

Tesis de Posgrado

Estudio del efecto del factor de Necrosis tumoral -alfa sobre las neuronas dopaminérgicas de la substantia nigra en relación a la enfermedad de Parkinson

Di Paolo, Nelson César

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Di Paolo, Nelson César. (2002). Estudio del efecto del factor de Necrosis tumoral -alfa sobre las neuronas dopaminérgicas de la substantia nigra en relación a la enfermedad de Parkinson. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3466_DiPaolo.pdf

Cita tipo Chicago:

Di Paolo, Nelson César. "Estudio del efecto del factor de Necrosis tumoral -alfa sobre las neuronas dopaminérgicas de la substantia nigra en relación a la enfermedad de Parkinson". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3466_DiPaolo.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

"Estudio del efecto del Factor de Necrosis Tumoral- α
sobre las neuronas dopaminérgicas
de la *substantia nigra*
en relación a la Enfermedad de Parkinson"

Autor

Lic. Nelson César Di Paolo

Director

Dr. Fernando Pitossi

Consejero de Estudios

Dr. Osvaldo Podhajcer

Tesis presentada para optar por el grado de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires (UBA)

Instituto de Investigaciones Bioquímicas
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires (UBA)

2002

A Mariana, mi amor.

A Lucas, nuestro amor.

A mi Viejo, por tantos años de apoyo sin aflojar.

A mi Madre, por tanto empuje desde mi niñez.

Gracias, Nelson.

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido publicados en:

“Neuroprotective and neurodegenerative effects of the long-term expression of TNF α in the substantia nigra of mice”.

Di Paolo, N., Schoenenberg, A., Depino, A., Ferrari, C., Alvarez, M., Pfinzenmaier, K., Podhajcer, O., Eisel, U., Pitossi, F. Enviado al “Journal of Experimental Medicine”.

Fe de Erratas.

Transiente: debe decir “transitoria”.

PGK-neo. Transgén de resistencia a neomicina (“neo”) bajo el control del promotor de la Fosfoglicerato Kinasa (PGK, “Phosphoglycerate Kinase”).

Sitios LoxP. Secuencias de ADN reconocidas por la recombinasa Cre.

Secuencia “floxeadá.” Secuencia de ADN flanqueada por dos sitios LoxP.

TNFTg. Factor de Necrosis Tumoral-alfa expresado por la construcción insertada bajo la regulación del promotor engrailed.

Abreviaciones utilizadas en el presente trabajo (presentadas por orden alfabético)(las correspondientes a Materiales y Métodos están al inicio de la sección “Materiales”):

6-OHDA. 6-hidroxi dopamina

BBB. Barrera hematoencefálica (“Blood Brain Barrier”).

Ca²⁺. Calcio.

CsA. Ciclosporina A.

CSFs. Factores Estimuladores de Colonia (“Colony Stimulating Factors”).

DBS. Estimulación Cerebral Profunda (“Deep Brain Stimulation”).

DD. Dominios de muerte (“Death Domain”).

DO. Densidad óptica.

EAE. Encefalomiелitis experimental autoinmune (“Experimental autoimmune encephalomyelitis”).

GABA. Acido gamma-amino-butírico (“γ-amine-butiric acid”).

ICAM-1. Molécula de Adhesión Intracelular-1 (“Intracellular Adhesion Molecule-1”).

IL. Interleuquina.

IL-1ra. Receptor antagonista de la IL-1 (“Interleukin 1 receptor antagonist”).

INOS. Oxido Nítrico Sintetasa inducible (“Inducible Nitric Oxide Synthase”).

JNK. Kinasa c-jun N-terminal (“c-jun N-terminal kinase”).

LPS. Lipopolisacárido.

LTα. Linfotoxina-alfa.

MAO-B. Monoamino oxidasa B.

MAPK. Proteínas quinasas activadas por mitógeno (“Mitogen activated protein-kinases”).

MnSOD. Manganeso-superóxido dismutasa (“Manganese-superoxide Dismutase”).

MPP+. 1-metil-4-fenilpiridinio.

MPTP. 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.

NFκB. Factor de Transcripción Nuclear kappa B (“Nuclear Transcription Factor kappa B”).

NMDA. N-metil-d-aspartato.

NO. Oxido nítrico.

PC-PLC. Fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (“Phosphatidylcholine specific-Phospholipase C”).

PD. “Enfermedad de Parkinson” (“Parkinson’s disease”).

ROS. Especies Reactivas de Oxígeno (“Reactive Oxygen Species”).

sn. *substantia nigra*.

SNC. Sistema Nervioso Central.

snpc. *substantia nigra pars compacta*.

snpr. *substantia nigra pars reticulata*.

TACE. Enzima “convertidora” de TNF (“TNF-α-converting enzyme”).

TGF-β. Factor de Crecimiento Transformante-beta (“Transforming Growth Factor-β”).

TH. Tirosin-hidroxilasa.

TH+. Célula positiva para la enzima TH.

TNF-α y β. Factores de Necrosis Tumoral α y β, respectivamente (“Tumor Necrosis Factor α y β”).

TNFm. Forma anclada a membrana del TNF.

TNFR1. Receptor Tipo I del TNF.

TNFR2. Receptor Tipo II del TNF.

TNFRs. Receptores del Factor de Necrosis Tumoral-alfa (“Tumor Necrosis Factor Receptors”).

TNFs. Forma soluble del TNF.

TRAFs. Factores asociados a los TNFRs (“TNFR associated factors”).

UCHL1. Ubiquitina hidrolasa carboxy-terminal L1.

Ufp. Unidades formadoras de placas.

VCAM-1. Molécula de Adhesión Vascular-1 (“Vascular cell adhesion molecule-1”).

VTA. Area tegmental ventral (“ventral Tegmental Area”).

	N° de página
Resumen.	I
Abstract.	II
1. Introducción.	1
1.1. El Síndrome de Parkinson.	1
1.1.1. Etiología de la PD.	1
1.1.2. Posibles mecanismos de muerte de las neuronas dopaminérgicas.	4
1.1.3. Tratamiento de la PD.	7
1.1.4. Modelos animales de la PD.	8
1.2. Citoquinas.	11
1.2.1. Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF).	11
1.2.1.1. La Superfamilia del TNF.	11
1.2.1.2. Biología del TNF.	12
1.2.1.3. Funciones mediadas por el TNF.	13
1.2.1.4. El TNF de membrana (TNFm).	14
1.3. Citoquinas en el SNC.	16
1.3.1. TNF en el SNC.	16
1.4. La PD, la respuesta inflamatoria, y el TNF.	18
1.5. Expresión condicional de genes en tiempo y lugar.	20
2. Objetivo.	24
3. Materiales.	25
3.1. Listado general de reactivos utilizados (por orden alfabético).	25
3.2. Soluciones comunes a distintos métodos.	26
3.3. Materiales comunes a distintos métodos.	26
3.3.1. Biología molecular.	26
3.3.1.1. Enzimas.	26
3.3.1.2. Kits para purificación de ADN.	26
3.3.1.3. Plásmidos.	27
3.3.2. Cultivo de células.	27

3.3.2.1. Materiales.	27
3.3.2.2. Líneas celulares.	27
3.4. Listado de reactivos y materiales particulares según el método.	28
3.4.1. Materiales y soluciones para desarrollar, amplificar y caracterizar adenovectores en cultivo.	28
3.4.1.1. Para control de endotoxina.	28
3.4.1.2. Para corridas electroforéticas en geles de agarosa.	28
3.4.1.3. Para Southern Blots.	29
3.4.1.4. Para la purificación de ARN y transcripción reversa.	29
3.4.1.5. Para las Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCRs).	30
3.4.1.6. Para Western Blots.	30
3.4.2. Para perfusión de animales, y obtención y conservación de cortes de cerebro.	31
3.4.3. Para inmunohistoquímicas e inmunofluorescencias de cortes de cerebro y células.	31
3.4.4. Para la histoquímica con X-gal.	32
3.4.5. Para purificar ADN genómico de tejido de ratón.	33
3.4.6. Para la detección del TNF de ratón por el ensayo de ELISA.	33
3.4.7. Para tinción con violeta de cresilo.	33
4. Métodos.	34
4.1. Transducción de células en cultivo con adenovectores.	34
4.2. Desarrollo de nuevos adenovectores.	34
4.2.1. Métodos generales a todos los adenovectores.	34
4.2.1.1. Amplificación de adenovectores en células en cultivo.	34
4.2.1.1.1. Preparación del inóculo.	34
4.2.1.1.2. Producción del stock viral crudo.	35
4.2.1.2. Purificación de adenovectores en gradientes de CICs.	35
4.2.1.3. Obtención del ADN adenoviral.	36
4.2.1.4. Digestión del ADN adenoviral.	36
4.2.1.5. Purificación del ADN viral en gel de agarosa.	36
4.2.1.6. Preparación del plásmido pADPSY.	37
4.2.1.7. Co-transfección para obtener adenovectores por recombinación homóloga.	37
4.2.1.7.1. Co-transfección y obtención del virus.	38
4.2.1.8. Amplificación de los nuevos adenovectores.	38
4.2.1.9. Purificación del virus bajo agar.	39
4.2.1.10. Amplificación de las colonias obtenidas.	39

4.2.1.11. Verificación de la correcta recombinación de los adenovectores.	39
4.2.1.12. Obtención de ADN adenoviral de células infectadas (Hirt).	40
4.2.1.13. Digestión y separación del ADN viral en gel de agarosa.	40
4.2.1.14. Transferencia del ADN a membrana de Nylon con NaOH.	41
4.2.1.15. Marcación de sondas con fluoresceína (Gene Images random prime labelling module, Amersham).	41
4.2.1.16. Southern blot no radioactivo (Gene Images CDP-Star detection module, Amersham).	42
4.2.1.17. Generación de un stock de adenovectores.	43
4.2.1.18. Obtención del stock concentrado de adenovector.	43
4.2.1.19. Cuantificación de las partículas virales por densidad óptica (DO).	43
4.2.1.20. Fraccionamiento y almacenamiento.	44
4.2.1.21. Cuantificación bajo agar.	44
4.2.1.22. Controles de ausencia de partículas replicativas.	44
4.2.1.22. 1. PCR para E1.	44
4.2.1.22. 2. Transducción de células que no transcomplementan E1.	45
4.2.1.23. Análisis de endotoxina presente en el stock.	45
4.2.2. Métodos particulares para cada adenovector.	46
4.2.2.1. AdCRE.	46
4.3. Western Blots por quimioluminiscencia (ECL, Amersham).	47
4.3.1. Obtención de proteínas para Western Blot.	47
4.3.2. Cuantificación de la concentración de proteínas en una muestra.	47
4.3.3. Separación de proteínas en geles de poliacrilamida.	48
4.3.4. Transferencia de las proteínas.	48
4.3.5. Incubaciones y revelado de las membranas.	48
4.4. Inmunofluorescencia de células en cultivo.	49
4.5. Obtención de cortes de cerebros.	49
4.6. Inmunohistoquímicas e inmunofluorecencias de cortes de cerebro.	50
4.7. Tinción con X-gal.	50
4.8. Inyecciones estereotáxicas en el cerebro de animales.	51
4.9. Purificación de ADN genómico de tejido de ratón.	51
4.10. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	51
4.10.1. PCR para detectar la recombinación del cassette PGK-neo, <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	52
4.10.2. PCR para al identificación de transgénicos.	52
4.10.3. PCR para detectar el la expresión del ARNm correspondiente al TNF transgénico.	53

4.11. Obtención de ARN.	53
4.12. Tratamiento del RNA con DNAsa.	53
4.13. Transcripción reversa (síntesis de la cadena de ADN copia).	54
4.14. ELISA (“Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay”) para detectar TNF de ratón.	54
4.14.1. Obtención de las proteínas.	54
4.14. 2. ELISA.	55
4.15. Tinción con Violeta de Cresilo o tinción de Nissl.	55
4.16. Análisis de la rotación inducida por Apomorfina.	55
4.17. Análisis del número de neuronas TH+ en la s.n..	56
4.18. Análisis de la densidad óptica para TH en el estriado.	56
4.19. Generación de un ratón knock-in para la expresión de TNF de ratón bajo la regulación del promotor engrailed.	57
5. Estrategia experimental utilizada en el presente trabajo para lograr la expresión del TNF en la s.n. del ratón.	59
6. Resultados.	61
6.1. Expresión constitutiva del TNF transgénico en la s.n. de los ratones knock-in dirigida por el promotor engrailed.	61
6.2. Construcción de un adenovector codificante para la proteína Cre.	61
6.3. Obtención de un stock de adenovectores codificantes para la proteína β -galactosidasa (Ad β gal).	66
6.4. El AdCre provoca la recombinación <i>in vitro</i> del cassette PGK-neo floxeado.	66
6.5. Los adenovectores transducen la proteína CRE eficientemente al núcleo de las neuronas dopaminérgicas de la snpc.	68
6.6. Caracterización detallada de la distribución de los adenovectores inyectados en la s.n.	69
6.7. Recombinación del cassette PGK-neo floxeado <i>in vivo</i> .	71
6.8. El TNF se expresa en un nivel basal bajo en la s.n. de los ratones knock-in. La recombinación y escisión del cassette PGK-neo por el AdCre permite el aumento en la expresión DEL ARNm y de la proteína del TNF.	72
6.9. El aumento crónico en la expresión del TNF en la s.n. pars compacta es neurodegenerativo.	75
6.10. Los animales knock-in inyectados con el AdCre muestran un paulatino aumento con el tiempo en el número de vueltas en respuesta al tratamiento con apomorfina.	81
6.11. Existe una correlación logarítmica entre el nivel de expresión de TH en el estriado y el número de vueltas inducidas por apomorfina.	83

6.12. Análisis del efecto del TNF basal o aumentado por la inyección del AdCre en la sobrevivencia de las neuronas TH+ de la s.n ante el efecto citotóxico de la 6-OHDA.	85
7. Discusión y conclusiones.	90
7.1. Desarrollo de un nuevo sistema para lograr la expresión condicional de genes en la s.n. del ratón.	90
7.2. Posibles mejoras al presente método de expresión transgénica en la s.n.	92
7.2.1. Posibles estrategias para evitar los efectos inespecíficos de la inyección del vector adenoviral	93
7.2.1.1. Nuevos vectores.	93
7.2.1.2. Nuevos animales modificados genéticamente.	93
7.2.2. Estrategias para mejorar la expresión y detección del transgén.	94
7.2.3. Knock-out condicional para TNF en la s.n..	95
7.2.4. Ratones knock-out, transgénicos, knock-in, hipomórficos: series alélicas.	95
7.3. El TNF tiene un efecto dual sobre las neuronas dopaminérgicas de la s.n. en el ratón. Posibles mecanismos de neuroprotección o neurodegeneración.	96
7.3.1. Posibles mecanismos de neuroprotección inducidos por el TNF en la s.n..	96
7.3.2. Posibles mecanismos de neurodegeneración inducidos por el TNF en la s.n..	98
7.4. Otras evidencias que apoyan el posible efecto dual del TNF.	99
7.5. Nuevo modelo de la PD.	101
8. Bibliografía	103

Agradecimientos

Resúmen

La enfermedad de Parkinson (PD, "Parkinson Disease") es una enfermedad neurodegenerativa crónica, de desarrollo muy lento. Su característica neuropatológica sobresaliente es la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* (s.n.) del cerebro. No se conoce la causa cierta, ni existe una cura para esta enfermedad.

Las citoquinas inflamatorias han sido halladas en el cerebro de pacientes con diversas enfermedades neurodegenerativas, inclusive con PD. El Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF) es una citoquina de particular interés, porque puede inducir tanto la sobrevida como la muerte de neuronas. El TNF y sus receptores han sido detectados en la s.n. de pacientes con PD, pero no de personas sanas. Sin embargo, no se tiene ninguna evidencia de cual podría ser la función del mismo en dicha patología.

Utilizando ratones knock-in "hipomórficos" y un promotor específico de la s.n. (*engrailed*), se logró la expresión constitutiva de TNF en la s.n. de ratones. Combinando lo previo con dos elementos más (vectores adenovirales y el sistema Cre-LoxP), se desarrolló un modelo para lograr la expresión crónica de diferentes niveles de TNF en el cerebro de ratones *in vivo*. El mismo fue utilizado para analizar el papel de esa citoquina en la sobrevida o muerte de las neuronas dopaminérgicas.

Realizando una única inyección estereotáxica de vectores adenovirales (Ad), se logró transducir las neuronas dopaminérgicas de la s.n. del ratón casi en un 100%. Así, cuando animales knock-in fueron inoculados en la s.n. con un adenovector codificante para la recombinasa Cre (AdCre), se observó la recombinación y escisión de un cassette que interfería con la expresión del transgén (cassette "PGK-neo"). El mismo estaba flanqueado por sitios llamados Lox-P ("floreado"), los cuales son reconocidos por la recombinasa Cre. Seguidamente se demostró un aumento específico en la expresión del TNF respecto del basal en la s.n. de los animales knock-in inyectados con el AdCre, pero no cuando fueron inyectados con un AdBgal, o en animales silvestres (wt) inyectados con cualquiera de los dos adenovectores. Esos resultados demostraron que el mencionado cassette PGK-neo ejerce un efecto de "interferencia transcripcional" sobre el transgen de interés. Así, la combinación de las estrategias mencionadas ha permitido lograr la expresión constitutiva, e inducida, de una proteína de interés (TNF) en la s.n. del ratón.

El análisis funcional de estos animales reveló que el TNF crónico inducido en algún momento de la vida adulta del animal provoca la lenta y progresiva desaparición de las neuronas dopaminérgicas de la s.n., representando un nuevo modelo de PD.

Por otro lado, fue muy interesante observar que la expresión constitutiva de TNF logró aumentar 3 veces más el número de neuronas sobrevivientes que en los grupos controles ante el tratamiento de los animales con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), una droga utilizada para modelar la PD. Estos resultados son un indicio para comenzar a comprender datos previos contradictorios de la literatura, referidos a la muerte o protección de neuronas mediado por TNF (el efecto final en cada caso podría depender de la concentración).

La información aquí presentada será útil al considerar la posibilidad de una terapia que de alguna manera u otra afecte al TNF, o a cualquier otra citoquina (anti-inflamatorios, por ejemplo), como se ha realizado recientemente para esclerosis múltiple.

Finalmente, la estrategia utilizada permitirá el estudio de las funciones de proteínas expresadas en la s.n. en forma controlada, y abre la posibilidad de establecer nuevos modelos animales de PD. Aún más, utilizando otros promotores endógenos, podrá permitir el estudio de otras patologías crónicas en el cerebro.

Palabras claves: Enfermedad de Parkinson; TNF- α ; Neurodegeneración; Neuroprotección.

Abstract.

Parkinson Disease (PD) is a debilitating, long-term neurodegenerative disease, which most important neuropathological feature is the loss of dopaminergic neurons in the *substantia nigra* (s.n.) of the brain. It is not known its cause, nor exists a cure for this disease.

Immune cytokines have been found in the brain of patients with many neurodegenerative diseases, including PD. Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF) is a cytokine of particular interest, because it can induce both the survival or death of neurons. Importantly, it has been found in the s.n. of PD patients, but not in control subjects. Nevertheless, it is not known which function could have TNF in this disease.

Combining “hypomorphic” knock-in mice and a promoter specific for the s.n. (*engrailed*), we obtained constitutive expression of TNF in the s.n. of mice. Combining two more elements (adenoviral vectors and the Cre-LoxP system), we had developed a model to obtain chronic expression of different levels of TNF *in vivo* in the s.n. of mice. This system was used to study the role of this cytokine in the survival or death of dopaminergic neurons.

We found that we could transduce dopaminergic neurons of the s.n. of adult mice with almost 100% efficiency with a single stereotaxic injection of adenoviral vectors.

When knock-in mice were inoculated in this brain region with an adenoviral vector coding for Cre recombinase, a “floxed” PGK-neo cassette was recombined.

In addition, s.n.-specific TNF expression was up-regulated in the AdCRE-injected knock-in mice but not in knock-in mice injected with Adbetagal or in AdCRE-injected control animals. These results showed that the PGK-neo cassette had a “transcriptional interference” effect on TNF expression. Moreover, the combination of the mentioned strategies allowed for the basal expression, and the temporal onset of an up-regulation, of a protein of interest in the s.n. of mice.

When we analyzed the functional effects of TNF on neuronal viability, we found that long-term TNF up-regulation was deleterious, inducing the progressive death of dopaminergic neurons. This has provided us with a new animal model of PD.

On the other hand, it was very interesting to observe that the constitutive expression of TNF could protect 3 times more neurons than wt mice in an accepted PD model injecting 6-OHDA, a neurotoxin used as an accepted PD model, into the striatum.

These results should help to understand previous contradictory data in the literature related to the neuroprotective or neurodegenerative effects of TNF (the final effect could depend on subtle differences on the TNF concentration).

Even more, the information presented here should be considered when designing a possible therapy for PD that could affect cytokines expression (and TNF in particular) in the s.n., as has recently been tested for multiple sclerosis.

Finally, the strategy used in this work provides the means to analyze the function of proteins expressed in the s.n. in a temporal and regional controlled manner, and opens up the possibility to establish other new animal models of PD. Even more, using other endogenous promoters, it should facilitate the study of other chronic pathologies in the adult mouse brain.

Keywords: Parkinson Disease; TNF- α ; Neurodegeneration; Neuroprotection.

Introducción.

I. Introducción.

I.1. El Síndrome de Parkinson.

En 1817, James Parkinson describió por primera vez una patología a la cual se la llamó “Enfermedad de Parkinson” (PD, “Parkinson’s disease”); actualmente, sin embargo, algunos autores consideran que al ser la suma de varios factores no sería una enfermedad, sino un síndrome (Blandini et al 2000; Blum et al 2001).

Neuropatológicamente, se caracteriza por una pérdida progresiva de poblaciones heterogéneas pero selectas de neuronas en el cerebro, siendo las más destacables las neuronas dopaminérgicas melanóticas de la *substantia nigra pars compacta* (snpc). Estas, junto con la *substantia nigra pars reticulata* (snpr), conforman la llamada *substantia nigra* (s.n.), y proyectan sus axones al cuerpo estriado o *striatum* (Figura 1). La mencionada pérdida de neuronas dopaminérgicas está asociada a la aparición de inclusiones intracitoplasmáticas eosinófilas llamadas Cuerpos de Lewy (“Lewy bodies”) en las neuronas residuales, los cuales contienen neurofilamentos, ubiquitina, alfa-sinucleína, entre otros componentes aún no identificados (Blum et al 2001; Lang & Lozano 1998a). Todavía hoy no se conoce como se forman ni cual es su papel en el proceso neurodegenerativo.

La PD se caracteriza clínicamente por temblor, rigidez, alteraciones en la postura y bradiquinesia (dificultad para comenzar movimientos). Existe una fase subclínica donde un fenómeno de “compensación estriatal” aumenta la actividad de las neuronas vivas o la sensibilidad de los receptores de dopamina a medida que se mueren las neuronas de la snpc, lo cual hace que los síntomas clínicos no se hagan evidentes hasta que la enfermedad está muy avanzada (Blum et al 2001).

El principal factor de riesgo asociado a la enfermedad es la edad. Aproximadamente el 1% de las personas con más de 55 años y el 3% con más de 65 padece de PD (Lang & Lozano 1998a), y se cree que aumentará la incidencia en la población mundial por el aumento en el promedio de vida de la población. Ello acentúa la necesidad de encontrar una cura a esta enfermedad.

1.1.1. Etiología de la PD.

¿Por qué al día de hoy, luego de casi 200 años desde que Parkinson describiera la enfermedad, todavía no existe una cura?

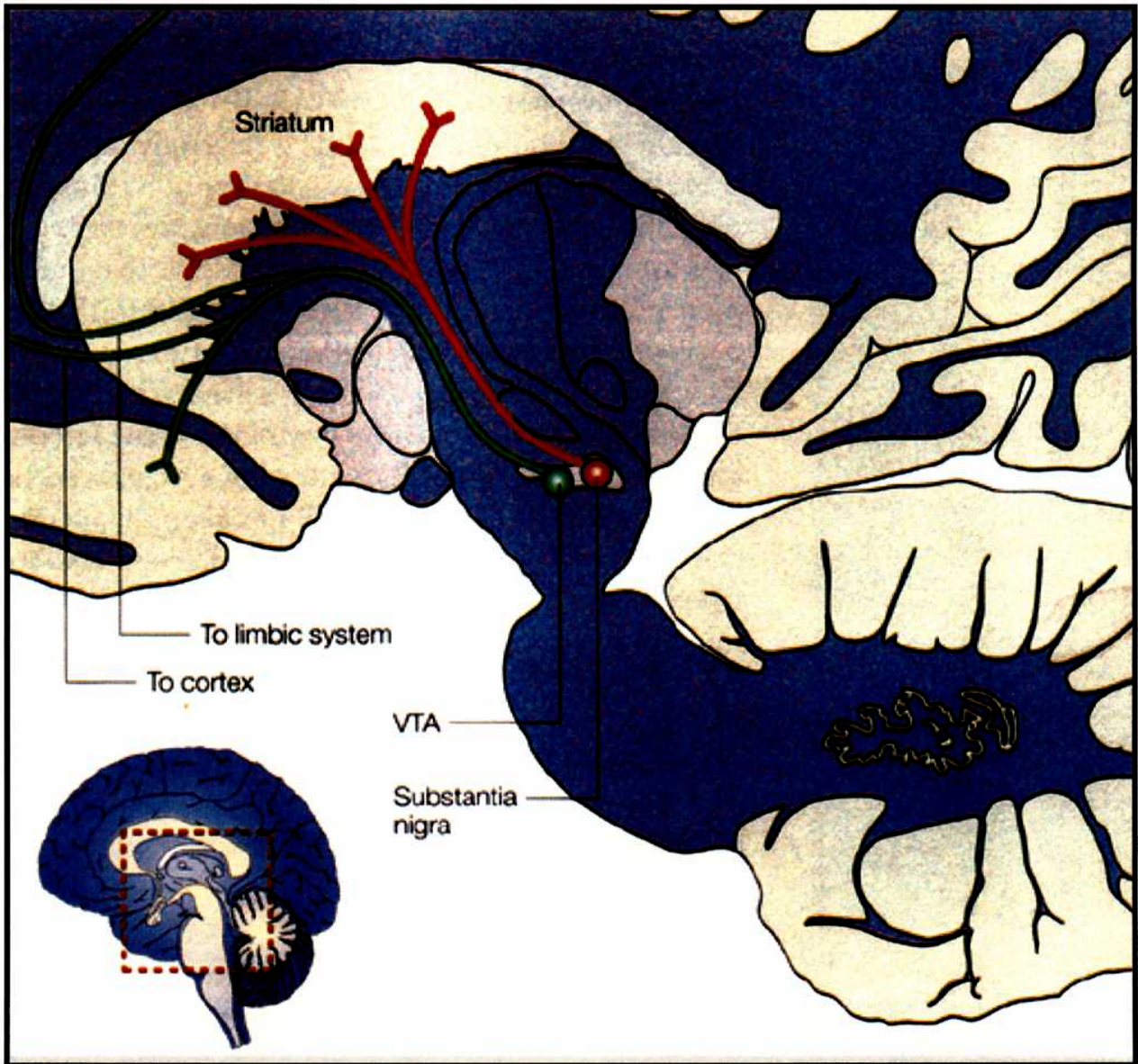


Figura 1. Diagrama de un corte sagital del cerebro humano. Se destacan las vías mesencefálicas dopaminérgicas. En verde se observan los cuerpos neuronales y proyecciones del Área Tegmental Ventral y en rojo los de la *substantia nigra*. Estas últimas proyectan sus axones al cuerpo estriado (proyección nigroestriatal). En la PD estas neuronas degeneran, provocando las anomalías motoras descritas en el texto. (Esquema copiado de Goedert M.)

Se considera que, muy probablemente, porque la causa de la PD es desconocida. Recién en los últimos años con el avance de la neurociencia molecular se están comenzando a desentrañar los posibles factores que podrían estar involucrados en la etiología de la enfermedad. Se supone que podrían ser tanto genéticos como ambientales, y que posiblemente existan en realidad varias causas diferentes que llevan a la enfermedad (revisado en (Blandini et al 2000; Blum et al 2001; Lang & Lozano 1998a)). A continuación se hace una breve referencia a las más importantes:

.- factores genéticos: sólo un 10% de los casos de Parkinson son los llamados “familiares”, que responderían a una causa genética. Se han hallado mutaciones relacionadas a esta enfermedad en las proteínas alfa-sinucleína, ubiquitina hidrolasa carboxy-terminal L1 (UCHL1) y parkina.

La proteína conocida como alfa-sinucleína está mutada en familias griegas e ítalo-americanas con numerosos casos de PD juvenil en ellas (Polymeropoulos et al 1997). Esta proteína fue luego encontrada en los Cuerpos de Lewy observados en cortes de la s.n. de pacientes con la enfermedad (Spillantini et al 1997). Ratones knock-out para esta proteína, si bien presentan disfunciones en el sistema nigro-estriatal, no presentan mayores alteraciones que semejen la PD (Abeliovich et al 2000). Por el contrario, la sobreexpresión de esta proteína en *Drosophila*, por ejemplo, lleva a la pérdida de neuronas dopaminérgicas con la edad, y a la aparición de agregados similares a los cuerpos de Lewy (Feany & Bender 2000), lo cual apoya la idea de que su posible implicancia en esta enfermedad se daría por una ganancia y no una pérdida de función. Asimismo, su sobreexpresión en ratones lleva a la aparición de inclusiones y deficiencias en el sistema dopaminérgico (Masliah et al 2000; van der Putten et al 2000).

Mutaciones en el locus PARK2, codificante para la proteína parkina, han sido relacionadas con una forma de parkinsonismo juvenil autosómico recesivo. La proteína es una E3 ubiquitina-ligasa, está relacionada con la ubiquitinación de proteínas, y se cree que estaría involucrada en la formación de los cuerpos de Lewy (Chung et al 2001; Kitada et al 1998).

Finalmente, se considera que mutaciones en la proteína UCHL1 podrían ser la causa de una forma autosómica dominante de la PD en una familia alemana, aunque representaría solamente unos pocos casos de la enfermedad (revisado en McNaught et al 2001).

Estos y otros hallazgos han llevado a autores a plantear que fallas en el sistema de la ubiquitinación y el proteasoma, con la consiguiente falla en la correcta degradación de proteínas, puede

ser no solo una de las causas de la PD, sino también una característica unificadora para numerosas enfermedades neurodegenerativas (revisado en (McNaught et al 2001) y en (Chung et al 2001)). Sin embargo, a pesar de toda la información que se ha generado en estos aspectos, estudios realizados en gemelos indicarían que la PD no podría ser considerada únicamente hereditaria, especialmente en los casos de inicio de la enfermedad en la edad adulta y en los casos esporádicos, aunque también estos estudios han sido cuestionados (Lang & Lozano 1998a).

.- factores ambientales: la gran mayoría de los casos de PD no pueden asociarse a una historia familiar, con lo cual se considera que no existe un componente genético en la misma, y son los llamados “esporádicos”. Sin embargo, identificar factores ambientales que causen PD en humanos es dificultoso. Se han realizado correlaciones con la posible exposición de los pacientes a pesticidas, herbicidas y químicos industriales. Varios de esos compuestos inducen una serie de características en modelos experimentales que semejan observaciones hechas en la s.n. de pacientes post-mortem (ver “Modelos animales de PD”). Sin embargo, el mayor apoyo a esta hipótesis surgió en 1983. Esos datos fueron relevantes, ya que la información no provino de animales de laboratorio, sino de humanos. Un artículo mostró que adictos que se inyectaron a sí mismos heroína contaminada con MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), desarrollaban una enfermedad clínica y neuropatológica muy similar a la PD (Langston et al 1983). Con éste y otros compuestos químicos se han obtenido importantes datos referidos a la PD, que apoyan la idea de una causa ambiental como inductora de la enfermedad.

Sin embargo, ninguno de ellos recopila todas las características de la PD (Beal 2001; Dawson 2000), por lo cual se considera que falta todavía encontrar el o los inductor/es precisos que llevan a la muerte a estas neuronas en particular.

1.1.2. Posibles mecanismos de muerte de las neuronas dopaminérgicas.

Como se mencionó en el punto anterior, no se sabe a ciencia cierta si factores genéticos o ambientales son los determinantes de la PD. Sin embargo, se conoce más sobre los mecanismos de muerte de las neuronas dopaminérgicas de la snpc, aunque aún no es claro la causa de la vulnerabilidad selectiva de estas neuronas en comparación con el resto de las neuronas del cerebro del paciente.

Se cree que procesos como el estrés oxidativo, la toxicidad por glutamato (excitotoxicidad) y el compromiso metabólico (también llamados “el triplete letal”)(Alexi et al 2000), así como defectos en la función mitocondrial, la apoptosis, los agregados proteicos, etc., podrían por si mismos, y más aún

en conjunto, ser los causantes de la muerte neuronal, ya que existen evidencias indirectas de que todos ellos podrían estar operando en la snpc de pacientes (revisado en (Alexi et al 2000), (Blum et al 2001) y en (Lang & Lozano 1998a)). A continuación se describen someramente algunos de ellos:

.- mal funcionamiento de la mitocondria.

El bloqueo de la actividad de la mitocondria, fundamentalmente a nivel del complejo I (cuya actividad se ve sensiblemente reducida en la PD), podría ser responsable directo de la muerte neuronal o un factor de sensibilidad a otros agentes tóxicos (revisado en (Blum et al 2001)). Esta posibilidad se ve reforzada por los efectos observados con la neurotoxina MPTP (Blum et al 2001) y el pesticida rotenona (Betarbet et al 2000), que inducen en modelos animales fenómenos similares a la degeneración en la PD, y que son inhibidores de dicho complejo I de la mitocondria.

.- estrés oxidativo.

Las neuronas dopaminérgicas han sido halladas particularmente sensibles a la reactividad de los radicales libres de oxígeno (ROS, "Reactive Oxygen Species"). Los productos del metabolismo de la dopamina, la elevación en la concentración de hierro y la falla de enzimas detoxificantes de radicales libres, entre otras observaciones realizadas en la s.n. de pacientes, son todos factores que pueden generar ROS, y podrían estar contribuyendo directamente a la muerte de neuronas (Berg et al 2001; Blandini et al 2000; Lang & Lozano 1998a). Asimismo, podrían contribuir indirectamente a través de la activación de la microglía presente en la snpc en degeneración, la cual puede generar más factores tóxicos (óxido nítrico, citoquinas)(McGeer et al 1988). En concordancia con ello, por ejemplo, las neuronas dopaminérgicas de ratones knock-out para la iNOS son más resistentes a la neurotoxina MPTP que animales silvestres (Liberatore et al 1999).

.- excitotoxinas.

El glutamato puede provocar la entrada masiva de Ca^{2+} a la célula luego de activar el receptor NMDA (N-metil-d-aspartato)(neurotoxicidad mediada por glutamato o excitotoxicidad), evento que es determinante de apoptosis o necrosis celular. Alternativamente puede funcionar reduciendo los niveles de antioxidantes intraneuronales, llevando a la formación de ROS y provocando finalmente la muerte

neuronal (Blandini et al 2000; Lang & Lozano 1998a). En la enfermedad de Parkinson, el núcleo subtalámico se encuentra hiperactivo, liberando glutamato en exceso en la s.n., siendo un probable factor de toxicidad para la misma (Lang & Lozano 1998b).

.- alteración de factores neurotróficos.

Existiría la posibilidad de que las neuronas dopaminérgicas sean dependientes de algún factor trófico. La observación experimental de que el Factor Neurotrófico Derivado de una línea celular de la Glía (GDNF) y del Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro (BDNF) sean potentes protectores de dichas neuronas en modelos animales de la enfermedad, hace pensar que quizás la disminución de ellos o algún otro factor neurotrófico hacia la vejez pudiera estar influyendo en la supervivencia neuronal (Choi-Lundberg et al 1997; Klein et al 1999; Lang & Lozano 1998a).

.- factores inmunes.

En los últimos años se le ha ido dando paulatinamente mayor importancia a una posible respuesta inmune que podría estar afectando a la snpc. Por la relevancia que tiene este aspecto para el presente trabajo, es tratado extensamente más adelante (ver “La PD, la respuesta inflamatoria, y el TNF”).

Finalmente, está todavía hoy en discusión si la muerte de las neuronas dopaminérgicas en los pacientes analizados post-mortem es mediada o no por apoptosis. Existe una serie de resultados contradictorios al respecto, fundamentalmente por la posibilidad de artefactos en la obtención de la muestra post-mortem. Se sabe, referido a modelos animales, que el MPTP, el glutamato, inhibidores del complejo I y otros factores relacionados con la PD, inducen la apoptosis neuronal, y los resultados obtenidos con las neurotoxinas MPTP y 6-OHDA *in vivo* apoyan la idea de que la muerte de las neuronas dopaminérgicas podría darse por apoptosis; sin embargo, otros autores indican que ambas toxinas podrían funcionar por mecanismos diferentes (revisado y discutido en (Blum et al 2001) y en (Blandini et al 2000)).

1.1.3 Tratamiento de la PD.

El tratamiento actualmente más utilizado consiste en paliar los síntomas de la enfermedad, con la administración del precursor de la dopamina, la l-3,4-dihydroxyphenylalanina (levodopa), el cual fue introducido a la clínica hace unos 30 años. Sin embargo, dicho tratamiento provoca a largo plazo complicaciones motoras secundarias como disquinesias (Bezard et al 2001; Blandini et al 2000; Lang & Lozano 1998a). Por ello, otras alternativas terapéuticas están siendo investigadas, y algunas ya están siendo analizadas en la clínica. A continuación se presenta una descripción breve de ellas:

.- intervenciones quirúrgicas: éstas incluyen la ablación de diferentes regiones del cerebro, como la talamotomía, palidotomía o subtalamotomía (Gross et al 1999). Por lo general se intenta, actualmente, que una cirugía como las mencionadas sea la última posibilidad terapéutica para el paciente.

“estimulación cerebral profunda” (DBS, “Deep Brain Stimulation”): son estimulaciones eléctricas controladas que se realizan con electrodos implantados en el cerebro e inhiben zonas similares a las que eran removidas quirúrgicamente. Poco a poco está desplazando a la alternativa de la cirugía, y se realiza sobre el tálamo, el núcleo subtalámico y el *globus pallidus* interno (Dunnett & Bjorklund 1999; Gross et al 1999; Lozano et al 1998);

.- trasplantes celulares: se han utilizado, por ejemplo, células de médula adrenal, así como también tejido mesencefálico fetal, aunque esta última alternativa implica serias consideraciones técnicas y éticas. Se espera que se mejore esta estrategia con la utilización de precursores neuronales (Alexi et al 2000; Dunnett & Bjorklund 1999);

.- factores protectores y tróficos: se intenta proteger las neuronas que aún restan en la snpc. Entre otros, se han utilizado factores neurotróficos, antioxidantes, suplementos metabólicos, moléculas antiapoptóticas, antiexcitotoxinas (revisado en Alexi et al 2000). Es de destacar, con relación al presente trabajo, que recientemente se está comenzando a implementar la utilización de inmunosupresores, como, por ejemplo, la Ciclosporina A (CsA), ya que se supone que tendrían efectos protectores (Alexi et al 2000; Dunnett & Bjorklund 1999).

