neurodegenerativas que involucran la actividad mitocondrial.

Disfunción mitocondrial en los astrocitos

La función mitocondrial astrocitaria influye en la interacción neurona glía. En particular en astrocitos espinales la inhibición de la actividad mitocondrial con distintos inhibidores de la cadena de transporte de electrones determina una disminución de su capacidad trófica para motoneuronas en co-cultivos, lo cual sugiere que la función mitocondrial adecuada es necesaria para mantener la supervivencia de las motoneuronas (Cassina y cols., 2008). Asimismo la inhibición mitocondrial en los astrocitos ahora de la corteza cerebral con fluorocitrato, un inhibidor de la aconitasa, aumenta la vulnerabilidad de la neuronas corticales a la toxicidad mediada por glutamato (Voloboueva y cols., 2007) indicando que la actividad mitocondrial modula algunas de las interacciones astrocito-neurona. Además, la inhibición metabólica con antimicina A en astrocitos corticales en cultivo, induce la apertura de los

hemicanales formados por conexina 43, provocando una reducción en la comunicación mediada por uniones en hendidura (Contreras y cols., 2002). En los astrocitos portadores de la SOD1G93A, que son neurotóxicos, el consumo de oxígeno mitocondrial y el coeficiente de respiración (RCR) se encuentra disminuido en su fracción mitocondrial. Esto coincide con la detección de daño oxidativo y nitración de proteínas mitocondriales. El tratamiento con antioxidantes dirigidos a la mitocondria (MitoQ) disminuye la nitración mitocondrial mejorando el RCR y revirtiendo la neurotoxicidad (Cassina y cols., 2008). Estos resultados sugieren una asociación entre la disfunción mitocondrial y el establecimiento de un fenotipo neurotóxico.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La alteración de la función mitocondrial en los astrocitos determina un cambio fenotípico hacia uno tóxico para las neuronas.

Este mecanismo podría contribuir a la progresión lesional de las enfermedades neurodegenerativas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar si la inhibición mitocondrial en los astrocitos de corteza cerebral altera su fenotipo y la capacidad trófica hacia las neuronas de hipocampo.

Objetivos específicos:

1.- Evaluar la eficiencia de los inhibidores mitocondriales mediante la medida del potencial mitocondrial por JC1.

2.- Describir cambios morfológicos en los astrocitos tratados con inhibidores mitocondriales mediante inmunocitoquímica anti-GFAP.

3.- Determinar si el tratamiento con los inhibidores mitocondriales modifica la proliferación astrocitaria mediante incorporación de bromo deoxiuridina (BrdU).

4.- Evaluar si los astrocitos tratados con los inhibidores mitocondriales resultan tóxicos para las neuronas de hipocampo, realizando co-cultivos astrocito-neurona.

5.- Determinar la expresión del transportador de glutamato GLT-1 en los astrocitos tratados con los inhibidores mitocondriales, como posible mecanismo neurotóxico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Para la realización de los cultivos primarios de astrocitos se emplearon neonatos de ratas de 1 o 2 días de vida y para las neuronas del hipocampo embriones en estadio 18 (E18) de la cepa Wistar, criadas en la Unidad de Reactivos Biológicos de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina. Las madres permanecieron en cajas separadas con agua y alimento disponibles, en régimen de temperatura y luz controlada. Se siguieron las normas de la CHEA en el manejo de los animales y en el desarrollo experimental.

Cultivo primarios de astrocitos

Se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, conservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. El cultivo primario de células se establece a partir de un tejido u órgano y en general comprende los siguientes pasos: 1) disección del tejido que contiene las células de interés; 2) disociación del tejido sin dañar las células; 3) cultivo de las células disociadas en el sustrato y medio adecuados (Freshney, 2000). El protocolo que fue empleado se ha descrito por Saneto y De Vellis (1987) con algunas modificaciones (Cassina y cols., 2002) y consiste en una disgregación mecánica y química del tejido, proliferación y enriquecimiento de astrocitos descartando otros tipos de células gliales y su posterior plaqueo.

Protocolo: Neonatos de ratas de 1 o 2 días de nacidos fueron sacrificados por decapitación, se les extrajo el cerebro y se disecaron las cortezas cerebrales bajo lupa. Luego de retirar todas las meninges, el tejido se cortó con bisturí y se colectó en un tubo falcon de 15 ml conteniendo DMEM. Se extrajo el medio y se incubó durante 25 min a 37ºC en presencia de tripsina 0.25% en PBS. El tratamiento con tripsina cliva las proteínas de la matriz extracelular y la superficie celular, incluyendo receptores de membrana y canales iónicos, aunque no afecta significativamente la viabilidad celular. Se retiró todo el PBS posible y se agregó 1ml de DMEM + 10% FBS (el suero y los iones divalentes del medio de cultivo inhiben la tripsina) y 50 µl de ADNasa I 1mg/ml. La ADNasa en una endonucleasa que permite la ruptura del ADN libre procedente de las células lisadas, disminuyendo la formación de agregados celulares durante el proceso de disgregación. A continuación, se resuspendió el pellet por pipeteo repetido y se pasó el sobrenadante por una malla de 80 µm, colectándose en un tubo falcon de 50 ml. Se centrifugó durante 8 min a 1100 rpm. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de DMEM + 10% FBS. Se contaron las células con cámara de Neubauer y se plaquearon a una densidad de 6×10^6 células por botella de 75 cm^2 en DMEM + 10% FBS. El cultivo celular fue mantenido en estufa a 37ºC, en una atmósfera saturada en agua, 95% aire, 5% CO_2. Para permitir una correcta adhesión de las células, las botellas no se movilizaron por 48 hs. El medio de cultivo para los astrocitos fue recambiado totalmente cada 48 hs. Luego de haber llegado a la confluencia, el cultivo fue enriquecido en astrocitos mediante agitación significativa durante 48 hs en agitador orbital, por desprendimiento de la microglía y la oligodendroglía. Luego, se lavaron las botellas dos veces con PBS y se agregó DMEM + 10% FBS más 5µl de arabinósido de citosina (ara-C, 10 µM) por 48 hs para deshacerse de aquellas células con capacidad proliferante que no hayan sido eliminadas por agitación. Cabe destacar que ara-C, inhibidor de la síntesis de ADN, es tóxico para las células proliferantes, de forma tal que no afecta a los astrocitos en monocapa, quienes no proliferan por la propia inhibición que les imprime el contacto célula-célula. Pasadas las 48 hs de incubación, las botellas se lavaron dos veces con PBS y se agregó DMEM + 10% FBS, y se dejaron en la estufa de cultivo por 48 hs antes de

sembrar para los experimentos. El cultivo enriquecido posee más de 95% de astrocitos.

Soluciones:

- Buffer Fosfato Salino (PBS) (5L, pH=7.4): 40g NaCl, 10g KCl, 4.58g Na_2HPO_4, 1g KH_2PO_4 en agua destilada.
- DMEM (Medio Esencial Dulbecco Modificado) (1L, pH=7.4): 13.37g DMEM, 1.2g $NaHCO_3$, 3.7545g HEPES, Penicilina 100U/ml, Estreptomicina 100 µg/ml en agua de cultivo.
- Medio para los astrocitos en cultivo: DMEM + 10% suero fetal bovino (FBS)
- Tripsina
- ADNasa I 1mg/ml

Los medios de cultivo, suero, tripsina, penicilina y estreptomicina son de Gibco, la ADNasa I es de Sigma.

Materiales:

- Plásticos: placas de Petri 35mm y 60mm, botellas de 25cm^2 y 75cm^2, tubo falcon 15mL y 50mL, pipetas 5mL, 10mL y 25mL,
- Pipetas Gilson p1000, p200, p20.
- Material de disección: tijeras, pinzas, bisturí, malla de disgregación de 80 micras.
- Lupa estereoscópica.
- Agitador orbital
- Centrifuga Centra CI2, Thermo Scientific.
- Cámara de Neubauer.

<u>Tratamientos de astrocitos con inhibidores mitocondriales</u>

La monocapa confluente de astrocitos fue incubada con rotenona (1µM), fluorocitrato (100 µM), antimicina A (5 µM) o azida de sodio (5 µM) durante 24 hs antes de evaluar el potencial mitocondrial, la morfología celular de los astrocitos, la proliferación astrocitaria, el nivel de expresión de GLT-1 o el co-cultivo con neuronas hipocampales. Los rangos de concentraciones elegidos de los diferentes inhibidores fueron reportados en Cassina y cols. (2008), y

resultan de un estudio dosis respuesta donde se seleccionaron las dosis que no afectaron la supervivencia celular.

- *Rotenona:* Compuesto natural derivado de raíces de leguminosas. Inhibidor de complejo I de la cadena transportadora de electrones (NADH deshidrogenasa), no permite la reoxidación de NADH (Radad y cols., 2006).
- *Fluorocitrato:* Bloquea la actividad de la enzima acotinasa del ciclo de Krebs, actuando como un sustrato "suicida" (Voloboueva y cols., 2007).
- *Antimicina A:* Sintetizado por bacterias del genero *Streptomyces*. Inhibidor del complejo III de la cadena transportadora de electrones (Citocromo bc_1), no permite la reoxidación del NADH y $FADH_2$ (Im y cols., 2012).
- *Azida de sodio:* Inhibidor del complejo IV de la cadena transportadora de electrones (Citocromo c oxidasa), evita el pasaje de electrones entre citocromo c y el oxígeno (Selvatici y cols., 2009). En la figura 1 se resumen los sitios de acción de los fármacos utilizados

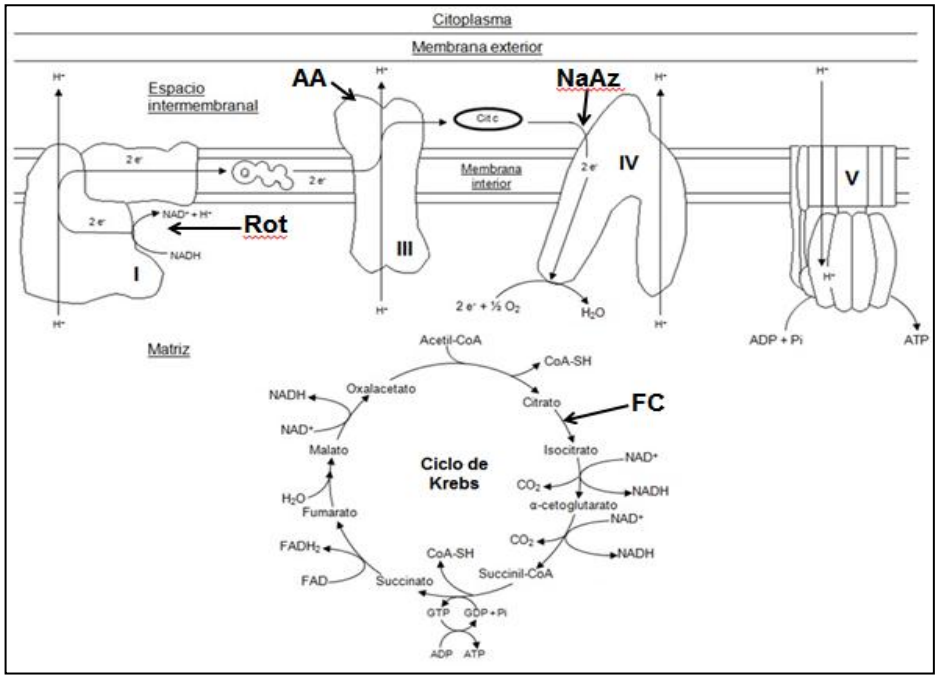

Fig 1. Sitios de acción de los inhibidores mitocondriales

Rot: Rotenona; FC: Fluorocitrato; AA: Antimicina A; NaAz: Azida de sodio.

