

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Caracterización de un modelo de Enfermedad de Huntington inducido por Tunicamicina

Tesis de grado - Orientación Neurociencias

Bachiller: Romina Barreto

Tutor: Pablo Díaz-Amarilla

Co-Tutor: Emiliano Trias

Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Laboratorio de Neurodegeneración

Institut Pasteur de Montevideo

Montevideo, noviembre de 2014

Quiero agradecer...

En primer lugar a Pablo y Emiliano por todo el tiempo que dedicaron a enseñarme todo lo que se, por la paciencia que tuvieron en cada paso y por la confianza, y sobre todo, por incentivar me día a día.

A Luis por la confianza y la posibilidad de integrarme a este grupo de investigación y trabajar de lo que tanto me gusta.

A Silvia y a mis compañeras del Laboratorio del IIBCE con quienes compartimos el día a día.

A las compañeras el laboratorio del IPMON con quienes hemos comenzado a trabajar.

A Giselle y Patricia, quienes amablemente aceptaron corregir este trabajo.

A mis amigos sin quienes estos años no hubieran sido lo mismo, gracias por acompañarme y aguantarme todo el camino.

Y por supuesto, a mis padres y a mi hermana, quienes me han apoyado desde siempre, quienes confiaron en mí y sin ellos esto no hubiera sido posible.

Índice	Pág.
Resumen	3
1) Introducción y fundamentación	4
Hipótesis	11
Objetivo.....	11
2) Materiales y Métodos	12
1. Diseño experimental	12
Perfusión	15
Obtención de cortes coronales y sagitales de cerebro	15
Inmunohistoquímica.....	16
Western Blot.....	17
2. Fundamento teórico de Materiales y Métodos	20
Inmunohistoquímica.....	20
Microscopía confocal.....	24
Western Blot	25
Electroforesis	25
Preparación de geles PAGE	25
Sembrado y corrida electroforética	26
Transferencia	27
Análisis de resultados - Estadística.....	29
3) Resultados	31
La administración de Tunicamicina indujo un trastorno neurológico similar a la Enfermedad de Huntington.....	31
La Tunicamicina indujo una degeneración estriatal.....	33
Estrés de Retículo Endoplasmático Inducido por Tunicamicina.....	34
La inyección de Tunicamicina induce reactividad astrocitaria en el estriado.....	35
La inyección de TM generó un aumento de la microgliosis en el estriado.....	36
La inyección de TM provocó una degeneración tardía de las neuronas de la sustancia nigra.....	37
4) Discusión	39
5) Conclusiones	44
6) Perspectivas	44
7) Bibliografía	46

Resumen

La Enfermedad de Huntington (EH) es un desorden neurodegenerativo genético, hereditario, progresivo y fatal, causado por una expansión de poliglutamina en la proteína huntingtina. Se caracteriza por la muerte selectiva de neuronas del estriado acompañada por una fuerte reactividad glial. Diferentes mecanismos patológicos como el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial han sido propuestos para explicar la muerte neuronal, aunque el Estrés de Retículo Endoplásmico (ERE) causado por la acumulación de la huntingtina mutada parecería ser un evento primario en dicha patología. En tal sentido, en este trabajo nos propusimos como objetivo determinar si la inducción farmacológica de ERE en el Sistema Nervioso Central (SNC) podría ser suficiente para provocar una patología similar a la EH. Para tal objetivo ratas adultas fueron inyectadas en la cisterna magna con Tunicamicina (TM), una toxina que induce ERE. No se observaron síntomas hasta 4-5 días luego de la inyección, tiempo en el cual las ratas comenzaron a desarrollar un síndrome neurológico y progresivo caracterizado por espasticidad, mioclonía y disminución de fuerzas en miembros delanteros. El análisis histológico mostró una degeneración del estriado, caracterizado por muerte de neuronas NeuN+, y un aumento del volumen ventricular. A nivel celular se observó la inducción de la expresión de BiP y ATF4, proteínas que se sobre-expresan en condiciones de ERE en patologías neurodegenerativas, a medida que progresa la sintomatología. Finalmente se demostró una fuerte reactividad glial, tanto de astrocitos como de microglía, en las regiones afectadas. En conclusión, la inducción de ERE por TM reproduce los fenómenos histopatológicos y sintomatológicos característicos de la EH, lo que podría representar un novedoso modelo inducido químicamente de dicha enfermedad.

1. Introducción y fundamentación

Las enfermedades neurodegenerativas han sido investigadas intensamente en las últimas décadas, sin embargo aún se desconocen las causas últimas que llevan a la muerte progresiva de diferentes poblaciones neuronales en enfermedades tales como la Enfermedad de Alzheimer (EA), Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Huntington (EH) y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). Estas enfermedades son un grupo de patologías multifactoriales que generan desordenes en el Sistema Nervioso Central (SNC) con diferente grado de discapacidad y que afectan a aproximadamente 30 millones de individuos en el mundo. La identificación de una cura para dichas patologías es uno de los mayores desafíos que afronta la neurociencia moderna. Esta necesidad se hace aún más apremiante con el aumento de la esperanza de vida y el aumento simultáneo de la incidencia de las enfermedades neurodegenerativas, convirtiéndose éstas en una gran carga sanitaria y económica para la sociedad. Se considera que el modesto avance en cuanto a la terapéutica de estas enfermedades se debe a que hasta hace no mucho tiempo el foco principal de las investigaciones estuvo centrado exclusivamente en las diferentes poblaciones neuronales degenerantes, sin considerar a las células gliales, como astrocitos y microglía, los mayores componentes celulares del SNC, así como también a las células del sistema inmune. (1-3). En este sentido una característica común en estas patologías es la presencia de una fuerte reactividad glial con mecanismos patogénicos comunes tales como el estrés oxidativo, el mal plegamiento de proteínas, la formación de radicales libres, disfunción mitocondrial y ERE (4).

La **enfermedad de Huntington (EH)** es un desorden neurodegenerativo, genético y hereditario causado por una expansión de poliglutamina en la proteína huntingtina (*HTT*). Es un desorden progresivo y fatal, que clínicamente está caracterizado por alteraciones cognitivas, psiquiátricas y motoras, así como también por fenotipos periféricos que incluyen pérdida de peso y de masa muscular (5). La prevalencia de la enfermedad a nivel mundial es de 3:100000 (6), *apareciendo los primeros síntomas aproximadamente a los 40*

años de edad y progresa de manera constante por 15- 20 años hasta la muerte de los individuos (7). Las alteraciones en la función de motora son los signos más evidentes de EH. La corea, es el síntoma motor principal y es visto en más de un 90% de los pacientes con este trastorno (8, 9). La bradicinesia, lentitud en la ejecución de los movimientos voluntarios y rigidez a la resistencia de movimientos articulares (10, 11) así como la distonía, contracciones musculares involuntarias que pueden causar torsión y posturas anormales, son las características sobresalientes de las etapas más avanzadas de la enfermedad (10, 11). Repeticiones mayores de poliglutamina aceleran la aparición de la patología, que también parece estar influenciada, aunque en menor medida, por modificaciones genéticas y ambientales (12). Se caracteriza por una muerte progresiva de neuronas principalmente estriatales (13, 14).

Desde el descubrimiento de la huntingtina mutante (mHTT) hace 20 años, se han publicado miles de artículos sobre la EH, de los cuales aproximadamente la mitad trata de modelar varios aspectos de la enfermedad. Los descubrimientos en modelos animales han ayudado a elucidar importantes vías que están interrumpidas en EH y han aportado importantes conocimientos sobre la patología de la enfermedad, lo que ha permitido el estudio de posibles drogas para la terapia (15). A pesar de los avances en el entendimiento de la patogénesis de la enfermedad, aún no se ha podido desarrollar un tratamiento efectivo que prevenga o enlentezca el progreso de la misma. La progresión relativamente lenta a menudo requiere de ensayos clínicos largos y por lo tanto costosos. Además, el número de pacientes con EH con los que se cuenta para la realización de ensayos clínicos es limitado, lo que significa que muy pocas drogas potenciales pueden ser probadas en cada estudio. Por lo tanto, los modelos animales resultan de enorme valor no sólo para la identificación de mecanismos patogénicos sino que también para la búsqueda de potenciales drogas previamente a los ensayos clínicos (5).

En las etapas avanzadas de la enfermedad de Huntington, otras áreas del cerebro se pueden ver afectadas. Una de las más afectadas por el arreglo de sus conexiones es las **Sustancia Nigra (SN)**. La **SN** es una estructura del cerebro localizada en el mesencéfalo que está involucrada en las funciones de recompensa, adicción y movimientos (16), además juega un rol fundamental en

el movimiento ocular, la planificación de los movimientos motores y el aprendizaje. Muchas de estas funciones de la SN están mediadas a través del cuerpo estriado. La entrada de las neuronas dopaminérgicas de la SN al cuerpo estriado a través de la vía nigro-estriatal está íntimamente relacionada con la función del cuerpo estriado (17).

Hasta la fecha se han generado más de 20 modelos de roedores diferentes de esta enfermedad. Los **modelos de ratones R6/2 y N171-Q82** son los más utilizados y expresan fragmentos N-terminales truncados de mHTT. R6/1 y R6/2 expresan el exón 1 de la HTT humana, originalmente con 116 y 144 repeticiones de CAG respectivamente, bajo el control del promotor humano de HTT (18). Estos modelos animales basados en fragmentos N-terminales truncados, típicamente muestran un rápido inicio de los síntomas, incluyendo anomalías en el comportamiento motor, cognitivo, pérdida de peso y una reducción de la esperanza de vida (5, 19).

También se han desarrollado dos modelos químicos de la EH, uno basado en la neurotoxina ácido-3-nitropropiónico (3-NP) un inhibidor del complejo II mitocondrial. La inyección intraperitoneal de 3-NP produce lesiones estriatales que serían responsables del trastorno motor típico de la EH que se observa (20). Si bien se sabe que el 3-NP actúa a nivel mitocondrial los mecanismos celulares y por qué el estriado resulta más vulnerable a esta toxina aún se desconocen (21). El otro modelo consiste en la inyección intraestriatal de ácido quinolínico, causando una muerte neuronal estriatal, que podría estar ligada a la excitotoxicidad y/o al estrés oxidativo que se evidencia por la expresión de la forma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS) (22).

Los modelos genéticos tienen la desventaja de ser costosos, poco accesibles y sobre todo difíciles de mantener, sumado a que el número de copias de la mHTT puede sufrir variaciones en las diferentes generaciones, lo que representa una variable difícil de controlar al momento de diseñar los experimentos (23). Esto ha llevado a la permanente búsqueda de nuevos modelos químicos que permitan el estudio de los diferentes mecanismos patogénicos presentes en la EH. A pesar de ello, los modelos animales han sido la herramienta principal para estudiar los mecanismos patogénicos que subyacen a la muerte neuronal así como la respuesta glial característica de la

EH.

El **retículo endoplasmático** es un complejo sistema de membranas dispuestas en forma de sacos aplanados y túbulos que están interconectados entre sí compartiendo el mismo espacio interno. Sus membranas se continúan con las de la envoltura nuclear y se pueden extender hasta las proximidades de la membrana plasmática, llegando a representar más de la mitad de las membranas de una célula. Sus principales funciones son la biosíntesis proteica, el metabolismo de los lípidos y glicosilación entre otras.

Cerca de un tercio del proteoma humano es sintetizado en el Retículo Endoplasmático (RE) y viaja a los compartimentos membranosos como la membrana plasmática o también pueden ser secretados (24). Muchas condiciones fisiológicas y patológicas pueden alterar el proceso de plegamiento de las proteínas en el RE, lo que puede llevar a la acumulación de proteínas desplegadas en el lumen del RE, un estado celular que recibe el nombre de **Estrés de Retículo Endoplasmático (ERE)**, esta condición desencadena una respuesta que se ha mantenido conservada a lo largo de la evolución, llamada **UPR** (del inglés *Unfolded Protein Response*) (25, 26).

El intento inicial de la UPR es estabilizar el ambiente cambiante y restablecer la función normal del RE. Éstos son mecanismos adaptativos que involucran programas transcripcionales que inducen la expresión de genes que aumentan la capacidad de plegamiento de proteínas del RE y promueven la degradación de proteínas desplegadas. La traducción de ARNm también está inhibida, reduciendo de esta manera las nuevas proteínas que deberían ser sintetizadas *de novo*. Cuando la adaptación falla el RE inicia caminos de alarma al activar NF- κ B, un factor de transcripción que induce la expresión de genes que codifican mediadores de defensa del huésped. Un ERE prolongado y/o excesivo desencadena la muerte celular, usualmente mediante apoptosis (27). Cuando las proteínas desplegadas se acumulan en el RE, las chaperonas residentes se activan, liberando a proteínas transmembrana del RE que participan en la inducción de la UPR. Éstas se sitúan en las membranas del RE, con su extremo amino terminal en el lumen del RE y su carboxilo terminal

inyecciones intra-estriatales de TM en dos modelos de ratón de EH, observándose un aumento de los agregados intracelulares de mHTT (32).

Los astrocitos son el tipo celular predominante en el SNC constituido por una población heterogénea de gran plasticidad, capaces de proliferar en diferentes condiciones y que realizan numerosas funciones tanto en condiciones basales como patológicas (33). Dentro de las funciones especializadas en condiciones de estado basal se destacan el soporte metabólico y trófico a las neuronas (34), la regulación de la excitabilidad neuronal y la neurotransmisión mediante el control de la disponibilidad de glutamato en la hendidura sináptica (35). De esta forma los astrocitos no solo proveen de un microambiente físico, trófico y metabólico para la supervivencia neuronal sino que además participan en la generación y el procesamiento de la información neural (36). En respuesta al daño, los astrocitos responden adoptando un fenotipo reactivo denominado astrogliosis, caracterizado morfológicamente por hipertrofia de los núcleos y de los cuerpos celulares, aumento de la proliferación y el desarrollo de procesos gruesos y largos con un alto contenido de la proteína GFAP (del inglés *Glial Fibrillary Acidic Protein*) (1). Las neuronas no sólo son dependientes metabólicamente de los astrocitos sino que además interactúan de manera continua con dichas células para mantener regulados los niveles extracelulares de glutamato (37). En este sentido los astrocitos remueven aproximadamente el 80% del glutamato de las sinapsis a través de la expresión de los transportadores de glutamato GLT-1 y GLAST (38), evitando un fenómeno conocido como excitotoxicidad (39). Estudios en animales *knockout* para estos transportadores han mostrado que un exceso de glutamato extracelular es capaz de inducir un fenotipo neurológico motor progresivo (40). Se ha observado, en otros modelos de enfermedades neurodegenerativas, una disminución en la expresión de GLT-1 astrocitario, lo que genera un aumento de los niveles de glutamato extracelular previo a la muerte neuronal, llevando a proponer que los astrocitos son protagonistas relevantes en la patogénesis (23). Sumado a esto se han evidenciado acumulaciones de mHTT en astrocitos estriatales de cerebros de pacientes así como también en modelos murinos (41, 42). La expresión selectiva de la mHTT únicamente en los astrocitos lleva a la muerte celular de

neuronas estriatales (41).

