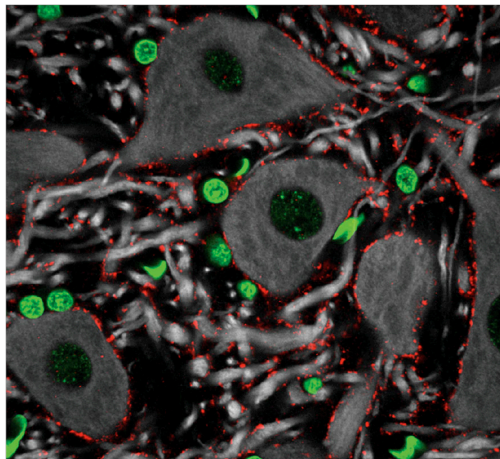


Tesis de maestría  
Area biología, Sub-área neurociencias  
PEDECIBA

**“Efectos de la señalización por ATP extracelular  
sobre astrocitos y motoneuronas: consecuencias  
para la Esclerosis Lateral Amiotrófica”**

**MANDI GANDELMAN PERSITZ**



**Orientadores:**

**Dr. Luis Barbeito**, Laboratorio de Neurodegeneración, Instituto Pasteur  
Montevideo.

**Dra. Patricia Cassina**, Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular,  
Facultad de Medicina, UdelaR.

Montevideo  
Uruguay  
2008

***A mi mamá***

## **INDICE**

<b>Resumen</b>	4
<b>Introducción</b>	
El ATP como molécula de señalización y sus receptores	5
Mecanismos de aumento del ATP extracelular	9
Aumento del ATP extracelular durante procesos patológicos	10
La degradación del ATP en el medio extracelular y la señalización por ADP y adenosina	12
Rol de la señalización purinérgica y de P2X <sub>7</sub> durante la patología en el sistema nervioso	15
Señalización por P2X <sub>7</sub> y la inducción de estrés oxidativo	19
Rol de los astrocitos en la Esclerosis Lateral Amiotrófica	21
<b>Hipótesis</b>	26
<b>Objetivo general</b>	26
<b>Objetivos específicos y abordaje metodológico</b>	27
<b>Materiales y métodos</b>	
Protocolos de experimentación animal	29
Materiales	29
Cultivos primarios de astrocitos espinales	29
Cultivos primarios de motoneuronas	30
Tratamiento de cultivos	31
Determinación del número de motoneuronas viables	32
Inmunofluorescencia	33
Determinación de la proliferación	34
Detección de ERON	34
Análisis de datos	36
<b>Resultados</b>	
Activación y neurotoxicidad retardada en astrocitos por señalización por ATP a través de P2X <sub>7</sub>	37
La activación de P2X <sub>7</sub> en astrocitos induce un incremento en la producción de ERON	43
Las ERONs median la neurotoxicidad astrocitaria inducida por la activación de P2X <sub>7</sub>	46
P2X <sub>7</sub> media la neurotoxicidad de astrocitos SOD1 <sup>G93A</sup>	47
El ATP media la proliferación de astrocitos SOD1 <sup>G93A</sup>	48
La activación de P2X <sub>7</sub> en motoneuronas induce la apoptosis mediada por ERON	50
<b>Discusión</b>	
Los astrocitos y la neurotoxicidad por ATP	53
Mecanismos de citotoxicidad iniciados por la activación de P2X <sub>7</sub>	56
Rol del ATP en la ELA	59
La activación de P2X <sub>7</sub> en motoneuronas	60
<b>Conclusiones y perspectivas</b>	62
<b>Referencias</b>	65

Foto de tapa:

Inmunofluorescencia de motoneuronas espinales de rata adulta marcadas con MAP-2 (blanco), P2X<sub>7</sub> (rojo) y contratinción con sytox (verde). Modificado de (Wang et al., 2004)

## **RESUMEN**

El Adenosín tri-fostato (ATP) constituye una molécula mensajera extracelular en la interfase neurona-glía aparte de su clásico rol en el metabolismo energético. En respuesta al daño y la inflamación del sistema nervioso, el ATP se libera al medio extracelular por fuga desde células necróticas y por su liberación altamente regulada principalmente desde los astrocitos. Existen 15 receptores de membrana a ATP, de los cuales el receptor P2X<sub>7</sub> se caracteriza por mediar la activación de células inmunes y microglía, y es también expresado por astrocitos y motoneuronas. Sin embargo, las consecuencias de su activación para la neurodegeneración son poco conocidas. En este trabajo estudiamos los efectos de la señalización por ATP extracelular y P2X<sub>7</sub> en astrocitos y motoneuronas de médula espinal. Se utilizaron astrocitos y motoneuronas mantenidas en cultivos puros o bien en forma de co-cultivos. Encontramos que el ATP es capaz de activar los astrocitos a través del receptor P2X<sub>7</sub>, llevando a la formación de superóxido, óxido nítrico, peróxido de hidrógeno y peroxinitrito, detectado por la cuantificación de superóxido y peróxido de hidrógeno. A su vez, la activación de P2X<sub>7</sub> en astrocitos determinó el desarrollo de un fenotipo neurotóxico, caracterizado por la liberación de uno o más factores difusibles con la capacidad de inducir muerte de motoneuronas. La neurotoxicidad astrocitaria para motoneuronas es característica de los astrocitos provenientes de animales que sobre-expresan la mutación G93A de la enzima Superóxido dismutasa 1, modelo de Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). Los resultados mostraron una activación basal de P2X<sub>7</sub> en estos astrocitos transgénicos, lo que sugiere una liberación basal aumentada de ATP, que podría actuar de forma autócrina y parácrina llevando a un fenotipo neurotóxico. De acuerdo con esta hipótesis, la inhibición de P2X<sub>7</sub> en astrocitos fue suficiente para prevenir la muerte de motoneuronas inducida por los astrocitos transgénicos. La activación de P2X<sub>7</sub> también indujo la muerte de motoneuronas directamente mediante un mecanismo apoptótico iniciado por el aumento del calcio y la producción de radicales libres. Estos hallazgos constituyen una contribución original al papel del receptor P2X<sub>7</sub> en la patogénesis y progresión de la muerte de motoneuronas en la ELA.

## **INTRODUCCIÓN**

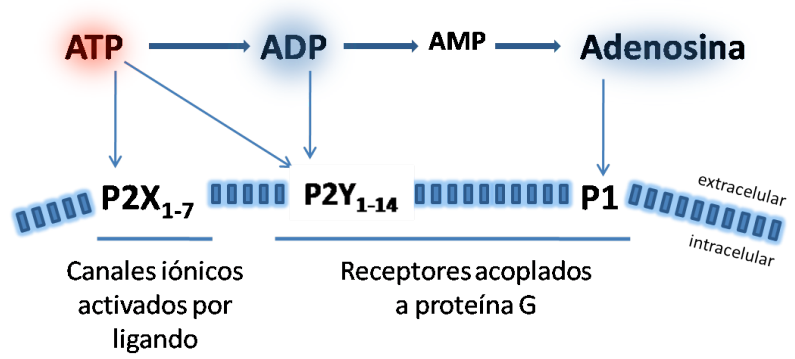
### **El ATP como molécula de señalización y sus receptores**

En 1929 el adenosin-trifostato (ATP), molécula que pertenece a la familia de las purinas y que está formada por una base nitrogenada (adenina), un azúcar (ribosa) y una cadena de tres grupos fosfato unidos a la ribosa, fue descubierta en el músculo (Fiske and Subbarow, 1929). En los años siguientes se hizo evidente que el ATP es la fuente de energía libre usada para sostener la mayoría de las funciones celulares. Hace 50 años fueron realizados los primeros experimentos que mostraron que algunos nervios son capaces de liberar ATP, llevando en 1972 a la proposición de la existencia de “nervios purinérgicos” (Burnstock, 1972; Burnstock et al., 1997). La idea de que las células podrían liberar una biomolécula tan importante para su supervivencia, y que una molécula tan ubicua podría ser un neurotransmisor encontró amplia resistencia en el medio académico y no fue aceptada sino hasta mediados de la década de los 80 (Burnstock, 2006). Actualmente es ampliamente aceptado que el ATP es un neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso (Burnstock, 2007). Siendo una de las moléculas más arcaicas, es sensato suponer que tendría múltiples roles, tanto intracelularmente como extracelularmente. Su pequeño tamaño, alta tasa difusional, baja concentración en el medio extracelular, imposibilidad de cruzar membranas y la alta conservación de las enzimas de su metabolismo y catabolismo a lo largo de la escala biológica convierten al ATP en una molécula ideal para la señalización. Numerosos tipos celulares son capaces de liberar ATP como molécula de señalización, incluyendo células epiteliales, endoteliales, fibroblastos, hepatocitos, osteocitos, queratinocitos, cardiomiocitos, eritrocitos, neutrófilos, monocitos/macrófagos, plaquetas, células cromafínicas, células de los acinos pancreáticos, astrocitos y neuronas (Yegutkin, 2008).

En el sistema nervioso, el concepto de neurotransmisión purinérgica comenzó con el descubrimiento de que el ATP era un neurotransmisor en las sinapsis no-adrenérgicas- no-colinérgicas (Burnstock et al., 1972). Luego fue mostrado que el ATP era un co-transmisor en nervios simpáticos y parasimpáticos. Actualmente, el ATP es reconocido como un co-transmisor en todos los tipos de nervios, tanto en el sistema nervioso central como periférico (Burnstock, 2007). La principal fuente de

ATP en el sistema nervioso sano son las neuronas y los astrocitos, mediante exocitosis de vesículas a lo largo de los axones y en el territorio sináptico. Sin embargo, durante el daño e inflamación en el sistema nervioso el ATP extracelular aumenta debido al incremento en su liberación por parte de neuronas, astrocitos y microglía y células con daño estructural en general (Fields and Burnstock, 2006; Franke et al., 2006)

El ATP, adenosín di-fosfato (ADP) y adenosina son capaces de señalizar a través de dos tipos de receptores ubicados en la membrana plasmática; los receptores P1 y P2. Ambos son expresados en un gran número de tipos celulares en el desarrollo y la vida adulta. Los receptores P2 son activados principalmente por ATP y los P1 responden a la adenosina. Los receptores a ATP tipo P2 se sub-clasifican en dos grandes grupos, los ionotrópicos P2X y metabotrópicos P2Y (Burnstock and Kennedy, 1985; Abbracchio and Burnstock, 1994). En la figura 1 se esquematizan los receptores purinérgicos y los nucleótidos capaces de activarlos.



**Fig. 1. Señalización purinérgica extracelular.**

El ATP es capaz de señalizar a través de los receptores P2X<sub>1-7</sub> y P2Y<sub>1-11</sub> ubicados en la membrana plasmática. Su hidrólisis en el medio extracelular determina la producción de ADP, capaz de señalizar por receptores P2Y específicos, de AMP, para el cual no se conocen receptores, y adenosina, que señaliza por receptores tipo P1.

Actualmente se conocen 8 receptores de tipo P2Y, caracterizados por estar acoplados a proteína G. Algunos de ellos no son sensibles al ATP, activándose en respuesta a ADP o UDP. Actualmente se han generado ratones *knockout* de P2Y<sub>1</sub>,

P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>12</sub> y P2Y<sub>13</sub> (aún no caracterizado). La delección de estos genes no es letal. La ausencia de P2Y<sub>1</sub> o P2Y<sub>12</sub> acarrea desórdenes en la coagulación (Fabre et al., 1999) y el *knockout* de P2Y<sub>1</sub> en *Xenopus laevis* suprime el desarrollo ocular (Masse et al., 2007). La delección de P2Y<sub>2</sub> o P2Y<sub>4</sub> altera el transporte de solutos y la secreción en células epiteliales (Cressman et al., 1999). En el sistema nervioso, la delección de P2Y<sub>12</sub> en la microglía inhibe la quimiotaxis inducida por ATP y anula su rol en la inducción del dolor neuropático (Haynes et al., 2006; Tozaki-Saitoh et al., 2008).

Los receptores de tipo P2X son 7 y constituyen canales iónicos permeables a cationes (Ca<sup>2+</sup>>Na<sup>2+</sup>>K<sup>+</sup>). La unión de 3 moléculas de ATP a la porción extracelular del receptor es necesaria para su activación. Los receptores P2X<sub>1-7</sub> están formados por tres subunidades proteicas y pueden ser homoméricos o heteroméricos (Nicke et al., 1998; Barrera et al., 2005). La alta heterogeneidad en la familia de receptores P2X se refleja en los variados perfiles funcionales y farmacológicos; la cinética de activación, inactivación y desactivación es ampliamente variable.

El receptor P2X<sub>7</sub> presenta propiedades únicas dentro del grupo de los receptores P2X. Es el receptor con menor afinidad por el ATP, activándose a concentraciones mayores de 100 μM. Frente a la prolongada exposición al agonista, P2X<sub>7</sub> posee la sorprendente capacidad de permeabilizar las células (Surprenant et al., 1996). Luego de una respuesta inicial rápida, donde deja entrar preferentemente calcio, cationes más grandes comienzan a ingresar. Luego sucede una conversión de canal a poro acuoso, por donde permean moléculas de hasta 900 dalton (Khakh and North, 2006). Se ha visto que esta permeabilización celular puede llevar a la lisis en variados tipos celulares, probablemente por la pérdida de metabolitos y mensajeros celulares esenciales (Surprenant et al., 1996; Khakh and North, 2006).

El receptor P2X<sub>7</sub> fue clonado inicialmente 12 años atrás a partir de cerebro de rata y un año después a partir de cerebro y macrófagos humanos (Surprenant et al., 1996; Collo et al., 1997; Rassendren et al., 1997). P2X<sub>7</sub> es expresado en células de linaje hematopoyético, incluyendo mastocitos, linfocitos, eritrocitos, macrófagos periféricos y células de Langerhans (Surprenant et al., 1996). En el sistema nervioso el receptor P2X<sub>7</sub> funcional se localiza en la microglía, astrocitos, células de

Schwann, oligodendrocitos y glía de Müller (Fields and Burnstock, 2006). También es expresado por numerosos tipos neuronales a lo largo del sistema nervioso, incluyendo neuronas de corteza, hipocampo, cerebelo y motoneuronas espinales (Anderson and Nedergaard, 2006; Yu et al., 2008).

Los ratones *knockout* para los receptores P2X aportan importante información que ayudan a entender sus variadas funciones. Hasta la fecha se han hecho y caracterizado ratones *knockout* de P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>7</sub>. Ninguno de ellos determina un fenotipo letal sin embargo la deleción homocigota de P2X<sub>1</sub> lleva a la infertilidad masculina (Mulryan et al., 2000). La deleción de P2X<sub>4</sub> lleva a un aumento de la presión arterial (Yamamoto et al., 2006). Los ratones *knockout* para P2X<sub>2</sub> presentan atrofia muscular por incorrecto desarrollo de las sinapsis neuromusculares (Ryten et al., 2007). La disrupción de P2X<sub>2</sub> o P2X<sub>3</sub> causa hiporeflexia vesical y disminución de sensación dolorosa en respuesta a inyección intraplantar de ATP o formalina (Cockayne et al., 2000; Cockayne et al., 2005).

Los estudios realizados en ratones *knockout* para P2X<sub>7</sub> han puesto en evidencia su importante rol en la inflamación y el dolor neuropático, por lo que los inhibidores de este receptor se postulan como los analgésicos de cuarta generación en el futuro próximo (Donnelly-Roberts and Jarvis, 2007). Estos ratones presentan respuestas inflamatorias deprimidas, causado por una disminución o desaparición de la liberación de interleukina 1 - beta (IL-1 $\beta$ ) y otras citoquinas en respuesta a estímulos inflamatorios (Solle et al., 2001), llevando a la activación sólo parcial de células inmunes (Labasi et al., 2002). Por esto, los ratones *knockout* para P2X<sub>7</sub> no desarrollan encefalitis autoinmune experimental y sólo levemente artritis inducida por inyección de anticuerpos anti -colágeno intra-articular (Labasi et al., 2002; Sharp et al., 2008).

Los ratones *knockout* para P2X<sub>7</sub> también presentan una incrementada resorción ósea por lo que actualmente se investiga a este receptor como una estrategia contra la osteoporosis (Ke et al., 2003).

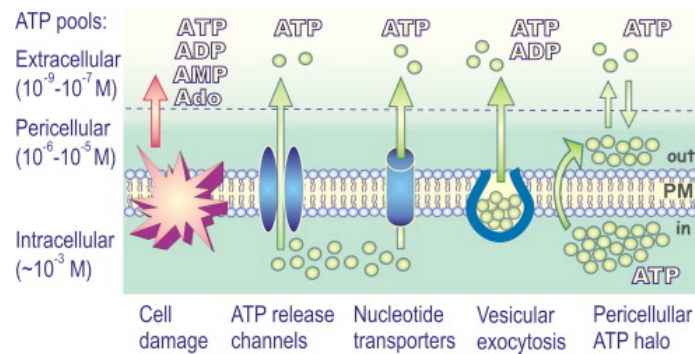


En astrocitos de ratones *knockout* de P2X<sub>7</sub> la propagación de ondas de calcio mediadas por ATP, esenciales para la comunicación de redes astrocitarias, se encuentra profundamente disminuida (Suadicani et al., 2006).

### **Mecanismos de aumento del ATP extracelular**

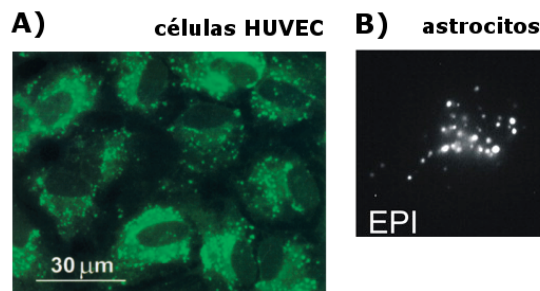
Las dificultades técnicas que acarrea la detección del ATP extracelular, combinada con el escaso conocimiento de los canales y transportadores que mediarían su pasaje al medio extracelular, determina que los mecanismos por los cuales el ATP aumenta extracelularmente sean poco conocidos y ampliamente discutidos. En la figura 3 se esquematizan las principales vías. Es evidente que la lisis celular liberaría grandes cantidades de ATP al medio extracelular, aunque esto no ha podido ser cuantificado. Se ha establecido que el ATP es almacenado por astrocitos y neuronas en vesículas y en lisosomas y es liberado mediante exocitosis dependiente de calcio (Bodin and Burnstock, 2001; Pangrsic et al., 2007; Zhang et al., 2007). En la figura 4 se observa el ATP dentro de vesículas ácidas en células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) y astrocitos. Los astrocitos también pueden liberar ATP al medio extracelular por medio de hemicanales de conexina y panexina y canales aniónicos activados por voltaje (Cotrina et al., 1998; Stout et al., 2002; Kang et al., 2008; Liu et al., 2008). El propio receptor P2X<sub>7</sub>, cuando adquiere propiedades de poro, también permite la salida de ATP (Suadicani et al., 2006). Otro mecanismo, putativo, de liberación de ATP es mediante transporte por miembros de la familia de proteínas ABC (del inglés *ATP-binding cassette*), aunque se plantea que estas proteínas podrían no estar transportando directamente el ATP al medio extracelular sino que gatillando otro mecanismo (Abraham et al., 1993; Franke and Illes, 2006).

El interior celular no es la única fuente de nucleótidos extracelulares sino que existen nuevas evidencias que señalan que el ATP también puede ser sintetizado en el medio extracelular. La enzima ATP sintasa F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub> se encuentra en la superficie de ciertos tipos celulares. Asimismo, existen dinucleótido-fosfoquinasas capaces de fosforilar ADP a partir de UTP, generando ATP y UDP (Franke et al, 2006).



**Fig. 3. Mecanismos de aumento del ATP extracelular.**

Se ha encontrado que el ATP se libera por exocitosis vesicular a partir de células excitables y no excitables. Los transportadores de la familia ABC y canales de panexina, conexina y P2X<sub>7</sub> también mediarían la aparición de ATP en el medio extracelular. Por último, la lisis celular implicaría la fuga del ATP intracelular en grandes cantidades. Modificado de (Yegutkin, 2008).



**Fig. 4. ATP intracelular en vesículas en células HUVEC y astrocitos.**

El marcado con quinacrina, que posee gran afinidad con el ATP y fluoresce en medio ácido, permite visualizar el ATP dentro de vesículas intracelulares en células HUVEC (izquierda) y en un astrocito (derecha). Modificado de (Bodin and Burnstock, 2001; Pangrsic et al., 2007).

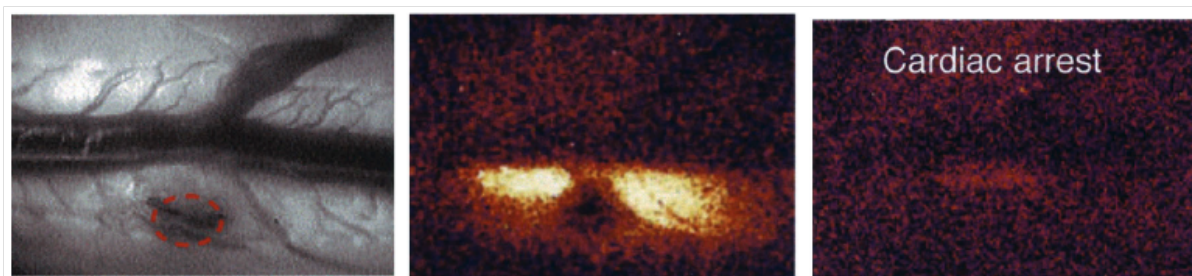
### Aumento del ATP extracelular durante procesos patológicos

La idea de que el incremento en el ATP extracelular era sólo causado por su liberación inespecífica ante la muerte o daño celular ha dado paso al concepto de que también es un proceso altamente regulado y específico tanto en el sistema nervioso sano como durante la patología. La concentración de ATP intracelular se encuentra en el rango milimolar. Su liberación al medio extracelular determina que exista una concentración pericelular en el rango micromolar, y en el espacio

extracelular más lejano a la célula, dónde generalmente es posible detectarlo con las técnicas disponibles, se encuentra en el rango nanomolar. Durante la inflamación e injuria en el sistema nervioso, los niveles de ATP extracelular aumentan, pudiendo llegar a concentraciones capaces de activar el receptor P2X<sub>7</sub> (Burnstock, 2008). Sin embargo, la concentración de ATP extracelular no depende únicamente de la cantidad liberada, sino de un fino balance entre su liberación, recaptación y degradación extracelular.