Co-cultivos de neuronas hipocampales-astrocitos

Sobre una monocapa confluente de astrocitos, controles o tratados con los inhibidores mitocondriales, se sembró una suspensión de neuronas obtenidas de hipocampos aisladas a partir de embriones de ratas Wistar de 18 días de gestación. Los hipocampos fueron disecados en una placa de Petri de 35 mm de diámetro con PBS sobre hielo y disociados mecánicamente con pipeta Pasteur de vidrio en medio Neurobasal, 2% B27, 2mM glutamina, hasta obtener una suspensión de 400.000 células/ml (las neuronas fueron contadas en cámara de Neubauer). Antes de agregar la neuronas, la monocapa de astrocitos fue lavada con DMEM 2 veces para retirar los inhibidores mitocondriales. Luego sobre las monocapas confluentes de astrocitos cultivados en placas de 24 pozos, se sembró una suspensión de neuronas en DMEM, 5% FBS, 25% suero de caballo.

Análisis del potencial de membrana mitocondrial (ΔΨm) mediante ensayo de yoduro de 5,5´, 6,6´-tetracloro-1,1-3,1´-tetraetilbenzimidazolil-carbocianina (JC-1)

JC-1 es una sonda fluorescente que permite estimar el potencial de membrana mitocondrial, excitándose con una única longitud de onda (480 nm) y emitiendo fluorescencia a dos longitudes de onda diferentes (590 nm y 520 nm). El cual atraviesa la membrana interna mitocondrial hacia la matriz en función del potencial de membrana (Fig. 2). En condiciones normales, el colorante se acumula en la matriz mitocondrial formando agregados que emiten a 590 nm (rojo). En cambio, si el potencial de membrana disminuye, el colorante fluorescente permanece disperso en el citoplasma, emitiendo fluorescencia a 520 nm (verde). La relación ratiométrica, emisión de fluorescencia 590nm/520nm (rojo/verde), indica el grado de polarización de las mitocondrias en un cultivo celular (White y Reynolds, 1996).

.

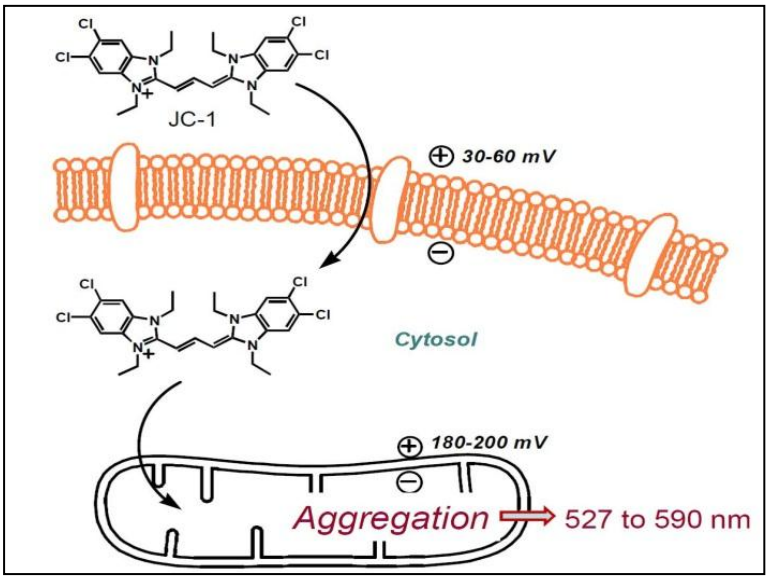

Fig.2: Distribución intracelular de JC-1. El colorante es absorbido por las células y, específicamente, acumulado dentro de la mitocondria debido a su naturaleza catiónica y lipófilica en proporción la magnitud de $\Delta\Psi m$.

Para realizar esta técnica, las células se lavaron con solución de Hank`s tibio dos veces y se incubaron en solución de Hank´s con 3 µM JC-1 durante 20 min (37ºC, 5 % CO_2). Las células se lavaron con solución de Hank´s dos veces y se fotografiaron en un microscopio de epifluorescencia Olympus IX81. La intensidad de fluorescencia fue determinada semicuantitativamente usando el programa Adobe Photoshop®.

Soluciones:

-Solución de Hank´s: 8 g/L NaCl, 0.4 g/L KCl, 0.0477 g/L Na_2HPO_4, 0.06 g/L KH_2PO_4, 0.14 g/L $CaCl_2$, 0.35 g/L $NaHCO_3$, 1g/L glucosa en agua destilada.

-JC-1 stock 3mM en DMSO.

Inmunofluorescencia

La morfología celular se estudió mediante inmunocitoquímica empleando el marcador astrocitario GFAP. La técnica de inmunocitoquímica se basa en la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo y es una técnica ampliamente

utilizada para localizar moléculas de interés, principalmente proteínas. Existen dos métodos distintos de inmunocitoquímica, conocidos como métodos directo e indirecto. El primer método consiste en la utilización de un anticuerpo primario que lleva asociado la marca que permitirá localizar el antígeno en la muestra de estudio. Esta técnica es ventajosa por su sencillez y rápida realización. En el método indirecto, se utiliza un anticuerpo primario que reconoce el antígeno, y un anticuerpo secundario marcado que reconoce la región constante de la cadena pesada del anticuerpo primario. Este método, aunque más laborioso, permite amplificar la señal, siendo especialmente útil a la hora de valorar señales débiles presentes en el tejido. En ambos métodos los anticuerpos son marcados con distintas moléculas, tales como fluorocromos, enzimas, elementos radiactivos u oro coloidal, según se quieran detectar antígenos en microscopia de luz visible, fluorescente, o microscopía electrónica de transmisión.

GFAP es una proteína de los filamentos intermedios de tipo III que marca selectivamente astrocitos maduros del SNC. Su expresión no es esencial para la apariencia y función normal de la mayoría de astrocitos en condiciones normales, sin embargo, su relevancia aumenta significativamente en procesos patológicos dentro del SNC, como la astrogliosis reactiva y la formación de la cicatriz glial (Wang y Bordey, 2008; Sofroniew y Vinters, 2010).

Protocolo: astrocitos cultivados en Lab-Tek se fijaron con paraformaldehído 4% en PBS a 4°C, se permeabilizaron para preservar la integridad estructural de las mismas con Tritón X-100 0.2% en PBS, se bloquearon las uniones inespecíficas con suero de cabra 10%, BSA 2%, Tritón X-100 0.2% en PBS y se incubaron con el anticuerpo primario anti-GFAP monoclonal de ratón conjugado a Cy-3 (1:800, Sigma) toda la noche. Se lavaron 3 x 10 min en PBS y se agregó DAPI (1:5000, a partir del stock 1 mg/ml). Se lavaron nuevamente 3 x 10 min y se montaron en glicerol. Las imágenes fueron obtenidas usando un microscopio de epifluorescencia Olympus IX81.

Co-cultivos: Luego de 2 días in vitro (DIV), los co-cultivos se fijaron con paraformaldehído 4% frío y se realizó inmunocitoquímica anti-βIII tubulina para

contar el número de neuronas supervivientes con morfología característica mediante microscopía de luz.

Brevemente se describen los pasos realizados en la inmunocitoquímica: luego de fijadas las células se lavaron con PBS (2 x 2 min), se bloquearon con 0.1% Tritón X-100, 10%FBS en PBS por 30 min y se incubaron con el anticuerpo primario anti-βIII tubulina monoclonal de ratón (1:4000, Promega) por 12 horas a 4ºC. Se lavaron nuevamente las células con 0.1% Tritón X-100 en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a biotina (1:500, Jackson), 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó con 0.1% Tritón X-100 en PBS, se incubó con streptavidina-peroxidasa (1:250, Jackson) 1 h a temperatura ambiente y se reveló con diaminobenzidina (DAB).

Estudio de la proliferación celular

Se estimó la tasa de proliferación de los astrocitos contando el número de células que incorporaron bromo deoxiuridina (BrdU) respecto del número total de células marcadas con DAPI (% BrdU+/DAPI+). BrdU es un análogo a la timidina que se incorpora al ADN de las células que se encuentren en fase S del ciclo celular (Knapp, 1992).

La monocapa confluente de astrocitos fue incubada con BrdU 10 µg/ml y con los diferentes inhibidores mitocondriales en DMEM 10% FBS por 24hs. Las células fueron fijadas con paraformaldehído 4%, luego se desnaturalizó el ADN de las células incubando las mismas con HCl 1N durante 40 min a 37ºC y después 20 min a temperatura ambiente. Se lavaron las células con PBS, se bloquearon durante 30 min con suero de cabra 10%, BSA %, Tritón X-100 0.2% en PBS y se incubaron con anticuerpo anti-BrdU monoclonal de ratón (1:300, Dako) a 4ºC, toda la noche en cámara húmeda. Se lavaron nuevamente las células con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado en cabra a Alexa Fluor 488 (1:1000, Invitrogen), 1h en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó 3x5 min en PBS y se adicionó 1:5000 de DAPI 1mg/ml. Las imágenes fueron obtenidas usando un microscopio de epifluorescencia Olympus IX81 y se cuantificó el número de núcleos usando el programa Image J® (NIH).

Inmunoblot

Los niveles de expresión de GLT-1 se evaluaron mediante la técnica de Western Blot (WB). El Western Blot es una técnica que permite la detección de una única proteína dentro de una mezcla compleja, hecho que posibilita abordajes de tipo cualitativo y semi-cuantitativo (Shewry y Fido, 1998).
Consta de cinco pasos básicos: 1) separación de la muestra de proteínas por electroforesis en gel desnaturalizante (SDS-PAGE); 2) transferencia de las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa o PVDF (polivinildenedifluoride); 3) bloqueo de los sitios de unión inespecíficos en la membrana; 4) incubación de la membrana con los anticuerpos específicos para la proteína de interés; 5) detección y revelado.

