



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGIA Y BIOLOGIA MOLECULAR

Rol de la α -sinucleína en procesos proinflamatorios de células neurales y su regulación mediante terapia génica para IGF-I.

AUTOR

Gaspar Rodriguez

DIRECTORA

Dra. María José Bellini

TUTORA

Lic. Eugenia Falomir Lockhart

INIBIOLP, CONICET-UNLP, Facultad de Ciencias Medicas

Índice

1. Glosario

2. Introducción

2.1. Enfermedad de Parkinson y neurodegeneración

2.2. Células gliales: características, desarrollo y funciones principales

2.2.1. Astrogliá

2.2.2. Microglía

2.2.3. Oligodendrocitos y células de Schwann

2.3. Proteína α -sinucleína y su rol en procesos neurodegenerativos

2.4. Factores neurotróficos

2.4.1. Factor de crecimiento tipo insulínico I (IGF-1)

2.5. Terapia génica

2.5.1. Vectores adenovirales

3. Hipótesis y Objetivos

3.1. Hipótesis:

3.2. Objetivos

4. Materiales y Métodos

4.1. Líneas celulares utilizadas

4.1.1. Procedimiento de cultivo y repique celular

4.1.2. Conteo celular en Cámara de Neubauer

4.1.3. Sub-cultivos y tratamientos realizados

4.2. Vectores adenovirales empleados

4.3. Determinación de parámetros asociados a procesos de estrés celular

- 4.3.1. Viabilidad celular por ensayo MTT
- 4.3.2. Técnica de Griess para la cuantificación de nitritos
- 4.4. Cuantificación de genes asociados a procesos inflamatorios
 - 4.4.1. Método de Trizol para la extracción de RNA total
 - 4.4.2. Obtención de cDNA por transcripción reversa
 - 4.4.3. PCR semicuantitativa
 - 4.4.3.1. Electroforesis en gel de agarosa
 - 4.4.3.2. Uso del software ImageJ para la cuantificación de cDNA
- 4.5. Análisis estadístico de datos

5. Resultados e Interpretación

- 5.1. Efecto de la α -sinucleína sobre la producción de nitritos y la viabilidad celular
 - 5.1.1. Efecto de la α -sinucleína sobre la viabilidad celular
 - 5.1.2. Efecto de la α -sinucleína sobre la producción relativa de nitritos
- 5.2. Efecto de la α -sinucleína sobre la expresión de genes inflamatorios.

6. Conclusiones y perspectiva

7. Referencias

Glosario

- ❖ **ATB/ATM:** antibiótico/antimicótico
- ❖ **Bp:** pares de bases
- ❖ **DA:** neuronas dopaminérgicas (dopaminergic neurons)
- ❖ **DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium
- ❖ **EDTA:** etilen-diamino tetra-acetato de sodio
- ❖ **EP:** Enfermedad de Parkinson
- ❖ **EA:** Enfermedad de Alzheimer
- ❖ **ER:** retículo endoplasmático
- ❖ **HEK293:** línea celular transgénica derivada de riñón de embrión humano 293
- ❖ **IGF-1:** Factor de crecimiento tipo insulínico 1
- ❖ **MEM:** Eagle's minimum essential medium
- ❖ **mL:** mililitro
- ❖ **ng:** nanogramos
- ❖ **nit:** proteína nitrada.
- ❖ **NTF:** factores neurotróficos
- ❖ **PBS:** buffer fosfato salino
- ❖ **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- ❖ **pfu:** unidades formadoras de placa
- ❖ **RAd:** Adenovirus Recombinante
- ❖ **RAd-DsRed:** vector Adenovírico Recombinante control que expresa la proteína fluorescente DsRed
- ❖ **RAd-IGF-1:** vector Adenovírico Recombinante que expresa el factor IGF-1
- ❖ **rpm:** revoluciones por minuto
- ❖ **SFB:** Suero fetal bovino
- ❖ **SN:** *substantia nigra pars compacta*
- ❖ **SNC:** sistema nervioso central
- ❖ **SNP:** sistema nervioso periférico
- ❖ **SN:** sustancia nigra
- ❖ **UV:** ultravioleta
- ❖ **mV:** milivolts
- ❖ **V:** volts
- ❖ **wt:** proteína wild type (salvaje)
- ❖ **α -syn:** proteína α -sinucleína
- ❖ **μ g:** microgramo
- ❖ **μ L:** microlitro

Introducción

2.1-Enfermedad de Parkinson y neurodegeneración

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden degenerativo del sistema nervioso caracterizado por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas (DA) de la *substantia nigra* (SN) *pars compacta* y de sus proyecciones al cuerpo estriado. Esta pérdida de viabilidad y funcionamiento neuronal conduce a una disminución de las funciones cerebrales generales, siendo de carácter relevante la coordinación del movimiento, la memoria y otras habilidades cognitivas (Hanson & Clarke, 2013). De etiología desconocida, afecta a cerca del 2% de la población mayor a 65 años en los países desarrollados (de Rijk et al., 1997) siendo una de las patologías neurodegenerativas más comunes. Se distinguen dos formas de EP: la idiopática o senil, y la familiar o de presentación temprana. En este último caso, es indudable la participación de un fuerte componente genético, que predispone para que la enfermedad se manifieste en la edad adulta temprana (Singleton, 2013)

Se cree que el proceso patológico de la EP incluye una etapa de propagación de la enfermedad de las células afectadas hacia las vecinas, pero aún no están completamente definidos los mecanismos por los cuales esto podría ocurrir. Una de las hipótesis es la liberación de partículas “tóxicas” que serían asimiladas por microglía, astrocitos y/o neuronas aún no afectadas, extendiendo así la patología a células vecinas (Hansen et al., 2011). Otra alternativa, no excluyente, sería la activación de un proceso inflamatorio por parte de la microglía asociado a la necrosis de las células dopaminérgicas que extendería el stress oxidativo más allá de las células contiguas (McGeer & McGeer, 2008). Existen evidencias que vinculan estos procesos celulares, junto con la disfunción mitocondrial y la disminución de factores neurotróficos, con el desarrollo y avance de EP y otras patologías neurodegenerativas similares. Aunque son varios los mecanismos que pueden desencadenar los procesos neurodegenerativos, la inflamación específica del cerebro está directamente asociada a estos, siendo el resultado de la activación del sistema inmune dentro del sistema nervioso central (SNC) por células de tipo glial (Block & Hong, 2005).

La neuroinflamación no debe asociarse siempre con un proceso patológico. De manera típica y característica, la inflamación crónica, patológica o normal, se caracteriza por un aumento general en la producción de citoquinas proinflamatorias y marcadores de inflamación.

A nivel celular, la pérdida neuronal es precedida por la degeneración de la sinapsis y la presencia de inclusiones citoplasmáticas conocidas como cuerpos de Lewy. Estas inclusiones consisten principalmente en fibrillas formadas a partir de la proteína α -sinucleína (α -Syn) insoluble, siendo este un marcador consistente en la identificación de procesos neuroinflamatorios (Spielman, Little, & Klegeris, 2014)

Actualmente, ningún tratamiento para la EP ha demostrado de forma fehaciente capacidad para modificar la evolución del proceso degenerativo, siendo en su mayoría tratamientos de tipo sintomático. Es por ello que se considera prioritario continuar la investigación de nuevas terapias potencialmente neuroprotectoras y neuroregenerativas, siendo la modulación de esta respuesta inflamatoria y el cambio en el fenotipo glial un objetivo tentador que podría contribuir a una mejora notable de los déficits observados con la edad y en pacientes en estado patológico (Spielman et al., 2014)

2.2-Células gliales: características, desarrollo y funciones principales.

En el sistema nervioso central pueden encontrarse dos tipos principales de células: neuronas y células gliales. Las células gliales, que constituyen un grupo heterogéneo de células, astrocitos, microglía y oligodendrocitos, se encuentran en mayor número que las neuronas. De hecho, las células de la microglía y los astrocitos combinados, comprenden el 80-90% de la población celular dentro del cerebro.

En los últimos años se ha hecho evidente que el funcionamiento del cerebro sólo puede entenderse comprendiendo la interacción de todos los tipos de células, es decir, tanto neuronas como células gliales. La investigación sobre células gliales ha aumentado considerablemente, fundamentalmente porque el desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular ha permitido detectar productos de la expresión génica específicos de estas células, siendo estos productos de carácter relevante para entender la funcionalidad de las mismas (Kettenmann & Verkhratsky, 2011).

Las células gliales y los astrocitos en particular, modulan la actividad neuronal y, por lo tanto, la función cerebral. Podemos suponer que la interacción entre las células gliales y las neuronas es crucial para todas las funciones cerebrales, cognitivas, motoras y emocionales.

Respecto a los astrocitos, constituyen una población celular funcionalmente heterogénea que interactúa con las neuronas y los vasos sanguíneos. Estas células detectan la actividad neuronal y pueden modular las conexiones entre neuronas.

Las células microgliales son las células inmunes del sistema nervioso central y reaccionan frente a los cambios en el sistema nervioso mediante un proceso conocido como activación de la microglía. Por lo que actúan como sensores patológicos en el cerebro. Al activarse, éstas migran al sitio del daño, proliferan y puede actuar como fagocitos entre otras funciones (Cherry, Olschowka, & O'Banion, 2014)

Hoy concebimos al cerebro como un órgano que puede lograr su función debido a la interacción entre todos los tipos de célula que lo componen, siendo de especial interés el estudio de esta interacción en estados patológicos.

Si bien las neuronas se han estudiado durante más de un siglo, la investigación sobre la glía sólo se ha desarrollado en las últimas décadas.

2.2.1-Astroglia

Los *astrocitos* (literalmente "células tipo estrella") son las células neurogliales más numerosas y diversas del SNC. Actualmente no existe una definición uniforme e inequívoca de un astrocito. No todos los astrocitos son células en forma de estrella, no todos expresan el marcador específico de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), no todos se encuentran en contacto a los capilares cerebrales (Cai, 2013). Los astrocitos son en realidad la población celular cerebral que resta después de que uno elimina neuronas, oligodendrocitos y células microgliales. Por lo tanto, muestran una notable heterogeneidad en su morfología y función. Conceptualmente, las células astrogliales son tan heterogéneas como las neuronas y pueden tener propiedades fisiológicas muy diferentes según las regiones cerebrales analizadas.

Funciones de las células astrogliales

Entre las funciones de los astrocitos podemos resaltar las siguientes: crean el ambiente cerebral, mantienen la homeostasis, almacenan y distribuyen sustratos energéticos, controlan el desarrollo de células neuronales, la sinaptogénesis y el mantenimiento sináptico y proporcionan protección cerebral. (Block & Hong, 2005)

Señalización astrogliar

Los receptores metabotrópicos astrogliales están acoplados a cascadas de señalización intracelular que regulan mecanismos de excitabilidad específicos. La cascada de señalización inicia con la activación de los receptores metabotrópicos astrogliales que induce entonces la formación de IP₃, que a su vez desencadena la liberación de Ca²⁺ en el retículo endoplasmático (ER) produciendo así las señales de Ca²⁺ que se asocian con la activación glial.

Las señales astrocíticas de Ca²⁺ pueden cruzar los límites de célula a célula y propagarse a través de los cúmulos astrogliales. Los mecanismos de generación y mantenimiento de las ondas intercelulares de Ca²⁺ son complejos e implican la difusión del intermediario IP₃ a través de uniones GAP, así como la liberación exocitótica de ATP de los astrocitos.

Las uniones GAP forman las vías para la señalización entre los astrocitos. Estas vías implican varios segundos mensajeros, sustratos metabólicos y otras moléculas. Sabemos muy poco sobre estas vías pudiendo constituir un factor importante para la plasticidad y el procesamiento de la información por parte de la astroglia.