.- antagonistas del glutamato: como ya se mencionó, el glutamato en exceso es excitotóxico, por lo cual se han utilizado numerosas drogas que bloquean su actividad (por ejemplo, amantadina o budipina). Es importante destacar que dado la toxicidad de este aminoácido, bloquearlo no sólo sería una forma de tratamiento sintomático, sino también protector (Blandini et al 2000). Sin embargo, cabe mencionar que el glutamato es un neurotransmisor fisiológico, y sería más adecuado no bloquearlo en forma general, sino específicamente en la zona del cerebro afectada. Para ello, por ejemplo, en pacientes que están destinados a “estimulación eléctrica profunda”, se está utilizando un vector viral adeno-asociado para llevar la enzima glutamato decarboxilasa a aquellos sitios del cerebro de los pacientes donde la transmisión por glutamato debe ser inhibida. De esa manera se piensa sintetizar GABA, un neurotransmisor inhibitorio, y aliviar los síntomas motores de los pacientes, sin afectar otras regiones del cerebro.

Como se puede apreciar de todo lo mencionado previamente, aún al día de hoy no existe una terapia neuroprotectora que detenga o retrase la neurodegeneración y alivie los síntomas en forma significativa, y es claro que dicho tratamiento sólo podrá surgir cuando se tenga un conocimiento más completo del curso de la enfermedad y de los mecanismos moleculares que operan en la degeneración de las neuronas de la s.n. (Blum et al 2001).

1.1.4. Modelos animales de la PD.

Dado que es muy difícil investigar la enfermedad en humanos, los modelos animales resultan imprescindibles, particularmente aquellos que implican roedores y primates no-humanos. Dos trabajos recientes han revisado extensamente los disponibles para estudiar la PD (Beal 2001; Dawson 2000). En ellos se destaca que un buen modelo debería incluir las siguientes características:

.- los animales deberían tener todas las neuronas dopaminérgicas al nacimiento, y perder selectiva y gradualmente las mismas en el adulto. Dicha pérdida debería ser mayor al 50%, y ser detectable bioquímica y neuropatológicamente;

.- los animales deberían presentar bradiquinesia, rigidez y temblor en reposo;

.- tendrían que desarrollarse Cuerpos de Lewy en las neuronas;

.- si el modelo es genético, la mutación debería estar en un solo gen, para poder asignar inequívocamente el fenotipo al mismo;

.- debería ser relativamente corto el proceso de la enfermedad (unos pocos meses). Esto simplificaría el estudio y el costo de los experimentos.

A continuación se describen someramente los más importantes:

. Modelos neurotóxicos.

.- 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

La inyección de esta neurotoxina, fundamentalmente en el estriado de roedores, donde provoca una pérdida progresiva de las neuronas de la snpc a lo largo de algunas semanas, es considerada uno de los mejores modelos animales de PD (Sauer & Oertel 1994). Se le critica a este modelo el hecho que no se generan Cuerpos de Lewy, ni los típicos signos motores de la enfermedad. Sin embargo, a favor del mismo se puede mencionar que:

.- es posible realizar un test de rotación inducida por fármacos en los animales, el cual permite analizar alteraciones motoras cuantificables en los mismos;

.- la neurodegeneración es progresiva, lo cual ha permitido estudiar la posible neuroprotección mediada por fármacos. Es de destacar que varios de aquellos que han mejorado los síntomas en este modelo han demostrado eficacia terapéutica en humanos (Beal 2001).

.- Rotenona.

La inyección de este pesticida se realiza subcutáneamente en forma crónica, y se sabe que inhibe el complejo I de la mitocondria. Los resultados obtenidos con esta estrategia (Betarbet et al 2000) recopilan muchas de las características requeridas a un buen modelo según los autores mencionados previamente: existen Cuerpos de Lewy en la snpc, los animales presentan bradiquinesia y en algunos casos temblor en reposo (lo cual mejora con agonistas dopaminérgicos). Además, a la concentración adecuada, sólo las neuronas dopaminérgicas son afectadas, no las de otras regiones del cerebro donde el químico también estaría presente (esto habla de la particular sensibilidad de estas neuronas a la inhibición del complejo I de la mitocondria). Como problema se presenta la gran variabilidad de la lesión en diferentes animales, que no permitiría análisis de agentes neuroprotectores. Sin embargo, es claramente útil para obtener información sobre la patofisiología de las neuronas de la snpc.

.- MPTP.

La inyección de MPTP es considerado uno de los modelos más relevantes para el estudio de la PD, sobre todo cuando es inyectado en primates (Blandini et al 2000; Blum et al 2001). Se considera que en ellos genera todas las características neuropatológicas y/o clínicas de la enfermedad, excepto la formación de los Cuerpos de Lewy.

La enzima monoamino oxidasa B (MAO-B) lo transforma en 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+), el cual es luego incorporado a las neuronas dopaminérgicas por los transportadores de dopamina, donde se concentra en la mitocondria e inhibe el complejo I de la cadena respiratoria, provocando compromiso metabólico, generación de radicales libres, crisis energética y muerte masiva de neuronas.

. Modelos genéticos.

Son varios los animales genéticamente modificados que han sido utilizados para estudiar diferentes aspectos de la PD, como la patofisiología, la etiología, y la patogénesis de la misma (estrés oxidativo, factores neurotróficos y alteraciones en la mitocondria)(ver (Vila et al 2001) para una revisión sobre el tema). Aquí se presentan las características salientes de uno de esos modelos:

.- alfa-sinucleína: la sobre-expresión de esta proteína en su forma mutante o salvaje en *Drosophila* induce pérdida de neuronas dopaminérgicas que expresan la enzima tirosín-hidroxilasa (TH+), genera inclusiones similares a los cuerpos de Lewy y deficiencias motoras. Se espera que este modelo genere información sobre otras mutaciones que aumenten o bloqueen el fenotipo, gracias a los conocimientos que se tienen sobre la genética de *Drosophila* (Feany & Bender 2000). Los ratones knock-out para alfa-sinucleína no presentan características de la PD. Sin embargo, los transgénicos que sobre-expresan esta proteína presentan inclusiones en el citoplasma de las neuronas (donde normalmente son encontradas en las de los pacientes), pero también en el núcleo (lo cual no fue observado en la enfermedad en humanos), y la morfología ultraestructural no es representativa de los cuerpos de Lewy característicos. Más aún, no pierden neuronas en la snpc (revisado en (Beal 2001) y en (Dawson 2000)).

Es importante destacar que ningún modelo animal disponible hoy es completamente satisfactorio, y que son necesarias nuevas estrategias y modelos que abarquen otros posibles aspectos relacionados con la enfermedad.

1.2. Citoquinas.

Las citoquinas son proteínas involucradas en la señalización celular, que han sido mayormente asociadas con el sistema inmune. Comprenden una serie de familias, las cuales pueden clasificarse (Hopkins & Rothwell 1995):

.- desde un punto de vista estructural en: interleuquinas (ILs), quemoquinas, factores de necrosis tumoral alfa y beta (TNF- α y β), factores estimuladores de colonia (CSFs, “Colony Stimulating Factors”), factores de crecimiento, neurotrofinas, neuropoietinas, etc.;

.- funcionalmente se las puede clasificar como citoquinas pro-inflamatorias (por ejemplo, la IL-1 y la IL-6, el TNF- α , el interferon- α), o anti-inflamatorias (como por ejemplo, la IL-4 o la IL-10, el factor de crecimiento transformante beta [TGF- β o “Transforming Growth Factor- β ”], el receptor antagonista de la IL-1 [IL-1ra o “Interleukin 1 receptor antagonist”]).

1.2.1. Factor de necrosis tumoral- α (TNF).

1.2.1.1. La Superfamilia del TNF.

El TNF es una citoquina considerada pro-inflamatoria. Fue el primer miembro identificado de una superfamilia de ligandos, al igual que existe una de receptores a los cuales se unen (TNFRs, “Tumor Necrosis Factor Receptors”). Han sido llamadas “Superfamilia de Proteínas Relacionadas al TNF o al TNFR”, respectivamente (Locksley et al 2001). Algunas de las características relevantes son (revisadas en (Locksley et al 2001), en (Smith et al 1994), y las citas en ellos):

.- referidas a los ligandos: se encuentran implicadas en el desarrollo de diversos órganos, en la participación en las respuestas inmunes (tanto en la inducción como en la resolución de las mismas), la inducción de la proliferación o la muerte celular (esta última fundamentalmente por apoptosis o muerte celular programada, pero también por necrosis), etc.

.- referidas a sus receptores: poseen dominios intracitoplasmáticos cortos, y transducen la señal al interior de la célula sirviendo de anclaje a dos tipos de proteínas adaptadoras presentes en el citosol, como son los factores asociados a TNFR (TRAFs, “TNFR associated factors”), o las moléculas con “dominios de muerte” (DD, “death domain”). Algunos receptores son llamados “Decoy”, no poseen dominio intracitoplasmático, y funcionarían secuestrando ligando (Ashkenazi & Dixit 1998).

1.2.1.2. Biología del TNF.

Descubierto en 1975 por E. Carswell y colaboradores, existe una bibliografía muy amplia referida al mismo, que abarca numerosos campos de investigación y lo relaciona con no menos patologías (Bazzoni & Beutler 1996).

El TNF es sintetizado como una molécula de transmembrana de 26 KDa (TNFm), la cual es biológicamente activa (Kriegler et al 1988). Puede ser clivada en la membrana celular liberando la forma soluble de 17 KDa (TNFs) por una metaloproteasa llamada TACE (“TNF- α -converting enzyme”), clonada en 1997 por dos grupos en forma independiente (Black et al 1997; Moss et al 1997).

La mayor producción celular de TNF corresponde a macrófagos activados, pero hoy se sabe que casi todas las células analizadas pueden sintetizarlo ante un estímulo adecuado (Bazzoni & Beutler 1996; Loetscher et al 1990; Schall et al 1990).

En el año 1989 surgieron las primeras evidencias que indicaban la existencia de dos receptores para el TNF, y un año más tarde fueron clonados los receptores humanos: TNFR1 o p55 y TNFR2 o p75 (Loetscher et al 1990; Schall et al 1990; Smith et al 1990); en 1991 se describió el clonado de los homólogos en el ratón (Lewis et al 1991). El TNF es el único de la superfamilia, junto con la linfotóxina-alfa (LT α), que se unen a dos receptores (todos los demás lo hacen a uno).

Excepto por los eritrocitos, se estima que todas las células expresan al menos el TNFR1, y pueden aumentar la expresión del TNFR2 ante un estímulo determinado, lo cual implica que, en principio, todos los tipos celulares respondan al TNF (Schulze-Osthoff et al 1998). En condiciones fisiológicas se cree que el TNFs se uniría principalmente al TNFR1, mientras que el TNFm al TNFR2. La unión a ambos receptores es de alta afinidad (del orden de 1×10^{-10} M) lo cual hace que cantidades muy pequeñas de ligando sean funcionales (Fiers 1991; Rothwell & Hopkins 1995).

El TNFR1 tiene DD, y ambos receptores poseen sitios de unión a TRAFs (Rothe et al 1994). Esos dominios les permiten reclutar moléculas adaptadoras en su parte citoplasmática (Ashkenazi &

Dixit 1998; Baud & Karin 2001; Bazzoni & Beutler 1996; Yuan 1997). Estas a su vez pueden poseer DDs (TRADD, FADD), las cuales llevan a la muerte celular por caspasas (Hsu et al 1995), o pueden ser TRAFs, que permiten a la célula sobrevivir por la activación de factores antiapoptóticos (por ej., los factores de transcripción nuclear kappa B [NFκB, “Nuclear Transcription Factor kappa B”] y AP-1 (Ashkenazi & Dixit 1998; Baud & Karin 2001; Liu et al 1996). Las vías de señalización entre los adaptadores y los efectores de la respuesta al ligando no están completamente claros. Se cree que involucran a una serie de segundos mensajeros, entre los cuales se incluirían la ceramida, la fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (PC-PLC, “Phosphatidilcholine specific-Phospholipase C”), proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAP quinasas, “Mitogen activated protein-kinases”) como la p38 y la kinasa n-jun (“JNK”), calcio (Ca²⁺), etc., (Beyaert & Fiers 1994).

Le agregan aún más complejidad al sistema del TNF el que ambos receptores puedan existir en forma soluble, funcionando de esa manera como inhibidores del TNF o prolongando su vida media en suero (Locksley et al 2001).

1.2.1.3. Funciones mediadas por el TNF.

El TNF es altamente pleiotrópico, responsable de una variedad de efectos a través de vías de señalización que inducen la sobrevida, proliferación o apoptosis celular, y de la inducción de factores proinflamatorios. Mediante esas funciones participa en muchos procesos fisiológicos, así como también es responsable de varios procesos patológicos en caso de estar ausente o presente en cantidades excesivas: necrosis hemorrágica de tumores, shock endotóxico, fiebre, reabsorción ósea, necrosis dérmica, resistencia insulínica, desarrollo de órganos linfoides, etc. (Bazzoni & Beutler 1996; Fiers 1991).

Los animales knock-out para TNF muestran que no es indispensable durante el desarrollo para la sobrevida del ratón, aunque sí es muy importante para la formación de folículos de células B en el bazo y para la maduración de la respuesta humoral (Douni et al 1996; Eugster et al 1996; Pasparakis et al 1996). La falta de otras alteraciones fenotípicas se cree que es debida a otra característica de las citoquinas, como es la redundancia de funciones.

Al principio se creyó que los efectos del TNF a través de ambos receptores eran completamente diferentes (p55 sería principalmente citotóxico, y p75 induciría proliferación celular) (Tartaglia et al 1991). Sin embargo, pronto se encontraron evidencias de que según las circunstancias (tipo celular,

método de estudio utilizado, etc.) ambos receptores podían favorecer la muerte o la supervivencia celular, y que además pueden funcionar en forma cooperativa para inducir una u otra respuesta.

Esos primeros datos contradictorios en la literatura indicaban que el p75 podía ser tóxico (Heller et al 1992). Ratones knock-out para el TNFR1 son resistentes a la toxicidad inducida por LPS luego de la sensibilización con D-galactosamina (un mecanismo ampliamente atribuido al TNF), lo cual apoyaría que todo el efecto citotóxico estaría dado por este receptor. Sin embargo, son sensibles al LPS como único tratamiento, donde se sabe que el TNF tiene también un papel importante en mediar su efecto tóxico. De tal manera, habría también otros mecanismos tóxicos de esta citoquina que utilizarían al TNFR2 (Pfeffer et al 1993; Rothe et al 1994).

Además, el knock-out para el TNFR2 presenta resistencia parcial a la muerte inducida por TNF, y un área de necrosis mucho menor ante la inyección subcutánea de la citoquina (Erickson et al 1994), lo cual lo relaciona indirectamente con la muerte celular.

Finalmente, otras evidencias al respecto indican que el TNFR2 funcionaría aumentando el efecto deletéreo del TNFR1, y que podría provocar el mismo disminuyendo la expresión de proteínas antiapoptóticas como, por ejemplo, Bcl-xl en células T activadas (Lin et al 1997), a través de la cooperación mediada por los factores TRAF-1 y -2 (Declercq et al 1998), secuestrando factores citoplasmáticos anti-apoptóticos que de otra manera servirían para bloquear el efecto citotóxico del TNFR1 (Weiss et al 1998), etc.

1.2.1.4. El TNF de membrana (TNFm).

Varios grupos de investigadores han intentado discernir las funciones específicas del TNFm. A continuación se describen algunos trabajos que ilustran sus funciones conocidas. Los mismos destacan las importantes contradicciones que todavía hoy existen con relación a su función.

Luego del hallazgo de la forma de membrana del TNF (Kriegler et al 1988), se generaron mutantes de la citoquina que no podían ser clivados por la proteína TACE, tanto de la forma humana como la de ratón. Con esa estrategia fue demostrado que el TNFm humano era citotóxico (Perez et al 1990), así como que el TNFm de ratón puede provocar proliferación celular, inducción de la expresión de citoquinas y apoptosis (Decoster et al 1995). Fue observado que dichos efectos eran menos eficientes si no estaba presente el receptor p75. Eso fue finalmente confirmado, ya que la forma de transmembrana del TNF señala principalmente a través del TNFR2 (Grell et al 1995). Datos adicionales del mismo grupo indican que la expresión constitutiva del TNFm induce la activación

constitutiva de NFkB, p38 MAPK y expresión de IL-6 (Haas et al 1999), y otros autores mencionan que animales transgénicos expresando la forma de membrana expresan más IL-12 ante el estímulo con LPS (Mueller et al 1999).

También se ha demostrado que el TNFm puede generar *in vitro* una señal dual. Al contacto célula-célula entre el TNFm y su receptor, además de inducir las señales mencionadas genera una señal en su propia célula con su dominio intracitoplasmático (aumenta la expresión de E-selectina)(Harashima et al 2001). Contrario a esta última observación, en animales transgénicos con expresión constitutiva de TNFm específicamente en el endotelio no aumentó la expresión de esa molécula de adhesión, aunque sí otras (ICAM-1, VCAM-1). Estos últimos animales sufren una respuesta inflamatoria crónica en el hígado y riñones; a pesar de ello, y sumándose a los efectos contradictorios observados con el TNF, los mismos presentan mayor protección que en el hígado de los compañeros de camada silvestres ante un desafío tóxico agudo (Willuweit et al 2001).

Un trabajo reciente describió la creación de un ratón knock-in, reemplazando el TNF endógeno por una construcción que expresa el TNFm (Ruuls et al 2001). De esa forma la regulación de su expresión sería lo más fisiológica posible. En dicho trabajo confirmaron observaciones previas de que el TNFm puede ser citotóxico a través de ambos receptores, y además encontraron que parcialmente recupera la estructura de los centros germinales (ausentes en los knock-out para TNF), e induce la producción normal de la mayoría de las quemoquinas analizadas. Además, inicialmente pareció que era suficiente para cumplir todas las funciones conocidas del TNF en un modelo de inflamación en el cerebro (EAE). Sin embargo, la respuesta inflamatoria fue igual al TNF $-/-$, y ante una dosis de antígeno 10 veces menor, la respuesta general fue también similar a estos últimos animales. Esto indicaría que sería el TNF soluble y no el TNFm el que regularía la localización del infiltrado leucocitario en este modelo experimental. Igualmente se debe recordar que los efectos mencionados se observaron en un animal que no posee TNFs, y que las respuestas pueden ser diferentes si ambas formas están presentes.

Toda esta información sobre el TNFm sirve para destacar que en cada modelo experimental sería posible atribuir funciones específicas a cada una de las formas de la citoquina. Es claro que esto debe ser tenido en cuenta al analizar experimentos donde el TNF es producido en forma endógena.

1.3. Citoquinas en el SNC.

A principios de la década del 80', se publicaron los primeros trabajos referidos a la expresión de citoquinas y de moléculas de presentación de antígenos en células del sistema nervioso central (SNC). Actualmente hay alrededor de 20000 trabajos publicados en la base de datos "Medline" en relación con citoquinas en el cerebro. En ellos ha quedado claro que estas proteínas, clásicamente relacionadas con el sistema inmune periférico, están involucradas en procesos tanto fisiológicos como patológicos en el SNC. En ambas condiciones (fisiológicas y patológicas), la gran mayoría de las citoquinas y sus receptores han sido encontrados en el SNC (Szelenyi 2001).

Las funciones fisiológicas con las cuales se las ha relacionado por su expresión en el SNC incluyen el sueño, la ovulación, el ejercicio, el apetito, procesos cognitivos, aprendizaje, memoria y desarrollo, entre otros. La alteración en la expresión de las citoquinas en el SNC afectan esas funciones, y se las ha relacionado con enfermedades como la anorexia, esquizofrenia, depresión, trastornos del sueño, etc. (Turrin & Plata-Salaman 2000).

Asimismo, las citoquinas han sido involucradas en procesos de neurodegeneración aguda (infarto, trauma, hemorragia, isquemia, epilepsia)(revisado en (Allan et al 2001)), y en procesos de neurodegeneración crónicos (Alzheimer, Parkinson), autoinmunes (esclerosis múltiple), e infecciosos (complejo demencial por HIV) del SNC (revisado en (Sei et al 1995)). Sin embargo, el efecto final de cada citoquina sobre la viabilidad de las neuronas en cada caso es muy contradictorio, y aún hoy no están completamente claros.

1.3.1. TNF en el SNC.

Se ha establecido claramente a lo largo de los últimos 15 años que el TNF tiene múltiples efectos sobre el SNC, tanto en su desarrollo y en su fisiología en el estado adulto, como en respuesta a estímulos patológicos, de tal manera que incluso se lo ha llegado a catalogar como un "neuromodulador" del SNC (Pan et al 1997).

Estudios en ratón han determinado que en el cerebro normal probablemente solo las neuronas expresen TNF en forma constitutiva (Breder et al 1994). Sin embargo, ante un estímulo adecuado o alguna injuria al SNC, se ha visto que la microglía y los astrocitos aumentan rápidamente la expresión de la citoquina (Munoz-Fernandez & Fresno 1998). Por ejemplo, astrocitos estimulados *in vitro* con LPS producen TNF (Lieberman et al 1989), e *in vivo*, ante la inyección de LPS en la periferia, también

las células perivasculares del endotelio cerebral (Breder et al 1994) se convierten en fuentes de TNF en el SNC. La expresión por astrocitos dependería del desarrollo del animal (fetal vs. adulto), de diferencias entre líneas de animales, la región del cerebro y la interacción con otras citoquinas en cada caso, etc. (revisado en (Pan et al 1997)). El TNF cerebral puede ser inducido desde la periferia, por ej., en la región del tálamo-estriado (Pitossi et al 1997).

Se han realizado numerosos experimentos *in vitro* para demostrar la expresión de ambos receptores para el TNF en las células de la glía y neuronas, y han sido detectados en el tallo cerebral, el cerebelo, la corteza, el tálamo, ganglios basales y la s.n. (Dopp et al 1997; Kinouchi et al 1991).

El TNF provoca efectos diversos sobre las células de la glía, induciendo su proliferación, su muerte y su diferenciación (revisado en (Pan et al 1997)). Sin embargo, hay autores que consideran que el TNF es siempre tóxico para todas las células de la glía, en general a través de la vía de la ceramida que provocaría estrés oxidativo (Singh et al 1998).

En suma, y al igual que para la gran mayoría de los temas relacionados a esta citoquina, se considera que el efecto final sobre las células de la glía vendrá dado por las condiciones experimentales de cada caso (Pan et al 1997).

Ese mismo concepto es particularmente cierto para las neuronas. En estas últimas, el TNF puede tener efectos neuroprotectores o neurodegenerativos. Al comenzar el presente trabajo, existían reportes en la literatura ilustrando ambas posibilidades, pero ninguno sobre neuronas dopaminérgicas, y asimismo ninguno planteando la posibilidad de que pudiera tener ambos efectos en el mismo modelo experimental.

Por ejemplo, el TNF sería neuroprotector en la línea celular de neuronas humanas SH-SY5Y, ya que si el TNFR2 es bloqueado por oligonucleótidos anti-sentido aumenta la muerte celular ante un estímulo de hipoxia o con la proteína Beta-amiloide (Shen et al 1997). También se observó que el TNF protegía las neuronas en el hipocampo de ratas recién nacidas contra el daño inducido con NMDA; sin embargo, en el mismo trabajo se destaca que esa citoquina no presentó ningún efecto en el estriado (Liu et al 1999).

Por otra parte, el TNF puede tener efectos neurodegenerativos, ya que, por ejemplo, fue observado un incremento en la muerte celular de la línea de neuroblastoma humano SK-N-MC al ser tratadas con TNF en concentraciones crecientes, y que esto era bloqueado por ejemplo, con antioxidantes (Talley et al 1995). Asimismo, se ha encontrado que la forma de membrana del TNF induce apoptosis a través del TNFR2 en una línea de neuroblastoma (N1E-115)(Sipe et al 1998). Por otra parte, ratones transgénicos con sobreexpresión del TNFs en el SNC desarrollan una respuesta

inflamatoria demielinizante espontánea a las 3-8 semanas de vida, con astrocitosis y microgliosis, además de infiltrado leucocitario al parénquima cerebral (Probert et al 1995). Resultados provenientes del mismo grupo también determinaron que el TNF provocaba ese mismo efecto cuando era expresado bajo promotores de neuronas o astrocitos, pero que el TNFm solo lo hacía cuando se lo expresaba en astrocitos (Akassoglou et al 1997). Los autores especulan que podría deberse a que el efecto primario del TNF en el SNC sería sobre el endotelio cerebral, con quien los astrocitos están en íntimo contacto. En favor de esta hipótesis, se sabe que el TNF puede afectar al endotelio cerebral; sin embargo, aquí nuevamente hay opiniones encontradas que mencionan un aumento en la permeabilidad de la BBB, otras que opinan por el contrario que la permeabilidad se ve reducida y habría un aumento en el flujo sanguíneo, y finalmente autores que no encontraron modificaciones (revisado en (Pan et al 1997)).

En conclusión, en el SNC así como en la periferia, se considera que el balance entre la concentración de citoquina, la expresión de receptores, las moléculas adaptadoras presentes en el citoplasma, el tipo celular analizado, y otros varios factores, determinarán el destino final de la célula (apoptosis o necrosis vs. sobrevivida) y del tejido (por ej., inflamación o no)(Baud & Karin 2001).

1.4. La PD, la respuesta inflamatoria, y el TNF.

Un proceso inflamatorio o la acción directa de citoquinas proinflamatorias sólo es mencionado superficialmente en la mayoría de las revisiones sobre las posibles causas de la PD (Dunnett & Bjorklund 1999; Lang & Lozano 1998b; Lozano et al 1998). Sin embargo, algunos grupos, incluido el nuestro, proponen que dichos mecanismos tendrían una participación activa en la enfermedad, aportando a un proceso crónico lento de degeneración o protección de neuronas (revisado en (Hunot et al 2001)).

Es importante mencionar que al hablar de respuesta inflamatoria en el cerebro no solo se hace referencia al posible reclutamiento de células inmunes de la periferia, sino también a una posible activación de la astro y microglía, las cuales pueden secretar moléculas tóxicas o protectoras para las neuronas.

Se cree que al menos parte del proceso inflamatorio observado en la PD sería mediado por la microglía. Ya en el año 1988 se la encontró reactiva en la snpc de pacientes con Parkinson, expresando moléculas de presentación antigénica, como por ejemplo HLA-DR (McGeer et al 1988), revisado en (Hirsch et al 1998) y en (Hunot et al 2001). Como ya se mencionó previamente, en pacientes expuestos

al MPTP años antes del análisis de su cerebro, se detectó microglía reactiva alrededor de neuronas que estaban muriendo (Langston et al 1999). Además, es interesante destacar que también en animales el proceso de muerte inducido por el MPTP podría estar relacionado con una respuesta inflamatoria localizada en la s.n. (Liberatore et al 1999). Evidencia reciente referida al papel de la microglía, proviene de una publicación utilizando neuronas dopaminérgicas *in vitro*. Estas, a pesar de que *in vivo* son sensibles a la rotenona (modelo ya descrito), *in vitro* no lo son, a menos que se las cultive con microglía. Asimismo, si se bloquea la producción de aniones superóxido por parte de éstas últimas, se bloquea parcialmente el efecto (Gao et al 2002). Esos resultados destacan la importancia de la activación de la microglía. Evidencia adicional indica que la reacción inflamatoria sería un tanto particular en la PD, ya que algunos autores proponen que sólo la microglía y no los astrocitos estarían activados (Mirza et al 2000).

A medida que ha ido surgiendo más interés por la respuesta inflamatoria con relación a la PD, se ha intentado modelar la misma en la s.n. de animales. Así, LPS inyectado directamente en ratas en esa región del cerebro, provocó la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Herrera et al 2000), las cuales son protegidas por un inhibidor de la activación de la microglía (“naloxone”), utilizando la misma estrategia experimental (Liu et al 2000). Más aún, se demostró que, en el cerebro de la rata, la s.n. es la región más sensible a la inyección de LPS, comparado con la corteza y el hipocampo, y esto se lo relacionó con la mayor densidad y activación de la microglía existente en la misma (Kim et al 2000).

Varias citoquinas proinflamatorias han sido relacionadas indirectamente a la PD, sea en pacientes o modelos animales: TNF, IL-1beta, IL-6 e IFN-gama ((Boka et al 1994), revisado en (Hirsch et al 1998), (Nagatsu et al 2000), (Hunot et al 2001)).

En particular, en ratas lesionadas con 6-OHDA se ha demostrado, utilizando ensayos muy sensibles, que la expresión del TNF aumenta en el estriado y la s.n. (Mogi et al 1999; Mogi et al 2000); también se ha descrito que existe una correlación directa entre la presencia de un polimorfismo en el promotor del TNF que aumenta la expresión del mismo y el inicio más temprano de la PD esporádica (Nishimura et al 2001).

Evidencias adicionales que involucran a citoquinas proinflamatorias como el TNF con la PD provienen de observaciones realizadas en cerebros postmortem de pacientes con PD que indican que las neuronas dopaminérgicas restantes presentan un aumento en la localización nuclear del factor NFkB. En cultivos primarios de mesencéfalo de rata la activación de la vía de la ceramida provocaría la activación de ese factor, la producción de ROS y finalmente apoptosis (Hunot et al 1997). Según se

mencionó anteriormente, el TNF puede activar las vías del NFkB y la ceramida, y ha sido demostrado que la microglía de la s.n. de pacientes, a diferencia de cerebros normales, expresan TNF al mismo tiempo que las neuronas expresan el receptor para esta citoquina (Boka et al 1994). Sin embargo, no queda claro si el TNF, teniendo en cuenta que puede ser neurodegenerativo o neuroprotector, pudiese estar matando neuronas, las mismas lo están usando como molécula protectora en respuesta a la neurodegeneración o se trata de un epifenómeno sin consecuencias funcionales.

Datos provenientes del mismo grupo indican que la citoquina mencionada previamente puede generar la expresión de CD23 en células gliales *in vitro*; la unión del ligando al CD23 indujo la expresión de NO por activación de la iNOS, y esto a su vez aumentó la expresión del TNF en un círculo auto-regulatorio positivo potencialmente tóxico. El CD23 y las citoquinas han sido encontradas en la snpc de los pacientes con PD (Dunnett & Bjorklund 1999; Hirsch & Hunot 2000; Hunot et al 1999; Lang & Lozano 1998b; Lozano et al 1998). Sin embargo, los autores no hallaron el ligando de CD23 en los pacientes.

La única evidencia funcional sobre el efecto del TNF en la PD, ha surgido utilizando animales transgénicos que sobre-expresan el TNF en todo el SNC (Aloe & Fiore 1997). Los autores observaron que disminuye la presencia de la enzima tirosín-hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de dopamina por las neuronas dopaminérgicas, en el estriado y áreas hipotalámicas, y altera el comportamiento de los animales. No hay otros datos en la literatura que aporten evidencias sobre el posible efecto directo de la expresión del TNF sobre las neuronas de la snpc utilizando modelos *in vivo*.

Es interesante destacar que la actividad inflamatoria incrementa con la edad, determinada por una mayor circulación de citoquinas. Por otro lado, como se destacó anteriormente, la edad es el principal factor asociado a la PD. Si bien no se sabe con certeza el significado clínico de estas observaciones, es intrigante la posibilidad de una correlación entre ambos eventos (Bruunsgaard et al 2001).

1.5. Expresión condicional de genes en tiempo y lugar.

La dificultad para expresar genes en forma condicional en regiones específicas del cerebro a un tiempo determinado de la edad adulta del animal es una de los mayores obstáculos en la investigación de la PD a nivel molecular (y de temas de neurociencia en general), así como la fuente de muchas contradicciones presentes en la literatura.

Existen actualmente algunas estrategias para lograr la expresión condicional de genes en tiempo y lugar en ratones, entre ellas las siguientes:

.- ratones knock-in “hipomórficos”.

La inserción de un cassette con el transgén de interés en el locus deseado por recombinación homóloga para generar ratones “knock-in” ha permitido eliminar algunos inconvenientes que los animales transgénicos tradicionales presentaban, como la expresión ectópica, la inserción de múltiples copias del transgén, la posibilidad de afectar la estructura de otros genes, etc., (Capecchi 1989).

Sin embargo, esta nueva estrategia también puede presentar inconvenientes. Por ejemplo, las construcciones utilizadas para insertar un transgén en el genoma de una célula, necesariamente incluyen un promotor que dirige la expresión de un gen que codifica para alguna proteína que genere resistencia ante una determinada droga. El mismo es necesario para identificar aquellas células troncales embrionarias que incorporaron la construcción. Uno de los más utilizados es el transgén de resistencia a neomicina (“neo”) bajo el promotor de la Fosfoglicerato Kinasa (PGK-neo)(PGK, “Phosphoglycerate Kinase”)(Lewandoski 2001).

Al comenzar el presente trabajo existía evidencia de un fenómeno llamado “interferencia transcripcional” (revisado en (Olson et al 1996)). La misma implica que, por razones que aún hoy son desconocidas, la presencia de dicho “cassette” PGK-neo puede alterar la transcripción del transgén de interés. Por ejemplo, entre las primeras evidencias al respecto se puede mencionar un estudio realizado con dos líneas de ratones generadas por estrategias diferentes, los cuales fueron mutados en la caja homeótica Hoxb4. Una línea de animales tenía incorporado el cassette PGK-neo en la construcción, y la otra, por el contrario, no presentaba ningún elemento regulatorio extra. El análisis de ambas líneas indicó que presentaban fenotipos claramente diferentes; debido a ello los autores plantean que el cassette PGK-neo pudiera estar ejerciendo efectos transcripcionales sobre otros genes (Ramirez-Solis et al 1993). Otros investigadores que estudiaban la importancia del sitio 2 hipersensitivo a DNAsa en sitios 5’ (5’ HS2) de la región del locus control (LCR) para la regulación del gen de la beta-globina, observaron que la delección de dicha región 5’ llevaba a una disminución de la expresión del gen. Sin embargo, cuando eliminaron el cassette PGK-neo de la construcción, la expresión de la beta-globina resultó ser casi normal (Fiering et al 1995). Los autores de estos primeros trabajos en los cuales observaron dichos efectos infirieron que el cassette PGK-neo podría influir en el nivel de expresión del transgén e inclusive en el fenotipo observado.

Ello resultó, con el tiempo, ser básicamente cierto, y existen hoy numerosos ejemplos más que ilustran el mencionado fenómeno de “interferencia transcripcional”. En la gran mayoría de los casos, PGK-neo así como otros cassettes de selección disminuyen el nivel de expresión del transgén de interés, por lo que a estos animales se los ha dado a llamar “hipomórficos” o “knock-down” (revisado en (Lewandoski 2001)).

El mencionado efecto puede representar un problema para un estudio en particular. Sin embargo, también puede ser utilizado como herramienta para analizar el fenotipo resultante de diferentes niveles de expresión de una proteína si es posible, de alguna manera, eliminar el elemento que interfiere con la transcripción (Fiering et al 1995; Olson et al 1996).

.- promotores específicos de tejido.

Una forma de dirigir la expresión de una proteína de interés a un tejido determinado, es colocando el gen de la primera bajo la regulación de un promotor específico de tejido. El interés del presente trabajo está centrado en la snpc del ratón, y más particularmente sobre las neuronas dopaminérgicas de dicha región del cerebro. El promotor del gen engrailed dirige la expresión de la proteína homónima a los somitas, al pliegue neural anterior y alguna otra estructura del ectodermo durante la embriogénesis del ratón, y durante la vida adulta del animal a las neuronas de la protuberancia (Pons) y la snpc ((Hanks et al 1995) y sus referencias).

.- el sistema Cre-loxP.

La recombinasa Cre del bacteriófago P1 reconoce una secuencia de ADN de 34 pares de bases (pb) llamada LoxP. Un sitio LoxP se compone de dos secuencias repetidas de 13 pb, unidas por 8 pb cuya secuencia es indistinta; una secuencia flanqueada por dos sitios LoxP se la denomina “floreada”. Finalmente, si esos dos sitios están ubicados “cabeza con cola”, la proteína Cre puede reconocer los sitios loxP y escindir la secuencia floreada (Sternberg & Hamilton 1981). Esto puede lograrse incluso en células de mamífero (Sauer & Henderson 1988).

Esta estrategia ha sido utilizada para eliminar los cassettes de selección *in vitro* que provocan la ya mencionada “interferencia transcripcional” al floxear los mismos con sitios LoxP y expresar luego la proteína Cre en las células de interés. En la mayoría de los casos reportados, el resultado fue el aumento en la expresión del transgén de interés. Por ejemplo, la inclusión y luego eliminación del

cassette PGK-neo en el análisis del efecto de distintos niveles de expresión del factor de transcripción restringido a la hematopoyesis GATA-1, permitió a los autores identificar diferentes contribuciones cuantitativas de dicho factor a la hematopoyesis durante el desarrollo (McDevitt et al 1997). Dichos autores resaltan, al igual que otros, la importancia de crear estas alteraciones en el nivel de expresión de un transgén para identificar posibles contribuciones cuantitativas de genes que normalmente no pueden detectarse con los transgénicos y knock-outs convencionales (Meyers et al 1998; Nagy et al 1998; Wang et al 1999). Estos conceptos son fundamentales para el presente trabajo.

.- vectores para la transferencia de genes al SNC: adenovectores.

Una forma de transferir información genética *in vivo* es, entre otras, la utilización de vectores virales (Kay et al 2001). Varios tipos de vectores han sido utilizados para expresar proteínas en el SNC, entre ellos los adenovirus, virus asociados a adenovirus, virus del herpes simple, e incluso más recientemente, lentivirus (Slack & Miller 1996).

De ellos, los adenovectores han probado ser muy eficientes para transducir información a varias regiones del SNC, como el cuerpo estriado, los ventrículos, el globus pallidus (Akli et al 1993; Bajocchi et al 1993; Davidson et al 1993), y, de importancia para nuestra estrategia, la s.n. (Bajocchi et al 1993; Le Gal La Salle et al 1993). Una desventaja de estos vectores es que en la periferia pueden generar una respuesta inmune que acota el tiempo de expresión de los mismos (Yang et al 1994). Sin embargo, en el cerebro, dicha respuesta es más reducida que en la periferia, y la expresión se logra por períodos de tiempo más largos (Kajiwara et al 1997).

De interés para el presente trabajo, los adenovectores han sido utilizados eficientemente para transferir la proteína Cre *in vivo*, con el objetivo de regular la expresión temporal y regional de genes. Así, han logrado la recombinación de secuencias “floxeada” en la corteza, hipocampo y cerebelo del SNC (Wang et al 1996), en el hígado (Rohlmann et al 1996; Wakita et al 1998), en el músculo cardíaco (Agah et al 1997), entre otros tejidos del ratón.

Objetivo.

2. Objetivo.

Para este trabajo nos hemos planteado el siguiente objetivo:

Analizar los efectos de la expresión crónica de diferentes niveles de la citoquina TNF en la snpc de ratones en la muerte o sobrevida de las neuronas dopaminérgicas y el comportamiento de los animales.

Estos resultados contribuirían a entender el rol del TNF en la PD, proveyendo información sobre posibles blancos terapéuticos nuevos.

Para ello, hemos querido también desarrollar una nueva estrategia para expresar transgenes en forma crónica en la snpc de ratones, con posibilidad de modificar el nivel de expresión de los mismos durante la vida adulta del animal.