1) Extracción de proteínas totales

Las placas de Petri de 35mm de diámetro conteniendo astrocitos en todas las condiciones experimentales se enjuagaron una vez con PBS frío y luego se rastrillaron con 100 µl de buffer de lisis para obtener una suspensión celular. Se trabaja sobre hielo para evitar la degradación de las proteínas debido a la acción de las proteasas. Posteriormente, las muestras fueron sometidas 5min a 95ºC.

Soluciones:
-Buffer de lisis: 50mM NaCl, 50 mM HEPES, mezcla de inhibidores de proteasas Cømplete (Roche), 1% Tritón X-100.

Materiales:
-Cell scraper Greiner bio-one.

2) Cuantificación de proteínas totales

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas. Muchos de estos métodos se basan en: a) la propiedad intrínseca de las proteínas para

absorber luz en el ultravioleta; b) para la formación de derivados químicos; c) la capacidad que tienen las proteínas de unir colorantes.

Por su alta sensibilidad, la cuantificación de proteínas en el presente trabajo se realizó utilizando el método de ácido bicinconínico (BCA, por sus siglas en inglés), utilizando una curva de estándar de seroalbúmina bovina (BSA).
El principio de esta técnica es la formación de un complejo Cu^{2+}-proteína en condiciones alcalinas, seguido de la reducción del átomo de Cu^{2+} a Cu^{+}. La cantidad de cobre reducido es proporcional a la cantidad de proteína presente. Los aminoácidos cisteína, cistina, triptófano y tirosina, así como el propio enlace peptídico son capaces de reducir el Cu^{2+} a Cu^{+}. El BCA forma un complejo azul-violeta con el Cu^{+} que permite monitorear la reducción de Cu^{2+} por las proteínas midiendo a una longitud de onda de 562nm.

Procedimiento: En una placa de 96 pocillos se siembran 5-10 µL de la muestra problema, los estándares de BSA de concentración conocida y un blanco (el buffer en que se encuentra la proteína problema); cada uno por duplicado. Se agrega a cada pocillo sembrado 200 µL de una mezcla 50:1 de BCA y $CuSO_4$. Se incuba la placa por 30 minutos a 37ºC para propiciar el desarrollo de color, tras lo cual, y luego de una leve agitación, se efectúa la medición de absorbancia en un lector de placas a 562 nm. Posteriormente, se grafican los datos de la absorbancia en función de las concentraciones estándar de BSA, se ajustan los puntos a una recta y se determina el coeficiente de regresión, estimándose una aceptabilidad mínima en un $R^2 \geq 0.98$. En función de dicha curva, se calculan las concentraciones de proteína de las muestras problema.

Soluciones:
-Solución BCA- Sigma (15H5062).
-Sulfato cúprico 4%- Pierce (23224).

Materiales:
-Microplaca de 96 pocillos Greiner bio-one.

3) Desnaturalización de proteínas

La desnaturalización de proteínas para Western Blot implica el tratamiento de la muestra con dodecil sulfato sódico (en inglés, sodium dodecyl sulphate, SDS), un detergente aniónico que induce la pérdida total de la estructura nativa de la proteína y permite al polipéptido la adquisición de carga negativa en forma directamente proporcional a su tamaño. Las micelas de SDS comienzan por unirse a los sitios hidrofóbicos de la proteína. La repulsión de cargas entre micelas provoca una fuerza de repulsión carga-carga que induce una expansión de la estructura conformacional de la proteína (Bhuyan, 2010). La desnaturalización completa de una muestra de proteínas requiere además el tratamiento con agentes reductores como β-mercaptoetanol o ditiotreitol (DTT) necesarios para reducir puentes di-sulfuros. Sumado a ello, es frecuente la incubación de la muestra a temperaturas cercanas a los 100ºC para facilitar la desnaturalización y la acción del SDS.

Para desnaturalizar de las proteínas, luego de determinar la concentración de proteínas, se adiciona buffer de carga 5x de forma que la concentración final en la muestra de proteínas sea 1x y se las somete a una incubación a 95ºC durante 5 minutos.

Soluciones:
-Buffer de carga (5x): 3g SDS, 1.0M Tris, 5ml glicerol, 2µg azul bromofenol, 104µl/ml β-mercaptoetanol.

4) *Separación de proteínas por electroforesis SDS-PAGE (en geles de poliacrilamida con SDS)*

El primer paso de todo Western Blot consiste en la separación de la muestra de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. La electroforesis desnaturalizante separa las proteínas en base a su peso molecular a medida que migran a través de un gel sometido a un campo eléctrico. Para que la separación por peso molecular tenga lugar, las proteínas deben sufrir la pérdida de su estructura cuaternaria, terciaria y secundaria, evitando así la influencia de la conformación tridimensional durante

la migración. Los complejos SDS-proteína adoptarán una forma única desplegada y un valor carga/masa constante y por lo tanto se separarán de acuerdo a su tamaño cuando migran desde el cátodo al ánodo a una velocidad relacionada por su peso molecular.

a. Preparación de los geles: Se utilizó un sistema de electroforesis discontinua que emplea dos geles, un gel separador (donde procede la separación de proteínas, "*resolving gel*") y un gel concentrador (permite que la entrada de las proteínas al gel de separador sea ordenada y compacta, "*stacking gel*"). El gel concentrador presenta un bajo porcentaje de acrilamida, por lo tanto, mayor tamaño de poro y un pH ligeramente ácido. El gel separador que ocupa mayor la mayor parte de la placa, presenta un tamaño de poro adecuado para la separación de las proteínas en función de su peso molecular y un pH básico. Teniendo en cuenta el peso molecular de la proteína que se analizó, GLT-1-65KDa, se preparó un gel separador 10% de acrilamida.

Brevemente, se describen los pasos para la preparación de los geles. Se añaden todos los componentes de gel separador en un tubo falcon y se mezclan bien. Se preparan unos 10 ml por gel para un molde de 1.5 mm de espesor. Se vierte la preparación en el molde con un pipeta, por uno de los extremos hasta aproximadamente 1 cm de la superficie superior. Esperar aproximadamente 45 min para la polimerización completa de gel separador, evitando su desecación cubriéndolo con SDS 0.1%. A continuación, se retira el SDS, se añaden y mezclan los componentes del gel concentrador y se colocan en el molde con cuidado por unos de los extremos. Finalmente se colocan los peines y se espera aproximadamente 30 min hasta que gelifique.

Soluciones:
-Gel separador 10% (1 gel): 4.07 ml H_2O MiliQ, 3.33 ml mezcla Acrilamida 30% (acrilamida-bisacrilamida, 30:1), 2.5 ml Tris 1.5M (pH= 8.8), 100 µl SDS 10%, 100 µl APS (persulfato de amonio) 10%, 10 µl TEMED (N, N, N, N´-tetrametilnediamina).
-Gel concentrador 4% (1 gel): 2.75 ml H_2O MiliQ, 650 µl mezcla Acrilamida 30%, 500 µl Tris 1.0M (pH= 6.8), 40 µl SDS 10%, 40 µl APS 10%, x µl TEMED.

Materiales:
-Cuba para geles BioRad.

b. Corrida electroforética: Los geles se colocan en el soporte adentro de la cuba de electroforesis y se añade buffer de corrida 1x. Se siembra en los pocillos del gel el volumen correspondiente a 40 µg de proteína de cada muestra y 5 µl del marcador de peso molecular preteñido. El marcador de peso molecular nos permite monitorear la corrida electroforética, verificar la eficiencia de transferencia y estimar el tamaño de las proteínas de interés. La corrida se realizó a 120 V, el tiempo necesario para que el frente de corrida abandone el gel.

Soluciones:
-Buffer de corrida (5x, 1L, pH= 8.3): 1 L agua destilada, 15.1g Tris base, 94g glicina, 5g SDS.
-Buffer de corrida 1x: dilución a partir de una solución 5x, en agua destilada.
-Marcador de peso molecular preteñido Fermentas (SM0671).

Materiales:
-Pipetas Gilson p1000, p200, p20.
-Mini-PROTEAN Tetra Cell BioRad.

5) Electrotransferencia (blotting) a la membrana de PVDF

Tras la separación electroforética por peso molecular, las proteínas deben ser transferidas desde el gel de electroforesis a la membrana. La ventaja de la electrotransferencia es su corta duración (de 30 minutos a pocas horas), lo que reduce el efecto de difusión de las bandas. Este método se basa en la movilidad electroforética de las proteínas cargadas negativamente e implica un íntimo contacto entre el gel y la membrana. Bajo un campo eléctrico, las proteínas migran fuera del gel hacia la superficie de la membrana donde quedan fuertemente adheridos de forma tal que la membrana resultante es una copia exacta del patrón de proteínas en el gel.

El procedimiento se inicia apilando sucesivamente sobre una esponja plana papel de filtro empapado en buffer de transferencia, el gel, la membrana en contacto directo con el gel, más papel de filtro y finalmente una esponja plana. Este "sándwich" se coloca entre dos capas de plástico perforado y se introduce en una cuba en el que se encuentra una solución salina (buffer de transferencia) y dos electrodos planos (diseñados para conseguir un campo uniforme en toda la superficie de gel). Se dispone de forma que el gel quede hacia al ánodo y la membrana hacia el cátodo. Dado que la carga neta de las proteínas en el caso de los geles de SDS-PAGE es negativa, debida al carga del SDS, las proteínas viajarán hacia el cátodo y se unirán por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas a la membrana. El proceso provoca un fuerte aumento de la temperatura de la solución por lo que se recomienda refrigerar el sistema y recircular el buffer. Tras la transferencia es aconsejable teñir la membrana en forma reversible para comprobar la eficacia de procedimiento. El rojo Ponceau es un reactivo comúnmente utilizado para la tinción de proteínas en una membrana, aunque su sensibilidad no es demasiado alta (Kurien y Scofield, 2003, 2006, 2009).

En el protocolo realizado, se utilizaron membranas de PVDF que tienen gran capacidad de unión a proteínas y una buena resistencia mecánica. Este tipo de membrana son altamente hidrofóbicas y es necesario un tratamiento previo con metanol, antes de sumergirlas en soluciones acuosas. Brevemente, se describen los pasos realizados: Se cortó la membrana PVDF del tamaño del gel (5 cm x 8 cm), se sumergió 2 min en etanol 100% y se lavó con buffer de transferencia. Se armó el "sándwich" sumergido en el buffer de transferencia en el siguiente orden: Esponja (polo positivo) → 3 papeles de filtro → membrana de PVDF → gel → 3 papeles de filtro → Esponja (polo negativo). Se quitaron las burbujas de aire, especialmente las que se formaron entre la membrana y el gel. Se colocó el "sándwich" en el dispositivo de electrotransferencia vertical con buffer de transferencia y se tomaron las precauciones de refrigeración mencionadas en el punto anterior. La transferencia se realizó a 300 mA y voltaje libre; el tiempo aproximado fue de 1 hora 10 min. Para controlar la eficacia de transferencia, la membrana se incubó 4 min en Rojo Ponceau 1x.