Se ha encontrado liberación de ATP constitutiva en numerosos tipos celulares; la concentración de ATP hace un pico frente a un cambio de medio y llegando luego a un valor de reposo dictado por el equilibrio entre su liberación e hidrólisis enzimática (Lazarowski et al., 2000). Sin embargo existen estímulos que llevan a importantes aumentos. En cultivo, los astrocitos liberan ATP en respuesta a múltiples estímulos, incluyendo los agonistas de receptores de aminoácidos excitatorios NMDA, AMPA y kainato (Queiroz et al., 1997), estímulos mecánicos (Guthrie et al., 1999), óxido nítrico (NO) (Bal-Price et al., 2002), interferón-gamma (Verderio and Matteoli, 2001) y ATP (Anderson et al., 2004). La mayoría de estos estímulos causan un aumento del calcio intracelular que lleva a la liberación de ATP. El aumento de calcio multifactorial durante la patología podría entonces disparar la salida de altas concentraciones de ATP observada en estos casos.

A pesar de que existe amplia evidencia de que la liberación de ATP al medio extracelular tiene un papel en la patología del sistema nervioso, existen escasas medidas directas de su liberación *in vivo*, debido a las dificultades técnicas que esto acarrea. Se ha visto que en la zona de penumbra de una contusión espinal (Fig.2) (Wang et al., 2004) y de isquemia aguda (Phillis et al., 1993; Melani et al., 2005) existe un gran aumento en el ATP extracelular. También la inflamación sistémica es capaz de provocar el aumento de ATP extracelular en el cerebro; una inyección intravenosa de lipopolisacárido bacteriano (LPS) provoca el aumento de ATP en el hipotálamo, donde es capaz de modular la respuesta febril (Gourine et al., 2007). Por otro lado, durante el fenómeno de *propagación de depresión cortical (cortical spreading depression*, que determina un preconditionamiento que provee de tolerancia a un subsiguiente evento de isquemia) existe liberación de ATP, que media la inducción de mecanismos protectores (Schock et al., 2007).



**Fig.2. ATP extracelular luego de contusión de médula espinal.**

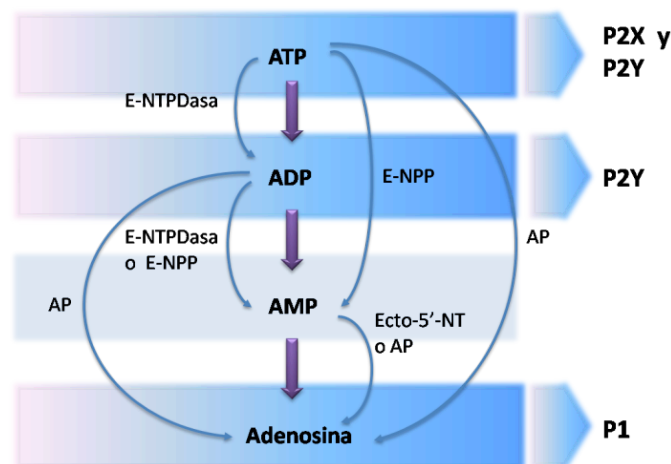
La detección del ATP es posible mediante la cuantificación de la luz emitida por la enzima luciferasa de manera dependiente del ATP. Se observa como 6 horas post-lesión (cuadro izquierdo, círculo rojo) existe un gran incremento en el ATP en el área peri-traumática (cuadro central). La liberación de ATP es un proceso activo mediado por células vitales, ya que la inducción de paro cardíaco en el animal lo detuvo completamente. En la zona directa del trauma no fue encontrada una elevación en el ATP extracelular, probablemente debido a que el registro sólo pudo ser comenzado 10 minutos después de establecida la lesión y la imposibilidad de mantener la producción de ATP en las células necróticas de esta área. Modificado de (Wang et al., 2004).

### **La degradación del ATP en el medio extracelular y la señalización por ADP y adenosina**

La liberación de ATP al medio extracelular es la etapa crítica para el inicio de la señalización a través de receptores tipo P2X, mientras que su degradación por enzimas extracelulares determina la culminación de este proceso y el inicio de la señalización a través de receptores P2Y específicos sensibles a ADP y receptores P1 a adenosina.

La hidrólisis de los nucleótidos es realizada por enzimas insertas en la membrana plasmática que poseen su sitio catalítico hacia el medio extracelular, aunque también se han visto casos donde pueden ser secretadas (Yegutkin, 2008). Las enzimas de la familias de las E-NTPDasas (ectodifosfohidrolasas de nucleósidos trifosfato, que incluye CD39 y CD39L1) y E-NPP (pirofosfatasa de ectonucleótidos o fosfodiesterasa) son capaces de hidrolizar ATP y ADP produciendo ADP, AMP o adenosina. La ecto-5'-NT (ecto-5'-nucleotidasa, también conocida como CD73) y la fosfatasa alcalina (AP) producen adenosina (Zimmermann, 2006; Yegutkin, 2008). En la figura 5 se esquematiza el proceso de degradación de ATP a ADP, AMP y

adenosina y las enzimas extracelulares responsables. En astrocitos de hipocampo, corteza y cerebelo se ha detectado actividad ectonucleotidasa, con importantes diferencias regionales en la tasa de interconversión de los distintos nucleótidos. En los tres tipos de astrocitos la enzima predominantemente expresada es la CD39L1 (Wink et al., 2003; Wink et al., 2006). La expresión de diversas enzimas y la modulación de su actividad podrían dar cuenta de las diferencias regionales encontradas.



**Fig. 5. Enzimas del metabolismo extracelular del ATP.**

El ATP y ADP, capaces de señalizar por los receptores P2, es degradado extracelularmente a AMP por enzimas de la familia de las E-NTPDasas (ectodifosfohidrolasas de nucleósidos trifosfato) o las E-NPP (pirofosfatasa de ectonucleótidos o fosfodiesterasa). La ecto-5'-NT (ecto-5'-nucleotidasa y la AP (fosfatasa alcalina) catalizan la degradación del nucleótido a adenosina, capaz de señalizar por receptores P1.

Las enzimas de degradación extracelular de nucleótidos constituyen un sistema altamente organizado para la regulación de la señalización mediada por nucleótidos, controlando la tasa, cantidad, lugar y momento de degradación nucleotídica y formación de nucleósido. Se han visto cambios en la expresión de algunas de estas enzimas en células tumorales de diferentes orígenes, incluyendo los gliomas. Las células de estos tumores cerebrales presentan disminuida capacidad de degradar ATP extracelularmente. Altos niveles de ATP se acumulan en el medio extracelular, estimulando la proliferación de las células transformadas e induciendo la muerte del

tejido nervioso circundante, permitiendo la expansión del tumor (Morrone et al., 2006).

En el sistema nervioso se ha observado un aumento en la expresión y actividad de ecto-nucleotidasas en episodios de isquemia aguda y luego de una herida cortante cortical (Braun et al., 1998; Nedeljkovic et al., 2006).

La degradación del ATP es la principal fuente de ADP y adenosina extracelulares. El ADP es capaz de señalar a través de los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub> y P2Y<sub>13</sub>. Los efectos de la activación de estos receptores en astrocitos son poco conocidos. Se ha visto que la activación de P2Y<sub>1</sub> es capaz de proteger a los astrocitos de un insulto con peróxido de hidrógeno (Shinozaki et al., 2005). Al mismo tiempo, la infusión de un agonista para estos receptores en el núcleo accumbens provoca reactividad astrocitaria (Franke et al., 2001a).

La importancia de la coordinación entre la liberación y degradación de ATP se evidencia en el proceso regulatorio de la migración microglial. El ATP y el ADP demostraron ser potentes quimiotácticos para la microglía (ver video en CD anexo) (Honda et al., 2001; Davalos et al., 2005; Haynes et al., 2006). Sin embargo, un trabajo reciente ha mostrado que la degradación del ATP por la ectonucleotidasa CD39 y la señalización simultánea a través de receptores P2 y P1 en la microglía es necesaria para inducir la quimiotaxis al sitio de la herida (Farber et al., 2008).

La adenosina señala a través de receptores tipo P1, induciendo una respuesta antiinflamatoria en variados tejidos, por lo que se considera cardioprotectora y neuroprotectora. En casos de isquemia cerebral y epilepsia, la adenosina es capaz de activar astrocitos y microglía de una manera pro-regenerativa y protectora (Dare et al., 2007).

La adenosina puede ser transportada al interior celular a través de transportadores de nucleósidos o degradada a hipoxantina mediante la acción de enzimas extracelulares, terminado así la cascada señalizadora comenzada en el momento de la liberación de ATP (Dare et al., 2007).

## Rol de la señalización purinérgica y de P2X<sub>7</sub> durante la patología en el sistema nervioso

En condiciones patológicas, el ATP liberado al medio extracelular y sus productos de degradación pueden actuar sobre las neuronas, astrocitos, microglía y células inmunes infiltrantes. El receptor P2X<sub>7</sub> se encuentra asociado con la inducción de la respuesta inmune y la muerte de neuronas ante la injuria en el sistema nervioso. El ATP actuando a través de P2X<sub>7</sub> ha demostrado ser directamente tóxico en neuronas en cultivo y en secciones organotípicas de corteza, estriado y cerebelo causando degeneración de neuronas por necrosis y apoptosis (Kong et al., 2005; Franke and Illes, 2006; Jun et al., 2007; Bernardino et al., 2008). El paralelismo entre la muerte inducida por la activación de P2X<sub>7</sub> y por el glutamato, donde en ambos casos el exceso de calcio lleva a la activación de la apoptosis, ha propiciado que el término excitotoxicidad se amplíe para incluir la muerte iniciada por P2X<sub>7</sub> (Matute, 2008).

La expresión del receptor P2X<sub>7</sub> se ha encontrado elevada en numerosas patologías del sistema nervioso, tanto en humanos como en modelos animales. En la tabla 1 se detallan las patologías y los tipos celulares y estructuras donde se ha observado esta reacción.

PATOLOGÍA	TIPO CELULAR o ESTRUCTURA	Referencia
Dolor neuropático	Ganglios de las raíces dorsales espinales y nervios lesionados (humanos)	(Chessell et al., 2005)
Isquemia	Microglía (corteza de rata)	(Collo et al., 1997)
Hipoglicemia	Neuronas granulares cerebelares ( <i>in vitro</i> )	(Cavaliere et al., 2002)
Isquemia	Neuronas (de hipocampo en cultivo organotípico)	(Cavaliere et al., 2004)
Isquemia	Astrocitos, neuronas, microglía (corteza de rata)	(Franke et al., 2004)
Herida corto-punzante	Astrocitos (de núcleo accubens de rata)	(Franke et al., 2001b)
Epilepsia de lóbulo temporal	Neuronas (hipocampo de gerbo)	(Vianna et al., 2002; Kang et al., 2004)
Alzheimer	Rodeando las placas (hipocampo de ratones Tg2576) y en microglía (cerebro humano)	(Parvathenani et al., 2003)
Esclerosis Múltiple	Oligodendrocitos (nervio óptico humano)	(Matute et al., 2007)
ELA	Microglía (médula espinal humana)	(Yiangou et al., 2006)

**Tabla 1. Aumento en la expresión de P2X7 durante la enfermedad en el sistema nervioso y tipos celulares implicados.**

En el sistema nervioso, los astrocitos son capaces de regular las sinapsis, la respuesta inmune, el flujo sanguíneo y el metabolismo energético. Durante las patologías agudas y crónicas los astrocitos se activan, adoptando una morfología caracterizada por la hipertrofia del núcleo y cuerpo celular y la formación de procesos largos y delgados con alta inmunoreactividad para la proteína glial ácida fibrilar (GFAP). También existen cambios en su expresión génica, que llevan a un aumento en la proliferación y la liberación de citoquinas y factores neurotóxicos. En estos casos, los astrocitos son capaces de modular la supervivencia neuronal, mediante el balance entre las actividades protectoras y las tóxicas (Barbeito et al., 2004)

En astrocitos, el ATP induce respuestas muy variadas. La heterogeneidad de receptores, afinidades por el ATP y mecanismos de transducción de señal determina que las distintas concentraciones y los tiempos de exposición a ATP generen respuestas distintas, tanto protectoras como neurotóxicas. Pulsos cortos de ATP (de 30 segundos a 24 horas), han demostrado generar respuestas protectoras en astrocitos, activando numerosas vías que le permitirán no sólo sobrevivir al insulto sino también contribuir a que el tejido circundante recupere la homeostasis. En estas condiciones, el ATP es capaz de proteger contra un insulto de peróxido de hidrógeno o agentes depletantes de glutatión (Shinozaki et al., 2006; Wu et al., 2007). Un pulso corto de ATP es capaz de disminuir la actividad de la enzima iNOS (sintasa de NO inducible) iniciada por citoquinas y de provocar un pronunciado aumento en la liberación de 2-Araquidonoil glicerol, endocanabinoide antiinflamatorio (Lin and Murphy, 1997; Walter et al., 2004).

Por otro lado, existe amplia evidencia de que el ATP es capaz de promover respuestas inflamatorias en los astrocitos. La activación de receptores P2Y lleva a un aumento en la proliferación y a cambios morfológicos propios de la reactividad, caracterizados por la formación de finos procesos altamente inmunoreactivos para GFAP. Este efecto es dependiente de la activación de la quinasa regulada por



activación extracelular (ERK) y el aumento de la ciclooxigenasa – 2 (COX-2) (Brambilla et al., 2002).

En astrocitos, el ATP es capaz de activar débilmente AP-1 y no activa NF- $\kappa$ B. Sin embargo, es capaz de potenciar la activación de estos factores en respuesta a otros estímulos inflamatorios, como la IL-1 $\beta$  (John et al., 2001). También potencia la producción de NO y TNF- $\alpha$  inducida por LPS (Kucher and Neary, 2005). La activación de los receptores P2X<sub>7</sub> lleva a la producción y liberación de la quimioquina MCP-1 (del inglés *monocyte chemoattractant protein-1*), evento temprano de la inflamación que promueve la invasión de monocitos al tejido neural (Panenka et al., 2001).

La microglía es activada por el ATP a través del receptor P2X<sub>7</sub>, que en respuesta aumenta la expresión de receptores P2X, citoquinas, quimioquinas, producción de óxido nítrico (NO) y superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), entre otros (Inoue, 2002; Sperlagh and Illés, 2007). También, como fue mencionado anteriormente y se muestra en el video anexo, el ATP actúa como quimiotáctico para estas células, provocando la migración hacia el foco de ATP (Davalos et al., 2005). En oligodendrocitos, el ATP es capaz de inducir la muerte por excitotoxicidad a través del receptor P2X<sub>7</sub>. La activación sostenida *in vivo* de este receptor causa lesiones propias de la esclerosis múltiple, muerte de oligodendrocitos, demielinización y degeneración axonal (Matute et al., 2007).

Teniendo en cuenta que la activación de receptores purinérgicos por el ATP liberado durante la injuria e inflamación lleva a la muerte excitotóxica de neuronas y oligodendrocitos, activación de microglía y astrocitos, los inhibidores de receptores P2X se postulan como nueva estrategia neuroprotectora. Los principales hallazgos *in vitro* e *in vivo* se esquematizan en la tabla 2. A pesar de que en varias de las patologías mencionadas en esta tabla no existe evidencia directa de liberación de ATP, el hecho de que el antagonismo de receptores P2X sea protector da evidencia indirecta de su activación por un incremento en el ATP extracelular.

Se ha observado una notable reducción en la activación glial y muerte neuronal mediante la inhibición de receptores P2X durante la isquemia, trauma espinal y cerebral e inflamación y degeneración inducida por la inyección de ATP y LPS *in*

*vivo*. También se evidenció una disminución en la cicatriz glial y una mejora en las variables motoras. En modelos de patología aguda la neuroprotección por inhibidores de P2X ha resultado exitosa. En modelos de enfermedades neurodegenerativas donde existe un proceso degenerativo e inflamatorio sostenido en el tiempo aún no se ha investigado el beneficio de esta estrategia. Sin embargo, recientemente Matute y colaboradores mostraron en un modelo experimental de encefalomiелitis autoinmune *in vivo* que la inhibición de P2X<sub>7</sub> durante 20 días lleva a una notable mejoría en los parámetros motores, asociado a niveles sorprendentemente disminuidos de demielinización (Matute et al., 2007).

ANTAGONISTA	CONDICIÓN	Referencia
<b>IN VITRO</b>		
oATP	Isquemia, ATP extracelular	(Cavaliere et al., 2004; Matute et al., 2007)
Basilen Blue / Reactive Blue 2	Deprivación de oxígeno y glucosa, ATP extracelular	(Cavaliere et al., 2001b; Cavaliere et al., 2001a; Amadio et al., 2002; Cavaliere et al., 2002; Cavaliere et al., 2004)
PPADS	Deprivación de oxígeno y glucosa, ATP extracelular	(Cavaliere et al., 2001b; Amadio et al., 2002; Matute et al., 2007)
Suramina	Deprivación de oxígeno y glucosa, ATP extracelular	(Cavaliere et al., 2001b; Amadio et al., 2002; Cavaliere et al., 2003)
Brilliant Blue G	ATP extracelular	(Matute et al., 2007)
<b>IN VIVO</b>		
oATP	Encefalitis autoinmune experimental Trauma de médula espinal Inyección de LPS cerebral	(Wang et al., 2004; Choi et al., 2007; Matute et al., 2007)
Reactive Blue 2	Trauma encefálico	(Ryu et al., 2002)
PPADS	Trauma encefálico Isquemia Trauma de médula espinal	(Franke et al., 1999; Franke et al., 2001b; Krugel et al., 2001; Franke et al., 2004; Wang et al., 2004)
Suramina	Isquemia	(Kharlamov et al., 2002)
Brilliant Blue G	Encefalitis autoinmune experimental	(Matute et al., 2007)

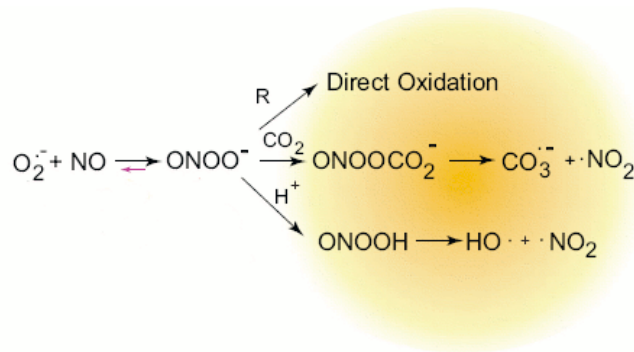
**Tabla 2. Neuroprotección por inhibición de receptores P2 en el sistema nervioso.** Todos los antagonistas mencionados son inespecíficos para receptores P2X con excepción del Brilliant Blue G (azul de coomasie) que posee una afinidad muy alta por P2X<sub>7</sub>.

## **Señalización por P2X<sub>7</sub> y la inducción de estrés oxidativo**

Las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ERONs) son moléculas que poseen un electrón desapareado por lo que son muy reactivas, ya que tienden a robar un electrón a las moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre, por quedar con un electrón desapareado. Se inicia así una cadena de reacciones que sólo se detendrá con una reacción de terminación, donde dos radicales forman un aducto no-radical. En la figura 6 se esquematizan algunas de las reacciones y productos formados en presencia de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y NO (Pacher et al., 2007; Trujillo et al., 2008).

Las células son capaces de producir el radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y el NO, que no son intrínsecamente deletéreos. En macrófagos y neutrófilos son cruciales para luchar contra bacterias y virus. Además, las ERONs son moléculas de señalización implicadas en el funcionamiento fisiológico del organismo. Las ERONs son neutralizadas fácilmente por el organismo, sin embargo cuando la producción de ERONs sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo y nitrativo, apareciendo el daño a bio-moléculas. El término “daño nitrooxidativo” generalmente es utilizado para referir al daño indiscriminado a biomoléculas, sin embargo los blancos de este daño son sorprendentemente específicos. La nitración y oxidación de proteínas, lípidos y ADN es capaz de producir alteraciones en sus funciones normales y ganancias de nuevas (Pacher et al., 2007; Trujillo et al., 2008).

En los astrocitos, posibles fuentes de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> podrían incluir la enzima NADPH oxidasa, la xantina oxidasa y la NOS desacoplada, metales de transición, el retículo endoplásmico a través del sistema citocromo p450 y el núcleo y la mitocondria a través de la cadena de transporte electrónico.



**Fig. 6. Interacción y reacciones del NO, O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>).**

Cuando el NO y O<sub>2</sub><sup>·-</sup> se encuentran presentes simultáneamente en tiempo y espacio pueden reaccionar formando ONOO<sup>-</sup>. A partir del ONOO<sup>-</sup> se pueden formar el radical hidroxilo (HO<sup>·</sup>), dióxido de nitrógeno (<sup>·</sup>NO<sub>2</sub>) y radical carbonato (CO<sub>3</sub><sup>·-</sup>) altamente dañinos para las células. Modificado de (Pacher et al., 2007)

La producción de un exceso de ERONs en respuesta a la activación del receptor P2X<sub>7</sub> se ha establecido en promielocitos, neutrófilos, macrófagos y microglía (Suh et al., 2001; Hewinson and Mackenzie, 2007; Kim et al., 2007; Hewinson et al., 2008). La movilización de calcio hacia el interior celular que provoca la activación de este receptor es el disparador para la activación de enzimas como la NADPH oxidasa, productora de O<sub>2</sub><sup>·-</sup>. En astrocitos se ha visto que el ATP extracelular es capaz de activar la enzima NADPH oxidasa, sin embargo, se desconoce si el receptor P2X<sub>7</sub> se encuentra implicado y cuáles son sus consecuencias (Abramov et al., 2005). En las enfermedades neurodegenerativas, el incremento en el ATP extracelular en respuesta a la inflamación y muerte celular podría llevar a la activación de P2X<sub>7</sub> en neuronas, microglía, astrocitos y células inmunes infiltrantes, incrementando su producción de ERONs, amplificando el daño e inflamación y pudiendo llevar a la muerte celular.