Astrogliá como células neuroprotectoras en condiciones patológicas

A fines del siglo XIX y principios del siglo XX destacados neuropatólogos como Carl Frommann, Franz Nissl, Alois Alzheimer y Pio del Río-Hortega reconocieron el papel de la neuroglía en procesos patológicos. Sin embargo, el conocimiento detallado del rol de los astrocitos en estos procesos sigue siendo escaso. Los astrocitos no sólo son

fundamentales para el control de la homeostasis cerebral, sino que también representan una parte importante del sistema intrínseco de defensa cerebral. Las injurias cerebrales de etiología múltiple desencadenan una respuesta de defensa astrogliol conservada evolutivamente, generalmente conocida como astrogliosis reactiva. La astrogliosis es esencial tanto para limitar las áreas de daño (mediante la formación de cicatrices a través de la astrogliosis anisomórfica) como para la remodelación y recuperación post-daño de la función neural (por astrogliosis isomórfica) (Bilbo & Schwarz, 2012).

Los astrocitos están implicados en todo tipo de patologías cerebrales, desde lesiones agudas (traumatismo o apoplejía) hasta procesos neurodegenerativos crónicos (como la enfermedad de Alexander, Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple entre otros) y enfermedades psiquiátricas. Estudios recientes también enfatizaron el papel de la gliosis reactiva en las etapas iniciales de varios trastornos neurodegenerativos, pudiendo determinar en gran medida la progresión y el resultado de estos procesos.

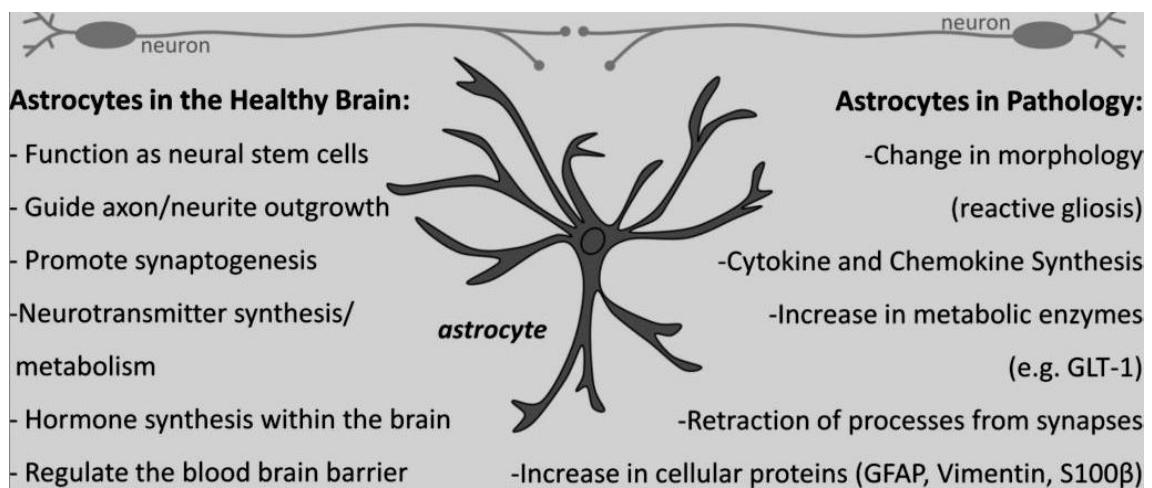


Figura 1. Astrocitos en estados de salud y patológicos. (figura extraída de Schwarz y Bilbo, 2012)

La **figura 1** resume las funciones y fenotipo de los astrocitos en el cerebro sano (izquierda) o patológico (derecha) luego de una injuria, enfermedad o trauma

2.2.2-Microglía

Las células microgliales representan la defensa endógena y el sistema inmune del cerebro. Son responsables de proteger al SNC frente a diversos tipos de factores patógenos y lesiones. Las células microgliales derivan de progenitores de origen mesodérmico que migran desde la periferia. Durante el desarrollo postnatal, suelen migrar al cerebro hasta el día 10 posnatal en roedores. Después de invadir el SNC, los precursores microgliales se diseminan de forma relativamente homogénea por todo el tejido nervioso y adquieren un fenotipo específico que los distingue claramente de sus precursores, los monocitos derivados de la sangre.

Funciones fisiológicas de las células microgliales

En condiciones fisiológicas, la microglía se encuentra en un estado de “reposo” o de “vigilancia”. Este estado celular se caracteriza por presentar un cuerpo celular pequeño y proyecciones delgadas muy elaboradas, que envían múltiples ramas y se extienden en todas las direcciones. De forma similar a los astrocitos, cada célula microglial tiene su propio espacio ocupado de aproximadamente 15 - 30 μm de ancho. Una característica notable es la poca superposición entre las proyecciones de células vecinas.

Las proyecciones de las células microgliales en reposo se mueven constantemente a través de su territorio; este movimiento relativamente rápido ocurre con una velocidad de aproximadamente 1.5 $\mu\text{m}/\text{min}$ y, por lo tanto, las proyecciones microgliales representan las estructuras de movimiento más rápido en el cerebro. Al mismo tiempo, envían y retraen constantemente pequeñas protuberancias, que pueden crecer y reducirse en 2-3 $\mu\text{m}/\text{min}$. Estudios recientes, han demostrado que estas proyecciones descansan durante períodos de minutos en sitios de contactos sinápticos. Considerando la velocidad de este movimiento la microglía es capaz de escanear completamente el parénquima cerebral cada varias horas. La motilidad de estas proyecciones no se ve afectada por la activación neuronal, pero si es sensible a los activadores (ATP y sus análogos) e inhibidores de los purinoceptores.

El daño neuronal focal induce un movimiento rápido y concertado de muchas proyecciones microgliales hacia el sitio de la lesión, y en menos de una hora este último puede estar completamente rodeado por estas células. Esta motilidad inducida por la lesión también se rige, al menos en parte, por la activación de purinoceptores; también es sensible a la inhibición de las uniones GAP, presentes en los astrocitos, pero no en la microglía; la inhibición de las uniones gap afecta la motilidad fisiológica de las proyecciones astrogiales. Por lo tanto, parece que los astrocitos envían señales a la microglía liberando ATP (y posiblemente algunas otras moléculas) a través de los hemicanales de conexina (Block & Hong, 2005;). Este sistema puede, en virtud de los receptores que residen en el plasmalema de células microgliales, detectar de inmediato las lesiones e iniciar el proceso de respuesta activa, que finalmente desencadena la activación microglial completa.

Activación de la microglía

Cuando las células microgliales detectan una lesión cerebral, inician un programa específico que da como resultado la transformación gradual de la microglía ramificada en reposo en una forma ameboide; este proceso generalmente se conoce como 'activación microglial' y continúa por varios pasos.

Durante la primera etapa de activación, la microglía en reposo retrae sus proyecciones, disminuyendo en número y volviéndose mucho más gruesos, aumentan el tamaño de sus cuerpos celulares, cambian la expresión de diversas enzimas y receptores y comienzan a producir moléculas de respuesta inmune, aumentan la producción de factores neurotróficos o factores inflamatorios y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) generando estrés oxidativo. Algunas células microgliales vuelven

a un modo proliferativo y comienzan a multiplicarse alrededor del sitio de la lesión. Si el daño persiste y las células del SNC comienzan a morir, las células microgliales experimentan una transformación adicional y se convierten en fagocitos.

Esto es, naturalmente, un esquema bastante superficial de los cambios complejos y altamente coordinados que ocurren en las células microgliales; el proceso de activación es gradual y es probable que existan muchos subestados en el camino desde el reposo a la microglía fagocítica. Además, las células activadas pueden mostrar propiedades bastante heterogéneas en diferentes tipos de patologías y en diferentes partes del cerebro. La microglía puede entonces diferenciarse a distintos fenotipos dependiendo del estímulo recibido, la clasificación más aceptada es la que se les da a los macrófagos periféricos, hablándose de microglía con fenotipo de tipo pro-inflamatorio o anti-inflamatorio.

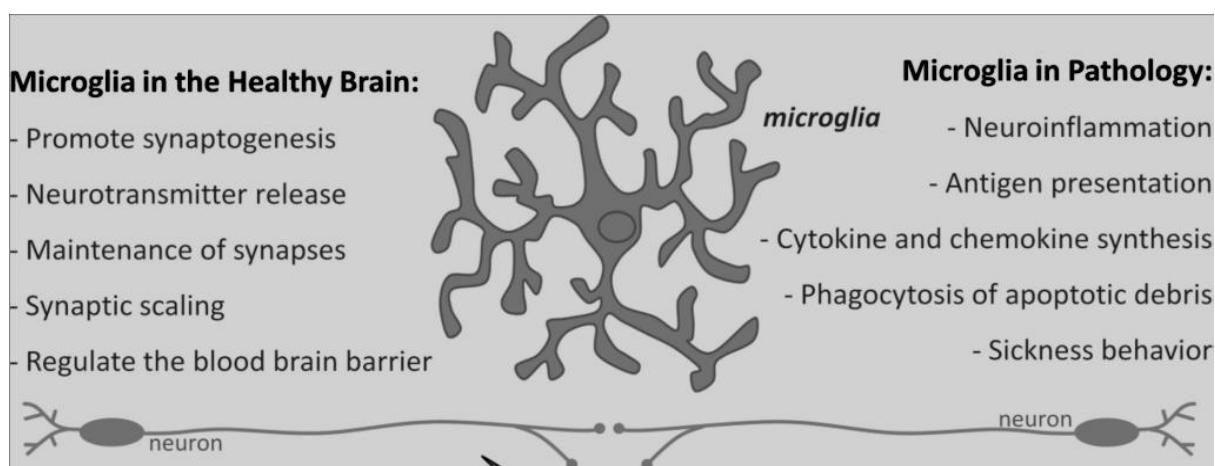


Figura 2. Microglía en estados de salud y patológicos. Figura extraída de Bilbo & Schwarz, 2012)

La **figura 2** resume las funciones y fenotipo de la microglía en el cerebro sano (izquierda) o patológico (derecha) luego de una injuria, enfermedad o trauma.

La naturaleza precisa de la señal inicial que desencadena el proceso de activación microglial no se comprende completamente; puede estar asociado con la retirada de algunas moléculas ("off-signal") liberada durante la actividad normal del SNC, o por la aparición de moléculas anormales o concentraciones anormales de moléculas presentes fisiológicamente ("on-signal"). Ambos tipos de señalización pueden proporcionar a las células microgliales información relevante sobre el estado del parénquima cerebral dentro de su dominio territorial.

Las "señales de apagado" (off-signals) que pueden indicar un deterioro en las redes neuronales aún no están completamente caracterizadas. Un buen ejemplo para este tipo de comunicación son los neurotransmisores.

Las células microgliales expresan una variedad de receptores de neurotransmisores clásicos, como receptores para GABA, glutamato, dopamina, noradrenalina. En la mayoría de los casos, la activación de los receptores contrarresta la

activación de las células microgliales con respecto a la adquisición de un fenotipo proinflamatorio. Se especula que la depresión de la actividad neuronal podría afectar la microglía vecina, convirtiéndola en un estado "alerta". De hecho, estas "señales de apagado" permiten a la microglía detectar la perturbación incluso si no se puede identificar la naturaleza del factor dañino.

La 'señal de encendido' (on-signals) son transmitidas por una amplia gama de moléculas, ya sea asociadas con daño celular o con materia extraña que invade el cerebro.

En particular, las neuronas dañadas pueden liberar grandes cantidades de ATP, citoquinas, neuropéptidos y factores de crecimiento. Muchos de estos factores pueden ser detectados por microglía y desencadenar la activación. Bien podría ser que diferentes moléculas puedan activar varios subprogramas de este proceso, regulando, por lo tanto, la velocidad y el grado de activación microglial.

Algunas de estas moléculas pueden llevar tanto señales de "apagado" como "encendido": por ejemplo, bajas concentraciones de ATP pueden ser indicativas de una actividad sináptica en curso normal, mientras que concentraciones altas indican daño celular. La microglía también es capaz de detectar alteraciones en el metabolismo cerebral: por ejemplo, la acumulación de amoníaco, que precede a fallas metabólicas graves (como durante la encefalopatía hepática) puede activar células microgliales directamente o a través de productos intermedios como NO o ATP.