Este colorante se une de forma inespecífica a la totalidad de proteínas presentes y puede eliminarse lavando la membrana con TBS-Tween 0.1%.

Soluciones:
-Buffer de transferencia (2L, pH= 8.3): 6.06g Tris base, 28.53g glicina, 421ml etanol 95%, en agua destilada.
-Rojo Ponceau 1x: 0.2% Rojo Ponceau, 3% ácido tricloroacético, 3% ácido sulfosalicilico.
-TBS (10x, 1L, pH= 7.6): 24.23g Tris base, 80.06g NaCl, en agua destilada.
-TBS-Tween: 100ml TBS 10x, 900ml agua destilada, 1ml Tween 20.

Materiales:
-Equipo de transferencia BioRad.
-Membrana de transferencia PDVF (88518) Thermo Scientific.

6) Bloqueo e incubación con anticuerpos

Realizada la transferencia, se procede a bloquear los sitios de la membrana que han quedado libres de la unión a proteínas. Ello impide que en pasos futuros, otras proteínas, como por ejemplo los anticuerpos empleados para la detección del antígeno de interés, se unan en forma inespecífica a la membrana. En la actualidad se utiliza una amplia variedad de soluciones de bloqueo, desde leche descremada y suero, hasta soluciones de proteínas altamente purificadas como la sero-albúmina bovina. Las soluciones de bloqueo permiten incrementar la sensibilidad del ensayo reduciendo la interferencia por ruido de fondo (*background*) (Kurien y Scofield, 2006). Para bloquear la membrana, se incubó 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave, con leche 5% en TBS-Tween 0.1%. Posteriormente se incubó toda la noche a 4ºC con anti-GLT-1 policlonal generado en conejo (1:1000, Cell Signaling) y agitación lenta.

Luego de la incubación con el anticuerpo especifico, se lavó 3 x 10 min con TBS-Tween 0.1% y se incubó con anti-IgG de conejo-HRP (1:4000, Thermo

Scientific) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se repitieron los lavados con TBS-Tween 0.1% (3 x 10 min) y se continuó con el revelado.

7) Revelado con quimioluminiscencia enzimática (ECL)

Existen tres grandes sistemas de revelado empleados en el Western Blot: enzimático, radioquímico y oro coloidal. En el sistema enzimático, la fosfatasa alcalina (AP) y la peroxidasa de rábano (HRP) son las enzimas más utilizadas. La fosfatasa alcalina es una enzima de 140 KDa que cataliza la hidrólisis de grupos fosfatos de la molécula del sustrato originando un producto coloreado, fluorescente o la liberación de luz. Por su parte, la peroxidasa de rábano es una proteína bastante más pequeña 40 KDa que cataliza la oxidación de los sustratos por el peróxido de hidrógeno, originando un producto coloreado, fluorescente o la liberación de luz. Su gran estabilidad, bajo costo y gran disponibilidad de sustratos hacen de esta una enzima de elección para la gran mayoría de las aplicaciones.

En este protocolo, se emplearon anticuerpos secundarios conjugados a la enzima HRP y un sistema de detección por quimioluminiscencia. El proceso de quimioluminiscencia se define como la emisión de energía en forma de luz a partir de una sustancia como consecuencia de una reacción química. El luminol es uno de los sustratos de mayor uso y su oxidación en presencia de peróxido de hidrógeno origina la formación de un producto en estado excitado llamado 3-aminoftalato, que al pasar a un estado de menor energía, emite fotones de luz. Esta reacción se produce sobre una membrana y al entrar en contacto con una película de autorradiografía, ésta queda impresionada. Los sustratos quimioluminiscentes han ganado en popularidad durante la última década ya que ofrecen numerosas ventajas sobre los métodos tradicionales de detección: a) con la quimioluminiscencia se pueden hacer múltiples exposiciones de la membrana hasta conseguir la mejor imagen; b) se puede lavar la membrana, eliminando por completo todos los reactivos para posteriormente volver a incubarlo a fin de visualizar otra proteína u optimizar la detección de la primera; c) posee un mayor rango lineal, lo que permite la detección cualitativa y cuantitativa en una mayor rango de concentraciones; d) los sustratos

quimioluminiscentes proporcionan la mayor sensibilidad de todos los métodos de detección existentes.

Brevemente, se describen los pasos realizados: Las membrana de PVDF se incubó con ambas soluciones de ECL durante 3 min y se envolvió en papel film. Se colocó dentro de un cassette de autorradiografía junto con la placa autorradiográfica (aproximadamente 10 min) y se reveló manualmente con revelador y fijador comerciales.

Luego la membrana fue "*strippiada"* para realizar el control de carga. *Stripping* (desprendimiento) es el término utilizado para describir la eliminación de anticuerpos primarios y secundarios de una membrana de transferencia. El *stripping* es útil cuando uno quiere investigar más de una proteína en la misma membrana, por ejemplo, una proteína de interés y el control de carga.
La membrana de PVDF se lavó con *stripping* buffer (2 x 10 min), luego se lavó con PBS (2 x 10 min) y por último 5 min con TBS-Tween 0.1%. Después se sumergió 1 min en etanol y se lavó con TBS-Tween 0.1% por 5 min. La membrana se incubó 1 hora con leche 5% en TBS-Tween 0.1% a temperatura ambiente para bloquearla. Posteriormente se incubó con anti- beta actina monoclonal (1:1000, Sigma) toda la noche a 4ºC. La beta actina es una proteína citoplasmática de expresión constitutiva y se empleó como control de carga de proteínas y como referencia para el análisis semicuantitativo de la expresión de GLT-1.
Luego se lavó con TBS-Tween 0.1% (3 x 10 min) y se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG ratón-HRP (1:4000, Thermo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, se repitieron los lavados con TBS-Tween 0.1% (3 x 10 min) y se realizó el revelado con ECL.

Soluciones:
-Pierce ECL WB (32209): Reactivo de detección 2 (solución de luminol) y Reactivo de detección 1 (solución de peróxido).
-Soluciones de revelado y fijación Química MediQ, SA.
-*Stripping* buffer de fuerza intermedia (pH= 2.2): 15g glicina, 1g SDS, 10 ml Tween 20.

Materiales:

-Placas autorradiográficas Kodak, Medical X-Ray Film, Genere Purpose Green-MXG Plus.

-Papel film.

-Cassette de autorradiografía.

Procesamiento y análisis de datos

Cada experimento se repitió por lo menos 3 veces. Las comparaciones entre las medias se hicieron por análisis de varianza seguido de análisis por el test de Student-Newman-Keuls. Las diferencias se declararon significativas si $p<0.05$. Si el test de normalidad falló las comparaciones entre las medidas se hicieron por análisis de varianza en rangos seguido del test de Kruskal-Wallis. Las estadísticas se hicieron utilizando el software SigmaStat (Jandel Scientific).

RESULTADOS

Modificación del potencial mitocondrial por los inhibidores específicos

El potencial de membrana mitocondrial es uno de los parámetros más sensibles al daño celular y su disipación altera la función mitocondrial. Los datos obtenidos empleando la sonda mitocondrial JC-1, muestran que el tratamiento con los diferentes inhibidores mitocondriales resultó en una disipación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi m$). El promedio de fluorescencia rojo/verde se redujo en un 43% como resultado del tratamiento con rotenona, un 48% con fluorocitrato, un 46% con antimicina A y un 31% azida de sodio en comparación con el control (Fig. 3B). Como se muestra en la figura 3A, la monocapa de astrocitos control mostró una mayor fluorescencia roja, lo que indica un estado polarizado, mientras que los astrocitos tratados con los inhibidores mitocondriales mostraron un aumento en la fluorescencia verde indicando la permanencia en el citosol de mayor proporción de la sonda debido a una reducción en el $\Delta\Psi m$. La foto permite apreciar que no hay

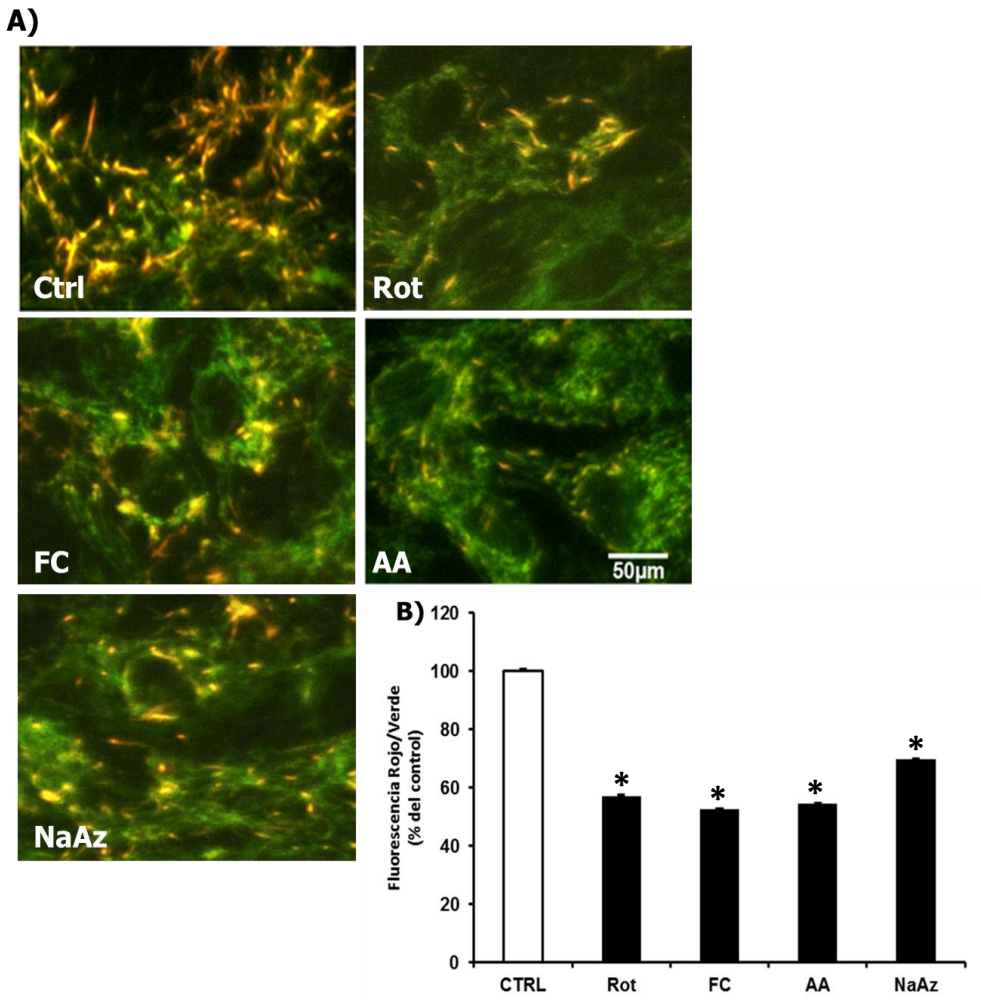

Fig. 3: Los inhibidores mitocondriales reducen el potencial mitocondrial.
(A) Microfotografías representativas de monocapas de astrocitos expuestos a los inhibidores mitocondriales en presencia de JC-1.
(B) Coeficiente de emisión de fluorescencia de la sonda JC-1 en astrocitos tratados con los inhibidores mitocondriales indicados (rotenona 1µM, fluorocitrato 100µM, antimicina A 5µM o azida de sodio 5µM) por 24hs. Los datos se expresan como el porcentaje del control de 2 experimentos, media ± SE, * = significativamente diferente del control ($p<0.05$).

alteraciones de la monocapa celular. Este resultado verifica que los inhibidores mitocondriales utilizados en las dosis y tiempos indicados resultan efectivos en disminuir la actividad mitocondrial.