## **Rol de los astrocitos en la Esclerosis Lateral Amiotrófica**

La ELA, también conocida como enfermedad de Lou Gehrig, es una enfermedad neurodegenerativa que lleva a la muerte del paciente entre los 3 a 5 años del diagnóstico inicial. Afecta a 1 cada 20.000 individuos, y generalmente se manifiesta en la sexta década de vida. Se caracteriza por la muerte selectiva de las motoneuronas tanto superiores (corteza motora) como inferiores (tronco cerebral y médula espinal), por lo que el paciente muestra síntomas progresivos de espasticidad, hiperreflexia, debilidad y parálisis muscular. La muerte del individuo en la mayoría de los casos sobreviene por fallos respiratorios

La enfermedad se presenta en su forma *esporádica* (ELAE) o *familiar* (ELAF). En la primera, que comprende el 90% de los casos, no existe un componente genético, sin embargo en la forma familiar el 10% de los pacientes presentan mutaciones en la Cu, Zn Superóxido dismutasa (SOD1) (Rosen et al., 1993).

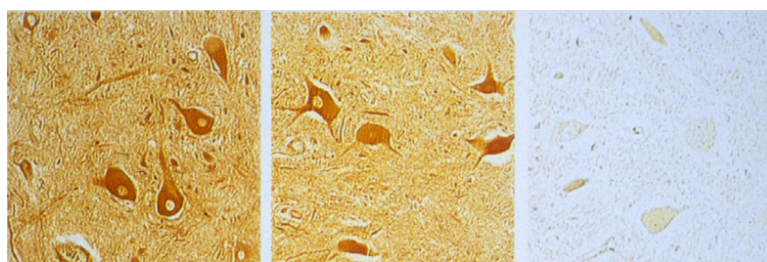
El descubrimiento de mutaciones en la enzima SOD1 y las pronunciadas similitudes patológicas y clínicas entre pacientes con ELAE y ELAF han permitido la generación de animales transgénicos como modelo de la enfermedad (Rosen et al., 1993; Gurney et al., 1994). Nuestro laboratorio cuenta con colonias de ratas y ratones que sobre-expresan la SOD1 humana y presentan sustituida la glicina en la posición 93 por alanina (SOD1<sup>G93A</sup>). Estos murinos desarrollan una enfermedad de impactante similitud a la ELAF. En este modelo la enfermedad se inicia alrededor de los tres meses de vida y la muerte ocurre aproximadamente un mes más tarde.

En la ELA se observa una pronunciada gliosis reactiva rodeando a las motoneuronas en degeneración, tanto en la corteza como en la médula espinal. El nivel de activación astrocitaria se correlaciona con el grado de degeneración. Al ser la activación astrocitaria un rasgo común de variadas condiciones patológicas como la isquemia cerebral, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la demencia frontotemporal y la enfermedad de Huntington, fue considerada tradicionalmente como una respuesta inespecífica al daño neural. Sin embargo,

actualmente se reconoce que los astrocitos activados cumplen un papel activo protagónico en la patogénesis.

La etiología de la ELA es desconocida. Sin embargo se plantean numerosas hipótesis patogénicas que involucran al estrés oxidativo, excitotoxicidad, disfunción mitocondrial, anormalidades del citoesqueleto, mal plegamiento y agregación de proteínas, autoinmunidad, alteración del soporte trófico y exposición a tóxicos ambientales (Rowland, 2001; Bruijn et al., 2004).

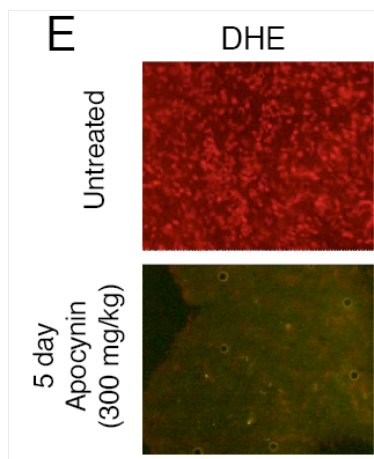
El descubrimiento de las mutaciones en la SOD1 inmediatamente implicó al estrés oxidativo en la etiología de la ELA. La SOD1 es una enzima antioxidante que convierte el radical  $O_2^{\cdot-}$  en peróxido de hidrógeno. Debido a que el *knockout* completo del gen que codifica para la SOD1 no produce una enfermedad de las motoneuronas, se postula que su toxicidad no se debería a la pérdida de actividad dismutasa sino a la ganancia de una nueva actividad tóxica (Beckman et al., 1993; Reaume et al., 1996). La SOD1 mutada podría catalizar reacciones de manera aberrante, resultando en la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs). De acuerdo con esto, se observa una elevada inmunorreactividad para nitrotirosina en las médulas espinales de modelos animales y pacientes de ELA (Abe et al., 1995; Beal et al., 1997; Ferrante et al., 1997). En la figura 7 se observa el aumento de inmunorreactividad para nitrotirosina en motoneuronas espinales y el neuropilo en ratones SOD1<sup>G93A</sup>.



**Fig. 7. Inmunorreactividad para nitrotirosina en hasta ventral de médula espinal.**

Nótese el dramático incremento de inmunorreactividad en las motoneuronas y neuropilo de ratones transgénicos (derecha y centro) en comparación con no transgénicos (izquierda) (Cortesía Liliana Viera. Datos no publicados). La nitración de tirosinas es catalizada por el peroxinitrito y es considerada un biomarcador de su presencia. Gentileza Liliana Viera.

Recientemente se ha visto que la SOD1 es capaz de inactivar la enzima NADPH oxidasa cuando el ambiente celular es oxidante, sin embargo la SOD1 mutada pierde su capacidad de inactivar esta enzima de manera que continúa produciendo  $O_2^{\cdot-}$  (Harrasz et al., 2008). En la figura 8 se observa la médula espinal de ratones SOD1<sup>G93A</sup> control y en presencia de apocinina, un inhibidor de la NADPH oxidasa. También se propone que su toxicidad también puede ser causada por su agregación, secreción al medio extracelular o interacción aberrante con otras proteínas (Bruijn et al., 2004; Polymenidou and Cleveland, 2008).



**Fig. 8. Producción de superóxido en médula espinal de ratón SOD1<sup>G93A</sup>.** Con la sonda Dihidroetidio (DHE) es posible observar detectar el superóxido en un corte de médula espinal de ratón SOD1<sup>G93A</sup>. Se observa una intensa fluorescencia (untreated, arriba), que desaparece en ratones inyectados con apocinina (apocynin, abajo), inhibidor de la enzima NADPH oxidasa. Modificado de (Harrasz et al., 2008).

En los últimos años se ha acumulado amplia evidencia que argumenta a favor de un rol de las células no neuronales en la ELA, principalmente mediante la creación de ratones transgénicos que expresan la SOD1 mutada selectivamente en los distintos tipos celulares. Los ratones que expresan la SOD1 mutada únicamente en motoneuronas o en astrocitos no desarrollan la enfermedad (Gong et al., 2000; Pramatarova et al., 2001; Lino et al., 2002; Yamanaka et al., 2008a), aunque la expresión de SOD1 mutada pan-neuronal es suficiente para que se desarrolle enfermedad (Jaarsma et al., 2008). La expresión de SOD1 mutada en las motoneuronas tendría un rol disparador de la enfermedad, ya que un decremento específico en su expresión en motoneuronas es capaz de postergar el inicio pero no enlentecer el progreso de la patología (Miller et al., 2005; Ralph et al., 2005).

Los astrocitos y la microglía activada en respuesta a la degeneración de neuronas tendrían un rol determinante de la progresión de la enfermedad, amplificando y profundizando el daño. Una reducción en los niveles de expresión de SOD1 mutada en microglía o en astrocitos es capaz de enlentecer la progresión de la enfermedad, sin embargo el inicio permanece incambiado (Boillee et al., 2006; Yamanaka et al., 2008b).

Con el fin de evaluar la respuesta de los astrocitos frente a diversos estímulos y su consecuencia en la interacción con motoneuronas espinales, nuestro grupo de investigación ha establecido modelos de co-cultivos de astrocitos y motoneuronas. La previa activación de los astrocitos con lipopolisacárido bacteriano, FGF-1 (factor de crecimiento fibroblástico-1) o peroxinitrito determina una reducción en el número de motoneuronas sobrevivientes. (Cassina et al., 2002; Pehar et al., 2004; Cassina et al., 2005). A su vez, nuestro laboratorio ha mostrado que los astrocitos SOD1<sup>G93A</sup> no estimulados presentan un fenotipo que determina la muerte de motoneuronas (Vargas et al., 2006). La producción de uno o más factores difusibles aún no caracterizados serían los responsables (Di Giorgio et al., 2007; Nagai et al., 2007). La mutación en la SOD1 determinaría que los astrocitos adquirieran un fenotipo inflamatorio. En la ELA, estas actividades astrocitarias podrían ejercer un efecto de selección sobre las motoneuronas dañadas, llevando a las más vulnerables a la apoptosis. La reducción de la expresión de transportadores de glutamato, incremento en su producción de radicales libres y citoquinas pro-inflamatorias, la depleción de antioxidantes y disfunción mitocondrial se postulan como algunos de los mecanismos por los cuales los astrocitos podrían modular la supervivencia de las motoneuronas en la ELA (Howland et al., 2002; Barbeito et al., 2004; Vargas et al., 2006; Cassina et al., 2008; Yamanaka et al., 2008b).

La interacción astrocito - microglía también sería determinante en la progresión de la enfermedad. Los astrocitos serían los primeros en censar el daño, activándose y expandiendo la inflamación a microglía y células inmunes infiltrantes. Esto se evidencia por la disminución de expresión de la SOD1 mutada en astrocitos, que no modifica el inicio de la muerte de motoneuronas o síntomas de la enfermedad, pero es capaz de postergar la activación de la microglía (Yamanaka et al., 2008b).



Se desconoce el rol de la señalización purinérgica en la ELA. Se ha encontrado que el receptor P2X<sub>4</sub> presenta incrementada inmunorreactividad en motoneuronas en degeneración de animales SOD1<sup>G93A</sup> (Casanovas et al., 2008). A su vez, la activación de este receptor mediante un agonista farmacológico es capaz de extender su supervivencia. Sin embargo, el compuesto fue administrado vía oral y no es capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica, por lo que sus efectos protectores se explicarían por su acción en el músculo o sistema inmune (Schinkel et al., 1996; Andries et al., 2007).

## **HIPÓTESIS**

Los niveles de ATP extracelular pueden aumentar notablemente durante la inflamación, injuria y muerte celular en el sistema nervioso. Durante la isquemia y trauma de médula espinal, donde existe activación de astrocitos y microglía y muerte de neuronas la inhibición de los receptores a ATP resulta ser neuroprotectora. A su vez, la activación de P2X<sub>7</sub> es capaz de inducir la producción de ERONs en variados tipos celulares. El presente trabajo se basa en la hipótesis de que el ATP, señalizando a través del receptor P2X<sub>7</sub>, podría ser uno de los factores de señalización extracelular que amplifica y extiende la respuesta inflamatoria glial e induce estrés oxidativo, derivando en el daño a motoneuronas en enfermedades neurodegenerativas como la ELA.

Las siguientes predicciones surgen de la hipótesis planteada:

- (1) En astrocitos activados y particularmente en los portadores de la mutación SOD1<sup>G93A</sup> ligada a la ELA el receptor P2X<sub>7</sub> podría encontrarse activado por el incremento del ATP extracelular.
- (2) Esto provocaría que los astrocitos modificaran su fenotipo, activando vías de respuesta al estrés y daño celular y aumentando su producción de radicales libres, modulando así la supervivencia de las motoneuronas
- (3) El ATP podría actuar sobre motoneuronas directamente, induciendo su muerte.
- (4) La inhibición de receptores purinérgicos podría constituir una estrategia neuroprotectora, actuando tanto sobre astrocitos como motoneuronas, constituyendo un blanco para la intervención terapéutica en casos de ELA.

## **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general consiste en contribuir al conocimiento de la señalización extracelular por ATP en dos tipos de células nerviosas espinales, los astrocitos y las motoneuronas. Se apunta a determinar los efectos de las alteraciones en la señalización extracelular por ATP y P2X<sub>7</sub> para la sobrevivencia de motoneuronas espinales y profundizar en los mecanismos involucrados. Los hallazgos de este trabajo constituirán un aporte a la comprensión del rol del ATP durante la patología

en el sistema nervioso, con especial importancia para enfermedades donde existe muerte de motoneuronas como la ELA.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- I. Investigar la capacidad del ATP extracelular de inducir en astrocitos espinales activación y un fenotipo neurotóxico para motoneuronas. Determinar la dependencia de la dosis y el tiempo en la aparición de los efectos del ATP y estudiar el rol del receptor P2X<sub>7</sub>. Evaluar el efecto de los productos de degradación del ATP sobre el fenotipo astrocitario.
- II. Estudiar los efectos de la activación de P2X<sub>7</sub> por un agonista farmacológico en astrocitos espinales en cultivo que determinan su neurotoxicidad para motoneuronas. En particular se investigará la inducción de estrés nitro-oxidativo.
- III. Evaluar el efecto de la inhibición de P2X<sub>7</sub> en astrocitos SOD1<sup>G93A</sup> como estrategia para modular su comportamiento neurotóxico.
- IV. Evaluar los efectos del ATP en motoneuronas puras en cultivo. Determinar los posibles mecanismos de muerte involucrados y las vías que causan su disparo.

## **ABORDAJE METODOLÓGICO**

- 1) Para el abordaje del primer objetivo, cultivos primarios de astrocitos espinales fueron pre-tratados con ATP y luego se establecieron co-cultivos con motoneuronas mediante el sembrado de motoneuronas sobre la monocapa. La supervivencia neuronal es indicativa del fenotipo astrocitario. La participación del receptor P2X<sub>7</sub> se estudió mediante un abordaje farmacológico. La aparición de cambios morfológicos se evaluó mediante inmunotinción para GFAP.

- 2) Para estudiar la producción de ERO y ERN en respuesta a la activación de P2X<sub>7</sub>, los astrocitos se expusieron a un agonista de este receptor y luego se cuantificó la fluorescencia de las sondas DHE y Amplex UltraRed, capaces de censar los niveles de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectivamente. Para estudiar si estas vías se encuentran implicadas en el fenotipo neurotóxico astrocitario se trataron astrocitos con un agonista de P2X<sub>7</sub> y fármacos capaces de prevenir el estrés oxidativo y se establecieron co-cultivos con motoneuronas.
- 3) Para este objetivo se trataron monocapas de astrocitos SOD1<sup>G93A</sup> con inhibidores de receptores P2X y con apirasa, enzima que hidroliza el ATP. Luego se establecieron co-cultivos con motoneuronas no transgénicas. Además se ensayó el efecto de esta estrategia para la modulación de la proliferación de los astrocitos SOD1<sup>G93A</sup>.
- 4) Se evaluó la supervivencia de motoneuronas puras en cultivo en respuesta a la estimulación del receptor P2X<sub>7</sub> con un agonista farmacológico. Se estudiaron las vías que llevan a esta respuesta mediante un enfoque farmacológico, evaluando la supervivencia neuronal en presencia de inhibidores y detoxificadores. A su vez se estudiaron los cambios fenotípicos mediante inmunofluorescencia.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Protocolos de experimentación animal**

Los protocolos de experimentación utilizados para el mantenimiento de las colonias de ratas y para el sacrificio de ratas adultas (para el cultivo de motoneuronas) y de neonatos (para el cultivo de astrocitos) fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal.

### **Materiales**

Las ratas que sobreexpresan la enzima SOD1 humana con la mutación G93A fueron compradas a Taconic y mantenidas en URBE (Facultad de Medicina, UDELAR). Los neonatos no transgénicos de rata fueron proporcionados por URBE. Los medios de cultivo, suplementos y sueros en Gibco (Invitrogen) y el material plástico a NUNC y Corning. El dihidroetidio, Amplex UltraRed, kit para marcación de citocromo C y los anticuerpos secundarios a Invitrogen. El anticuerpo para iNOS a Upstate (Millipore), el de caspasa 3 clivada a Cell Signaling y el de P2X<sub>7</sub> a Alomone. Todos los demás reactivos fueron comprados a Sigma.

### **Establecimiento de cultivos altamente enriquecidos en astrocitos espinales**

Se realizaron cultivos de astrocitos de ratas no transgénicas y SOD1<sup>G93A</sup>. El genotipado de las ratas SOD1<sup>G93A</sup> neonatas por PCR, a partir de ADN extraído de una biopsia de cola, utilizando primers contra la SOD1 humana.

Los cultivos primarios de astrocitos se realizaron de acuerdo al protocolo de Saneto y De Vellis (1987), con modificaciones menores. Brevemente, se extrajo la columna vertebral de ratas de 1 – 2 días de vida y se aisló la médula espinal, removiendo cuidadosamente las meninges. El tejido fue cortado en fragmentos que se incubaron con tripsina al 0,25% en PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,92 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g/L, NaCl 8,0 g/L, KCl 0,2 g/L) a 37°C. Luego de 25 minutos la digestión se detuvo agregando DMEM completo (suplementado con penicilina (100 U/L), estreptomina (100 µg/mL), 10%

suero fetal bovino (SFB) y Hepes (15 mM)). Se adicionó ADNasa (50 µg/mL) y se disgregó mecánicamente utilizando una micropipeta de 1000 µL. La suspensión celular obtenida se plaqueó a una densidad de  $1,5 \times 10^6$  células por botella de cultivo de 25cm<sup>2</sup>.

Luego de una semana los astrocitos forman una monocapa confluyente, de la cual se remueven los otros tipos celulares mediante su agitación (250 rpm, 48 horas) y posteriormente su incubación con citosina arabinósido (10µM, 48 horas). Los cultivos purificados de astrocitos se amplificaron mediante su tripsinización y plaqueo a menor densidad en placas de 24 o 96 pocillos. Al cabo de una semana los astrocitos expresan GFAP y forman monocapas confluentes como se observa en la figura 8A y B y se encuentran listos para ser tratados.

### **Obtención de cultivos purificados de motoneuronas.**

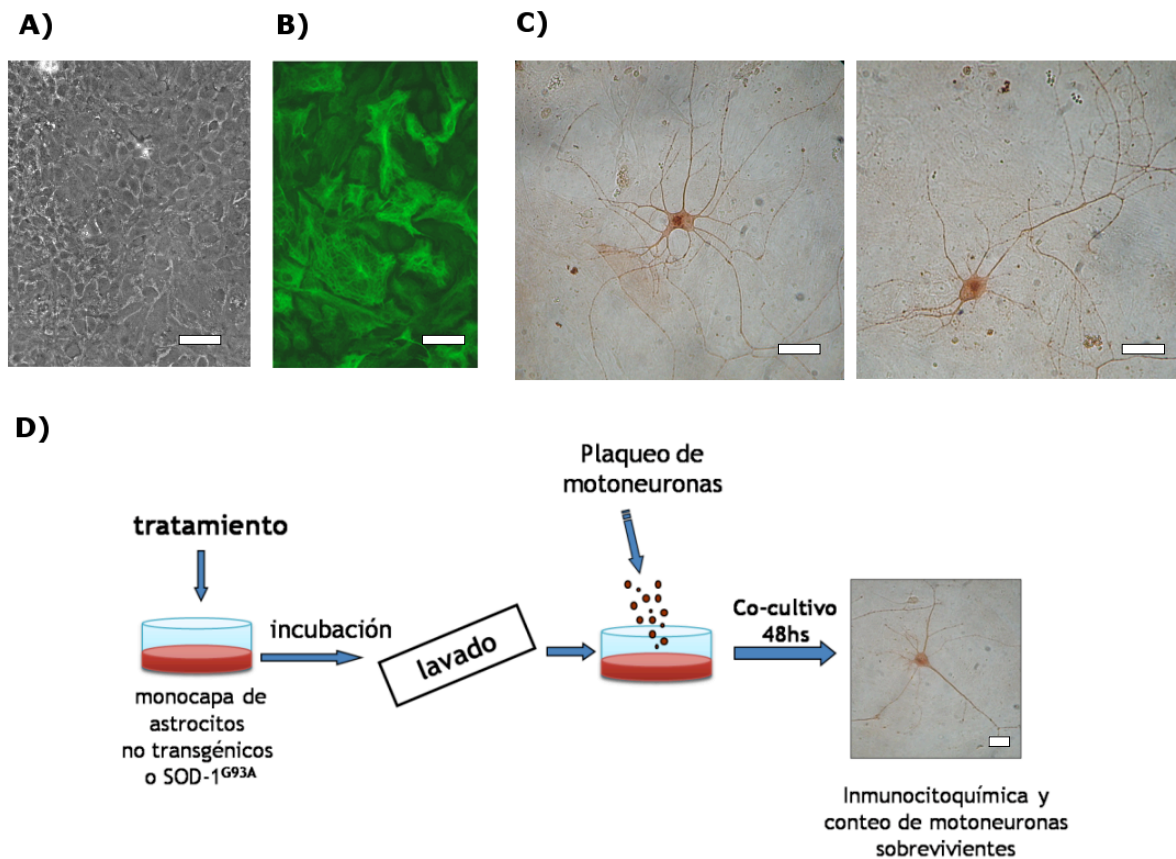
Los cultivos enriquecidos en motoneuronas espinales se obtuvieron a partir de embriones de ratas Wistar de 15 días mediante una combinación de centrifugación diferencial e inmunoselección de acuerdo al procedimiento descrito por Henderson y col (1995). Brevemente, las médulas fueron disecadas y aisladas de meninges, se aisló la región ventral de la médula separándola del asta dorsal con bisturí. Las regiones ventrales fueron fraccionadas y tripsinizadas en PBS en presencia de 0,02% tripsina durante 12 minutos a 37°C. El proceso de tripsinización se detuvo por el agregado de medio de cultivo L15 completo (L15 de Leibovitz suplementado con: bicarbonato de sodio (22mM), glucosa (20mM), insulina (5 µg/mL), progesterona (21nM), penicilina (100 U/mL), estreptomina (100 µg/mL y suero de caballo (2%) suplementado con 0,1% seroalbúmina bovina (BSA)). Seguidamente se procedió a la disociación mecánica del tejido en presencia de 0,02 mg/mL de DNAasa-1 en medio L15 completo, las células se separaron del detrito por centrifugación sobre un colchón de BSA (4%, 300g, 10 minutos). El precipitado celular fue resuspendido y sometido a una centrifugación diferencial sobre un colchón de optiprep (1:10 en L15, 800g, 15 minutos). Este paso enriquece en motoneuronas la fracción en la interfase medio – optiprep (>70%). Posteriormente se realizó un paso adicional de purificación mediante inmunoadfinidad empleando anticuerpo anti-p75NTR (sobrenadante de hibridoma MC-192), en donde la suspensión celular se incubó 1

hora en placa de bacteriología pretratadas con este anticuerpo. Las células no adherentes fueron desechadas y las motoneuronas adheridas se eluyeron por lavado con sobrenadante de hibridoma MC-192. Finalmente las motoneuronas fueron colectadas por centrifugación en un colchón de BSA. Se plaquearon a una densidad de 300 células/cm<sup>2</sup> sobre monocapas de astrocitos confluentes en medio L15 completo. En caso de cultivos puros de motoneuronas se plaquearon en placas de 4 pocillos pretratados con poliornitina y laminina y mantenidas en medio Neurobasal suplementado con B27 (2%), glutamina (0,5mM), L-glutamato (25 µM), β-mercaptoetanol (25 µM), suero de caballo (2%).