Las células microgliales contribuyen fuertemente con el componente neuro-inflamatorio que acompaña a las enfermedades neurodegenerativas (43). La microglía constituye la principal célula efectora del sistema inmune en el SNC. Como tal, responde a cualquier condición patológica que involucre la activación del sistema inmune (44). La microglía puede presentar diversos estados de activación, los cuales dependen del ambiente en el que se encuentren. Dicha activación es una respuesta al daño que sufre el tejido nervioso; está caracterizada por proliferación y una transformación en células fagocíticas, con morfología similar a la de los macrófagos (45). El estado activado de la microglía ha sido reportado en diversos estudios en las diferentes patologías neurodegenerativas, incluyendo la EH, EP y ELA en sus distintos estadios (46). Estudios previos han reportado cambios estructurales y un aumento en el número de células microgliales a medida que avanza la sintomatología en la EH sugiriendo un rol importante de estas células en la progresión de la patología (47-50).

Por esto, nos propusimos determinar si mediante una inyección en la cisterna magna de TM, se podría generar un modelo de EH, utilizando esta droga como compuesto estresor del RE, ya que una de las mayores limitaciones que presentan los modelos genéticos es que no tienen en cuenta muchos de los eventos que están sucediendo en la patología a nivel molecular. Por el rol protagonista que ha tomado el ERE en la EH y también en muchas enfermedades neurodegenerativas proponemos estudiar qué sucede con el ambiente celular luego de una inyección en la cisterna magna de TM, prestando especial atención a como afecta ésta droga a las células gliales y que sucede con las neuronas estriatales principalmente.

Hipótesis

La inducción de un estrés de retículo endoplasmático agudo en el SNC mediante la administración de tunicamicina podría generar una neurodegeneración estriatal con características similares a los fenómenos histopatológicos y sintomatológicos que tienen lugar en la enfermedad Huntington.

Objetivo general

Caracterizar la neurodegeneración inducida por la administración en la cisterna magna del estresor del retículo endoplásmico Tunicamicina.

Objetivos específicos:

- Determinar si ocurre una degeneración estriatal mediante la técnica de Inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo neuronal característico NeuN.
- Estudiar los niveles de Estrés de Retículo Endoplasmático inducidos por Tunicamicina mediante los anticuerpos característicos de BiP, ATF4 mediante las técnicas Inmunohistoquímica y Western Blot.
- Estudiar la inducción de gliosis reactiva por Tunicamicina, mediante la técnica de Inmunohistoquímica, utilizando los anticuerpos característicos de astrocitos GFAP y s100 β e Iba1 para las células microgliales.

2. Materiales y Métodos

1) Diseño experimental

Se utilizaron como modelo de estudio ratas Sprague Dawley (Figura 2). Se seleccionaron 8 ratas hembras y 8 ratas machos, de 4 meses de edad. Los machos pesaban aproximadamente 330 gramos y las hembras 310 gramos. Los animales fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) con un ciclo de 12 horas de luz- 12 horas de oscuridad, con acceso a agua y comida *ad libitum*.



Figura 2. Rata de experimentación Sprague Dawley

La mitad de los animales fueron seleccionados para ser inyectados con DMSO, grupo control, y la mitad para ser inyectados con Tunicamicina, grupo tratado. En la figura 3 se esquematiza el procedimiento del diseño experimental.

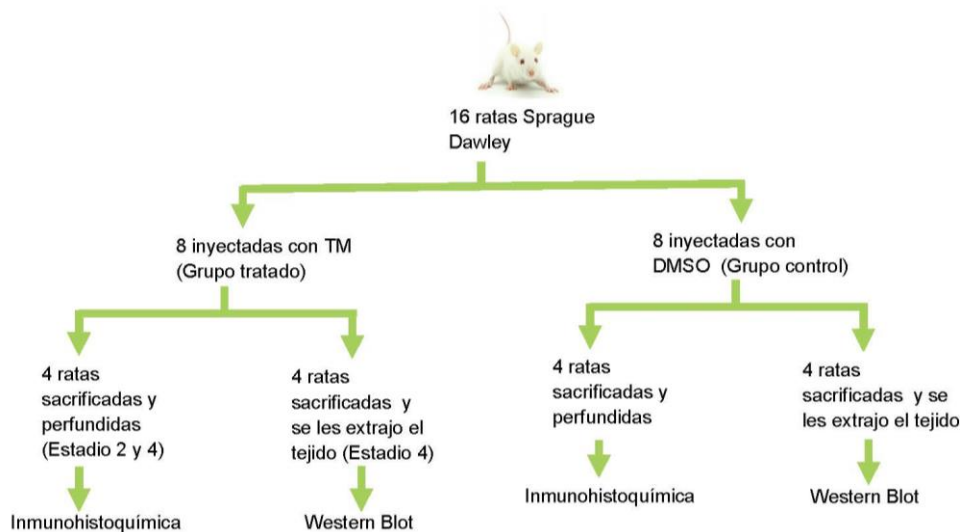


Figura 3. Esquema del diseño experimental utilizado en el trabajo.

Para la inyección en la cisterna magna las ratas fueron anestesiadas con ketamina (90mg/kg) / xilacina (10 mg/kg). Esta anestesia es comúnmente usada en modelos de rata, su seguridad ha sido probada para procedimientos de imagen y no se ha demostrado que cause cambios significativos en el flujo sanguíneo cerebral. Las ratas son fijadas en un esterotáxico (Figura 3).

En este trabajo se utilizó una Hamilton de calibre 27G. La aguja se introduce en una trayectoria vertical, perforando piel y músculo, hasta que se perfora la membrana atlanto-occipital. La aguja es introducida lentamente y



Figura 4. Estereotáxico utilizado para la inyección en la cisterna magna.

una vez que la membrana atlanto-occipital es atravesada se extraen aproximadamente un volumen de 20 μL para confirmar que la

localización de la aguja es correcta. Se inyectan en ese momento 5 μg de Tunicamicina, 0.416 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (en 12 μl de DMSO estéril).

Para los animales inyectados con TM, como no existe en la bibliografía una clasificación para modelos animales, y con el fin de poder establecer distintos estadios de la enfermedad se generó una clasificación basada en la observación de los animales tratados, para ser utilizada en posteriores análisis. La clasificación creada se detalla a continuación:

- Estadio 1: Inclinación del cuerpo hacia uno de los costados. Temblores de los miembros.
- Estadio 2: Se acentúa la inclinación, los animales comienzan a perder los movimientos voluntarios en el mismo costado, generalmente comienza en el día 5 post-inyección.
- Estadio 3: Los animales arrastran los miembros traseros, perdiendo la movilidad voluntaria.
- Estadio 4: Los animales presentan movimientos descoordinados, girando sobre sí mismos (siempre hacia el costado primeramente afectado). Este estadio se ve al día 7 post-inyección.
- Estadio 5: Los animales pierden toda capacidad de moverse voluntariamente y continuamente sufren movimientos descoordinados. La mayor parte del tiempo el animal no se mueve y yace inmóvil en la caja.

Los animales fueron sacrificados en el estadio 2 y en el estadio 4. Los dos grupos de animales comenzaron a ser pesados 5 días antes de la inyección en la cisterna magna, y se continuaron los registros hasta el momento de su muerte.

Perfusión

Se siguieron procedimientos previamente publicados y aprobados por el comité de ética del IIBCE y bajo la ley de experimentación animal N° 18.611 (2). Los animales fueron anestesiados con Ketamina/Xilacina (90 mg/kg/10 mg/kg). Una vez que entraron en anestesia profunda se colocaron sobre la mesa de perfusión bajo una campana de extracción de aire. Se realizó una incisión abdominal por debajo del reborde costal, se seccionó el diafragma y se cortaron las costillas en ambos lados, retirando el esternón y parte de las costillas. Posteriormente se cortó la aurícula derecha para que fluya la sangre y los líquidos perfundidos mediante una bomba peristáltica de perfusión; por el ventrículo izquierdo se inyectaron en primera instancia 100 ml de suero fisiológico – 0.4% citrato de sodio, de forma de evitar la coagulación. Luego se administró la solución fijadora, 120-150 mL de paraformaldehído (PAF) 4% en PBS. Se disecaron los cerebros y se mantuvieron en PAF 4% a 4°C durante 24 horas, luego de lo cual se preservaron los tejidos en PBS- Azida 0.05% y se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento.

Obtención de cortes coronales y sagitales de cerebro.

Para la generación de los cortes se utilizó un vibrátomo Leica 1000s (Figura 4). Se adhirieron las secciones coronal y sagital de los cerebros con un adhesivo instantáneo, luego se seleccionó el grosor de los cortes en 50 μ m el grosor y la velocidad a 4.0 mm/segundos y la frecuencia a 4.5 Hz. Se colectan los cortes en flotación en PBS-Azida de sodio 0.05 % para su posterior procesamiento.



Figura 5. Vibrátomo, modelo Leica 1000S.

Inmunohistoquímica

Se utilizaron cortes sagitales y coronales de cerebro de animales tratados con TM y con DMSO. Se realizó reclutamiento/recuperación antigénica en buffer citrato 10 mM pH 6 a fuego por 3 minutos, luego de lo cual se dejaron los cortes en el buffer citrato por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 20 minutos cada uno en PBS. Luego los cortes se permeabilizaron con Tritón-X100 0.5% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Como solución de bloqueo se utilizó seroalbúmina bovina (BSA) 5% en PBS, y este se realizó a temperatura ambiente por 1 hora. La incubación con los anticuerpos primarios se realizó en Tritón-X100 0.3% por 24 horas a 4°C, y los anticuerpos secundarios en Tritón-X100 0.3% por 2 horas a temperatura ambiente. Luego se montaron los cortes en portaobjetos previamente tratados con Poli-Lisina y se empleó Mowiol como medio de montaje. Se utilizaron anticuerpos característicos de neuronas, astrocitos y microglía, detallados en la Tabla 1. Los anticuerpos secundarios utilizados se detallan en la Tabla 2.

Tabla 1. Se detallan los anticuerpos primarios utilizados.

Anticuerpos	Abreviatura	Hospedero	Reconoce	Diluciones
Anti-Tirosina Hidroxilasa	α -TH	Ratón/Monoclonal	Neuronas Dopaminérgicas	(1/300)
Anti-NeuN	α -NeuN	Ratón/monoclonal	Neuronas	(1/400)
Anti-Proteína β de unión a Calcio	α -S100 β	Ratón/monoclonal	Astrocitos	(1/400)
Anti-Proteína Ácida Fibrilar Glial	α -GFAP	Ratón/Monoclonal	Astrocitos	(1/400)
Anti-Molécula adaptadora de union a calcio ionizado 1	α -Iba1	Conejo/Policlonal	Microglía	(1/200)
Anti-Proteína de unión a la inmunoglobulina (BiP)	α -BiP/GRP78	Conejo/Policlonal	Estrés de Retículo Endoplasmático	(1/300)

Tabla 2. Se detallan los anticuerpos secundarios utilizados.

Anticuerpo	Abreviatura	Hospedero	Reconoce	Diluciones
Cabra-Anti Ratón 488 y 543	α -Ratón 488 α -Ratón 543	Ratón/Policlonal	Región Fc del anticuerpo de ratón	(1/500)
Cabra-Anti Conejo 488 y 543	α -Ratón 488 α -Ratón 543	Conejo/Policlonal	Región Fc del anticuerpo de ratón	(1/500)

Las muestras obtenidas luego de la técnica IHQ fueron analizadas utilizando un microscopio confocal Leica TCS-SP5-DMI 6000.

Western Blot

Preparación del lisado a partir de tejido.

1. Se disecó el estriado y sustancia nigra, con herramientas limpias, en hielo, lo más rápido posible para prevenir la degradación por proteasas.
2. Se depositó el tejido en buffer de lisis de tejido (300 μ l). Y posteriormente se almacenó el tejido a -20°C hasta el momento de homogenizarlo.
3. Se utilizó el ultrasonido para romper el tejido y las membranas celulares.
4. Se centrifugó por 20 minutos a 12000 rpm a 4°C. Luego se removieron cuidadosamente los tubos de la centrifuga y se descartó el pellet.

Receta Buffer de Lisis de Tejido: 4 mM de EDTA, 1 pastilla de inhibidores de proteasas para 100 mL de agua destilada.

Determinación de la concentración de proteínas.

La cuantificación de las proteínas se realizó mediante la técnica colorimétrica del ácido bicinonínico (BCA) (SIGMA). Los ensayos colorimétricos involucran la adición de una sustancia química que es capaz de reaccionar con determinados residuos aminoacídicos. El principio de la técnica de BCA se basa en la formación de un complejo Cu^{2+} -proteína en condiciones alcalinas,

con la consiguiente reducción del átomo de Cu^{2+} a Cu^+ . La cantidad de Cu^+ reducido es proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra. El resultado de esta reacción es el cambio de color en la solución, que es cuantificado mediante la medida de absorbancia a 562 nm. Para determinar la concentración de proteínas totales de la muestra a analizar, se interpolan los resultados de absorbancia a un curva de calibración construida utilizando una proteína estándar, en este caso, albúmina sérica bovina (BSA: bovine serum albumin), cuya concentración es conocida. En todos los pocillos que contienen muestra con las proteínas a cuantificar (se siembran dos pocillos por muestra para luego promediar los resultados) se agregan 150 μL del reactivo BCA + CuSO_4 (50 partes de BCA por cada parte de CuSO_4). Se deja incubando durante 30 minutos a 37 °C y luego se realiza la lectura. Luego de haber determinado la concentración de las proteínas, las mismas son mezcladas con el buffer de carga 5X (15% SDS, 0,3 M Tris pH 6,8, 25 % Glicerol, 1,5 M β -mercaptoetanol, 0,01 % Bromophenol Blue), de forma que la concentración final del buffer sea 1X. Luego las proteínas son sometidas durante 5 minutos a una temperatura de 100 °C, para lograr su desnaturalización. Se guardan las muestras a -20 °C hasta su sembrado en el gel.