Los resultados obtenidos con este modelo deberían ser útiles para luego poder expresar en forma crónica condicional proteínas de interés para la PD en dicha región del cerebro, lo que facilitaría la investigación de nuevas proteínas involucradas en la degeneración o protección de las neuronas dopaminérgicas.

Material es .

3. Materiales.

3.1. Listado general de reactivos utilizados (por orden alfabético).

- ABC (Vectastain Elite ABC), Vector Laboratories.
- Aceite mineral, Sigma.
- Acido bórico, Amresco.
- Acido fosfórico 85%, Merk.
- Acido hidrociorhídrico, Sigma.
- Acrilamida, Gibco.
- Agarosa, Gibco.
- Agua Oxigenada (100 Vol), material hospitalario.
- Apomorfina, Sigma.
- Aprotinina, Sigma.
- APS (Persulfato de Amonio), Sigma.
- Azul brillante de Coomasie (G-250), Sigma.
- Azul de bromophenol (3',3'',5',5''-tetrabromofenolsulfoneftaleína), Sigma.
- BES (N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethane-sulfonic acid), Gibco.
- B-mercaptoetanol, Merk.
- Bromuro de etidio, Sigma.
- Citrato de sodio, Sigma.
- Cloroformo, Aldrich.
- Cloruro de calcio, Amresco.
- Cloruro de cesio, Gibco.
- Cloruro de sodio, Amresco.
- Cresyl violeta, Merk.
- DAB (Diaminobenzidina), Sigma.
- DEPC (Dietilpirocarbonato), Sigma.
- DPX, Fluka.
- EDTA (Acido etilendiaminotetracético), Sigma.
- Etanol, Merk.
- Fenol ácido, Ambión.
- Fenol básico, Ambión.
- Ferricianuro de Potasio,
- Ferrocianuro de Potasio,
- Fosfato dibásico, Sigma.
- Fosfato monobásico, Sigma.
- Glicerol, Aldrich.
- Glicina, Sigma.
- Hidróxido de sodio, Mallinckrodt.
- Leupeptina, Sigma.
- N,N-dimetilformamida, Merk.
- Nitrógeno liquido.
- NP-40,
- PFA (Paraformaldehído), Sigma.
- PMSF (Fenilmetilsulfonilfluoruro), Sigma.
- SDS (Dodecyl sulfato de sodio), Amresco.
- Seroalbúmina bovina (BSA), Fracción V, ICN.
- Solución de Hanks, Gibco.
- TEMED (Tetrametiletilendiamina), Sigma.
- TNF- α recombinante, Sigma.
- Tris (Trishidroximetilaminometano), Sigma.
- Tritón X-100,
- TRIzol, Gibco.
- Tween®20 (Polyoxietilensorbitanmonolaureato), Merk.
- X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-Beta-D-galactosido), Sigma.
- Xilol, Douglas

3.2. Soluciones comunes a distintos métodos.

Tris 1M:

.- 121,1 gr/lt, más la cantidad necesaria de HCl para llegar al pH de interés.

EDTA 0,5 M, pH 8:

.- 186,1 gr EDTA, 20 gr NaOH, agua csp. 200 ml.

SDS 10%:

.- 100 gr/lt SDS, pH 7,2.

PFA 4% en PB:

.- llevar 700 ml de agua a 60 °C con agitación constante. Agregar 40 grs de PFA. Agregar unas gotas de hidróxido de sodio 1M y dejar disolver. Llevar a 900 ml con agua, y finalmente a 1 litro con PB 10x. Filtrar y enfriar a 4 °C.

Cloruro de sodio 5M:

.- 292,2 grs de NaCl en 1 lt de agua, esterilizado por autoclave.

Tampón STE para la Proteinasa K:

.- Tris 100 mM PH 7,8-EDTA 5 mM-SDS 0,5%.

3.3. Materiales comunes a distintos métodos.

3.3.1. Biología molecular.

3.3.1.1. Enzimas.

de restricción	de modificación	otras
Sal I, ClaI, BamHI, EcoRI, XhoI, MluI, FspI, HindIII, NEB. BglII, NEB.	Klenow, NEB. CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase), Amersham. Ligasa, Promega.	Proteinasa K, Gibco. DNAsaI, Promega.

3.3.1.2. Kits para purificación de ADN.

Quiaex II, Quiagen.

Qiaquick, Quiagen.

3.3.1.3. Plásmidos.

.- pADPSY: nos fue gentilmente cedido por el grupo del Dr. J. Mallet del Hospital Pitie Salpetriere de París. El mismo tiene, desde 5' a 3', secuencias adenovirales necesarias para la encapsidación (las LTR, "long terminal repeats", y el sitio de encapsidación, Ψ), el promotor del RSV humano (promotor LTR del Virus del Sarcoma de Rous), un sitio de clonado Sal I (para insertar el transgén de interés), la secuencia de poliadenilación del virus SV40, y finalmente una gran región 3' correspondiente el gen adenoviral pIX. Con esta última región deberá darse la recombinación homóloga con el ADN viral purificado a fin de formar un genoma completo con un tamaño que le permita encapsidarse.

.- pBS185: fue obtenido de GIBCO BRL (cat# 10347-011). Expresa la proteína Cre bajo el control del promotor inmediatamente temprano del citomegalovirus humano (hCMV).

.- pSP72: fue obtenido de Promega (cat# P2191). Es un vector con sitios múltiples de clonado.

3.3.2. Cultivo de células.

3.3.2.1. Materiales.

Antibiótico/antimicótico 10x, DMEM alta glucosa, glutamina, PBS, SFB, todos de Gibco.

3.3.2.2. Líneas celulares.

.- HEK293: es una línea de epitelio de riñón humano que transcomplementa el gen adenoviral E1. Ese gen falta en el ADN viral utilizado y es indispensable para activar el resto de los genes necesarios para obtener partículas adenovirales. Por eso solo se pueden generar y amplificar adenovirus en esta línea celular.

.- HeLa: línea tumoral epitelial humana. No transcomplementa E1.

3.4. Listado de reactivos y materiales particulares según el método.

3.4.1. Materiales y soluciones para desarrollar y amplificar adenovectores en cultivo.

CaCl₂ 2 M:

.- 108 grs de cloruro de calcio sexta-hidratado en 200 ml de agua MilliQ, esterilizado por filtración.

BBS 2x:

.- 50 mM BES (N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethane-sulfonic acid), 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄. Llevar a pH 7.0 con NaOH.

CICs con las siguientes densidades:

.- D= 1,3 (55 g de CsCl y llevar a 185 g finales con Tris 10 mM pH 7,8).

.- D= 1,6 (58,33 g de CsCl y llevar a 114 g finales con Tris 10mM pH 7,8).

.- D= 1,34 (0,3715 g de CsCl por cada ml de solución final con el mismo buffer).

Medio 2x-Agar:

.- mezclar 50% de Medio Eagle Modificado 2x (Gibco) y 50% de una preparación 2,2% Agarosa SeaPlaque (Biozym) en agua MilliQ autoclavada (derretida y enfriada a 40 °C). A esto agregar un 10% de SFB y antibiótico/antimicótico de forma que quede 1x (Gibco).

Columna PD-10 de Sephadex G-25, Pharmacia Biotech.

Solución Salina Balanceada de Hanks, GIBCO, cat# 14175-095.

Aceite mineral, etanol, Proteinasa K, fenol, cloroformo, cloruro de sodio 5M, SDS, EDTA.

3.4.1.1. Para control de endotoxina.

E-TOXATE (Limulus Amebocyte Lysate), detección y semi-cuantificación de endotoxina (Sigma, cat# 210-20).

3.4.1.2. Para corridas electroforéticas en geles de agarosa.

TBE 10x:

.- 121,1 gr/lt Tris, 51,3 gr/lt ácido bórico, 3,7 gr/lt EDTA.

Tampón de carga:

.- 10% de glicerol en tampón TBE 1x, más 0,01% de naranja de acridina.

Agarosa, bromuro de etidio, marcadores de peso molecular y de masa de ADN, todo obtenido de Gibco.

3.4.1.3. Para Southern Blots.

HCl 0,25 M.

NaOH 0,4 M.

SSC 5x (tampón de citrato de sodio):

.- 43,82 gr/lit de ClNa, 22,05 gr/lit citrato de sodio, pH 7.

Solución de prehibridización e hibridización para Southern:

.- 5x SSC,

.- 0,1 % Dextran Sulfato,

.- 1/20 de "Liquid Block" (provisto por el kit utilizado),

.- 0,1 % SDS. Se mezcló todo y se lo disolvió suavemente, aplicando calor (no más de 65 °C).

Buffer A:

.- 100 mM Tris-HCl pH 9,5-300 mM NaCl.

Gene Images random prime labelling module (Amersham).

Gene Images CDP-Star detection module (Amersham), compuesto por:

.- "Liquid Block".

.- Conjugado Antifluoresceína-AP.

.- Reactivo de Detección.

Película de revelado, BioMax MR, Kodak.

Membrana de nylon de 0,45 um, Hybond-N, Amersham.

BSA, SDS, Tween@20.

3.4.1.4. Para la purificación de ARN y transcripción reversa.

TRIzol Reagent, cloroformo, isopropanol, DEPC, DNAsa I, fenol ácido, Transcriptasa Reversa SuperScript™II (incluye tampón de simple cadena 5x y DTT 0,1 M), oligo(dT), dNTPs 10 mM..

3.4.1.5. Para las Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCRs).

Los dNTPs, el MgCl₂, el tampón 5x y la polimerasa Taq fueron de Gibco.

ADN de Ad 2, GIBCO.

Iniciadores o "primers" (DNAgency):

E1A: 5'gAC gCC CgA CAT CAC CTg Tg

E1B: 5'Cgg CgA gCg CCT TCT ggC gg

en seq 5': 5'AAg CCA CCA ggA gCT gAg gC

eng 3'B: 5'CAT CTg gAg CAC ACA AgA gC

eng 5'B: 5'gAg ATT TgC TCC ACC AgA gC

TNFas: 5'ggg AgT AgA CAA ggT ACA AC

TNFs: 5'TCT CAT CAg TTC TAT ggC CC

GAPDH-5: 5'TgA TgA CAT CAA gAA ggT ggT gAA g

GAPDH-3: 5'TCC TTg gAg gCC ATg TAg gCC AT

3.4.1.6. Para Western Blots.

Laemmly buffer 2x (solución de lisis):

.- 20% glicerol

.- 125 mM Tris-HCl pH 6,8

.- 4% SDS

.- 1 mg azul de bromofenol.

Esta preparación fue mantenida a temp. amb., y diluida al momento de usar según lo siguiente:

.- 50% Laemmly 2x

.- 45% agua MilliQ autoclavada

.- 5% B-mercaptoetanol.

Azul brillante de Coomasie (reactivo de Bradford):

.- Disolver 100 mg de azul brillante de Coomasie (G-250) en 50 ml de etanol 95%, agregar 100 ml de ácido fosfórico 85% y llevar a 1 litro con agua. Filtrar y guardar a 4 °C.

Tampón para el gel superior o "stacking gel". (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8):

.- 15,1 gr Tris-HCl hasta alcanzar pH 6,8-agua hasta 250 ml.

Tampón para el gel principal (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8):

.- 45,4 gr Tris-HCl hasta llegar a pH 8,8-agua hasta 250 ml.

Solución stock de acrilamida:

.- 30% : 29,2 gr acrilamide-0,8 gr Bis-acrilamide-agua hasta 100ml.

Tampón de corrida 10x:

.- Tris Base 30 gr, glicina 144 gr, SDS 10 gr, agua hasta 1 lt.

Tampón de transferencia 10x:

.- Tris base 30 gr, glicina 144 gr, agua hasta 1 lt. Al usar preparar lo siguiente: 10x stock 50 ml, metanol 100 ml, agua hasta 500 ml.

ECL-immunodetection kit, Amersham, compuesto por:

.- reactivo de bloqueo,

.- reactivos A y B de detección.

Otros:10% SDS, 10% APS (siempre debe ser fresco), TEMED, Tween®20, película de revelado BioMax MR (Kodax).

Anticuerpos primarios:

.- ratón anti Cre, Chemicon (1/1000).

Anticuerpos secundarios:

.- cabra anti ratón unido peroxidasa (1/10000).

3.4.2. Para perfusión de animales, y obtención y conservación de cortes de cerebro.

Ketamina, Rompún, sacarosa 20% en PB, isopentano, hielo seco, etanol.

Salina con heparina:

.- agregar heparina de forma que queden 5 U/ml a una solución 0,9% de cloruro de sodio.

PFA 4% en PB, 4 °C.

Solución de conservación para cortes de cerebro:

.- 30% etilenglicol-40% glicerol en PB.

3.4.3. Para inmunohistoquímicas e inmunofluorescencias de cortes de cerebro y células.

Reactivo ABC, xilol, etanol, vidrios gelatinizados, DPX, glicerol.

Solución de bloqueo:

.- PB-0,25% Tritón X-100-0,5% BSA-10% suero normal que correspondiera.

Solución de revelado:

.- DAB 0,05%-H₂O₂ 0,01%-PB.

MOWIOL (o gelvatol):

.- agregar 2,4 grs de Mowiol a 6 grs de glicerol. Agregar 6 ml de agua y dejar varias horas a temp. amb.. Agregar 12 ml de Tris 0,2 M pH 8,5, y calentar a 50 °C por 10' con agitación ocasional. Centrifugar 15', 5000 rpm. Alicuotar y guardar a -20 °C.

Anticuerpos primarios:

.- conejo anti Tirosina Hidroxilasa, Chemicon (1/500).

.- conejo anti TNF de ratón, Endogen (1/100).

.- ratón anti Cre, Chemicon (1/1000).

Anticuerpos secundarios:

.- cabra anti conejo biotinilado (1/500).

.- cabra anti ratón unido al fluoroforo Cy3 (Jackson).

.- cabra anti conejo unido al fluoroforo Cy2 (Jackson).

3.4.4. Para la histoquímica con X-gal.

Soluciones Stock.

PFA 4%, PBS 1M (10x), MgCl₂ 1 M.

Ferricianuro de Potasio (K₃Fe[CN]₆):

.- 50 mM en agua. Guardar a 4 °C en oscuridad.

Ferrocianuro de Potasio (K₄Fe[CN]₆):

.- 50 mM en agua. Guardar a 4 °C en oscuridad.

X-Gal:

.- 20 mg/ml de disuelto en N,N-dimetilformamida. Alicuotar y guardar a -20 °C.

Solución de tinción.

.- 100 mM fosfato de sodio	200 ul de 1M PBS
.- 1,3 mM MgCl ₂	2,6 ul de 1M
3 mM K ₃ Fe[CN] ₆	120 ul de 50 mM
3 mM K ₄ Fe[CN] ₆	120 ul de 50 mM
1 mg/ml X-Gal.	100 ul de 20 mg/ml

.- Agua csp. 2ml 1480 ul.

3.4.5. Para purificar ADN genómico de tejido de ratón.

Proteinasa K, fenol básico, cloroformo, alcohol isoamílico, etanol.

Acetato de sodio 3 M pH 7:

.- pesar 408.1 grs de acetato de sodio trihidratado en 800 ml de agua, llevar a pH 7 con ácido acético glacial, y llevar a 1 lt.

3.4.6. Para la detección del TNF de ratón por el ensayo de ELISA.

Solución de lisis para Elisa:

.- 137 mM NaCl; 20 mM Tris pH 8; 1% NP-40; 10% glicerol; 1 mM PMSF; 10 ug/ml aprotinina; 1 ug/ml leupeptina.

Solución de pegado: 0,1 M Na₂HPO₄, pH 6.

PBS 10x :

.- 80 g ClNa, 11.6 g Na₂HPO₄, 2 g KH₂PO₄, 2 g KCl, agua hasta 1 lt.

PBS/T:

.- diluir el PBS 1/10 y agregar 500 ul (0,05 %) de Tween®20.

Acido sulfúrico:

.- diluir 1/7 la solución comercial pura (aproximadamente 14M).

Anticuerpo de captura anti-TNF (PharMingen, cat. #554641), clon G281-2626.

Anti-TNF de ratón biotinilado (PharMingen, clon MP6-XT3 cat # 18122D, 500 ug/ml).

TNF-a recombinante (reconstituido a 2.5 ng/ul en 1% BSA-PBS).

Avidina-HRP (Dako).

Sustrato de visualizacion TMB, (PharMingen).

Placas de 96 pocillos de alto pegado (Nunc MaxiSorp), BSA, Tween®20.

3.4.7. Para tinción con violeta de cresilo.

Violeta de cresilo: 0,25% violeta de cresilo en agua. Filtrar.

Métodos .

4. Métodos.

4.1. Transducción de células en cultivo con adenovectores.

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de diferentes tamaños según la necesidad. En general, la transducción se realizó cuando estuvieran en un 80 % de confluencia. Para ello se les retiró el medio de cultivo, y se les agregó medio con 2% SFB con los adenovectores en la multiplicidad de infección (MOI= número de partículas virales por cada célula) que se necesitara, en un volumen final que alcanzara para cubrir las células. Se incubó 1 hora (hr) rotando la placa cada 20'. Se retiró ese volumen y se colocó medio fresco con la cantidad de SFB adecuado para cada línea celular.

4.2. Desarrollo de nuevos adenovectores.

El desarrollo de adenovectores comprende una serie de pasos generales, con modificaciones puntuales a lo largo del protocolo para cada virus en particular. En una primera parte de esta sección se describirán los protocolos generales necesarios para llegar desde una secuencia de ADN que codifica una proteína de interés hasta tener el stock final de adenovectores que expresen la misma, y luego se describirán cuales fueron los pasos particulares para el adenovector que codifica para la proteína Cre.

4.2.1. Métodos generales a todos los adenovectores.

Se realizaron según protocolos ya establecidos, con algunas modificaciones (Revah et al 1996). Todos los procedimientos que involucraron partículas adenovirales posiblemente infectivas se realizaron bajo campana vertical de bioseguridad.

4.2.1.1. Amplificación de adenovectores en células en cultivo.

4.2.1.1.1. Preparación del inóculo.

Para obtener el “brazo izquierdo” de ADN del esqueleto adenoviral (región m.u. 2,6 a 100 del mismo) se utilizó un adenovector construido previamente, que expresa la proteína bacteriana beta-galactosidasa (Le Gal La Salle et al 1993). Se transdujo 1 placa de cultivo de 10 cm. de diámetro (p100) de células HEK293 con una MOI de 1. Se dejaron 48 hrs, se comprobó que las células

comenzaran a sufrir el efecto citopático (se redondean y comienzan a perder adhesión a la placa), se las colectó suavemente y se las centrifugó en un tubo de 50 ml. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 5 ml de PBS para someterlas alternativamente a 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento en nitrógeno líquido y a 37 °C. Finalmente fueron centrifugadas a 5000 rpm, 10', y el sobrenadante con adenovectores fue guardado a -70 °C para ser usado en el próximo paso de amplificación.

4.2.1.1.2. Producción del stock viral crudo.

Los 5 ml de inóculo previamente obtenidos fueron llevados a 50 ml con DMEM-2 % SFB. Se inocularon 50 placas de 10 cm con 1 ml de inóculo cada una (medio DMEM-2% de SFB-1% glutamina). Cuando se observó efecto citopático se colectaron todas las células en la cantidad necesaria de tubos de 50 ml y se las centrifugó a 3000 r.p.m., 10'. Luego de descartar el sobrenadante, se resuspendieron en 1/10 de la cantidad de medio original de cada placa (aproximadamente 50 ml de medio para 50 placas). Finalmente se realizaron nuevamente 3 ciclos de congelamiento y descongelamiento en nitrógeno líquido y a 37 °C. Se centrifugó a 5000 r.p.m., 10', y se recuperó el sobrenadante para ser congelado hasta el próximo paso.

4.2.1.2. Purificación de adenovectores en gradientes de CICs.

Se prepararon 6 gradientes discontinuos de CsCl en tubos de polialómero (Beckman), colocando 4,8 ml de CsCl D=1,6 y agregando sobre esto (muy suavemente) 4,8 ml de CsCl D=1,3. Se agregaron luego en forma lenta aproximadamente 6 ml por tubo del stock viral crudo, y finalmente 1 ml de aceite mineral. Los gradientes se ultracentrifugaron a 35000 r.p.m., 1,30 hrs, 20 °C, en rotor SW40. Se deben formar dos bandas blanquecinas, separadas por aproximadamente 1 cm. Se colectaron de cada gradiente la banda inferior (adenovectores) con una jeringa de 5ml, utilizando una aguja nueva (21 G1) para cada tubo, teniendo mucho cuidado de no tomar nada de la banda superior (cápsides vacías). Se colocó suavemente la mitad del volumen obtenido en cada uno de otros dos tubos con 5 ml de CsCl D=1,34 cada uno, y se agregó aceite mineral hasta 0,5 cm del tope del borde superior. Estos tubos fueron centrifugados 18 hrs, 35000 r.p.m., 20 °C, con el mismo rotor ya mencionado. Si el primer paso de obtención de virus fue correcto se debería observar sólo una banda. La misma fue colectada siguiendo los pasos ya mencionados y los virus fueron guardados a -70 °C hasta ser usados.

4.2.1.3. Obtención de ADN adenoviral.

El stock de adenovectores obtenido en el segundo gradiente de CsCl fue precipitado en un tubo Corex agregando 2 volúmenes de agua y 6 volúmenes de etanol 100 %, dejándolo a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30'. Se centrifugó en rotor SS34 a 7000 r.p.m., 10', $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante fue descartado y se resuspendió el sedimento con 6 ml de agua, más 30 ml de etanol 100 %. Se centrifugó 10', 7000 r.p.m., $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, en el mismo rotor anterior. El sobrenadante fue descartado y se dejó secar el sedimento (poco tiempo). Se lo resuspendió en 3 ml de tampón STE y se agregaron 50 ug/ml de Proteinasa K, para luego incubar 1 hr, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se hicieron 2 extracciones con fenol básico/cloroformo (sin agitar para no romper el ADN!). Se lo precipitó de la fase acuosa colectada con 2 volúmenes de etanol 100%, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, toda la noche. Se centrifugó a 13000 r.p.m., $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 25'. El pellet fue lavado con etanol 70%, y resuspendido en 200 ul de agua. Se midió la concentración de una alícuota de 2 ul por densidad óptica (DO) en espectrofotómetro (Pharmacia Biotech).

4.2.1.4. Digestión del ADN adenoviral.

Aproximadamente 120 ug de ADN obtenido en el paso anterior fueron cortados con 1,2 U de Cla I por cada ug, 3 hrs, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. En ese punto se agregó 1 U/ug más de la enzima. Al cabo de 1 hr, se controló la digestión corriendo una alícuota en gel de agarosa 0,7 %, en tampón TBE 1x. La corrida se realizó en forma lenta para poder separar fragmentos de ADN grandes (25-30 Kpb). Cuando la digestión es completa, se debe observar una única banda de alto peso molecular (23-25 Kpb), que corresponde al brazo izquierdo del genoma del adenovector, y que es la que se precisa purificar. Pueden o no observarse, según las condiciones de la corrida, algunas bandas pequeñas (1-2 Kpb) correspondientes a fragmentos del brazo izquierdo del genoma del adenovector. Cuando la restricción estuvo completa, se inactivó la enzima a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10'.

4.2.1.5. Purificación del ADN viral en gel de agarosa.

Con el volumen total de la restricción se sembraron varios pocillos de un gel de agarosa 0,7 % en presencia de bromuro de etidio, y se realizó una electroforesis durante la noche a 0,5 V/cm, en tampón TBE. Las bandas de aproximadamente 26 Kpb se visualizaron y se escindieron del gel bajo luz UV, en el menor tiempo posible para evitar daños al ADN. La extracción del ADN del gel se realizó

utilizando el kit Quiaex II (QIAGEN), siguiendo paso a paso las especificaciones del fabricante. Se midió la concentración de ADN de cada una de las extracciones por DO, se corrió una alícuota de 2 ul de cada tubo en un nuevo gel para verificar la presencia de una sola banda, y se guardó el ADN a -20°C .

4.2.1.6. Preparación del plásmido pADPSY.

El plásmido fue linearizado con la enzima Sal I, 2,5 hrs, 37°C , y purificado con QIAQUICK. Los extremos cohesivos fueron rellenados con la enzima Klenow. La reacción se incubó durante 15', 30°C , y se frenó agregando 5 ul de EDTA 0,5 M y calentando a 75°C , 10'. Luego se realizó una extracción con fenol-cloroformo y se lo precipitó con etanol. Fue resuspendido en 25 ul de tampón CIAP, enzima con la cual se lo defosforiló incubando a 50°C , 60'. Nuevamente se lo purificó con fenol-cloroformo, reprecipitó con etanol, y se lo resuspendió con 10 ul de Tris 10 mM.

Digestión con Sall	Rellenado con Klenow.	Defosforilacion con CIAP
30 ug pADPSY	20 ug pADPSY/Sall	20 ug pADPSY/Sall/Klenow
12 ul Sall	10 mM cada dNTP	20 ul tampon 5x CIAP
24 ul Tampon 10x	25 ul Tampón NEB 2	2,5 ul de CIAP (22 U/ul)
agua qsp. 240 ul	25 ul Klenow	agua qsp. 100 ul
	agua qsp. 250 ul.	

A este plásmido se le ligaron los ADN copia de interés. Esas nuevas construcciones fueron en todos los casos linearizados con la enzima Fsp I, purificados de geles de agarosa utilizando el kit QIAQUICK, y guardado a -20°C hasta su uso en la co-transfección con el genoma viral.

4.2.1.7. Co-transfección para obtener adenovectores por recombinación homóloga.

Células: se utilizaron células HEK293. Fueron sembradas en placas de 60 mm (p60) de forma que al comenzar el experimento estuvieran 70 % confluentes.

ADN: se utilizaron dos fragmentos de ADN, el brazo izquierdo del ADN viral y el plásmido linearizado pADPSY. La preparación de ambos se describió previamente.

4.2.1.7.1. Co-transfección y obtención del virus.

Se cambió el medio a las células entre 3-5 hrs antes de la transfección (medio DMEM-1% SFB-1% antibiótico/antimicótico), dejando una cantidad suficiente sólo para cubrirlas. Se controló que no estuvieran retraídas al momento de la transfección. Caso contrario, se descartaron. Se preparó lo siguiente, justo antes de la transfección, a temperatura ambiente (temp. amb.):

Fragmento Viral	2 ug
Plásmido lineal	3 ug
Agua	qsp. hasta 90 ul.

Se mezcló bien y se agregó:

CaCl ₂ 2 M	10 ul
BBS x2	100 ul.

El BBS se retiró de la heladera por lo menos 2 hrs antes y se lo mantuvo a temp. amb. El CaCl₂ y el BBS 2x se agregaron muy suavemente por las paredes del eppendorf, agitando el tubo sobre agitador suave en forma continua. Esta preparación fue agregada a las células y se dejó durante la noche en estufa. Como controles se hicieron dos preparaciones más, una sin colocar plásmido (para verificar que no haya efecto tóxico por la mezcla en sí y que no se formaron partículas sólo con el esqueleto viral izquierdo), y otra con un plásmido que codifique una proteína reportera (en este caso beta-galactosidasa). Al día siguiente se retiró el medio, y se agregaron 3 ml de medio fresco con 5 % de SFB. Se realizó ensayo de X-gal a las 24 hrs con el control y se continuó con el experimento si se detectaron al menos un 10 % de células positivas. Se cambió el medio cada 3 días, controlando diariamente la aparición de efecto citopático. Entre 5 y 8 días después de la cotransfección se observó que las células comenzaban a redondearse y a despegarse de la placa, momento en que se las colectó.

4.2.1.8. Amplificación de los nuevos adenovectores.

Las células colectadas fueron sometidas alternativamente a 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento en nitrógeno líquido y a 37 °C. Luego fueron centrifugadas 5', temp. amb., 5000 r.p.m.. El sobrenadante (aproximadamente 3 ml) se alicuotó en 3 tubos, 2 para ser congelados a -70 °C, y uno fue usado para transducir células 293 sembradas en un pocillo de una placa de 24 pocillos

("multiwell", MW x 24), en 50 % de confluencia. Cuando estas células sufrieron efecto citopático, se repitió el proceso pasando por una placa p60 y finalmente una p100.

4.2.1.9. Purificación del virus bajo agar.

Como es posible que en la población de adenovectores obtenidas hasta este punto no sea homogénea, se realiza una purificación de los virus. Se sembraron células 293 en los 6 pocillos de un MW x 6, se esperó a que estuvieran en 100 % de confluencia (una monocapa perfecta), y se realizó la transducción con diluciones seriadas 1/10 del sobrenadante de la última p100 colectada, con 750 ul por pocillo, empezando con una alicuota sin diluir, y dejando en cada MW un pocillo control sin adenovector. Luego de 2 hrs se retiró el medio y se agregaron 2 ml de la preparación de medio 2x-agar, muy suavemente contra un borde, para evitar levantar la monocapa. Cada 3 días se agregaron 2 ml por well de esa misma preparación. Entre los 10 y 12 días se empezaron a observar pequeñas placas de lisis. Aquellas que estuvieran bien separadas fueron colectadas pasando la punta de una pipeta Pasteur nueva hasta el fondo, atravesando el agar y aspirando con una perita de goma. Lo colectado fue colocado en tubos "eppendorf" con 500 ul de medio y congelados a -70°C . Usualmente se recuperaron 10 a 15 placas por experimento. Este procedimiento se repite una vez más, para asegurar la obtención de un clon puro.

4.2.1.10. Amplificación de las colonias obtenidas.

Como se mencionó, en este punto cada una de las poblaciones de virus obtenidas de cada placa de lisis debería ser un clon, compuesta por un solo tipo de vector. La amplificación de las partículas virales de cada una de ellas se realizó como ya se describió mas arriba, desde un pocillo de un MW x 24 hasta una p100.

4.2.1.11. Verificación de la correcta recombinación de los adenovectores.

Como es posible que se generen partículas que no correspondan exactamente a lo esperado, se realizó para todas las placas de lisis un ensayo de restricción de ADN con dos enzimas para las cuales se conoce el patrón de corte tanto del adenovector como del transgén. Esto nos permitió detectar

aquellas colonias con un solo tipo de vector y que tenían la orientación adecuada. Se seleccionó una de ellas para continuar generando cada stock.

4.2.1.12. Obtención de ADN adenoviral de células infectadas (Hirt).

Se cosecharon las células 293 transducidas con el adenovector de interés. Fueron centrifugadas en tubos de 15 ml, 4000 r.p.m., 10'. Se descartó el sobrenadante y se las resuspendió en 2 ml de PBS. De ese volumen, se tomaron 400 ul (se congela el resto) y se los colocó en un tubo eppendorf nuevo de 2 ml. Se agregaron: 30 ul SDS 20% (1,5 % final)-20 ul EDTA 0,5 M (25 mM final)-5 ul Proteínasa K 20 mg/ml (0,25 mg/ml final). Se invirtió suavemente (para no romper el ADN genómico) dos veces y se incubó durante 2 horas a 55 °C, con lo cual se lisan las células y los adenovirus presentes en la alicuota. Se agregó 100 ul de NaCl 5M, se mezcló nuevamente por inversión dos veces y se incubaron durante 30', -20 °C (de tal forma de precipitar los fragmentos de ADN de mayor tamaño provenientes de las células). Se centrifugaron durante 45', 13000 r.p.m., 4 °C. Se recuperó el sobrenadante, se lo colocó en un tubo nuevo, se agregaron 400 ul de cloroformo, y se mezclaron suavemente las fases (sin agitador). Luego de centrifugar 5', 13000 r.p.m., se recuperó nuevamente la fase acuosa a un tubo nuevo. Se agregó 1 ml de etanol 100 %, se lo mezcló por inversión y se lo dejó 1 hr, -20 °C. Seguidamente se centrifugó durante 30', 13000 r.p.m.. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet de ADN viral con 500 ul de etanol 70 %. Se lo dejó secar y se lo resuspendió en 50 ul de H₂O Milli-Q autoclavada.

4.2.1.13. Digestión y separación del ADN viral en gel de agarosa.

En un tubo de 1,5 ml se colocaron:

- 8 ul de la preparación de ADN viral,
- 9 ul de H₂O,
- 2 ul del tampón de digestión,
- 1 ul de Hind III o BglII (concentración 4-5 U/ul, NEB).

Luego de incubar a 37 °C, 45', se sembraron 10 ul de las digestiones en un gel de agarosa 0,7 %-1x TBE, en presencia de bromuro de etidio, y se realizó la corrida electroforética durante la noche a 0,5 Volts/cm. Al otro día se obtuvo una fotografía del gel para poder estudiar el patrón de restricción de

las distintas colonias. Posteriormente se realizó la transferencia del ADN a membranas para confirmar por Southern Blot que la construcción del vector fue correcta.

4.2.1.14. Transferencia del ADN a membrana de Nylon con NaOH.

Pretratamiento del gel: se lo colocó 30' en HCl 0,25 M con agitación a temp. amb., se lo lavó 15' en H₂O Milli Q autoclavada, y se lo equilibró 20' en NaOH 0,4 M.

Transferencia: se colocó una cantidad adecuada de NaOH 0,4 M en una fuente, un soporte que cruzara la misma y que pudiera sostener el gel, y luego una tira de papel Whatmann 3MM que pasara por arriba del soporte y tocara el NaOH de ambos lados a modo de puente. Se colocó el gel dado vuelta sobre el puente. Se ubicó sobre éste una membrana de nylon de 0,45 um (Hybond-N, Amersham) del tamaño exacto del gel, y luego 6 papeles Whatmann del mismo tamaño, retirando todas las burbujas que pudieran formarse (los tres primeros húmedos, el resto secos). Finalmente sobre ellos se colocó una torre de papel absorbente, un nuevo soporte sólido y un peso de medio kilo. La transferencia se realizó por dos hrs. Se desarmó el dispositivo, y sin mover la membrana se marcaron los pocillos en la misma con lápiz negro y la orientación de la membrana. Se la lavó en SSC 2X, 5', y luego se la colocó sobre un papel Whatmann para fijar el ADN a la misma con luz UV (programa C-L, BioRad-crosslinker, 125 mJ). La membrana fue utilizada inmediatamente o se guardó en un sobre hasta su utilización.

4.2.1.15. Marcación de sondas con fluoresceína (Gene Images random prime labelling module, Amersham).

Se utilizaron como sonda 50 ng del fragmento de Cre escindido del plásmido pBS185, los cuales fueron incubados a 90 °C en un tubo eppendorf por 5' y colocado rápidamente en hielo. Mientras tanto se descongelaron y colocaron en hielo la "Mix" y los "Primers" provistos por el kit. Se agregó a cada tubo:

- .- 10 ul de Mix,
- .- 5 ul de primers,
- .- 1 ul de Klenow,
- .- Agua hasta 50 ul.

Luego de mezclar y dar un spin, se incubó a 37 °C, 1 hr. Se espera que se obtengan por lo menos unos 5 ng de sonda marcada por ul.

4.2.1.16. Southern blot no radioactivo (Gene Images CDP-Star detection module, Amersham).

Se calentó la solución de prehibridización a 60 °C. Se la puso en contacto con los filtros (0,125 ml/cm² de membrana). Se prehibridizó durante al menos 30' en agitación continua a la misma temperatura. Se tomó una cantidad suficiente de sonda para que queden aproximadamente 10 ng por cada ml de solución y se lo llevó a un volumen final de 20 ul con agua. Luego de incubar la sonda a 90 °C, 5', se la colocó rápidamente en hielo por unos minutos y se la agregó a la solución que bañaba la membrana. Se mezcló bien por agitación suave e hibridizó desde 1 hr a toda la noche según el caso, 60 °C. Para lavar la membrana se la colocó primero en 1x SSC/0,1 % SDS, 15', temp. amb., y luego en 0,1x SSC/0,1 % SDS durante 1 hr, 60 °C (todo con agitación).

Para el revelado, se incubó la membrana 1 hr, temp. amb. con 10 ml de una dilución 1/10 de Liquid Block en Buffer A. Inmediatamente antes de usar, se diluyó el conjugado Antifluoresceína-AP 1/5000 en buffer A recién preparado con 0,5 % P/V BSA. Luego de incubar la membrana en 3 ml de esa solución por 1 hr, temp. amb., con agitación, se hicieron 3 lavados de 10' cada uno con 100 ml de Buffer A-0,3 % Tween®20, temp. amb.. Se eliminó el exceso de líquido de la membrana y se la colocó sobre "SaranWrap". En forma aséptica se tomó una alícuota de Reactivo de Detección (30-40 ul por cada cm² de membrana) y se lo colocó sobre ésta última. Se dejó 5', se escurrió y se pasó la membrana a un SaranWrap nuevo o a un nylon adecuado en el cual poder envolverla para que no se seque. La exposición se realizó en un chasis exponiendo la membrana a una película sensible a temp. amb. y se la reveló entre 5' a 1 hr después. Según el resultado obtenido se expuso nuevamente el tiempo que se consideró necesario.

En este punto ya se tienen identificadas cuáles de aquellas placas de lisis obtenidas previamente tienen un solo tipo de adenovector, y con el transgen insertado en el lugar y dirección correcta en el genoma. El paso siguiente consiste en realizar uno o más controles que indiquen que los adenovectores presentes en la colonia que se seleccione para seguir adelante expresen el gen de interés. Esto puede realizarse a nivel de ARN o de proteína. Mas adelante se especifican para cada virus en particular.

4.2.1.17. Generación de un stock de adenovectores.

Una vez que se esta seguro de la expresión de la proteína de interés, se procede a generar un stock de cada adenovector. Para ello hay que seguir básicamente los mismos pasos ya especificados

previamente (los cuales ahora solo se mencionan) con algunas modificaciones (las cuales son explicadas en detalle).

4.2.1.18. Obtención del stock concentrado de adenovector.

Una alícuota de la última p100 con virus de la colonia seleccionada que se mantenía a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ fue sometida a nitrógeno líquido- $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por tres veces, centrifugada, y con el sobrenadante se transdujo una nueva p100 de células 293 en 80 % de confluencia. Dos días después se colectaron las células, se rompieron con frío-calor, se centrifugaron, el sobrenadante se llevó a 50 ml con medio 2% SFB, y con 1 ml por placa se transdujeron 50 p100 con células 293 a 80% de confluencia. Nuevamente, 2 días después se recuperaron las células, se las centrifugó y se las resuspendió en 50 ml de PBS. Se procedió a romperlas con frío-calor, se eliminaron los restos por centrifugación, y el sobrenadante con el total de los adenovectores provenientes de las 50 p100, fue pasado por los dos gradientes de cloruro de cesio según ya se mencionó anteriormente. Sin embargo, a diferencia de lo descrito antes, ahora nos interesa obtener el stock de adenovectores, no su ADN. Por eso el volumen de virus obtenido en el segundo gradiente fue llevado a 2,5 ml con Solución Salina Balanceada de Hanks pH 7,4 (sin cloruro de calcio, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio ni rojo fenol) y pasado por una columna PD-10 de Sephadex G-25 (Pharmacia) previamente equilibrada con 30 ml de la misma solución. Así se eliminaron las sales provenientes del gradiente. Se eluyeron las partículas adenovirales con la misma solución aplicando 6 veces 2,5 ml, y tomando aproximadamente 15 alícuotas de 500 μl en tubos eppendorf. Los mismos se mantuvieron en hielo inmediatamente que salían de la columna.