Acción de los inhibidores mitocondriales sobre la morfología astrocitaria

Una de las características que acompaña la reactividad astrocitaria es un cambio morfológico caracterizado por la hipertrofia celular y la formación de prolongaciones delgadas y ramificadas. Para determinar si los inhibidores mitocondriales producían cambios morfológicos en los astrocitos, se realizaron estudios de inmunofluorescencia para GFAP. En la figura 4, se muestran microfotografías representativas de la inmunofluorescencia para dicho

marcador frente al tratamiento con los diferentes inhibidores. En los controles, los astrocitos adheridos a la placa, presentan las formas poligonales típicas, con un soma extendido y pocos procesos celulares visibles. En los astrocitos tratados con los inhibidores las monocapas se mantienen adheridas pero que ocurren cambios morfológicos que variaron de acuerdo al inhibidor utilizado.

El tratamiento con fluorocitrato, antimicina A y azida de sodio, provocó cambios en la citoarquitectura astrocitaria, observándose una retracción de los somas y núcleos, que parecen de menor tamaño y la aparición de procesos delgados y largos, con una condensación aparente del inmunomarcado. Sin embargo no se observaron cambios con rotenona.

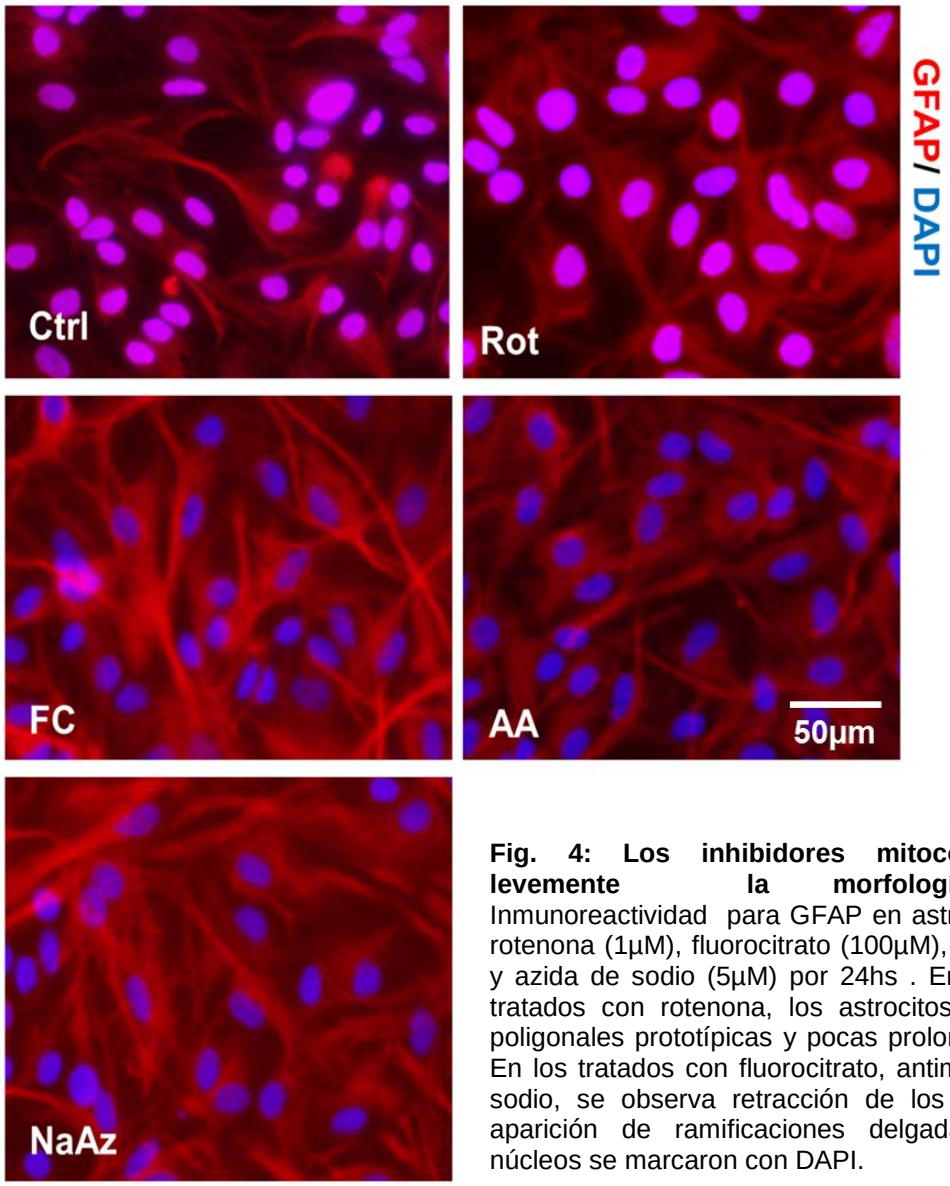

Fig. 4: Los inhibidores mitocondriales alteran levemente la morfología astrocitaria. Inmunoreactividad para GFAP en astrocitos tratados con rotenona (1µM), fluorocitrato (100µM), antimicina A (5µM) y azida de sodio (5µM) por 24hs . En lo controles y los tratados con rotenona, los astrocitos presentan formas poligonales prototípicas y pocas prolongaciones visibles. En los tratados con fluorocitrato, antimicina A y azida de sodio, se observa retracción de los somas y núcleos, aparición de ramificaciones delgadas y largas. Los núcleos se marcaron con DAPI.

Acción de los inhibidores mitocondriales sobre la proliferación astrocitaria

Otra de las características que acompaña la reactividad astrocitaria es el aumento en la proliferación. Los astrocitos portadores de la SODG93A presentan menor actividad mitocondrial asociada a un aumento en la tasa de proliferación. Para determinar si los inhibidores mitocondriales producían cambios en este factor, se realizaron estudios de incorporación de BrdU. La proporción de núcleos marcados con BrdU sobre el total de núcleos marcados con el marcador nuclear DAPI se utiliza como índice de la tasa de proliferación celular. En los astrocitos tratados con los inhibidores mitocondriales durante 24 horas a las dosis establecidas no se encontraron cambios en la tasa de proliferación comparada con los controles (Fig. 5). Aunque es necesario repetir el experimento para confirmar esto.

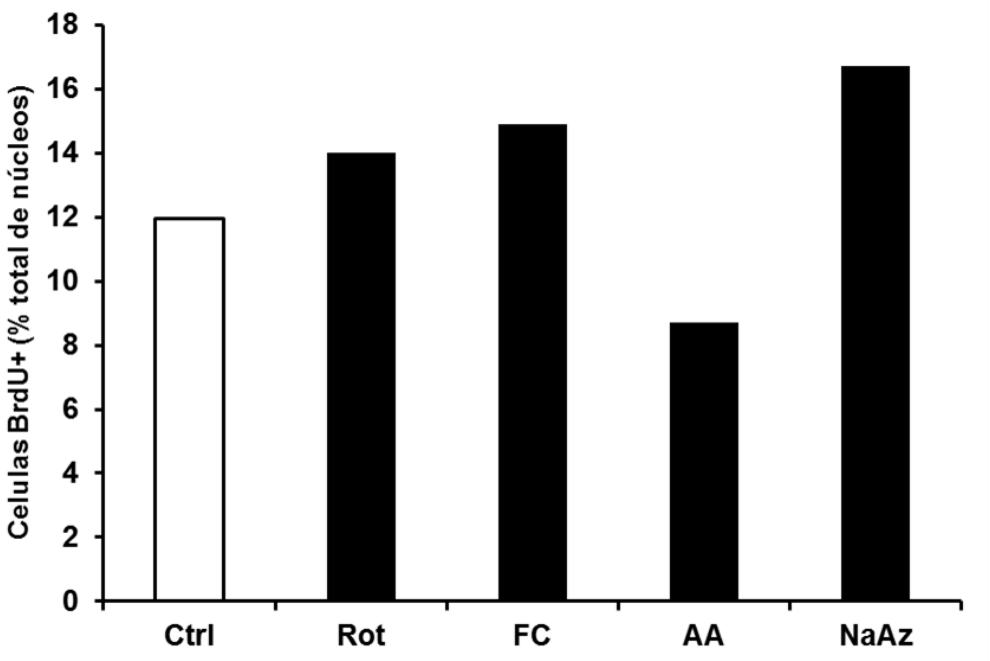

Fig. 5: Los inhibidores mitocondriales en tratamiento agudo no alteran significativamente la proliferación en los astrocitos. La gráfica muestra el porcentaje de núcleos inmunoreactivos para BrdU de astrocitos después de 24 hs de tratamiento con los inhibidores mitocondriales. Los datos se expresan como la media de un experimento en duplicado.

Efectos del tratamiento con los inhibidores mitocondriales en la actividad trófica de los astrocitos

Para el estudio de la capacidad trófica de los astrocitos realizamos co-cultivos entre astrocitos corticales y neuronas de hipocampo. Utilizamos las neuronas de hipocampo porque es una preparación más homogénea a nivel celular, a diferencia de la corteza en la cual existe una gran variedad neuronal. El establecimiento de co-cultivos astrocito-neurona resulta un recurso muy utilizado en la literatura para el análisis de la interacción entre ambas células (Stewart y cols., 1998; Cassina y cols., 2002; Volobouéva y cols., 2007; Olivera y cols., 2008). Las neuronas de hipocampo son una población neuronal blanco de afectación en la enfermedad de Alzheimer y este tipo de co-cultivo es utilizado como modelo para el estudio de mecanismos patogénicos de dicha enfermedad (Sáez y cols., 2006; Kelly y Ferreira, 2007; Calkins y Reddy, 2011; Noshita y cols., 2012).