Función fagocítica de células microgliales

Las células microgliales son los fagocitos innatos del tejido del SNC. Esta función es importante no sólo en estados patológicos, sino que es esencial para el cerebro en estado fisiológico normal, siendo de suma importancia en procesos durante el desarrollo del cerebro.

En el desarrollo del SNC, la fagocitosis microglial es fundamental para eliminar las células apoptóticas y puede estar involucrada en la eliminación de sinapsis durante el desarrollo y, potencialmente, en las sinapsis de poda en el cerebro postnatal. La fagocitosis microglial está íntimamente involucrada en muchas enfermedades neurológicas.

En respuesta a la lesión, las células microgliales se acumulan en el sitio dañado y eliminan los restos celulares o incluso partes de las células dañadas. A través de la fagocitosis, las células microgliales también pueden acumular diversos factores patológicos tales como, por ejemplo, beta-amiloide en la enfermedad de Alzheimer o fragmentos de mielina en enfermedades desmielinizantes. Múltiples factores, receptores y cascadas de señalización pueden regular la actividad fagocítica. En particular, la fagocitosis microglial está controlada por purinoceptores; los receptores metabotrópicos P2Y6 estimulan mientras que los receptores ionotrópicos P2X7 inhiben la actividad fagocítica. La fagocitosis también está controlada por el factor neurotrófico derivado de la glía, por el factor neurotrófico ciliar, por los receptores TOLL, por el receptor prostanoide, etc.

Microglía como presentador de antígeno

Las células microgliales son las células presentadoras de antígenos dominantes en el sistema nervioso central. En condiciones de reposo, la expresión del complejo molecular presentador de antígeno, el complejo mayor de histocompatibilidad II (MHCII) y moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y CD40 se encuentran en estado basal. Tras la lesión, la expresión es regulada positivamente y la formación de estos complejos se vuelve esencial para interactuar con los linfocitos T.

La microglía entonces interactúa con los linfocitos T infiltrantes presentándoles los antígenos y, por lo tanto, media la respuesta inmune en el cerebro. Tienen la capacidad de estimular la proliferación de células T positivas tanto TH1 como TH2-CD4.

2.2.3- Proteína α -sinucleína y su rol en procesos neurodegenerativos

La α -sinucleína (α -syn) es una pequeña proteína presináptica, localizada principalmente en la proximidad de las vesículas sinápticas (Hardy, Cookson, & Singleton, 2003; Lykkebo & Jensen, 2002). Las diversas funciones fisiológicas de α -syn todavía están bajo investigación, se sabe que se une a las membranas lipídicas en las vesículas sinápticas, las mitocondrias y el aparato de Golgi (Dudek et al., 2010). En consecuencia, α -syn funciona como chaperona molecular, permitiendo el ensamblaje del complejo SNARE en la sinapsis (Burre, Sharma, & Sudhof, 2015). Por otro lado, controla la dinámica de la liberación de neurotransmisores y la sustitución de la clatrina-dependiente de endocitosis en el conjunto de vesículas sinápticas.

La aSyn, debido a su desorden intrínseco, es capaz de adaptar su conformación a distintas estructuras o proteínas interactuantes. Esta flexibilidad sería modulada por diversas modificaciones post-traduccionales (PTMs) fisiológicas como fosforilación, acetilación, ubiquitinización, SUMOilación o proteólisis parcial. Sin embargo, bajo condiciones de estrés también entrarían en juego PTMs que gatillarían o aumentarían su actividad tóxica, como podrían ser oxidaciones, nitraciones o glicaciones, así como también PTMs fisiológicas desreguladas (hiperfosforilación, hiperacetilación, etc.).

La homeostasis intracelular de α -Syn requiere la degradación adecuada de la proteína por tres vías: autofagia mediada por chaperonas, autofagia por macrófagos y proteólisis por el sistema ubiquitin-proteasoma. La alteración de cualquiera de estas vías se considera un factor patogénico importante cuyas contribuciones relativas pueden estar sujetas a varios mecanismos reguladores, por ejemplo al envejecimiento (Ebrahimi-Fakhari et al., 2011). El tráfico celular alterado en la vía autofagia somática da como resultado la liberación exosomal de α -Syn (Lykkebo & Jensen, 2002) y probablemente de otras proteínas diana.

A través de mecanismos aún poco identificados, su forma monomérica puede transformarse en estados propensos a la agregación como α -Syn oligomérica; diferentes estados intermedios (protofibrillas) y finalmente fibrillas. La presencia de especies

agregadas de α -Syn en el SNC es un factor patológico característico de la enfermedad de Parkinson (PD), la demencia con cuerpos de Lewy (DLB) y la atrofia multisistémica (MSA). Específicamente, los agregados de α -Syn se detectan intracelularmente en los agregados lipo-protéicos conocidos como Cuerpos y Neuritas de Lewy (LB) de neuronas (PD y DLB) y oligodendrocitos (MSA) (Hoffmann et al., 2016)(Hodaie, Neimat, & Lozano, 2007), donde representan el componente mayoritario de estas inclusiones.

Efecto patológico de la alfa-sinucleína

Las sinucleinopatías como la enfermedad de Parkinson (PD), se definen por la presencia de agregados de α -Syn intracelular en neuronas y/u oligodendrocitos. Varios estudios sugieren que las formas nitradas de α -Syn (α -Syn Nit) juegan un rol importante en la patogénesis de EP

El análisis de tejido post mortem reveló cambios profundos en la morfología microglial, que indica activación microglial y neuroinflamación. Por lo tanto, la α -Syn, así como su variante nitrada, puede activar directamente la microglía, lo que conduce a una mayor producción de citoquinas proinflamatorias claves como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleuquina-1 β (IL-1 β), polarizando dichas células hacia un fenotipo pro-inflamatorio, que a su vez podría favorecer la propagación de la enfermedad (Spielman et al., 2014).

Las distintas especies de α -Syn que median la activación de la microglía no se encuentran actualmente bien definidas. Se presume que la activación microglial depende de un estado de agregación específico de la proteína, así como de sus posibles modificaciones post-traduccionales. Diversos estudios muestran como la α -Syn en su forma fibrilar induce el aumento de la producción y la secreción de citoquinas proinflamatorias en líneas celulares microgliales como BV2 en comparación con la α -Syn monomérica y oligomérica. Por su parte las células BV2 fagocitan la α -Syn fibrilar en comparación con los monómeros y oligómeros de la misma (Cremades et al., 2012). En un estudio realizado por Cremades et al., se vio que la captación microglial de fibrillas de α -Syn y la consiguiente activación dependieron del tiempo y la concentración a las cuales fueron expuestas las líneas celulares tratadas (Cremades et al., 2012). Además, el grado de fibrilación determinó la eficacia de la internalización microglial. Estudios similares resaltan las diversas interacciones de distintas especies de α -Syn con células microgliales.

Varios estudios exploraron la activación de células microgliales α -syn-dependiente (Cremades et al., 2012; Fauvet et al., 2012). Existe una fuerte evidencia que sugiere que la liberación de α -syn agregada o nitrada desde las neuronas dopaminérgicas dañadas provocan, en parte, una respuesta inflamatoria (Hoffmann et al., 2016; Reynolds et al., 2008). En particular, se demostró que las formas mutantes, nitradas o agregadas de α -syn causan una activación de células microgliales y astrogiales, asociadas con la liberación de citoquinas y estrés oxidativo (Hoffmann et al., 2016; Klegeris et al., 2008).

2.4-Factores Neurotróficos

Los factores neurotróficos (NTF) son una familia de biomoléculas, casi todas ellas péptidos o pequeñas proteínas que están involucrados en diversos procesos de crecimiento, diferenciación, maduración y desarrollo neuronal. (Espinet, Gonzalo, Fleitas, Menal, & Egea, 2015) La mayoría de los NTF ejercen sus efectos tróficos sobre las neuronas mediante la señalización vía tirosina quinasas.

En el sistema nervioso maduro, estos promueven la supervivencia neuronal e inducen plasticidad sináptica. También promueven el crecimiento inicial y posterior desarrollo de las neuronas tanto en el SNC como en el SNP. Algunos factores neurotróficos son liberados por el tejido diana para guiar el crecimiento de los axones durante el desarrollo neural. (Cotman, Berchtold, & Christie, 2007)

La mayoría de los factores neurotróficos pertenecen a una de las siguientes tres familias: (1) neurotrofinas, (2) ligandos del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial y (3) citoquinas neuropoyéticas.

Cada familia tiene sus propios mecanismos distintivos de señalización celular, aunque las respuestas celulares que se obtienen a menudo se superponen. (Kirk-Sanchez & McGough, 2013)

Entre estos factores se encuentra el factor de crecimiento insulino similar de tipo I (IGF-I)

1.2.5-Factor de crecimiento tipo insulínico I (IGF-1)

El IGF-I, es una hormona peptídica de 70 aminoácidos sintetizada principalmente en el hígado y secretada en respuesta a concentraciones aumentadas de hormonas de crecimiento (por ejemplo, somatotropina). Es un potente factor neurotrófico y neuroprotector, considerado con creciente interés para el rescate neuronal en procesos neurodegenerativos (Fernandez & Torres-Aleman, 2012; Torres-Aleman, 2010). Existe una clara evidencia de que el IGF-I juega un rol fisiológico como neuroprotector en el SNC (Trejo, Carro, & Torres-Aleman, 2001). En estudios in vitro se ha demostrado que el IGF-I incrementa la supervivencia celular de cultivos primarios de neuronas hipotalámicas (Knusel, Michel, Schwaber, & Hefti, 1990) y que estimula la diferenciación de neuronas mesencefálicas dopaminérgicas de rata (Trejo et al., 2001). En situaciones de estrés oxidativo se ha demostrado que el IGF-I ejerce una acción protectora sobre los astrocitos (Campos et al., 2016) y de esta forma colabora con ellos en la protección neuronal. Además, se sabe que en condiciones de daño citotóxico del hipocampo, la microglía de esta región aumenta sustancialmente la producción del IGF-I.

Si bien el IGF-1 ha sido reconocido durante mucho tiempo por su papel como una hormona metabólica y anabólica en la periferia, en el SNC desempeña un papel clave en el desarrollo, la maduración y la función neural (Landi, Ciucci, Maffei, Berardi, & Cenni, 2009).

El IGF-1 actúa como una señal pro-supervivencia responsable de la activación en cascada antiapoptóticas, la potenciación del crecimiento de las células nerviosas y la promoción de la plasticidad sináptica (Castilla-Cortazar et al., 2014)

Estas funciones combinadas son fundamentales para la protección de las células nerviosas contra las lesiones y los factores tóxicos asociados con procesos neurodegenerativos. La disminución de la concentración de IGF-1 y los errores de señalización se han asociado con estados patológicos tales como enfermedades de Alzheimer, enfermedades de Parkinson, enfermedades de Huntington, esclerosis múltiple y trastornos depresivos (Pellecchia et al., 2014)

En nuestro laboratorio se ha aplicado terapia génica con IGF-I en el cerebro de ratas lesionadas, logrando disminuir la gliosis reactiva en las inmediaciones de la lesión (Bellini, Hereñú, Goya, & Garcia-Segura, 2011). A su vez, se estudió el efecto del IGF-I sobre cultivos primarios de astrocitos bajo condiciones inflamatorias, logrando una disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias (Bellini et al., 2011). Recientemente se observó que la terapia génica con IGF-I modifica la respuesta de las células de la glía en el núcleo estriado de animales seniles con déficit motor (Falomir-Lockhart et al. 2017, submitted; Falomir Lockhart et al. 2015). Existen mecanismos que sugieren que la neuroinflamación es nociva, al menos parcialmente, debido a que evita la acción neuroprotectora del IGF-I (Trejo et al. 2004).