4.2.1.19. Cuantificación de las partículas virales por densidad óptica (DO).

Se tenían preparados 15 eppendorf de 1,5 ml con 495 μl de una solución 0,02 M de Tris pH 7,4-0,5 % de SDS, a la cual se le agregan 5 μl de cada tubo colectado de la columna. Luego de 15' de lisis a temp. amb., se procedió a medir la DO de la preparación utilizando como blanco la misma solución de lisis con 5 μl de solución de Hanks (1 OD a 260 nm = $1,1 \times 10^{12}$ partículas). Usualmente las partículas virales se recuperaron entre los tubos 5, 6 y 7, los cuales fueron o no mezclados según cada caso en particular.

4.2.1.20. Fraccionamiento y almacenamiento.

Al volumen final de adenovectores colectado se le agregó glicerol de tal forma que quedase 10% final. Se mezcló suave y extensamente para asegurar una perfecta homogeneidad en la preparación y se procedió a alicuotar los virus de a 3-5 ul por eppendorf de 500 ul. Todo el procedimiento se realizó manteniendo los tubos en hielo. Finalmente se guardaron los vectores a -70°C .

4.2.1.21. Cuantificación bajo agar.

El procedimiento es básicamente similar al ya descrito previamente para obtener las placas de lisis, con algunas pequeñas modificaciones. Como usualmente el título obtenido por OD fue de 1×10^{13} partículas/ml, se hicieron transducciones seriadas comenzando con el stock sin diluir, hasta una dilución de 10^{-10} (2 MWx6, 1 control sin transducir en cada uno, 10 diluciones de adenovector en total). A los 10-12 días generalmente se pudieron contar las placas de lisis obtenidas (se cuentan en aquella dilución en que se puedan reconocer claramente y estén bien aisladas unas de otras). De esta manera se multiplican por la dilución y se establece el título final del stock de adenovectores, que se expresa como unidades formadoras de colonias (pfu, "plaque forming units")/ml.

4.2.1.22. Controles de ausencia de partículas replicativas.

Para asegurarse que en el stock solo hay adenovectores deficientes en su replicación, y no adenovirus replicativos, se realizan dos controles.

4.2.1.22.1. PCR para E1.

El objetivo es verificar que en el stock no haya vectores adenovirales que hayan recombinado con el genoma de las células 293 y hayan recuperado el gen E1, haciéndose de esta manera replicativos. Se tomaron dos o tres alicuotas al azar del stock, y se obtuvo el ADN por el método de Hirt. Se realizó la PCR según el esquema siguiente:

- .- Templado: diluciones de una alícuota del ADN obtenido por HIRT.
- .- Control positivo: ADN de adenovirus 2 (Ad 2, GIBCO), cepa salvaje, el cual posee E1.

.- Control para verificar que en la muestra no haya algún factor que inhiba a la polimerasa: se hace PCR a una alícuota de Ad 2 en presencia de la menor dilución utilizada para las muestras a chequear.

.- Control negativo: PCR sin agregar ADN.

Las cantidades a utilizar se especifican en la siguiente tabla:

Tubos a preparar:	Ad 2 más stock sin diluir	Stock			Ad 2	Control negativo
		sin diluir	1/100	1/1000		
ADN	2 ul	2 ul en cada caso			2 ul	-
E1A	0,5 ul	0,5 ul			0,5 ul	0,5 ul
E1B	0,5 ul	0,5 ul			0,5 ul	0,5 ul
Taq	0,5 ul	0,5 ul			0,5 ul	0,5 ul
Master Mix	46,5 ul	46,5 ul			46,5 ul	48,5 ul

.- "Master Mix": 0,2 mM dNTPs-1X PCR buffer-2,5 mM MgCl₂-agua qsp. el volumen deseado.

4.2.1.22.2. Transducción de células que no transcomplementan E1.

Se utilizaron células HeLa, que son transducidas muy eficientemente por los adenovectores. Se las sembró en placas p60 a 80% de confluencia, y se las transdujo con una MOI de 100, utilizándose 3 o 4 alícuotas diferentes de cada stock. Como control se hicieron en paralelo transducciones de células 293 para asegurarnos que los vectores eran funcionales. Luego de 3-5 días, se analizó si las células HeLa presentaban o no el efecto citopático observable en las placas de células 293. De ser así se descarta el stock. Caso contrario se prosigue con el siguiente paso.

4.2.1.23. Análisis de endotoxina presente en el stock.

Como es posible que cierta cantidad de endotoxina esté presente en el stock, y esto pueda influir en los experimentos posteriores, sobre todo *in vivo*, es necesario saber si está dentro de los límites aceptables. Para ello se utilizó el kit E-TOXATE, que detectaría 0,05 EU/ml (1 ng/ml) de endotoxina. El procedimiento se realizó siguiendo paso a paso las indicaciones del fabricante. En caso de que el test detectara endotoxina el stock debe descartarse.

El último paso consiste en realizar nuevamente un ensayo que detectara la expresión de la proteína, ahora con el stock puro, para verificar que durante el proceso de generación del mismo no se hubieran inactivado las partículas. En caso de ser positivo este último ensayo pudimos determinar que disponíamos de un nuevo stock de vectores adenovirales que expresaban la proteína de interés.

4.2.2. Métodos particulares para cada adenovector.

Los ADN copia de interés deben ser clonados en el sitio Sall del pADPSY, a fin de ser luego linearizado y cotransfectado. Se mencionan los pasos seguidos para cada adenovector en particular.

4.2.2.1. AdCRE.

El ADN copia (ADNc) codificante para CRE estaba clonado en el plásmido pBS185. Se diseñaron dos iniciadores (“primers”) para poder amplificar la región codificante 5’ del gen por PCR. Al primer diseñado para reconocer la secuencia 5’ de CRE se le agregó una secuencia de localización nuclear (NLS, “nuclear localization signal”, la cual dirige la proteína al núcleo y la haría mas eficiente para llevar a cabo la recombinación de la secuencia blanco en el genoma) y un sitio de corte XhoI para facilitar el clonado posterior. La secuencia amplificada fue purificada en gel de agarosa, y digerida con las enzimas XhoI-BamHI. Con las mismas enzimas se digirió el plásmido pSP72, y se lo purificó. En el mismo se clonó el fragmento 5’ de CRE, y se lo volvió a cortar con BamHI y EcoRI. Por otro lado, la secuencia 3’ de CRE fue escindida de pBS185 cortando con BamHI-EcoRI y purificada. En un próximo paso se ligó la secuencia 3’ en pSP72, quedando de esa manera la secuencia de CRE completa (con la NLS). Finalmente se cortó la secuencia completa con XhoI-MluI, se la purificó, se rellenaron los extremos con la enzima Klenow, y se lo repurificó. Este fragmento es el que fue utilizado para ser clonado en una ligación de extremos romos en el sitio Sall del plásmido pADPSY, el cual fue luego linearizado con FspI y purificado. Hasta este punto en la construcción del AdCRE fue realizado por la Lic. Amaicha Depino previo a la llegada del presente tesista al laboratorio.

A partir de aquí (desde la co-transfección con el genoma viral, hasta la obtención final del stock) fue realizado por el presente estudiante de doctorado.

Los controles particulares para este adenovector fueron: análisis de la expresión de la proteína por western blot, y análisis de la localización nuclear de la misma por inmunofluorescencia *in vitro* (con células HeLa transducidas) e *in vivo* (inyectando el adenovector en la s.n. de ratones).

4.3. Western Blots por quimioluminiscencia (ECL, Amersham).

4.3.1. Obtención de proteínas para Western Blot.

En el caso de células en cultivo, las mismas fueron lavadas con PBS a 4 °C. Se agregó a la placa 100 ul por p60 o 500 ul por p100 de solución de lisis 1x (“Laemly buffer”), y se colectaron las células en tubos eppendorf por arrastre con un “policerubberman”. Se las dejó en hielo por 15’ y se las sonicó por 10-15 segundos.

En el caso de muestras de cerebro, las mismas fueron rápidamente colectadas luego de sacrificar al animal, y arrojadas a N2 líquido. Se descongelaron en el momento de ser procesadas por sonicación en la solución de lisis.

En ambos casos se centrifugaron los extractos por 5’, 10000 r.p.m., 4 °C. Se tomaron los sobrenadantes, se los alicuotó y se los congeló a -70 °C. Una alicuota de cada uno fue utilizada para cuantificar la concentración de proteínas por el método de Bradford.

4.3.2. Cuantificación de la concentración de proteínas en una muestra.

Se utilizaron placas de 96 pocillos. Se preparó por duplicado una curva standard con seroalbúmina bovina (BSA, “bovine seroalbumine”), diluida en salina (desde 0,5 a 10 ug por pocillo en 20 ul). Se dejaron pocillos en blanco, sólo con la salina. Las proteínas a cuantificar se pusieron por duplicado, inicialmente en una dilución 1/10 y 1/1000, y se varió según el resultado para obtener un valor que se ubicara dentro de la ecuación lineal de la curva standard. Se agregaron a todos los pocillos 200 ul del reactivo de Bradford, se mezcló por agitación, se dejó a temp. amb. por 2’, y se midió la absorbancia a 595 nm.

4.3.3. Separación de proteínas en geles de poliacrilamida.

Se utilizó el sistema Miniprotean II (BIORAD). Los vidrios fueron lavados, enjuagados y secados. Se prepararon geles desnaturizantes discontinuos con distintas concentraciones de acrilamida según las necesidades específicas. Una vez solidificado el gel principal, se agregó el gel “apilador” (“stacking gel”) y se esperó a su vez que éste también solidificara. Fueron sembrados 50 ug de proteínas por pocillo, en 20 ul, previamente calentadas por 5’, 95 °C y puestas en hielo. La

electroforesis se realizó en tampón de corrida 1x, a 20 mA constantes hasta que las proteínas entraran al gel principal y luego a 30 mA hasta que el colorante alcanzara el final del gel.

Gel apilador.		Gel principal.	
			10%
Acrilamide 30%	2 ml	Acrilamide 30%	12,5 ml
Tampon pH 6,8	3 ml	Tampon pH 8,8	9,4 ml
SDS 10%	120 ul	SDS 10% (0,4%)	375 ul
Agua	6,7 ml	Agua	15 ml
APS 10%	160 ul	APS 10%	120 ul
TEMED	16 ul	TEMED	<u>30</u> ul
			35 ml

.- Se presenta sólo una concentración de gel utilizado. Según las necesidades se varían la acrilamida y el agua.

4.3.4. Transferencia de las proteínas.

Las membranas de nitrocelulosa fueron pre-humedecidas en agua y equilibradas en tampón de transferencia. Se transfirieron las proteínas en distintos tiempos y amperajes según el caso utilizando el mismo tampón.

4.3.5. Incubaciones y revelado de las membranas.

Se bloquearon las membranas con 5% de Reactivo de Bloqueo provisto por el kit, diluido en TBS-Tween@20 0,1%, 1 hr, temp. amb.. Se lavó la membrana varias veces en TBS-T, y se la incubó con el primer anticuerpo diluido en TBS-leche descremada 2%, entre 1 hr a temp. amb. y toda la noche a 4 °C. Nuevamente se lavó la membrana y la incubó en el segundo anticuerpo marcado con peroxidasa (HRP) durante 1 hr, diluido según cada caso en particular. La membrana fue extensamente lavada. Para el revelado se la cubrió con la cantidad necesaria de una mezcla en partes iguales de los reactivos de detección provisto por el kit. Se incubó un minuto, se eliminó el líquido sobrante, se envolvió la membrana en SaranWrap, y se la expuso por 15 seg a una película sensible. Se reveló la misma y según el resultado, se realizó una segunda exposición.

4.4. Inmunofluorescencia de células en cultivo.

Células HeLa fueron sembradas en pocillos de plástico (Lab-Tek Chamber Slide system, Nalge Nunc International). Las mismas fueron transducidas con el adenovector de interés. Como controles se usaron pocillos de células sin transducir o transducidas con un virus control, y como control de la IF se cambió el primer anticuerpo por suero normal del animal que corresponda. Las células fueron fijadas con PFA 4%, 10', lavadas con PBS, e incubadas en solución de bloqueo, 1 hr. Luego fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente durante la noche. Luego de varios lavados se las incubó con el anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo de interés. Nuevamente fueron lavadas, y finalmente montadas en forma transciente con 50% de glicerol en PB, analizadas por microscopía de fluorescencia y fotografiadas.

4.5. Obtención de cortes de cerebros.

Los animales fueron anestesiados profundamente con 500 ul de Ketamina (Holliday, 50 mg/ml, aproximadamente 100 mg/kg de peso, intraperitoneal). Se los perfundió por la aorta ascendente con salina mas heparina (5 U/ml) a temp. amb. hasta que la sangre fluyera bien clara, y posteriormente con PFA, 4%, 4 °C (100 ml por ratón, 250 ml por rata). Los cerebros fueron colectados y post-fijados por 3-4 hrs, 4 °C, y crioprotejidos por inmersión en sacarosa 20%, 4 °C, hasta que cayeran. Finalmente fueron lavados, y congelados en isopentano enfriado con etanol en hielo seco. Se los almacenó a -20 °C. Luego se obtuvieron cortes con criostato (Leyca): 12 um de ancho para el caso de ser directamente pegados sobre vidrios gelatinizados (se los almacenó a -20 °C), o de 25-30 um para el caso en que fueran destinados para tinciones en flotación (cortes "free floating", almacenados también a -20 °C en solución de criopreservación).

4.6. Inmunohistoquímicas e inmunofluorecencias de cortes de cerebro.

Al momento de ser usados los cortes fueron rehidratados y/o lavados en PB, y bloqueados durante 1 hr. Luego fueron incubados 16 hrs, temp. amb. o entre 24 y 48 hrs, 4 °C en el anticuerpo primario diluido en la misma solución de bloqueo, pero con 1% de suero normal. Los cortes fueron lavados por 3 veces en PB, e incubados en el segundo anticuerpo a temp. amb., 1,30 hrs (el mismo

podía estar biotinilado –IHQ o IF- o marcado con algún fluorocromo –IF-). Aquí el procedimiento podía seguir según lo siguiente:

.- IHQ: los cortes fueron nuevamente lavados, y se los incubó en una dilución 1/100 de avidina-biotina con peroxidasa (Reactivo ABC, Vector), 45'. Finalmente los cortes fueron extensamente lavados e inmersos en solución de revelado. La reacción fue detenida lavando los cortes con PB, 30', y luego se los ubicó sobre vidrios gelatinizados. Se los dejó secar durante la noche, se los deshidrató en etanol en concentraciones ascendentes hasta llegar a 100%, se los clarificó en xilol, y se los montó en DPX.

.- IF: si el anticuerpo secundario estaba marcado con un fluoróforo, los cortes fueron ubicados sobre vidrios gelatinizados, se los dejó secar levemente hasta pegarse, y se los montó en MOWIOL. Si el secundario estaba biotinilado, los cortes se lavaron y se los incubó con streptavidina marcada con el fluoróforo de interés diluida 1/200 a 1/1000 en PB, para finalmente lavar los cortes y montarlos en MOWIOL como ya se mencionó.

4.7. Tinción con X-gal.

Células: se lavó la monocapa celular con PBS, se agregó un volumen adecuado de PFA 4% para cubrirla y se la dejó 10', 4 °C. Se aspiró el PFA, se lavó con PBS y se aspiró nuevamente. Se agregó el volumen de solución de tinción necesario para cubrir las células según cada caso. Se incubó desde 2 hrs hasta toda la noche a 37 °C. Se analizó a la lupa y se lavó con PBS si fue necesario. Se las montó en PBS-50% glicerol y se las analizó al microscopio.

Cortes: los mismos fueron lavados en PB e inmersos en solución de tinción. Se los incubó con agitación a 4 °C durante la noche. Nuevamente fueron extensamente lavados en PB, y montados sobre vidrios gelatinizados (en algunos casos se los destinó a IHQ con TH). Luego de secarse durante la noche, se los deshidrató en etanol, clarificó en xilol, y se los montó en DPX.

4.8. Inyecciones estereotáxicas en el cerebro de animales.

Se utilizó un aparato estereotáxico (Stoelting). Al mismo se aseguró un capilar de vidrio (Drummond Scientific Company) cuyo diámetro externo en la punta fue de aproximadamente 50 μ m. Las coordenadas utilizadas fueron obtenidas del atlas de cerebro de ratón (Franklin & Paxinos 1997).

Para las inyecciones intracerebrales de adenovectores, los mismos fueron diluidos a la cantidad requerida de pfu/ul en solución de Hanks-10% glicerol, y mantenidos en hielo y en oscuridad hasta ser inyectados. El volumen de inyección fue de 2 ul, a 0,5 ul/min.

Las inyecciones de 6-OHDA se realizaron con el mismo tipo de capilar en el caso de los ratones.

Coordenadas para la s.n. de ratón: AP -3,4; ML -1,2; DV -4 desde la duramadre.

Coordenadas para el estriado de ratón: AP +0,5; ML +/-2; DV -3, desde la duramadre.

4.9. Purificación de ADN genómico de tejido de ratón.

Un pequeño fragmento de cola de cada ratón o un fragmento de la substantia nigra fue colocado en 0,75 ml de tampón STE con 50 ul de proteinasa K (10 mg/ml en agua), y fueron incubados con agitación toda la noche a 55 °C. Luego se le agregaron 0,75 ml de fenol básico, se mezcló suavemente y se centrifugó 10', 5000 r.p.m.. Se recuperaron 500 ul del sobrenadante y se agregaron 500 ul de fenol básico-cloroformo-alcohol isoamilico (25:24:1), se mezcló y se centrifugó. La fase acuosa se colectó nuevamente (400 ul), se le agregó 35 ul de acetato de sodio 3 M pH 7 y 0,8 ml 100% etanol a -20 °C, y se observó el precipitado del ADN en forma de una "nube". Esto fue colectado con la punta de un tip, y lavado en un nuevo tubo en 70% etanol. Se lo centrifugó 2', 10000 r.p.m., se aspiró el sobrenadante, se dejó secar levemente el pellet, y se lo resuspendió en 100 ul de agua.

4.10. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

En este trabajo se utilizó esta técnica para varios experimentos. Para simplificar, se presenta una tabla (Tabla 1) que resume las condiciones de todas las PCRs de esta tesis. Luego se amplía en cada punto en particular según sea necesario.

4.10.1. PCR para detectar la recombinación del cassette PGK-neo, *in vitro* e *in vivo*.

Para poder identificar la recombinación y escisión por la recombinasa CRE del cassette PGK-neo rodeado por sitios LoxP, se diseñó una PCR con iniciadores que reconocen secuencias a los lados del mismo. Con las condiciones de PCR dadas, no se pueden amplificar las 2970 pares de bases (pb)

que comprenden la secuencia de PGK-neo (2000 pb) + las secuencias del TNF y eng a sus lados (970 pb). Sin embargo, si PGK-neo es escindido, sí se deben amplificar las casi 1000 pb restantes entre los iniciadores. Se inyectaron animales en la s.n. con el AdCRE o un adeno control, y se obtuvieron muestras de ADN genómico a los 7 y 20 días, así como también de animales transgénicos y no transgénicos sin inyectar. Sobre estas muestras se realizaron PCRs para detectar la recombinación mediada por CRE.

.- Tabla 1. Resumen de las distintas PCRs realizadas en este trabajo.

	Recombinación del cassette NEO.	Identificación de ratones transgénicos.	PCR para GAPDH	Detección del TNF transgenico.
Muestra	2 ul (ADN genómico)	2 ul (ADN genómico)	1 ul (RNA o ADN copia)	2 ul (ADN copia)
Tampón 10x	5 ul	5 ul	5 ul	5 ul
CIMg (50 mM)	2 ul	2 ul	2 ul	2 ul
dNTPs (10 mM c/u)	1 ul	1 ul	1 ul	1 ul
Iniciador 1 (100 uM)	eng 3'B, 0.25 ul	en1 5'UTR, 0.25 ul	GAPDH-3', 0.25 ul	eng 5'B, 0.25 ul
Iniciador 2 (100 uM)	TNFs, 0.25 ul	TNFas, 0.25 ul	GAPDH-5', 0.25 ul	TNFas, 0.25 ul
Taq (Gibco)	0.5 ul	0.5 ul	0.5 ul	0.5 ul
agua csp.	50 ul.	50 ul	50 ul.	agua csp. 50 ul
Condiciones de PCR	<u>94 °C, 4'</u> 94 °C, 45 seg 55 °C, 20 seg <u>72 °C, 1'30 seg</u> 38 ciclos 72 °C, 3'.	<u>94 °C, 2'</u> 94 °C, 45 seg 55 °C, 20 seg <u>72 °C, 1'30 seg</u> 35 ciclos 72 °C, 3'.	<u>94 °C, 2'</u> 94 °C, 30 seg 60 °C, 20 seg <u>72 °C, 1'</u> 35 ciclos 72 °C, 3'.	<u>94 °C, 2'</u> 94 °C, 30 seg 55 °C, 20 seg <u>72 °C, 1'</u> 42 ciclos 72 °C, 3'.

.- 10 ul de cada PCR se corrieron en un gel de agarosa 1% en presencia de bromuro de etidio y se visualizaron las bandas bajo luz UV. Se obtuvieron fotografías digitales de las mismas.

4.10.2. PCR para la identificación de transgénicos.

La pérdida de ambos alelos eng (eng -/-) es letal para los animales. Se identificaron los animales heterocigotas (eng/tnf) de los homocigotas (eng/eng) realizando PCRs con ADN obtenido de las colas

de los animales. Se diseñaron iniciadores de tal manera que pudiera detectarse la construcción del TNF transgénico insertado en el locus eng. Uno es específico de la secuencia del TNF, y el otro corresponde a una secuencia de la región 5' no traducida (5' UTR, "untranslated region") del gen engrailed. En los animales transgénicos se espera una banda de 434 pb.

4.10.3. PCR para detectar el la expresión del ARNm correspondiente al TNF transgénico.

Luego de obtener el ARNm de la s.n. y regiones control del cerebro de ratones y generar los ADNc (ver debajo), se amplificó el del TNFtg utilizando iniciadores diseñados de tal manera que pudiera detectarse el TNF transgénico. Así, en forma similar a los mencionados anteriormente, uno era específico de la secuencia del TNF, y el otro correspondía a una secuencia en la región 5' del gen engrailed (Tabla 1).

4.11. Obtención de ARN.

Los animales fueron rápidamente sacrificados por dislocación cervical. Muestras de cerebro fueron obtenidas y rápidamente congeladas en N₂ líquido. Se las homogeneizó en 1 ml de TRIzol Reagent (Gibco) con un homogeneizador (Polytron, Scientific Instrumenties, Inc.) a máxima velocidad en hielo por 10-15 seg. Se incubaron las muestras a temp. amb., 5', y se agregaron 0,5 ml de cloroformo. Se mezclaron a mano por 15 seg y se las dejó en hielo 15'. Luego se las centrifugó por 10', 14000 r.p.m., 4 °C. La fase acuosa se pasó a un tubo nuevo y se precipitó el ARN con 0,5 ml de isopropanol, incubando 45', -20 °C. Se centrifugó nuevamente por 10', 4 °C, el sedimento se lavó con 70% de etanol, y luego de una nueva centrifugación se descartó el sobrenadante y se dejó secar el sedimento final. Se agregaron 20 ul de agua libre de RNAsa tratada con DEPC, y se calentó la muestra a 65 °C, 5'. Se cuantificó por DO 260/280, y se congeló a -70 °C.

4.12. Tratamiento del RNA con DNAsa.

A cada preparación de RNA se lo trato según lo siguiente:

25 ug RNA

5 ul tampón 10x de DNAsa

5 ul DNAsa I (1 U/ul).

Se incubaron durante 30', 37 °C, y se la inactivó calentando las muestras a 70 °C, 5'. Luego se llevaron a 300 ul con agua, se realizó una extracción con fenol-cloroformo, y se lo precipitó con etanol. Luego de lavar el pellet, se lo resuspendió en 20 ul de agua DEPC. Para controlar que en las muestras no había DNA contaminante se realizó una PCR para amplificar un gen control como el de la GAPDH en todas ellas (Tabla 1).

4.13. Transcripción reversa (síntesis de la cadena de ADN copia).

Se utilizó la enzima SuperScriptTMII (Gibco), siguiendo los pasos indicados por el fabricante. Brevemente, a 5 ug de ARN libre de ADN se le agregaron 1 ul de Oligo(dT) y agua hasta 12 ul. Esto fue calentado por 10', 70 °C, y puesto en hielo por 5'. Luego de una breve centrifugación se agregaron 4 ul de tampón de simple cadena 5x, 2 ul de DTT 0,1 M y 1 ul de una mezcla de dNTPs, cada uno 10 mM. Luego de mezclar e incubar 2', 42 °C, se agregó 1 ul de la enzima, mezclando con pipeta. Luego de 50', 42 °C, se inactivó la enzima calentando 15', 70 °C. Esto se guardó a -20 °C hasta su uso en la PCR mencionada arriba.

4.14. ELISA (“Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay”) para detectar TNF de ratón.

4.14.1. Obtención de las proteínas.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y la s.n. fue rápidamente colectada y arrojada a nitrógeno líquido. Luego fueron sonicadas en solución de lisis para ELISA durante 15 segundos. Luego de 20' en hielo con agitación ocasional fueron centrifugados 10', 4 °C, 14000 r.p.m.. El sobrenadante fue alicuotado y guardado a -70 °C.

4.14.2. ELISA.

Placas de 96 pocillos de alto pegado fueron cubiertas con 50 ul de 10 ug/ml del anticuerpo de captura anti-TNF (PharMingen) diluido en solución de pegado (0,1 M Na₂HPO₄, pH 6) por 16 hrs, 4 °C. Se lavó la placa con PBS-T por 4 veces. El bloqueo se realizó con 200 ul de 1% BSA, en PBS, 30', temp. amb.. Nuevamente se lavó por 4 veces con PBS. Se preparó y se colocó lo siguiente en las placas:

.- Curva standard. Se prepararon diluciones de una solución madre de TNF recombinante (SIGMA), en solución de bloqueo-Tween®20 con las siguientes concentraciones: 1.- 2000 pg/ml; 2.- 1000 pg/ml; 3.- 500 pg/ml; 4.- 250 pg/ml; 5.- 125 pg/ml; 6.- 62.5 pg/ml; 7.- 31.25 pg/ml. Se agregaron en duplicado 100 ul por well, dejando una serie solo con solución de bloqueo como blanco.

.- Muestras. Se agregaron a cada well 100 ul de muestra en triplicado.

Se dejaron incubando durante la noche a 4 °C, y se lavó 5 veces con PBS-T. El anticuerpo de detección utilizado fue un anti-TNF de ratón biotilado (PharMingen, clon MP6-XT3 cat # 18122D, 500 ug/ml) en una concentración de 1 ug/ml en solución de bloqueo-Tween, 100 ul/pocillo, temp. amb., 1 hr. Se lavó la placa 10 veces con PBS y se agregaron 100 ul de avidina-HRP (Dako) 1/3000 en PBS dejando incubar a temp. amb., 30'. Nuevamente se lavó 10 veces con PBS. Se agregaron 100 ul de sustrato de visualización (TMB, PharMingen, preparado diluyendo partes iguales de reactivo A y B). Se dejó desarrollar el color en la curva standard hasta cuando fuera necesario y se frenó la reacción con 50 ul de H2SO4 2M. Se determinó la absorvancia a 450 nm.

4.15. Tinción con Violeta de Cresilo o tinción de Nissl.

Cortes de cerebro pegados a portaobjetos gelatinizados fueron inmersos en una solución de Violeta de Cresilo, durante 2-3 minutos, diferenciados en alcohol 70%, deshidratados en alcoholes crecientes, clarificados en xilol, y montados en DPX.

4.16. Análisis de la rotación inducida por Apomorfina.

La apormofina es un análogo de la dopamina. Para este análisis se inyectaron en forma subcutánea 0,25 mg de apomorfina (Sigma)/kg de animal diluída en salina estéril. Luego de 5' los animales fueron colocados en recipientes redondos de 15 cm de diámetro aproximadamente (para el caso de los ratones). Durante 20' se contaron el número de vueltas ipsi y contralaterales al sitio de inyección en el cerebro.

4.17. Análisis del número de neuronas TH+ en la s.n..

Las IHQ fueron realizadas con cortes en solución ("free floating"), como ya se describió. Se contaron solamente las neuronas TH+ que presentaran un núcleo claro no marcado rodeado de un

citoplasma claramente positivo para la inmunohistoquímica, y que presentaran al menos una prolongación gruesa saliendo del soma celular. El análisis se realizó bajo un aumento de 200x, en forma manual. Se tuvieron en cuenta los siguientes detalles para analizar la s.n. del ratón:

.- se realizaron cortes de 30 μm a lo largo de toda la s.n., realizando 6 series, de tal forma que cada corte estuviera separado aproximadamente por 200 μm del siguiente;

.- se analizaron entre 6-7 cortes por s.n., desde $-3,8$ hasta $-2,8$ aproximadamente (Franklin & Paxinos 1997)

.- finalmente, sólo se tuvieron en cuenta las TH+ de la snpc, no del área tegmental ventral (VTA, “ventral tegmental area”), ni de la snpr, utilizándose un mismo criterio para todos los cortes con morfología similar. Esto último se refiere a que la s.n. del ratón es muy heterogénea en el eje anteroposterior. Para establecer un criterio homogéneo, se analizaron cortes de la s.n. de 5 animales teñidos con TH, y se determinaron todas las posibles imágenes que podían ser observadas de dicha región del cerebro (Figura 2). Así, como se mencionó anteriormente, se utilizó un mismo criterio para contar las neuronas de una determinada coordenada antero-posterior asignada según el atlas del cerebro del ratón (Franklin & Paxinos 1997).

4.18. Análisis de la densidad óptica para TH en el estriado.

Los cortes se obtuvieron a distintas alturas del cerebro, de tal forma de obtener en forma aproximada uno del *globus pallidus*, y dos del *striatum* en las coordenadas 0 y +1 (Franklin & Paxinos 1997). Las IHQs para TH se realizaron según ya fue descrito. Se obtuvieron imágenes digitales de los hemisferios ipsi y contralaterales de cada corte a analizar, se cuantificó la DO promedio en el área seleccionada (todo el estriado o el *globus pallidus*), se le restó la tinción inespecífica de fondo, y se expresó el porcentaje del lado ipsilateral a el tratamiento comparado con el contralateral sin inyectar.

4.19. Generación de un ratón knock-in para la expresión de TNF de ratón bajo la regulación del promotor engrailed.

Aquí se presentan los pasos generales de la construcción de este ratón. Para ver los pasos completos referirse a “Schoneberg, A. Zelltypspezifische und induzierbare Expression des Zytokins Tumor-Nekrose-Faktor in der *Substantia nigra* und der Hypophyse transgener Mause. Tesis doctoral”.

Brevemente, a la Dra. Schoneberg le fueron cedidas dos construcciones por el Dr. Wolfgang Wurst:

.- una en el plásmido pBSKS, llamada pKSloxPNT + 3,8 KbEN-1 3'. El mismo poseía, en este orden, de 5' a 3': el gen de la Timidina Kinasa del Herpes simplex Virus bajo el promotor de la Fosfogliceratokinasa (PGK, “Phosphogliceratokinase”), un cassette de resistencia a neomicina, también bajo la regulación de su propio promotor de la PGK (Neo y su promotor estaban flanqueados por sitios Lox-P), y finalmente 3,8 Kpb con homología a la región 3' del primer exón, un intrón y la región 5' del segundo exón del gen En-1 de ratón;

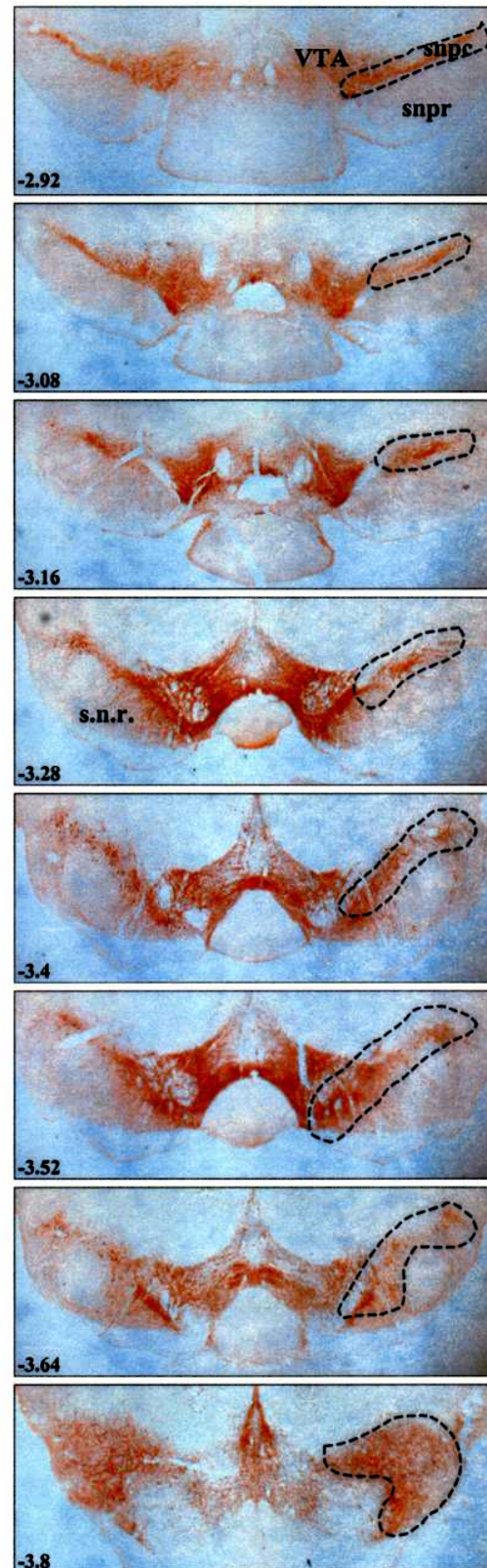
.- la segunda se denominaba pPRO-En1/5, y contenía una parte de la región promotora del gen engrailed. En la parte 3' de esta región se clonó el ADN copia codificante para el TNF de ratón. Juntos conformaron un fragmento de 5,2 Kpb, que fue liberado cortando con la enzima PvuI.

Finalmente esta segunda construcción fue clonada en el sitio de restricción SgfI, presente entre los genes TK y Neo del plásmido pBSKS. De esta manera, los genes codificantes para TNF y Neo (este último floxeado), quedaron flanqueados por regiones de homología con engrailed.

Con esta construcción transformó células troncales (“stem”) embrionales de la línea R1, las seleccionó positivamente con el análogo de la neomicina, G418 (sobreviven aquellas que expresan el transgen Neo), y negativamente con ganciclovir (mata aquellas células en las que la recombinación no fue homóloga, donde también se insertó el gen de la TK, y procesan el ganciclovir a su forma tóxica).

Estas células fueron inyectadas en blastocistos de ratones CD-1, y los mismos depositados en el útero de madres receptoras. Se obtuvieron quimeras, y de ellas se estableció la línea En-1/TNF-KI, en la cual el TNF quedó bajo la regulación del promotor engrailed, y 3' al mismo quedó la construcción PGK-neo floxeada.

Figura 2. Criterio establecido para contar las neuronas TH+ de la *substantia nigra pars compacta* (snpc) de ratón. Las fotos representan las distintas imágenes que se pueden obtener al realizar cortes seriados de la s.n. entera de un ratón, y teñirlos para la enzima tirosín-hidroxilasa (TH). Se estimó para cada corte la coordenada antero-posterior desde bregma (indicada en la parte inferior izquierda de cada foto; según Franklin y Paxinos). En el presente trabajo se contaron las neuronas que presentaban clara reactividad para TH, con al menos una prolongación gruesa saliendo del soma celular, dentro de aproximadamente el área marcada por las líneas de puntos en cada foto (correspondientes a la snpc). Se intentó en todos los casos no incluir las células del área tegmental ventral (VTA) ni de la *substantia nigra pars reticulata* (snpr).



Estrategia Experimental.

5. Estrategia experimental utilizada en el presente trabajo para lograr la expresión del TNF en la s.n. del ratón.

Se ha generado una línea de ratones knock-in en la cual la expresión del transgén de interés (en este caso la citoquina TNF) se espera esté dirigida en forma constitutiva a la s.n. por el promotor engrailed durante su vida adulta (Figura 3a). Esta estrategia permitiría, entonces, estudiar el efecto de la expresión crónica basal del TNF sobre las neuronas dopaminérgicas.

Sin embargo, como ya se describió extensamente en párrafos previos, la citoquina TNF puede tener más de un efecto sobre las neuronas según las circunstancias. De acuerdo con el objetivo del presente trabajo, se ha planteado cuál sería el efecto de diferentes niveles de expresión crónicos de la misma sobre las neuronas dopaminérgicas del ratón.

Sobre la base de la evidencia previa existente en la literatura mostrando que un cassette PGK-neo podría afectar la expresión del transgén de interés, la mayoría de las veces disminuyéndola (ver en la introducción “Expresión condicional de genes en tiempo y lugar”), dicho cassette fue floxeado, y fue agregado a la construcción con la cual se generó el ratón knock-in (Figura 3a). Se pensó que el mismo podría ser escindido por la expresión de Cre en las neuronas de la snpc durante la vida adulta del animal (Figura 3c). Para expresar dicha proteína en las células mencionadas, se planteó utilizar la inyección estereotáxica de un adenovector codificante para Cre específicamente en la s.n. del ratón (Figura 3b). En caso de producirse el efecto previamente mencionado mediado por el cassette PGK-neo, la expresión del transgén aumentaría luego de la escisión del mismo (Figura 3c).

De ser así, debería ser posible analizar *in vivo* el efecto de dos niveles de expresión crónicos diferentes de TNF en la s.n. del ratón.

Asimismo, representaría la base para el desarrollo de otras estrategias para lograr la expresión condicional en la s.n. de cualquier otro transgén de interés para la PD.