Para la **electroforesis** se cargaron 40 μg de proteína del estriado y de la sustancia nigra. Las muestras en el gel fueron corridas a una intensidad fija de 30 mA con la utilización de una fuente de poder (Bio-rad), durante aproximadamente 3 horas y 30 minutos a aproximadamente 60 mV. Luego que el frente de corrida abandona el gel se desmontó el gel en buffer de transferencia.

Receta de Buffer de Corrida: 3.03 g de Tris, 14.4 g de Glicina, 1 g de SDS para un litro de agua destilada.

Para la **transferencia** la membrana se coloca sobre el gel, éstos son colocados entre sándwiches de materiales absorbentes, y éstos son sujetos entre soportes sólidos para mantener el estrecho contacto entre el gel y la membrana. La misma se realiza a 300 mA a 4° C por 1 hora y media. Para verificar si la transferencia se realizó con éxito se utilizó el colorante Rojo

Ponceau. Se dejaron las membranas en el colorante por 5 minutos con agitación. Se determinó si las proteínas se encontraban en la membrana y luego se las lavó con TBS-Tween hasta que se eliminó el colorante.

Para el **bloqueo de la membrana** se utilizó BSA 5% en TBS-Tween 0.1%, se bloqueó por una hora a temperatura ambiente con agitación suave.

Los **anticuerpos primarios fueron incubados** en BSA 5% en TBS-Tween 0.1% durante toda la noche, a 4° C, con agitación suave. Los anticuerpos utilizados se detallan en la tabla 3. Tras la incubación de los primarios, se realizaron 3 lavados con TBS-Tween de 10 minutos cada uno en agitación rápida, para retirar los anticuerpos que no se unieron a las proteínas en la membrana.

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados para la técnica Western Blot

Anticuerpo	Origen	Dilución
Anti- β Actina (control de carga)	Monoclonal/Ratón	1/4000
Anti- iNOS	Policlonal/ Conejo	1/500
Anti-ATF4	Monoclonal/Ratón	1/1000
Anti-BiP	Policlonal/ Conejo	1/3000

Los **anticuerpos secundarios se incubaron** durante 1 hora a temperatura ambiente en la misma solución utilizada para el bloqueo y la incubación de los anticuerpos primarios. Los anticuerpos secundarios para el reconocimiento de los primarios fueron un anti-IgG Conejo conjugado a HRP (Bio-Rad) y un anti-IgG Ratón conjugado a HRP (Pierce). Ambos anticuerpos secundarios se utilizaron en una dilución de 1/4000. Una vez finalizada la incubación, la membrana es sometida a 3 nuevos lavados de 10 minutos de duración cada uno con TBS-Tween.

Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizados para la técnica Western Blot

Anticuerpo	Origen	Dilución
Cabra- Anti Ratón- HRP	Policlonal/Ratón	1/4000
Cabra- Anti Conejo- HRP	Policlonal/ Conejo	1/4000

Para revelar la membrana fue incubada durante 2-3 minutos con una mezcla de partes iguales de los reactivos A y B del *ECL* (ECL Western blotting detection reagents and análisis system, Amersham). La señal que se genera sobre la membrana es captada gracias a la exposición de la misma a una placa autorradiográfica (AGFA) durante 10 minutos. Posteriormente la placa es incubada durante algunos minutos en la solución reveladora (Química mediQ, concentración final 1X). Una vez que la señal se hace presente en la placa, esta se lava en agua y se sumerge en la solución de fijación (Química mediQ, concentración final 1X). Para el análisis de los resultados, se escanea la placa con el revelado, y se analiza mediante la utilización de un programa informático de imagen, ImageJ.

2. Fundamento Teórico de Materiales y Métodos

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica en la cual se utilizan anticuerpos para detectar antígenos en un corte o sección de tejido biológico. Utiliza la unión específica de éstos, y es posible localizar y visualizar dichas moléculas blanco en cortes histológicos debido a que los anticuerpos específicos están marcados con fluoróforos o enzimas. Es comúnmente utilizada en investigaciones biológicas para conocer la ubicación y co-localización de proteínas dentro de las diferentes partes de la célula (51).

Los anticuerpos son producidos y purificados en dos formas básicas para su uso como reactivos en inmunoensayos: monoclonales y policlonales. Los monoclonales son específicos para un único epítipo antigénico, y por lo tanto se considera que son más específicos para el antígeno blanco que los policlonales.

Los policlonales son una mezcla compleja y heterogénea de anticuerpos, generalmente purificados directamente a partir de un suero, y reconocen varios epítopes antigénicos y por lo tanto tienen menos probabilidad de ser afectados por cambios conformacionales que los monoclonales, y por lo general pueden tener menor afinidad. Son especialmente útiles como anticuerpos secundarios marcados para inmunoensayos.

Para visualizar el complejo antígeno-anticuerpo que se puede utilizar el método

directo o el método indirecto, en este trabajo se utilizó el método indirecto (Figura 5). El primero utiliza un anticuerpo conjugado a una enzima como la Peróxidasa de Rábano (HRP) o Fosfatasa Alcalina (AP) o bien a un marcador fluorescente. El indirecto usa un anticuerpo primario anti-antígeno de interés, y luego un anticuerpo secundario que se une al anticuerpo primario, conjugado a una enzima o a un fluoróforo.

Microscopía confocal

Marvin Minsky fue el pionero en la microscopía confocal, cuando en 1955 mientras investigaba en la Universidad de Harvard realizó una construcción de la imagen punto por punto, centrándose un punto de luz a través de una secuencia de muestras y luego recogiendo algunos de los rayos que retornan (52). Al iluminar un único punto lograba evitar la mayor parte de la luz dispersada no deseada que típicamente oscurece la imagen cuando se ilumina

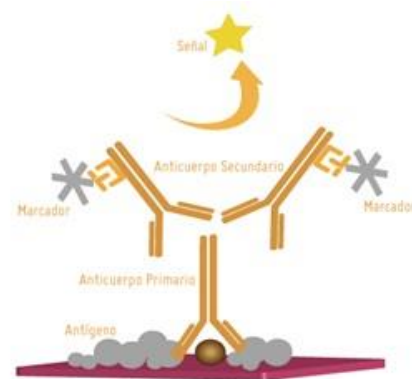


Figura 6. Unión de los anticuerpos conjugados a la proteína de interés. Se muestra como el anticuerpo secundario, conjugado a la enzima, se une al anticuerpo primario que reconoce a la proteína de interés.

toda la muestra al mismo tiempo. Además, la luz que vuelve de la muestra pasa a través de una segunda abertura extremadamente fina (*pinhole*) que rechaza los rayos que no provienen directamente desde el punto focal. El resto de los rayos “deseables” serían recopilados mediante un fotomultiplicador y la imagen sería reconstruída gradualmente. Para construir la imagen, Minsky escaneó la muestra moviendo el escenario en vez de los rayos de luz, evitando así el problema de buscar mantener la alineación de la óptica sensible en movimiento. Con el uso de un solenoide de 60 Hz para mover la plataforma verticalmente y un solenoide de baja frecuencia para moverlo horizontalmente, logró obtener una velocidad de aproximadamente una imagen cada 10 segundos (52).

La microscopia confocal moderna ha mantenido los elementos esenciales del diseño de Minsky: la abertura “*pinhole*” y la iluminación punto por punto de la muestra. Los avances en óptica y electrónica han sido incorporados en los diseños modernos y han traído mejoras en la velocidad, la calidad de imagen, la generación y el almacenamiento de las imágenes.

Actualmente existen varios tipos de diseños de microscopios confocales, sin embargo la descripción general de los mismos no varía en estos diferentes tipos. La mayoría de las imágenes generadas por éstos se da reflejando la luz fuera de la muestra o mediante la estimulación de la fluorescencia de colorantes (fluoróforos) aplicados a la muestra. La diferencia entre las dos técnicas es pequeña; y en aplicaciones biológicas generalmente se usa la estimulación de la fluorescencia. También hay métodos que se basan en la transmisión de la luz a través de la muestra, pero estos son mucho menos comunes (52).

Cuando la luz incide en una molécula, ésta puede absorber la luz y luego emitir luz en un color diferente, proceso conocido como **fluorescencia**. A temperatura ambiente, la mayoría de las moléculas están en su

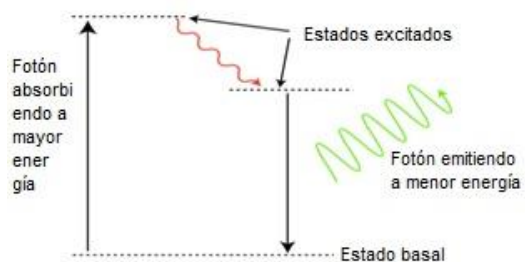


Figura 7. Mecanismo de fluorescencia. La línea horizontal indica niveles quantum de energía de la molécula. Un colorante fluorescente es elevado a un estado de energía mayor por el fotón de alta energía. Éste cede energía a otras moléculas resultando en un estado de excitación más bajo. El resto de la energía la pierde al emitir la luz de menor energía.

estado más bajo de energía, estado fundamental. Sin embargo, éstas pueden absorber un fotón de luz, que incrementa su energía causando el salto de un electrón a un estado excitado discreto (53). En la figura 7 se representa el cambio del estado de excitación con la línea punteada negra superior. En general la molécula rápidamente (en aproximadamente 10^8 segundos) disipa algo de la energía absorbida a través de colisiones con moléculas que la rodean causando que el electrón pase a un nivel de energía menor (segunda línea punteada negra en la Figura 7). Si las moléculas circundantes no son capaces de aceptar esta diferencia de energía necesaria para reducir aún más la molécula a su estado fundamental, puede someterse a la emisión espontánea, perdiendo de este modo la energía restante, mediante la emisión de luz de una longitud de onda mayor (54).

La microscopia de fluorescencia presenta muchas ventajas en comparación con la microscopía de luz reflejada o transmitida. Puede ser más sensible, e incluso es posible unir moléculas fluorescentes a partes específicas del espécimen, siendo éstas las únicas visibles en el microscopio.

En la microscopia de fluorescencia convencional, un espécimen fluorescente es iluminado con la longitud de onda apropiada y se forma la imagen como resultado de la luz fluorescente emitida. El microscopio usa un espejo dicroico que refleja la luz a una longitud de onda más corta que la real, pero transmite la luz a una longitud de onda mayor (Figura 8). A pesar de esto, la luz de la fuente principal es reflejada y pasa a través del objetivo a la muestra, mientras que la luz con longitud de onda mayor del espécimen fluorescente pasa a través del objetivo y del espejo dicroico. Este

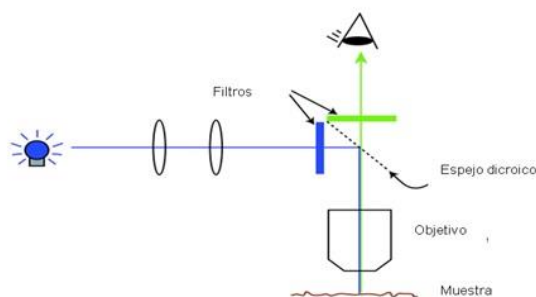


Figura 8. Organización básica de un microscopio de fluorescencia. La luz de la fuente es reflejada fuera del espejo dicroico a través del espécimen. La fluorescencia que regresa con una longitud de onda mayor pasa a través del espejo dicroico hasta el ocular.

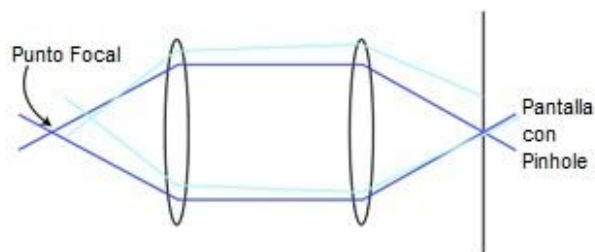


Figura 9. Representación gráfica del rechazo de la luz no incidente del plano focal. Toda la luz del plano focal que llega a la pantalla puede pasar. La luz alejada del plano focal es mayoritariamente rechazada.

tipo particular de microscopía de fluorescencia se llama de epifluorescencia. En la figura 9 se representa un esquema de que sucede en la microscopía confocal; ésta presenta un par de lentes que se enfocan en la luz del punto focal de un lente al punto focal del otro, esto se representa por los rayos azules en la figura 9. Los rayos celestes representan luz de otro punto del espécimen, el cual no está en el punto focal del lado derecho de los lentes, la imagen de la luz de los rayos celestes no está en el mismo lugar que la imagen de los rayos azules. En la microscopía confocal el objetivo es ver solo la imagen en el punto negro. En consecuencia, si una pantalla con un “pinhole” es puesta en el otro lado del sistema de lentes, entonces toda la luz del punto negro podrá pasar a través del pinhole. Además, la mayor parte de la luz será bloqueada por la pantalla, resultando en una imagen de la luz del punto celeste que será significativamente atenuada comparada con la imagen del punto azul. Para

minimizar aún más la cantidad de luz emergente de los rayos celestes, las configuraciones del microscopio confocal logran minimizar que cantidad del espécimen es iluminado. Normalmente en la microscopía fluorescente todo el campo de visión del espécimen es completamente iluminado, dejando a toda la región fluorescente al mismo tiempo, siendo el punto focal el que presenta la mayor intensidad de excitación. Las dos

aberturas del microscopio confocal reducen significativamente el ruido de fondo que es típico de las imágenes fluorescentes convencionales. En la Figura 10 se representa el diseño de un microscopio confocal típico.

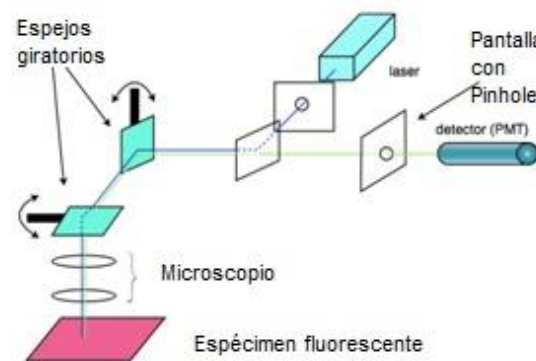


Figura 10. Organización básica de un microscopio confocal. La luz del láser es escaneada a través de los espejos. El seccionamiento óptico se produce cuando la luz pasa a través del pinhole en su camino hacia el detecto.