### **Tratamiento de los cultivos**

**Astrocitos.** Monocapas confluentes de astrocitos fueron lavadas con PBS y transferidos a DMEM 2% SFB. Luego se adicionaron los tratamientos correspondientes. En caso de utilizarse inhibidores, se agregaron 1 hora antes que los demás tratamientos. Las soluciones stock se realizaron en PBS o en el menor volumen posible de agua o dimetilsulfóxido de manera que el volumen final no superó el 1%. En la Figura 8D se detalla el esquema de tratamiento y establecimiento de co-cultivos.

**Motoneuronas puras.** Éstas fueron tratadas con GDNF (1 ng/mL) y los fármacos correspondientes luego de 2 horas de plaqueadas. Los inhibidores fueron incubados 1 hora antes que los fármacos. Para el estudio de la toxicidad del medio condicionado, las monocapas de astrocitos fueron incubadas con los tratamientos correspondientes, posteriormente fueron lavadas y transferidas a medio neurobasal suplementado por 24 horas. Este medio se centrifugó (500g, 4°C, 10 minutos) y el sobrenadante fue guardado a -80°C hasta el momento de su adicionamiento a las motoneuronas puras.



**Fig. 8. Tratamiento de astroцитos y establecimiento de co-cultivos.**

(A) Monocapa de astroцитos confluentes observada por microscopía de contraste de fases (aumento 10X. La barra corresponde a 15  $\mu\text{m}$ ). Se observa su morfología poligonal. (B) Inmunofluorescencia para GFAP de una monocapa de astroцитos confluyente (20X) (C) Co-cultivos de astroцитos y motoneuronas luego de inmunocitoquímica contra el receptor p75. Las motoneuronas adquieren un fenotipo altamente diferenciado, proyectando numerosas neuritas y un único axón. (D) El estudio del impacto del fenotipo astrocitario sobre la supervivencia de motoneuronas se estudió mediante co-cultivos con astroцитos provenientes de animales no transgénicos o SOD1<sup>G93A</sup>. Los tratamientos se realizaron previo al co-cultivo, y fueron lavados extensamente para evitar que produzca un efecto directo sobre las motoneuronas. Luego se sembró una suspensión de motoneuronas espinales recién purificadas y se mantuvieron en co-cultivo por 48 horas, al cabo de las cuales se realizó una inmunotinción para el receptor p75 y se contaron las motoneuronas con neuritas de más de 4 diámetros celulares de largo. Las barras corresponden a 30  $\mu\text{m}$ .

### Determinación del número de motoneuronas viables

**Cultivos puros.** Se realizó por conteo directo de las células que presentaron neuritas de un largo mayor a 4 somas, en un área prefijada de 0,9  $\text{cm}^2$  de cada



pocillo. Los resultados se expresan como el porcentaje de las células sin tratar en presencia de GDNF (media  $\pm$  error estándar).

**Co-cultivos.** Para poder visualizar las motoneuronas sobre la monocapa astrocitaria, los co-cultivos fueron sometidos a inmunohistoquímica para p75<sup>NTR</sup>. Para esto fueron incubados por 20 minutos a 37°C con sobrenadante del hibridoma MC-192 (1:2 en el medio de cultivo preexistente). Luego fueron lavados 1 vez con PBS y fijados con paraformaldehído (PFA) 4% y glutaraldehído 0,1% en PBS durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente fueron incubados por 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo (BSA 2%, Tritón X-100 0,1% en PBS). Luego se incubaron toda la noche a 4°C con el sobrenadante de hibridoma MC-192 diluído 1:2 en solución de bloqueo. Luego de lavar con PBS los cultivos fueron incubados por 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo IgG anti-ratón biotinilado (1:125) en solución de bloqueo, y luego con estreptavidina conjugada a peroxidasa (1:175 en Tris-HCl pH 7,4). El revelado se realizó utilizando como sustrato una solución de diaminobencidina – peróxido de hidrógeno. La supervivencia neuronal se determinó por conteo directo de todas las células p75<sup>NTR</sup>- positivas que presentaban neuritas intactas de dimensiones mayores a 4 diámetros celulares. En la figura 8C se observan motoneuronas típicas luego de 2 días de co-cultivo con inmunotinción para p75<sup>NTR</sup>. El conteo se realizó en un área de 0,9cm<sup>2</sup> a lo largo de dos diagonales de un pocillo de placa de 24 pocillos, encontrándose un promedio de 40 motoneuronas.

### **Inmunofluorescencia**

**Astroцитos.** Los astroцитos tratados fueron fijados con PFA 4% en PBS por 20 minutos a 4°C. A continuación se incubaron con PBS 0.1% Tritón X-100 por 10 minutos y con solución de bloqueo suplementada con suero de cabra al 10% por 1 hora. Los anticuerpos primarios contra GFAP (1:300), contra iNOS (1:100) o P2X<sub>7</sub> (1:100) se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente. Luego se lavó y los cultivos se incubaron con un anticuerpo cabra anti conejo acoplado a Cy3 (1:2000). La tinción de los núcleos se realizó con DAPI (1µg/mL, 5 minutos). Las imágenes se adquirieron en un microscopio de epifluorescencia Olympus IX81.

**Motoneuronas.** Se fijaron con PFA 4% y glutaraldehído 0,1% por 20 minutos a 4°C. La inmunotinción de motoneuronas se realizó de la misma manera que los

astrocitos. Se utilizaron anticuerpos contra nitrotirosina (1:500), caspasa – 3 clivada (1:100) y citocromo c (1:100).

### **Determinación de la proliferación celular**

Para cuantificar la proliferación las monocapas confluentes de astrocitos fueron tratadas por 24 horas con los fármacos de interés, al cabo de las cuales se adicionó Bromodeoxiuridina (BrdU) 10µg/ml y se incubaron por 24 horas más. Las células que incorporaron BrdU se detectaron por inmunofluorescencia. Para ello las monocapas fueron lavadas con PBS y fijadas con PFA 4% por 20 minutos a 4°C. Posteriormente fueron lavadas y se incubaron con metanol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% en proporción 5:1 durante 15 minutos. A continuación se lavaron nuevamente y se sometieron a HCl 1N por 30 minutos a temperatura ambiente con el fin de desnaturalizar los ácidos nucleicos. Se neutralizó lavando con tampón borato y a continuación se incubó con solución suplementada con suero de cabra al 10% de bloqueo por 60 minutos. Se incubó con anticuerpo monoclonal contra BrdU conjugado a Alexa Fluor 594 (1:200) toda la noche a 4°C. El anticuerpo se lavó y se adicionó la tinción nuclear DAPI (1µg/mL, 5 minutos). Las imágenes se adquirieron en un microscopio de epifluorescencia Olympus IX81. Se fotografiaron los núcleos en 6 campos aleatorios por pocillo en microscopio de epifluorescencia y se calculó el porcentaje de núcleos positivos para BrdU en función del total en cada campo.

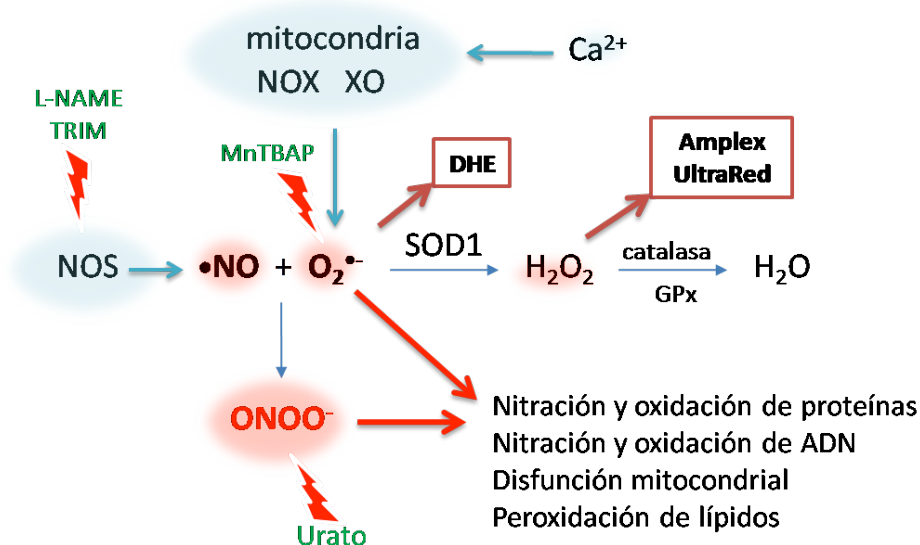
### **Detección de ERON**

La producción de ERON se realizó con las sondas fluorescentes DHE y Amplex UltraRed. Estas sondas detectan O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> correspondientemente. En la figura 9 se esquematizan las fuentes de estos oxidantes, su reactividad, vías de detoxificación y los fármacos relevantes para el análisis realizado.

**Detección de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.** Monocapas confluentes de astrocitos plaqueadas en placas mattek de 35mm fueron tratadas en medio DMEM 2% SFB 15mM HEPES sin rojo fenol por el tiempo correspondiente. Al final del tratamiento se agregó la sonda dihidroetidio (DHE) a una concentración final de 2 µM y la placa se montó inmediatamente en la platina de un microscopio confocal Zeiss LSM510 META

acoplado a un microscopio motorizado Axiovert 200. Se adquirió la imagen de un campo cada 15 segundos por 10 minutos con un objetivo 25X (aceite). Se excitó con un laser cercano al UV a 405 nM y la fluorescencia emitida (>610) fue cuantificada por el software de adquisición LSM (versión 3.2). La fluorescencia se expresó como el incremento con respecto a la fluorescencia inicial de cada condición.

**Determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Monocapas confluentes de astrocitos fueron tratadas en medio DMEM 2% SFB 15mM Hepes sin rojo fenol por el tiempo correspondiente. Al final del tratamiento se agregó en cada pocillo la enzima peroxidasa de rábano (0,1 U/mL) y la sonda Amplex UltraRed (2 μM). Se incubó por 45 minutos a 37°C y se midió la fluorescencia en un lector de placas Spectramax Gemini, excitando a 540 nM (con corte a 550 nM) y registrando la emisión a 620 nM. Todos los fármacos utilizados se testearon para detectar inhibición de la actividad enzimática de la peroxidasa de rábano, que podría generar falsos resultados, no encontrándose en ningún caso.



**Fig. 9. Principales vías de producción, reactividad y daño por ERONs y sondas fluorescentes que permiten su detección.**

La mitocondria, NADPH oxidasas (NOX) y Xantina Oxidasa (XO) son las principales fuentes de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en el sistema nervioso. La sonda DHE permite su detección mediante microscopía de fluorescencia. El O<sub>2</sub><sup>•-</sup> es detoxificado por la enzima SOD1, que produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que es degradado principalmente por la Glutación peroxidasa (GPx) y la catalasa. La cuantificación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue posible con la sonda Amplex UltraRed. De existir •NO el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> reaccionará primero con él, formando peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>).

## **Análisis de datos**

Todos los ensayos se realizaron por duplicado y se repitieron independientemente 3 veces como mínimo. El análisis estadístico se realizó con el programa SigmaStat versión 3.11 (Jandel Scientific, 2004) y los gráficos con el programa SigmaPlot 9.0 (Jandel Scientific, 2004). Se realizó el test paramétrico de análisis de varianzas de una vía ANOVA, cuando los datos ajustaron a una distribución normal, evaluada mediante el test de Kolmogorov - Sminrov. En el caso en que los datos no presentaron distribución normal se utilizó el test Kruskal-Wallis ANOVA de rangos. El ANOVA fue seguido por un test de Student – Newman – Keuls. Se consideraron significativos las diferencias cuando  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **I) Activación y neurotoxicidad retardada en astrocitos por señalización por ATP a través de P2X<sub>7</sub>.**

Los astrocitos en cultivo en monocapas confluentes adoptan una morfología aplanada, ovoide a poligonal como se muestra en la figura 1A. El tratamiento de los astrocitos con ATP no causó cambios morfológicos evidentes, evaluado por inspección en microscopio de contraste de fases (no mostrado). Sin embargo, inmunotinción para GFAP reveló que el tratamiento de astrocitos con ATP mediante su agregado al medio de cultivo (1  $\mu$ M, 3 tratamientos separados por 48 horas, total 5 días) causó el rearreglo de los filamentos de GFAP, resultando en la aparición de ramificaciones largas y finas con intensa inmunorreactividad para esta proteína (Fig. 10). Estos cambios son característicos de los astrocitos activados, que aparecen rodeando a las motoneuronas en degeneración en la ELA.

El tratamiento con ATP no causó muerte de astrocitos, evaluado por tinción con yoduro de propidio, capaz de incorporarse a las células cuya membrana plasmática se encuentra dañada. En monocapas de astrocitos control y tratados con ATP el porcentaje de núcleos marcados con yoduro de propidio fue menor al 1%.

En condiciones control, los astrocitos son capaces de proveer soporte trófico a motoneuronas, permitiendo su supervivencia y diferenciación en co-cultivo sin el agregado de factores tróficos exógenos. La activación astrocitaria puede causar cambios en su fenotipo bioquímico que pueden determinar un decremento en su actividad trófica y/o incremento en actividades tóxicas. Este fenotipo se evidencia por una disminución o aumento en el número de motoneuronas sobrevivientes. El protocolo de tratamiento y establecimiento de co-cultivos se detalla en la figura 8D.

Para estudiar los efectos de la señalización purinérgica sobre el fenotipo astrocitario se establecieron co-cultivos con astrocitos pre-tratados con ATP (100, 1 o 0,1  $\mu$ M) durante 1, 3 o 5 días. El medio de cultivo fue cambiado cada 2 días, agregándose

ATP cada vez. Dado que en el medio de cultivo el ATP tiene una vida media de minutos (Shinozaki et al., 2005), el tratamiento de 6 días consistió en 3 pulsos separados por 48 horas cada uno, el de 3 días por dos pulsos y el de 1 día por un único pulso. Este protocolo de tratamiento se esquematiza en la figura 11A. Antes de establecer el co-cultivo las monocapas fueron lavadas extensivamente para eliminar rastros de ATP o sus productos de degradación, evitando un efecto directo de ellos sobre las motoneuronas. Las motoneuronas se plaquearon sobre los astrocitos y luego de dos días se evaluó su supervivencia.

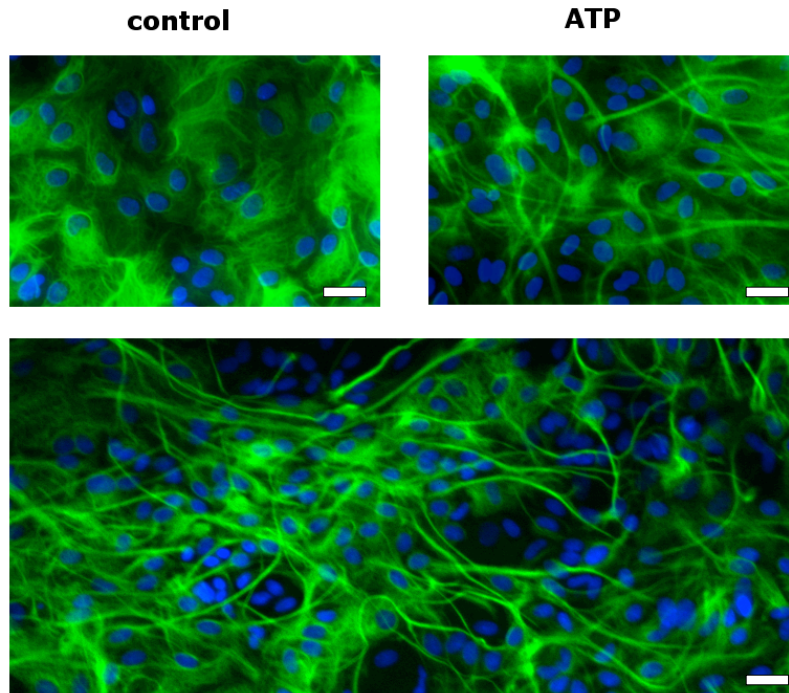
La exposición de monocapas de astrocitos espinales a un único pulso de ATP 24 horas antes del establecimiento del co-cultivo no modificó la supervivencia de motoneuronas. La administración de dos pulsos de ATP, separados por 48 horas, produjo una respuesta dual, dependiendo de la concentración. La concentración más baja de ATP ensayada (0,1  $\mu\text{M}$ ) causó un aumento del 20% en el número de motoneuronas sobrevivientes. Sin embargo, concentraciones más altas (1  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ ) causaron un descenso promedio de 20%. La administración de tres pulsos de ATP causó un descenso del 40% en la supervivencia de motoneuronas, sin distinción de la concentración usada (Fig. 11B).

Para determinar si los astrocitos expuestos a ATP son capaces de producir factores difusibles tóxicos para las motoneuronas o si la toxicidad es dependiente del contacto físico entre los dos tipos celulares, monocapas de astrocitos fueron tratadas con ATP (1  $\mu\text{M}$ , 5 días), lavadas e incubadas con medio de cultivo para motoneuronas durante 48 horas. Este medio se utilizó (en dilución 1:1 con medio fresco) para el mantenimiento de motoneuronas en cultivos puros plaqueadas sobre un sustrato de laminina en lugar de sobre una monocapa de astrocitos. Encontramos que el medio proveniente de astrocitos tratados con ATP redujo en un 20% el número de motoneuronas, en comparación con el medio proveniente de astrocitos no tratados, indicando que un factor difusible presente en el medio es parcialmente responsable de la muerte de motoneuronas inducida por los astrocitos (Fig. 11C).

El fenotipo neurotóxico desarrollado por los astrocitos expuestos a ATP pudo ser prevenido por el inhibidor del receptor purinérgico P2X<sub>7</sub> Brilliant Blue G (BBG, 1  $\mu\text{M}$ )

y por la enzima apirasa (api, 2 U/mL), que degrada rápidamente el ATP (Fig. 12A). Esto indica que el ATP, y no los compuestos formados durante su degradación, es el responsable de los efectos observados. Además, sugiere que la señalización a través del receptor P2X<sub>7</sub> es necesaria para la inducción de neurotoxicidad. La presencia de este receptor en nuestros cultivos fue confirmada mediante inmunofluorescencia para P2X<sub>7</sub>. Los astrocitos mostraron inmunorreactividad extensiva para este receptor, con una distribución uniforme y un aumento de inmunorreactividad en los límites celulares, indicando que se encontraría en la membrana plasmática (Fig. 12B).

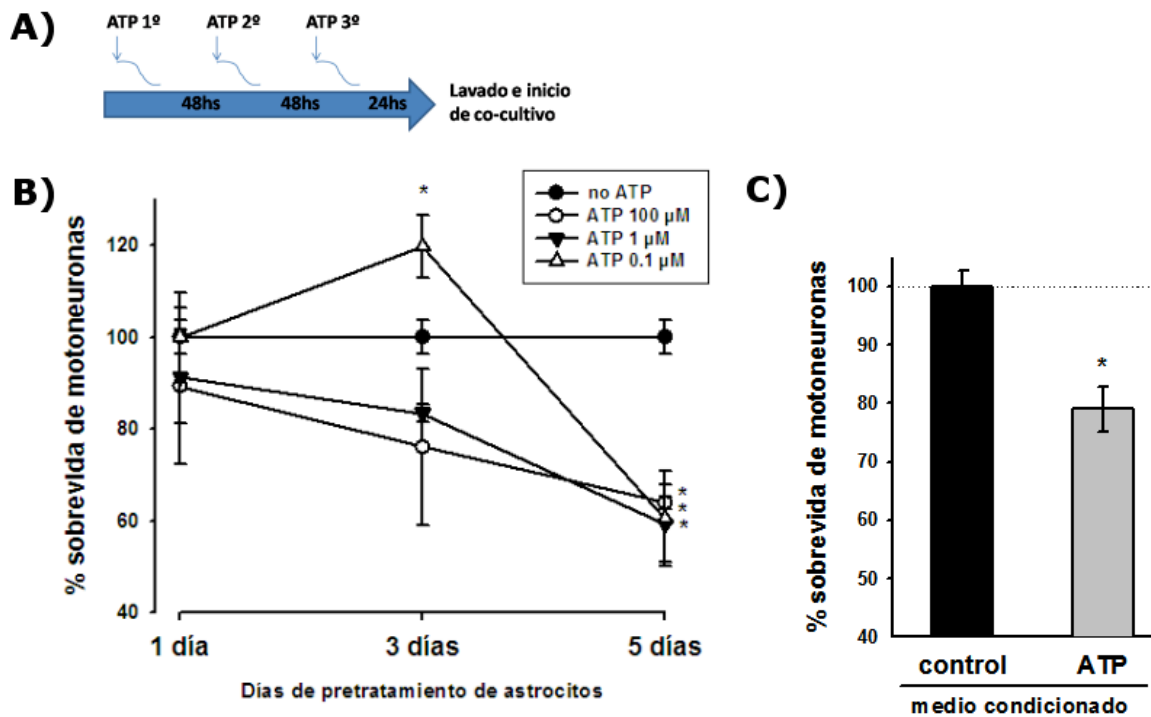
La hidrólisis rápida del ATP por la apirasa no sólo previno la neurotoxicidad, sino que indujo un comportamiento protector en los astrocitos, evidenciado por un aumento de hasta un 35% en la supervivencia de motoneuronas (Fig. 12A). Esto fue observado en presencia de apirasa y ATP agregado exógenamente, y no en respuesta a la apirasa exclusivamente, indicando que la concentración de ATP extracelular endógena no sería suficiente para inducir este efecto. Para determinar la actividad de los productos de hidrólisis del ATP generados por la apirasa, se trataron monocapas con ADP, AMP o adenosina (0,1 µM, 5 días), de manera de simular el efecto de la apirasa en presencia de ATP. Se encontró que las tres moléculas son capaces de activar respuestas protectoras en los astrocitos, llevando a un incremento en la supervivencia de motoneuronas análogo al encontrado con apirasa (Fig. 12C).