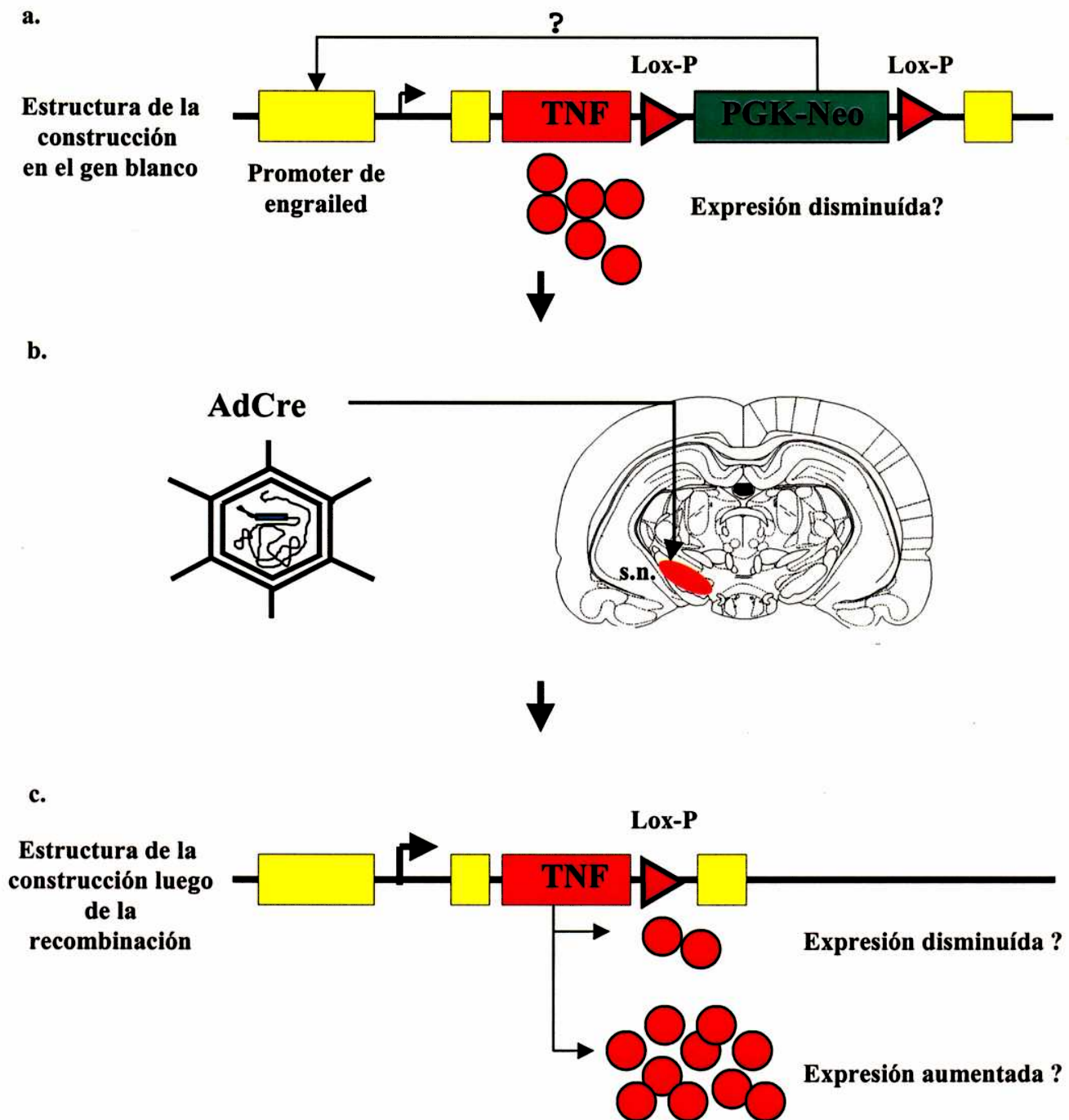


Figura 3. Esquema de la estrategia utilizada en el presente trabajo para lograr diferentes niveles de expresión del TNF en la sustancia nigra (s.n.) de ratones. a) El transgén TNF fue insertado en el locus del gen engrailed del genoma del ratón. Se espera que el cassette floxeado (rodeado por sitios Lox-P) fosfogliceratocinasa-neomicina (PGK-neo) altere la expresión del TNF regulada por el promotor de engrailed (simbolizado como "?"). b) Inyección del adenovector codificante para Cre (AdCre) en la s.n. del cerebro del ratón. c) Estructura del locus luego de la recombinación y escisión del cassette PGK-neo mediada por Cre. Se espera que esto elimine el efecto de PGK-neo sobre el promotor engrailed, y se modifique la expresión del TNF (círculos rojos).

Resultados.

6. Resultados.

6.1. Expresión constitutiva del TNF transgénico en la s.n. de los ratones knock-in dirigida por el promotor engrailed.

La línea de ratones knock-in fue generada por la Dra. Annette Schoneberg y gentilmente cedida por el Dr. Ulrich Eisel, del “Institut für Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart”, Alemania, en el marco de un trabajo en colaboración con nuestro laboratorio. La participación del grupo alemán se basó exclusivamente en proveer este animal. Todos los experimentos que se detallan a continuación fueron efectuados por el Lic. Di Paolo.

En dichos ratones se espera que el promotor engrailed dirija la expresión de la citoquina TNF constitutivamente a la s.n. durante la vida adulta de los animales. Para caracterizar dicha expresión de TNF transgénico, se diseñó una PCR con un primer específico del gen del TNF, y el otro correspondiente a una secuencia del 5' UTR de engrailed (que se transcribe junto con el TNFtg), de forma de amplificar un fragmento de ~570 pb (Figura 4a). Posteriormente, se obtuvo ARN de la s.n. (y de una región control, como el hipocampo) de ratones adultos, se generó el ADNc, y se amplificó el correspondiente al TNFtg por PCR, utilizando los dos primers mencionados.

Sólo se detectó TNFtg en forma constitutiva en la s.n. de animales knock-in sin inyectar (Figura 4b, gel superior, calle “s.n.”), pero no en la región control (el hipocampo, calle “hip.”), lo cual demuestra la especificidad del promotor engrailed.

Este resultado indica que disponemos de un ratón knock-in que expresa en forma constitutiva una citoquina como el TNF en la s.n. durante la vida adulta de los animales.

6.2. Construcción de un adenovector codificante para la proteína Cre.

Se construyó un nuevo adenovector codificante para la proteína Cre según lo indicado en Métodos. A continuación se presentan los resultados relevantes en la caracterización del stock del mismo.

1) Como es factible que al generarse los adenovectores se produzcan eventos de recombinación aberrantes, es necesario seleccionar un clon de adenovirus en la cual el transgén se encuentre correctamente ubicado en el genoma viral.

Con ese objetivo se obtuvieron varias colonias de adenovectores por purificación bajo agar, y a todas ellas se les realizó un control del evento de recombinación con enzimas de restricción y una confirmación posterior del resultado por Southern blot. Se muestran aquí los resultados obtenidos con algunas colonias como ejemplo (Figura 5).

Se utilizaron enzimas de restricción cuyo patrón de corte para el adenovector sin inserto y el plásmido pADPSY es conocido (HindIII y BglII). Asimismo, se conoce el patrón de restricción y la longitud del transgén de interés, en este caso Cre, y de un adenovector control, como es el AdBgal. Así, se obtuvo el ADN viral de las distintas colonias por el método de Hirt, se lo digirió con las enzimas de restricción HindIII y BglII, y se separaron los fragmentos en un gel de agarosa. Observamos el desplazamiento de una banda de 3,3 Kpb en el AdBgal a aproximadamente 4 Kpb en el AdCre al utilizar la enzima HindIII (Figura 5a, foto izquierda), así como el desplazamiento esperado de la banda de 10 Kpb en el AdBgal a 8 Kpb en el AdCre al digerir con la enzima BglII (Figura 5a, foto derecha).

Estos resultados fueron confirmados por estudios con Southern blots. La banda esperada para la digestión con HindIII fue inequívocamente reconocida por una sonda contra Cre, en donde no se observaron bandas inespecíficas, así como no se observaron con el adenovector control (Figura 5b, foto izquierda). Para el caso de la digestión con la enzima BglII, se observaron 2 o 3 bandas positivas (Figura 5b, foto derecha). Las bandas más abundantes corresponden al fragmento de interés, y se infiere que las superiores corresponden a ADN incompletamente digerido. La banda inferior en las últimas dos colonias del AdCre podrían representar algún error en la recombinación, y son un ejemplo de colonias que son descartadas para pasos siguientes.

2) Lo mencionado previamente permitió seleccionar una de las colonias, la cual fue utilizada en los siguientes pasos hasta obtener un stock de adenovectores siguiendo los pasos ya descritos en Métodos. La cuantificación inicial por DO determinó que dicho stock poseía 2×10^{13} partículas virales totales/ml. La cuantificación de las partículas infectivas se determinó en ensayo de placa bajo agar, donde se obtuvo un valor de 1×10^{13} ufp/ml.

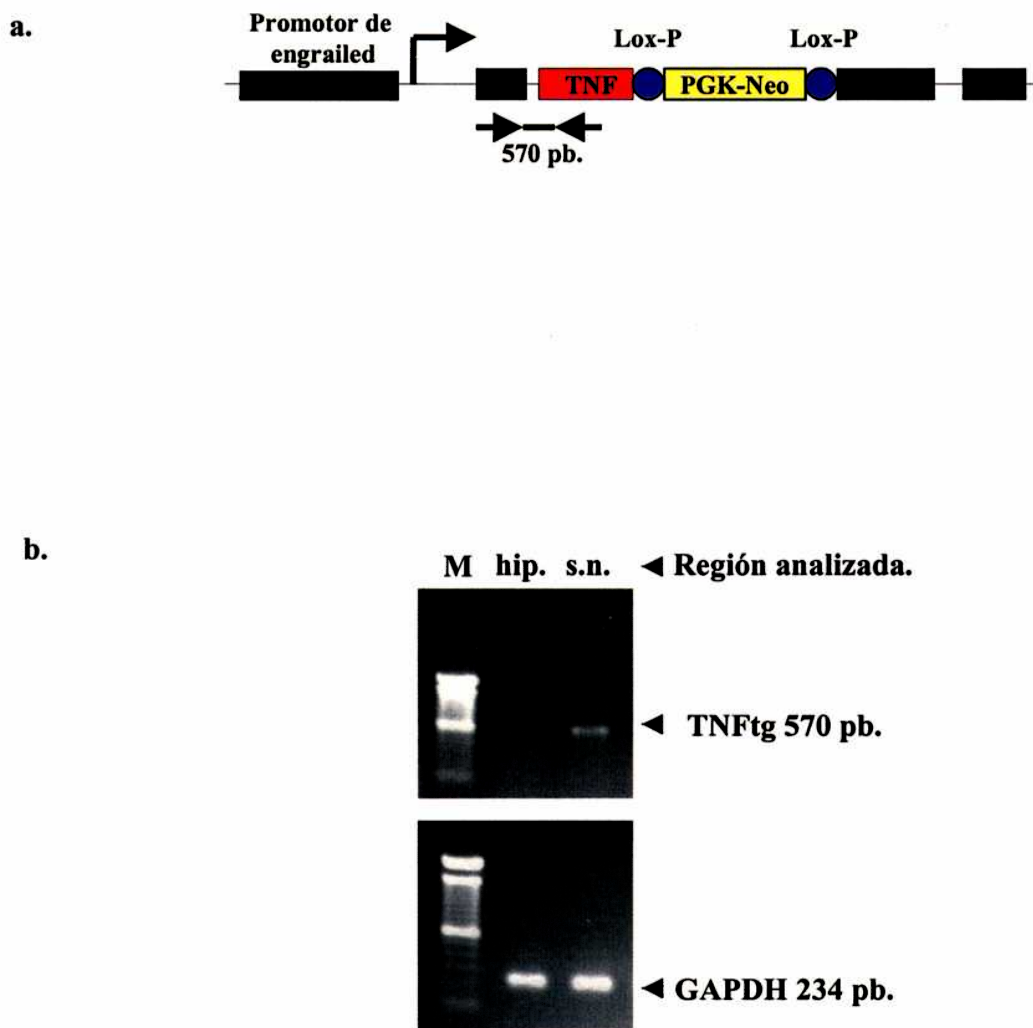


Figura 4. Expresión del TNF transgénico (TNFtg) en la *substantia nigra* (s.n.) de animales knock-in dirigida por el promotor engrailed. a.- Esquema del gen engrailed (cuadrados negros) y la construcción insertada. Flechas: primers utilizados para detectar el ADNc del TNFtg. PGK-neo: promotor de la fosfogliceratokinasa junto al gen de resistencia a neomicina. Lox-P: sitios reconocidos por Cre. b.- Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en el cual se separaron los productos amplificados por PCR utilizando como molde el ADNc obtenido del hipocampo (hip.) y la s.n. de ratones knock-in (gel superior). Como control de que todas las muestras tenían ADNc se amplificó el gen constitutivo de la D-gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH)(gel inferior).

3) Se realizaron controles para verificar la ausencia de partículas autoreplicativas en el stock. Los adenovectores son deficientes en su replicación por no poseer el gen E1, el cual es complementado en trans por las células 293. Al analizar por PCR la presencia del gen E1 en el stock, no se encontraron partículas que hubieran recuperado dicho gen por recombinación con el genoma de las células mencionadas (Figura 5c, calle 3 a 5). Como control positivo de la PCR se incluye un adenovector que posee el gen E1 (calle 2). La ausencia de un factor inhibitorio de la reacción que provoque un falso negativo se controló con el vector que posee E1 más una alícuota de ADN del stock (calle 6).

Evidencia complementaria de la ausencia de partículas replicativas se obtuvo de experimentos de transducción de células HeLa que no transcomplementan E1. No se observó efecto citopático al utilizar diferentes alícuotas al azar del stock, mientras que sí fue observado en las células controles HEK293 transducidas con las mismas alícuotas (dato no mostrado).

Esos dos resultados demostraron que el stock del AdCre no tenía partículas autoreplicativas.

4) Con el objetivo de caracterizar la calidad de los stocks de adenovectores, en nuestro laboratorio se utiliza de rutina un ensayo para detectar endotoxina en los mismos. Se determinó que el stock no poseía la cantidad mínima detectable por el kit utilizado (1 ng/ml).

5) Para verificar que los adenovectores expresaran la proteína de interés, se transdujeron células 293, se obtuvieron proteínas totales y se las procesó para Western Blot. La proteína Cre se detectó como una banda del peso molecular esperado (32 Kda), mientras que no se la observó en células controles (“mock”)(Figura 5d). La localización nuclear de Cre se verificó por inmunofluorescencia, primero en células HeLa transducidas en cultivo (dato no mostrado), y más importante aún, en neuronas de la substantia nigra compacta *in vivo* (Figura 7b).

En resumen, todos estos resultados permitieron concluir que disponemos de un stock adenoviral que expresa la proteína Cre dirigida al núcleo celular, libre de endotoxina y partículas autoreplicativas, adecuado para estudios tanto *in vitro* como *in vivo*.

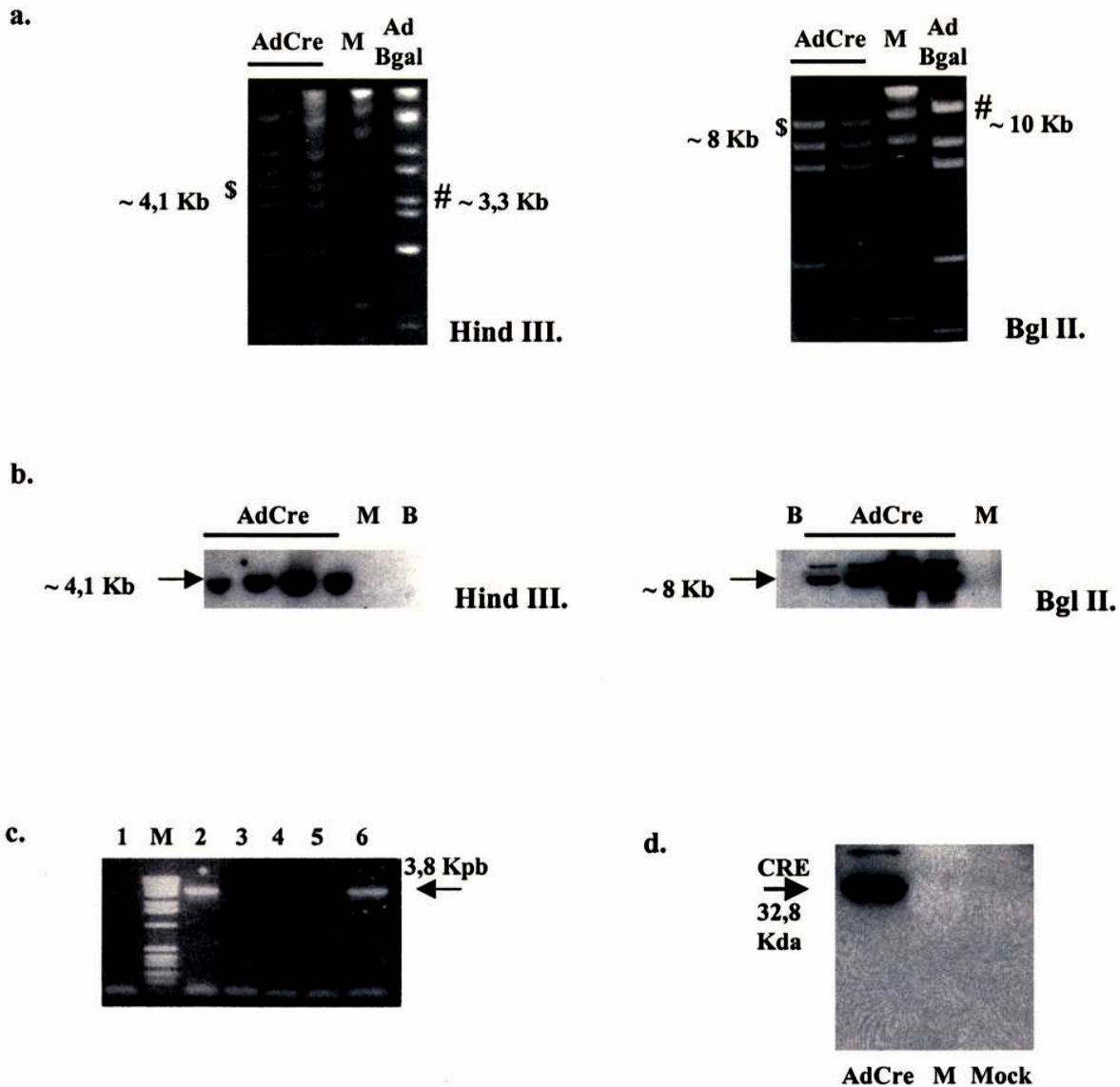


Fig. 5. Controles realizados al adenovector Cre a lo largo de su construcción. a.- Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, en el cual se observa el ADN del AdCre (y del AdBgal como control), los cuales se extrajeron por el método de HIRT de células transducidas con dichos vectores. El ADN fue previamente digerido con las enzimas de restricción BglII o HindIII. \$: banda con el inserto de Cre; #: banda con el inserto de Bgal. M: marcador de peso molecular (λ HindIII, Gibco). b.- Southern blots de ADN obtenido de cuatro clones del AdCre, digerido como en "a", e hibridizados con una sonda específica para Cre marcada no-radioactivamente. Las flechas indican la presencia de las bandas del PM esperado. B: AdBgal utilizado como control. c.- Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en el cual se separaron los productos de la PCR utilizada para detectar el gen adenoviral E1 (flecha). 1. Control negativo. 2. Control positivo: ADN de un adenovirus silvestre que posee E1 (Ad2). 3. Stock sin diluir. 4. Stock diluido 1/100. 5. Stock diluido 1/1000. 6. Ad2 + stock sin diluir. M. Marcador de peso molecular de ADN (1Kb, Gibco). d.- Western blot de proteínas totales de células HeLa transducidas con el AdCre, en el cual se detecta la proteína Cre como una banda del peso molecular esperado de 32,8 Kda. M: marcador de peso molecular de proteínas (LMW, Amersham). Mock: células sin transducir.

6.3. Obtención de un stock de adenovectores codificantes para la proteína β -galactosidasa (Ad β gal).

Para la presente tesis se generó un stock del Ad β gal siguiendo los mismos pasos ya descritos para el AdCre. La cuantificación por OD arrojó un total de 3×10^{13} partículas por ml, mientras que los ensayos bajo agar determinaron que el stock contenía 1×10^{13} ufp/ml. Se determinó la ausencia de partículas autoreplicativas y de endotoxina en el stock. La expresión de la proteína se detectó por histoquímica con Xgal tanto *in vitro* (Figura 6b) como *in vivo* (Figura 7a).

6.4. El AdCre provoca la recombinación *in vitro* del cassette PGK-neo floxeadado.

La hipótesis que se planteó para poder obtener dos niveles de expresión diferentes de TNF en la s.n. de los ratones knock-in generados, se basaba en la eliminación mediada por la recombinasa Cre del cassette PGK-neo insertado junto con el transgén de interés en el locus engrailed.

Con el objetivo de demostrar que la proteína Cre expresada por el adenovector era funcional en provocar la recombinación y escisión del cassette PGK-neo floxeadado, se transdujeron las células embrionarias troncales utilizadas para crear los ratones knock-in con el mismo .

En la figura 6c se observa un esquema de la construcción insertada en el locus engrailed, así como el sitio de pegado de dos primers diseñados para amplificar por PCR un fragmento de 2,8 Kpb con el cassette PGK-neo incluido (esquema superior). Si el cassette PGK-neo es removido, el ensayo por PCR debería amplificar una banda de 0,8 Kb (esquema inferior).

En una primera instancia se ha utilizado el Ad β gal, y ha sido demostrado que las células progenitoras eran factibles de ser transducidas por adenovectores. Con una MOI de 500, aproximadamente el 100% de las células resultaron ser X-gal+ (Figura 6b). Se aprecian los “amontonamientos” (“clusters”) de células stem de menor tamaño, así como algunos fibroblastos de mayor tamaño, sobre las cuales se las cultiva, que fueron transducidos por igual. No se observó tinción en células sin transducir (dato no mostrado).

Seguidamente se transdujeron células stem utilizando el AdCre. Se realizó una PCR sobre el ADN obtenido de las mismas con los primers mencionados, bajo condiciones en las cuales no pueden amplificarse los 2,8 Kpb, pero sí el fragmento de 0,8 si PGK-neo fue escindido. Observamos una banda del peso molecular esperado por el evento de recombinación mediado por la recombinasa Cre

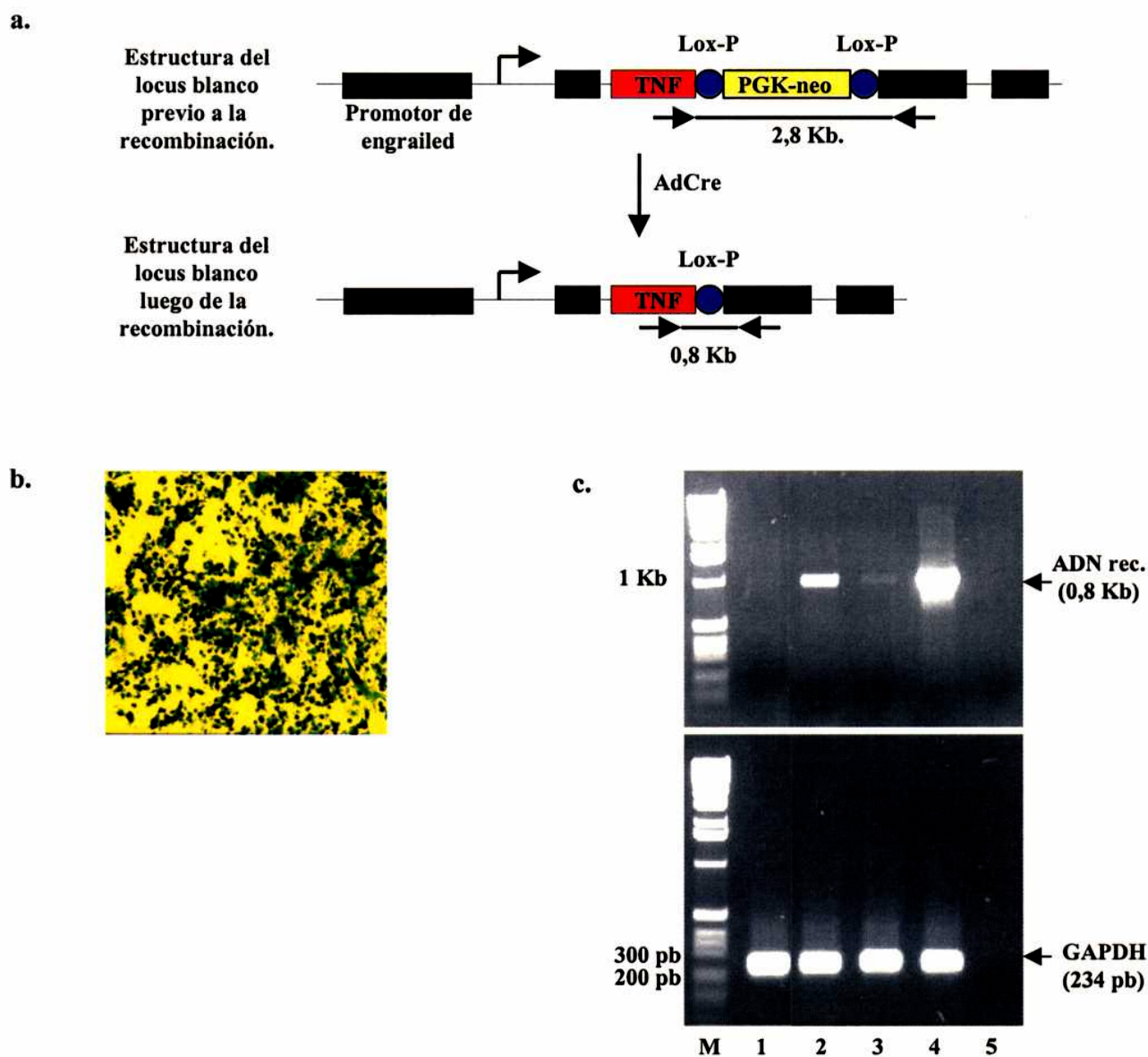


Figura 6. Recombinación *in vitro* del cassette PGK-neo (fosfoglicerotkina-neomicina). a. Esquema superior: estructura del locus del gen engrailed con la construcción de interés insertada. Cuadrados negros: gen engrailed. Flechas: primers diseñados para amplificar por PCR en esta construcción una región de 2800 pb. Esquema inferior: estructura del locus luego de la recombinación y escisión del cassette PGK-neo por el adenovector codificante para Cre (AdCre). Los primers amplificarán una banda de 0,8 Kb. Lox-P: sitios reconocidos por la recombinasa. b. Células troncales embrionarias de ratón transducidas *in vitro* con el AdBgal y teñidas a las 48 hrs. con solución de Xgal. c. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, en el cual se separaron los productos amplificados por PCR con los primers mencionados en "a", a partir de ADN genómico obtenido de células progenitoras transducidas con dos MOI diferentes del AdCre (gel superior). Se observa una banda amplificada del tamaño esperado luego de la recombinación del cassette PGK-neo floxeado mediada por el AdCre (calles 2 y 3). Como control positivo se utilizó ADN obtenido de la cola de ratones knock-in cruzados con un ratón que expresa Cre en todas sus células (ratón knock-in x Cre)(calle 4). Gel inferior: control de la presencia de ADN en todas las muestras amplificando el gen GAPDH (D-gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa). M: marcador de peso molecular (1Kb, Gibco). 1. Células no transducidas. 2-3. Células transducidas con el AdCre utilizando una MOI de 500 o 250, respectivamente. 4. Ratón knock-in x Cre. 5. PCR sin ADN.

expresada por los adenovectores (Figura 6c, gel superior, calles 2 y 3). Como control positivo se utilizó ADN de la cola de un ratón proveniente de la cruce de animales knock-in con otra línea que expresa constitutivamente Cre en todas sus células (calle 4). El control que amplifica el gen de la enzima GAPDH indica que todas las muestras contenían ADN (Figura 6c, gel inferior).

Este resultado indica que el AdCre es capaz de expresar una proteína funcionalmente activa, de tal forma de reconocer y eliminar de la construcción al cassette PGK-neo floxeado.

6.5. Los adenovectores transducen la proteína CRE eficientemente al núcleo de las neuronas dopaminérgicas de la snpc.

Para encontrar las condiciones con las cuales un alto porcentaje de las neuronas TH⁺ de la snpc fueran transducidas por los adenovectores, se inyectaron animales en la s.n. según se muestra en la tabla siguiente:

	1x10 ⁶ ufp/ul	1x10 ⁷ ufp/ul	1x10 ⁸ ufp/ul
AdBgal	n=3	n=3	n=3
AdCre	n=3	n=3	n=3

Luego de 4 días, se realizaron , las tinciones adecuadas para cada caso en cortes de la s.n. de los ratones inyectados con Xgal seguido de IHQ para TH –revelado con DAB- para el caso del AdBgal, e IF doble TH/Cre para el caso del AdCre). Seguidamente se obtuvo el porcentaje de neuronas doble positivas para TH y la expresión del transgén.

Cuando 10e6 ufp/ul fueron inyectadas, no se pudo detectar tinción alguna en ningún caso, y con 10e7 ufp/ul, sólo unas pocas células positivas pudieron detectarse con cada adenovector, principalmente en el sitio de inyección (datos no mostrados). Sin embargo, al inyectar 10e8 ufp/ul, se pudo observar que ambos adenovectores transdujeron casi en su totalidad las neuronas TH⁺ de la s.n.. Se obtuvieron imágenes de los cortes seriados de la s.n. completa de un animal representativo inyectado con el AdBgal (Figura 7a). Se aprecia como el adenovector se distribuyó a lo largo y ancho de toda la s.n. (Figura 7a, columna de la izquierda a menor aumento), transduciendo la gran mayoría de las neuronas TH⁺, donde muy pocas no expresan el transgén (Figura 7a, columna de la derecha a mayor aumento).

El mismo resultado se observó con el AdCre, para el cual se muestra una sección característica de la distribución del mismo (Figura 7b, panel superior), así como se puede apreciar a mayor aumento nuevamente que solo unas pocas neuronas TH positivas no expresan el transgén (Figura 7b, panel inferior). Asimismo, estas imágenes demuestran la localización nuclear de la proteína Cre *in vivo* en las neuronas de nuestro interés.

Se realizó un análisis cuantitativo del porcentaje de neuronas TH+ transducidas con cada adenovector sobre el número total de las mismas presentes en tres animales para cada adenovector (Figura 7c). El mismo resalta la alta eficiencia de transducción en la snpc de las neuronas mencionadas: aproximadamente el 90% de las neuronas TH+ fueron transducidas utilizando 2×10^8 ufp/ul de cualquiera de los dos adenovectores.

6.6. Caracterización detallada de la distribución de los adenovectores inyectados en la s.n.

Como ya se describió, una única inyección de adenovectores en las condiciones mencionadas en Materiales y Métodos permitió lograr la transducción de las neuronas dopaminérgicas de la s.n. casi en su totalidad, distribuyéndose el vector en sentido medio-lateral y antero-posterior a lo largo y ancho de dicha región del cerebro (Figura 8a).

Para caracterizar mejor esta observación, se analizó la transducción de células (no se determinó si son neuronas o células de la glía) por fuera de la s.n.. Se observaron muy pocas células positivas para la expresión de ambos transgenes por sobre la misma. En mayor número se distribuyen sobre el sitio de inyección (el cual, según lo esperado, pudo ser determinado aproximadamente en AP -3,4 (Franklin & Paxinos 1997)), y en mucha menor cantidad en una región de unas pocas micras a ambos lados de dicho sitio (Figura 8a)(el resultado con el AdBgal es similar para cualquier adenovector probado). También se pudo determinar la expresión de los transgenes en las neuronas del VTA. Finalmente, se detectan en forma ocasional células positivas para la expresión del transgén en el pedúnculo cerebral (cp, “cerebral peduncle”), las cuales sean posiblemente oligodendrocitos.

Se realizó un estudio cuantitativo del número de células Xgal positivas por sobre la s.n. en distintas coordenadas antero-posteriores de 3 animales (Figura 8b). En el sitio de inyección se observó un promedio de 150 células por sobre la s.n. A unas 100 micras a ambos lados de ese punto, se detectan en promedio escasamente 100 células por corte, y más lateralmente es mínimo el número de células encontradas por sobre la región del cerebro estudiada.

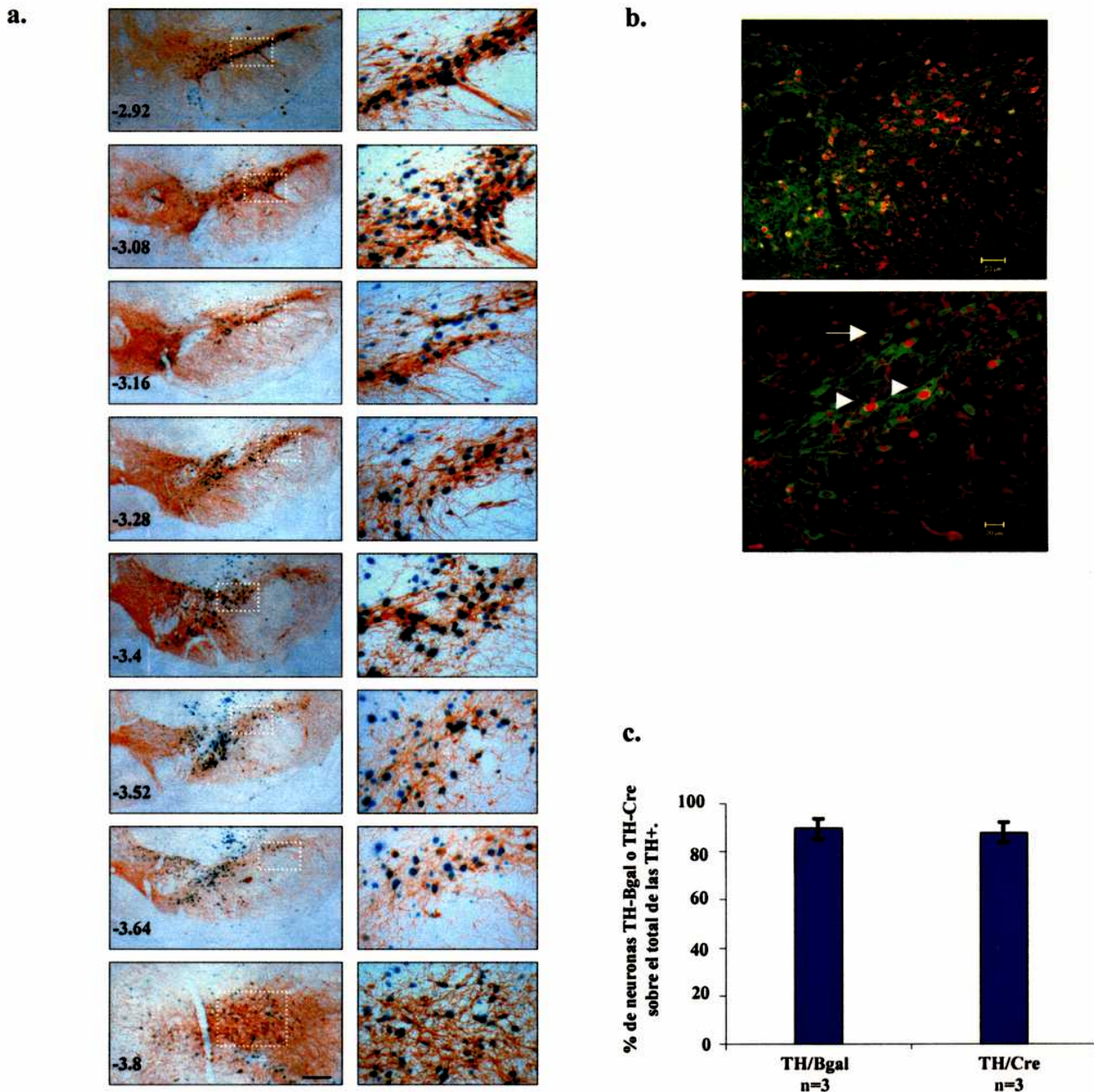


Figura 7. Estudio de la eficiencia de transducción de los adenovectores inyectados en forma estereotáxica en la *substantia nigra* (s.n.) del ratón. a. Cortes seriados de la s.n. completa de un ratón inyectado con 2 μ l de AdBgal (1×10^8 ufp/ μ l), revelados con Xgal para detectar la proteína Beta-galactosidasa (tinción azul nuclear), y luego procesados para inmunohistoquímica contra tirosín-hidroxilasa (TH, tinción marrón citoplasmática). Números en el margen inferior izquierdo: coordenadas antero-posteriores en mm desde bregma (según Franklin y Paxinos). Barras: columna izquierda, 200 micras; columna derecha, 20 micras. Las fotos de la columna de la derecha corresponden a los recuadros de puntos blancos en las fotos de la columna izquierda. b. Inmunofluorescencia doble sobre cortes de la s.n. de ratones inyectados con el AdCre para detectar las proteínas Cre (rojo, nuclear) y TH (verde, citoplasmática). Foto superior: 200x, barra = 50 micras; foto inferior, 400x, barra = 200 micras. Cabezas de flechas: neuronas positivas para TH y para Cre. Flecha: neurona no transducida. c. Gráfico en el cual se presenta el porcentaje de neuronas positivas para TH y Cre (TH/Cre) o para TH y Bgal (TH/Bgal) respecto del total de las neuronas TH+ en la *substantia nigra pars compacta* de ratones inyectados con el AdBgal o el AdCre. Se graficó el promedio \pm el ES de al menos 6 cortes de cada s.n. .

Este análisis, junto con lo descrito en el punto anterior, indican que es posible transducir con un adenovector, en forma altamente eficiente y específica, las neuronas TH⁺ de la s.n.. También demuestran que es posible analizar regiones de la s.n. que expresarán el transgén de interés, pero sin haber sido perturbadas directamente por el trauma mecánico de la inyección. Este último concepto es fundamental para los siguientes estudios.

6.7. Recombinación del cassette PGK-neo floxeado *in vivo*.

Para responder si la proteína Cre codificada por el adenovector era capaz de recombinar el cassette PGK-neo *in vivo*, se realizó el siguiente experimento. Se inyectaron animales knock-in o hermanos de camada silvestres (ratones wt) en la s.n. con el AdCre o con el AdBgal como control (n=3 por grupo). A los 7 días se obtuvo el ADN genómico de dicha región de los animales inyectados y de 3 animales knock-in sin inyectar. Se diseñaron dos primers para realizar una PCR que amplificara una secuencia de aproximadamente 1000 pb sólo en caso que el cassette PGK-neo no estuviera en el genoma (similares a los de la figura 6a). En el caso que dicho cassette estuviera presente, las condiciones de PCR dadas no permiten la amplificación de las aproximadamente 3 Kb de la secuencia completa.

Del ADN obtenido se logró amplificar la banda del tamaño esperado en los animales knock-in inyectados con el AdCre, pero no en ratones wt inyectados con el mismo adenovector, o ratones knock-in inyectados o no con un adenovector control (AdBgal)(Figura 9, gel superior). Se controló que todas las muestras utilizadas contuvieran ADN amplificando el gen de la GAPDH (Figura 9, gel inferior).

Este experimento indica claramente que la proteína Cre es funcional *in vivo*, y que se puede lograr la recombinación y escisión del cassette PGK-neo floxeado en las células de la s.n..

6.8. El TNF se expresa en un nivel basal bajo en la s.n. de los ratones knock-in. La recombinación y escisión del cassette PGK-neo por el AdCre permite el aumento en la expresión DEL ARNm y de la proteína del TNF.

Se demostró que el promotor engrailed dirige la expresión del TNFtg en forma constitutiva en la s.n. de los ratones knock-in (Figura 4).

Sin embargo, si como se ha estudiado en otros casos, el cassette PGK-neo afecta la transcripción del transgén en su misma construcción, la expresión del TNFtg debiese verse afectada luego de la escisión de dicho cassette por el AdCre.

Para demostrar esa posibilidad, se comenzó con un estudio por RT-PCR como se describió en la figura 4. Se inyectaron los siguientes animales en la s.n. y se procesaron las muestras según el siguiente esquema:

Ratón	Adenovector inyectado	Días luego de la inyección	N	Región analizada
knock-in	-		5	s.n. e hipocampo
wt	Cre	7	3	s.n.
knock-in	Cre	7	5	s.n.
		20	5	s.n. e hipocampo
	Bgal	7	3	s.n.
		20	3	s.n.