En este contexto, resulta interesante estudiar el potencial neuroprotector y/o modulador de la sobreexpresión del IGF-I en modelos de neurodegeneración. Para esto, consideramos a la terapia génica con IGF-I una estrategia interventiva promisorio

2.5-Terapia Génica

Aspectos generales

La transferencia de genes (*gene delivery*) se refiere al uso de ácidos nucleicos para incrementar, disminuir o suprimir la expresión de un gen o proteína de interés (Laporte, Rea, & Shea, 2009).

La aplicación más ambiciosa de la transferencia de genes es la terapia génica, donde precisamente distintas moléculas codificadas por ácidos nucleicos pueden ser usadas para atenuar enfermedades en diferentes etapas, así como en la prevención de la progresión de las enfermedades y sintomatologías (Patil, Rhodes, & Burgess, 2005).

En los casos en los cuales la terapia génica involucra la corrección de la disfunción de un gen a través de la introducción y expresión de su copia correcta, se obtiene como resultado la producción de una única proteína. Análogamente, cuando la terapia génica involucra el silenciamiento de genes, sólo los genes seleccionados son apagados, asegurándose la especificidad en el control de la enfermedad. De este modo, la

disponibilidad de proteínas terapéuticas mediante la terapia génica tiene la capacidad potencial de mejorar la eficacia, conveniencia y la efectividad de costo en el tratamiento de una variedad de enfermedades.

Se han desarrollado numerosas estrategias de transferencia génica, tanto *in vitro* como *in vivo*, para facilitar la inserción de genes en las células blanco y protegerlos de la degradación celular

Los sistemas de transferencia génica vectoriales, como su nombre lo indica, utilizan vectores (vehículos) para administrar los ácidos nucleicos. Los vectores pueden ser clasificados en: vectores no-virales y vectores virales

Los virus presentan una elevada eficiencia en la transferencia de ácidos nucleicos. Ésta es la principal ventaja de su utilización como vectores de transferencia génica. Sin embargo, también poseen desventajas, tales como la respuesta inmune que desencadenan, la limitación en el tamaño del transgen que pueden transportar, lo dificultoso de su producción a escala industrial y la potencial mutagénesis insercional que pueden producir (Basarkar & Singh, 2007; Gao, Kim, & Liu, 2007; Patil et al., 2005). Los principales tipos de vectores virales en uso son los retrovirus, adenovirus (Ad), lentivirus (derivados del HIV), vectores herpéticos y vectores adeno-asociados (AAV).

Actualmente, más del 67% de los ensayos clínicos de terapia génica que se están conduciendo emplean vectores virales, de los cuales más del 58% son vectores adenovirales y retrovirales (**Figura 3**)

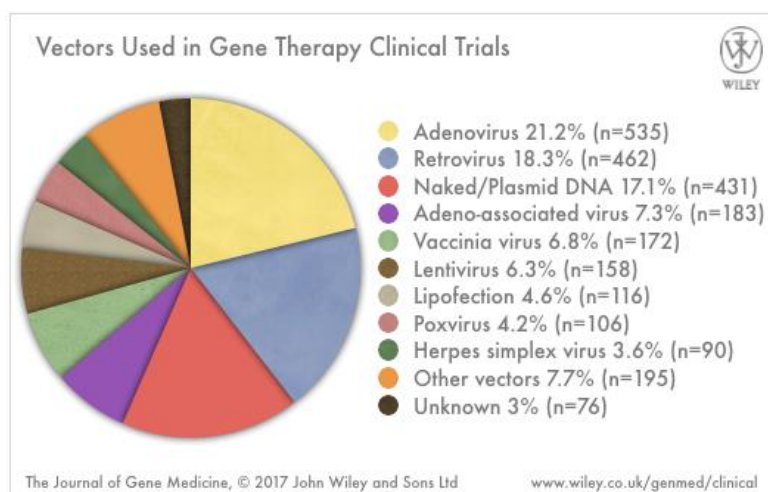


Figura 3. La figura 3 muestra el porcentaje y tipo de vectores virales utilizados al año 2017. Imagen extraída del sitio www.wiley.co.uk

En este trabajo utilizamos como vector de transferencia un adenovirus recombinante, por lo cual nos centraremos en la descripción de los mismos.

2.5.1-Características generales de los adenovirus

Los adenovirus (Ad) pertenecen a la familia Adenoviridae, siendo los que infectan a mamíferos del género Mastadenovirus. Las partículas adenovirales consisten en una cápside icosaédrica desnuda de 70 a 100 nm de diámetro, la cual encapsula el DNA genómico de doble cadena (Schaffer, Koerber, & Lim, 2008).

Actualmente, más de 51 serotipos de adenovirus han sido aislados en humanos y no humanos y se los han clasificado en subgrupos (de la A a la F). Los adenovirus pueden infectar células de diversos tejidos, tales como las vías respiratorias, urinarias, los ojos y el hígado. En humanos, los adenovirus causan infecciones oculares, respiratorias (subgrupo C) e intestinales y no son oncogénicos.

La cápside de los adenovirus está formada por 20 caras triangulares y 12 vértices (**Figura 4 A y B**).

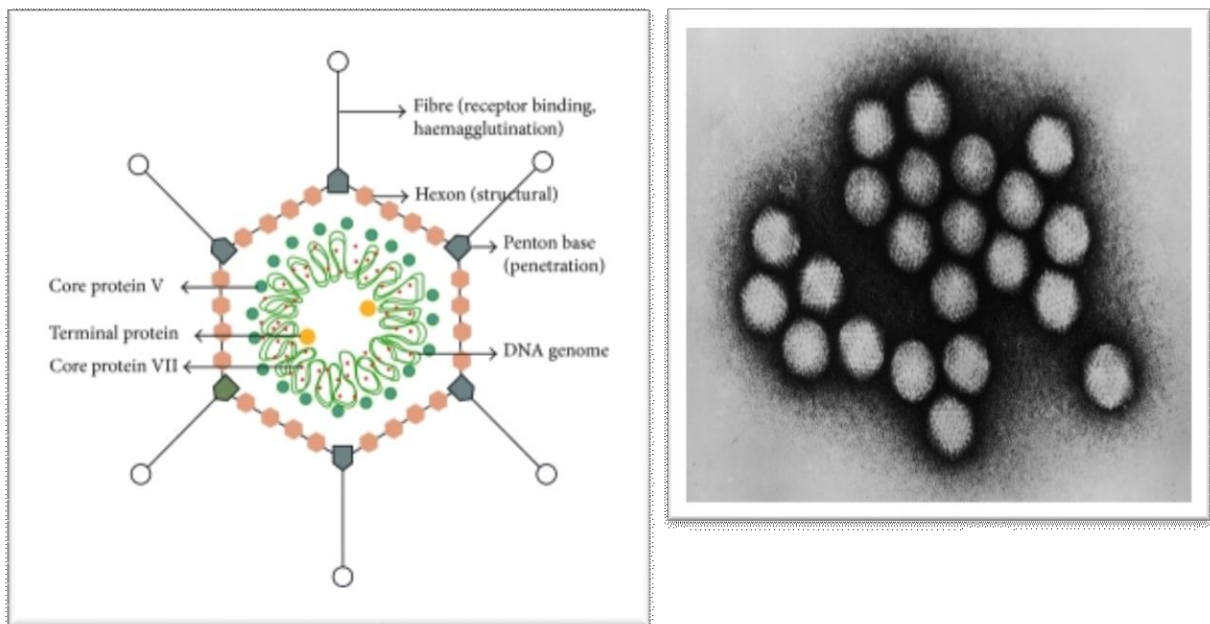


Figura 4 - Adenovirus tipo V. A) Representación esquemática de la estructura correspondiente al Ad. **B)** Foto de microscopía electrónica perteneciente al Adenovirus 5.

El genoma de los adenovirus consiste en DNA lineal de doble cadena de 30 a 38 kb de tamaño (el Ad5 tiene un DNA de aproximadamente 36 kb) presentando una proteína terminal de 55 kDa. unida covalentemente al extremo 5' de cada cadena, Asimismo, el genoma de los adenovirus presenta en sus extremos repeticiones terminales invertidas de aproximadamente 100 pares de bases (bp). Esto significa que los primeros 100 nucleótidos

(nt) en los extremos 5' y 3' de cada hebra de DNA son complementarios y pueden aparear sus bases, permitiendo que las hebras de DNA monocatenario se circularicen. Tanto las proteínas terminales como las repeticiones terminales invertidas están involucradas en la replicación del genoma viral.

El genoma adenoviral codifica para más de cincuenta proteínas debido al splicing alternativo y la transcripción bidireccional (Schaffer et al., 2008)

Mecanismo de infección y expresión

La infección viral se inicia con el reconocimiento e interacción específica entre proteínas de la cápside viral y receptores de la superficie de la célula blanco. De este modo, la entrada del virus a las células blanco mediante este proceso de reconocimiento e interacción altamente selectivo, es un paso limitante para que se desarrolle un ciclo de infección exitoso.

Los Ad5 se unen a la célula blanco por la interacción del botón terminal de la fibra viral presente en la cápside con receptores celulares de superficie de alta afinidad para adenovirus y virus coxsackie B, denominados CAR (**Figura 5**).

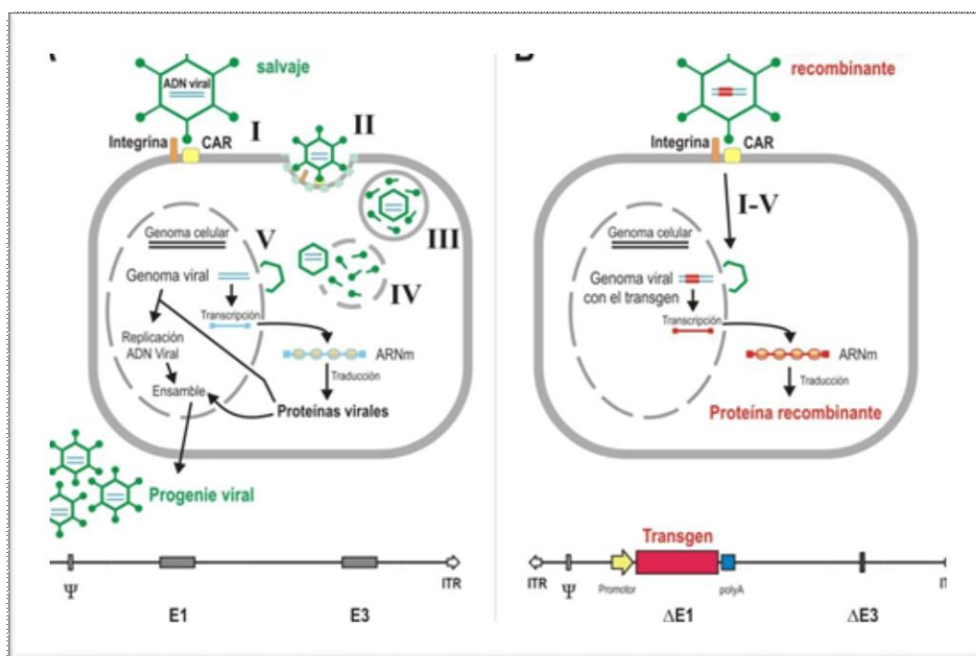


Figura 5

Esquemas del ciclo de infección de los adenovirus salvajes y de vectores adenovirales recombinantes.

Los CAR son un tipo de proteína transmembrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas que intervienen en la endocitosis de la mayor parte de los adenovirus. Actualmente, se están estudiando otras moléculas capaces de actuar como receptores primarios de adenovirus, pero son menos eficientes; entre ellas se encuentran el ácido siálico, el heparán sulfato, el receptor del ácido hialurónico y factores sanguíneos (Bangari & Mittal, 2006).