Microscopía de contraste de fase

La microscopía de contraste de fase, fue utilizada por primera vez en 1934 por el físico holandés Frits Zernike. Es una técnica óptica que mejora el contraste y puede ser utilizada para producir imágenes de alto contraste de especímenes

transparentes, tales como células vivas (por lo general cultivos celulares), microorganismos, cortes de tejido muy delgados entre otros. En efecto, la técnica de contraste de fase emplea un mecanismo óptico para distinguir entre variaciones muy pequeñas de las distintas fases correspondientes a cambios en la amplitud del contraste de las imágenes. Una de las principales ventajas de esta técnica es que las células vivas se pueden examinar en su estado natural. Como resultado de ello, la dinámica de los procesos biológicos en curso pueden ser observados y registrados en alto contraste con gran claridad.

Western Blot

La técnica del Western Blot (también llamado *immunoblotting* debido a que se utilizan anticuerpos para detectar el antígeno o los antígenos específicos de interés) fue descrita por primera vez por Towbin y colaboradores en 1979 y en la actualidad es una técnica de rutina en todos los laboratorios que realizan análisis de proteínas (55).

La especificidad de la unión antígeno–anticuerpo permite la detección de una única proteína dentro de una mezcla compleja de otras proteínas. Se utiliza como criterio de identificación positivo de una proteína específica y es útil para obtener datos cualitativos y semi-cuantitativos de la misma.

El primer paso del Western Blot es la separación de las macromoléculas mediante geles de electroforesis; después de la misma, las macromoléculas ya separadas en función de su peso molecular diferente se transfieren a una segunda matriz, generalmente una membrana de nitrocelulosa o PVDF. Posteriormente, se bloquea la membrana para evitar la unión inespecífica a su superficie de los anticuerpos que se van a utilizar para la detección de la proteína de interés.

En el siguiente paso, se une a dicha proteína transferida un anticuerpo específico, marcado con una enzima y, finalmente, se añade un sustrato apropiado para dicha enzima con lo que se produce un producto detectable como, por ejemplo, un precipitado cromogénico o fluorogénico en la membrana

Para preparar las muestras para correrlas en el gel, el tejido debe ser lisado para liberar a las proteínas. Esto solubiliza las proteínas, por lo que ellas pueden migrar individualmente a través de un gel separador. Los buffers de lisis que contienen dodecil sulfato de sodio (SDS) y otros detergentes iónicos son considerados más fuertes y por lo tanto tienden a dar mejores rendimientos. Al momento de elegir el buffer a usar hay que tener en cuenta el anticuerpo que se piensa utilizar y verificar si este reconoce muestras nativas o desnaturalizadas. Ni bien ocurre la lisis comienza la desfosforilación y la proteólisis. Para pausar estos eventos se almacenan las muestras a 4°C o en hielo todo el tiempo y los inhibidores apropiados son agregados a los buffers de lisis.

Electroforesis.

La electroforesis es una técnica que permite separar moléculas según su movilidad en un campo eléctrico. Puede ser en una o en dos dimensiones. La electroforesis en una dimensión es usada principalmente para proteínas conocidas y separaciones de ácidos nucleicos (56).

Preparación de geles PAGE

Cuando se realiza una separación en un gel de poliacrilamida, generalmente se utiliza la abreviación **SDS-PAGE** (del inglés Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). Esta técnica es un estándar para separar proteínas según su peso molecular. Los geles de poliacrilamida se forman de la polimerización de dos compuestos, acrilamida y N,N-bisacrilamida (Bis). La Bis es un

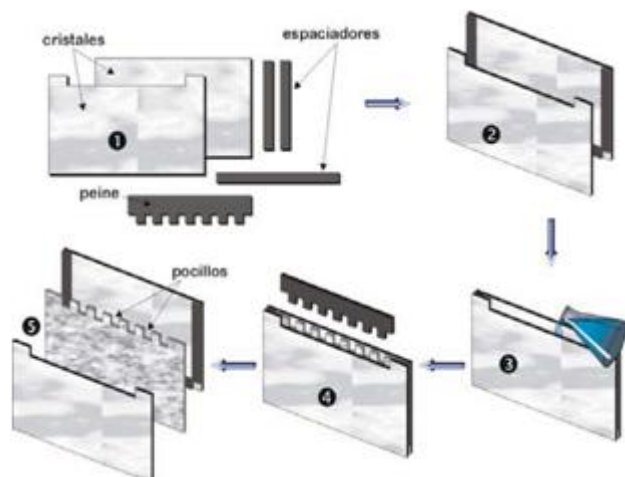


Figura 11. Esquema donde se muestran los pasos que llevan al armado del gel. Se separan, con la ayuda de los espaciadores de 1,5 mm de espesor, dos vidrios, los cuales son montados en un soporte. Luego de preparada la solución de acrilamida, esta se vierte en el espacio formado por los vidrios y se deja reposar durante aproximadamente una hora hasta que el gel se encuentra completamente polimerizado.

agente entrecruzador para los geles. La polimerización es iniciada por la adición solo de persulfato de amonio (APS) o acompañado de DMAP O TEMED.

Los geles son neutrales, hidrofílicos, redes tridimensionales de hidrocarburos entrecruzadas por grupos metileno. La separación de las moléculas dentro del gel está determinada por el tamaño relativo de los poros del gel. El tamaño del poro del gel está determinado por dos factores: la cantidad total de acrilamida presente (designada como % Total) y la cantidad de entrecruzador (%C). A medida que la cantidad total de acrilamida aumenta el tamaño del poro disminuye. Con 5%C de agente entrecruzador se obtiene el poro más pequeño. Cualquier aumento o disminución de %C aumenta el tamaño del poro. Los geles se describen con porcentajes, a mayor porcentaje de acrilamida menor el tamaño de los poros.

Tamaño de la proteína (kDa)	Porcentaje aproximado del gel (%)
4-40	20
12-45	15
10-70	12.5
15-100	10
25-200	8

Los controles positivos se usan para demostrar que el protocolo es eficiente y correcto y que el anticuerpo reconoce la proteína en cuestión que podría no estar presente en todas las muestras. **Los marcadores de peso molecular** son para determinar el tamaño de las proteínas y también para visualizar el progreso de la corrida electroforética.

Sembrado y corrida electroforética

Para sembrar el gel se puede usar una pipeta Hamilton o una micropipeta, dependiendo del volumen que se deba sembrar. Hay que tener especial cuidado para no sobrecargar los pocillos para evitar que haya contaminación de una muestra a otra. Los pocillos deben ser sumergidos en buffer de corrida.

Los controles de carga son necesarios para verificar que en todos los carriles se sembró la misma cantidad de proteína.

Transferencia de las proteínas

Las proteínas cargadas eléctricamente (por su unión al SDS) son inducidas a viajar a través del gel por un campo eléctrico, y luego son transferidas en un campo eléctrico desde el gel a una membrana que atrapa las proteínas del gel. La transferencia puede hacerse en condiciones húmedas o semi-secas. La transferencia semi-seca es más rápida pero la húmeda es más segura ya que en la transferencia semi-seca tiene riesgo de secarse con proteínas mayores a 100 kDa. Para ambos tipos de transferencia la membrana se coloca sobre el gel. La membrana y el gel son colocados entre sándwiches de materiales absorbentes, y éstos son sujetos entre soportes sólidos para mantener el estrecho contacto entre el gel y la membrana.

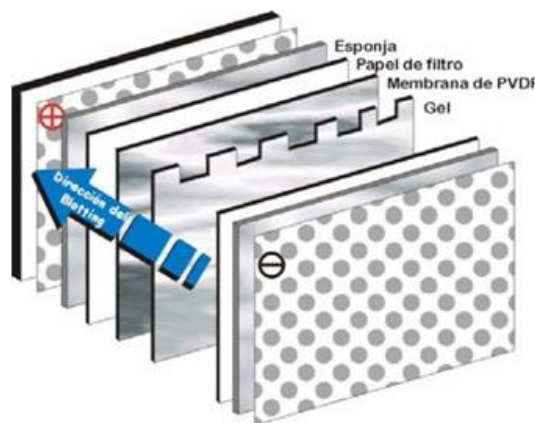


Figura 12. Esquema del sándwich armado para la transferencia. Esta requiere estrecho contacto entre el gel y la membrana. Para esto se colocan ambos juntos, y se los encierra en un sándwich de papel absorbente y dos almohadillas. La cubierta externa que forma el sándwich es de policarbonato.

En la transferencia húmeda, que fue la utilizada en este trabajo, el gel y la membrana se ubican entre esponjas y papel absorbente (esponja, papel absorbente, gel, membrana, papel absorbente, esponja) y se sujetan fuertemente luego de asegurarse que no hay burbujas de aire entre el gel y la membrana. El sándwich se sumerge en buffer de transferencia y se aplica un campo eléctrico. Las proteínas cargadas negativamente viajan a través del electrodo cargado positivamente, pero la membrana las para, las une y evita que continúen la migración. Un buffer estándar para transferencias húmedas es el mismo utilizado en el buffer de corrida de las proteínas sin SDS y con 20% de metanol. Para proteínas más grandes que 80kDa se debería incluir SDS a una concentración final de 0.1%.

Dos tipos de membrana están disponibles, nitrocelulosa y PVDF (nylon cargado positivamente). Las membranas de PVDF, que son las utilizadas en este trabajo, requieren un cuidadoso tratamiento previo: cortar la membrana al

tamaño apropiado, activar la membrana en metanol por 1 o 2 minutos. Luego se la incuba en buffer de transferencia en frío por 5 minutos.

El bloqueo de la membrana es de suma importancia en el Western Blot ya que bloquear los sitios de unión de la membrana sin reaccionar con el antígeno reduce la unión inespecífica de las proteínas durante los siguientes pasos del ensayo.

En la actualidad se utilizan una amplia variedad de tampones de bloqueo (desde leche o suero, hasta proteínas altamente purificadas) para bloquear los sitios libres de la membrana. Estos tampones de bloqueo, permiten es incrementar la sensibilidad del ensayo reduciendo la interferencia por el ruido de

fondo (*background*). Un problema adicional es que no todos los tampones de bloqueo son compatibles con todos los sistemas, por lo que una gran variedad de bloqueantes están disponibles comercialmente tanto en tampón TBS como PBS, dependiendo la elección del bloqueante más adecuado del propio antígeno

así como de la enzima que se vaya a utilizar; por ejemplo, aquellos Western Blot en los que se vaya a utilizar fosfatasa alcalina como enzima de conjugación, se deben utilizar tampones bloqueantes en TBS ya que el PBS interfiere con la fosfatasa alcalina.

Para realizar un Western Blot se pueden utilizar tanto anticuerpos monoclonales como policlonales. De la misma manera, hay una gran variedad de anticuerpos secundarios marcados de diferentes maneras para la detección del Western Blot. Su elección depende de la especie en la que se haya obtenido el anticuerpo primario (la hospedadora). La elección del anticuerpo secundario también depende del tipo de marcaje que se desee. Hace algunos años se utilizaban mayoritariamente los radioisótopos, pero eran muy caros y

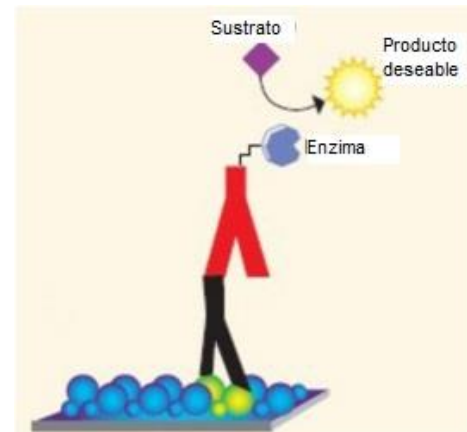


Figura 13. Representación esquemática de la unión de los anticuerpos conjugados a la membrana. Se muestra como el anticuerpo secundario, conjugado a la enzima, se une al anticuerpo primario que reconoce una proteína en la membrana. Una vez en contacto con el sustrato, se genera un producto luminoso.

tenían una vida media muy corta, requiriendo una manipulación especial y no ofreciendo ninguna mejora de la relación señal:ruido con respecto a los utilizados actualmente.

Como marcajes alternativos, en los últimos años se han desarrollado los marcajes con biotina, fluoróforos o enzimas (Figura 13). El uso de fluoróforos requiere de menos cantidad de pasos durante el proceso, aunque necesita de un equipamiento especial para visualizar la fluorescencia, sobre todo si se desea tener un registro permanente de los resultados. El marcaje con enzimas se utiliza ampliamente y, aunque necesita algunos pasos extra, suelen ser bastante sensibles. Las dos enzimas que más se utilizan son la fosfatasa alcalina (AP) y la peroxidasa de rábano (HRP) y hay una amplia variedad de sustratos cromogénicos, fluorogénicos y quimioluminiscentes disponibles comercialmente para cada enzima. Al igual que ocurre con el resto de los componentes de un Western Blot, hay un gran número de sustratos disponibles comercialmente y su elección depende, entre otros factores, de la enzima utilizada (AP o HRP), la sensibilidad deseada y el método de detección o tipo de señal que se busque (colorimetría, fluorescencia, quimioluminiscencia, etc.). Los sustratos cromogénicos son los más utilizados y proporcionan el método de detección más barato y sencillo; cuando estos sustratos entran en contacto con la enzima correspondiente, se transforman en productos insolubles coloreados que precipitan sobre la membrana, por lo que no necesitan ninguna instrumentación especial para realizar la visualización de los resultados.

Análisis de resultados- Estadística

Los animales fueron pesados todos los días y se calculó el peso promedio de cada uno de los grupos (grupo control y tratado). Los datos fueron representados como el promedio de peso y desvío estándar, con un $p < 0.05$. Para el análisis cuantitativo de los estudios de inmunohistoquímica, al menos 8 secciones por animal fueron utilizadas en cada uno de los experimentos ($n=2$). Las medias fueron calculadas y se representaron los datos como la media \pm SD; $*P < 0.05$. El análisis cuantitativo del estudio por Western Blot se llevó a cabo midiendo la intensidad por área de cada una de las bandas para cada uno

de los marcadores, corrigiendo la expresión relativa de cada una con la intensidad por área de la β -Actina (control de carga), con un $n=4$. Para el análisis cuantitativo de los estudios histológicos así como el análisis del Western Blot, se utilizaron las herramientas del Software libre ImageJ. En todos los casos se realizó un test de ANOVA y una prueba de Kruskal-Wallis. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo utilizando la aplicación libre Past3.