A los tiempos indicados se preparó ARN y luego ADNc de las regiones del cerebro a analizar.

No se detectó la expresión del mensajero en los ratones wt luego de la inyección del AdCre (Figura 10a, gel superior, wt con AdCre).

En los animales knock-in inyectados con el AdBgal no se observó que la expresión del TNFtg se viera alterada respecto del basal, tanto a los 7 como a los 20 días (Figura 10a, gel superior, knock-in con AdBgal; a la izquierda se incluye la foto de la figura 4 para poder comparar con el nivel basal encontrado en los animales knock-in). Sin embargo, el AdCre sí provocó un aumento en la transcripción del ARNm del TNFtg en ambos tiempos analizados en la s.n. de animales knock-in (Figura 10a, gel superior, knock-in con AdCre). No se detectó la expresión ectópica del TNF en ningún

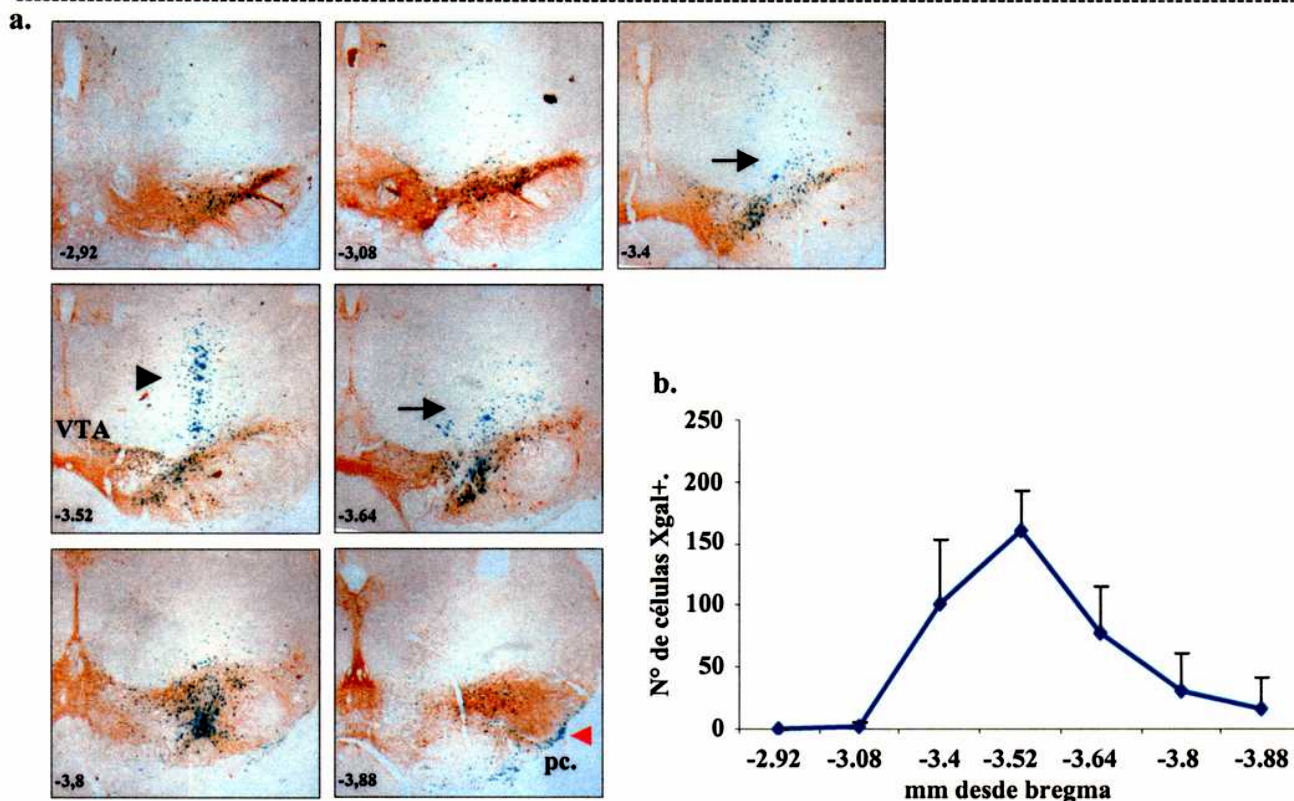
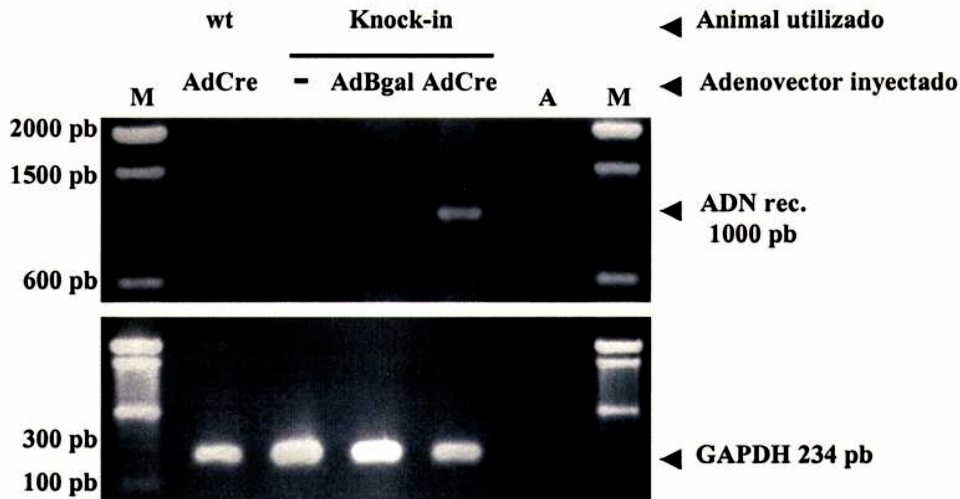


Figura 8. Distribución del adenovector AdBgal por sobre la *substantia nigra* (s.n.) luego de la inyección estereotáxica en esa región. a. Fotos de cortes de la s.n. tratados como en la figura “7a”. Cabeza de flecha: en el sitio de inyección (-3,52 mm desde bregma) hay un mínimo reflujo de partículas, y se extiende en menor cantidad a dos cortes a los lados del mismo (flechas). Ocasionalmente se observaron algunas células positivas en el pedúnculo cerebral (pc, flecha roja). Varias neuronas del área tegmental ventral (VTA) son positivas para el transgén. Números: mm desde bregma (según Franklin y Paxinos). b. Análisis cuantitativo del número de células Xgal+ por sobre la s.n.. Se expresa el promedio \pm ES de 3 cortes para cada una de las coordenadas indicadas.

Figura 9. El AdCre escinde el cassette PGK-neo (fosfogliceratocinasa-neomicina) de las células de la *substantia nigra* (s.n.) de ratones adultos *in vivo*. Se observa un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en el cual se separaron los productos de PCR amplificados con primers y condiciones similares a las utilizadas para verificar la recombinación *in vitro* en la figura 6 (gel superior). Estos primers amplifican una banda de 1000 pb si el cassette PGK-neo fue escindido de la construcción. Como control de que todas las muestras contenían ADN, se amplificó el gen D-gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH)(gel inferior) . M: marcador de PM (1 Kb, Gibco). A: control negativo, PCR sin agua. wt: cepa silvestre.



caso, por ejemplo, en el hipocampo de un ratón knock-in inyectado con el AdCre (Figura 10a, gel superior, knock-in con AdCre, hip.).

En todas las muestras se amplificó el ADNc de un gen “housekeeping” (GAPDH), para verificar que todas las muestras tuvieran ADNc (Figura 10a, gel inferior).

Este experimento demuestra que los animales knock-in expresan niveles basales del mensajero del TNFtg en su s.n., y que el AdCre puede en forma específica aumentar la expresión del mismo en dicha región del cerebro en un momento determinado de la vida adulta del animal. Se debe tener en cuenta que las reacciones de PCR aquí realizadas no son estrictamente cuantitativas; sin embargo, luego de hacerlas para varios animales, más de una vez por muestra, y obtener en todos los casos el mismo resultado, consideramos que estos resultados son un indicio de que realmente el sistema estuviera funcionando.

Para demostrar fehacientemente a nivel de la proteína que la expresión del TNFtg aumentaba luego de la recombinación de PGK-neo, se realizó un experimento similar al anterior, esta vez procesando los cerebros para inmunohistoquímica.

No fue posible detectar la proteína en ningún caso utilizando varias estrategias, entre ellas inmunofluorescencia, inmunohistoquímica y ELISAs, esta última con una sensibilidad aproximada de 100 pg/ml. Indirectamente, estos resultados son indicativos de que el nivel de expresión del TNFtg aún luego de la recombinación de PGK-neo sería muy bajo.

Se continuó buscando alternativas que nos permitieran detectar la proteína, para poder confirmar los cambios observados en el ARNm. Cuando cortes de la s.n. de ratones knock-in fueron procesados para IHQ contra TNF, y se utilizó el reactivo ABC (que amplifica la señal) sumado a un segundo reactivo (Tiramida, DAKO), que genera una nueva ronda de amplificación a la señal, se pudo observar a bajo aumento a los 20 días una señal en la s.n. ipsilateral a la inyección del AdCre en ratones knock-in con fibras también positivas que se extendían hacia la s.n. reticulada (Figura 10b, foto 2). Esto no pudo ser observado en ninguno de los controles utilizados, a saber: la s.n. contralateral de éstos mismos cortes o cualquiera de los otros animales inyectados o no con adenovectores controles (lo que indica que aún con esta estrategia no se detecta el nivel de proteína basal), (Figura 10b, foto 1; la misma es representativa de todos ellos).

El análisis a mayor aumento nos permitió determinar que en ninguno de esos controles era posible detectar células TNF+ (Figura 10b, foto 3). Sin embargo, en los ratones knock-in inyectados con el AdCre, fue posible detectar varias células por corte expresando TNF, de las cuales algunas presentaron claramente morfología neuronal (Figura 10b, imagen superior izquierda en foto 2, y foto 4). Ocasionalmente fue posible identificar otras células TNF+, más pequeñas y con ramificaciones gruesas y cortas, reminiscentes de células de microglía activada (Figura 10b, imagen superior izquierda en foto 4).

Como no nos fue posible realizar dobles marcaciones con TH, se presenta una fotografía de una neurona TH+ bajo las mismas condiciones para poder comparar morfología y tamaño celular (Figura 10b, foto 5). Las neuronas inmunopositivas para TNF tienen claras similitudes con las TH+ en cuanto al tamaño del soma y a la presencia de una gruesa prolongación que sale del mismo (comparar fotos 4 y 5); además, las células fueron observadas en la región del cerebro claramente identificable como la s.n. pars compacta.

En conjunto, estos experimentos demuestran que la presencia del cassette PGK-neo realmente dificulta la expresión del TNFtg, y que su recombinación y escisión aumenta la expresión del mismo. Estos resultados indican que se dispone de un modelo animal en el cual se puede obtener la expresión crónica de dos niveles de expresión de una proteína en la s.n. del ratón. Asimismo, muestran que es posible estudiar tanto el efecto de la expresión basal crónica del TNF sobre las neuronas dopaminérgicas de la s.n. del ratón, como el de su aumento en un momento determinado en la vida adulta del animal.

6.9. El aumento crónico en la expresión del TNF en la s.n. pars compacta es neurodegenerativo.

Para estudiar el posible efecto de la expresión crónica basal o inducida del TNF sobre las neuronas dopaminérgicas de la s.n. a largo plazo, se diseñó el siguiente experimento:

Región inyectada	Tiempo	Ratones	Adeno inyectado	n
s.n.	20d	wt	-	2
			Bgal	4
			Cre	4
		knock-in	-	2
			Bgal	4
			Cre	4
	100d	wt	-	2
			Bgal	4
			Cre	4
		knock-in	-	2
			Bgal	5
			Cre	5

A los 20 y 100 días se sacrificaron los animales por perfusión transcardíaca, los cerebros fueron colectados, se obtuvieron cortes a lo largo de toda la s.n. y se los procesó para inmunohistoquímica contra un marcador de neurona dopaminérgicas, la tirosín-hidroxilasa (TH). Se obtuvieron imágenes digitales a bajo aumento que permitieran comparar el efecto de cada tratamiento en forma cualitativa, y se seleccionaron fotos a 3 distintos niveles antero-posteriores de la s.n. (Franklin & Paxinos 1997): en el medio (-3,4 mm desde bregma, correspondiente al sitio aproximado de inyección del adenovector), y los extremos anterior y posterior (-2,92 y -3,8 mm respectivamente, correspondientes a zonas de la s.n. alejadas del sitio de inyección). Posteriormente se contabilizó el número de neuronas TH⁺, y los valores de cada tratamiento fueron agrupados y expresados como el porcentaje de neuronas ipsilateral a la inyección comparado con su contralateral no tratado.

Análisis a 20 días.

El análisis de las imágenes obtenidas permiten determinar en forma cualitativa que no hubo pérdida alguna de neuronas en los hemisferios contralaterales de los animales en ninguno de los tratamientos analizados (Figura 11a, panel Izquierdo). Asimismo, no se observa pérdida de neuronas TH⁺ en los animales knock-in o wt no inyectados (datos no mostrados). Por el contrario, claramente se aprecia una pérdida de viabilidad de las neuronas TH⁺ en el lugar donde es inyectado el adenovector, indistintamente del vector o ratón inyectado (Figura 11a, fotos a -3,4 mm de bregma).

Sin embargo, solamente en los knock-in inyectados con el AdCre se observa una disminución en el número de neuronas TH⁺ en la región anterior y posterior de la s.n (Figura 11a, comparar fotos de la s.n. ipsi, fotos a -2,92 y -3,8 mm). Las neuronas TH⁺ estaban transducidas casi en su totalidad en ratones inyectados con AdCre o AdBgal indistintamente, por lo que la diferencia en la viabilidad neuronal no puede deberse a variaciones en la eficiencia de transducción de la s.n. (Figura 7 y dato no mostrado).

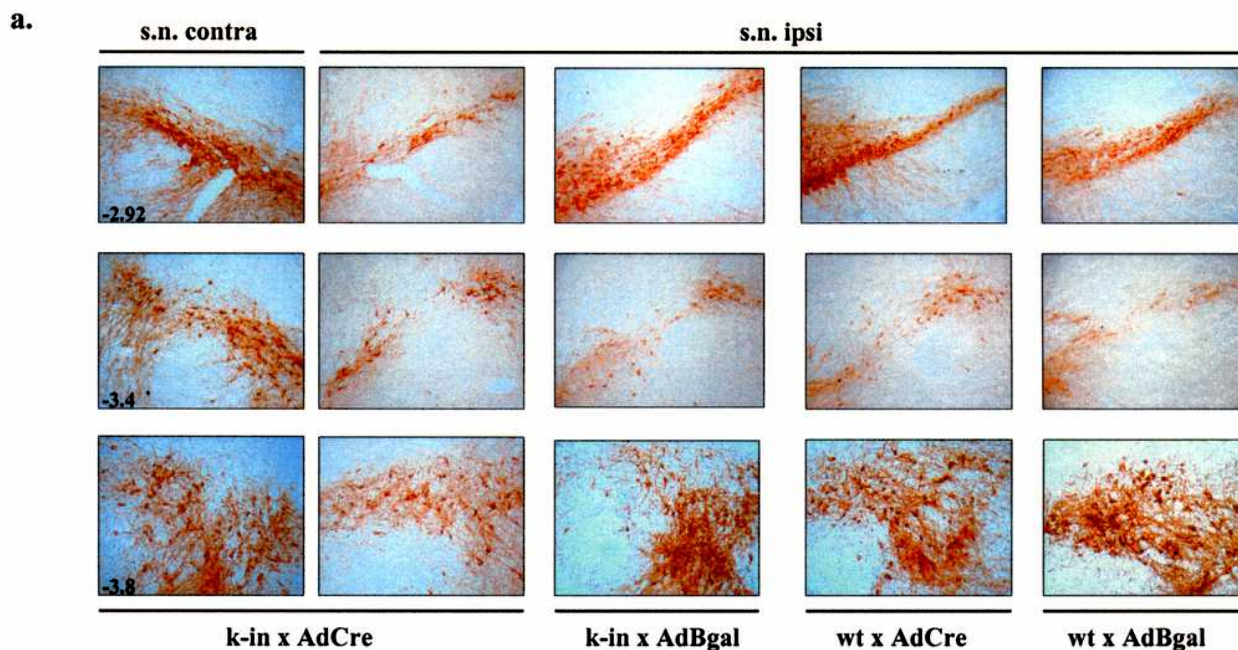
Luego, procedimos al análisis cuantitativo del número de neuronas TH⁺ remanentes en cada caso. Los animales no inyectados presentan un número significativamente mayor de neuronas TH⁺ en comparación a cualquiera de los grupos que recibieron adenovectores en la s.n. (Figura 11b, * $p < 0,0002$). Este resultado confirma que la inyección de los adenovectores provoca la pérdida de neuronas TH⁺ en la s.n. en forma inespecífica. Así, se puede apreciar una reducción del 20%-30% de las neuronas mencionadas en los ratones knock-in inyectados con AdBgal o los animales wt inyectados con cualquiera de los adenovectores Sin embargo, al analizar los animales knock-in inyectados con el AdCre se observa una disminución bastante más marcada (de alrededor del 50%), que resultó en una diferencia significativa respecto de aquellos ratones knock-in inyectados con el AdBgal (Figura 11b, $p < 0,001$).

Estos datos muestran que los ratones knock-in inyectados con AdCre presentan un descenso estadísticamente significativo en el número de neuronas TH⁺ en la s.n. provocado por el aumento en la expresión del TNFtg por 20 días.

Análisis a 100 días.

A los 100 días de inyectados, ningún animal sufrió pérdida de neuronas en su lado contralateral, ni hubo diferencias en el número de neuronas TH⁺ totales en la s.n. de animales sin inyectar, (Figura 12a, columna izquierda y datos no mostrados)

Se observó que las regiones anterior y posterior al sitio de inyección en la s.n. de los animales knock-in inyectados con AdBgal o animales controles wt inyectados con AdBgal o AdCre no presentan pérdida neuronal, similar a lo observado al día 20 (Figura 11a, columna derecha a -2,92 y -3,8 mm de bregma, y datos no mostrados). Igualmente, se observa una pérdida de neuronas en forma no específica por la inyección de adenovectores en el sitio de inyección de cualquiera de los animales



b.

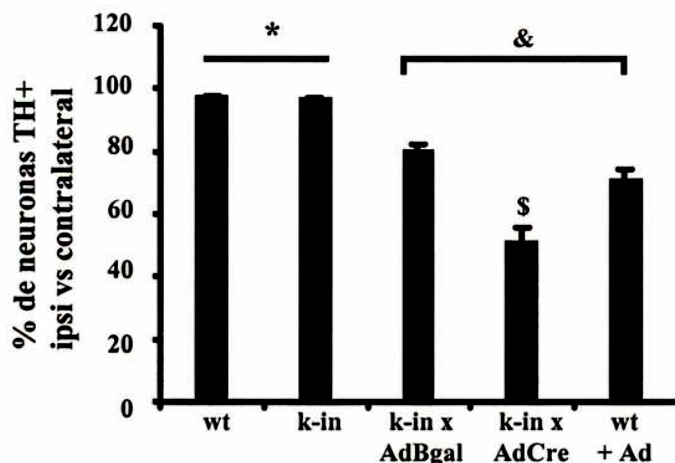


Figura 11. Estudio del número de neuronas inmunoreactivas para tirosín-hidroxilasa (TH) en la *substantia nigra* (s.n.) de ratones, 20 días después de la inyección de adenovectores en dicha región del cerebro. a.- Inmunohistoquímica realizada sobre cortes de la s.n. de ratones, teñidos con un anticuerpo contra TH y revelado con DAB. Se seleccionaron imágenes a 3 distintos niveles antero-posteriores de la s.n. (números en las 3 primeras fotos de la izquierda corresponden a mm desde bregma, según Franklin y Paxinos; valores válidos para cada fila horizontal). La s.n. contralateral de los ratones knock-in inyectados con el AdCre (k-in x AdCre, s.n. contra) es representativa de la misma región de cualquier otro ratón inyectado con adenovector, y de la s.n. ipsilateral de ratones knock-in y wt (cepa silvestre) inyectados con solución salina. b.- Gráfico en el cual se presenta el porcentaje de neuronas inmunoreactivas para TH del lado ipsilateral comparado con el contralateral, 20 días después de la inyección de los adenovectores. * $p < 0,0002$, animales sin inyectar comparado con cualquiera de los grupos inyectados con adenovectores. \$ $p < 0,001$, animales knock-in inyectados con el AdCre comparados con los knock-in inyectados con AdBgal (k-in x AbBgal). & $p < 0,05$, k-in x AdBgal vs. animales de la cepa silvestre inyectados con cualquiera de los adenovectores (wt + Ad).

inyectados (Figura 11a, columna derecha a $-3,4$ mm). Sin embargo, se observa claramente que el número de neuronas TH⁺ en los ratones knock-in inyectados con el AdCre se ha reducido sensiblemente respecto de cualquiera de los grupos controles o lo observado a los 20 días en la s.n. ipsilateral de esos mismos ratones (Figura 12a, knock-in x AdCre, s.n. ipsi).

El análisis cuantitativo confirma que los animales no inyectados no presentaron diferencias en el porcentaje de neuronas entre ambos hemisferios (Figura 12b, wt y knock-in). El número de neuronas en los animales knock-in inyectados con AdBgal y los ratones wt con ambos adenovectores (wt + Ad) mantuvieron el número de neuronas promedio existente a los 20 días (comparar figuras 11b y 12b). Sin embargo, resultó ser claramente significativa la disminución de células TH⁺ en los ratones knock-in inyectados con AdCre, respecto de los grupos de animales wt con cualquier vector y los knock-in con AdBgal (* $p < 0.006$), y más aún de los no inyectados (& $p < 0.0007$). La disminución de las neuronas de la s.n. en los animales knock-in inyectados con AdCre llegó a un 20% con respecto a la s.n. contralateral no tratada (Figura 12b)

Con el objetivo de determinar si las neuronas dopaminérgicas realmente no estaban presentes, o el TNF sólo había producido una reducción en la expresión de la enzima TH, secciones intermedias de este experimento a 100 días fueron teñidas con violeta de cresilo. Esta tinción permite ver los núcleos celulares. Se puede observar claramente que solamente en los ratones knock-in con AdCre no se observan las neuronas de la s.n. pars compacta identificables por el mayor tamaño del soma y su disposición característica en forma de “sonrisa” (Figura 12c).

Todos estos resultados en conjunto (20 y 100 días) indican que un aumento crónico en el nivel de expresión del TNF en la s.n. pars compacta, tiene un efecto degenerativo sobre las neuronas mencionadas.

6.10. Los animales knock-in inyectados con el AdCre muestran un paulatino aumento con el tiempo en el número de vueltas en respuesta al tratamiento con apomorfina.

Al degenerar las neuronas de la s.n., la cantidad de dopamina disminuye en el cuerpo estriado. En ese caso, los receptores post-sinápticos para dicho neurotransmisor se sensibilizan. Si la lesión es unilateral, la sensibilización será también unilateral. Si se da un estímulo adecuado al animal (por ejemplo, dopamina, o un análogo de la misma, como puede ser la apomorfina), esa sensibilización unilateral provocará una respuesta diferente en cada hemisferio cerebral, y consiguientemente una asimetría motora.

Para investigar si la degeneración paulatina unilateral de las neuronas de la snpc en nuestro modelo podía tener un correlato funcional produciendo una asimetría motora en los animales, se diseñó el siguiente experimento:

Región inyectada	Ratones	Adeno inyectado	n
s.n.	wt	-	6
		Bgal	6
		Cre	6
	knock-in	-	6
		Bgal	6
		Cre	16

A los 20, 40, 60 y 80 días luego de la inyección de los distintos adenovectores, se inyectaron los animales con apomorfina en forma subcutánea, y se contabilizó el número de vueltas contralaterales a la lesión de los animales durante 20 minutos.

A los 20 días de la inyección de los adenovectores se observó que ningún animal respondía a la apomorfina, y en ninguno de los grupos controles hubo ratón alguno al cual la apomorfina le indujera rotación en ninguno de los tiempos analizados (Figura 13a). Sin embargo, fue interesante observar que a los 40 días algunos animales del grupo knock-in con AdCre comenzaron a mostrar una mínima rotación en respuesta a la droga, y a los 60 días claramente se definieron dos grupos de animales: unos que respondían (r) y otros que no (nr) a la misma (Figura 13b). Se puede observar, además, que el número de vueltas provocada por la administración de apomorfina aumentaba con el tiempo.

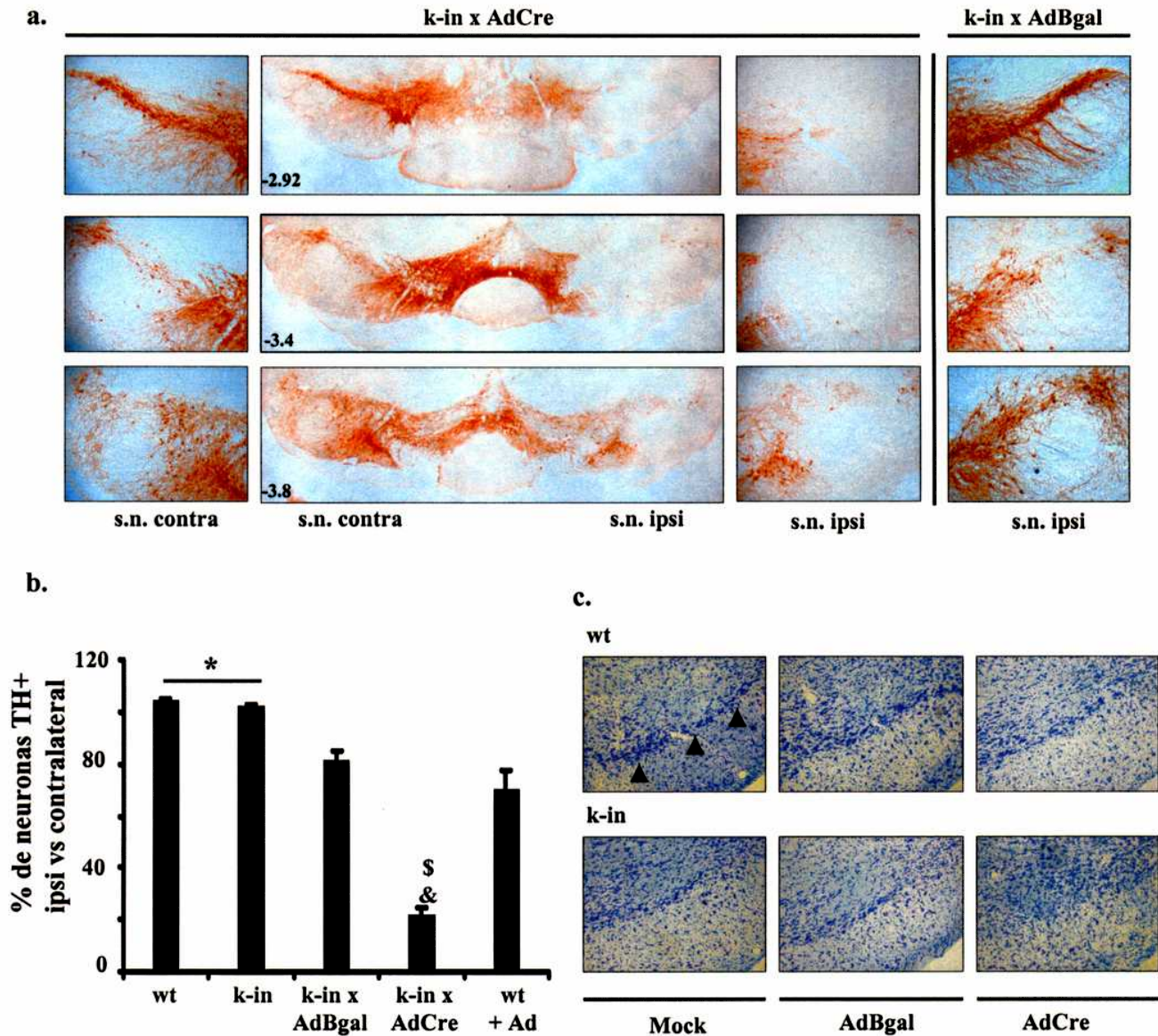


Figura 12. Estudio del número de neuronas inmunoreactivas para tirosín-hidroxilasa (TH⁺) en la substantia nigra (s.n.) de ratones 100 días después de la inyección de adenovectores en dicha región del cerebro. a.- Inmunohistoquímica para detectar TH en la s.n. de ratones. Se presentan imágenes a 3 niveles antero-posteriores (ver figura 11a). Ratón knock-in inyectado con AdCre (k-in x AdCre), columna central: imágenes a bajo aumento (20x) para apreciar las diferencias entre ambas s.n. en un solo animal. A ambos lados hay imágenes a mayor aumento (100x) de ambas s.n. de las fotos centrales. Columna izquierda: s.n. contralateral (s.n. contra), cuya imagen es representativa de la s.n. contralateral de todos los animales inyectados y de la s.n. ipsilateral de animales inyectados con solución salina. Columna derecha: s.n. ipsilateral (s.n. ipsi) de ratones knock-in inyectados con AdCre. Ratones knock-in inyectados con el AbBgal (k-in x AdBgal): estas imágenes son representativas de la s.n. ipsilateral de los animales knock-in o silvestres inyectados con un adenovector control (AdBgal). b.- Gráfico en el cual se observa el porcentaje de neuronas TH⁺ en el lado ipsi comparado con el contralateral a los 100 días de la inyección de los adenovectores. * $p < 0.01$, animales sin inyectar comparados con cualquiera inyectado. $\$p < 0.006$, k-in x AdCre respecto de los grupos de animales wt (cepa silvestre) inyectados con cualquier vector (wt + Ad) y los k-in inyectados con AdBgal, y $\&p < 0.0007$, k-in x AdCre comparado con los no inyectados. c.- Secciones intermedias a las procesadas para TH fueron teñidas con violeta de cresilo. Flechas: "franja" de neuronas de la s.n. compacta identificables por el mayor tamaño del soma y la disposición característica. Mock: ratones inyectados con salina.

Resulta ser también interesante de observar que aún después de un tiempo tan prolongado luego de la inyección, dos animales nuevos comenzaron a rotar (Figura 13b, comparar 40 y 60 días, de $n=7$ a $n=9$). A los 80 días no se identificaron otros animales respondedores, y en aquellos que lo eran, continuó el aumento en el número de vueltas.

Este experimento indicaría que la inyección del AdCre y el aumento en la expresión del TNFtg en nuestros animales knock-in provoca, en aproximadamente el 60% de los mismos, pérdida en el número de las neuronas dopaminérgicas que a su vez lleva a una sensibilización de los receptores de dopamina del estriado, lo que les induce rotación contralateral ante el estímulo con un agonista de la dopamina como la apomorfina.

6.11. Existe una correlación logarítmica entre el nivel de expresión de TH en el estriado y el número de vueltas inducidas por apomorfina.

Para investigar cuál podría ser la razón por la cual sólo 9 de 16 animales rotaron en respuesta a la apomorfina, distintas posibilidades fueron planteadas.

Podría suponerse que la inyección del adenovector en la s.n. de estos animales fuera incorrecta. Para ello se analizó la s.n. de 2 animales no respondedores y de 3 respondedores del grupo knock-in. Se determinó que el número de neuronas TH+ en todos ellos estaba considerablemente reducido (Figura 14c), lo cual sugiere que los animales habían sido correctamente inyectados. Asimismo, la reducida variación en el número de neuronas TH+ en la s.n. de los animales knock-in (13,1% a 27,7%) indica la poca variabilidad en el método de inyección.

Otra opción sería que a pesar del descenso en el número de neuronas TH+ en la s.n., ello no se viera correlacionado con un cambio importante en la cantidad de dopamina en el estriado. Como se mencionó previamente, para que los animales respondan a la apomorfina, los receptores de dopamina del estriado han de estar supersensibilizados. A su vez, para que ello suceda, debe existir un descenso en la concentración de dopamina en el estriado. Una forma indirecta de determinarlo es analizar la densidad de fibras TH+ en dicha región del cerebro. Para ello se analizaron el cuerpo estriado de 5 de los ratones mencionados y otros 3 animales de cada grupo control. Se obtuvieron cortes y se realizaron tinciones por inmunohistoquímica contra la proteína tirosín-hidroxilasa, y la densidad óptica fue medida de las imágenes obtenidas.

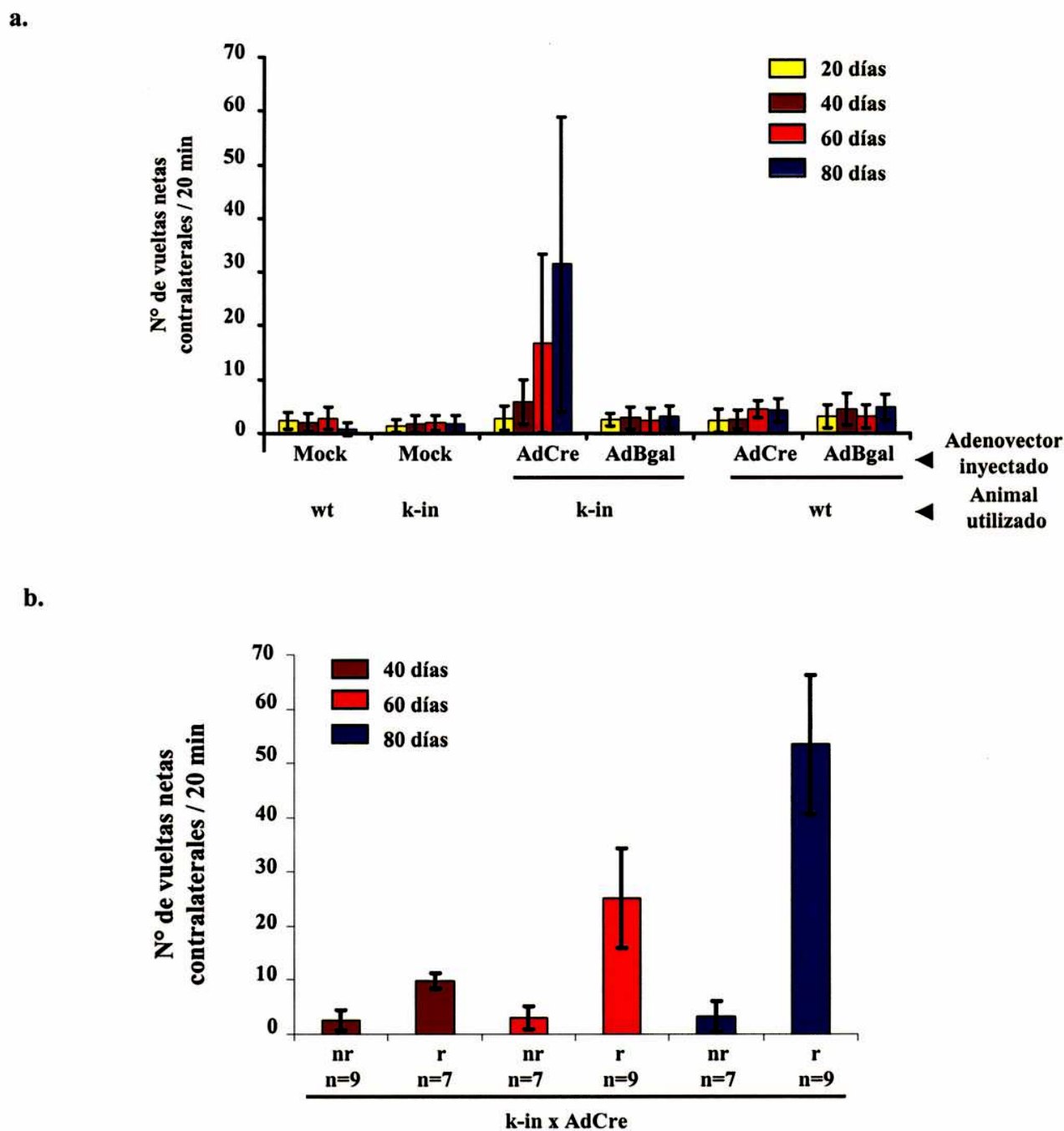


Figura 13. Análisis de la rotación inducida en animales por la inyección de apomorfina a distintos tiempos luego de la inyección de adenovectores en la *substantia nigra* (s.n.). a.- Número de vueltas contralaterales al sitio de inyección dadas por los animales durante 20 minutos al ser inyectados con apomorfina. k-in: knock-in; wt: cepa silvestre; Mock: animales inyectados con solución salina. b.- Gráfico en el cual se analiza individualmente los datos del grupo de ratones knock-in inyectados con AdCre (k-in x AdCre) de la figura superior. Los animales knock-in x AdCre pueden ser separados en dos grupos, en base a su respuesta motora a la inyección de apomorfina: “respondedores” (r), y “no respondedores” (nr).

A nivel cualitativo no observamos disminución en la expresión de TH en el estriado de ninguno de los controles analizados (animales knock-in inyectados con AdBgal, o animales de la cepa salvaje inyectados con cualquiera de los adenovectores)(dato no mostrado). Por el contrario, sí observamos una disminución en la densidad en TH en todos los animales analizados del grupo knock-in con AdCre (Figura 14a, R1 a R5). Sin embargo, se aprecia que el estriado de los dos animales que no rotaron mantienen una mayor reactividad para TH en la región más interna de esa estructura, comparado con los tres animales que rotaron, donde la denervación es casi completa (Figura 14a, comparar R1-2 contra R3-5). Es para destacar también la presencia casi intacta de TH en el tubérculo olfatorio de todos los animales, por donde pasan los haces TH+ del área tegmental ventral (VTA).

El análisis cuantitativo reveló que los animales no inyectados no presentaban reducción alguna en la expresión de TH en el estriado, mientras que los knock-in inyectados con AdBgal o los wt inyectados con cualquier adenovector presentaban signos de haber sufrido una leve reducción en la expresión de la enzima (entre el 10 y el 50 %)(Figura 14b). Sin embargo, esa disminución claramente no fue suficiente para inducir la rotación de los animales (Figura 13a). Al analizar los animales knock-in inyectados con AdCre, se ve una clara e importante reducción en la expresión de TH en el estriado, del orden del 70% (Figura 14a). El análisis detallado de la información referida al número de vueltas inducido en cada animal y la densidad óptica para TH de su estriado, permitió determinar que existe una correlación exponencial inversa altamente significativa entre ambas variables luego de la inyección con apomorfina ($r^2=0.992$)(Figura 14c).

6.12. Análisis del efecto del TNF basal o aumentado por la inyección del AdCre en la sobrevivencia de las neuronas TH+ de la s.n ante el efecto citotóxico de la 6-OHDA.

Como fue mencionado anteriormente, existían en la bibliografía evidencias aisladas de que el TNF podría tener tanto un efecto neurodegenerativo como neuroprotector. La explicación a ello era en todos los casos muy vaga, resaltando que una combinación de factores deberían estar actuando en cada caso para obtener los diferentes resultados. Sin embargo, no se conocían cuales podrían ser las causas reales de este efecto contradictorio a primera vista.