Las integrinas ($\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ y $\alpha_3\beta_1$) de la célula hospedadora sirven como correceptores inespecíficos para la entrada de los adenovirus. Estas integrinas interactúan con la secuencia arginina-glicina-aspartato del pentón base de la cápside viral (Hidaka et al., 1999). La interacción mediada por los CAR proporciona la unión inicial con una alta afinidad del adenovirus a la célula huésped. La interacción con las integrinas desencadena cascadas de señalización intracelulares que permiten la endocitosis dependiente de clatrina. Las vesículas con viriones en su interior entran a la vía endosomal. Luego, la acidificación endosomal produce un cambio conformacional en la cápside (se liberan proteínas estructurales, tales como, el pentón base y la fibra, entre otras) que desencadena la liberación del virión al citoplasma. En el citoplasma, el virión con su cápside parcialmente desensamblada viaja utilizando el citoesqueleto hasta la membrana nuclear. Finalmente, el virión se une específicamente al complejo del poro nuclear y el DNA viral ingresa al núcleo (**Figura 5**)

En el núcleo, el genoma viral permanece en un estado no integrado o episómico y comienzan los procesos de transcripción de los genes virales y de replicación del genoma viral. La transcripción de los genes de los adenovirus ocurre en dos etapas consecutivas: una fase temprana, durante la cual se expresan los genes tempranos, denominados E (early), y una fase tardía, durante la cual se expresan los genes tardíos, denominados L (late).

Los genes E, que comprenden los E1 (A y B), E2 (A y B), E3 y E4 (**Figura 6**), son aquellos que se expresan antes de la replicación del DNA y en su mayoría codifican para proteínas involucradas en la transcripción de los genes virales, la replicación del DNA viral, la supresión de la respuesta inmune y la inhibición de la apoptosis de la célula huésped. En particular, la expresión de la proteína E1A induce a las células a entrar en la fase S del ciclo celular, a la vez que estimula los promotores de los otros genes tempranos. Por lo tanto, las proteínas E1A son necesarias para la transcripción eficiente de los RNAm virales tempranos.

Los genes L, que comprenden los L1 a L5 (**Figura 6**), se expresan después de la replicación del DNA y codifican para las proteínas estructurales y para algunas pocas proteínas no-estructurales necesarias para el ensamblaje de la cápside.

Utilización como vectores

Se han desarrollado diversas estrategias para la generación de vectores adenovirales recombinantes (RAds), las cuales se basan en efectuar modificaciones en el genoma viral en el que subsecuentemente se clona el transgen de interés. La mayor parte de los trabajos con RAds se basó en el uso de adenovirus humanos tipo 2 y 5 del subgrupo C (Schaffer et al., 2008); esto se debe a que sus genomas se encuentran sumamente bien caracterizados y a que demostraron no inducir tumores en modelos animales

Los primeros vectores adenovirales en construirse se basaron en adenovirus a los que se les suprimieron los genes tempranos E1 o E1 y E3 del genoma viral, denominados vectores adenovirales de primera generación (**Figura 5.B y Figura 6**). La eliminación de la región E1 lleva a la incapacidad del virus para replicar y generar progenie (Benihoud, Yeh,

& Perricaudet, 1999) y la supresión de la región E3 genera más espacio dentro del genoma para clonar secuencias exógenas (hasta 7,5 kb). En consecuencia, la utilización de estos RAds replicación-defectivos evita una infección viral generalizada.

El sistema utilizado para construir el genoma adenoviral de primera generación se basa en la recombinación homóloga entre un plásmido shuttle, el cual contiene los extremos del genoma del adenovirus y el cassette de expresión del transgen en el lugar de la región E1, y un plásmido genómico, el cual consiste en la mayor parte del genoma del adenovirus salvo por las regiones E1 y E3. La amplificación de estos vectores sólo puede llevarse a cabo en la línea celular transgénica derivada de riñón de embrión humano 293 (HEK293), que contiene la región genómica E1 faltante necesaria para iniciar la replicación

Para reducir al máximo el riesgo de inmunogenicidad, se han desarrollado métodos para eliminar todos los genes virales de un adenovector. Este tipo de vectores se denominó vectores adenovirales de tercera generación o helper-dependent (HD) (Puntel et al., 2006). Estos adenovectores de alta capacidad sólo cuentan con las secuencias necesarias en cis, tales como los dos orígenes de replicación (en los ITRs) y la señal de empaquetamiento (Figura 6). Para generar y producir los vectores HD se necesita aportar en trans todos los elementos necesarios para la replicación y el empaquetamiento. Esto se logra coinfectando las células productoras con un adenovirus denominado virus auxiliar (helper). Las características más destacables de estos vectores son que poseen una gran capacidad de clonado (teóricamente entre 28 a 32 kb), menor inmunogenicidad y expresión génica más prolongada (Józkowicz & Dulak, 2006).

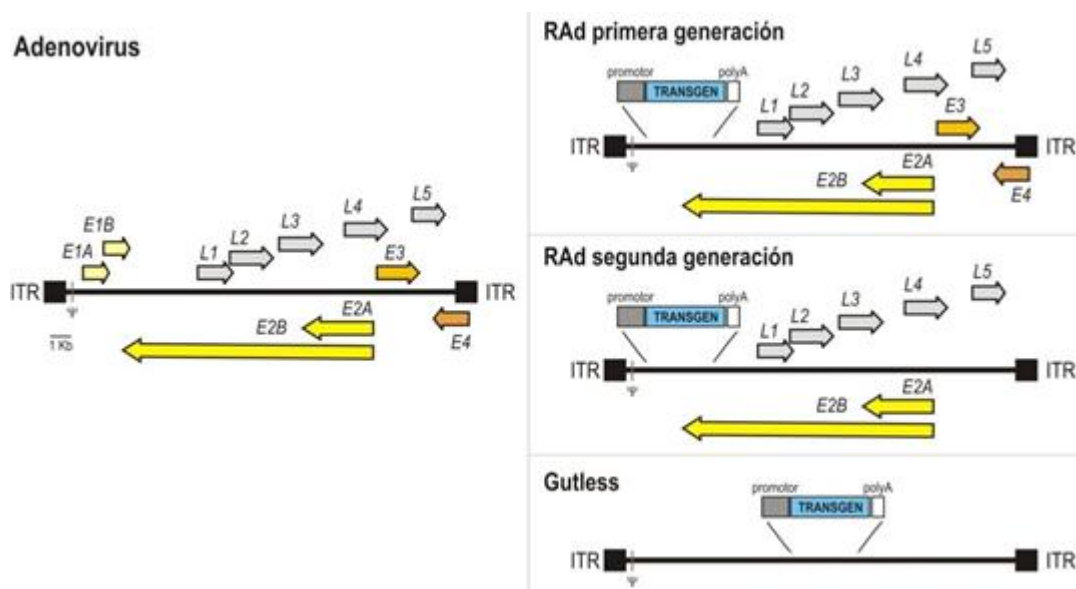


Figura 6 - Representación esquemática de la organización genética de los adenovirus y sus respectivos vectores. En los vectores Ad se indica la localización de la inserción del casete portador del transgen. ITR, repeticiones invertidas terminales. Ψ, señal de empaquetamiento. Modificado de Giacca, 2007.

Los RAds cuentan con algunas ventajas respecto a los otros vectores virales: (1) son capaces de transducir eficientemente un amplio rango de tejidos y tipos celulares, en estado

proliferativo o quiescente; (2) poseen una capacidad de clonado de hasta 32 kb de DNA (vectores HD); (3) son fáciles de manipular en el laboratorio; (4) es factible producirlos en títulos elevados; (5) el genoma de los RAds no se integra al genoma de la célula huésped descartando el riesgo de mutagénesis insercional; y (6) poseen una alta eficiencia de expresión génica (Benihoud et al., 1999; Schaffer et al., 2008).

Hipótesis y Objetivos

3.1-Hipótesis

Teniendo en cuenta que el rol de la α -Syn y sus formas nitradas en la inducción de la neuroinflamación no está totalmente dilucidado, planteamos que la α -Syn extracelular modula la respuesta microglial y de células neurales. Además, resulta interesante estudiar el potencial protector y/o modulador de la sobreexpresión del IGF-1, mediada por terapia génica, en modelos *in vitro* de neuroinflamación causada por α -Syn o sus formas modificadas.

Hipótesis 1: la α -sinucleína, tanto en su forma salvaje como nitrada, tendrán un efecto proinflamatorio sobre las células ensayadas.

Hipótesis 2: la sobreexpresión de IGF-I modificará la respuesta inflamatoria causada por la α -sinucleína

Para probar estas hipótesis, se analizará la influencia de dos formas de la proteína α -Syn; wild type o salvaje y nitrada en la respuesta inflamatoria de las células microgliales BV2 y la línea celular tipo neural SH-SY5Y. Así como los cambios producidos por la sobreexpresión del factor IGF-1 vía vectores adenovirales

3.2-Objetivos

El objetivo general de este proyecto es desarrollar estrategias terapéuticas de avanzada que nos permitan prevenir y/o subsanar los cambios degenerativos que ocurren en el cerebro. En este contexto profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares y bioquímicos que llevan a la neurodegeneración y la comprensión de los cambios que ocurren en la microglía en los procesos neurodegenerativos es el primer paso en la identificación de terapias que modulen el estado de estas células y, en última instancia, alteren los procesos de la enfermedad.

Objetivos específicos:

1- Determinar el efecto inflamatorio de α -sinucleína en su forma “salvaje” y nitrada en la activación de distintas líneas celulares de origen glial y neuronal.

2- Estudiar el posible rol anti-inflamatorio de la sobreexpresión de IGF-I utilizando un vector adenoviral portador del cDNA del IGF-I de rata.

En ambos casos se evaluará inflamación determinando expresión de mRNA de citoquinas pro y anti-inflamatorias por PCR. Y se evaluará la producción de nitritos y la viabilidad celular como factores de respuesta a estrés.

Materiales y Métodos

4.1-Líneas celulares utilizadas

Para el desarrollo del trabajo fueron utilizadas tres líneas celulares ampliamente caracterizadas y con funcionalidad conocida.

-Células BV2, derivadas de microglía de ratón immortalizadas (Blasi, Barluzzi, Bocchini, Mazzolla, & Bistoni, 1990) que han sido ampliamente utilizadas en estudios relacionados con desórdenes neurodegenerativos.

-Células B92, células de tipo glial/neuronal de rata (Schubert *et al.* 1974).

-Células SH-SY5Y, derivadas de un neuroblastoma humano (Cells *et al.* 1983), usadas frecuentemente como modelo *in vitro* de diferenciación y funcionalidad neuronal.

Los cultivos y tratamientos fueron probados en las diversas líneas celulares pero el proyecto fue puesto a punto principalmente con las células BV2 por su alta tasa de crecimiento y facilidad en el cultivo.

La línea celular BV-2 fue generada por Blasi (Blasi et al., 1990), immortalizando células microgliales de cultivo primario de cerebro de ratón con el retrovirus J2 conteniendo los oncogenes v-raf/v-myc. Se ha descrito que la línea conserva la mayoría de las propiedades morfológicas, fenotípicas y funcionales presentes en las células microgliales de cultivo primario (Bocchini et al., 1992; Lund et al., 2006; Henn et al., 2009). En cuanto a su morfología, la línea BV2 es heterogénea por lo que se distinguen dos poblaciones. Por un lado, se observan células planas adherentes con forma y tamaño variable, y por el otro, células redondeadas con poca adherencia al sustrato (Bocchini et al., 1992).

4.1.1 Técnica de Cultivo y repique celular

Las células BV2 (gentilmente donadas por el Dr. Lisandro Falomir-Lockhart) fueron cultivadas en botellas de cultivo en medio DMEM F12 (EMEVE) suplementado con 15% de suero de fetal bovino (Natocor), y 1% de penicilina/estreptomicina a 37°C y 5% de CO₂ en estufa. A las 48 hs se cambió el medio de las botellas por medio fresco. Al alcanzar una confluencia de aproximadamente 90% se procedió a realizar los subcultivos y tratamientos.