**Fig. 10. El ATP induce un rearrreglo en los filamentos de GFAP.**

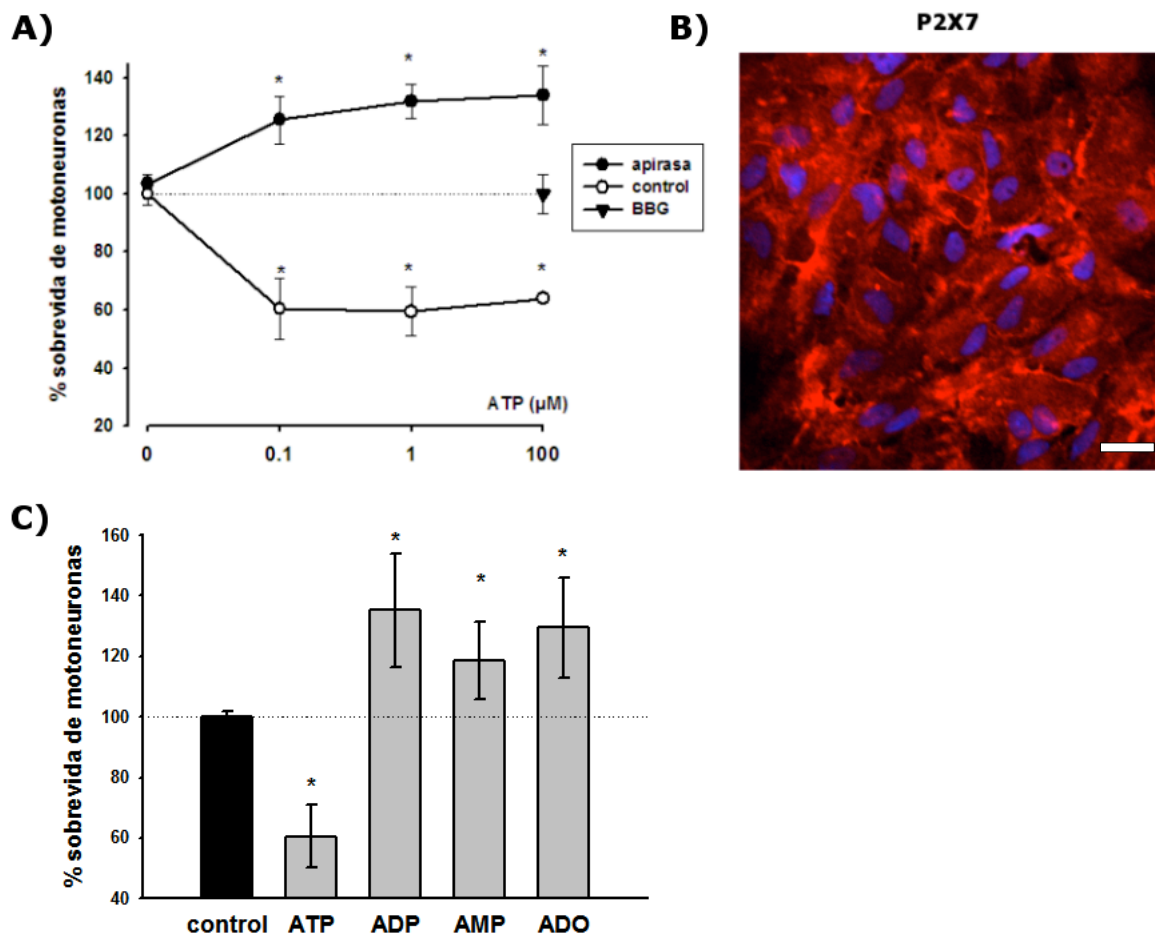
Microfotografía de Inmunofluorescencia para GFAP en monocapa de astrocitos control (arriba izquierda, 20X) o tratados con ATP (arriba derecha, 20X y abajo, 10X). Se observa en respuesta a ATP la aparición de procesos largos y finos con alta inmunorreactividad para GFAP. La barra corresponde a 30  $\mu$ m.





**Fig. 11. El ATP extracelular en astrocitos induce un fenotipo neurotóxico que lleva a la muerte de motoneuronas.**

**(A)** Esquema detallando el tratamiento de las monocapas de astrocitos con ATP. Los astrocitos fueron tratados con 100, 1 o 0,1 µM ATP por 1, 3 o 5 días previo al establecimiento de co-cultivos. El medio fue cambiado cada 48 horas, agregándose ATP nuevamente, que rápidamente es degradado. Al final del tratamiento los astrocitos fueron lavados y se establecieron los co-cultivos. **(B)** Supervivencia de motoneuronas en co-cultivo con astrocitos tratados con ATP según se especifica en (A). **(C)** Motoneuronas puras fueron cultivadas en medio condicionado por astrocitos control o tratados con ATP (1 µM, 5 días). Los valores son la media ± el error estándar. (\*) Diferencia significativa respecto al control no tratado con  $p < 0,05$ .



**Fig. 12. El ATP señala a través del receptor P2X<sub>7</sub> y su degradación induce un aumento en la supervivencia de motoneuronas.**

**(A)** Co-cultivo de motoneuronas y astrocitos pre-tratados con ATP (100, 1 o 0,1 μM) y simultáneamente apirasa (2U/mL) o BBG (1 μM). **(B)** Inmunofluorescencia contra P2X<sub>7</sub> (rojo. 20X La barra corresponde a 30 μm). **(C)** Co-cultivo con astrocitos pretratados con 0,1 μM ATP, ADP, AMP o adenosina por 5 días (según Fig. 11A). Los valores son la media ± el error estándar. (\*) Diferencia significativa respecto al control no tratado si  $p < 0,05$ .

## **II) La activación de P2X<sub>7</sub> en astrocitos induce un incremento en la producción de ERON.**

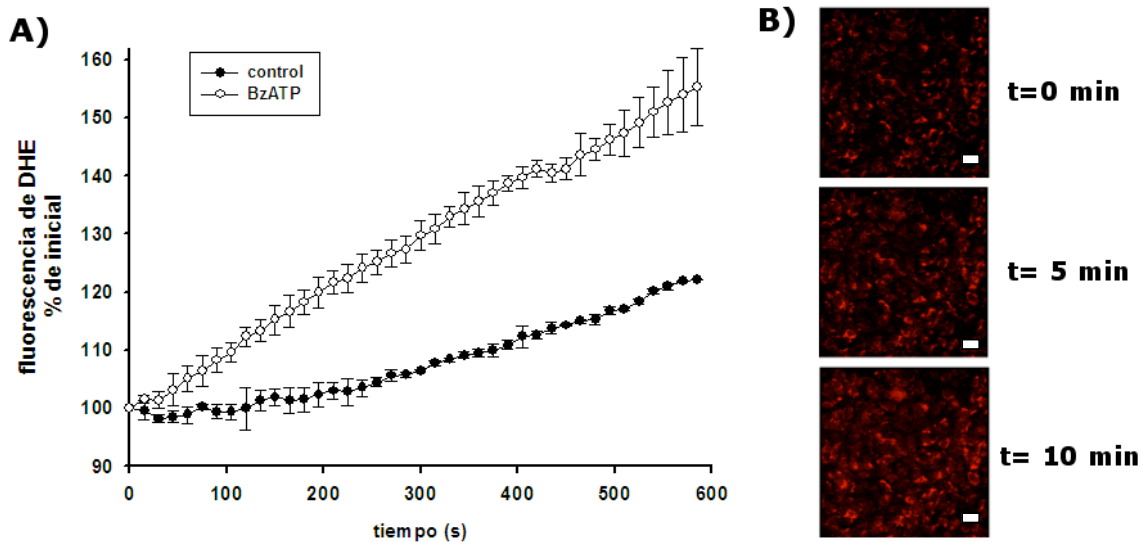
Para estudiar los mecanismos por el cual el ATP actuando a través de P2X<sub>7</sub> induce la activación y el fenotipo neurotóxico observado en astrocitos, monocapas se trataron con 3'-O-(4-benzoil)benzoil ATP (BzATP). A la concentración utilizada este compuesto es agonista específico de receptores P2X con alta selectividad para P2X<sub>7</sub> (Gever et al., 2006).

La entrada de calcio que resulta de la activación de P2X<sub>7</sub> es capaz de activar vías inductoras de estrés oxidativo en macrófagos, neutrófilos y microglía (Hewinson and Mackenzie, 2007). Por otro lado, se ha visto que el peroxinitrito es capaz de inducir un fenotipo neurotóxico en astrocitos (Cassina et al., 2002). Por esto, estudiamos si en nuestro modelo la activación y neurotoxicidad astrocitaria podría estar mediada por el daño por radicales libres. Para esto, se utilizaron las sondas fluorescentes dihidroetidio (DHE) y Amplex UltraRed, capaces de detectar O<sub>2</sub><sup>-</sup> y peróxido de hidrógeno respectivamente. En la figura 9 se describen las principales fuentes de ERON, su reactividad, vías de detoxificación e intervenciones farmacológicas realizadas.

La sonda DHE es oxidada por el O<sub>2</sub><sup>-</sup> formando hidroxietidio, compuesto posible de excitar de manera selectiva a 396 nM, cuantificando así la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> celular (Robinson et al., 2006). El DHE fue agregado al medio de cultivo de monocapas de astrocitos confluentes control o tratadas con BzATP (10 μM, 48hs) e inmediatamente se comenzó a registrar el aumento en la fluorescencia del hidroxietidio. Los astrocitos control mostraron un aumento del ~25% sobre la fluorescencia inicial en un lapso de 10 minutos, mientras que los tratados con BzATP mostraron un aumento del ~55%, indicando que la oxidación del DHE por parte del O<sub>2</sub><sup>-</sup> ocurre un ~35% más rápido (Fig. 13A). En la figura 13B se observan micrografías de los astrocitos mostrando el incremento en fluorescencia de un campo tratado con BzATP.

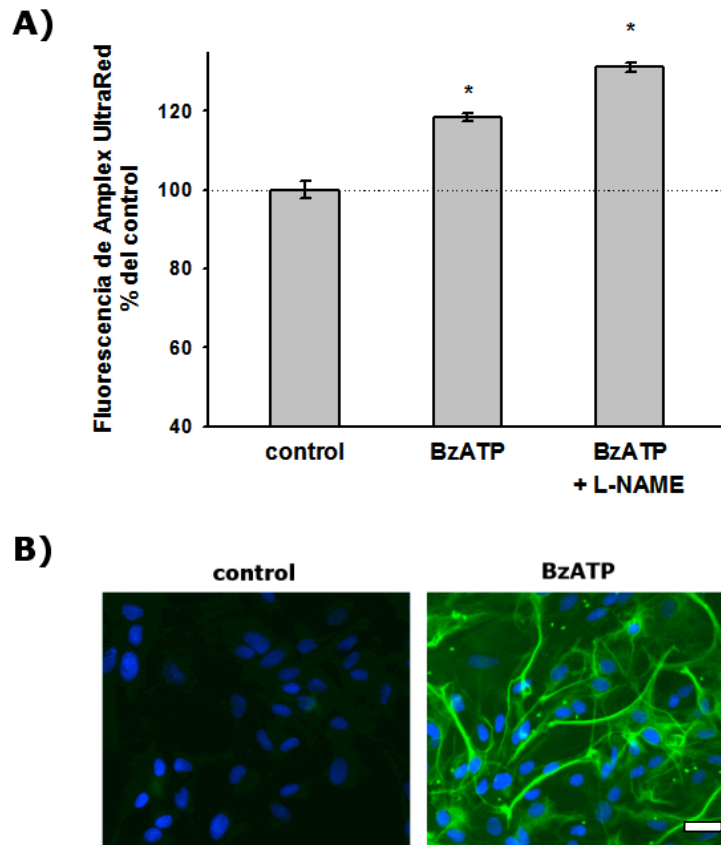
La producción de  $H_2O_2$  a nivel celular se encuentra determinada en gran parte por los niveles de  $O_2^{\cdot-}$ , NO y antioxidantes. El  $O_2^{\cdot-}$  es convertido en  $H_2O_2$  por la SOD1, sin embargo, el  $O_2^{\cdot-}$  también reacciona con el NO, produciendo peroxinitrito. Para evaluar la producción de  $H_2O_2$  en respuesta al BzATP, se utilizó la sonda Amplex UltraRed. En presencia de peroxidasa de rábano, el Amplex UltraRed reacciona con el  $H_2O_2$  produciendo un compuesto altamente fluorescente.

Los astrocitos fueron tratados con BzATP en ausencia o presencia del inhibidor de las NOS Nitro-L-arginina-metilester (L-NAME, 1mM) y se evaluó la producción de  $H_2O_2$ . El tratamiento con BzATP elevó en ~18% el nivel fluorescencia respecto a los controles no tratados. El agregado de L-NAME (1mM) provocó un incremento de ~13% adicional (Fig. 14A). Esto sugiere que parte del  $O_2^{\cdot-}$  detectado con la sonda DHE es dismutado por la SOD1 pero que una fracción reacciona antes con el NO, formando peroxinitrito. Acorde con este hallazgo fue la intensa inmunorreactividad para la iNOS en las monocapas de astrocitos tratadas con BzATP (Fig. 14B).



**Fig. 13. Producción de  $O_2^{\cdot-}$  iniciada por la activación de  $P2X_7$**

**(A)** Cuantificación mediante microscopía de la intensidad de emisión de fluorescencia de la sonda DHE en astrocitos control (línea negra) o tratados con BzATP (línea blanca), los resultados están expresados como la tasa de aumento de fluorescencia respecto a la fluorescencia inicial de cada condición. **(B)** Microfotografía de monocapa tratada con BzATP (10  $\mu$ M, 48hs) y cargada con la sonda dihidroetidio, al momento de inicio de registro, a los 5 minutos y a los 10 minutos (t=0, t=5 y t=10 min correspondientemente). La barra corresponde a 30  $\mu$ m.



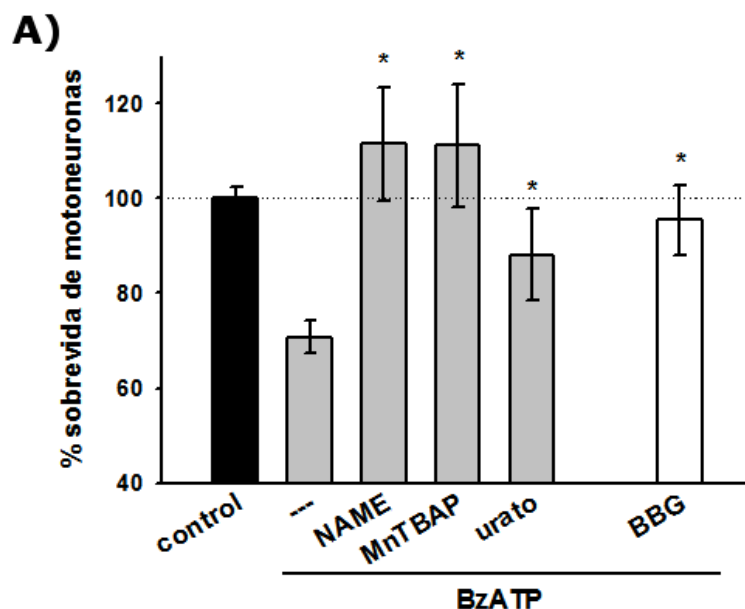
**Fig. 14. Producción de  $H_2O_2$  iniciada por la activación de  $P2X_7$ .**

**(A)** Cuantificación de la producción de  $H_2O_2$  con la sonda Amplex UltraRed en astrocitos control, tratados con BzATP (10  $\mu$ M, 48hs) o con BzATP + L-NAME (1mM). **(B)** Inmunofluorescencia contra iNOS, mostrando intensa inmunorreactividad en astrocitos tratados con BzATP (10  $\mu$ M). Los valores son la media  $\pm$  el error estándar. (\*) Diferencia significativa BzATP vs. control no tratado y vs. BzATP + L-NAME con  $p < 0,05$ . La barra corresponde a 30  $\mu$ m.

### III) Las ERONs median la neurotoxicidad astrocitaria inducida por la activación de P2X<sub>7</sub>.

Dado que la señalización por P2X<sub>7</sub> causó un aumento en la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, investigamos si el estrés oxidativo y nitrativo podría estar implicado en la aparición de neurotoxicidad astrocitaria. El BzATP (10 μM) aplicado 48 horas antes del establecimiento del co-cultivo causó una reducción del 30% en la supervivencia de motoneuronas. La adición simultánea de BBG (1 μM) anuló sus efectos, indicando señalización específica a través de P2X<sub>7</sub> (Fig. 15).

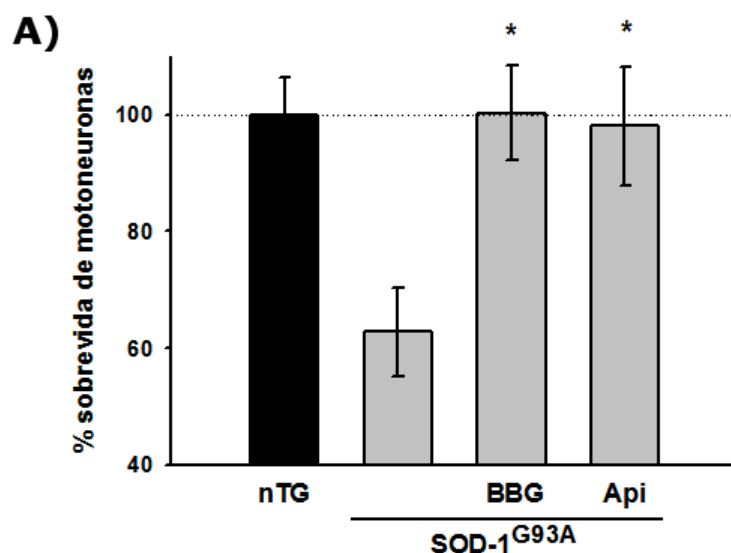
La adición de L-NAME (1 mM), el atrapador de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> porfirina Mn(III)tetrakis (ácido 4-benzoico) (MnTBAP, 100 μM) o el detoxificador de peroxinitrito, urato (200 μM) simultáneamente al BzATP fue suficiente para abolir la inducción de neurotoxicidad astrocitaria (Fig. 15). Estos resultados ligan el incremento en la producción de NO y el estrés oxidativo y nitrativo en la inducción del fenotipo neurotóxico por BzATP en astrocitos.



**Fig. 15. Las ERON median el desarrollo de neurotoxicidad astrocitaria.** Co-cultivo con motoneuronas y astrocitos control o pretratados con BzATP (10 μM) y L-NAME (1mM), MnTBAP (100 μM), urato (200 μM) y BBG (1 μM). Los valores son la media ± el error estándar. (\*) Diferencia significativa vs. BzATP con p<0,05.

#### IV) P2X<sub>7</sub> media la neurotoxicidad de astrocitos SOD1<sup>G93A</sup>

Investigaciones previas de nuestro laboratorio mostraron que los astrocitos provenientes de ratas SOD1<sup>G93A</sup> presentan un fenotipo neurotóxico, soportando la supervivencia de ~40% menos motoneuronas que los no transgénicos (Vargas et al, 2006). Estudios en progreso en nuestro laboratorio indican que el ATP extracelular se encuentra elevado en astrocitos SOD1<sup>G93A</sup>, y dada su capacidad de inducir un fenotipo neurotóxico en astrocitos, decidimos investigar si la señalización por ATP extracelular en astrocitos SOD<sup>G93A</sup> tiene un rol en su neurotoxicidad. Encontramos que la incubación de los astrocitos durante las 48 horas previas al sembrado de las motoneuronas con BBG o apirasa fue suficiente para revertir su neurotoxicidad, encontrándose el mismo número de motoneuronas sobrevivientes que las monocapas no transgénicas (Fig. 16). El BBG (1  $\mu$ M) y la apirasa (2 U/mL) fueron lavados extensivamente previo al establecimiento del co-cultivo, por lo que se descarta un efecto directo de estos fármacos sobre las motoneuronas.