3. Resultados

La administración de Tunicamicina indujo un trastorno neurológico similar a la Enfermedad de Huntington

Todas las enfermedades neurodegenerativas progresivas se caracterizan por presentar diferentes estadios a lo largo de la sintomatología (4). Por este motivo, realizamos una clasificación para delimitar bien las diferencias fenotípicas en la degeneración central causada por la TM. Los distintos estadios fenotípicos mostraron una rápida progresión de la neurodegeneración, observándose esto por el comportamiento del animal y siendo validado por los resultados obtenidos mediante las técnicas de Inmunohistoquímica (IHQ) y Western Blot (WB). El estadio 2 fue considerado para los análisis como una sintomatología temprana, siendo el estadio 4 ya una patología severa, considerándose previa a los momentos finales de la enfermedad.

Los animales inyectados con TM mostraron un descenso significativo de su peso comenzando al día 1 post-inyección (Figura 14B). A medida que la patología progresa la disminución de peso se hace más pronunciada.

A diferencia de los animales tratados con TM, los que recibieron el vehículo (DMSO) no mostraron problemas motores de ningún tipo ni se registró una variación significativa del peso corporal (Figura 14B). No se observaron diferencias significativas entre los sexos.

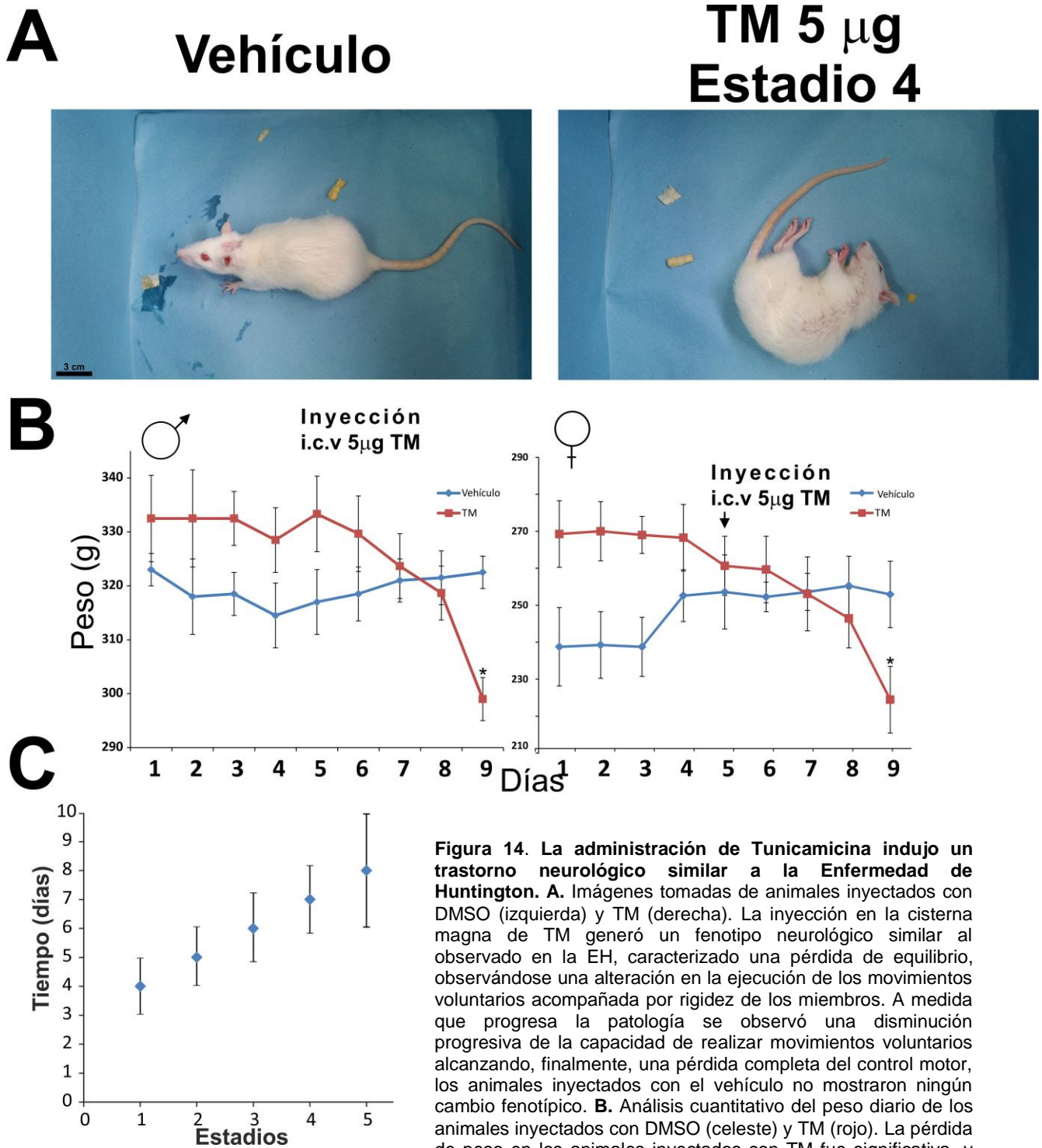


Figura 14. La administración de Tunicamicina indujo un trastorno neurológico similar a la Enfermedad de Huntington. A. Imágenes tomadas de animales inyectados con DMSO (izquierda) y TM (derecha). La inyección en la cisterna magna de TM generó un fenotipo neurológico similar al observado en la EH, caracterizado una pérdida de equilibrio, observándose una alteración en la ejecución de los movimientos voluntarios acompañada por rigidez de los miembros. A medida que progresa la patología se observó una disminución progresiva de la capacidad de realizar movimientos voluntarios alcanzando, finalmente, una pérdida completa del control motor, los animales inyectados con el vehículo no mostraron ningún cambio fenotípico. **B.** Análisis cuantitativo del peso diario de los animales inyectados con DMSO (celeste) y TM (rojo). La pérdida de peso en los animales inyectados con TM fue significativa, y comenzó inmediatamente después de la inyección, en el día 1 post-inyección, manteniendo un descenso continuo hasta el momento de su sacrificio, por el contrario, los animales inyectados con DMSO no mostraron cambios significativos en su peso. Los datos están expresados como promedio \pm SD; * $P < 0.05$. **C.** En la gráfica se puede ver el estudio representativo de la progresión de la enfermedad. Nótese que las ratas comienzan a desarrollar los síntomas luego de 4-5 días post-inyección. La patología avanza aproximadamente 1 estadio por día, hasta alcanzar un estadio terminal 8-10 días post-inyección. Los datos están representados como el promedio \pm SD.

La Tunicamicina indujo una degeneración estriatal

Los resultados obtenidos a través de microscopía de campo claro (Figura 15A) muestran un aumento significativo del volumen del ventrículo lateral en un animal tratado con TM respecto del vehículo, resultando en una disminución del tamaño del estriado. Esta disminución del estriado puede observarse a partir del día 5 post-inyección, en el estadio 2 y se hace dramática luego que la enfermedad progresa hacia el estadio 4-5 (Figura 15A).

Los resultados obtenidos a través de la técnica de IHQ por microscopía confocal, muestran una degeneración estriatal caracterizada por una disminución significativa del número de neuronas NeuN+ en los animales tratados con TM respecto a los animales tratados con DMSO (Figura 15B).

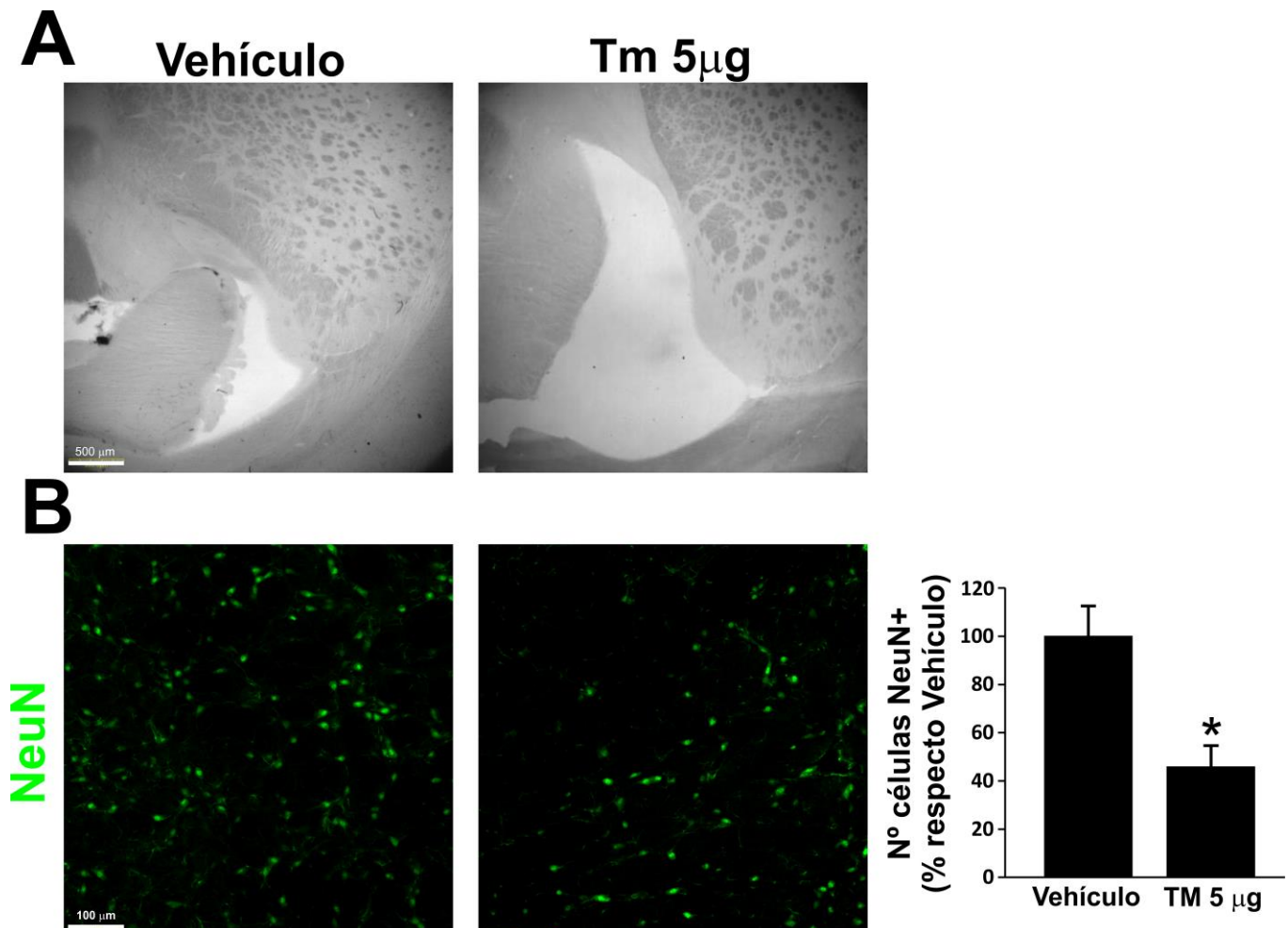


Figura 15. La Tunicamicina indujo una degeneración estriatal. **A.** Imágenes de microscopía de campo claro del estriado de animales tratados con DMSO (izquierda) y con TM, estadio 4 (derecha). Obsérvese el aumento significativo del volumen del ventrículo lateral en un animal tratado con TM respecto del vehículo, resultando en una disminución del estriado. **B.** Inmunohistoquímica representativa del estriado de animales tratados con DMSO (izquierda) y con TM (derecha) donde se analizan los niveles de expresión de NeuN (verde). Obsérvese la disminución significativa del número de neuronas NeuN+ (aproximadamente 60% - análisis cuantitativo en la gráfica a la derecha) en los animales tratados con TM respecto a los animales tratados con DMSO. Los datos están expresados con un \pm SD; * $P < 0.05$.

Estrés de Retículo Endoplasmático Inducido por Tunicamicina

Por ser el ERE es una de las características principales de la EH estudiamos la presencia de marcadores típicos como BiP, ATF4, y para complementar el estudio del proceso neurodegenerativo seleccionamos a la enzima iNOS, que es característico de estrés oxidativo.

En la figura 16A, se observa por IHC un aumento de la cantidad de células BiP+ en el estriado de los animales tratados con TM. Podemos observar un aumento de aproximadamente un 100% en el estadio 2 y un drástico aumento del 150% aproximadamente cuando la progresión llega al estadio 4. Para confirmar estos datos, se evaluó la expresión de BiP, ATF4 e iNOS mediante la técnica de Western Blot, tanto en el estriado como en la Sustancia Nigra (SN). En la figura 16B podemos observar un aumento significativo de BiP e iNOS en la SN, y un aumento significativo de BiP, ATF4 e iNOS en el estriado, respecto de la expresión detectada en los animales controles.