Dada la alta tasa de crecimiento que presentan estas células, los repiques celulares para el mantenimiento de la línea se realizaron diluyendo el pellet 20 veces, considerando el tamaño de las botellas de cultivo y el volumen de medio de cultivo necesario en cada caso. A continuación, se cultivó las células en las condiciones anteriormente mencionadas.

diluciones 1/5, 1/50, 1/100, 1/500 y 1/1000 en tubos eppendorf de 1,5 ml. De cada dilución se tomó 10 µl y se agregó 90 µl de azul de tripán. Se dejó actuar durante 3 minutos y luego se vertió 10 µl de muestra en cada zona de conteo por capilaridad entre la cámara de Neubauer y el cubreobjetos. El preparado se observó en microscopio invertido (Olympus IX71), despreciando aquellas células teñidas por el colorante (**Figura 8**).

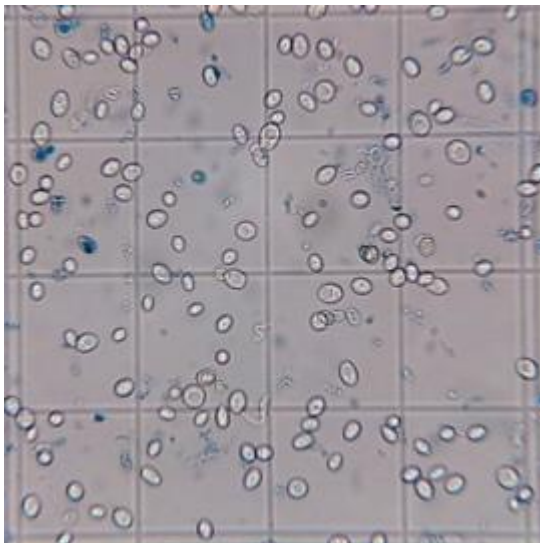


Figura 8. Puede apreciarse la tinción de las células sin vida, respecto de las viables

Una vez realizado el recuento se multiplicó el número obtenido por el factor de la cámara y las diluciones correspondientes.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Total Células Contadas} \times 10.000}{\text{Número de Cuadrados}}$$

La dilución seleccionada fue aquella que contenía un recuento promedio entre 25 y 250 células

4.1.3-Sub cultivos y tratamientos realizados

Para los tratamientos se sembraron entre 500.000 y 1.000.000 de células por pocillo en una placa de 6 wells y se llevó a un volumen final de 1,5 ml por well con medio de cultivo según línea celular.

En paralelo fueron sembradas 25.000 células por pocillo en una placa de 96 wells y se lo llevó a un volumen final de 200 µl con medio de cultivo. Las cantidades utilizadas fueron tomadas de protocolos para tratamientos similares.

Se dejó transcurrir un lapso mínimo de 1 hora para asegurar la adherencia celular a la placa de cultivo. Se transducieron los subcultivos celulares utilizando los vectores

adenovirales RAd-DsRed y RAd-IGF-1 (construidos por nuestro grupo) a concentración de 1×10^8 pfu/ml. Las placas fueron entonces incubadas durante 12 hs a 37°C en estufa. Se descartó el sobrenadante y se agregaron distintas concentraciones de proteína α -Syn y α -Syn nitrada, ($0,1 \mu\text{M}$; $1 \mu\text{M}$; $2,5 \mu\text{M}$), como tratamientos independientes, preparadas a partir de un stock de concentración 2 mg/ml (proporcionado por el Dr. Falomir-Lockhart y el Lic. Ezequiel Gimenez) y medio sin suero. Luego del agregado de las distintas proteínas se continuó con la incubación durante 6 horas más en iguales condiciones.

Finalizado el tiempo se recogió el sobrenadante de cada pocillo de las placas de 6 wells y se procedió a la recolección de las células para la extracción de mRNA y posterior PCR. Las placas de 96 wells fueron destinadas a la medida de viabilidad por MTT y a la cuantificación de nitritos por la técnica de Griess.

Los tratamientos fueron realizados por cuadruplicado, y se incluyeron células sin transducir con ambos tratamientos proteicos; células transducidas con ambos vectores sin posterior tratamiento proteico; y células sin transducir y sin adición de proteína, siendo este último el control empleado para definir las condiciones basales.

4.2-Vectores Adenovirales Empleados

Se emplearon los vectores adenovirales recombinantes de primera generación portadores de los cDNA del IGF-1 de rata (Rad-IGF-1) o de la proteína roja fluorescente DsRed (Rad-DsRed). El control de la expresión de ambos transgenes se encuentra bajo el control del promotor Citomegalovirus (CMV). Ambos vectores fueron construidos y ampliamente caracterizados en nuestro laboratorio

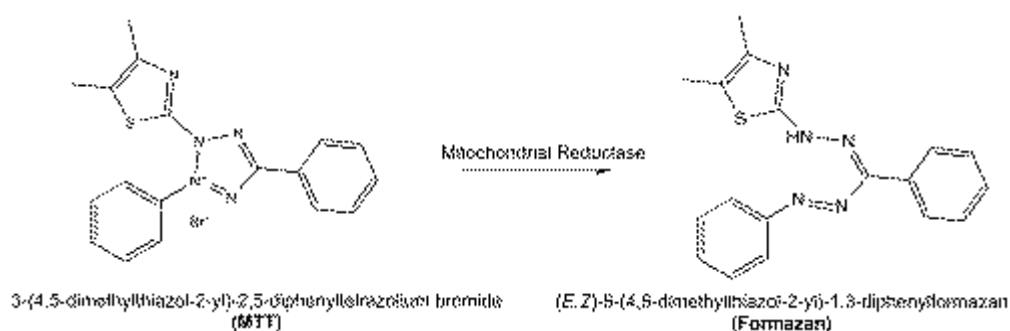
4.3-Determinación de parámetros asociados a procesos de estrés celular

4.3.1-Viabilidad celular por ensayo MTT

Una vez realizados los tratamientos previamente mencionados en las placas de 96 wells, se evaluó la viabilidad celular utilizando el ensayo MTT.

Este ensayo se basa en la medida de la actividad enzimática oxidoreductasa NAD(P)H-dependiente a partir de la reducción de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) a su forma formazan insoluble, la cual presenta una coloración distintiva azul-violeta y una absorbancia específica a 595 nm.

El MTT es un compuesto amarillo perteneciente a la familia de **sales de tetrazolio**, soluble en agua. Una vez reducido a su forma insoluble por acción enzimática, los cristales coloreados son disueltos con el agregado del solvente orgánico DMSO (dimetilsulfóxido) para permitir la lectura de absorbancia.



Experimentalmente, se procedió tomando el sobrenadante de cada pocillo de una placa de 96 wells para la posterior medición de nitritos. Se agregó entonces 100 μ l de MTT a una concentración de 0,5 mg/ml a cada well. Se incubó durante 4 hs a 37°C en estufa. Posteriormente, el sobrenadante con MTT fue descartado y se adicionó 100 μ l de DMSO (dimetilsulfóxido) permitiendo la disolución de los cristales formados. Se incubó 5 min a temperatura ambiente con agitación y luego se midió la absorbancia utilizando un lector de placas (Beckman Coulter, DTX800) a una longitud de onda de 595 nm.

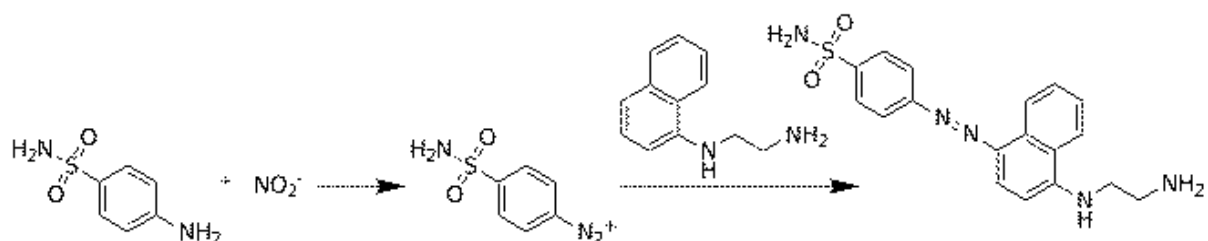
Como control se midió la absorbancia producida por células sin ningún tipo de tratamiento y a dichos mediciones se le asignó un valor de 100% de viabilidad refiriendo las otras mediciones a este valor (Ramalingam & Kim, 2016).

4.3.2-Técnica de Griess para la cuantificación de nitritos

El ensayo de Griess es un ensayo colorimétrico sencillo que permite cuantificar de manera precisa la concentración de iones nitritos y/o nitratos presentes con un límite de detección de aproximadamente 100 nM.

Este consiste en la formación de sales de diazonio a partir de la reacción de iones nitritos frente al agregado del reactivo de Griess. La reacción concluye con la formación de una solución rosada con una absorbancia característica a 492nm.

El reactivo de Griess contiene una mezcla de sulfanilamida y N-1- dihidrocloruro de naftiletilendiamina (NED) en ácido fosfórico o clorhídrico que proporcionan el entorno ácido necesario. Típicamente se comercializa en proporciones 0.2% N-1-dihidrocloruro de naftiletilendiamina) y 2% sulfanilamida en 5% de ácido fosfórico.



Para poder cuantificarla concentración de nitrito se realizó una curva de calibración por duplicado de una solución patrón de nitritos para cada ensayo realizado.

Experimentalmente, se procedió tomando 100µl de sobrenadante de los cultivos realizados en placas de 96 wells y se los transfirió a una nueva placa La curva de calibración se generó a partir de un patrón de nitrito con una concentración 100 µM realizando diluciones seriadas de 1:2, constando de 8 puntos, siendo el último punto agua destilada.

Se agregaron 100 µl del reactivo de Griess preparado previamente a cada well y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Se midió a una longitud de onda de 490 nm.

La cantidad de nitritos presentes se calcularon a partir de la curva de calibración obtenida, tomando como concentración basal la obtenida de las células sin tratamiento

4.4-Cuantificación de genes asociados a procesos inflamatorios

4.4.1-Extracción de RNA total por el Método de Trizol

Para la determinación de la expresión de genes asociados a procesos inflamatorios se extrajo el ARN total de los cultivos celulares, empleando el método de Trizol.

El trizol es un compuesto de base fenólica e isocianato de guanidina que permite la lisis celular y disuelve los componentes celulares manteniendo la integridad del RNA. Para proceder a la extracción se descartó el sobrenadante de los cultivos previamente tratados en placas de 6 wells y se adicionaron 500 µl de trizol a cada well. A continuación, se homogeneizó la muestra por pipeteo repetido unas 25 veces aproximadamente. Se recolectó la suspensión en un eppendorf de 1,5 ml y se agregaron otros 500 µl de trizol a cada a modo de lavado. Ambos volúmenes de Trizol se juntaron y se centrifugó a 11.500 rpm durante 10' a 4°C.

Una vez finalizado el tratamiento, se eliminó el sobrenadante de las células cultivadas en placas de 6 wells y se adicionó 500 µl de trizol a cada well. A continuación, se homogeneizó la muestra por pipeteo repetido unas 25 veces aproximadamente. Se recolectó la suspensión en un eppendorf de 1,5 ml y se procedió agregando 500 µl de trizol nuevamente a cada well y a homogenizar de igual manera una segunda vez a modo de lavado. Ambos volúmenes de Trizol se juntaron y se centrifugó a 11.500 rpm durante 10' a 4°C.

Posteriormente se transfirió, el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 ml incubando durante 5' a temperatura ambiente para la disociación del complejo nucleoproteico.

Con el fin de purificar el RNA obtenido, se adicionaron 200 µl de cloroformo por ml de trizol utilizado y se mezcló por inversión 15-30 veces. Se incubó 3' a temperatura ambiente y se centrifugó a 11.500 rpm durante 15' a 4°C. Posteriormente a la centrifugación se obtuvieron dos fases claramente diferenciables, el RNA, permanece en la fase acuosa superior, por sus propiedades de solubilidad, mientras que las proteínas permanecen en la fase fenol-cloroformo. Fue posible evidenciar a su vez una delgada interfase blanca entre ambas fases conteniendo DNA.