La figura 6 muestra que los astrocitos pretratados con inhibidores mitocondriales reducen la supervivencia de neuronas en co-cultivo de manera variable de acuerdo con el inhibidor utilizado. Comparado con la situación control que consideramos como el 100% de la supervivencia alcanzada, los astrocitos pretratados con rotenona determinaron la muerte del 68% de las neuronas, con fluorocitrato el 27%, con antimicina A el 76% y con azida de sodio el 58%.

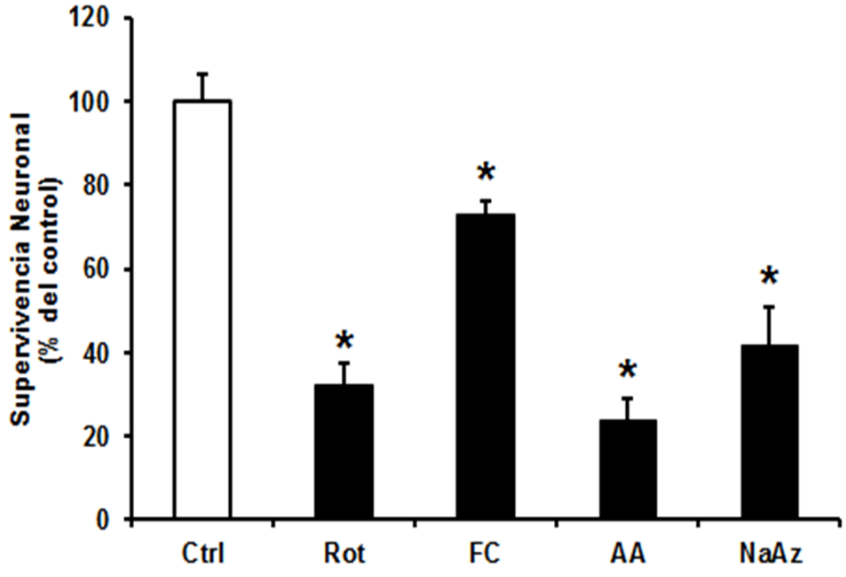

Fig. 6: Los inhibidores mitocondriales afecta la viabilidad de neuronas hipocampales en co-cultivo. El tratamiento de las monocapas de astrocitos con los inhibidores mitocondriales determino una disminución de la supervivencia de neuronas hipocampales. Los datos se expresan como porcentaje del control, media ± SE de 3 experimentos independientes, * = significativamente diferente del control ($p<0.05$).

Evaluación de los niveles de expresión de GLT-1 en los astrocitos tratados con los inhibidores mitocondriales

Una reducción en la expresión de GLT-1 se ha identificado en astrocitos reactivos (Papadeas y cols., 2011) y en las patologías del SNC (Maragakis y Rothstein, 2001). Además, resultados publicados de nuestro laboratorio muestran que una población de astrocitos altamente neurotóxicos aislados de animales adultos portadores de la mutación en SOD1 asociada a formas familiares de la enfermedad neurodegenerativa ELA no expresan el transportador GLT-1 lo cual podría explicar en parte su gran toxicidad (Díaz-Amarilla y cols., 2011). Recientemente se ha detectado una interacción fisica entre GLT-1 y las mitocondrias (Genda y cols., 2011), proporcionando un mecanismo por el cual se evidencia que existe una comunicación entre ambos. Con el fin de analizar si la toxicidad mostrada por los astrocitos pretratados con inhibidores mitocondriales se asocia a una reducción en la expresión del GLT-1, realizamos estudios de la presencia de la proteína mediante la técnica de Western Blot. El análisis por WB realizado con los extractos de proteínas totales de los astrocitos controles y tratados, muestra una variación en la expresión de GLT-1 de acuerdo al inhibidor utilizado.

Los resultados sugieren que los tratamientos con rotenona, fluorocitrato y antimicina A aumentan su expresión; y la azida de sodio la disminuye.

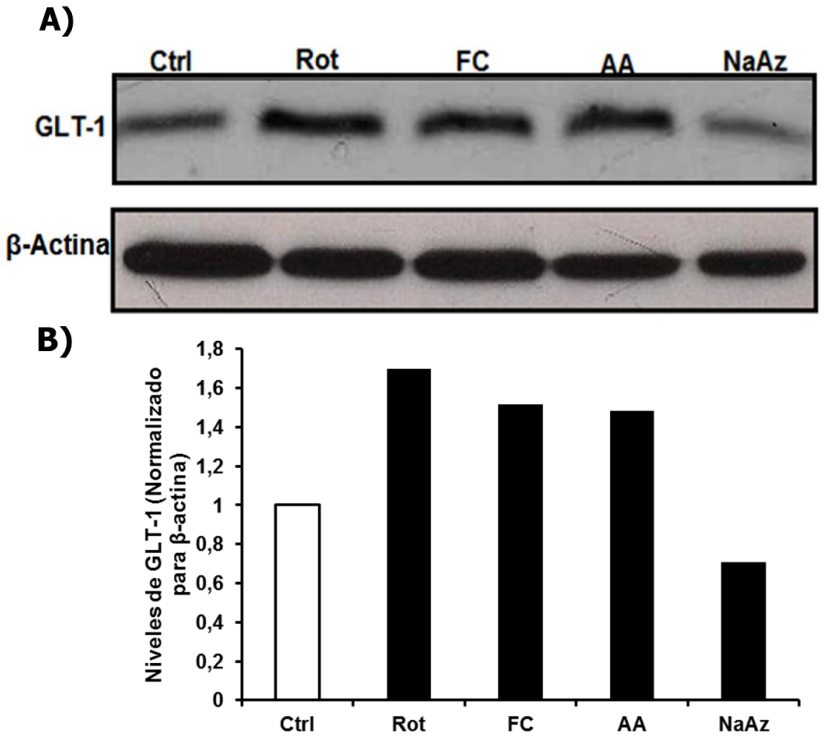

Fig. 7: Los inhibidores mitocondriales afectan la expresión del transportador de glutamato GLT-1. (A) Inmunoblot para GLT-1 y β-actina de lisado de astrocitos después de 24 hs de tratamiento con inhibidores mitocondriales como se indica. (B) Cuantificación de los niveles de GLT-1 normalizado contra β-actina. Los datos se expresan como la media de un experimento.

Respecto al control hubo aumentos del 70% para la rotenona, aproximadamente 51% para fluorocitrato, 48% para antimicina A y hubo una disminución del 29% para la azida de sodio, siendo necesario repetir este experimento para confirmar estos resultados. Las bandas inferiores corresponden a actina, el control de carga empleado que muestra que las cantidades de proteínas totales sembradas en cada condición fueron comparables (Fig. 7A y B).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo mostramos que la inhibición farmacológica de la respiración mitocondrial en astrocitos de corteza cerebral es suficiente para alterar su función de soporte para neuronas en co-cultivo.

La disfunción mitocondrial es un evento común a las enfermedades neurodegenerativas sin embargo no está claro el papel que cumple en cada uno de los tipos celulares involucrados (Rowland y Schneider, 2001). La mayoría de los datos publicados muestran resultados obtenidos en mitocondrias aisladas de homogeneizados de regiones del SNC (Kirkinezos y cols., 2004) o de modelos celulares neuronales (Menzies y cols., 2002), con lo cual se asume que en todos los tipos celulares que integran el tejido nervioso la disfunción mitocondrial conduce a la muerte celular por apoptosis.

Astrocitos y neuronas modulan su metabolismo energético de manera diferente ante la inhibición de la respiración mitocondrial. Mientras las neuronas dependen estrictamente del metabolismo oxidativo, los astrocitos son capaces de modificar su metabolismo energético hacia la glicolisis, hecho que permite mantener un estado energético suficientemente alto para asegurar su viabilidad (Bolaños y Almeida, 2006). En la base de tal respuesta adaptativa subyace la activación por un aumento en los niveles de superóxido de diferentes sensores moleculares como el factor de transcripción nuclear κB (NF- κB) y la quinasa activada por AMP (AMPK), en respuesta a un aumento del metabolismo de AMP. La señalización desencadenada culmina con un aumento en la expresión

de enzimas glicoliticas y un incremento en la captación de glucosa (Almeida y cols., 2001; Bolaños y Almeida, 2006; Moncada y Bolaños, 2006).

Nuestro laboratorio trabaja sobre la hipótesis de que los astrocitos que rodean y sostienen a las neuronas participan en la progresión lesional en las enfermedades neurodegenerativas adoptando un fenotipo neurotóxico que mantiene y propaga la muerte neuronal (Barbeito y cols., 2004). En este contexto la participación de la mitocondria en la determinación del fenotipo tóxico no está aclarada. Previos trabajos de nuestro grupo han mostrado que la disfunción mitocondrial en los astrocitos de médula espinal induce neurotoxicidad para las motoneuronas, dato que puede tener relevancia para la ELA (Cassina y cols., 2008). Dada la diversidad en función y expresión de diferentes agentes incluyendo el transportador de glutamato que se han descrito en diferentes poblaciones astrocitarias (Hewett, 2009), nuestros resultados aportan nuevos datos de que la función mitocondrial es importante para mantener la capacidad trófica de los astrocitos también en la corteza cerebral.

La diferencia de potencial de membrana mitocondrial es un índice indirecto de la actividad de la cadena de transporte de electrones. Analizamos el potencial mitocondrial con la sonda JC-1 como indicador de la efectividad de los inhibidores mitocondriales utilizados. Esta sonda permite la determinación del potencial ya sea por citometría de flujo, microscopia de fluorescencia o lector de fluorescencia en placas lo cual resulta un mecanismo sencillo para la comprobación del tratamiento utilizado. Verificando que los inhibidores mitocondriales utilizados en la dosis y tiempos indicados resultan efectivos en disminuir la actividad mitocondrial.