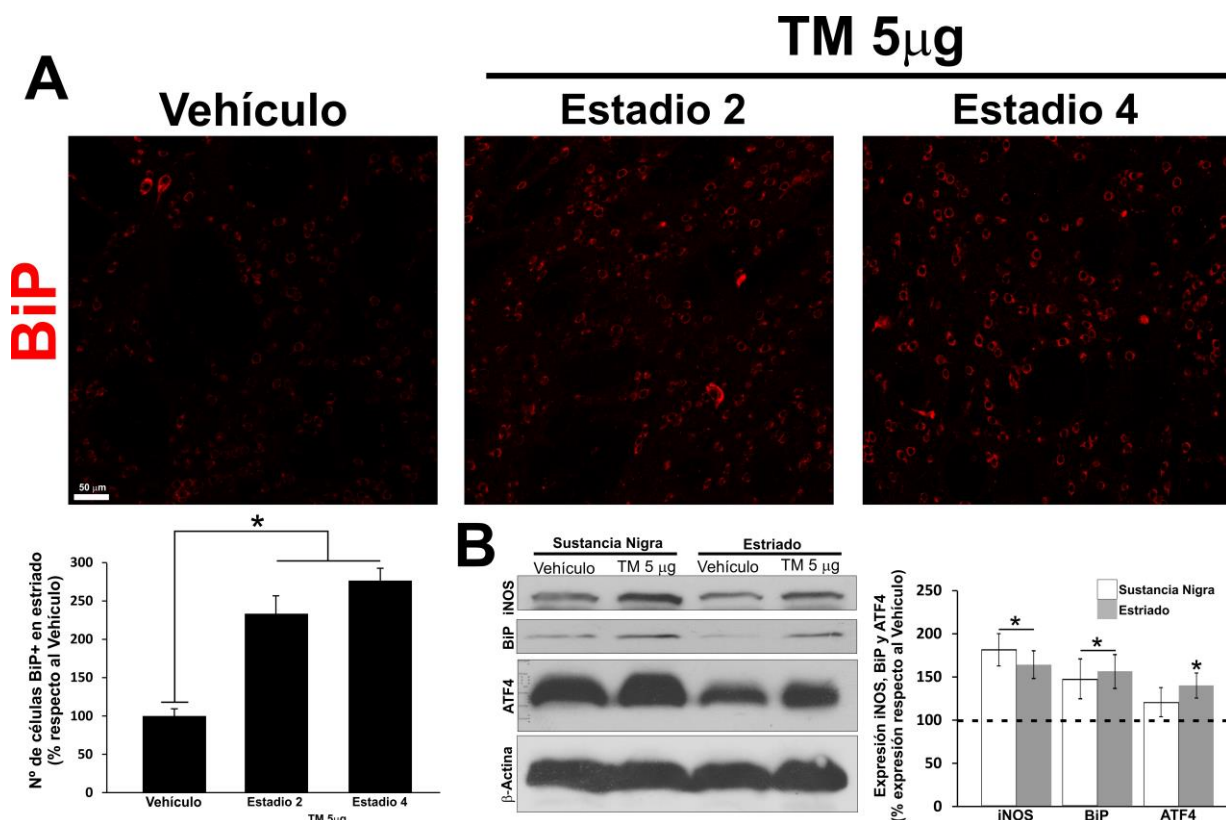


Figura 16. La inyección de Tunicamicina aumenta los niveles estrés de retículo y estrés oxidativo A. Inmunohistoquímica confocal representativa de cerebros de animales tratados con TM y DMSO. Se muestran cortes coronales de estadios 2 y 4 de animales tratados con TM. En ambos estadios se observa un aumento del número de células BiP+, siendo éste de aproximadamente 100% en el estadio 2, y 150% en el estadio 4, como se puede observar en el análisis cuantitativo en la gráfica de la segunda fila a la izquierda. **B.** Western Blot de Sustancia Nigra y Estriado de animales controles y tratados (estadio 4) donde se estudió la expresión de BiP, ATF4 e iNOS. Óbserve en el análisis cuantitativo de la derecha el aumento significativo de iNOS (60% aproximadamente), BiP (60% aproximadamente) y ATF4 (40% aproximadamente) en el estriado animales tratados respecto los controles. Para las muestras de la SN se observó un aumento significativo de las proteínas BiP (40% aproximadamente) e iNOS (60% aproximadamente). Los datos están expresados respecto al 100% con un \pm SD; * $P < 0.05$.

La inyección de Tunicamicina induce reactividad astrocitaria en el estriado

La reactividad glial es otra de las características observadas en la EH, la cual se observa acompañando a la muerte de las neuronas. Mediante IHQ se analizaron dos marcadores astrocitarios característicos, GFAP y S100β (Figura 17A). Se pudo determinar un aumento progresivo de la reactividad para ambos marcadores en el estriado a medida que la enfermedad avanza. Observamos un aumento de aproximadamente el 50% para GFAP+/S100β+ en el estadio 2 y un aumento significativo de aproximadamente un 150% durante el estadio 4.

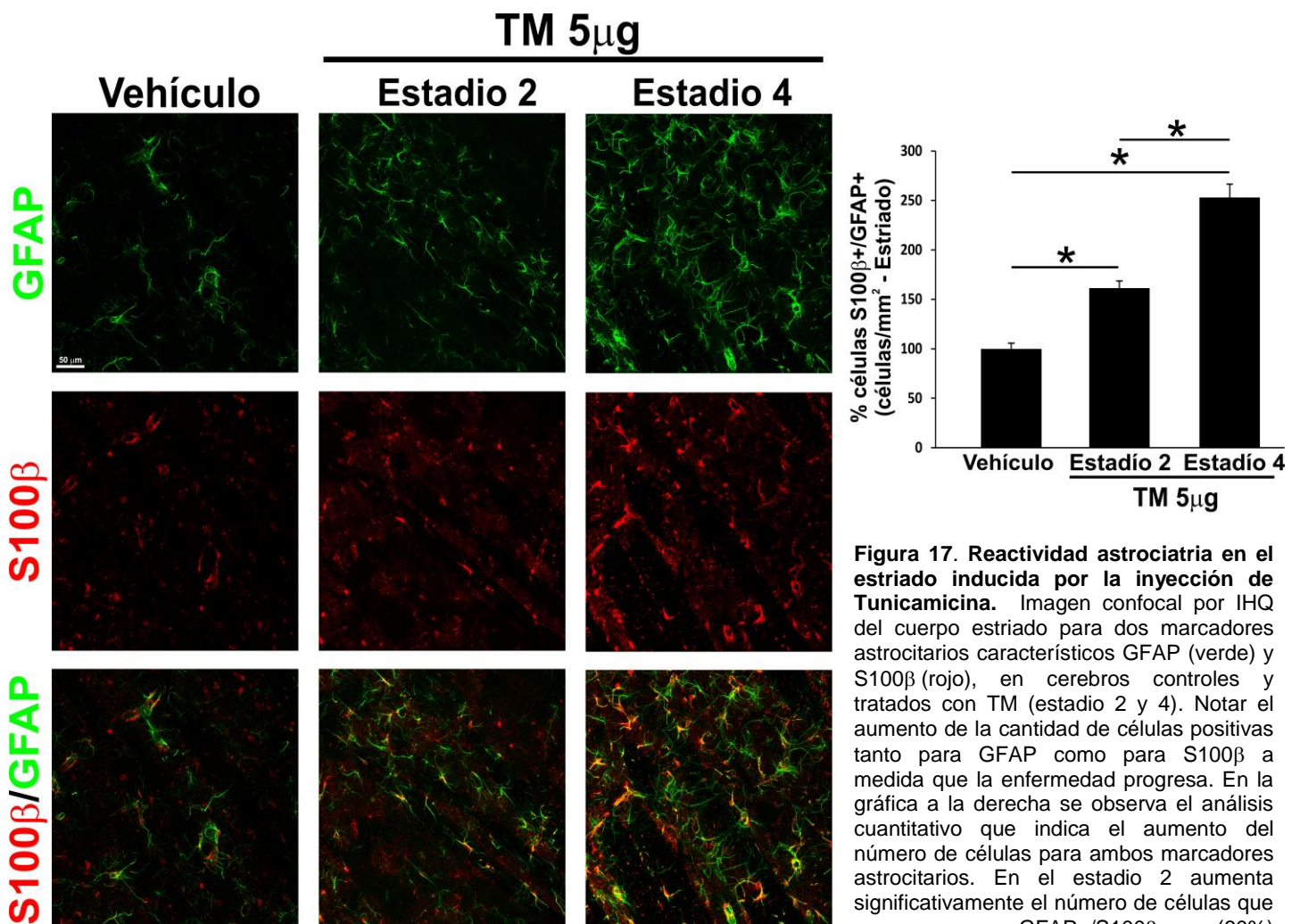


Figura 17. Reactividad astrocitaria en el estriado inducida por la inyección de Tunicamicina. Imagen confocal por IHQ del cuerpo estriado para dos marcadores astrocitarios característicos GFAP (verde) y S100β (rojo), en cerebros controles y tratados con TM (estadio 2 y 4). Notar el aumento de la cantidad de células positivas tanto para GFAP como para S100β a medida que la enfermedad progresa. En la gráfica a la derecha se observa el análisis cuantitativo que indica el aumento del número de células para ambos marcadores astrocitarios. En el estadio 2 aumenta significativamente el número de células que co-expresan GFAP+/S100β+ (60%)

mientras que en el estadio 4 se observa un aumento de casi un 150%. Los datos están expresados como el promedio ± SD; *P < 0.05.

La inyección de TM generó un aumento de la microgliosis en el estriado

Además de la respuesta astrocitaria característica, la neuroinflamación está también acompañada por la proliferación de células microgliales. Por tal motivo analizamos la expresión por IHQ de Iba1, un marcador típico de células microgliales. En la figura 18A se observa un aumento significativo de la cantidad de células Iba1+, el cual aumenta progresivamente a medida que la enfermedad avanza. En el estadio 2 observamos un aumento aproximado del 60% mientras en el estadio 4 la expresión de Iba1 aumenta aproximadamente un 140%.

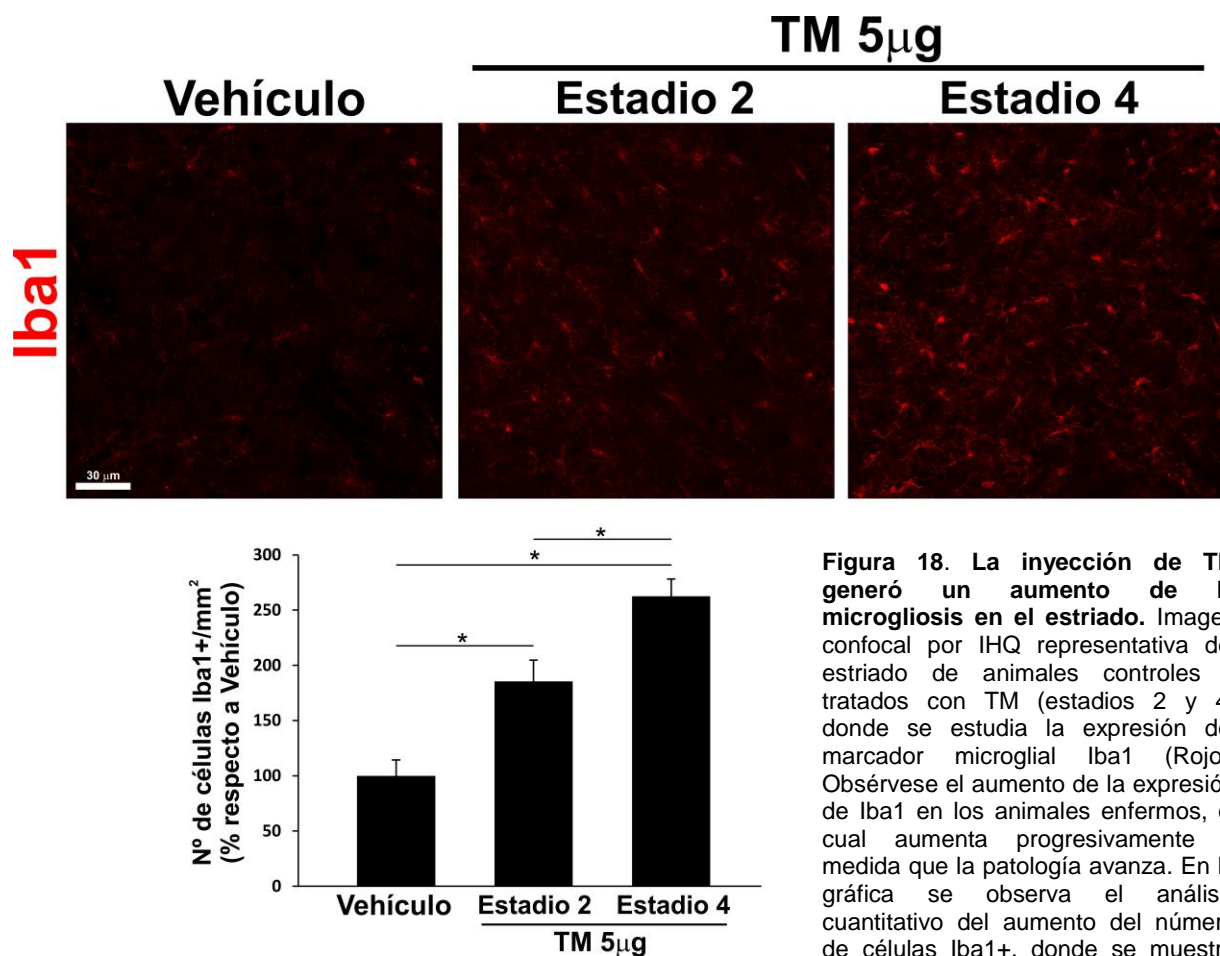


Figura 18. La inyección de TM generó un aumento de la microgliosis en el estriado. Imagen confocal por IHQ representativa del estriado de animales controles y tratados con TM (estadios 2 y 4) donde se estudia la expresión del marcador microglial Iba1 (Rojo). Obsérvese el aumento de la expresión de Iba1 en los animales enfermos, el cual aumenta progresivamente a medida que la patología avanza. En la gráfica se observa el análisis cuantitativo del aumento del número de células Iba1+, donde se muestra que en el estadio 2 existe un aumento

de aproximadamente el 60%, el cual se eleva hasta aproximadamente un 140% en el estadio 4. Los datos están expresados con un \pm SD; * $P < 0.05$.

La inyección de TM provocó una degeneración tardía de las neuronas de la Sustancia Nigra

En las etapas tardías de la EH también se ven afectadas otras zonas del encéfalo, además del estriado, como la Sustancia Nigra (SN). Por este motivo estudiamos la neuroinflamación en la SN mediante la técnica de IHQ, analizando la población de células microgliales Iba1+ y estudiamos las poblaciones de neuronas TH+ durante el estadio. En la figura 19A podemos observar una disminución significativa (aproximadamente un 40 %) del número de neuronas TH+ en la SN de los animales tratados con TM durante el estadio 4. Además, esta pérdida de neuronas está acompañada de un gran aumento de la reactividad microglial evidenciada por el aumento en la expresión de Iba1. En la gráfica se puede observar un incremento significativo del 90% de la expresión de Iba1. Además del aumento del número de células microgliales, podemos observar en los animales sintomáticos, una estrecha relación de la microglía con las neuronas TH+ degenerantes.