La fase acuosa se transfirió a un nuevo eppendorf de 1,5 ml teniendo extremada precaución en no tomar parte de la fase fenólica ni de la interfase con DNA.

A continuación, se utilizó las propiedades insolubles del RNA en alcohol para lograr su precipitación. Para ello, se adicionaron 500 µl de isopropanol por ml de trizol y se lo incubó durante 10' a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó a 11.500 rpm durante 20' a 4°C. El RNA precipitado se observó por la formación de un pellet en el fondo del eppendorf.

Por último, se procedió al lavado del pellet por agregados consecutivos de 1 ml de Etanol al 75% por ml de trizol y posterior centrifugado durante 10' a 11.500 rpm. El sobrenadante se descartó y se repitió el proceso de lavado durante 3 instancias. Una vez finalizados los lavados, se descartó el sobrenadante alcohólico y se dejó secar el tubo durante 15 minutos, boca abajo, cerca de un mechero.

El pellet se resuspendió en 20 µl de agua destilada y se lo dejó en hielo durante 30-60 minutos previo a su almacenamiento en freezer a -20°C

El RNA obtenido se cuantificó posteriormente con el uso de un Nanodrop (Termofisher).

4.4.2-Obtención de cDNA por transcripción reversa

Una vez obtenido el RNA total de los cultivos celulares, se procedió a generar el cDNA correspondiente, para ello se utilizó la técnica de retrotranscripción por la enzima transcriptasa reversa. El fundamento de esta técnica se basa en la utilización de hebra simple de RNA junto con primers random y la enzima transcriptasa reversa, la cual utiliza el RNA como molde y produce una cadena de DNA complementario (cDNA) a esta. En una segunda instancia, el RNA es degradado y se genera la doble hebra de cDNA siendo este el objetivo final del proceso.

De cada muestra de RNA extraída previamente se tomó un volumen suficiente que contuviese 0,5 µg de RNA y se lo llevó a un volumen final de 10 µl con agua destilada.

Se preparó entonces un primer mix con 0,07 µl de random primers (Roche) y 5 µl de agua destilada para cada muestra. Se adicionó la solución de 10 µl de RNA y se lo llevó a un baño a 70° durante 5 minutos y luego rápidamente a hielo. El objetivo de este paso es proporcionar las condiciones de annealing para los primers y el RNA al desestabilizar las estructuras secundarias de este último. Un segundo mix se preparó con 2,75 µl de agua destilada, 1,25 µl de dNTPs (Roche, 3 µg/µl), 5 µl buffer 10X (Promega) y 0,5 µl la enzima retrotranscriptasa (Promega 200U/µl) para cada muestra. Se adicionó entonces el mix 2 y la mezcla fue incubada en un termociclador durante 60' a 37°C y luego 15' a 70°C. Obteniendo así el cDNA correspondiente a cada muestra (Ramalingam & Kim, 2016).

4.4.3-PCR Semicuantitativa

El cDNA obtenido se utilizó para medir la expresión de mRNA de distintas citoquinas e interleuquinas (ILs) a partir de la técnica de PCR.

Se utilizaron primers diseñados en el presente laboratorio y la base de datos de NCBI para corroborar la posibilidad de amplificación de dichos genes en las líneas celulares utilizadas.

Experimentalmente la técnica consistió en el preparado de un mix contenido con 0,1 µl de la enzima Taq polimerasa 5 U/µl (Epicentre), 1 µl de buffer 10X (Epicentre), 0,3 µl de MgCl₂ 50mM, 0,2 µl de primer forward 10 mM, 0,2 µl de primer reverse 10 mM, 0,3 µl de dNTPs (Roche, 3 µg/µl) y 7,5 µl de agua destilada por cada muestra. A la mezcla de 9,5 µl de mix se le adicionó 0,5 µl de muestra con cDNA diluido 1/50 y se incubó en un termociclador

durante 2' a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 15" a 92°C, 15" a 58°C y 30" a 72°C. El programa corresponde a los procesos de desnaturalización del cDNA, Annealing de los primers empleados y polimerización de la nueva hebra de cDNA. Posteriormente se incubó 5' a 72°C como extensión final del proceso. Como control se preparó una solución de mix donde el volumen de cDNA fue reemplazado por agua destilada.

Los primers utilizados, fueron los correspondientes a los genes:

IL-6:

Forward 5'-GAAACCGCTATGAAGTTCCTCTCTG-3'

Reverse 5'-TGTTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA-3'

IL-1 β

Forward 5'-CGACAAAATACCTGTGGCCT-3'

Reverse 5'-TTCTTTGGGTATTGCTTGGG-3'

IL-4:

Forward 5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT-3'

Reverse 5'-CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG-3'

Arg-1

Forward 5'-GAACACGGCAGTGGCTTTAAC-3'

Reverse 5'-TGCTTAGCTCTGTCTGCTTTG-3'

18S

Forward 5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT-3'

Reverse 5'-CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG-3'

4.4.4-Electroforesis en gel de agarosa

Con el objetivo de observar y cuantificar el cDNA amplificado mediante PCR, se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa 0,8% p/v.

Para ello se pesó 0,32 gr de agarosa MARCA y se lo disolvió en buffer TBE 1x, la mezcla se calentó durante ciclos de 20' hasta que todo el contenido se hubiese disuelto. Una vez enfriado hasta temperatura ambiente se agregó 3 μ l del intercalante Diamon Die (Promega), y posteriormente se volcó todo el contenido en una cama de electroforesis equilibrada con un peine adosado previamente. Se dejó solidificar la mezcla en ausencia de luz a temperatura ambiente durante 20 aproximadamente.

Una vez que el gel hubiese solidificado, se retiró el peine y se colocó el gel en una cuba de electroforesis. A continuación, se llenó la cuba con Buffer TBE 1x y se sembraron las muestras obtenidas por PCR a razón de 6 μ l por well. La corrida del gel se realizó a voltaje constante de 90 mV durante 60 minutos.

Como controles, se sembró junto a las muestras un patrón de peso molecular (Embiotech) y el producto de la PCR sin contenido de cDNA.

El gel se visualizó en un transiluminador UV (MaestroGen LB-16) donde los ácidos nucleicos fueron evidenciados por la presencia de bandas teñidas por el colorante Diamon Dye (Promega)

4.4.3.2-Uso del software ImageJ para la cuantificación de cDNA

Para determinar finalmente de manera semicuantitativa la concentración de mRNA expresado por los cultivos celulares se tomaron fotos en alta definición de los geles en el transiluminador y se procesaron dichas imágenes con el software ImageJ utilizando como expresión basal y asignando un valor de 100% a las muestras provenientes de células sin tratamiento.

4.5-Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron procesados por ANOVA, para el análisis estadístico se usó el software GraphPad Prism 7.0

Resultados e interpretación

5.1- Efecto de la α -sinucleína sobre la producción de nitritos y la viabilidad celular

Con el fin de analizar el efecto de la proteína α -Syn wild type y nitrada y el efecto del IGF-1 sobre la viabilidad y el estrés/daño celular, se cuantificó la producción de nitritos mediante el ensayo de MTT y la reacción de Griess, respectivamente. Estos ensayos se realizaron empleando dos líneas celulares, células BV2 y células SH-SY5Y, y se ensayaron tres concentraciones de proteína distintas.

5.1.1 Efecto de la α -sinucleína sobre la viabilidad celular

Las **figuras 8 y 9** muestran la viabilidad de las células SHSY5Y y BV2 luego de los distintos tratamientos. Como puede observarse en la figura A, las células SH-SY5Y tienden a disminuir su viabilidad con el aumento de la concentración de ambas proteínas, aunque no de manera significativa, en aquellas células tratadas con RAd-DsRed y RAd-IGF1. Las células que no recibieron un tratamiento viral previo tienden a disminuir su viabilidad de manera independiente a la concentración y tipo de proteína.

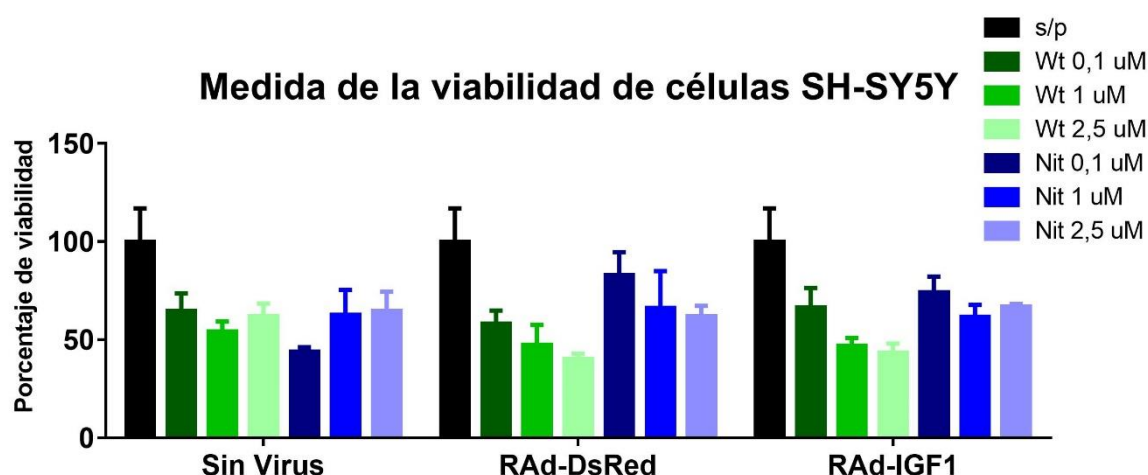


Figura 8. Porcentaje de viabilidad de células SHSY5Y con diferentes tratamientos proteicos y virales. El grafico muestra el porcentaje de viabilidad refiriendo como 100% viabilidad de células sin virus, sin tratamiento

En cuanto a las células BV2, se observa que la viabilidad de las células no se vio afectada por el tratamiento proteico ni por el tratamiento viral, a excepción de las células tratadas con RAd-DsRed y α -Syn Wt en una concentración de 0,1 μ M.

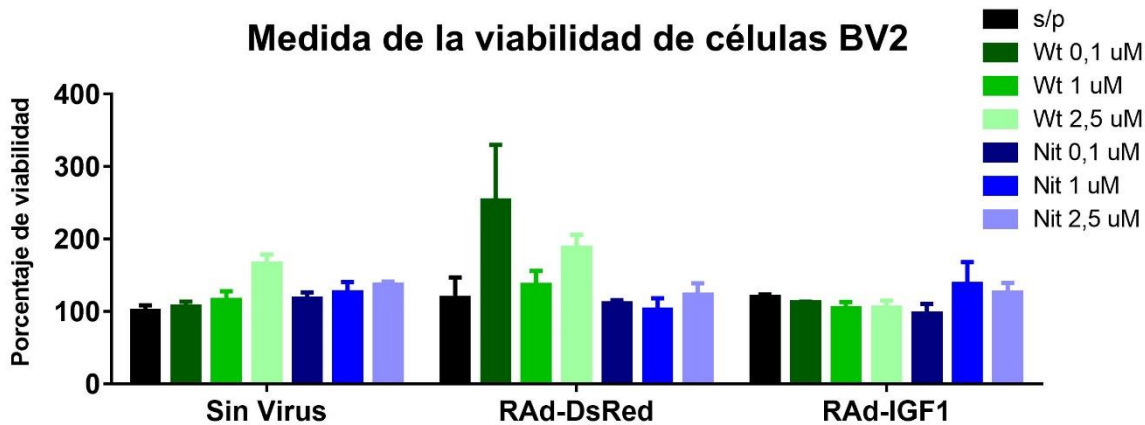


Figura 9. Porcentaje de viabilidad de células BV2 con diferentes tratamientos proteicos y virales. El grafico muestra el porcentaje de viabilidad refiriendo como 100% viabilidad de células sin virus, sin tratamiento

5.1.2 Efecto de la α -sinucleína sobre la producción relativa de nitritos

La **Figura 10** muestra la producción de nitritos frente a la exposición de α -Syn Wt y Nit a concentración 0,1 μ M para la línea celular SH-SY5Y. Se observan diferencias significativas para la producción de nitritos en los distintos tratamientos proteicos de las células sin virus, aumentando la producción con el agregado de proteína wild type, y más aún con el agregado de proteína nitrada. Puede observarse también que el tratamiento previo con RAd-DsRed disminuye significativamente la producción de nitritos, en comparación con su control sin virus. No se observan diferencias entre los tratamientos proteicos aplicados a células con RAd-DsRed y RAd-IGF1.