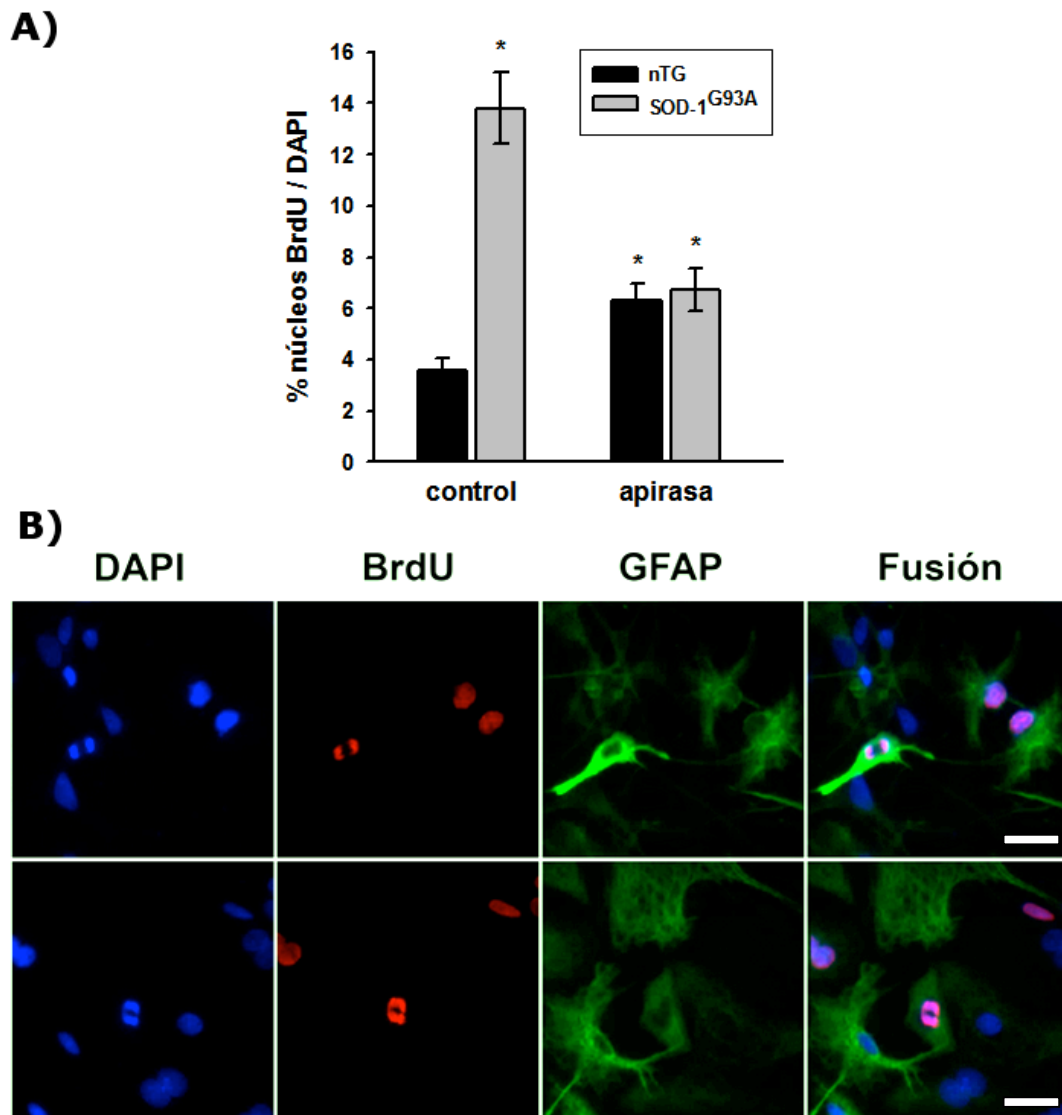


**Fig. 16. Protección mediada por la inhibición de P2X<sub>7</sub> en astrocitos SOD1<sup>G93A</sup>.** Co-cultivos de motoneuronas y astrocitos no transgénicos (nTG, barras negras) o SOD1<sup>G93A</sup> (barras grises) pretratados con BBG (1  $\mu$ M) o apirasa (2U/mL) por 48 horas.

## V) El ATP media la proliferación de astrocitos SOD1<sup>G93A</sup>

La activación astrocitaria se caracteriza por un incremento en su tasa proliferativa, típicamente mediada por la aparición o aumento de factores inflamatorios en el medio extracelular. El líquido cefalorraquídeo de pacientes con ELA es capaz de inducir la proliferación de astrocitos en cultivo (Silani et al., 1987). Además, se ha encontrado elevada proliferación de células gliales en la médula de animales SOD1<sup>G93A</sup> (Lepore et al., 2008). Investigaciones previas en nuestro laboratorio determinaron que los astrocitos SOD1<sup>G93A</sup> *in vitro* presentan una incrementada proliferación (Raquel Castellanos, 2006). En monocapas de astrocitos SOD1<sup>G93A</sup> confluentes el ~14% de las células incorporan BrdU, en comparación con el ~3% en monocapas no transgénicas (Fig. 17A). Esto se acompañó de una aparición más frecuente de figuras mitóticas (Fig. 17B). El ATP media la proliferación de tumores y células progenitoras en el sistema nervioso, y es mitógeno para astrocitos (Neary et al, 1998). Por estas razones, nos preguntamos si el aumento en el ATP extracelular en astrocitos SOD1<sup>G93A</sup> podría explicar el aumento en su proliferación. Encontramos que la hidrólisis del ATP por la apirasa llevó a un descenso significativo en el número de células SOD1<sup>G93A</sup> proliferantes (~6%) (Fig. 17A). Ha sido previamente descrito que la adenosina es mitogénica para astrocitos, lo que explicaría que la apirasa no descienda la proliferación al mismo nivel que los no transgénicos, y que éstos muestren un pequeño aumento en su proliferación en respuesta a la apirasa.





**Fig. 17. El ATP extracelular media el incremento en la proliferación de astrocitos SOD1<sup>G93A</sup>**

**(A)** Proliferación de monocapas confluentes de astrocitos nTG o SOD1<sup>G93A</sup> control o tratados con apirasa por 48 horas cuantificada según el porcentaje de núcleos marcados con BrdU sobre el total. Los valores son la media  $\pm$  el error estándar. (\*) Diferencia significativa vs. SOD1<sup>G93A</sup> sin tratar, con  $p < 0,05$ . **(B)** Inmunofluorescencia de astrocitos SOD1<sup>G93A</sup> mostrando la coincidencia del marcado con BrdU (rojo) con figuras mitóticas (20X). Las barras corresponden a 30  $\mu$ m.

## **VI) La activación de P2X<sub>7</sub> en motoneuronas induce la apoptosis mediada por ERON.**

Dado que los astrocitos se encuentran en íntima relación anatómica con las motoneuronas, nos preguntamos si el ATP liberado al medio extracelular por los astrocitos, además de actuar autócrinamente sobre ellos mismos, podría también actuar parácrinamente sobre los receptores purinérgicos de las motoneuronas. Para responder esta pregunta, se realizaron cultivos puros de motoneuronas, plaqueados en un sustrato de laminina, en lugar de sobre una monocapa de astrocitos. Los cultivos fueron tratados luego de 2 horas de su establecimiento, cuando las motoneuronas ya se encuentran adheridas y comienzan a extender sus neuritas; 48 horas después se evaluó su supervivencia.

El BzATP (100 – 0.5  $\mu$ M) causó un descenso de 30% en la supervivencia de las motoneuronas, en comparación con los controles no tratados (Fig. 18A). La muerte iniciada por BzATP (10 $\mu$ M) fue revertida por el antagonista general de receptores P2X oATP (del inglés, periodate-oxidised ATP, 1  $\mu$ M) y los antagonistas selectivos para P2X<sub>7</sub>, el BBG (1  $\mu$ M) y el 1-[N, O-bis(5-isoquinolinesulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenilpiperazina (KN-62, 1  $\mu$ M) (Fig. 18B).

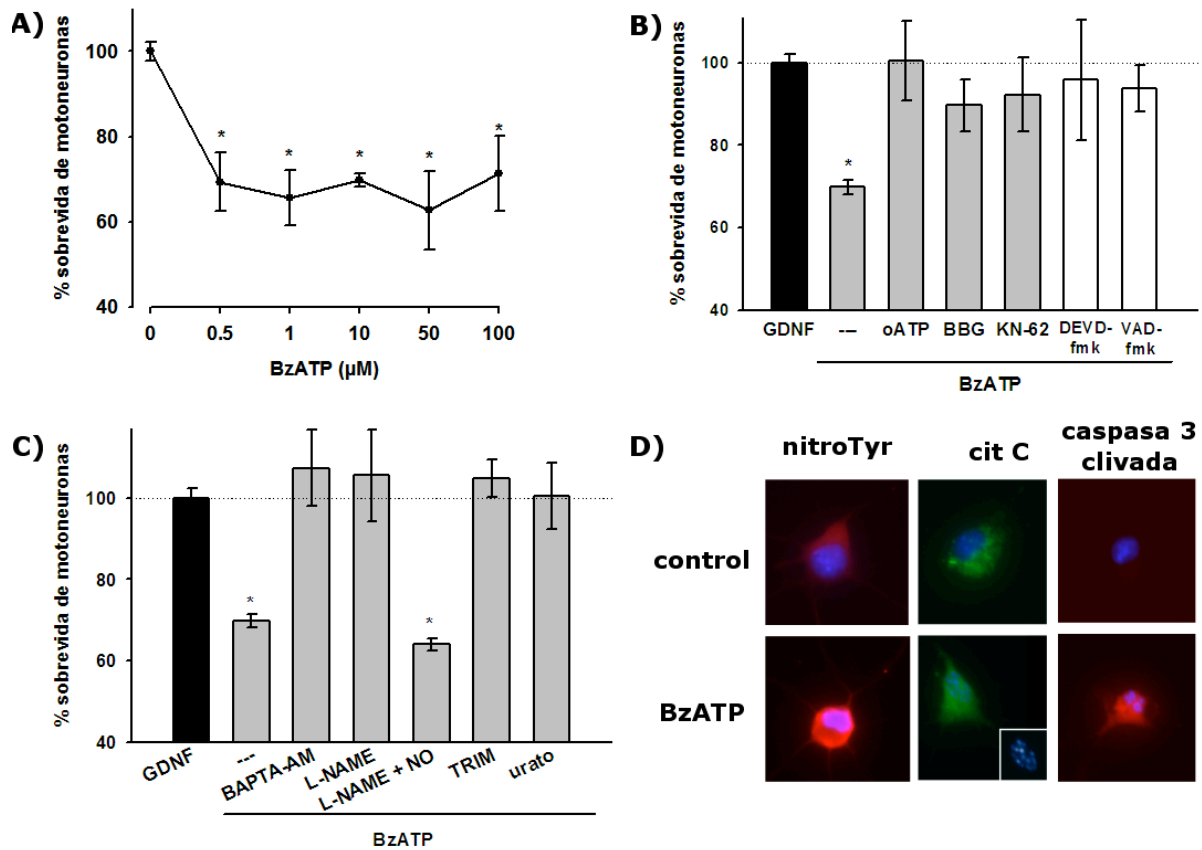
Para determinar si la activación de P2X<sub>7</sub> en motoneuronas llevaba a la muerte por lisis o si por lo contrario se disparaba el proceso de apoptosis, se administró previo al tratamiento con BzATP el inhibidor general de caspasas z-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona (zVAD-fmk, 10  $\mu$ M) y el inhibidor selectivo para caspasa – 3 Ac-Asp-Glu-Val-Asp-fluorometilcetona (DEVD-fmk, 10  $\mu$ M). Estos compuestos previnieron la muerte de motoneuronas en respuesta a BzATP, sugiriendo que éste es capaz de activar un proceso apoptótico dependiente de caspasas (Fig. 18B). A su vez, las motoneuronas expuestas a BzATP mostraron de manera predominante inmunoactividad para caspasa – 3 clivada, como muestra la microfotografía de la inmunofluorescencia en Fig. 18D, panel derecho. Adicionalmente, las motoneuronas expuestas a BzATP evidenciaron una tinción citoplásmica uniforme para citocromo C, en comparación con los controles, donde la tinción era típicamente mitocondrial (Fig. 18D panel del medio). Esto evidencia la liberación de citocromo c al

citoplasma, uno de los eventos más tempranos de la apoptosis. Las células que presentaron inmunoactividad citoplasmática para citocromo C y caspasa 3 clivada típicamente exhibieron condensación de la cromatina y fragmentación nuclear (Fig.18D inserto en panel central y derecha).

La activación del receptor P2X<sub>7</sub> genera un importante flujo de calcio al interior de la célula, que es capaz de activar numerosas enzimas dependientes de calcio así como causar la muerte por excitotoxicidad. Para averiguar si la entrada de calcio en respuesta a BzATP es necesaria para la inducción de la apoptosis, se adicionó 1,2-bis(2-Aminofenoxi)etano-N,N,N',N'- ácido tetraacético *tetrakis*(acetoximetil) ester (BAPTA-AM, 10 μM), quelante de calcio intracelular. El BAPTA-AM fue capaz de revertir completamente la apoptosis de motoneuronas, indicando que el influjo de calcio es necesario en el disparo de los efectos del BzATP (Fig. 18C)

Dado que el calcio es un modulador de la producción de NO, activando a las NOS (Stuehr, 1999), estudiamos si el NO podría mediar la muerte de las motoneuronas. Efectivamente, el L-NAME (100 μM) y el inhibidor selectivo de la isoforma predominantemente neuronal nNOS (1-2-trifluorometilfenil) imidazol (TRIM, 10 μM) previnieron la apoptosis de motoneuronas, sugiriendo la activación de estas enzimas. La protección conferida por el L-NAME fue abolida por el agregado de [(Z)-1-[N-(2-aminoetil)-N-(2-amonio-etil)amino]diazén-1-ium-1,2-diolato] (NOC-18, 10 μM) para generar un flujo de NO constante <50 nM (Fig. 18C)

La muerte de motoneuronas como consecuencia de la activación de P2X<sub>7</sub> también fue prevenida por el urato (200 μM), sugiriendo que en esta condición el O<sub>2</sub><sup>-</sup> reacciona con el NO para producir peroxinitrito (Fig. 18C). A su vez, se observó un aumento en la inmunorreactividad para nitrotirosina, que evidencia la existencia de peroxinitrito (Fig. 18D panel izquierdo).



**Fig. 18. Efectos de la activación de P2X<sub>7</sub> en motoneuronas.**

(A) Curva de dosis respuesta de BzATP en motoneuronas espinales en cultivo primario puro. (B) Las motoneuronas fueron tratadas con BzATP (10  $\mu\text{M}$ ) y simultáneamente los inhibidores de receptores P2X oATP, BBG o KN-62 (1  $\mu\text{M}$ , barras grises) o los inhibidores de actividad caspasa DEVD-fmk o VAD-fmk (10  $\mu\text{M}$ , barras blancas). (C) Las motoneuronas fueron tratadas con BzATP (10  $\mu\text{M}$ ) y simultáneamente con BAPTA-AM (10  $\mu\text{M}$ ), L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ), L-NAME + NOC-18 (10  $\mu\text{M}$ ), TRIM (10  $\mu\text{M}$ ) o urato (200  $\mu\text{M}$ ) (D) Inmunofluorescencia de motoneuronas puras en cultivo control o tratadas con BzATP (10  $\mu\text{M}$ ) para nitrotirosina (nitroTyr, panel izquierdo), citocromo C (cit C, panel central) y caspasa 3 clivada (panel derecho). La tinción nuclear con DAPI revela la presencia de fragmentación nuclear, característica de células apoptóticas (inserto en panel central, abajo). 1 centímetro equivale a 30  $\mu\text{m}$ .

Los valores son la media  $\pm$  el error estándar. (\*) Diferencia significativa vs. Control GDNF, con  $p < 0,05$ .

## **DISCUSIÓN**

En este trabajo aportamos evidencias de que el incremento en el ATP extracelular puede conducir a la muerte de motoneuronas por activación de receptores P2X<sub>7</sub> tanto en astrocitos como en motoneuronas. La inducción de estrés oxidativo evidenciado por un aumento en la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, NO y peroxinitrito constituyó un mecanismo común tanto en astrocitos como motoneuronas. Sin embargo, en astrocitos ésto determinó un fenotipo neurotóxico mientras que en motoneuronas la activación de P2X<sub>7</sub> llevó a la apoptosis.

### **Los astrocitos y la neurotoxicidad por ATP**

En el sistema nervioso sano, el ATP extracelular actúa como neurotransmisor y neuromodulador (Burnstock et al., 1997). Además, el ATP es quimiotáctico y activador de la microglía y células inmunes que invaden el sistema nervioso durante la enfermedad o injuria aguda (Burnstock, 2008). Sin embargo, su papel en la activación de astrocitos y como mediador de injuria a neuronas es poco conocido.

En respuesta a los insultos, los astrocitos se activan, adoptando un fenotipo caracterizado por cambios morfológicos, proliferación, secreción de factores y citoquinas pro-inflamatorias (Barbeito et al., 2004). La activación de los astrocitos determina una alteración en su interacción con neuronas, glia y células inmunes, que puede ser trófica y regeneradora o perjudicial dependiendo de la injuria y su contexto. En este trabajo mostramos que la exposición *in vitro* a ATP indujo la activación de los astrocitos y el desarrollo progresivo de un fenotipo neurotóxico que llevó a la muerte de motoneuronas (Fig. 11B). La gran heterogeneidad de receptores a ATP determina que la respuesta celular se encuentre en gran manera condicionada por la intensidad, duración y distribución del estímulo, así como la presencia de otros estímulos simultáneos. Existe una extensa bibliografía que describe la inducción de efectos tróficos y protectores en respuesta al ATP, generalmente efectos agudos de un único pulso (Walter et al., 2004; Shinozaki et al., 2006; Burgos et al., 2007; Wu et al., 2007). Bajas concentraciones de ATP momentáneas podrían constituir una señal de peligro, desencadenando una

respuesta adaptativa, como vimos a una baja dosis de ATP (100nM), donde luego de 2 pulsos existió un aumento del  $\approx 20\%$  en la sobrevivencia de motoneuronas (Fig. 11B). Sin embargo, estudios *in vivo* sugieren que este no sería el caso en las enfermedades neurodegenerativas o el trauma, donde el daño y la inflamación crónicos podrían constituir estímulos para la liberación de ATP persistente y/o repetida (Wang et al., 2004; Matute et al., 2007). Aquí mostramos que estimulaciones repetidas a lo largo del tiempo, incluso con bajas concentraciones de ATP, llevan al desarrollo progresivo de un fenotipo neurotóxico (Fig. 11B).

### ***La neurotoxicidad es mediada por un factor difusible***

Los astrocitos activados son capaces de secretar factores pro-inflamatorios, que llevan a la propagación del daño a zonas adyacentes. En este trabajo mostramos que el insulto con ATP causó la liberación de uno o varios factores al medio extracelular que son capaces de inducir muerte de motoneuronas (Fig. 11C). Sin embargo, la muerte de motoneuronas puras cultivadas en medio condicionado fue un  $\approx 20\%$  menor que cuando fueron cocultivadas directamente sobre los astrocitos pre-tratados con ATP (Fig. 11 B y C). Esta diferencia podría deberse a la posible degradación de los factores tóxicos en la manipulación y almacenamiento del medio condicionado o podría manifestar la necesidad de contacto íntimo entre los dos tipos celulares para la inducción de la muerte.

El factor de crecimiento neural (NGF) señalizando a través del receptor p75 podría ser uno de los factores liberado por los astrocitos en respuesta al ATP, induciendo la muerte de motoneuronas. Durante la enfermedad las motoneuronas son capaces de re-expresar este receptor, capaz de mediar su muerte en respuesta al NGF. El NGF se encuentra aumentado en médulas espinales de modelos animales de ELA, y los astrocitos activados en respuesta a estrés oxidativo o factores pro-inflamatorios liberan más NGF al medio (Pehar et al., 2004; Vargas et al., 2004).

La liberación de NGF al medio podría coexistir con un mecanismo de muerte dependiente del contacto directo entre los astrocitos y motoneuronas, tal como el del ligando Fas. Su expresión aumenta en astrocitos reactivos y en la ELA las

motoneuronas presentan una incrementada sensibilidad a la muerte inducida por el ligando Fas (Raoul et al., 2002).

En este sentido, sería interesante identificar el factor difusible capaz de inducir muerte de motoneuronas, ya que constituiría un blanco al que dirigir terapias para prevenir los efectos del ATP extracelular en enfermedades neurodegenerativas.

### ***Efectos neurotróficos del APD, AMP y adenosina***

En el medio extracelular el ATP es rápidamente degradado a ADP, AMP y adenosina por enzimas extracelulares. En el medio de cultivo de astrocitos, el ATP agregado exógenamente posee una vida media de 10 minutos (Shinozaki et al., 2005), formándose rápidamente ADP, AMP y adenosina. El ADP es capaz de señalizar a través de ciertos subtipos de receptores tipo P2, aunque sus efectos en astrocitos espinales no son conocidos. Sin embargo se ha visto que la adenosina es neuroprotectora en modelos de injuria, pudiendo inducir respuestas adaptativas en los astrocitos (Dare et al., 2007). Encontramos que la hidrólisis del ATP mediante el agregado de apirasa logró revertir sus efectos sobre los astrocitos, evidenciado por un sorprendente aumento en la supervivencia de motoneuronas (Fig.12A). Esto indicaría que el desarrollo de un comportamiento neurotóxico es una respuesta específica para el ATP, y no es causada por los productos formados durante su degradación. Adicionalmente, encontramos que la apirasa en presencia de ATP provocó una respuesta protectora en los astrocitos, que pudimos reproducir mediante el pre-tratamiento de astrocitos directamente con ADP, AMP y adenosina (Fig. 12C).

Nuestros resultados indican que mientras que el ATP es capaz de suscitar una transformación neurotóxica del astrocito, su degradación origina una respuesta protectora, probablemente mediada por la adenosina señalizando a través de receptores P1. Bajas concentraciones de adenosina son capaces de activar respuestas adaptativas en los astrocitos, con resultados neuroprotectores y regenerativos (Dare et al., 2007). Por lo tanto, no sólo la concentración de ATP extracelular es importante a la hora de determinar el fenotipo astrocitario, sino que su cinética de degradación y recaptación también cumplen papeles importantes. En

este sentido, se ha detectado el aumento en la expresión y actividad de enzimas degradadoras del ATP en casos de isquemia y lesión cortante cerebral (Braun et al., 1998; Nedeljkovic et al., 2008).

### ***Rol del receptor P2X<sub>7</sub>***

Mediante la inhibición del receptor P2X<sub>7</sub> fue posible revertir el desarrollo del fenotipo neurotóxico astrocitario en respuesta a ATP (Fig. 12A). En pacientes y modelos murinos de ELA y Alzheimer la expresión de este receptor se encuentra aumentada, sugiriendo que tendría un rol en la neurodegeneración (Parvathenani et al., 2003; Yiangou et al., 2006). Se ha visto que la activación de P2X<sub>7</sub> determina respuestas pro-inflamatorias a nivel del sistema inmune y nervioso (Burnstock, 2008). La entrada masiva de calcio que sigue a su activación podría llevar a la activación de enzimas como la NOS, cicloxigenasa y NADPH oxidasa que pueden llevar a la producción de ERON. Este receptor por lo tanto constituye un blanco terapéutico para modular las actividades astrocitarias que llevan a la muerte de motoneuronas espinales como ser en la ELA o trauma de médula espinal.

### **Mecanismos de citotoxicidad iniciados por la activación de P2X<sub>7</sub>**

Encontramos que en astrocitos la activación de P2X<sub>7</sub> fue seguida de un incremento en la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, evidenciado con la sonda fluorescente DHE (Fig. 13A). La detección de la fluorescencia selectiva del hidroxietidio permitió la cuantificación específica del O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, sin embargo no se descarta una pequeña contribución de otras EROs a la señal. Estudios en astrocitos de corteza han mostrado que el influjo de calcio momentáneo en respuesta a ATP lleva a la activación aguda de la enzima NADPH oxidasa, productora de grandes cantidades de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Abramov et al., 2005). En este trabajo demostramos en astrocitos espinales que la activación de P2X<sub>7</sub> es capaz de inducir un aumento persistente en el nivel de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> hasta 48 horas luego del estímulo. Posibles fuentes de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> podrían incluir la enzima NADPH oxidasa, otras enzimas como la xantina oxidasa y la NOS, metales de transición, el retículo



endoplásmico a través del sistema citocromo p450 y el núcleo y la mitocondria a través de la cadena de transporte electrónico.