Ya hemos demostrado que el TNF crónico aumentado resulta ser degenerativo para la s.n.. Sin embargo, analizando cuidadosamente los resultados se observó una protección estadísticamente significativa del TNF basal a la injuria inespecífica inducida por la inyección del adenovector a los 20d (Figura 10b, $p<0.001$).

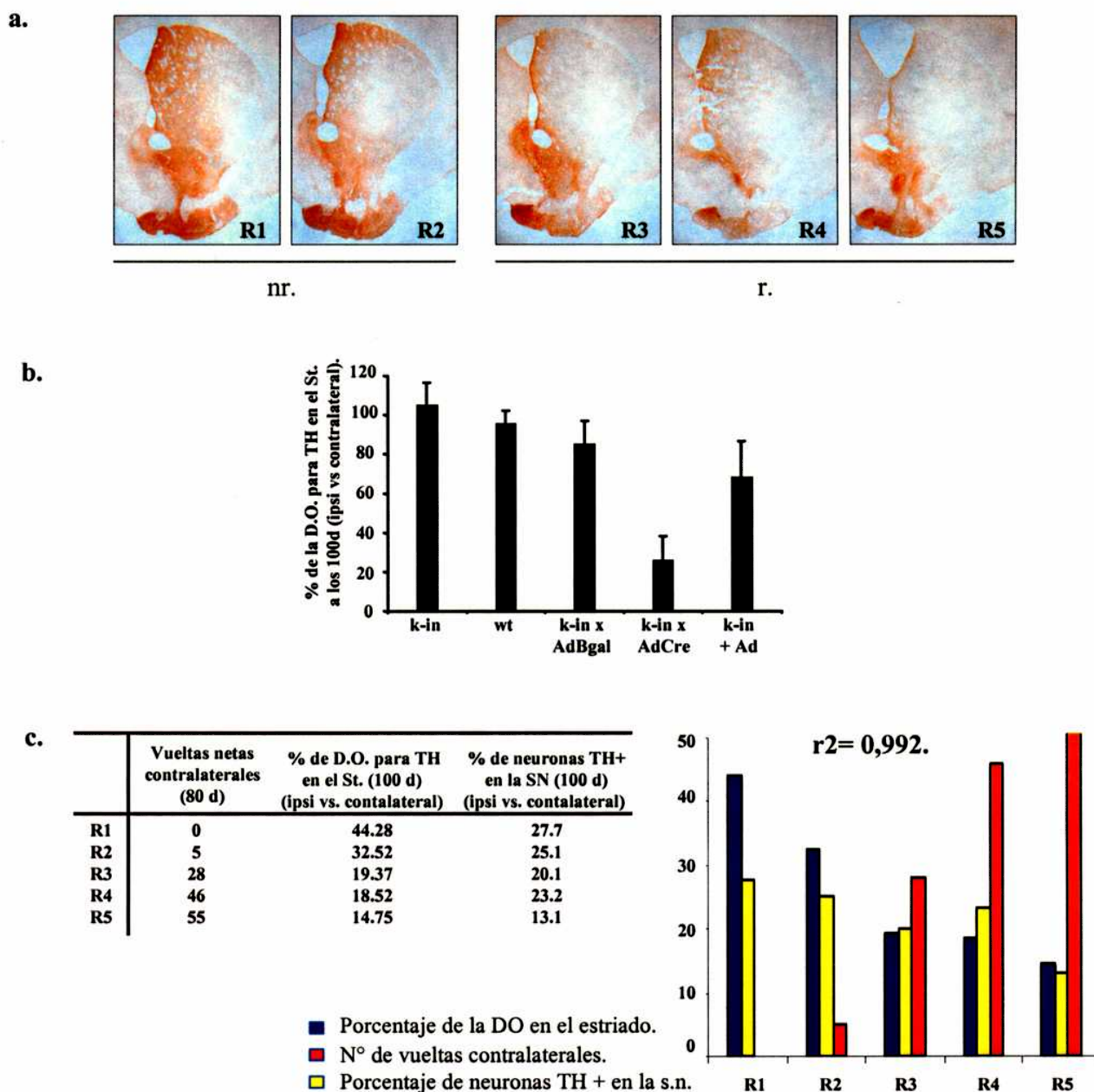


Figura 14. Correlación exponencial inversa entre el número de vueltas inducidas por la apomorfina en los animales knock-in inyectados con AdCre y la densidad óptica (DO) para tirosín-hidroxilasa (TH) en el cuerpo estriado. a.- Cortes del cuerpo estriado del cerebro de ratones knock-in (k-in) no respondedores a apomorfina (nr)(R1 y R2) y respondedores (r)(R3 a R5) teñidos para TH. b.- Gráfico en el cual se expresa el porcentaje de la densidad óptica para TH en el estriado ipsilateral respecto del contralateral de animales tratados según se indica en el mismo. wt: cepa silvestre. k-in x AdBgal o k-in x AdCre: ratones knock-in inyectados con el AdBgal o el AdCre, respectivamente. wt + Ad: animales de la cepa silvestre inyectados con cualquiera de los dos adenovectores. c.- Tabla y gráfico ilustrativo en el cual se muestran el porcentaje de neuronas TH+ remanentes en la s.n. y la DO para TH en el estriado (a los 100 días de la inyección de los adenovectores), y el número de vueltas contralaterales a la lesión (a los 80 días) de los ratones k-in 1 a 5 mencionados en "a".

Para testear esta posibilidad, se analizó si el TNF expresado en la s.n. tenía algún efecto protector en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson basado en la inyección de 6-OHDa en los terminales axónicos en el estriado de las neuronas de la s.n. compacta (Sauer & Oertel 1994). Para ello se diseñó el siguiente experimento, en el cual se inyectaron animales con adenovectores en la s.n. y neurotoxina o solución salina en el estriado según se especifica:

Ratones	Día 0 inyección en s.n.	Día 7 inyección en estriado	n
wt	-	6-OHDa	4
knock-in	-	6-OHDa	4
	AdCre		4
	AdBgal		4
	-	Salina + AA	4

A los 20 días de la inyección de la 6OHDa (día 27 del experimento), se testeó una probable asimetría motora inyectando a los animales en forma subcutánea con apomorfina, y se contó el número de vueltas contralaterales a la lesión en 20 minutos.

Los animales control inyectados con el vehículo de la droga (salina + AA) no mostraron rotación alguna (Figura 15a, # $p < 0,0002$ respecto a cualquiera de los grupos tratados con 6-OHDa). Por otra parte, ninguno de los grupos inyectados con la droga presentó diferencias significativas entre sí en el número de vueltas en los 20' analizados. Este resultado indicó que la expresión basal del TNF, o el aumento del mismo por la inyección del AdCre, no tiene eficacia en la protección de los terminales axonales de las neuronas TH+ de la s.n. compacta. Las imágenes obtenidas de las IHQ para TH en los estriados de los animales tratados con 6-OHDa confirmaron que no había diferencias entre los distintos grupos, con el estriado ipsilateral casi completamente denervado en todos los casos (dato no mostrado).

Seguidamente se analizó el número de neuronas TH+ de la s.n.. La inyección de solución salina, al igual que no modificó la concentración de TH en el estriado, no afectó el número de neuronas TH+ en la s.n. compacta de los animales knock-in, mostrando una diferencia muy significativa respecto a cualquiera de los otros grupos (Figura 15b, imágenes de la izquierda, y figura 15c, * $p < 0,0002$). Sin embargo, al analizar los animales tratados con 6-OHDa fue sorprendente encontrar que los ratones knock-in que no fueron inyectados con adenovectores mostraran una significativa neuroprotección (Figura 15b, y figura 15c, \$ $p < 0,0001$, comparado con cualquiera de los otros 3 grupos), protegiendo casi 3 veces más neuronas que los animales wt. Por otro lado, el grupo de los ratones knock-in inyectados con AdBgal sufrió un efecto negativo aditivo a la 6-OHDa por la inyección del adenovector.

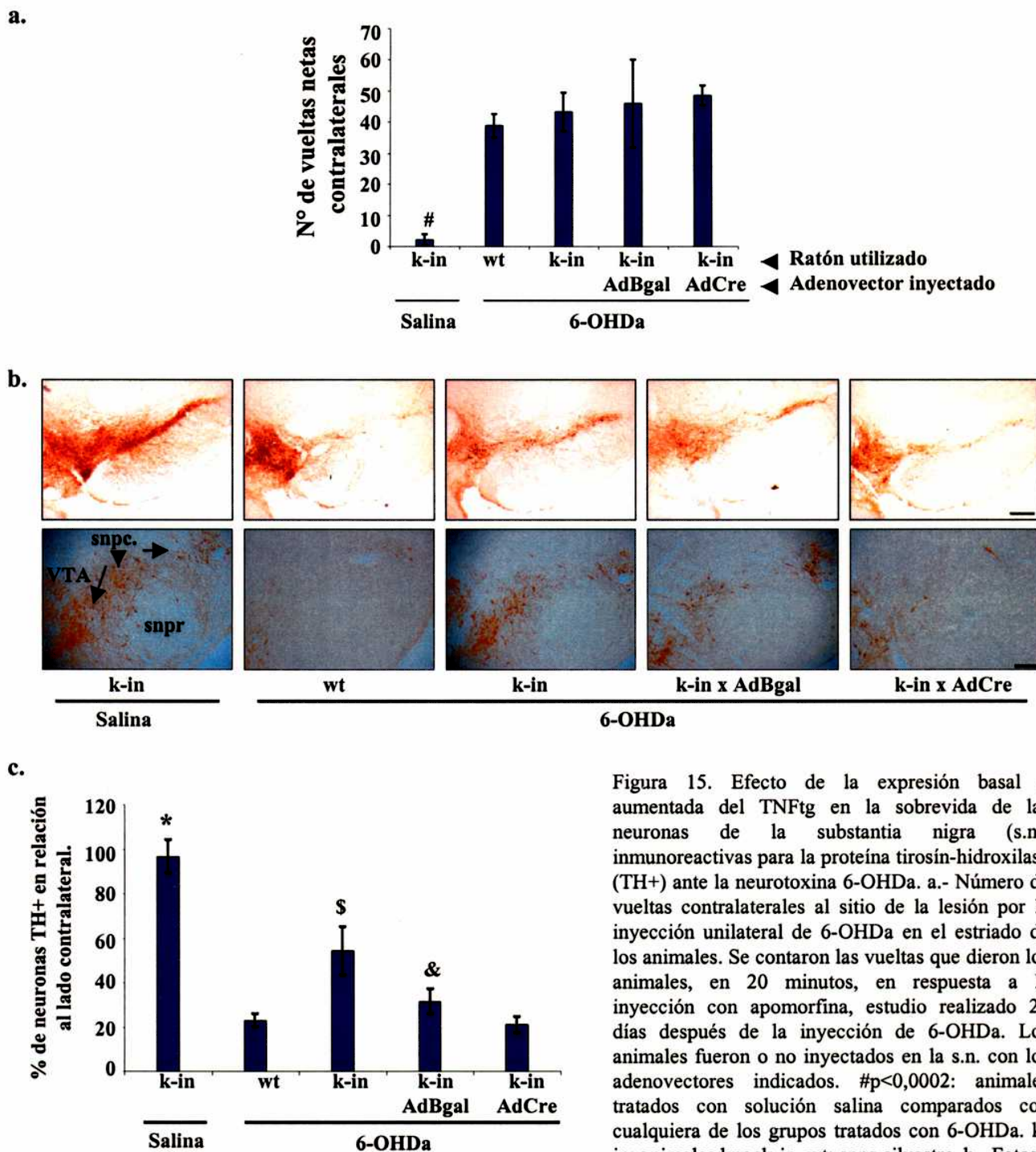


Figura 15. Efecto de la expresión basal o aumentada del TNFtg en la sobrevivencia de las neuronas de la substantia nigra (s.n.) inmunoreactivas para la proteína tirosín-hidroxilasa (TH+) ante la neurotoxina 6-OHDa. a.- Número de vueltas contralaterales al sitio de la lesión por la inyección unilateral de 6-OHDa en el estriado de los animales. Se contaron las vueltas que dieron los animales, en 20 minutos, en respuesta a la inyección con apomorfina, estudio realizado 20 días después de la inyección de 6-OHDa. Los animales fueron o no inyectados en la s.n. con los adenovectores indicados. # $p < 0,0002$: animales tratados con solución salina comparados con cualquiera de los grupos tratados con 6-OHDa. k-in: animales knock-in. wt: cepa silvestre. b.- Fotos

de la inmunohistoquímica para TH en la s.n., representativas de cada grupo. Panel superior (-2,9 mm desde bregma, 20x), barra = 200 μ m. Panel inferior (-3,4 mm desde bregma, 40x), barra = 100 μ m. VTA: área tegmental ventral. snpc: *substantia nigra pars compacta*. snpr: *substantia nigra pars reticulata*. K-in x AdBgal o k-in x AdCre: animales knock-in inyectados con el adenovector correspondiente. c.- Gráfico en el cual se ilustra el porcentaje de neuronas TH+ remanentes en la snpc a los 23 días de la inyección de 6-OHDa en el estriado (porcentaje con respecto al lado contralateral sano, media \pm ES). * $p < 0,0002$: animales inyectados con solución salina comparado con cualquier otro grupo. \$ $p < 0,0001$: animales knock-in sin inyectar con adenovectores comparados con cualquiera de los otros 3 grupos tratados con 6-OHDa. & $p = 0,05$: animales knock-in inyectados con AdBgal comparados con los knock-in inyectados con AdCre.

Sin embargo, aún en este caso observamos un número significativamente mayor de neuronas TH+ que en los knock-in inyectados con AdCre (Figura 15b, y figura 15c, $p=0,05$), lo cual pone en evidencia el efecto negativo del TNF aumentado en este último grupo, que se sumaría al de la 6-OHDA.

Este experimento indicaría lo siguiente:

.- el hecho que los ratones knock-in presenten una diferencia en la neuroprotección respecto de los controles de la cepa silvestre (los cuales comparten exactamente el mismo genoma excepto por la presencia o no del transgén insertado en el gen engrailed), evidenció que pese a las dificultades para detectar la proteína del TNF, ésta estaba siendo expresada, y, más aún, tiene un efecto neuroprotectivo;

.- la expresión basal crónica del TNF sería suficiente para mantener viables los somas de aproximadamente el 50 % de las neuronas TH+ de la s.n. compacta, aunque no lo es para mantener funcionales sus prolongaciones en el estriado.

Discusión y Conclusiones.

7. Discusión y conclusiones.

7.1. Desarrollo de un nuevo sistema para lograr la expresión condicional de genes en la s.n. del ratón.

Utilizando una combinación de elementos (ratones knock-in y el promotor engrailed) hemos logrado expresar una proteína de interés (la citoquina pro-inflamatoria TNF) específicamente en la s.n. del ratón.

Más importante aún, hemos demostrado que la eficiente delección del cassette floxeado PGK-neo por medio de la inyección de AdCre en la s.n. derivó en la inducción del transgén, verificando que nuestros animales knock-in son hipomórficos por la presencia de dicho cassette. Ello nos ha permitido modificar (aumentar) la expresión del transgén (TNF) específicamente en dicha región del cerebro del animal, en el momento de la vida adulta que deseábamos. La estrategia mencionada ha sido utilizada para analizar por vez primera el efecto de dos niveles de expresión crónicos de una misma proteína sobre las neuronas dopaminérgicas de la s.n..

Cabe preguntarse si se pudiesen utilizar otras estrategias para lograr la expresión condicional crónica del TNF u otra proteína en la s.n. Esto podría lograrse utilizando otras alternativas de control temporal y regional de la expresión transgénica.

.- Control regional

Una alternativa a la alternativa presentada en este trabajo podría basarse en la inyección continua de proteína recombinante a través de una cánula directamente en la s.n., modelo ya desarrollado para ratas (Schoning et al 1999). Sin embargo, esta estrategia presentaría problemas por la facilidad de movimiento de la cánula lo cual lleva a inflamación, la obturación frecuente de la cánula y el costo del proceso.

Otra posibilidad podría ser la utilización de solamente un vector viral o no viral, sin la utilización de ratones modificados genéticamente. Los datos presentados en este trabajo muestran que una única inyección de un adenovector puede transducir aproximadamente el 90-95 % de las neuronas dopaminérgicas. Si bien no existe un promotor específico de la s.n. suficientemente caracterizado para ser incorporado a un vector de forma que asegure la expresión en dicha región, se podría investigar la utilización de promotores específicos de, por ej. , neuronas. Sin embargo, sería difícil obtener dos niveles de expresión diferentes con esta estrategia sin variar la cantidad de virus inyectado.

.- Regulación temporal.

Dentro de las posibilidades existentes de expresión condicional *in vivo*, existen otras varias alternativas a la presentada en este trabajo (revisado en (DeMayo & Tsai 2001; Lewandoski 2001; Porter 1998)). La mayoría ha sido perfeccionada solo en los últimos años, y no están exentos de inconvenientes. Los mejores sistemas de expresión condicional son los llamados “binarios”. Están divididos en dos categorías:

- a) sistemas utilizando un efector que transactiva la expresión del gen blanco,
- b) sistemas en los cuales el efector es una recombinasa que activa o silencia un gen.

a.- el más utilizado es el sistema regulatorio dependiente de tetraciclina (Gossen & Bujard 1992). Existen hoy dos versiones: aquel en cual el transgén se expresa cuando el inductor está ausente (“tet-off”), y uno más recientemente desarrollado en que el gen se expresa cuando el inductor está presente (“tet-on”). El inductor más utilizado es la doxiciclina (Lewandoski 2001).

La ventaja de este sistema es que puede ser reversible agregando o quitando el inductor, y que permite en el mismo animal analizar los efectos de la expresión y el silenciamiento temporal del transgén. En los últimos años está siendo refinado para ser utilizado eficientemente en la regulación de la expresión génica en el cerebro (revisado en (Mansuy & Bujard 2000)).

Un ejemplo muy relevante de esta estrategia son los resultados obtenidos en el estudio de la conformación de la memoria a través de la expresión regulada de la quinasa II dependiente de la calmodulina de calcio (CaMKII), donde la expresión de la misma provoca la pérdida de la potenciación a largo plazo (LTP) en un modelo de memoria, mientras que la posterior supresión de la expresión en el mismo animal provoca la reversión de dicho fenotipo (Mayford et al 1996).

Las desventajas del modelo son, por ejemplo, que siempre hay una mínima expresión basal que no puede ser regulada, y que la cinética de eliminación del inductor es lenta (Lewandoski 2001; Utomo et al 1999).

Sería interesante combinar la eficiencia de transducción de los adenovectores en la s.n. con estos promotores. En línea con ello, actualmente existen evidencias que un único vector adenoviral puede lograr la expresión controlada de una proteína (tirosín-hidroxilasa) regulada por doxiciclina (sistema descrito debajo) en células progenitoras neurales humanas transplantadas en animales, o directamente en el cerebro de los mismos (Corti et al 1999a; Corti et al 1999b). Restaría verificar que dicho promotor pueda expresar un transgén a tan largo plazo como el promotor endógeno.

b.- Varias recombinasas han sido utilizadas para lograr regulación transgénica temporal: la ya mencionada recombinasa Cre del bacteriófago P1, la recombinasa FLP de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, y la recombinasa R de la levadura *Zygosaccharomyces rouxii* (Kilby et al 1993). Todas estas recombinasas reconocen sitios específicos de recombinación (LoxP en el caso de Cre) y deletan el fragmento flanqueado por estos sitios si se hallan en la misma orientación. De ellas, el sistema Cre-LoxP es el más utilizado y el mejor caracterizado, lo cual lo hace el sistema de elección para realizar estrategias de recombinación *in vivo* para la activación o delección de secuencias (Lewandoski 2001).

De acuerdo con lo mencionado, y a que además existen evidencias que indican que el sistema Cre-LoxP es altamente eficiente para lograr la recombinación de una secuencia floxeada virtualmente en cualquier región o célula del cerebro (Tsien et al 1996), es que consideramos que este sistema de expresión condicional de transgenes es uno de los más eficientes de los disponibles a la fecha. Una posible desventaja que ha sido descrita en los últimos años indicaría que la expresión de Cre podría inducir arresto del ciclo celular y daño al ADN (Loonstra et al 2001). Sin embargo, la existencia de numerosas líneas de animales transgénicos expresando la proteína Cre, implicaría que ese fenómeno sería un evento relativamente raro *in vivo* (Lewandoski 2001).

En resumen, la combinación de adenovectores que transducen regiones específicas del cerebro con promotores endógenos, permiten una controlada expresión regional de transgenes en el cerebro. La regulación temporal del sistema la provee el tiempo de la inyección adenoviral y el sistema Cre-LoxP.

7.2. Posibles mejoras al presente método de expresión transgénica en la s.n.

Como todo método de estudio, nuestro modelo animal es factible de ser perfeccionado. A continuación se presentan una serie de alternativas que consideramos podrían mejorar o complementar la estrategia utilizada y los resultados obtenidos en el presente trabajo.

7.2.1. Posibles estrategias para evitar los efectos inespecíficos de la inyección del vector adenoviral

7.2.1.1. Nuevos vectores.

El efecto deletéreo inespecífico de la inyección del adenovector sobre las neuronas dopaminérgicas, si bien no impidió visualizar los resultados presentados, tuvo un efecto inespecífico sobre la vitalidad de las neuronas dopaminérgicas. Sería interesante generar un nuevo vector que exprese Cre, como por ejemplo los adenovectores que no poseen secuencia alguna del adenovirus (desnudos o “gutless”), los cuales se sabe que generan una reacción tisular menor (Morsy & Caskey 1999).

Otra alternativa podría ser la utilización de vectores lentivirales, los cuales se han visto que pueden transducir eficientemente la s.n. del ratón (Bensadoun et al 2000). Incluso ya han sido generados dichos vectores que expresan Cre junto con un sistema de autoeliminación para evitar cualquier efecto tóxico de dicha proteína *in vivo* (Pfeifer et al 2001).

Finalmente, también ha sido desarrollado y utilizado un vector basado en el virus del herpes que expresa esta recombinasa y que fue utilizado eficientemente para lograr la expresión condicional del factor de crecimiento nervioso (NGF) en el hipocampo de la rata (Brooks et al 1997). Sin embargo, faltaría estudiar cuál sería la distribución y el tropismo del mismo en las neuronas de la s.n..

7.2.1.2. Nuevos animales modificados genéticamente.

Otra estrategia podría basarse en utilizar una línea de animales transgénicos que expresen constitutivamente Cre en todas sus células en lugar del adenovector (Schwenk et al 1995). La idea sería cruzar ambas líneas de animales, y analizar la progenie (en la cual todas las células deberían tener el cassette PGK-neo recombinado, y la expresión del TNF aumentada bajo la expresión de engrailed). Sin embargo, se debe tener en cuenta que ello sucederá desde el desarrollo, y que podrían aparecer efectos compensatorios, lo cual no sucede en la estrategia utilizada para el presente trabajo, donde el TNF es aumentado solo en la vida adulta.

Otra alternativa sería generar un ratón capaz de expresar Cre bajo el control del promotor de tetraciclina (sistema “tet-on”). De la cruce de dicho animal con el ratón knock-in descrito en el presente trabajo surgiría un animal capaz de expresar CRE en la vida adulta ante la administración de doxiciclina, la cual recombinaría la secuencia floxeada y escindiría a PGK-neo. Así, se evitaría la

cirugía invasiva para transducir las neuronas de la snpc. Esta estrategia ya ha sido utilizada para otros tejidos o regiones cerebrales (Rohlmann et al 1996), y cabe destacar que una expresión transiente de Cre es suficiente para recombinar el sitio blanco (Utomo et al 1999). Sin embargo, este sistema también presentaría ciertas desventajas, ya que a pesar de la ausencia del inductor se sabe que hay expresión basal dirigida por ese promotor (Utomo et al 1999), y que podría llevar a una mínima expresión de Cre que recombine a PGK-neo en el desarrollo.

7.2.2. Estrategias para mejorar la expresión y detección del transgén.

De nuestros resultados se desprende claramente que la expresión de un transgén dirigida por el promotor engrailed, será específico para la s.n. y permitirá realizar estudios detallados de la función de proteínas en animales con relación a la PD.

Sin embargo, también queda claro que el nivel de expresión que genera es muy bajo. Por lo general, los promotores endógenos son muy “débiles”, y ello ha sido visto, por ejemplo, en estrategias experimentales similares a la nuestra donde han descrito varias alteraciones neurológicas dados por la interleuquina 6 (IL-6) sin poder siquiera detectar la proteína (Campbell 1998; Campbell et al 1993).

El sistema de detección del transgén podría mejorarse utilizando reactivos de detección más sensibles o mejor caracterizados. Por ejemplo, agregándole un “cola” (por ej. , de histidinas) para identificarlo en forma indirecta, o expresando un transgén reportero separado del de interés por un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES, “Internal Ribosomal Entry Site”), que permita la expresión de ambos al mismo tiempo a partir del mismo ARNm (Jang et al 1988).

Por otro lado, si se busca aumentar el nivel de expresión de la proteína, se puede utilizar, por ejemplo, una estrategia que aumente la traducción de un ARNm, como puede ser el elemento de regulación post-transcripcional del virus de la hepatitis woodchuck (WPRE), el cual se sabe que colocado en la región 3' no traducida de un transgén de interés, aumenta la traducción del mismo varias veces (Zufferey et al 1999). Una segunda opción sería la utilización de un promotor viral “fuerte”, como, por ejemplo, las “Long terminal repeats” (LTR) del virus del sarcoma de Rous (RSV).

7.2.3. Knock-out condicional para TNF en la s.n..

No menos interesante sería la posibilidad de generar un ratón knock-in con la expresión constitutiva de TNF bajo el promotor engrailed endógeno (sin la presencia del cassette PGK-neo), estando dicho transgén del TNF floxeado. Esta estrategia permitiría en algún momento de la vida del animal “apagar” la expresión del transgén (knock-out condicional) y estudiar la reversibilidad de los efectos neuroprotectores o neurodegenerativos del TNF.

Esta estrategia también podría utilizarse para estudiar cualquier otro transgén o gen endógeno. Un ejemplo que resalta la importancia de esta estrategia fue recientemente publicado, en el cual la expresión de la proteína huntingtina mutada fue condicionalmente expresada en el cerebro de animales, los cuales desarrollaron inclusiones neuronales, más alteraciones neuropatológicas y motoras características de la enfermedad de Huntington. Sin embargo, cuando la expresión fue bloqueada en algún momento del desarrollo de la enfermedad, los síntomas mejoraron significativamente, lo cual indicó que era necesaria la presencia continua de la proteína para la enfermedad (Yamamoto et al 2000). Sería interesante realizar un experimento similar para proteínas involucradas tanto en las formas genéticas como en las esporádicas de la PD en nuestro modelo experimental.

7.2.4. Ratones knock-out, transgénicos, knock-in, hipomórficos: series alélicas.

Lo descrito hasta el momento, tanto de la literatura como de nuestros resultados, indicarían que un knock-out o un transgénico con un único nivel de expresión podrían no ser suficientes para entender completamente el papel que una proteína puede desempeñar en un organismo completo. Las diferencias en el fenotipo final que se pueden obtener en un modelo animal con una misma proteína expresada en diferentes niveles, resaltan la idea propuesta por varios autores de la necesidad de generar “series alélicas” de ratones (animales con diferentes niveles de expresión de un mismo transgén) para definir completamente la función de una proteína en un modelo *in vivo*.

Un ejemplo es la estrategia desarrollada para crear una línea de ratones “alelogénica” (diferentes líneas de ratones con distintos niveles de expresión de un transgén) para el gen *Fgf8*, un gen de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Se obtuvieron diferentes niveles de expresión del factor y se pudieron determinar diferentes funciones en la gastrulación y el desarrollo del cráneo, cerebro, cerebelo, etc., (Meyers et al 1998). Varias de ellas hubieran pasado desapercibidas si se hubiera obtenido un solo nivel de expresión.

Todo hace pensar que las evidencias que se obtienen con proteínas protectoras o degenerativas en un único modelo de estudio, con un único nivel de expresión, orientadas a ser luego utilizadas como terapia en PD, deben ser más extensamente estudiadas antes de cualquier intento terapéutico en la clínica.

7.3. El TNF tiene un efecto dual sobre las neuronas dopaminérgicas de la s.n. en el ratón. Posibles mecanismos de neuroprotección o neurodegeneración.

Los resultados presentados en este trabajo han revelado que el TNF tiene un efecto dual sobre las neuronas dopaminérgicas de la s.n.. Cuando la expresión del TNF es aumentada en forma crónica en la s.n., en la vida adulta del animal, esta citoquina induce la paulatina muerte de las neuronas dopaminérgicas. Por otro lado, utilizando un modelo aceptado de PD, como es la inyección de 6-OHDA en el estriado del animal, no encontramos que el TNF en ninguna de sus formas (basal o elevada), pudiera proteger las fibras TH+ en esta última región del cerebro. Sin embargo, resultó muy interesante observar que el nivel basal de citoquina logró proteger, comparando con cualquier otro grupo experimental, un número significativamente mayor de cuerpos neuronales en la s.n..

7.3.1. Posibles mecanismos de neuroprotección inducidos por el TNF en la s.n..

Numerosos autores han demostrado extensamente que el GDNF es el factor neurotrófico más potente para las neuronas de la s.n., y que su transferencia a dicha región del cerebro en diferentes modelos de la PD logra proteger dichas neuronas (Akerud et al 2001; Bensadoun et al 2000; Bilang-Bleuel et al 1997; Choi-Lundberg et al 1997; Gash et al 1996; Mandel et al 1997; Rosenblad et al 1999; Sauer et al 1995; Winkler et al 1996). A su vez, se ha descrito que el TNF puede inducir la expresión del GDNF en astrocitos en cultivo (Appel et al 1997). Será interesante analizar la expresión de este factor neurotrófico en la s.n de nuestros animales.

Un punto adicional de coincidencia entre ambas moléculas es que, a pesar de ser tan potente, existen evidencias que el GDNF expresado sólo en la s.n. no puede proteger las terminales dopaminérgicas en el estriado contra la 6-OHDA, mientras que si mantiene vivos los cuerpos neuronales. Lo mismo sucede en nuestro modelo con la expresión basal del TNF. El GDNF sí logra proteger todo el sistema dopaminérgico contra la 6-OHDA en la rata si es colocado en el estriado (Kirik

et al 2000). Por ello, será interesante estudiar si niveles muy bajos de TNF en el estriado de modelos animales de PD pueden tener un efecto similar al GDNF.

Recientemente se ha demostrado que neuronas del ganglio retinal dañadas mecánicamente en su axón son protegidas por el TNF. Lo haría a través de mantener el balance iónico de potasio, y activando la vía anti-apoptótica de la PI3K-Akt (Diem et al 2001).

Otra línea de investigación indica que el TNF puede inducir la expresión de la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD)(Wong & Goeddel 1988). Esta proteína ha sido particularmente relacionada con la neuroprotección mediada por TNF. Animales knock-out para ambos receptores (p55 y p75) presentan un aumento en la pérdida de neuronas en el hipocampo ante la inyección de ácido kaínico y mayor área de infarto ante una isquemia cerebral focal (Bruce et al 1996). Parte del efecto protector sería a través de la inducción de moléculas anti-oxidantes, como la MnSOD. Evidencia adicional indica que la proteína MnSOD protegió líneas celulares neuronales y las neuronas de ratones transgénicos ante los insultos oxidativos inducidos por hierro, la proteína beta-amiloide o factores generadores de óxido nítrico (Keller et al 1998). Datos publicados del mismo grupo indican que el TNF es neuroprotector ante el estrés oxidativo mediado por el ácido 3-nitropropiónico (3-NP), y que precisamente lo logra a través del aumento en la actividad de la MnSOD (Bruce-Keller et al 1999).

Además, el TNF podría estar modulando la apoptosis neuronal. Animales transgénicos (Offen et al 1998) o vectores virales expresando el gen anti-apoptótico Bcl-2 (Yamada et al 1999), protegen las neuronas dopaminérgicas del efecto tóxico de la 6-OHDA. Existen evidencias que en neuronas primarias de hipocampo de rata, el TNF activa a NFkB, el cual provocaría un aumento en la expresión de los genes Bcl-2 y Bcl-xl, induciendo protección contra hipoxia y óxido nítrico (Tamatani et al 1999). Dicho factor de transcripción, así como el TNF, han sido encontrados aumentados en la s.n. de pacientes; sin embargo, no se ha definido su función en los mismos (Hunot et al 1997).

Por otro lado, se sabe que una subpoblación de neuronas dopaminérgicas expresando proteínas de unión a calcio son resistentes a la 6-OHDA, en el modelo experimental ya descrito (Tsuboi et al 2000). Asimismo, existen evidencias que el TNF puede proteger neuronas embrionales de hipocampo y corteza en cultivo contra la toxicidad mediada por privación de glucosa y aminoácidos excitotóxicos. Lo haría aumentando la expresión de la proteína Calbindina-D28k (Cheng et al 1994). Sería interesante estudiar como es la expresión de ésta y otras proteínas de unión a calcio en nuestros animales, antes y después del tratamiento con 6-OHDA.

Todas estas alternativas pueden ser testeadas en nuestro modelo.

7.3.2. Posibles mecanismos de neurodegeneración inducidos por el TNF en la s.n..

Las neuronas dopaminérgicas son sensibles al estrés oxidativo, el cuál puede ser provocado por óxido nítrico. Se ha descubierto que ratones knock-out para la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) son resistentes al MPTP (Liberatore et al 1999). También se sabe que el TNF, a través de sus dos receptores, puede inducir a la iNOS (Riches et al 1998). De esto se desprende que la expresión crónica de esta citoquina podría estar generando estrés oxidativo en la s.n..

Como ya se mencionó anteriormente, una reacción inflamatoria y la activación de la microglía (donde el TNF podría ser responsable) podrían tener relación con la muerte neuronal en la PD. En línea con esa propuesta, un anti-inflamatorio como la minociclina resultó ser protector contra la neurodegeneración mediada por 6-OHDA (He et al 2001). Será interesante estudiar en nuestros animales si el mismo u otro anti-inflamatorio podrá también proteger la s.n.. Respondería si el TNF está ejerciendo su efecto degenerativo en forma directa sobre las neuronas a través de sus receptores, o quizás a través de activar la microglía y la liberación de factores tóxicos por parte de la misma.

Nuevamente, el TNF podría estar modulando la apoptosis neuronal. El bloqueo de la kinasa n-jun (JNK) se ha demostrado que es protector en ratones tratados con MPTP (Xia et al 2001). Como se sabe que el TNF puede activar la expresión de dicha kinasa (Haridas et al 1998), es factible que el aumento crónico del TNF pudiera mantener constitutivamente activada la vía de señalización de la misma, induciendo un efecto tóxico sobre las neuronas.

Recientemente se descubrió un mecanismo por el cual el TNF sería neurodegenerativo, y se lo dio a llamar “silenciamiento de la señal de sobrevida” (SOSS, “Silencing of Survival Signal”); se determinó que concentraciones de TNF tan bajas como 10 pg/ml podían inhibir la activación de la PI3K, reduciendo la capacidad del IGF-1 para mantener la sobrevida de neuronas primarias de cerebelo de ratón (Venters et al 1999)(revisado en (Venters et al 2001; Venters et al 2000)).

Finalmente, también hace poco tiempo se ha reportado un mecanismo por el cual el TNF liberado por los astrocitos estimulados a través del receptor CXCR-4 por su ligando provocaría la activación del NFkB. Dicha activación provocaría la liberación de más TNF, la activación de la microglía, y esto provocaría la liberación masiva de glutamato por los astrocitos, que finalmente induciría la muerte neuronal por excitotoxicidad (Bezzi et al 2001; Han et al 2001). Será interesante estudiar el perfil de expresión y liberación de glutamato en nuestro modelo animal, para determinar si es posible que la activación crónica del TNF pudiera estar generando excitotoxicidad mediada por glutamato en forma continua, y esto a su vez matando las neuronas dopaminérgicas.

Así, existen numerosos estudios sobre moléculas que protegen o matan a las neuronas dopaminérgicas. Muchas de ellas pueden ser, directa o indirectamente, relacionadas al TNF, lo cual a su vez lo involucran como un posible factor neuroprotector o neurodegenerativo. Esperamos que el modelo animal que hemos presentado en este trabajo podrá ser útil para ayudar a aclarar cual puede ser el efecto final del TNF con relación a la PD, y su relación con la expresión de otras moléculas involucradas en la patología.

Una estrategia para analizar cuál es el perfil de expresión de todas ellas en nuestro modelo, podría basarse en “microarrays”. Asimismo, se espera obtener información sobre la expresión de los receptores en cada uno de los distintos tratamientos.

7.4. Otras evidencias que apoyan el posible efecto dual del TNF.

Al momento de comenzar este trabajo existían numerosos reportes que mencionaban una serie de evidencias contradictorias sobre el efecto del TNF en diversos modelos de neurodegeneración (descritos en la introducción, “TNF en el SNC”). Sin embargo, no había ningún reporte que indicara que podría ser tanto degenerativo como neuroprotector en el mismo sistema experimental. Solo recientemente han comenzado a aparecer algunas investigaciones que, al igual que nuestro trabajo, apuntan a esclarecer esas observaciones aunque no se refieren a modelos de la PD:

a) Abundante evidencia apuntaba a que el TNF era un importante mediador de la esclerosis múltiple (Merrill & Benveniste 1996). Por esa razón se realizaron ensayos clínicos bloqueando sistémicamente a esta citoquina utilizando Lenercept, una inmunoglobulina de fusión con el TNFR-1. (, 1999). Sin embargo, los pacientes tratados con la proteína mostraron una exacerbación de los síntomas comparados con los que recibieron placebo, y ello ocurrió incluso más rápido que el grupo control.

Para intentar comprender esta situación, se realizaron nuevos estudios. Se utilizó un modelo aceptado de esclerosis múltiple (EAE, “experimental autoimmune encephalomyelitis”, o encefalomiélitis experimental autoinmune), en combinación con ratones deficientes para el TNF. Los mismos revelaron que el TNF, si bien era importante en el inicio de la inflamación en el cerebro, también lo era hacia el final de la reacción inflamatoria para detener la activación de linfocitos reactivos contra la mielina, ya que si la citoquina estaba ausente, la EAE se exacerbaba. Más aún, demostraron que este proceso es dependiente del TNFR-1 (Kassiotis & Kollias 2001).

Estudios incluso más recientes han utilizado ratones knock-out para el TNFR-1 o el TNFR-2, tratados con una toxina que demieliniza en forma muy controlada y reversible el cerebro del animal, llamada cuprizona. Así, demostraron que el TNF, una molécula particularmente tóxica para los oligodendrocitos maduros, es fundamental para la proliferación de los progenitores de estas células en el cerebro del animal adulto, especialmente a través de la señalización a través del TNFR-2 (Arnett et al 2001).

Es intrigante una publicación de algunos años atrás, utilizando un modelo de Esclerosis Múltiple inyectando animales con la glicoproteína de la mielina del oligodendrocito (MOG). Los autores describen que animales knock-out para el TNF presentan mayor inflamación y demielinización que los animales silvestres, proponiendo al TNF como un potente factor anti-inflamatorio en esas condiciones (Liu et al 1998).

b) recientemente ha sido publicado un trabajo en el cual los autores destacan que los receptores para TNF tienen efectos opuestos en un modelo de isquemia en la retina del ratón. El estudio lo realizaron con animales knock-out para el TNF, el TNFR-1 o el TNFR-2. Mientras el TNFR-1 mediaría la muerte neuronal en la retina, el TNFR-2 protegería a las mismas, este último probablemente a través de la vía de la proteína kinasa B/Akt (Fontaine et al 2002).

c) unos pocos meses atrás fue publicado un trabajo en el cual se describe que neuronas de hipocampo *in vitro*, al ser tratadas con TNF, sufren muerte neuronal a través del receptor 1, mientras que la sobreexpresión en las mismas neuronas del TNFR-2 podía no tener efecto o ser incluso trófico para las mismas (Yang et al 2002).