En situaciones de astrocitosis reactiva los astrocitos experimentan cambios que incluyen modificaciones morfológicas y alteraciones en la proliferación celular (Sofroniev y Vinters, 2010). En nuestro trabajo si bien observamos cambios morfológicos con la mayoría de los inhibidores utilizados éstos no se acompañaron de un aumento apreciable en la tasa de proliferación como era esperable, siendo necesario repetir este último resultado. Esta presunción se basa en el fenómeno ya descrito donde las células proliferantes se acompañan

de mayor actividad glicolítica sin utilizar la vía mitocondrial de oxidación de la glucosa (Warburg y cols., 1930). Es probable que en nuestro modelo el tiempo de inhibición no fuera lo suficientemente prolongado como para inducir la remodelación metabólica ya que los cambios en los astrocitos se ven de manera acumulativa en el SNC intacto (Levine y cols., 1999). Es probable que las células en cultivo requieran mayor tiempo de estimulación. Queda dentro de nuestras perspectivas ensayar estímulos crónicos de inhibición mitocondrial.

A pesar de no apreciarse cambios en la proliferación, la inhibición mitocondrial en astrocitos indujo la muerte de las neuronas de hipocampo en co-cultivo lo cual es compatible con un fenotipo neurotóxico. Otros reportes de la literatura muestran modificaciones de la función astrocitaria luego de la inhibición mitocondrial. Por ejemplo Volobouevа y cols. (2007) muestran que los astrocitos expuestos a fluorocitrato son menos eficientes en proteger neuronas a la excitotoxicidad. En otro trabajo se aporta evidencia que la rotenona induce la disfunción de la conexina 43 en astrocitos mesencefálicos lo cual puede estar implicado en la patología de la enfermedad de Parkinson (Zhang y cols., 2011).

El mecanismo por el cual los astrocitos con disfunción mitocondrial resultan neurotóxicos no fue estudiado y constituirá alguna de nuestras perspectivas.

Se ha demostrado que una disfunción mitocondrial astrocitaria afecta el soporte trófico y metabólico, así como la señalización que lo astrocitos brindan a las neuronas. Si bien el metabolismo oxidativo mitocondrial no es la única fuente de ATP para el astrocito ya que éste presenta rutas metabólicas alternativas, la mitocondria está vinculada a diversos procesos celulares y de señalización, tales como producción de ROS, apoptosis y proliferación a través de la vía MAPK/ERK (Keating, 2008; Galli y cols., 2009).

Uno de los mecanismos que podrían explicar la muerte neuronal es que en el co-cultivo se generase una situación de excitotoxicidad entendida como la sobreestimulación de los receptores de glutamato que conduce a muerte celular como consecuencia de un aumento en el influjo de sodio y calcio. Los astrocitos son capaces de liberar glutamato frente a diversas circunstancias. Uno de los mecanismos de liberación de glutamato por los astrocitos puede

ocurrir vía vesicular, la cual depende de la concentración intracelular de Ca^{2+} que a su vez es regulada por la mitocondria (Parpura y Zorec, 2010).

Por otra parte, las alteraciones ya sea en la expresión o en la funcionalidad del transportador de glutamato podrían contribuir a la muerte excitotóxica de las neuronas de hipocampo. Nuestro hallazgo de cambios en la expresión del GLT-1 necesita ser repetido, aunque habla a favor de que este pudiera ser un mecanismo por el cual facilitar la muerte celular. Esto está en acuerdo con lo descrito para astrocitos de otras regiones del SNC. El trabajo reportado por Rao y cols. (2003) mostró que una pérdida en la actividad del transportador de glutamato GLT-1 en los astrocitos de médula espinal determinó la muerte de las motoneuronas circundantes.

Nosotros evaluamos la expresión del GLT-1 pero no su funcionalidad, lo cual también es relevante dado que el trasporte de glutamato por GLT-1puede alterarse frente a un aumento en el estrés oxidativo. La disfunción mitocondrial aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. De hecho se ha reportado que GLT-1 altera su funcionamiento en situaciones de estrés oxidativo (Trotti y cols., 1998) y que sufre alteraciones en su plegamiento al igual que otras proteínas (Lauderback y cols., 2001).

Por otra parte recientemente se ha mostrado que el transporte de glutamato se afecta con la disfunción local del metabolismo energético. El trabajo de Genda y cols. (2011) detecta una interacción física entre GLT-1, la Na^+/K^+ ATPasa de membrana, enzimas glicolíticas y las mitocondrias. Además, la inhibición conjunta de la glicolisis y de la fosforilación oxidativa reduce el transporte de glutamato, con lo cual proponen un mecanismo que apoya espacialmente las demandas energéticas del transporte. Cada ciclo de transporte determina un influjo de Na^+ y H^+ que es amortiguado por la mitocondria y necesita de ATP y gradiente de Na^+ que es generado por la glicolisis y la $Na+/K^+$ ATPasa de membrana.

Nuestro laboratorio ha descrito una vía de neurotoxicidad específica para motoneuronas mediada por liberación de NO y NGF actuando a través de p75 (Pehar y cols., 2004). Las neuronas de hipocampo también expresan p75 y la expresión de los receptores TRK aparece más tarde en el desarrollo por lo cual

no podemos descartar que este mecanismo también contribuya a la muerte neuronal.

En suma, nuestros resultados fortalecen la hipótesis de que ante una noxa que altere la función mitocondrial en los astrocitos estas células modifican su fenotipo hacia uno neurotóxico para las neuronas circundantes, con lo cual facilita la propagación de la muerte neuronal y en consecuencia la progresión lesional. Nuestros resultados demuestran que la sola inhibición mitocondrial es suficiente para alterar el mantenimiento de la supervivencia neuronal en co-cultivos.

PERSPECTIVAS

Durante la realización de este trabajo se han generado nuevas interrogantes que sugieren trabajos futuros:

Establecer si la muerte neuronal es mediada por glutamato (utilizando inhibidores de receptores NMDA, dizocilpine MK801).

Establecer si la muerte neuronal es mediada por NGF (utilizando anticuerpos bloqueantes anti-NGF o anti-p75).

Analizar el impacto de tratamientos crónicos con los inhibidores mitocondriales.

Comparar las respuestas a la disfunción mitocondrial de astrocitos y neuronas de otras regiones: hipocampo, mesencéfalo.

BIBLIOGRAFÍA

- Agostinho P, Cunha RA, Oliveira C. (2010) Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer´s disease. *Curr Pharm Des.* **16**:2766-2778.
- Almeida A, Almeida J, Bolaños JP, Moncada S. (2001) Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocytes protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:15294-15299.
- Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Peluffo H, Viera L, Estévez AG, Beckman JS. (2004) A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res.* **4**7: 263-274.
- Berger UV and Hediger MA. (2000) Distribution of the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in rat circumventricular organs, meninges, and dorsal root ganglia. *J Comp Neurol.* **421**:385-399.
- Bhuyan AK. (2010) On the mechanism of SDS-induced protein denaturation. *Biopolymers.* **93**:186-199.
- Bolaños JP and Almeida A. (2006) Modulation of astroglial energy metabolism by nitric oxide. *Antioxid. Redox Signal.* **8**:955-965.
- Burhans WC and Heintz NH. (2009) The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radic Biol Med.* **47**:1282-1293.
- Butt AM and Kalsi A. (2006) Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions. *J Cell Mol Med.* **10**:33-44.
- Calkins MJ and Reddy PH. (2011) Assessment of newly synthesized mitochondrial DNA using BrdU labeling in primary neurons from Alzheimer´s disease mice: Implications for impaired mitochondrial biogenesis and synaptic. *Biochim Biophys Acta.* **1812**:1182-1189.
- Cassina P, Peluffo H, Pehar M, Martinez-Palma L, Ressia A, Beckman JS, Estevez AG, Barbeito L. (2002) Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. *J. Neurosci. Res.* **67**:21-29.
- Cassina P, Pehar M, Vargas MR, Castellanos R, Barbeito AG, Estévez AG, Thompson JA, Beckman JS, Barbeito L. (2005) Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* **93**:38-46.
- Cassina P, Cassina A, Pehar M, Castellanos R, Gandelman M, de León A, Robinson KM, Mason RP, Beckman JS, Barbeito L, Radi R. (2008) Mitochondrial dysfunction in SODG93A-bearing astrocytes promotes motor

neuron degeneration prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *J. Neurosci.* **28**:4115-4122.

- Contreras JE, Sánchez HA, Eugenin EA, Speidel D, Theis M, Willecke K, Bukauskas FF, Bennett MV, Sáez JC. (2002) Metabolic inhibition induces opening of unopposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proc Natl Acad U S A.* **99**:495-500.
- de Moura MB, dos Santos LS, Van Houten B. (2010) Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disease and cancer. *Environ. Mol. Mutagen.* **51**:391-405.
- De Simoni S, Goemaere J, Knoops B. (2008) Silencing of peroxiredoxin 3 and peroxiredoxin 5 reveals the role of mitochondrial peroxiredoxins in the protection of human neuroblastoma SH-SY5Y cells toward MPP+. *Neurosci Lett.* **433**:219-224.
- Deng HX, Shi Y, Furukawa Y, Zhai H, Fu R, Liu E, Gorrie GH, Khan MS, Hung WY, Bigio EH, Lukas T, Dal Canto MC, O´Halloran TV, Siddique T. (2006) Conversion to the amyotrophic lateral sclerosis phenotype is associated with insoluble aggregates of SOD1 in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**:7142-7147.

- DeWitt DA, Perry G, Cohen M, Doller C, Silver J. (1998) Astrocytes regultate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer´s disease. *Exp Neurol.* **149**:329-340.
- Díaz-Amarilla P, Olivera-Breavo S, Trias E, Cragnolini A, Martínez-Palma L, Cassina P, Beckman J, Barbeito L. (2011) Phenotypically aberrant astrocytes that promote motorneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**:18126-18131.
- Dupuis L, Oudart H, René F, Gonzalez de Aguilar JL, Loeffler JP. (2004) Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad U S A.* **101**:11159-11164.
- Ernster L and Schatz G. (1981) Mitochondria: a historical review. *J. Cell Biol.* **91**:227-255.
- Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM. (2005) Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat Med.* **10**:1055-1063.