A pesar de que el  $O_2^{\cdot-}$  por sí mismo no es necesariamente detrimental, ya que es poco reactivo, el incremento en su producción ha sido asociado con numerosas patologías, como el cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, y también con el envejecimiento (Pacher et al., 2007; Linseman, 2008). La enzima SOD1 es capaz de dismutarlo, produciendo  $H_2O_2$  que será detoxificado por la glutatión peroxidasa y la catalasa principalmente. Mediante la cuantificación de la cantidad de  $H_2O_2$  en el medio de cultivo, pudimos evidenciar que existe un aumento de este oxidante en astrocitos activados con BzATP (Fig. 14A). Este aumento probablemente refleja el incremento en los niveles de  $O_2^{\cdot-}$  evidenciados con la sonda DHE (Fig. 13A).

Mediante inmunofluorescencia para iNOS determinamos que esta enzima se expresa en mayor nivel en respuesta al BzATP (Fig. 14B). La faceta más peligrosa del  $O_2^{\cdot-}$  aparece cuando existe NO simultáneamente en tiempo y espacio. El  $O_2^{\cdot-}$  es capaz combinarse a una velocidad muy alta con el radical NO para formar el anión peroxinitrito. Esta reacción, en el límite de control difusional, es más rápida que la reacción del  $O_2^{\cdot-}$  con la SOD1, por lo que si existe NO compitiendo con la SOD1, se favorecerá la formación de peroxinitrito (Beckman et al., 1990; Pacher et al., 2007). La inhibición de la producción de NO nos permitió revelar que parte del  $O_2^{\cdot-}$  efectivamente reaccionaba con el NO formando peroxinitrito en astrocitos tratados con BzATP. Esto se evidenció como un aumento en la producción de  $H_2O_2$  por la SOD1, causado por el incremento en la disponibilidad de  $O_2^{\cdot-}$ . (Fig. 14A).

### ***Citotoxicidad mediada por ERON***

Existen numerosas vías por las cuales el  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ , NO, peroxinitrito y sus derivados (el radical hidroxilo y el radical carbonato especialmente) son citotóxicos. La oxidación y nitración de proteínas y lípidos puede causar una pérdida de su función y/o la ganancia de nuevas con resultados tóxicos. Al día de hoy la nitración de tirosinas por peroxinitrito ha sido identificada en más de 50 enfermedades humanas y 80 de modelos animales (Greenacre and Ischiropoulos, 2001; Pacher et

al., 2007; Souza et al., 2008). El ADN también es susceptible a la oxidación, nitración y fragmentación por parte de ERON, acumulando daños que llevan a la inducción de vías apoptóticas. El daño también se extiende a cascadas de señalización intracelular, por daño a proteínas y lípidos involucrados y por desregulación de las cascadas donde las ERON se encuentran involucradas fisiológicamente.

El daño por radicales libres en la mitocondria puede llevar a la inhibición de enzimas como la aconitasa y de la mayoría de los elementos de la cadena de transporte de electrones, llevando a la producción de más ERON y disfunción mitocondrial (Castro et al., 1994; Pacher et al., 2007). Trabajos previos en nuestro laboratorio relacionan el aumento del  $O_2^{\cdot-}$  mitocondrial con la neurotoxicidad astrocitaria, indicando que la función mitocondrial es necesaria para que el astrocito soporte la supervivencia de motoneuronas (Cassina et al., 2008). A su vez, nuestro laboratorio ha determinado que la exposición de astrocitos a peroxinitrito es capaz de generar un fenotipo neurotóxico para motoneuronas cocultivadas (Cassina et al., 2002; Pehar et al., 2002).

La acumulación del daño a proteínas, lípidos, ADN y la disfunción mitocondrial y alteración de vías de señalización generalmente lleva al desencadenamiento de la apoptosis o necrosis celular, como vimos en motoneuronas puras (fig. 18A). Sin embargo, los astrocitos son altamente resistentes, en parte por su alto contenido de antioxidantes y porque pueden sobrevivir a expensas del metabolismo anaeróbico (Almeida et al., 2001).

A pesar de su gran capacidad de sobrevivir a variados insultos, su activación determina que sus actividades tróficas descienden e incrementan las tóxicas. En este trabajo mostramos que la inducción de estrés oxidativo por activación del receptor  $P2X_7$  en astrocitos media el desarrollo de un fenotipo neurotóxico para motoneuronas ya que atrapadores de NO,  $O_2^{\cdot-}$  y peroxinitrito lograron revertir sus efectos deletéreos (Fig. 15). Vale destacar que estos compuestos no se encontraron en contacto con las motoneuronas, si no que actuaron directamente sobre el

astrocito estimulado con BzATP, denotando un rol del estrés oxidativo generado por el propio astrocito y ejerciendo daño sobre sí mismo.

Las cascadas de señalización y eventos a nivel intracelular que conectan la activación del receptor P2X<sub>7</sub>, la producción de ERON y la neurotoxicidad astrocitaria no fueron caracterizadas, pero sin duda constituyen un punto a estudiar por ser blancos potenciales para la modulación de la citotoxicidad por ATP.

## **Rol del ATP en la ELA**

La importancia que las ERON poseen a nivel del sistema nervioso en la enfermedad y en la interacción glia-motoneurona se evidencia en el trabajo de Harraz y colaboradores (Harraz et al., 2008). La administración de un inhibidor de la enzima NADPH oxidasa en ratones SOD1<sup>G93A</sup> lleva al mayor aumento de la supervivencia de estos animales encontrado hasta el momento, de 125 a 230 días, postergando el inicio de la enfermedad y enlenteciendo su transcurso.

Resultados preliminares del laboratorio sugieren que los astrocitos SOD1<sup>G93A</sup> liberarían una elevada cantidad de ATP al medio extracelular. Asimismo, aquí mostramos que el ATP a través del receptor P2X<sub>7</sub> es capaz de inducir estrés oxidativo y neurotoxicidad en astrocitos, características compartidas con los astrocitos SOD1<sup>G93A</sup>. Los astrocitos SOD1<sup>G93A</sup> presentan un fenotipo neurotóxico que lleva a la muerte de un 40% de las motoneuronas en co-cultivo (Vargas et al., 2006; Nagai et al., 2007). Sorprendentemente, encontramos que la inhibición del receptor P2X<sub>7</sub> o la hidrólisis rápida del ATP por 48 horas previo al establecimiento del co-cultivo fue suficiente para prevenir la neurotoxicidad de los astrocitos SOD1<sup>G93A</sup>, restableciendo la supervivencia de motoneuronas al mismo nivel que los astrocitos no transgénicos (Fig. 16).

Investigaciones previas de nuestro laboratorio han mostrado que las condiciones inflamatorias y de estrés oxidativo a las que se encuentran sometidos basalmente los astrocitos SOD1<sup>G93A</sup> determinan que su proliferación se encuentre aumentada

respecto a los astrocitos no transgénicos. Dado que el ATP es capaz de inducir tanto la respuesta inflamatoria, estrés oxidativo y un incremento en la proliferación de astrocitos (Neary et al., 1998; Burnstock, 2008) hipotetizamos que el ATP extracelular podría ser uno de los factores que median la elevada proliferación en astrocitos SOD1<sup>G93A</sup>. Efectivamente, mediante la hidrólisis del ATP extracelular, logramos reducir significativamente su proliferación. El hecho de que en respuesta a la apirasa exista un leve aumento en la proliferación de los astrocitos no transgénicos, y que a su vez la proliferación no haya sido revertida totalmente en los SOD1<sup>G93A</sup> podría deberse a las propiedades mitogénicas de la adenosina (Neary et al., 1998) (Fig. 17A).

Los astrocitos SOD1<sup>G93A</sup> presentan disfunción mitocondrial, disminución en su capacidad antioxidante, alteraciones en la liberación de factores y citoquinas pro-inflamatorias y un incremento en los niveles de NO, O<sub>2</sub><sup>-</sup> y peroxinitrito (resultados no publicados; (Cassina et al., 2005; Vargas et al., 2005; Hensley et al., 2006; Vargas et al., 2006; Cassina et al., 2008). Además, nuestros resultados sugieren que los astrocitos SOD1<sup>G93A</sup> liberan suficiente ATP al medio extracelular para activar autócrinamente el receptor P2X<sub>7</sub>, induciendo un fenotipo neurotóxico y un incremento en su proliferación. Sin duda constituye un objetivo futuro estudiar si la inhibición de P2X<sub>7</sub> en estos astrocitos y en otros modelos de neurodegeneración es capaz de disminuir el estrés oxidativo y fenotipo inflamatorio que presentan.

La participación del receptor P2X<sub>7</sub> en la ELA no ha sido estudiada, sin embargo podría estar implicado en varios procesos. Elevado ATP extracelular podría activar al receptor P2X<sub>7</sub> en astrocitos, microglía y células inmunes infiltrantes causando la activación de NADPH oxidasa y estrés nitro-oxidativo. A su vez la presencia de purinas extracelulares promovería la migración de la microglía y células inmunes a las zonas de mayor daño, a través de CD39 y MCP-1 (Panenka et al., 2001; Farber et al., 2008). La producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO, peroxinitrito y citoquinas pro-inflamatorias en estas células agravaría aún más el daño a las motoneuronas.

## **La activación de P2X<sub>7</sub> en motoneuronas**

Los astrocitos son capaces de liberar al medio extracelular grandes cantidades de ATP en respuesta a insultos e inflamación en el sistema nervioso, como vimos en los astrocitos SOD1<sup>G93A</sup>. Los efectos del ATP sobre astrocitos se exponen en las figuras 10 a 17. Sin embargo, las motoneuronas también expresan una variedad de receptores purinérgicos, incluyendo el P2X<sub>7</sub>, por lo que evaluamos los posibles efectos directos del ATP sobre este receptor.

La activación de P2X<sub>7</sub> causó un descenso del 30% en la supervivencia de motoneuronas. Este efecto fue independiente de la concentración, posiblemente porque las motoneuronas son cultivadas a extrema baja densidad, aumentando mucho la disponibilidad del BzATP y enlenteciendo su degradación (Fig. 18A).

La activación del receptor P2X<sub>7</sub> en neuronas es capaz de inducir la muerte celular tanto por vía necrótica como por apoptosis mediada por caspasas (Kong et al., 2005; Franke et al., 2006; Jun et al., 2007). En este caso, la activación de las caspasas fue necesaria para inducir la muerte celular (Fig. 18B). A su vez la muerte se acompañó por la liberación de citocromo c mitocondrial al citoplasma, condensación de la cromatina, fragmentación de núcleos y aumento de inmunorreactividad para Caspasa 3 clivada (Fig. 18D), eventos característicos de la apoptosis.

En las motoneuronas puras la activación de P2X<sub>7</sub> llevó a la muerte por una vía similar a la encontrada en astrocitos. Las ERON mediaron daño celular y consiguiente activación de apoptosis en un proceso dependiente de calcio (Fig. 18C).

La capacidad del receptor P2X<sub>7</sub> de inducir muerte de motoneuronas se ha visto en el trauma agudo de médula espinal, donde existe un gran aumento en la cantidad de ATP extracelular y muerte de motoneuronas (Wang et al., 2004). En este trabajo estudiamos las vías íntimas de inducción de muerte por P2X<sub>7</sub> en motoneuronas, describiendo las vías apoptóticas implicadas y estableciendo nuevos blancos para la modulación de la muerte iniciada por la activación de P2X<sub>7</sub>.

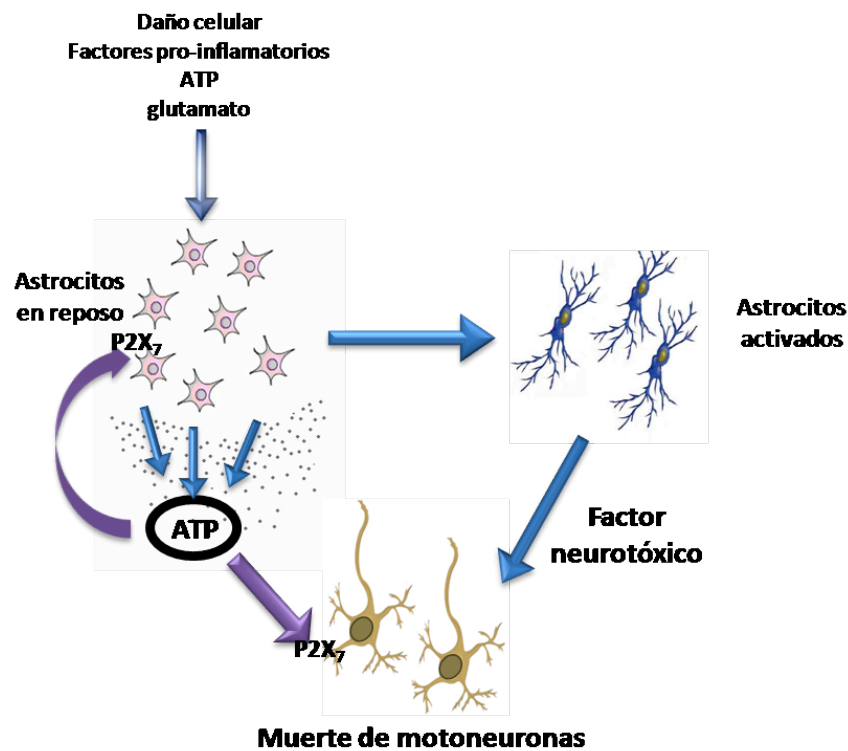
## **CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

En este trabajo se describe un nuevo mecanismo de injuria en astrocitos y motoneuronas espinales: la activación de P2X<sub>7</sub>. La señalización por ATP a través del receptor P2X<sub>7</sub> fue responsable de la muerte de motoneuronas espinales, iniciada tanto por su activación en astrocitos como en las mismas motoneuronas. En ambos tipos celulares se desató una respuesta común, el estrés oxidativo. Sin embargo, las consecuencias fueron distintas: los astrocitos adoptaron un fenotipo neurotóxico mientras que en las motoneuronas llevó a la muerte por apoptosis. En las figuras 19 y 20 se esquematiza y resumen los principales hallazgos presentados en esta tesis y se incluyen algunos elementos que componen nuestra hipótesis global sobre los efectos del ATP.

Estudios preliminares llevados a cabo en el laboratorio sugieren que el ATP extracelular se encuentra aumentado en los astrocitos SOD1<sup>G93A</sup>. En concordancia, aquí describimos que en estos astrocitos el receptor P2X<sub>7</sub> se encuentra activado basalmente y es responsable de su neurotoxicidad para motoneuronas. Resultados preliminares sugieren que su inhibición también disminuye los niveles de O<sub>2</sub><sup>-</sup> de estos astrocitos. Un objetivo a corto plazo es estudiar si esta respuesta se debe a la inhibición de la enzima NADPH oxidasa, que se encuentra activada en animales SOD1<sup>G93A</sup> (Harraz et al., 2008)

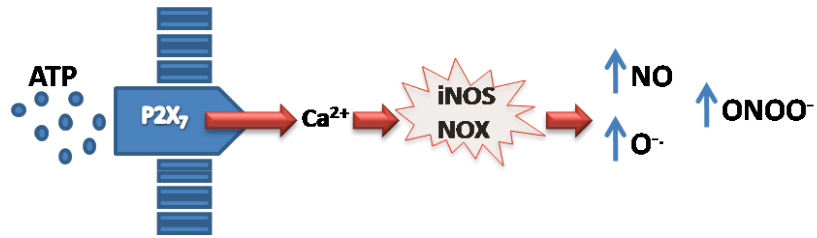
Debido a que encontramos que la inhibición de P2X<sub>7</sub> en astrocitos resulta protectora para motoneuronas, planes futuros en nuestro laboratorio incluyen extender nuestros resultados en cultivo a modelos animales de ELA. Específicamente, evaluaremos si administración de BBG es capaz de extender la vida de los ratones SOD1<sup>G93A</sup> mediante la inhibición sistémica de P2X<sub>7</sub>. El ATP podría no sólo actuar sobre astrocitos y motoneuronas, con las consecuencias descritas en esta tesis, sino que también sobre la microglía y células inmunes infiltrantes. El ATP extracelular es capaz de activar estas células, propagando y amplificando la respuesta inflamatoria.

Dados los efectos deletéreos de la señalización por ATP a través de P2X<sub>7</sub> aquí descritos, proponemos que su inhibición podría constituir una nueva estrategia neuroprotectora para enfermedades neurodegenerativas donde exista un incremento en su nivel extracelular.



**Fig. 19. Blancos del ATP extracelular y sus efectos.**

El la lisis celular, los factores pro-inflamatorios, el glutamato y el ATP en si mismo son capaces de iniciar la movilización de grandes cantidades de ATP al medio extracelular. El ATP puede actuar sobre el receptor P2X<sub>7</sub> de astrocitos, activándolos y provocando la liberación de uno o más factores neurotóxicos capaz de inducir muerte de motoneuronas. A su vez el ATP también puede actuar en receptores P2X<sub>7</sub> de motoneuronas, induciendo la muerte directamente.



**Fig. 20. Mecanismo propuesto de inducción de neurotoxicidad en astrocitos y muerte de motoneuronas por activación de P2X<sub>7</sub>.**

El incremento en el ATP extracelular activa el receptor P2X<sub>7</sub> en astrocitos y motoneuronas, iniciando un influjo de calcio que resulta en la activación de las enzimas iNOS y NADPH oxidasa (NOX), y el consiguiente aumento en el O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO y peroxinitrito que actuarán induciendo daño celular en múltiples niveles.



## **REFERENCIAS**

- Abbracchio MP, Burnstock G (1994) Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 64:445-475.
- Abe K, Pan LH, Watanabe M, Kato T, Itoyama Y (1995) Induction of nitrotyrosine-like immunoreactivity in the lower motor neuron of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 199:152-154.
- Abraham EH, Prat AG, Gerweck L, Seneveratne T, Arceci RJ, Kramer R, Guidotti G, Cantiello HF (1993) The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:312-316.
- Abramov AY, Jacobson J, Wientjes F, Hothersall J, Canevari L, Duchen MR (2005) Expression and modulation of an NADPH oxidase in mammalian astrocytes. *J Neurosci* 25:9176-9184.
- Almeida A, Almeida J, Bolanos JP, Moncada S (2001) Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15294-15299.
- Amadio S, D'Ambrosi N, Cavaliere F, Murra B, Sancesario G, Bernardi G, Burnstock G, Volonte C (2002) P2 receptor modulation and cytotoxic function in cultured CNS neurons. *Neuropharmacology* 42:489-501.
- Anderson CM, Nedergaard M (2006) Emerging challenges of assigning P2X7 receptor function and immunoreactivity in neurons. *Trends Neurosci* 29:257-262.
- Anderson CM, Bergher JP, Swanson RA (2004) ATP-induced ATP release from astrocytes. *J Neurochem* 88:246-256.
- Andries M, Van Damme P, Robberecht W, Van Den Bosch L (2007) Ivermectin inhibits AMPA receptor-mediated excitotoxicity in cultured motor neurons and extends the life span of a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 25:8-16.
- Bal-Price A, Moneer Z, Brown GC (2002) Nitric oxide induces rapid, calcium-dependent release of vesicular glutamate and ATP from cultured rat astrocytes. *Glia* 40:312-323.
- Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Peluffo H, Viera L, Estevez AG, Beckman JS (2004) A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Brain Res Rev* 47:263-274.
- Barrera NP, Ormond SJ, Henderson RM, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM (2005) Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *J Biol Chem* 280:10759-10765.
- Beal MF, Ferrante RJ, Browne SE, Matthews RT, Kowall NW, Brown RH, Jr. (1997) Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 42:644-654.
- Beckman JS, Carson M, Smith CD, Koppenol WH (1993) ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* 364:584.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1620-1624.
- Bernardino L, Balosso S, Ravizza T, Marchi N, Ku G, Randle JC, Malva JO, Vezzani A (2008) Inflammatory events in hippocampal slice cultures prime neuronal susceptibility to excitotoxic injury: a crucial role of P2X7 receptor-mediated IL-1beta release. *J Neurochem* 106:271-280.

- Bodin P, Burnstock G (2001) Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res* 26:959-969.
- Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW (2006) Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312:1389-1392.
- Brambilla R, Neary JT, Cattabeni F, Cottini L, D'Ippolito G, Schiller PC, Abbracchio MP (2002) Induction of COX-2 and reactive gliosis by P2Y receptors in rat cortical astrocytes is dependent on ERK1/2 but independent of calcium signalling. *J Neurochem* 83:1285-1296.
- Braun N, Zhu Y, Kriegstein J, Culmsee C, Zimmermann H (1998) Upregulation of the enzyme chain hydrolyzing extracellular ATP after transient forebrain ischemia in the rat. *J Neurosci* 18:4891-4900.
- Brujin LI, Miller TM, Cleveland DW (2004) Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* 27:723-749.
- Burgos M, Neary JT, Gonzalez FA (2007) P2Y2 nucleotide receptors inhibit trauma-induced death of astrocytic cells. *J Neurochem* 103:1785-1800.
- Burnstock G (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24:509-581.
- Burnstock G (2006) Purinergic signalling. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S172-181.
- Burnstock G (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87:659-797.
- Burnstock G (2008) Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 7:575-590.
- Burnstock G, Kennedy C (1985) Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 16:433-440.
- Burnstock G, Satchell DG, Smythe A (1972) A comparison of the excitatory and inhibitory effects of non-adrenergic, non-cholinergic nerve stimulation and exogenously applied ATP on a variety of smooth muscle preparations from different vertebrate species. *Br J Pharmacol* 46:234-242.
- Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A (1997) Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. 1970. *Br J Pharmacol* 120:337-357; discussion 334-336.
- Casanovas A, Hernandez S, Tarabal O, Rossello J, Esquerda JE (2008) Strong P2X4 purinergic receptor-like immunoreactivity is selectively associated with degenerating neurons in transgenic rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Comp Neurol* 506:75-92.
- 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, Estevez AG, Thompson JA, Beckman JS, Barbeito L (2005) Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 93:38-46.
- Cassina P, Cassina A, Pehar M, Castellanos R, Gandelman M, de Leon A, Robinson KM, Mason RP, Beckman JS, Barbeito L, Radi R (2008) Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *J Neurosci* 28:4115-4122.
- Castro L, Rodriguez M, Radi R (1994) Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J Biol Chem* 269:29409-29415.