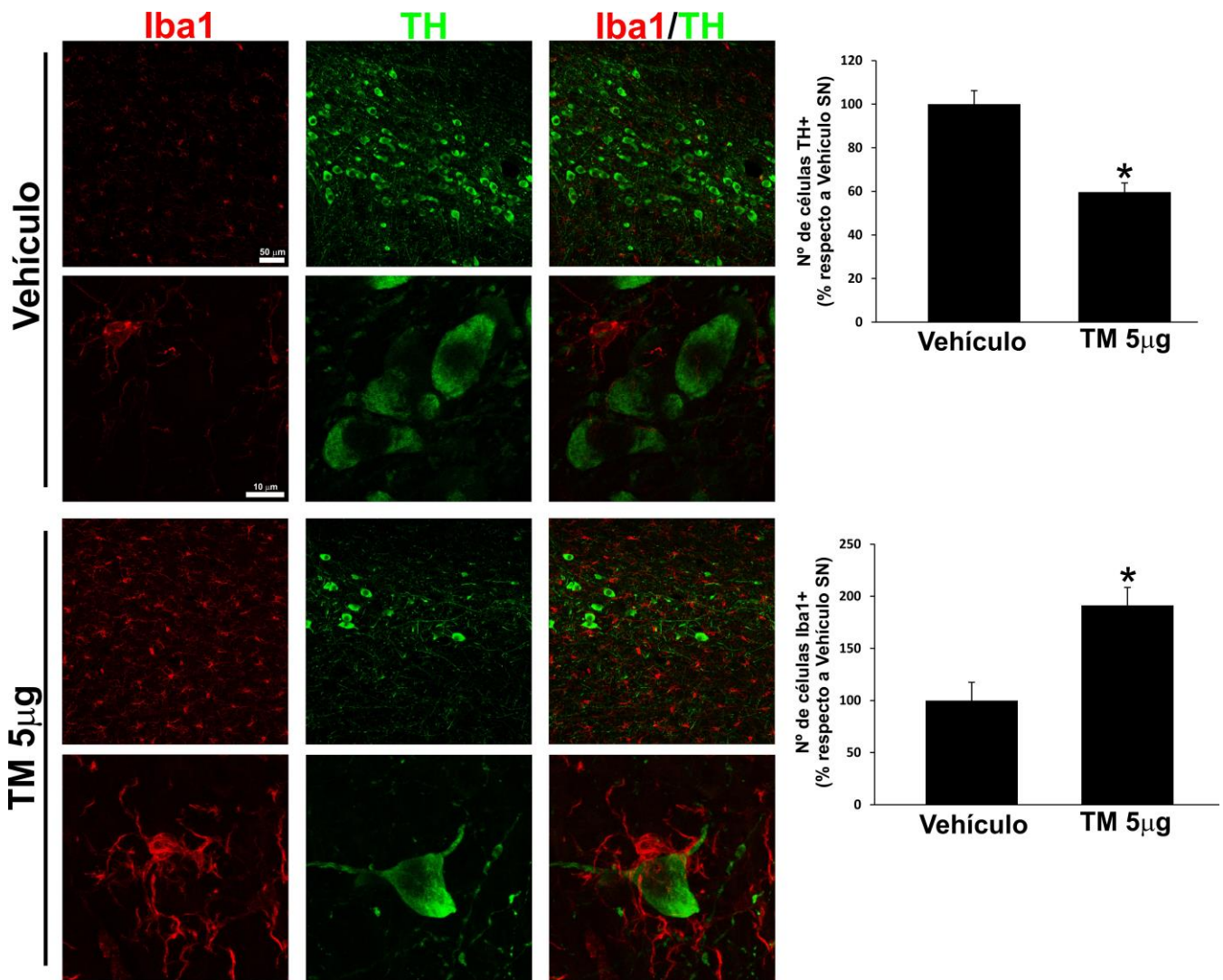


Figura 19. La inyección de TM provocó una disminución tardía del número de neuronas TH+ de la sustancia nigra. Inmunohistoquímica confocal representativa de la Sustancia Nigra de animales inyectados con DMSO y con TM (estadio 4). Obsérvese una disminución significativa (40 % según el análisis cuantitativo de la gráfica a la derecha) del número de neuronas TH+ (Verde) en la SN de los animales durante el estadio 4. Ésta pérdida de neuronas está acompañada de un gran aumento de la reactividad microglial evidenciada por el aumento en la expresión de Iba1 (Rojo- aproximadamente 90% como se puede ver en la gráfica de abajo). Obsérvese también en los animales sintomáticos una estrecha relación de la microglía con las neuronas TH+. Los datos están expresados con un \pm SD; * $P < 0.05$.

4. Discusión

La EH es una patología neurodegenerativa progresiva y fatal, causada por una expansión de CAG en el gen que codifica para la Huntingtina y en la cual el ERE ha sido ampliamente asociado a los mecanismos moleculares que subyacen a la misma. Esta degeneración del cuerpo estriado está acompañada de una fuerte activación de las células gliales, particularmente los astrocitos y la microglía. Además, a medida que la enfermedad progresa, otras áreas diferentes del estriado se ven afectadas, como la SN y la corteza pre-frontal asociada a funciones cognitivas. En este trabajo nos propusimos como objetivo determinar si la inducción del ERE utilizando un estresor del retículo endoplásmico, como la TM, podía generar una patología neurodegenerativa estriatal. Los resultados mostraron que una única inyección de TM en la cisterna magna (5 µg) es suficiente para desarrollar una patología neurológica caracterizada por un fenotipo motor similar a la corea de Huntington, donde el ERE provoca la muerte de las neuronas estriatales NeuN+, la cual está acompañada por una fuerte reactividad astrocitaria y microglial, tanto en el estriado como en la SN.

Las ratas inyectadas con TM desarrollaron un fenotipo con características similares a las presentadas en pacientes y modelos animales de EH (19, 57). Este fenotipo está caracterizado por una pérdida de peso significativa respecto a los animales control inyectados con el vehículo DMSO, así como también se vieron afectadas sus capacidades motoras debido a la pérdida de movimientos voluntarios. La pérdida de peso comenzó en el día 1 post-inyección y mantuvo un descenso progresivo hasta el momento del sacrificio del animal. Cuatro días luego de la inyección de TM, las capacidades motoras comenzaron a verse afectadas en principio por la pérdida de equilibrio, observándose una disminución en la ejecución de los movimientos voluntarios, acompañada por rigidez de los miembros. En un estadio más avanzado (estadio 3) se observó un enlentecimiento de la capacidad de desplazarse alcanzando, finalmente, una pérdida completa del control motor, fenotipo que coincide con lo observado en la patología en modelos murinos y pacientes humanos (8-11). Uno de los

aspectos más llamativos del fenotipo fue que logró recrear los movimientos de corea de la EH una vez avanzada la sintomatología, siendo ésta la una de las primeras características descritas de la enfermedad (58). Estas características típicas de la EH nos llevan a pensar que el fenotipo desencadenado por la TM podría constituir un novedoso modelo para dicha patología neurodegenerativa. La TM fue utilizada por primera vez por D.D. Leaver *et. al.* (1988), quienes inyectando 12-24 μg de TM en el ventrículo lateral en ratas Wistar, observaron una alteración neurológica superior, en muchos casos con características similares a las de un infarto cerebral (31)., aunque sin hacer foco en la degeneración que tiene lugar en el estriado. Más recientemente, otros autores inyectaron TM directamente en el estriado, mostrando aumento de la agregación de mHTT en dos modelos genéticos diferentes de ratón (32). Estos resultados apoyan la posibilidad de que la TM pueda ser utilizada como un modelo alternativo a los modelos genéticos disponibles, ya que estos tienen numerosas desventajas, siendo una de las más importantes la limitación al momento de estudiar los eventos moleculares, así como la contribución de las células gliales a la patología (23).

El estudio morfológico del estriado reveló una disminución significativa del volumen del mismo en las ratas tratadas con TM respecto de los controles, disminución que ha sido previamente reportada en los modelos genéticos de EH (59). Además se observó una disminución del número de neuronas estriatales mediante técnica de IHQ, observándose una disminución significativa del número de células NeuN+, un fenómeno que ha sido previamente evidenciado en modelos animales y que es característico de la patología en humanos (60). Las alteraciones de las neuronas espinosas del estriado acompañadas por una gran reactividad glial son eventos que ocurren muy tempranamente en la fase sintomática en modelos animales y humanos (23, 48). Aunque aún no se ha podido determinar con certeza si la degeneración comienza en el estriado, muchas investigaciones avalan que ésta es, probablemente, la zona más vulnerable tanto en modelos genéticos como químicos de la EH (61). Por lo tanto, nuestros resultados tanto a nivel comportamental como histológico refuerzan la hipótesis de que la TM podría inducir una patología similar a la EH iniciando una degeneración estriatal

temprana.

La inyección de TM provocó un aumento significativo de la expresión de BiP de aproximadamente un 50% en la SN y 55% en el estriado, y un aumento aproximado de la iNOS de un 80% en la SN y 60% en el estriado. Observamos también un aumento significativo de la expresión de ATF4 en el estriado de animales tratados con TM. Éste aumento de la expresión de BiP ha sido reportado en estudios previos en la EH, en los cuales se evidenció que las neuronas estriatales que expresan la mHTT son más sensibles a un ERE inducido farmacológicamente, ya que se observa una rápida acumulación de BiP en el RE activando rápidamente la respuesta UPR. Como consecuencia de esto, las inclusiones proteicas podrían activar las vías apoptóticas asociadas al ERE o podrían alterar los controles de calidad poniendo en peligro el plegamiento de otras proteínas secretorias, simulando los efectos causados por la sobre-expresión de las expansiones de poliglutamina en el citoplasma (62-64). Por otra parte, ha sido reportado el aumento de la expresión de iNOS en el estriado en modelos de EH inducidos químicamente, indicando que el estrés oxidativo puede desempeñar un papel patogénico importante durante la enfermedad (22).

El ERE también se ha propuesto como un mecanismo patogénico relevante en la EH, ya que el aumento de la expresión de proteínas inducidas en esta condición (BiP, ATF4 y eIF2 α -fosforilada) se correlacionan con el avance de la sintomatología (25, 26). Por otro lado existen evidencias tanto en modelos murinos como en tejido *post-mortem* humano, de que la formación de agregados de la proteína huntingtina mutante aumenta conforme progresa la sintomatología (29, 65), siendo la agregación de proteínas mal plegadas en el RE, la causa principal de la generación del ERE. Por esto, y en concordancia con nuestros resultados, podemos pensar que la inyección de TM genera un aumento progresivo del ERE (aumento progresivo de BiP) a medida que los síntomas progresan. Este aumento de ERE progresivo ha sido demostrado previamente en los modelos murinos genéticos (62-64). Si bien no ha sido demostrado aún en pacientes, podríamos pensar que a medida que la enfermedad en humanos progresa, los niveles de ERE, debido al mal

plegamiento de proteínas, también aumenta progresivamente, convirtiéndose en un mecanismo patogénico preponderante en la patología (65, 66). Por lo tanto nuestros resultados, podrían aportar evidencias de la importancia del ERE en la degeneración temprana de las neuronas del estriado, siendo éste el evento central que desencadena la neurodegeneración.

Por otro lado, en este trabajo mostramos un aumento significativo de reactividad astrocitaria, evidenciada por el incremento en la expresión de GFAP y S100 β . Además, al igual que con los niveles de ERE, el aumento de la astrocitosis en el estriado fue progresivo a medida que avanzaron los síntomas. En el estadio 2 observamos un aumento de aproximadamente un 50% de la co-localización de GFAP/S100 β , y un aumento de aproximadamente 150% en el estadio 4, en comparación con los animales inyectados con el vehículo. La reactividad astrocitaria es una de las características fundamentales de las patologías neurodegenerativas, como la Esclerosis Lateral Amiotrófica, la enfermedad de Parkinson, el Alzheimer y EH (1, 3, 23). En particular, en la EH, la reactividad astrocitaria es un evento que ocurre en etapas tempranas de la patología. Ha sido demostrado que esta reactividad glial está caracterizada por un fuerte aumento de la expresión de GFAP y S100 β (67). S100 β tiene efectos parácrinos que contribuyen a la proliferación astrocitaria, la migración así como a la diferenciación y muerte neuronal (68, 69). Además, estudios previos en modelos químicos de la EH sugieren que la reactividad astrocitaria podría estar contribuyendo a la progresión de la enfermedad mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (22). Por esto, nuestros resultados aportan evidencias que la inyección de TM podría estar generando un ERE estriatal, que lleva a la muerte de neuronas NeuN+ y desencadena una fuerte reactividad astrocitaria, siendo estos eventos característicos ya reportados en los diferentes modelos genéticos y químicos de EH así como en pacientes humanos.

Otra evidencia que confirma el fenotipo similar a la EH inducida por la inyección de TM, es la microgliosis progresiva observada en el modelo. Mediante técnicas de IHQ, observamos un significativo aumento en los niveles de la proteína Iba1, típica de las células microgliales. Durante el estadio 2

observamos un aumento de aproximadamente un 40% con respecto al control, y un aumento de aproximadamente un 90% en el estadio 4. Además del aumento en el estriado, observamos un aumento significativo de los niveles de Iba1 en la SN, donde las células microgliales se encuentran rodeando a las neuronas TH+. Trabajos previos han mostrado que el aumento de la reactividad microglial está estrechamente relacionado a la fase asintomática y sintomática de la EH, tanto en modelos murinos como en humanos (70). Esta reactividad microglial produce citoquinas, factores de muerte, fagocitosis de neuronas (50, 71). Trabajos previos han demostrado en cultivos celulares, que las células microgliales son capaces de activarse en presencia de neuronas que sobre-expresan mHTT humana, proliferando y posicionándose alrededor de los cuerpos y procesos neuronales. La activación de la microglía implica aumento de la tasa proliferativa además de un cambio morfológico que se correlaciona con la muerte neuronal progresiva tanto en el estriado, la SN y otras regiones tardíamente afectadas en la enfermedad (47, 50, 71).