- Freshney RI. (2000) Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Techniques. 2nd ed., Wiley, New York.
- Galli S, Jahn O, Hitt R, Hesse D, Opitz L, Plessmann U, Urlaub H, Poderoso JJ, Jares-Erijman EA, Jovin TM. (2009) A new paradigm for MAPK: structural interactionsns of hERK1 with mitochondria in HeLa cells. *Plos One* **4**:e7541.
- Genda EN, Jackson JG, Sheldon AL, Locke SF, Greco TM, O´Donnell JC, Spruce LA, Xiao R, Guo W, Putt M, Seeholzer S, Ischiropoulos H, Robinson MB. (2011) Co-compartmentalization of the astroglial glutamate transporter, GLT-1, with glycolytic enzymes and mitochondria. *J Neurosci.* **31**:18275-18288.
- Hewett JA. (2009) Determinants of regional and local diversity within the astroglial lineage of the normal central nervous system. *J Neurochem.* **110**:1717-1736.
- Higgins CM, Jung C, Ding H, Xu Z. (2002) Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. *J. Neurosci.* **22**:RC215.
- Im AR, Kim YH, Uddin MR, Lee HW, Chae SW, Kim YH, Jung WS, Kang BJ, Mun CS, Lee MY. (2012) Scutellaria baicalensis extracts and flavonoids protect rat L6 cells from antimycin A-induced mitochondrial dysfunction. *Evid Based Complement Alternat Med.* **2012**:517965.
- Jaarsma D, Rognoni F, van Dujin W, Verspaget HW, Haasdijk ED, Holstege JC. (2001) CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. *Acta Neuropathol.* **102**:293-305.
- Kanai Y and Hediger MA. (2004) The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch.* **447**:469-479.
- Karbowski M and Neutzner A. (2012) Neurodegeneration as a consequence of failed mitochondrial maintenance. *Acta Neuropathol.* **123**:157-171.
- Keating DJ. (2008) Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, regulation of exocytosis and their relevance to neurodegenerative diseases. *J Neurochem.* **104**:298-305.
- Kelly BL and Ferreira A. (2007) Beta-amyloid disrupted synaptic vesicle endocytosis in cultured hippocampal neurons. *Nueroscience.* **147**:60-70.
- Kirkinnezos IG, Hernandez D, Bradley WG, Moraes CT. (2004) An ALS mouse model with a permeable blood-brain barrier benefits from systemic cyclosporine A treatment. *J. Neurochem.* **88**:821-826.

- Knapp PE. (1992) The Cell Cycle of Glial Cell Grown In Vitro: An Immunocytochemical Method of Analysis. *J Histochem Cytochem.* **40**:1405-1411.
- Kurien BJ and Scofield RH. (2003) Protein Blotting: a review. *J. Immunol. Methods.* **274**:1-15.
- Kurien BJ and Scofield RH. (2006) Western Blotting. *Methods.* **38**:283-293.
- Kurien BJ and Scofield RH. (2009) A brief review of other notable protein blotting methods. *Methods Mol. Biol.* **536**:367-384.
- Lauderback CM, Hackett JM, Huang FF, Keller JN, Szweda LI, Markesbery WR, Butterfiel DA. (2001) The glial glutamate transporter, GLT-1, is oxidatively modified by 4-hydroxy-2-nonenal in the Alzheimer´s brain: the role of Abeta1-42. *J Neurochem.* **78**:413-416.
- Levine JB, Kong J, Nadler M, Xu Z. (1999) Astrocytes interact intimately with degenerating motor neurons in mouse amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Glia.* **28**:215-224.
- Liu J, Lillo C, Jonsson PA, Vande Velde C, Ward CM, Miller TM, Subramaniam JR, Rothstein JD, Marklund S, Andersen PM, Brännström T, Gredal O, Wong PC, Williams DS, Cleveland DW. (2004) Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron.* **43**:5-17.
- Magrané J, Hervias I, Henning MS, Damiano M, Kawamata H, Manfredi G. (2009) Mutant SOD1 in neuronal mitochondrial causes toxicity and mitochondrial dynamics abnormalities. *Hum Mol Genet.* **18**:4552-4564.
- Manfredi G and Xu Z. (2005) Mitochondrial dysfunction and its role in motor neuron degeneration in ALS. *Mitochondrion.* **5**:77-87.
- Mao P and Reddy PH. (2011) Aging and amyloid beta-induced oxidative DNA damage and mitochondrial dysfunction in Alzheimer´s disease: implications for early intervention and therapeutics. *Biochim Biophys Acta.* **1812**:1358-1370.
- Maragakis NJ and Rothstein JD. (2006) Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **2**:679-689.
- Marchetto MC, Muotri AR, Mu Y, Smith AM, Cezar GG, Gage FH. (2008) Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* **3**:649-657.
- Markiewicz I and Lukosmska B. (2006) The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. *Acta Neurobiol Exp.* **66**:343-358.
- Matos M, Augusto E, Oliveira CR, Agostinho P. (2008) Amyloid-beta peptide decreases glutamate uptake in cultured astrocytes: involvement of oxidative

stress and mitogen-activated protein kinase cascades. *Neuroscience.* **156**:898-910.

- Menzies FM, Cookson MR, Taylor RW, Turnbull DM, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Dong L, Figlewicz DA, Shaw PJ. (2002) Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* **125**(Pt 7):1522-1533
- Mitani A and Tanaka K. (2003) Functional changes of glial glutamate transporter GLT-1 during ischemia: an in vivo study in the hippocampal CA1 of normal mice and mutant mice lacking GLT-1. *J Neurosci.* **23**:7176-7182.
- Moncada S and Bolaños JP. (2006) Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J Neurochem.* **97**:1676-1689.
- Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S. (2007) Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat. Neurosci.* **10**:615-622.
  Neuropathol. **119**:7-35.
- Noshita T, Murayama N, Oka T, Ogino R, Nakamura S, Inoue T. (2012) Effect of bFGF on neuronal damge induced by sequential treatment of amyloid β and excitatory amino acid in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol.* **695**:76-82.
- Olivera S, Fernandez A, Latini A, Rosillo JC, Casanova G, Wajner M, Cassina P, Barbeito L. (2008) Astrocytic proliferation and mitocondrial dysfunction induced by accumulated glutaric academia I (GAI) matabolites: possible implications for GAI pathogenesis. *Neurobiol Dis.* **32**:528-534.
- Papadeas ST, Kraig Se, O´Banion C, Lepore AC, Maragakis NJ. (2011) Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) mutation induces wild-type motor neuron degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**:17803-17808.
- Parpura V and Zorec R. (2010) Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res Rev.* **63**:83-92.
- Patten DA, Germain M, Kelly MA, Sclack RS. (2010) Reactive oxygen species: stuck in the middle of neurodegeneration. *J Alzheimers Dis.* 20 Suppl **2**:S357-S367.
- Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Castellanos R, Viera L, Beckman JS, Estévez AG, Barbeito L. (2004). Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* **89**:464-473.

- Pines G, Danbolt NC, Bjoras M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E, Kanner BI. (1992) Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature.* **360**:464-467.
- Radad K, Rausch WD, Gille G. (2006) Rotenone induces cell death in primary dopaminergic culture by increasing ROS production and inhibiting mitochondrial respiration. *Neurochem Int.* **49**:379-386.
- Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, Castro L. (2002) Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **33**:1451-1464.
- Rao SD, Yin HZ, Weiss JH. (2003) Disruption of glial glutamate transport by reactive oxygen species produced in motor neurons. *J Neurosci.* **23**:2627-2633.
- Regan MR, Huang YH, Kim YS, Dykes-Hoberg MI, Jin L, Watkins AM, Bergles DE,Rothstein JD.(2006) Variations in promoter activity reveal a differential expression and physiology of glutamate transporters by glia in the developing and mature CNS. *J Neurosci.* **27**:6607-6619.
- Rich PR and Maréchal A. (2010) The mitochondrial respiratory chain. *Essays Biochem.* **47**:1-23.
- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. (1995) Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amytrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* **38**:73-84.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron.* **16**:675-686.
- Rowland LP and Shneider NA. (2001) Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med.* **344**:1688-1700.
- Sáez ET, Pehar M, Vargas MR, Barbeito L, Maccioni RB. (2006) Production of nerve growth factor by beta-amyloid-stimulated astrocytes induces p75NTR-dependent tau hyperphosphorylation in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res*. **84**:1098-106.
- Saneto R. P. and De Vellis J. (1987) Neuronal and glial cells: cell culture of the central nervous system, in Neurochemistry: a Practical Approach (Turner, A. J. Brachelard, H. S., eds), pp. 27–63. IRL Press, Washington, DC.
- Schon EA and Manfredi G. (2003) Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction. *J Clin Invest.* **111**:303-312.
- Schon EA and Przedborski S. (2011) Mitochondria: the next (neurode)generation. *Neuron.* **70**:1033-1053.

- Selvatici R, Previat M, Marino S, Marani L, Falzarano S, Lanzoni I, Siniscalchi A. (2009) Sodium azide induced neuronal damage in vitro: evidence for non-apoptotic cell death. *Neurochem Res.* **34**:909-916.
- Shewry PR and Fido RJ. (1998) Protein Blotting: Principles and Applications. *Molecular Biomethods Handbook.* Long Ashton Research Station, Bristol, UK.
- Sofroniew MV and Vinters HV. (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta*
- Stewart VC, Taylor B, Bolaños JP, Land JM, Clark JB, Heales SJ. (1998) Astrocytic mitochondrial respiratory chain damage: effect on cellular ATP levels. *Biochem Soc Trans.* **26**:S346.
- Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K. (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science.* **276**:1699-1702.
- Tillement L, Lecanu L, Papadopoulos V. (2011) Alzheimer´s disease: effects of β-amyloid on mitochondria. *Mitochondrion.* **11**:13-21.
- Trotti D, Danbolt NC, Volterra A. (1998) Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci.* **19**:328-334.
- Tzingounis AV and Wadiche JI. (2007) Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**:935-947.
- Vargas MR, Pehar M, Cassina P, Beckman JS, Barbeito L. (2006) Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR-dependent motor neuron apoptosis. *J. Neurochem.* **97**:687-696.
- Veerhuis R. (2011) Histological and direct evidence for the role of complement in the neuroinflammation of AD. *Curr Alzheimer Res.* **8**:34-58.
- Vijayvergiya C, Beal MF, Buck J, Manfredi G. (2005) Mutant superoxide dismutase 1 forms aggregates in the brain mitocondrial matrix of amyotrophic sclerosis mice. *J Neurosci.* **25**:2463-2470.
- Volobоueva LA, Suh SW, Swanson RA, Giffard RG. (2007) Inhibition of mitocondrial function in astrocytes: implications for neuroprotection. *J. Neurochem.* **102**:1383-1394.
- Wang DD and Bordey A. (2008) The astrocyte odyssey. *Prog. Neurobiol.* **86**:342-367.
- Warburg, O., Wind, F., & Neglers, E. (1930). In O. Warburg (Ed.), *Metabolism of tumours* (pp. 254–270). London: Constable & Co.

- White RJ and Reynolds IJ. (1996) Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal to excitotoxin exposure. *J. Neurosci.* **16**:5688-5697.
- Xu JX. (2004) Radical metabolism is partner to energy metabolism in mitochondria. *Ann N Y Acad Sci.* **1011**:57-60.
- Zhang S, Liang R, Zhou F, Huang X, Ding JH, Hu G. (2011) Reversal of rotenone-induced dysfunction of astrocytic connexin43 by opening mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Cell Mol Neurobiol.* **31**:111-117.
- Zhu J and Chu CT. (2010) Mitochondrial dysfunction in Parkinson´s disease. *J Alzheimers Dis.* 20 Suppl **2**:S325-S334.