- Cavaliere F, Sancesario G, Bernardi G, Volonte C (2002) Extracellular ATP and nerve growth factor intensify hypoglycemia-induced cell death in primary neurons: role of P2 and NGFRp75 receptors. *J Neurochem* 83:1129-1138.
- Cavaliere F, D'Ambrosi N, Sancesario G, Bernardi G, Volonte C (2001a) Hypoglycaemia-induced cell death: features of neuroprotection by the P2 receptor antagonist basilen blue. *Neurochem Int* 38:199-207.
- Cavaliere F, Amadio S, Sancesario G, Bernardi G, Volonte C (2004) Synaptic P2X7 and oxygen/glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:392-398.
- Cavaliere F, D'Ambrosi N, Ciotti MT, Mancino G, Sancesario G, Bernardi G, Volonte C (2001b) Glucose deprivation and chemical hypoxia: neuroprotection by P2 receptor antagonists. *Neurochem Int* 38:189-197.
- Cavaliere F, Florenzano F, Amadio S, Fusco FR, Viscomi MT, D'Ambrosi N, Vacca F, Sancesario G, Bernardi G, Molinari M, Volonte C (2003) Up-regulation of P2X2, P2X4 receptor and ischemic cell death: prevention by P2 antagonists. *Neuroscience* 120:85-98.
- Cockayne DA, Dunn PM, Zhong Y, Rong W, Hamilton SG, Knight GE, Ruan HZ, Ma B, Yip P, Nunn P, McMahan SB, Burnstock G, Ford AP (2005) P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. *J Physiol* 567:621-639.
- Cockayne DA, Hamilton SG, Zhu QM, Dunn PM, Zhong Y, Novakovic S, Malmberg AB, Cain G, Berson A, Kassotakis L, Hedley L, Lachnit WG, Burnstock G, McMahan SB, Ford AP (2000) Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature* 407:1011-1015.
- Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North RA, Buell G (1997) Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36:1277-1283.
- Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H, Kang J, Naus CC, Nedergaard M (1998) Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15735-15740.
- Cressman VL, Lazarowski E, Homolya L, Boucher RC, Koller BH, Grubb BR (1999) Effect of loss of P2Y(2) receptor gene expression on nucleotide regulation of murine epithelial Cl(-) transport. *J Biol Chem* 274:26461-26468.
- Chessell IP, Hatcher JP, Bountra C, Michel AD, Hughes JP, Green P, Egerton J, Murfin M, Richardson J, Peck WL, Grahames CB, Casula MA, Yiangou Y, Birch R, Anand P, Buell GN (2005) Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 114:386-396.
- Choi HB, Ryu JK, Kim SU, McLarnon JG (2007) Modulation of the purinergic P2X7 receptor attenuates lipopolysaccharide-mediated microglial activation and neuronal damage in inflamed brain. *J Neurosci* 27:4957-4968.
- Dare E, Schulte G, Karovic O, Hammarberg C, Fredholm BB (2007) Modulation of glial cell functions by adenosine receptors. *Physiol Behav* 92:15-20.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8:752-758.
- Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, Maniatis T, Eggan K (2007) Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* 10:608-614.
- Donnelly-Roberts DL, Jarvis MF (2007) Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br J Pharmacol* 151:571-579.

- Fabre JE, Nguyen M, Latour A, Keifer JA, Audoly LP, Coffman TM, Koller BH (1999) Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice. *Nat Med* 5:1199-1202.
- Farber K, Markworth S, Pannasch U, Nolte C, Prinz V, Kronenberg G, Gertz K, Endres M, Bechmann I, Enjyoji K, Robson SC, Kettenmann H (2008) The ectonucleotidase cd39/ENTPDase1 modulates purinergic-mediated microglial migration. *Glia* 56:331-341.
- Ferrante RJ, Shinobu LA, Schulz JB, Matthews RT, Thomas CE, Kowall NW, Gurney ME, Beal MF (1997) Increased 3-nitrotyrosine and oxidative damage in mice with a human copper/zinc superoxide dismutase mutation. *Ann Neurol* 42:326-334.
- Fields RD, Burnstock G (2006) Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 7:423-436.
- Fiske CH, Subbarow Y (1929) Phosphorus Compounds of Muscle and Liver. *Science* 70:381-382.
- Franke H, Illes P (2006) Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacol Ther* 109:297-324.
- Franke H, Krugel U, Illes P (1999) P2 receptor-mediated proliferative effects on astrocytes in vivo. *Glia* 28:190-200.
- Franke H, Krugel U, Illes P (2006) P2 receptors and neuronal injury. *Pflugers Arch* 452:622-644.
- Franke H, Krugel U, Schmidt R, Grosche J, Reichenbach A, Illes P (2001a) P2 receptor-types involved in astrogliosis in vivo. *Br J Pharmacol* 134:1180-1189.
- Franke H, Grosche J, Schadlich H, Krugel U, Allgaier C, Illes P (2001b) P2X receptor expression on astrocytes in the nucleus accumbens of rats. *Neuroscience* 108:421-429.
- Franke H, Gunther A, Grosche J, Schmidt R, Rossner S, Reinhardt R, Faber-Zuschratter H, Schneider D, Illes P (2004) P2X7 receptor expression after ischemia in the cerebral cortex of rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:686-699.
- Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford AP (2006) Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch* 452:513-537.
- Gong YH, Parsadanian AS, Andreeva A, Snider WD, Elliott JL (2000) Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *J Neurosci* 20:660-665.
- Gourine AV, Dale N, Llaudet E, Poputnikov DM, Spyer KM, Gourine VN (2007) Release of ATP in the central nervous system during systemic inflammation: real-time measurement in the hypothalamus of conscious rabbits. *J Physiol* 585:305-316.
- Greenacre SA, Ischiropoulos H (2001) Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic Res* 34:541-581.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliando J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264:1772-1775.
- Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, Kater SB (1999) ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* 19:520-528.
- Harraz MM, Marden JJ, Zhou W, Zhang Y, Williams A, Sharov VS, Nelson K, Luo M, Paulson H, Schoneich C, Engelhardt JF (2008) SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *J Clin Invest* 118:659-670.
- Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan WB, Julius D (2006) The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci* 9:1512-1519.

- Hensley K, Abdel-Moaty H, Hunter J, Mhatre M, Mou S, Nguyen K, Potapova T, Pye QN, Qi M, Rice H, Stewart C, Stroukoff K, West M (2006) Primary glia expressing the G93A-SOD1 mutation present a neuroinflammatory phenotype and provide a cellular system for studies of glial inflammation. *J Neuroinflammation* 3:2.
- Hewinson J, Mackenzie AB (2007) P2X(7) receptor-mediated reactive oxygen and nitrogen species formation: from receptor to generators. *Biochem Soc Trans* 35:1168-1170.
- Hewinson J, Moore SF, Glover C, Watts AG, MacKenzie AB (2008) A key role for redox signaling in rapid P2X7 receptor-induced IL-1 beta processing in human monocytes. *J Immunol* 180:8410-8420.
- Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S (2001) Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J Neurosci* 21:1975-1982.
- Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD (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* 99:1604-1609.
- Inoue K (2002) Microglial activation by purines and pyrimidines. *Glia* 40:156-163.
- Jaarsma D, Teuling E, Haasdijk ED, De Zeeuw CI, Hoogenraad CC (2008) Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase is sufficient to induce amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice. *J Neurosci* 28:2075-2088.
- John GR, Simpson JE, Woodroffe MN, Lee SC, Brosnan CF (2001) Extracellular nucleotides differentially regulate interleukin-1beta signaling in primary human astrocytes: implications for inflammatory gene expression. *J Neurosci* 21:4134-4142.
- Jun DJ, Kim J, Jung SY, Song R, Noh JH, Park YS, Ryu SH, Kim JH, Kong YY, Chung JM, Kim KT (2007) Extracellular ATP mediates necrotic cell swelling in SN4741 dopaminergic neurons through P2X7 receptors. *J Biol Chem* 282:37350-37358.
- Kang J, Kang N, Lovatt D, Torres A, Zhao Z, Lin J, Nedergaard M (2008) Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J Neurosci* 28:4702-4711.
- Kang TC, Park SK, Hwang IK, An SJ, Won MH (2004) GABA(B) receptor-mediated regulation of P2X7 receptor expression in the gerbil hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 121:12-18.
- Ke HZ, Qi H, Weidema AF, Zhang Q, Panupinthu N, Crawford DT, Grasser WA, Paralkar VM, Li M, Audoly LP, Gabel CA, Jee WS, Dixon SJ, Sims SM, Thompson DD (2003) Deletion of the P2X7 nucleotide receptor reveals its regulatory roles in bone formation and resorption. *Mol Endocrinol* 17:1356-1367.
- Khakh BS, North RA (2006) P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 442:527-532.
- Kharlamov A, Jones SC, Kim DK (2002) Suramin reduces infarct volume in a model of focal brain ischemia in rats. *Exp Brain Res* 147:353-359.
- Kim SY, Moon JH, Lee HG, Kim SU, Lee YB (2007) ATP released from beta-amyloid-stimulated microglia induces reactive oxygen species production in an autocrine fashion. *Exp Mol Med* 39:820-827.
- Kong Q, Wang M, Liao Z, Camden JM, Yu S, Simonyi A, Sun GY, Gonzalez FA, Erb L, Seye CI, Weisman GA (2005) P2X(7) nucleotide receptors mediate caspase-8/9/3-dependent apoptosis in rat primary cortical neurons. *Purinergic Signal* 1:337-347.
- Krugel U, Kittner H, Franke H, Illes P (2001) Accelerated functional recovery after neuronal injury by P2 receptor blockade. *Eur J Pharmacol* 420:R3-4.
- Kucher BM, Neary JT (2005) Bi-functional effects of ATP/P2 receptor activation on tumor necrosis factor-alpha release in lipopolysaccharide-stimulated astrocytes. *J Neurochem* 92:525-535.

- Labasi JM, Petrushova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, Payette MM, Brissette W, Wicks JR, Audoly L, Gabel CA (2002) Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol* 168:6436-6445.
- Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK (2000) Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *J Biol Chem* 275:31061-31068.
- Lepore AC, Dejea C, Carmen J, Rauck B, Kerr DA, Sofroniew MV, Maragakis NJ (2008) Selective ablation of proliferating astrocytes does not affect disease outcome in either acute or chronic models of motor neuron degeneration. *Exp Neurol* 211:423-432.
- Lin HL, Murphy S (1997) Regulation of astrocyte nitric oxide synthase type II expression by ATP and glutamate involves loss of transcription factor binding to DNA. *J Neurochem* 69:612-616.
- Lino MM, Schneider C, Caroni P (2002) Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J Neurosci* 22:4825-4832.
- Linseman DA (2008) Targeting Oxidative Stress for Neuroprotection. *Antioxid Redox Signal*.
- Liu HT, Toychiev AH, Takahashi N, Sabirov RZ, Okada Y (2008) Maxi-anion channel as a candidate pathway for osmosensitive ATP release from mouse astrocytes in primary culture. *Cell Res* 18:558-565.
- Masse K, Bhamra S, Eason R, Dale N, Jones EA (2007) Purine-mediated signalling triggers eye development. *Nature* 449:1058-1062.
- Matute C (2008) P2X7 Receptors in Oligodendrocytes: A Novel Target for Neuroprotection. *Mol Neurobiol*.
- Matute C, Torre I, Perez-Cerda F, Perez-Samartin A, Alberdi E, Etxebarria E, Arranz AM, Ravid R, Rodriguez-Antiguedad A, Sanchez-Gomez M, Domercq M (2007) P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* 27:9525-9533.
- Melani A, Turchi D, Vannucchi MG, Cipriani S, Gianfriddo M, Pedata F (2005) ATP extracellular concentrations are increased in the rat striatum during in vivo ischemia. *Neurochem Int* 47:442-448.
- Miller TM, Kaspar BK, Kops GJ, Yamanaka K, Christian LJ, Gage FH, Cleveland DW (2005) Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 57:773-776.
- Morrone FB, Oliveira DL, Gamermann P, Stella J, Wofchuk S, Wink MR, Meurer L, Edelweiss MI, Lenz G, Battastini AM (2006) In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. *BMC Cancer* 6:226.
- Mulryan K, Gitterman DP, Lewis CJ, Vial C, Leckie BJ, Cobb AL, Brown JE, Conley EC, Buell G, Pritchard CA, Evans RJ (2000) Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. *Nature* 403:86-89.
- 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.
- Neary JT, McCarthy M, Kang Y, Zuniga S (1998) Mitogenic signaling from P1 and P2 purinergic receptors to mitogen-activated protein kinase in human fetal astrocyte cultures. *Neurosci Lett* 242:159-162.
- Nedeljkovic N, Bjelobaba I, Lavrnja I, Stojkov D, Pekovic S, Rakic L, Stojiljkovic M (2008) Early temporal changes in ecto-nucleotidase activity after cortical stab injury in rat. *Neurochem Res* 33:873-879.

- Nedeljkovic N, Bjelobaba I, Subasic S, Lavrnja I, Pekovic S, Stojkov D, Vjestica A, Rakic L, Stojiljkovic M (2006) Up-regulation of ectonucleotidase activity after cortical stab injury in rats. *Cell Biol Int* 30:541-546.
- Nicke A, Baumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G (1998) P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *Embo J* 17:3016-3028.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87:315-424.
- Panenka W, Jijon H, Herx LM, Armstrong JN, Feighan D, Wei T, Yong VW, Ransohoff RM, MacVicar BA (2001) P2X7-like receptor activation in astrocytes increases chemokine monocyte chemoattractant protein-1 expression via mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci* 21:7135-7142.
- Pangrsic T, Potokar M, Stenovc M, Kreft M, Fabbretti E, Nistri A, Pryazhnikov E, Khiroug L, Giniatullin R, Zorec R (2007) Exocytotic release of ATP from cultured astrocytes. *J Biol Chem* 282:28749-28758.
- Parvathenani LK, Tertysnikova S, Greco CR, Roberts SB, Robertson B, Posmantur R (2003) P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 278:13309-13317.
- Pehar M, Martinez-Palma L, Peluffo H, Kamaid A, Cassina P, Barbeito L (2002) Peroxynitrite-induced cytotoxicity in cultured astrocytes is associated with morphological changes and increased nitrotyrosine immunoreactivity. *Neurotox Res* 4:87-93.
- Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Castellanos R, Viera L, Beckman JS, Estevez AG, Barbeito L (2004) Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 89:464-473.
- Phillis JW, O'Regan MH, Perkins LM (1993) Adenosine 5'-triphosphate release from the normoxic and hypoxic in vivo rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 151:94-96.
- Polymenidou M, Cleveland DW (2008) Motor neuron disease: The curious ways of ALS. *Nature* 454:284-285.
- Pramatarova A, Laganieri J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau GA (2001) Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci* 21:3369-3374.
- Queiroz G, Gebicke-Haerter PJ, Schobert A, Starke K, von Kugelgen I (1997) Release of ATP from cultured rat astrocytes elicited by glutamate receptor activation. *Neuroscience* 78:1203-1208.
- Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, Carthy JM, Leroux MA, Lee DC, Wong LF, Bilsland LG, Greensmith L, Kingsman SM, Mitrophanous KA, Mazarakis ND, Azzouz M (2005) Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* 11:429-433.
- Raoul C, Estevez AG, Nishimune H, Cleveland DW, deLapeyriere O, Henderson CE, Haase G, Pettmann B (2002) Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* 35:1067-1083.
- Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA, Surprenant A (1997) The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem* 272:5482-5486.
- Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH, Jr., Scott RW, Snider WD (1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 13:43-47.

- Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM, Murphy MP, Beckman JS (2006) Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:15038-15043.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59-62.
- Rowland LP (2001) How amyotrophic lateral sclerosis got its name: the clinical-pathologic genius of Jean-Martin Charcot. *Arch Neurol* 58:512-515.
- Ryten M, Koshi R, Knight GE, Turmaine M, Dunn P, Cockayne DA, Ford AP, Burnstock G (2007) Abnormalities in neuromuscular junction structure and skeletal muscle function in mice lacking the P2X(2) nucleotide receptor. *Neuroscience* 148:700-711.
- Ryu JK, Kim J, Choi SH, Oh YJ, Lee YB, Kim SU, Jin BK (2002) ATP-induced in vivo neurotoxicity in the rat striatum via P2 receptors. *Neuroreport* 13:1611-1615.
- Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L (1996) P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* 97:2517-2524.
- Schock SC, Munyao N, Yakubchik Y, Sabourin LA, Hakim AM, Ventureyra EC, Thompson CS (2007) Cortical spreading depression releases ATP into the extracellular space and purinergic receptor activation contributes to the induction of ischemic tolerance. *Brain Res* 1168:129-138.
- Sharp AJ, Polak PE, Simonini V, Lin SX, Richardson JC, Bongarzone ER, Feinstein DL (2008) P2x7 deficiency suppresses development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* 5:33.
- Shinozaki Y, Koizumi S, Ohno Y, Nagao T, Inoue K (2006) Extracellular ATP counteracts the ERK1/2-mediated death-promoting signaling cascades in astrocytes. *Glia* 54:606-618.
- Shinozaki Y, Koizumi S, Ishida S, Sawada J, Ohno Y, Inoue K (2005) Cytoprotection against oxidative stress-induced damage of astrocytes by extracellular ATP via P2Y1 receptors. *Glia* 49:288-300.
- Silani V, Pizzuti A, Redaelli LM, Bassani R, Causarano IR, Buscaglia M, Zuliani G, Scarlato G (1987) ALS cerebrospinal fluid enhances human foetal astroglial cell proliferation in vitro. *Adv Exp Med Biol* 209:79-81.
- Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, Gabel CA (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem* 276:125-132.
- Souza JM, Peluffo G, Radi R (2008) Protein tyrosine nitration--functional alteration or just a biomarker? *Free Radic Biol Med* 45:357-366.
- Sperlagh B, Illes P (2007) Purinergic modulation of microglial cell activation. *Purinergic Signal* 3:117-127.
- Stout CE, Costantin JL, Naus CC, Charles AC (2002) Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* 277:10482-10488.
- Stuehr DJ (1999) Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1411:217-230.
- Suadecani SO, Brosnan CF, Scemes E (2006) P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *J Neurosci* 26:1378-1385.
- Suh BC, Kim JS, Namgung U, Ha H, Kim KT (2001) P2X7 nucleotide receptor mediation of membrane pore formation and superoxide generation in human promyelocytes and neutrophils. *J Immunol* 166:6754-6763.



- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272:735-738.
- Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Miyata H, Ueda K, Kohsaka S, Inoue K (2008) P2Y12 receptors in spinal microglia are required for neuropathic pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 28:4949-4956.
- Trujillo M, Ferrer-Sueta G, Radi R (2008) Peroxynitrite detoxification and its biologic implications. *Antioxid Redox Signal* 10:1607-1620.
- 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.
- Vargas MR, Pehar M, Cassina P, Estevez AG, Beckman JS, Barbeito L (2004) Stimulation of nerve growth factor expression in astrocytes by peroxynitrite. *In Vivo* 18:269-274.
- Vargas MR, Pehar M, Cassina P, Martinez-Palma L, Thompson JA, Beckman JS, Barbeito L (2005) Fibroblast growth factor-1 induces heme oxygenase-1 via nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) in spinal cord astrocytes: consequences for motor neuron survival. *J Biol Chem* 280:25571-25579.
- Verderio C, Matteoli M (2001) ATP mediates calcium signaling between astrocytes and microglial cells: modulation by IFN-gamma. *J Immunol* 166:6383-6391.
- Vianna EP, Ferreira AT, Naffah-Mazzacoratti MG, Sanabria ER, Funke M, Cavalheiro EA, Fernandes MJ (2002) Evidence that ATP participates in the pathophysiology of pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy: fluorimetric, immunohistochemical, and Western blot studies. *Epilepsia* 43 Suppl 5:227-229.
- Walter L, Dinh T, Stella N (2004) ATP induces a rapid and pronounced increase in 2-arachidonoylglycerol production by astrocytes, a response limited by monoacylglycerol lipase. *J Neurosci* 24:8068-8074.
- Wang X, Arcuino G, Takano T, Lin J, Peng WG, Wan P, Li P, Xu Q, Liu QS, Goldman SA, Nedergaard M (2004) P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nat Med* 10:821-827.
- Wink MR, Braganhol E, Tamajusuku AS, Casali EA, Karl J, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ, Battastini AM (2003) Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions. *Neurochem Int* 43:621-628.
- Wink MR, Braganhol E, Tamajusuku AS, Lenz G, Zerbini LF, Libermann TA, Sevigny J, Battastini AM, Robson SC (2006) Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. *Neuroscience* 138:421-432.
- Wu J, Holstein JD, Upadhyay G, Lin DT, Conway S, Muller E, Lechleiter JD (2007) Purinergic receptor-stimulated IP3-mediated Ca<sup>2+</sup> release enhances neuroprotection by increasing astrocyte mitochondrial metabolism during aging. *J Neurosci* 27:6510-6520.
- Yamamoto K, Sokabe T, Matsumoto T, Yoshimura K, Shibata M, Ohura N, Fukuda T, Sato T, Sekine K, Kato S, Isshiki M, Fujita T, Kobayashi M, Kawamura K, Masuda H, Kamiya A, Ando J (2006) Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nat Med* 12:133-137.
- Yamanaka K, Boillee S, Roberts EA, Garcia ML, McAlonis-Downes M, Mikse OR, Cleveland DW, Goldstein LS (2008a) Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7594-7599.

- Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW (2008b) Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 11:251-253.
- Yegutkin GG (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783:673-694.
- Yiangou Y, Facer P, Durrenberger P, Chessell IP, Naylor A, Bountra C, Banati RR, Anand P (2006) COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurol* 6:12.
- Yu Y, Ugawa S, Ueda T, Ishida Y, Inoue K, Kyaw Nyunt A, Umemura A, Mase M, Yamada K, Shimada S (2008) Cellular localization of P2X7 receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res* 1194:45-55.
- Zhang Z, Chen G, Zhou W, Song A, Xu T, Luo Q, Wang W, Gu XS, Duan S (2007) Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol* 9:945-953.
- Zimmermann H (2006) Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Found Symp* 276:113-128; discussion 128-130, 233-117, 275-181.