Diversos estudios han mostrado que en la EH la neurodegeneración progresa a otras áreas del SNC, como la corteza, el hipocampo, cerebelo, y principalmente la SN (72). Por tanto, para determinar si en nuestro modelo la patología progresa hacia otras áreas diferentes del estriado, estudiamos por IHQ las poblaciones de células TH+ en la SN. Observamos que durante los estadios finales de la enfermedad (estadio 4), se produce una disminución significativa del número de células TH+ (aproximadamente un 40%). Estudios previos han demostrado que a medida que la patología avanza, otras áreas del encéfalo se ven afectadas, como la SN, el cerebelo, el hipocampo y la corteza pre-frontal asociada a las funciones cognitivas (71). La degeneración en estas áreas adyacentes al estriado está caracterizada por el aumento de los niveles de ERE, reactividad glial, y muerte de neuronas (23, 71). Esta alteración de las células TH+ en la SN ha sido previamente reportada tanto en modelos animales como en humanos, observándose un aumento temprano de la actividad TH seguido por una inhibición significativa de la misma (72). Nuestros resultados coinciden con las características reportadas en la EH tanto en los modelos animales como en los pacientes. Esto nos lleva a pensar que la TM podría estar iniciando una degeneración estriatal como consecuencia del ERE,

que lleva a una neurodegeneración progresiva, caracterizada además por una evidente reactividad astrocitaria y microglial. Además, al igual que sucede en los modelos previamente descritos, en nuestro modelo, en etapas avanzadas de la patología logramos observar una disminución del número de neuronas TH+ en la SN, acompañada de neuroinflamación evidenciada por el aumento de la expresión de Iba1.

Conclusiones

Nuestros resultados muestran que una única inyección de TM en la cisterna magna fue capaz de generar un fenotipo motor similar al observado en la EH, caracterizado por una pérdida de neuronas NeuN+ en el cuerpo estriado y un aumento significativo del volumen del segundo ventrículo. La inyección de TM indujo un ERE progresivo en el estriado y en la SN. También se observó un incremento significativo de la reactividad glial, particularmente un aumento de la reactividad astrocitaria, evidenciada por un aumento de la expresión de S100 β y GFAP, y un aumento significativo de la reactividad microglial, caracterizado por un aumento de la expresión de Iba1 en el estriado y en la SN. Sumado a esto, los resultados mostraron una disminución significativa de las células TH+ en la SN. Todos estos resultados nos permiten afirmar que la TM fue capaz de inducir un ERE capaz de desencadenar una neurodegeneración central, principalmente en el estriado, generando un fenotipo motor similar a la EH, y con características histológicas compartidas. Por lo tanto, podría considerarse a la inyección de TM en la cisterna magna, como un nuevo modelo de enfermedad de Huntington.

Perspectivas

- Debido a la gran degeneración observada, analizaremos marcadores de daño celular en estadios presintomáticos.
- Caracterizar la muerte neuronal primaria, para verificar si sucede en el estriado y luego se expande a otras áreas del encéfalo, con un posterior análisis de las otras áreas afectadas.
- Administrar la Tunicamicina directamente en el estriado para determinar

la especificidad de la droga.

- Administrar menores dosis de Tunicamicina con el objetivo de obtener una sintomatología más lenta para obtener una mayor ventana terapéutica.
- Evaluar el daño en la barrera hematoencefálica.

Bibliografía

1. L. H. Barbeito *et al.*, A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain research. Brain research reviews* **47**, 263 (Dec, 2004).
2. E. Trias *et al.*, Phenotypic transition of microglia into astrocyte-like cells associated with disease onset in a model of inherited ALS. *Frontiers in cellular neuroscience* **7**, 274 (2013).
3. P. Diaz-Amarilla *et al.*, Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 18126 (Nov 1, 2011).
4. S. Saba Sheikh, Ejazul Haque, and Snober S. Mir, Neurodegenerative Diseases: Multifactorial Conformational Diseases and Their Therapeutic Interventions. *Journal of Neurodegenerative Diseases* **2013**, (2013).
5. F. O. Walker, Huntington's Disease. *Seminars in neurology* **27**, 143 (Apr, 2007).
6. T. Pringsheim *et al.*, The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* **27**, 1083 (Aug, 2012).
7. L. W. Ho *et al.*, The molecular biology of Huntington's disease. *Psychological medicine* **31**, 3 (Jan, 2001).
8. P. Beighton, M. R. Hayden, Huntington's chorea. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde* **59**, 250 (Feb 21, 1981).
9. S. E. Folstein, R. J. Leigh, I. M. Parhad, M. F. Folstein, The diagnosis of Huntington's disease. *Neurology* **36**, 1279 (Oct, 1986).
10. P. D. Thompson *et al.*, The coexistence of bradykinesia and chorea in Huntington's disease and its implications for theories of basal ganglia control of movement. *Brain : a journal of neurology* **111 (Pt 2)**, 223 (Apr, 1988).
11. A. B. Young *et al.*, Huntington's disease in Venezuela: neurologic features and functional decline. *Neurology* **36**, 244 (Feb, 1986).
12. M. A. Pouladi, A. J. Morton, M. R. Hayden, Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. *Nature reviews. Neuroscience* **14**, 708 (Oct, 2013).
13. E. Cattaneo, C. Zuccato, M. Tartari, Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nature reviews. Neuroscience* **6**, 919 (Dec, 2005).
14. J. P. Vonsattel, M. DiFiglia, Huntington disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **57**, 369 (May, 1998).
15. C. A. Ross, S. J. Tabrizi, Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *The Lancet. Neurology* **10**, 83 (Jan, 2011).
16. J. M. Rabey, F. Hefti, Neuromelanin synthesis in rat and human substantia nigra. *Journal of neural transmission. Parkinson's disease and dementia section* **2**, 1 (1990).
17. S. M. Nicola, J. Surmeier, R. C. Malenka, Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annual review of neuroscience* **23**, 185 (2000).

18. T. Mestre, J. Ferreira, M. M. Coelho, M. Rosa, C. Sampaio, Therapeutic interventions for symptomatic treatment in Huntington's disease. *The Cochrane database of systematic reviews*, CD006456 (2009).
19. S. M. Hague, S. Klaffke, O. Bandmann, Neurodegenerative disorders: Parkinson's disease and Huntington's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **76**, 1058 (Aug, 2005).
20. M. F. Beal *et al.*, Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **13**, 4181 (Oct, 1993).
21. E. Brouillet, C. Jacquard, N. Bizat, D. Blum, 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *Journal of neurochemistry* **95**, 1521 (Dec, 2005).
22. J. K. Ryu, S. U. Kim, J. G. McLarnon, Blockade of quinolinic acid-induced neurotoxicity by pyruvate is associated with inhibition of glial activation in a model of Huntington's disease. *Experimental neurology* **187**, 150 (May, 2004).
23. J. Bradford *et al.*, Expression of mutant huntingtin in mouse brain astrocytes causes age-dependent neurological symptoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 22480 (Dec 29, 2009).
24. I. Braakman, N. J. Balleid, Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annual review of biochemistry* **80**, 71 (2011).
25. C. Hetz, B. Mollereau, Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nature reviews. Neuroscience* **15**, 233 (Apr, 2014).
26. K. M. Doyle *et al.*, Unfolded proteins and endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disorders. *Journal of cellular and molecular medicine* **15**, 2025 (Oct, 2011).
27. C. Xu, B. Bailly-Maitre, J. C. Reed, Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *The Journal of clinical investigation* **115**, 2656 (Oct, 2005).
28. A. Balogh *et al.*, Overexpression of CREB protein protects from tunicamycin-induced apoptosis in various rat cell types. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **19**, 1080 (Jul, 2014).
29. R. Vidal, B. Caballero, A. Couve, C. Hetz, Converging pathways in the occurrence of endoplasmic reticulum (ER) stress in Huntington's disease. *Current molecular medicine* **11**, 1 (Feb, 2011).
30. F. W. Hemming, Control and manipulation of the phosphodolichol pathway of protein N-glycosylation. *Bioscience reports* **2**, 203 (Apr, 1982).
31. D. D. Leaver *et al.*, The neurotoxicity of tunicamycin. *Toxicology* **49**, 179 (Apr, 1988).
32. J. Y. Noh *et al.*, SCAMP5 links endoplasmic reticulum stress to the accumulation of expanded polyglutamine protein aggregates via endocytosis inhibition. *The Journal of biological chemistry* **284**, 11318 (Apr 24, 2009).
33. G. P. Wilkin, D. R. Marriott, A. J. Cholewinski, Astrocyte heterogeneity. *Trends Neurosci* **13**, 43 (Feb, 1990).

34. M. Tsacopoulos, P. J. Magistretti, Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* **16**, 877 (Feb 1, 1996).
35. A. Volterra, J. Meldolesi, Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* **6**, 626 (Aug, 2005).
36. P. Bezzi, M. Domercq, S. Vesce, A. Volterra, Neuron-astrocyte cross-talk during synaptic transmission: physiological and neuropathological implications. *Prog Brain Res* **132**, 255 (2001).
37. M. Palmada, J. J. Centelles, Excitatory amino acid neurotransmission. Pathways for metabolism, storage and reuptake of glutamate in brain. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **3**, d701 (Jul 20, 1998).
38. L. Hertz, R. Dringen, A. Schousboe, S. R. Robinson, Astrocytes: glutamate producers for neurons. *Journal of neuroscience research* **57**, 417 (Aug 15, 1999).
39. E. B. Clabough, Huntington's disease: the past, present, and future search for disease modifiers. *The Yale journal of biology and medicine* **86**, 217 (Jun, 2013).
40. J. D. Rothstein *et al.*, Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* **16**, 675 (Mar, 1996).
41. J. Y. Shin *et al.*, Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *The Journal of cell biology* **171**, 1001 (Dec 19, 2005).
42. M. Faideau *et al.*, In vivo expression of polyglutamine-expanded huntingtin by mouse striatal astrocytes impairs glutamate transport: a correlation with Huntington's disease subjects. *Human molecular genetics* **19**, 3053 (Aug 1, 2010).
43. V. H. Perry, J. A. Nicoll, C. Holmes, Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* **6**, 193 (Apr, 2010).
44. S. U. Kim, J. de Vellis, Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* **81**, 302 (Aug 1, 2005).
45. E. D. Hall, J. A. Oostveen, M. E. Gurney, Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia* **23**, 249 (Jul, 1998).
46. J. Gehrman, Y. Matsumoto, G. W. Kreutzberg, Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* **20**, 269 (Mar, 1995).
47. N. Pavese *et al.*, Microglial activation correlates with severity in Huntington disease: a clinical and PET study. *Neurology* **66**, 1638 (Jun 13, 2006).
48. E. Sapp *et al.*, Early and progressive accumulation of reactive microglia in the Huntington disease brain. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **60**, 161 (Feb, 2001).
49. S. K. Singhrao, J. W. Neal, B. P. Morgan, P. Gasque, Increased complement biosynthesis by microglia and complement activation on neurons in Huntington's disease. *Experimental neurology* **159**, 362 (Oct, 1999).
50. A. D. Kraft, L. S. Kaltenbach, D. C. Lo, G. J. Harry, Activated microglia proliferate at neurites of mutant huntingtin-expressing neurons. *Neurobiology of aging* **33**, 621 e17 (Mar, 2012).
51. D. C. T. Leandro Luongo de Matos, Maria Graciela Luongo de Matos and Maria Aparecida da Silva Pinhal, Immunohistochemistry as an Important

- Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. *Libertas Academica*, (2010).
52. C. J. R. S. Sheppard, D.M. , Image formation in the confocal laser scanning microscope. *In Confocal Laser Scanning Microscopy*, (1997).
 53. G. Guilbault, General aspects of luminescence spectroscopy. . *In Practical Fluorescence, 2nd Ed.*, (1990).
 54. D. W. Semwogerere, E.R., Confocal Microscopy. (2006).
 55. H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4350 (Sep, 1979).
 56. R. Westermeier, Looking at proteins from two dimensions: a review on five decades of 2D electrophoresis. *Archives of physiology and biochemistry* **120**, 168 (Dec, 2014).
 57. F. O. Walker, Huntington's disease. *Lancet* **369**, 218 (Jan 20, 2007).
 58. M. S. Okun, Huntington's disease: what we learned from the original essay. *The neurologist* **9**, 175 (Jul, 2003).
 59. K. A. Sieradzan, D. M. Mann, The selective vulnerability of nerve cells in Huntington's disease. *Neuropathology and applied neurobiology* **27**, 1 (Feb, 2001).
 60. H. Heinsen *et al.*, Cortical and striatal neurone number in Huntington's disease. *Acta neuropathologica* **88**, 320 (1994).
 61. H. D. Rosas *et al.*, Cerebral cortex and the clinical expression of Huntington's disease: complexity and heterogeneity. *Brain : a journal of neurology* **131**, 1057 (Apr, 2008).
 62. P. Lajoie, E. L. Snapp, Changes in BiP availability reveal hypersensitivity to acute endoplasmic reticulum stress in cells expressing mutant huntingtin. *Journal of cell science* **124**, 3332 (Oct 1, 2011).
 63. S. Waelter *et al.*, Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Molecular biology of the cell* **12**, 1393 (May, 2001).
 64. T. Gidalevitz, A. Ben-Zvi, K. H. Ho, H. R. Brignull, R. I. Morimoto, Progressive disruption of cellular protein folding in models of polyglutamine diseases. *Science* **311**, 1471 (Mar 10, 2006).
 65. F. Cicchetti *et al.*, Mutant huntingtin is present in neuronal grafts in Huntington disease patients. *Annals of neurology* **76**, 31 (Jul, 2014).
 66. E. Pecho-Vrieseling *et al.*, Transneuronal propagation of mutant huntingtin contributes to non-cell autonomous pathology in neurons. *Nature neuroscience* **17**, 1064 (Aug, 2014).
 67. S. Olivera-Bravo *et al.*, Neonatal astrocyte damage is sufficient to trigger progressive striatal degeneration in a rat model of glutaric acidemia-I. *PLoS one* **6**, e20831 (2011).
 68. F. Brozzi, C. Arcuri, I. Giambanco, R. Donato, S100B Protein Regulates Astrocyte Shape and Migration via Interaction with Src Kinase: IMPLICATIONS FOR ASTROCYTE DEVELOPMENT, ACTIVATION, AND TUMOR GROWTH. *The Journal of biological chemistry* **284**, 8797 (Mar 27, 2009).
 69. R. Donato *et al.*, S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochimica et biophysica acta* **1793**, 1008 (Jun, 2009).

70. D. A. Simmons *et al.*, Ferritin accumulation in dystrophic microglia is an early event in the development of Huntington's disease. *Glia* **55**, 1074 (Aug 1, 2007).
71. M. Politis *et al.*, Microglial activation in regions related to cognitive function predicts disease onset in Huntington's disease: a multimodal imaging study. *Human brain mapping* **32**, 258 (Feb, 2011).
72. G. J. t. Yohrling *et al.*, Analysis of cellular, transgenic and human models of Huntington's disease reveals tyrosine hydroxylase alterations and substantia nigra neuropathology. *Brain research. Molecular brain research* **119**, 28 (Nov 6, 2003).