Evidencia adicional indica que también en otras patologías (como el daño al cerebro mediado por isquemia o trauma), el TNF podría tener un efecto degenerativo en la respuesta inicial aguda. Sin embargo, modelos experimentales indican que a largo plazo, es necesario para la reparación del tejido (revisado en (Shohami et al 1999)).

De lo observado en la bibliografía se desprende, aparentemente, que la mayoría de las señales degenerativas del TNF pasarían por el TNFR-1, mientras que las señales canalizadas a través del TNFR-2 podrían ser inocuas o incluso neuroprotectoras (Arnett et al 2001; Fontaine et al 2002; Yang et al 2002). Una estrategia factible para contestar estas preguntas es la posibilidad de utilizar ratones knock-out para cada uno y para ambos receptores de TNF.

Todas las evidencias mencionadas apoyan claramente la posibilidad de que el TNF se comporte en forma dual. Teniendo en cuenta que existen en la bibliografía proposiciones mencionando la posibilidad de realizar terapias para enfermedades neurodegenerativas que proponen las citoquinas como blanco de las mismas (Yang et al 2002), es nuestra convicción que estas estrategias terapéuticas deben ser cuidadosamente planeadas. Más importante aún, es arriesgado extraer conclusiones definitivas sobre el rol de una proteína en una patología a partir de un único modelo de estudio.

De nuestros resultados se desprende que bajas concentraciones de TNF pudieron proteger 3 veces más neuronas que en un ratón control en un modelo aceptado de la PD como es la inyección de la 6-OHDa. Teniendo en cuenta que existe un “umbral” de muerte neuronal a partir del cual se comienzan a sufrir los síntomas del PD ((Lang & Lozano 1998a), y figura 14), esperamos que si algún tratamiento fuera capaz de al menos una modesta protección, será muy importante para la calidad de vida de los pacientes.

Por otra parte, aún si no se considera la posibilidad de inyectar una citoquina pro-inflamatoria en la s.n. de pacientes como factor protector, es muy importante terminar de definir claramente cual es el papel del mismo en dicha región del cerebro. Si una concentración baja es protectora (como la que podría haber en el cerebro de los pacientes en forma basal), en principio no habría que tratar a pacientes con inmunosupresores, a riesgo de quizás provocar un efecto deletéreo como en los pacientes mencionados con esclerosis múltiple.

7.5. Nuevo modelo de la PD.

Finalmente, el aumento crónico en la expresión del TNF en la s.n. del ratón recapitula muchas de las características de la PD.

En dicha enfermedad, las neuronas dopaminérgicas mueren en un proceso lento. Los modelos animales con neurotoxinas son relativamente agudos (MPTP, 6-OHDa), a pesar que se han buscado condiciones para hacerlos lo más progresivos posibles (Beal 2001; Sauer & Oertel 1994). Es destacable que en nuestro modelo animal, la muerte neuronal se da en forma más lenta que en los ya mencionados. Evidencia de ello es, por ejemplo, la respuesta de los animales a la apomorfina. Mientras que en el modelo considerado “progresivo” con 6-OHDa inyectada en el estriado, los animales rotan a los 15-20 días, nuestros animales tardan 40-50 días para comenzar a hacerlo. Eso habla de un proceso de degeneración neuronal e hipersensibilización de los receptores dopaminérgicos mucho más lento que en otros modelos ampliamente aceptados de la PD. Asimismo, mientras en el primero el número de

neuronas remanentes a los 20 días es de aproximadamente el 20% del lado contralateral sano, en nuestros animales todavía están presentes el 50%.

Otra característica que es importante mencionar, es que el patrón de pérdida de fibras TH+ en el estriado de los animales sigue el mismo patrón que en otros modelos animales y que los humanos, esto es, dorsolateral a medioventral (Lang & Lozano 1998a; Sauer & Oertel 1994).

Hay que destacar que en nuestro modelo animal, aproximadamente sólo el 50% de los animales rotan, a pesar de haber sido correctamente inyectados (evidenciado porque no presentan diferencias en el número de neuronas en la s.n.). Esto podría ser un inconveniente si se requiere que la extensión de la denervación en el estriado sea homogénea para un estudio en particular. Una solución a ello es inyectar con apomorfina a los animales y detectar aquellos con más del 70-75 % de pérdida de la reactividad para TH en el estriado. Por otro lado, también podría ser interesante realizar estudios comparativos entre animales con distintos niveles de lesión: no se sabe si la respuesta de las neuronas dopaminérgicas a una determinada droga podría ser diferente dependiendo de la densidad de las mismas en la s.n. o el estriado.

Será interesante también analizar en estos animales knock-in por qué hay diferencias en la densidad para fibras TH+ en el estriado, siendo que casi no las hay en el número de cuerpos neuronales en la s.n.

Resumiendo, la sobreexpresión del TNF en forma crónica en las neuronas dopaminérgicas de la s.n. del ratón nos ha provisto con un nuevo modelo de PD, que recopila algunas de las características de otros modelos ampliamente utilizados, y que agrega otras que serán interesantes de estudiar para aportar nuevos datos en el estudio de la PD.

Bibliografía.

8. Bibliografia.

- ,1999. TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology* 53:457-65.
- Abeliovich, A., Schmitz, Y., Farinas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W. H., et al. 2000. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25:239-52
- Agah, R., Frenkel, P. A., French, B. A., Michael, L. H., Overbeek, P. A., Schneider, M. D. 1997. Gene recombination in postmitotic cells. Targeted expression of Cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle in vivo. *J Clin Invest* 100:169-79.
- Akassoglou, K., Probert, L., Kontogeorgos, G., Kollias, G. 1997. Astrocyte-specific but not neuron-specific transmembrane TNF triggers inflammation and degeneration in the central nervous system of transgenic mice. *J Immunol* 158:438-45
- Akerud, P., Canals, J. M., Snyder, E. Y., Arenas, E. 2001. Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 21:8108-18.
- Akli, S., Caillaud, C., Vigne, E., Stratford-Perricaudet, L. D., Poenaru, L., et al. 1993. Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors. *Nat Genet* 3:224-8.
- Alexi, T., Borlongan, C. V., Faull, R. L., Williams, C. E., Clark, R. G., et al. 2000. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog Neurobiol* 60:409-70
- Allan, S. M., Allan, S. M., Rothwell, N. J. 2001. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2:734-44.
- Aloe, L., Fiore, M. 1997. TNF-alpha expressed in the brain of transgenic mice lowers central tyroxine hydroxylase immunoreactivity and alters grooming behavior. *Neurosci Lett* 238:65-8.
- Appel, E., Kolman, O., Kazimirsky, G., Blumberg, P. M., Brodie, C. 1997. Regulation of GDNF expression in cultured astrocytes by inflammatory stimuli. *Neuroreport* 8:3309-12.
- Arnett, H. A., Mason, J., Marino, M., Suzuki, K., Matsushima, G. K., Ting, J. P. 2001. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 4:1116-22.
- Ashkenazi, A., Dixit, V. M. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305-8
- Bajocchi, G., Feldman, S. H., Crystal, R. G., Mastrangeli, A. 1993. Direct in vivo gene transfer to ependymal cells in the central nervous system using recombinant adenovirus vectors. *Nat Genet* 3:229-34.
- Baud, V., Karin, M. 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 11:372-7.
- Bazzoni, F., Beutler, B. 1996. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 334:1717-25.

- Beal, M. F. 2001. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2:325-34.
- Bensadoun, J. C., Deglon, N., Tseng, J. L., Ridet, J. L., Zurn, A. D., Aebischer, P. 2000. Lentiviral vectors as a gene delivery system in the mouse midbrain: cellular and behavioral improvements in a 6-OHDA model of Parkinson's disease using GDNF. *Exp Neurol* 164:15-24.
- Berg, D., Gerlach, M., Youdim, M. B., Double, K. L., Zecca, L., et al. 2001. Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 79:225-36.
- Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V., Greenamyre, J. T. 2000. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3:1301-6.
- Beyaert, R., Fiers, W. 1994. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not. *FEBS Lett* 340:9-16.
- Bezard, E., Brotchie, J. M., Gross, C. E. 2001. Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies. *Nat Rev Neurosci* 2:577-88.
- Bezzi, P., Domercq, M., Brambilla, L., Galli, R., Schols, D., et al. 2001. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci* 4:702-10.
- Bilang-Bleuel, A., Revah, F., Colin, P., Locquet, I., Robert, J. J., et al. 1997. Intrastratial injection of an adenoviral vector expressing glial-cell-line-derived neurotrophic factor prevents dopaminergic neuron degeneration and behavioral impairment in a rat model of Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8818-23
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., et al. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* 385:729-33
- Blandini, F., Nappi, G., Tassorelli, C., Martignoni, E. 2000. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 62:63-88.
- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M., Benabid, A., et al. 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 65:135-72.
- Boka, G., Anglade, P., Wallach, D., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Hirsch, E. C. 1994. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 172:151-4.
- Breder, C. D., Hazuka, C., Ghayur, T., Klug, C., Huginin, M., et al. 1994. Regional induction of tumor necrosis factor α expression in the mouse brain after systemic lipopolysaccharide administration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11393-7
- Brooks, A. I., Mukherjee, B., Panahian, N., Cory-Slechta, D., Federoff, H. J. 1997. Nerve growth factor somatic mosaicism produced by herpes virus-directed expression of cre recombinase. *Nat Biotechnol* 15:57-62
- Bruce, A. J., Boling, W., Kindy, M. S., Peschon, J., Kraemer, P. J., et al. 1996. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med* 2:788-94

-
- Bruce-Keller, A. J., Geddes, J. W., Knapp, P. E., McFall, R. W., Keller, J. N., et al. 1999. Anti-death properties of TNF against metabolic poisoning: mitochondrial stabilization by MnSOD. *J Neuroimmunol* 93:53-71.
- Brunsgaard, H., Pedersen, M., Pedersen, B. K. 2001. Aging and proinflammatory cytokines. *Curr Opin Hematol* 8:131-6.
- Campbell, I. L. 1998. Transgenic mice and cytokine actions in the brain: bridging the gap between structural and functional neuropathology. *Brain Res Brain Res Rev* 26:327-36.
- Campbell, I. L., Abraham, C. R., Masliah, E., Kemper, P., Inglis, J. D., et al. 1993. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10061-10065
- Capecchi, M. R. 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244:1288-92.
- Cheng, B., Christakos, S., Mattson, M. P. 1994. Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron* 12:139-53.
- Choi-Lundberg, D. L., Lin, Q., Chang, Y. N., Chiang, Y. L., Hay, C. M., et al. 1997. Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy [see comments]. *Science* 275:838-41
- Chung, K. K., Zhang, Y., Lim, K. L., Tanaka, Y., Huang, H., et al. 2001. Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med* 7:1144-50.
- Corti, O., Sabate, O., Horellou, P., Colin, P., Dumas, S., et al. 1999a. A single adenovirus vector mediates doxycycline-controlled expression of tyrosine hydroxylase in brain grafts of human neural progenitors. *Nat Biotechnol* 17:349-54.
- Corti, O., Sanchez-Capelo, A., Colin, P., Hanoun, N., Hamon, M., Mallet, J. 1999b. Long-term doxycycline-controlled expression of human tyrosine hydroxylase after direct adenovirus-mediated gene transfer to a rat model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12120-5.
- Davidson, B. L., Allen, E. D., Kozarsky, K. F., Wilson, J. M., Roessler, B. J. 1993. A model system for in vivo gene transfer into the central nervous system using an adenoviral vector. *Nat Genet* 3:219-23.
- Dawson, T. M. 2000. New animal models for Parkinson's disease. *Cell* 101:115-8.
- Declercq, W., Denecker, G., Fiers, W., Vandenabeele, P. 1998. Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor 75. *J Immunol* 161:390-9.
- Decoster, E., Vanhaesebroeck, B., Vandenabeele, P., Grooten, J., Fiers, W. 1995. Generation and biological characterization of membrane-bound, uncleavable murine tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 270:18473-8
- DeMayo, F. J., Tsai, S. Y. 2001. Targeted gene regulation and gene ablation. *Trends Endocrinol Metab* 12:348-53.

- Diem, R., Meyer, R., Weishaupt, J. H., Bahr, M. 2001. Reduction of potassium currents and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent AKT phosphorylation by tumor necrosis factor-(alpha) rescues axotomized retinal ganglion cells from retrograde cell death in vivo. *J Neurosci* 21:2058-66.
- Dopp, J. M., Mackenzie-Graham, A., Otero, G. C., Merrill, J. E. 1997. Differential expression, cytokine modulation, and specific functions of type-1 and type-2 tumor necrosis factor receptors in rat glia. *J Neuroimmunol* 75:104-12.
- Douni, E., Akassoglou, K., Alexopoulou, L., Georgopoulos, S., Haralambous, S., et al. 1996. Transgenic and knockout analyses of the role of TNF in immune regulation and disease pathogenesis. *J Inflamm* 47:27-38
- Dunnett, S. B., Bjorklund, A. 1999. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature* 399:A32-9
- Erickson, S. L., de Sauvage, F. J., Kikly, K., Carver-Moore, K., Pitts-Meek, S., et al. 1994. Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. *Nature* 372:560-563
- Eugster, H. P., Muller, M., Karrer, U., Car, B. D., Schnyder, B., et al. 1996. Multiple immune abnormalities in tumor necrosis factor and lymphotoxin- alpha double-deficient mice. *Int Immunol* 8:23-36
- Feany, M. B., Bender, W. W. 2000. A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature* 404:394-8.
- Fiering, S., Epner, E., Robinson, K., Zhuang, Y., Telling, A., et al. 1995. Targeted deletion of 5'HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the beta-globin locus. *Genes Dev* 9:2203-13.
- Fiers, W. 1991. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett* 285:199-212.
- Fontaine, V., Mohand-Said, S., Hanoteau, N., Fuchs, C., Pfizenmaier, K., Eisel, U. 2002. Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. *J Neurosci* 22:RC216.
- Franklin, K. B. J., Paxinos, G. 1997. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, Inc.
- Gao, H. M., Hong, J. S., Zhang, W., Liu, B. 2002. Distinct Role for Microglia in Rotenone-Induced Degeneration of Dopaminergic Neurons. *J Neurosci* 22:782-790.
- Gash, D. M., Zhang, Z., Ovadia, A., Cass, W. A., Yi, A., et al. 1996. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature* 380:252-5.
- Gossen, M., Bujard, H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5547-51.

-
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., et al. 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83:793-802
- Gross, C. E., Boraud, T., Guehl, D., Bioulac, B., Bezard, E. 1999. From experimentation to the surgical treatment of Parkinson's disease: prelude or suite in basal ganglia research? *Prog Neurobiol* 59:509-32
- Grunblatt, E., Mandel, S., Youdim, M. B. 2000. Neuroprotective strategies in Parkinson's disease using the models of 6-hydroxydopamine and MPTP. *Ann N Y Acad Sci* 899:262-73.
- Haas, E., Grell, M., Wajant, H., Scheurich, P. 1999. Continuous autotropic signaling by membrane-expressed tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 274:18107-12
- Han, Y., He, T., Huang, D. R., Pardo, C. A., Ransohoff, R. M. 2001. TNF-alpha mediates SDF-1 alpha-induced NF-kappa B activation and cytotoxic effects in primary astrocytes. *J Clin Invest* 108:425-35.
- Hanks, M., Wurst, W., Anson-Cartwright, L., Auerbach, A. B., Joyner, A. L. 1995. Rescue of the En-1 mutant phenotype by replacement of En-1 with En-2 [see comments]. *Science* 269:679-82
- Harashima, S., Horiuchi, T., Hatta, N., Morita, C., Higuchi, M., et al. 2001. Outside-to-inside signal through the membrane TNF-alpha induces E-selectin (CD62E) expression on activated human CD4+ T cells. *J Immunol* 166:130-6.
- Haridas, V., Darnay, B. G., Natarajan, K., Heller, R., Aggarwal, B. B. 1998. Overexpression of the p80 TNF receptor leads to TNF-dependent apoptosis, nuclear factor-kappa B activation, and c-Jun kinase activation. *J Immunol* 160:3152-62.
- He, Y., Appel, S., Le, W. 2001. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Res* 909:187-93.
- Heller, R. A., Song, K., Fan, N., Chang, D. J. 1992. The p70 tumor necrosis factor receptor mediates cytotoxicity. *Cell* 70:47-56.
- Herrera, A. J., Castano, A., Venero, J. L., Cano, J., Machado, A. 2000. The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. *Neurobiol Dis* 7:429-47.
- Hirsch, E. C., Hunot, S. 2000. Nitric oxide, glial cells and neuronal degeneration in parkinsonism. *Trends Pharmacol Sci* 21:163-5.
- Hirsch, E. C., Hunot, S., Damier, P., Faucheux, B. 1998. Glial cells and inflammation in Parkinson's disease: a role in neurodegeneration? *Ann Neurol* 44:S115-20.
- Hopkins, S. J., Rothwell, N. J. 1995. Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition [see comments]. *Trends Neurosci* 18:83-8
- Hsu, H., Xiong, J., Goeddel, D. V. 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81:495-504.

- Hunot, S., Brugg, B., Ricard, D., Michel, P. P., Muriel, M. P., et al. 1997. Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7531-6.
- Hunot, S., Dugas, N., Faucheux, B., Hartmann, A., Tardieu, M., et al. 1999. FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *J Neurosci* 19:3440-7
- Hunot, S., Hartmann, A., Hirsch, E. 2001. The inflammatory response in the Parkinson brain. *Clinical Neuroscience Research* 1:434-443
- Jang, S. K., Krausslich, H. G., Nicklin, M. J., Duke, G. M., Palmenberg, A. C., Wimmer, E. 1988. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* 62:2636-43.
- Kajiwara, K., Byrnes, A. P., Charlton, H. M., Wood, M. J., Wood, K. J. 1997. Immune responses to adenoviral vectors during gene transfer in the brain. *Hum Gene Ther* 8:253-65
- Kassiotis, G., Kollias, G. 2001. Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. *J Exp Med* 193:427-34.
- Kay, M. A., Glorioso, J. C., Naldini, L. 2001. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 7:33-40.
- Keller, J. N., Kindy, M. S., Holtsberg, F. W., St Clair, D. K., Yen, H. C., et al. 1998. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* 18:687-97.
- Kilby, N. J., Snaith, M. R., Murray, J. A. 1993. Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet* 9:413-21
- Kim, W. G., Mohney, R. P., Wilson, B., Jeohn, G. H., Liu, B., Hong, J. S. 2000. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* 20:6309-16
- Kinouchi, K., Brown, G., Pasternak, G., Donner, D. B. 1991. Identification and characterization of receptors for tumor necrosis factor-alpha in the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 181:1532-8.
- Kirik, D., Rosenblad, C., Bjorklund, A., Mandel, R. J. 2000. Long-term rAAV-mediated gene transfer of GDNF in the rat Parkinson's model: intrastriatal but not intranigral transduction promotes functional regeneration in the lesioned nigrostriatal system. *J Neurosci* 20:4686-700
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., et al. 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392:605-8.

- Klein, R. L., Lewis, M. H., Muzyczka, N., Meyer, E. M. 1999. Prevention of 6-hydroxydopamine-induced rotational behavior by BDNF somatic gene transfer. *Brain Res* 847:314-20.
- Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., Lu, S. D. 1988. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53:45-53
- Lang, A. E., Lozano, A. M. 1998a. Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 339:1044-53.
- Lang, A. E., Lozano, A. M. 1998b. Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med* 339:1130-43.
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., Irwin, I. 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219:979-80.
- Langston, J. W., Forno, L. S., Tetrud, J., Reeves, A. G., Kaplan, J. A., Karluk, D. 1999. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol* 46:598-605.
- Le Gal La Salle, G., Robert, J. J., Berrard, S., Ridoux, V., Stratford-Perricaudet, L. D., et al. 1993. An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science* 259:988-90.
- Lewandoski, M. 2001. Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* 2:743-55.
- Lewis, M., Tartaglia, L. A., Lee, A., Bennett, G. L., Rice, G. C., et al. 1991. Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2830-4
- Liberatore, G. T., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Mandir, A. S., Vila, M., et al. 1999. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med* 5:1403-9.
- Lieberman, A. P., Pitha, P. M., Shin, H. S., Shin, M. L. 1989. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with liposaccharide or a neutropic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:6348-6352
- Lin, R. H., Hwang, Y. W., Yang, B. C., Lin, C. S. 1997. TNF receptor-2-triggered apoptosis is associated with the down-regulation of Bcl-xL on activated T cells and can be prevented by CD28 costimulation. *J Immunol* 158:598-603
- Liu, B., Jiang, J. W., Wilson, B. C., Du, L., Yang, S. N., et al. 2000. Systemic infusion of naloxone reduces degeneration of rat substantia nigral dopaminergic neurons induced by intranigral injection of lipopolysaccharide. *J Pharmacol Exp Ther* 295:125-32.
- Liu, J., Marino, M. W., Wong, G., Grail, D., Dunn, A., et al. 1998. TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. *Nat Med* 4:78-83
- Liu, X. H., Xu, H., Barks, J. D. 1999. Tumor necrosis factor- α attenuates N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity in neonatal rat hippocampus. *Brain Res* 851:94-104.

- Liu, Z. G., Hsu, H., Goeddel, D. V., Karin, M. 1996. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 87:565-76
- Locksley, R. M., Killeen, N., Lenardo, M. J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104:487-501.
- Loetscher, H., Pan, Y. C., Lahm, H. W., Gentz, R., Brockhaus, M., et al. 1990. Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* 61:351-9.
- Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H. B., Allak, B. A., van Drunen, E., et al. 2001. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9209-14.
- Lozano, A. M., Lang, A. E., Hutchison, W. D., Dostrovsky, J. O. 1998. New developments in understanding the etiology of Parkinson's disease and in its treatment. *Curr Opin Neurobiol* 8:783-90
- Mandel, R. J., Spratt, S. K., Snyder, R. O., Leff, S. E. 1997. Midbrain injection of recombinant adeno-associated virus encoding rat glial cell line-derived neurotrophic factor protects nigral neurons in a progressive 6-hydroxydopamine-induced degeneration model of Parkinson's disease in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14083-8
- Mansuy, I. M., Bujard, H. 2000. Tetracycline-regulated gene expression in the brain. *Curr Opin Neurobiol* 10:593-6.
- Masliyah, E., Rockenstein, E., Veinbergs, I., Mallory, M., Hashimoto, M., et al. 2000. Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* 287:1265-9.
- Mayford, M., Bach, M. E., Huang, Y. Y., Wang, L., Hawkins, R. D., Kandel, E. R. 1996. Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* 274:1678-83
- McDevitt, M. A., Shivdasani, R. A., Fujiwara, Y., Yang, H., Orkin, S. H. 1997. A "knockdown" mutation created by cis-element gene targeting reveals the dependence of erythroid cell maturation on the level of transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6781-5.
- McGeer, P. L., Itagaki, S., Boyes, B. E., McGeer, E. G. 1988. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38:1285-91.
- McNaught, K. S., Olanow, C. W., Halliwell, B., Isacson, O., Jenner, P. 2001. Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2:589-94.
- Merrill, J. E., Benveniste, E. N. 1996. Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci* 19:331-8.
- Meyers, E. N., Lewandoski, M., Martin, G. R. 1998. An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat Genet* 18:136-41.
- Mirza, B., Hadberg, H., Thomsen, P., Moos, T. 2000. The absence of reactive astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience* 95:425-32.

- Mogi, M., Togari, A., Tanaka, K., Ogawa, N., Ichinose, H., Nagatsu, T. 1999. Increase in level of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats without influence of systemic L-DOPA on the TNF-alpha induction [In Process Citation]. *Neurosci Lett* 268:101-4
- Mogi, M., Togari, A., Tanaka, K., Ogawa, N., Ichinose, H., Nagatsu, T. 2000. Increase in level of tumor necrosis factor-alpha in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats is suppressed by immunosuppressant FK506. *Neurosci Lett* 289:165-8.
- Morsy, M. A., Caskey, C. T. 1999. Expanded-capacity adenoviral vectors--the helper-dependent vectors. *Mol Med Today* 5:18-24
- Moss, M. L., Jin, S. L., Milla, M. E., Bickett, D. M., Burkhart, W., et al. 1997. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha [published erratum appears in *Nature* 1997 Apr 17;386(6626):738]. *Nature* 385:733-6
- Mueller, C., Corazza, N., Trachsel-Loseth, S., Eugster, H. P., Buhler-Jungo, M., et al. 1999. Noncleavable transmembrane mouse tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) mediates effects distinct from those of wild-type TNFalpha in vitro and in vivo [In Process Citation]. *J Biol Chem* 274:38112-8
- Munoz-Fernandez, M. A., Fresno, M. 1998. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog Neurobiol* 56:307-40
- Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H., Togari, A. 2000. Cytokines in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*:143-51.
- Nagy, A., Moens, C., Ivanyi, E., Pawling, J., Gertsenstein, M., et al. 1998. Dissecting the role of N-myc in development using a single targeting vector to generate a series of alleles. *Curr Biol* 8:661-4.
- Nishimura, M., Mizuta, I., Mizuta, E., Yamasaki, S., Ohta, M., et al. 2001. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 311:1-4.
- Offen, D., Beart, P. M., Cheung, N. S., Pascoe, C. J., Hochman, A., et al. 1998. Transgenic mice expressing human Bcl-2 in their neurons are resistant to 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5789-94.
- Olson, E. N., Arnold, H. H., Rigby, P. W., Wold, B. J. 1996. Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell* 85:1-4.
- Pan, W., Zadina, J. E., Harlan, R. E., Weber, J. T., Banks, W. A., Kastin, A. J. 1997. Tumor necrosis factor-alpha: a neuromodulator in the CNS. *Neurosci Biobehav Rev* 21:603-13.
- Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Episkopou, V., Kollias, G. 1996. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* 184:1397-411.

-
- Perez, C., Albert, I., DeFay, K., Zachariades, N., Gooding, L., Kriegler, M. 1990. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell* 63:251-8
- Pfeffer, K., Matsuyama, T., Kundig, T. M., Wakeham, A., Kishihara, K., et al. 1993. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 73:457-67.
- Pfeifer, A., Brandon, E. P., Kootstra, N., Gage, F. H., Verma, I. M. 2001. Delivery of the Cre recombinase by a self-deleting lentiviral vector: efficient gene targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11450-5.
- Pitossi, F., del Rey, A., Kabiersch, A., Besedovsky, H. 1997. Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. *J Neurosci Res* 48:287-98.
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., et al. 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease [see comments]. *Science* 276:2045-7
- Porter, A. 1998. Controlling your losses: conditional gene silencing in mammals. *Trends Genet* 14:73-9.
- Probert, L., Akassoglou, K., Pasparakis, M., Kontogeorgos, G., Kollias, G. 1995. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11294-8.
- Ramirez-Solis, R., Zheng, H., Whiting, J., Krumlauf, R., Bradley, A. 1993. Hoxb-4 (Hox-2.6) mutant mice show homeotic transformation of a cervical vertebra and defects in the closure of the sternal rudiments. *Cell* 73:279-94.
- Revah, F., Horellou, P., Vignet, E., Le Gal La Salle, G., Robert, J. J., et al. 1996. Protocols for Gene Transfer in Neuroscience: towards Gene Therapy of Neurological Disorders. Jhon Wiley and Sons.
- Riches, D. W., Chan, E. D., Zahradka, E. A., Winston, B. W., Remigio, L. K., Lake, F. R. 1998. Cooperative signaling by tumor necrosis factor receptors CD120a (p55) and CD120b (p75) in the expression of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase by mouse macrophages. *J Biol Chem* 273:22800-6.
- Rohlmann, A., Gotthardt, M., Willnow, T. E., Hammer, R. E., Herz, J. 1996. Sustained somatic gene inactivation by viral transfer of Cre recombinase. *Nat Biotechnol* 14:1562-5.
- Rosenblad, C., Kirik, D., Devaux, B., Moffat, B., Phillips, H. S., Bjorklund, A. 1999. Protection and regeneration of nigral dopaminergic neurons by neurturin or GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease after administration into the striatum or the lateral ventricle. *Eur J Neurosci* 11:1554-66
- Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J., Goeddel, D. V. 1994. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78:681-92.
- Rothwell, N. J., Hopkins, S. J. 1995. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action [see comments]. *Trends Neurosci* 18:130-6

- Ruuls, S. R., Hoek, R. M., Ngo, V. N., McNeil, T., Lucian, L. A., et al. 2001. Membrane-bound TNF supports secondary lymphoid organ structure but is subservient to secreted TNF in driving autoimmune inflammation. *Immunity* 15:533-43.
- Sauer, B., Henderson, N. 1988. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5166-70
- Sauer, H., Oertel, W. H. 1994. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 59:401-15
- Sauer, H., Rosenblad, C., Bjorklund, A. 1995. Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor beta 3 prevents delayed degeneration of nigral dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8935-9
- Schall, T. J., Lewis, M., Koller, K. J., Lee, A., Rice, G. C., et al. 1990. Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* 61:361-70.
- Schoning, B., Elepfandt, P., Lanksch, W. R., Volk, H. D., Woiciechowsky, C. 1999. Continuous infusion of proinflammatory cytokines into the brain to study brain cytokine induced local and systemic immune effects. *Brain Res Brain Res Protoc* 4:217-22.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., Peter, M. E. 1998. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 254:439-59
- Schwenk, F., Baron, U., Rajewsky, K. 1995. A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res* 23:5080-1
- Sei, Y., Vitkovic, L., Yokoyama, M. M. 1995. Cytokines in the central nervous system: regulatory roles in neuronal function, cell death and repair. *Neuroimmunomodulation* 2:121-33
- Shen, Y., Li, R., Shiosaki, K. 1997. Inhibition of p75 tumor necrosis factor receptor by antisense oligonucleotides increases hypoxic injury and beta-amyloid toxicity in human neuronal cell line. *J Biol Chem* 272:3550-3.
- Shohami, E., Ginis, I., Hallenbeck, J. M. 1999. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine Growth Factor Rev* 10:119-30.
- Singh, I., Pahan, K., Khan, M., Singh, A. K. 1998. Cytokine-mediated induction of ceramide production is redox-sensitive. Implications to proinflammatory cytokine-mediated apoptosis in demyelinating diseases. *J Biol Chem* 273:20354-62.
- Sipe, K. J., Dantzer, R., Kelley, K. W., Weyhenmeyer, J. A. 1998. Expression of the 75 kDA TNF receptor and its role in contact-mediated neuronal cell death. *Brain Res Mol Brain Res* 62:111-21
- Slack, R. S., Miller, F. D. 1996. Viral vectors for modulating gene expression in neurons. *Current Opinion in Neurobiology* 6:576-583

-
- Smith, C. A., Davis, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M. P., et al. 1990. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 248:1019-23.
- Smith, C. A., Farrah, T., Goodwin, R. G. 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76:959-62
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., Goedert, M. 1997. Alpha-synuclein in Lewy bodies [letter]. *Nature* 388:839-40
- Sternberg, N., Hamilton, D. 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* 150:467-86
- Szelenyi, J. 2001. Cytokines and the central nervous system. *Brain Res Bull* 54:329-38.
- Talley, A. K., Dewhurst, S., Perry, S. W., Dollard, S. C., Gummuluru, S., et al. 1995. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in human neuronal cells: protection by the antioxidant N-acetylcysteine and the genes bcl-2 and crmA. *Mol Cell Biol* 15:2359-66
- Tamatani, M., Che, Y. H., Matsuzaki, H., Ogawa, S., Okado, H., et al. 1999. Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFkappaB activation in primary hippocampal neurons. *J Biol Chem* 274:8531-8
- Tartaglia, L. A., Weber, R. F., Figari, I. S., Reynolds, C., Palladino, M. A., Goeddel, D. V. 1991. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9292-6.
- Tsien, J. Z., Chen, D. F., Gerber, D., Tom, C., Mercer, E. H., et al. 1996. Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain [see comments]. *Cell* 87:1317-26
- Tsuboi, K., Kimber, T. A., Shults, C. W. 2000. Calretinin-containing axons and neurons are resistant to an intrastriatal 6-hydroxydopamine lesion. *Brain Res* 866:55-64.
- Turrin, N. P., Plata-Salaman, C. R. 2000. Cytokine-cytokine interactions and the brain. *Brain Res Bull* 51:3-9
- Utomo, A. R., Nikitin, A. Y., Lee, W. H. 1999. Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 17:1091-6.
- van der Putten, H., Wiederhold, K. H., Probst, A., Barbieri, S., Mistl, C., et al. 2000. Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *J Neurosci* 20:6021-9
- Venters, H. D., Broussard, S. R., Zhou, J., Bluthe, R., Freund, G. G., et al. 2001. Tumor necrosis factor alpha and insulin-like growth factor-I in the brain: Is the whole greater than the sum of its parts? *J Neuroimmunol* 119:151-65.
- Venters, H. D., Dantzer, R., Kelley, K. W. 2000. A new concept in neurodegeneration: TNFalpha is a silencer of survival signals. *Trends Neurosci* 23:175-80

-
- Venters, H. D., Tang, Q., Liu, Q., VanHoy, R. W., Dantzer, R., Kelley, K. W. 1999. A new mechanism of neurodegeneration: a proinflammatory cytokine inhibits receptor signaling by a survival peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9879-84.
- Vila, M., Wu, D. C., Przedborski, S. 2001. Engineered modeling and the secrets of Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 24:S49-55.
- Wakita, T., Taya, C., Katsume, A., Kato, J., Yonekawa, H., et al. 1998. Efficient conditional transgene expression in hepatitis C virus cDNA transgenic mice mediated by the Cre/loxP system. *J Biol Chem* 273:9001-6.
- Wang, Y., Krushel, L. A., Edelman, G. M. 1996. Targeted DNA recombination in vivo using an adenovirus carrying the cre recombinase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3932-3936
- Wang, Y., Spatz, M. K., Kannan, K., Hayk, H., Avivi, A., et al. 1999. A mouse model for achondroplasia produced by targeting fibroblast growth factor receptor 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4455-60.
- Weiss, T., Grell, M., Siemienski, K., Muhlenbeck, F., Durkop, H., et al. 1998. TNFR80-dependent enhancement of TNFR60-induced cell death is mediated by TNFR-associated factor 2 and is specific for TNFR60. *J Immunol* 161:3136-42
- Willuweit, A., Sass, G., Schoneberg, A., Eisel, U., Tiegs, G., Clauss, M. 2001. Chronic inflammation and protection from acute hepatitis in transgenic mice expressing TNF in endothelial cells. *J Immunol* 167:3944-52.
- Winkler, C., Sauer, H., Lee, C. S., Bjorklund, A. 1996. Short-term GDNF treatment provides long-term rescue of lesioned nigral dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 16:7206-15
- Wong, G. H., Goeddel, D. V. 1988. Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* 242:941-4.
- Xia, X. G., Harding, T., Weller, M., Bieneman, A., Uney, J. B., Schulz, J. B. 2001. Gene transfer of the JNK interacting protein-1 protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10433-8.
- Yamada, M., Oligino, T., Mata, M., Goss, J. R., Glorioso, J. C., Fink, D. J. 1999. Herpes simplex virus vector-mediated expression of Bcl-2 prevents 6-hydroxydopamine-induced degeneration of neurons in the substantia nigra in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4078-83.
- Yamamoto, A., Lucas, J. J., Hen, R. 2000. Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* 101:57-66.
- Yang, L., Lindholm, K., Konishi, Y., Li, R., Shen, Y. 2002. Target depletion of distinct tumor necrosis factor receptor subtypes reveals hippocampal neuron death and survival through different signal transduction pathways. *J Neurosci* 22:3025-32.

- Yang, Y., Nunes, F. A., Berencsi, K., Furth, E. E., Gonczol, E., Wilson, J. M. 1994. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4407-11
- Yuan, J. 1997. Transducing signals of life and death. *Curr Opin Cell Biol* 9:247-51
- Zufferey, R., Donello, J. E., Trono, D., Hope, T. J. 1999. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73:2886-92.

Agradecimientos.

Agradecimientos.

Soy un convencido de que nadie llega a una meta sin haber recibido apoyo de otras personas. Sin embargo, también creo que expresar la gratitud que se tiene para con ellas en unas pocas líneas para cada una, es un don que muy pocas personas tienen.

Yo confío en haberles transmitido mi agradecimiento con cada momento compartido en los últimos años. Igualmente intentaré, con la fluidez característica de que estoy dotado para estas situaciones, expresar lo mejor posible mi gratitud por tantas cosas compartidas;

.- al Dr. Fernando Pitossi, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo, por tanta confianza y tanto apoyo en estos años, por intentar que aprenda a escribir en castellano.

.- al Dr. Osvaldo Podhajcer, por su apoyo y por disponer siempre de un tiempo para escuchar y aconsejar.

.- a las autoridades del IIB, por permitir que me formara en una de las mejores instituciones de la Argentina.

.- a la Fundación Barón, por dar tanto apoyo a nuestro granito de arena a la ciencia en Argentina.

.- al CONICET, por su apoyo económico que me permitió cumplir esta etapa en mi formación (un comentario constructivo: gastaron mucho dinero y esfuerzo para formarnos, tanto a mi como a muchos compañeros; hagamos un esfuerzo para que no nos aprovechen los países extranjeros).

.- a Esteban, mi AMIGO.

.- a mis compañeros de tantos años: Chenófilo, Ecuménico Luchín, Yoggy.

.- a Marcho99, por tu amistad y el elefantito que se balanceaba... durante tantos días de bioterio.

.- a Caffé, por ser de fierro.

.- a “Malvarez”, la persona más dispuesta a dar una mano que conozco.

.- a Carina, por traer la luz de la histología a los cerebros con neuropatologías espongiiformes.

.- a los compañeros del 106-107-108 (preciso otra tesis para hacer la lista completa!!)

.- a los “Moscas”, sea la popular Drosophila o la pujante ceratitis, por toda la buena onda.

.- a Fabio, un maestro (gracias mail!!).

.- a Hilda, por tantos momentos tan gratos, por tanta risa.

.- a Pancho, el Tano, Huguito, Aida (que personajes!!).

.- a Liliana, Tilda, Griseldita, Vanina, Gualterio, Cristian, Georgina, Carlitos, Juan, Mary, Anita, Giusti, por toda la buena disposición y ayudas varias, y en especial a Silvia por las corridas para que llegue todo a tiempo.

.- a Silvana, de Alumnos en la Facultad, que sin conocerme ni yo conocerla, y sin ninguna necesidad, solo buena onda, me dio una mano increíble.

.- al Dr. Uli Eisel, por su apoyo y amistad en Alemania.

.- a Annette, por darme tanta ayuda en su laboratorio, y dedicarme tanto de tu tiempo para mostrarme tu Deutschland.

.- al Dr. Daniel Anthony.

.- a Leica y Stoelting, sin olvidarme de Jackson.