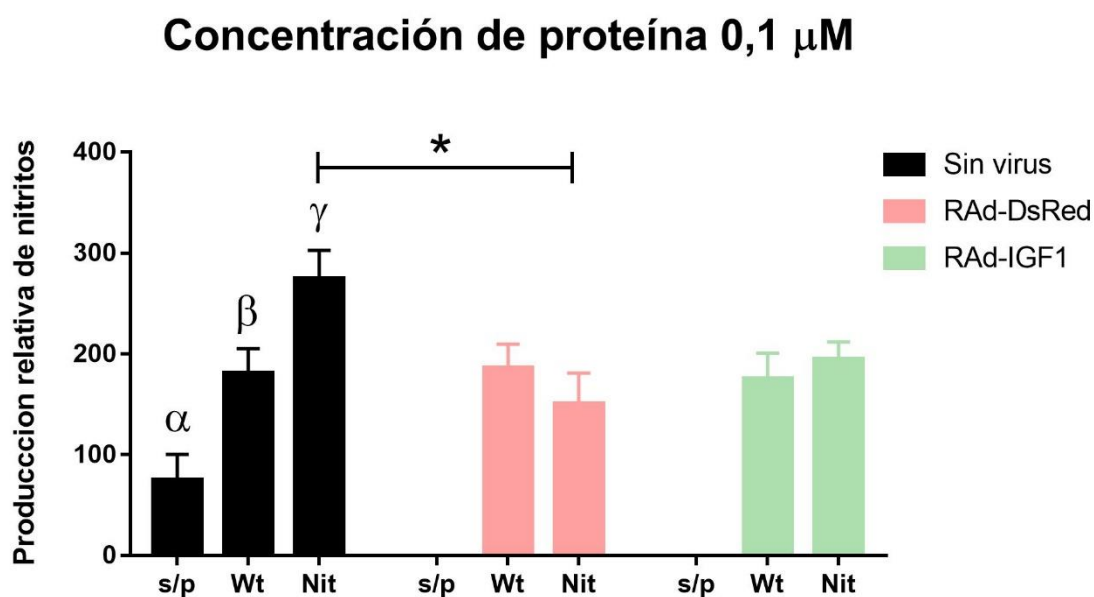


Figura 10. Producción relativa de nitritos frente al agregado de proteína α -Syn 0,1 μ M. La figura muestra la producción de nitritos frente a la exposición de α -Syn Wt y Nit a concentración 0,1 μ M relativizada a la producción de nitritos de células sin tratamiento alguno (sin virus, sin proteína) y normalizada al porcentaje de viabilidad celular. " α "; " β "; " γ " presentan valores significativos entre sí con $p < 0.05$ "*" $p < 0.05$

El tratamiento con proteína α -Syn Wt y Nit a concentración 1 μ M aumenta la producción de nitritos de las células SH-SY5Y que no estuvieron expuestas a un tratamiento viral previo (**Figura 11**). En cuanto al tratamiento viral con RAd-DsRed no parece afectar de manera significativa la producción de nitritos en las células con tratamiento proteico, mientras que el IGF1 tiende a disminuirla.

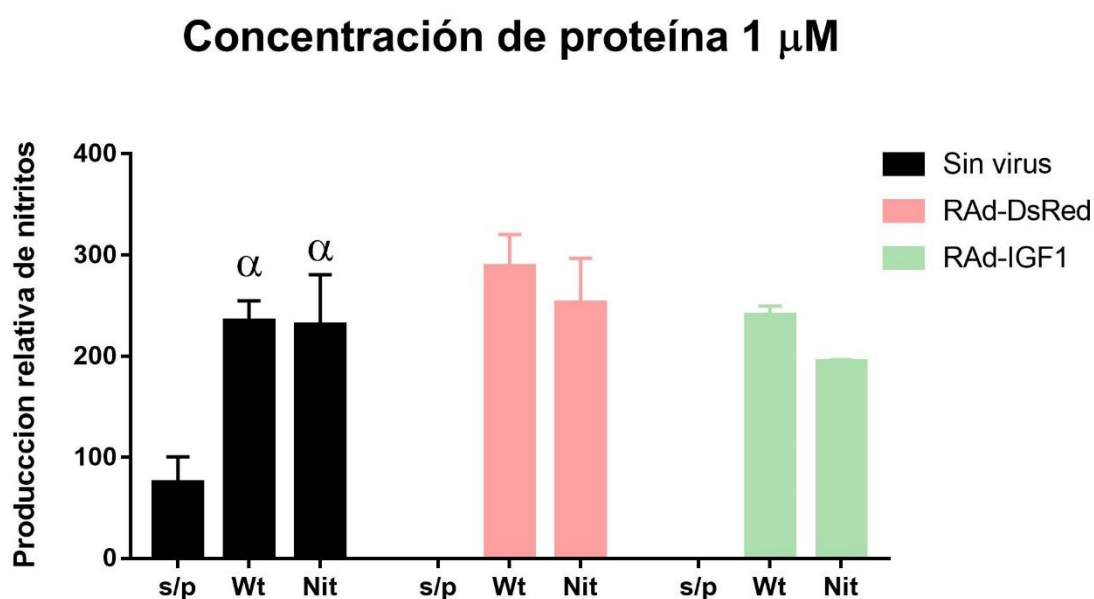


Figura 11. Producción relativa de nitritos frente al agregado de proteína α -Syn 1 μ M. La figura muestra la producción de nitritos frente a la exposición de α -Syn Wt y Nit a concentración 1 μ M relativizada a la producción de nitritos de células sin tratamiento alguno (sin virus, sin proteína) y normalizada al porcentaje de viabilidad celular. "α" $p < 0.05$ respecto a células s/p, sin virus. Los grupos con igual letra no presentan diferencias significativas entre sí.

De manera análoga al tratamiento con el ensayo anterior, el agregado de α -Syn Wt y Nit en una concentración de 2,5 μ M aumenta de manera significativa la producción de nitritos en las células sin tratamiento viral previo (**Figura 12**). En este caso, el tratamiento viral previo, tanto con RAd-DsRed como con RAd-IGF1, no parecen afectar la producción de nitritos.

Concentración de proteína 2,5 μM

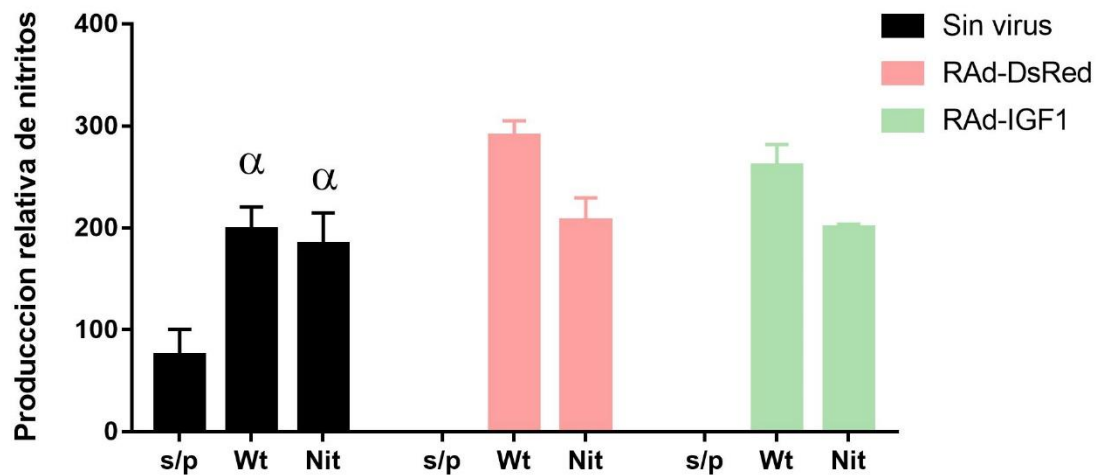


Figura 12. Producción relativa de nitritos frente al agregado de proteína $\alpha\text{-Syn}$ 2,5 μM . La figura muestra la producción de nitritos frente a la exposición de $\alpha\text{-Syn}$ Wt y Nit a concentración 2.5 μM relativizada a la producción de nitritos de células sin tratamiento alguno (sin virus, sin proteína) y normalizada al porcentaje de viabilidad celular. "α" $p < 0.05$ respecto a células s/p, sin virus. Los grupos con igual letra no presentan diferencias significativas entre sí.

La **Figura 13** muestra la producción de nitritos frente a la exposición de $\alpha\text{-Syn}$ Wt y Nit a concentración 0,1 μM para la línea celular BV2. Puede observarse que la producción de nitritos disminuye significativamente con el agregado de proteína wt en las células que fueron expuestas previamente al virus RAd-DsRed, mientras que los valores para los ensayos restantes no presentan diferencias significativas entre sí.

Concentración de proteína 0,1 μM

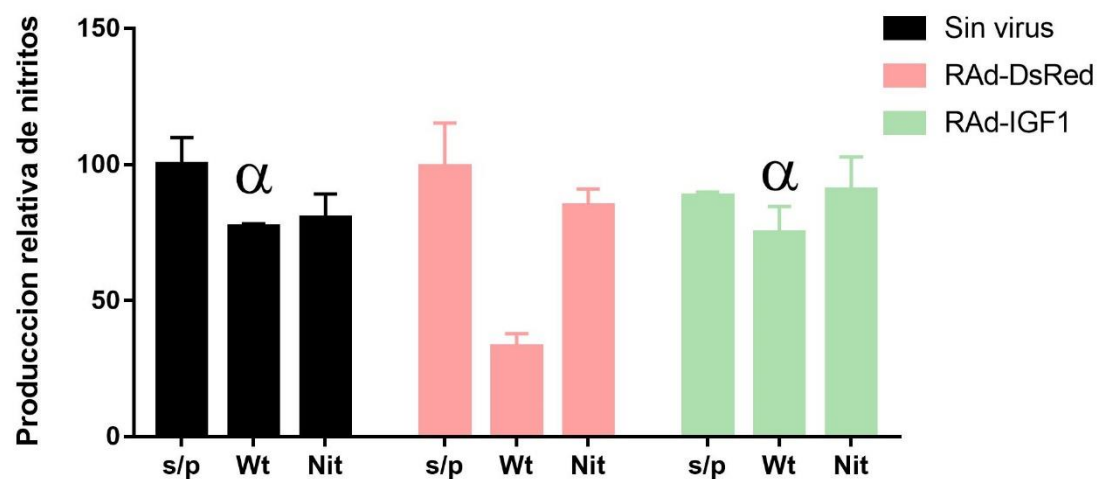


Figura 13. Producción relativa de nitritos frente al agregado de proteína α -Syn 0,1. La figura muestra la producción de nitritos frente a la exposición de α -Syn Wt y Nit a concentración 0,1 μ M relativizada a la producción de nitritos de células sin tratamiento alguno (sin virus, sin proteína) y normalizada al porcentaje de viabilidad celular. "α" $p < 0.05$ respecto a células wt, RAd-DsRed. Los grupos con igual letra no presentan diferencias significativas entre sí.

Un aumento en la concentración de α -Syn tanto nit como wt (1 μ M) no afecta de manera significativa a la producción de nitritos entre los distintos tratamientos (**Figura 14**). La exposición a α -Syn sólo tiende a disminuir la producción de nitritos en los diversos grupos de tratamientos virales.

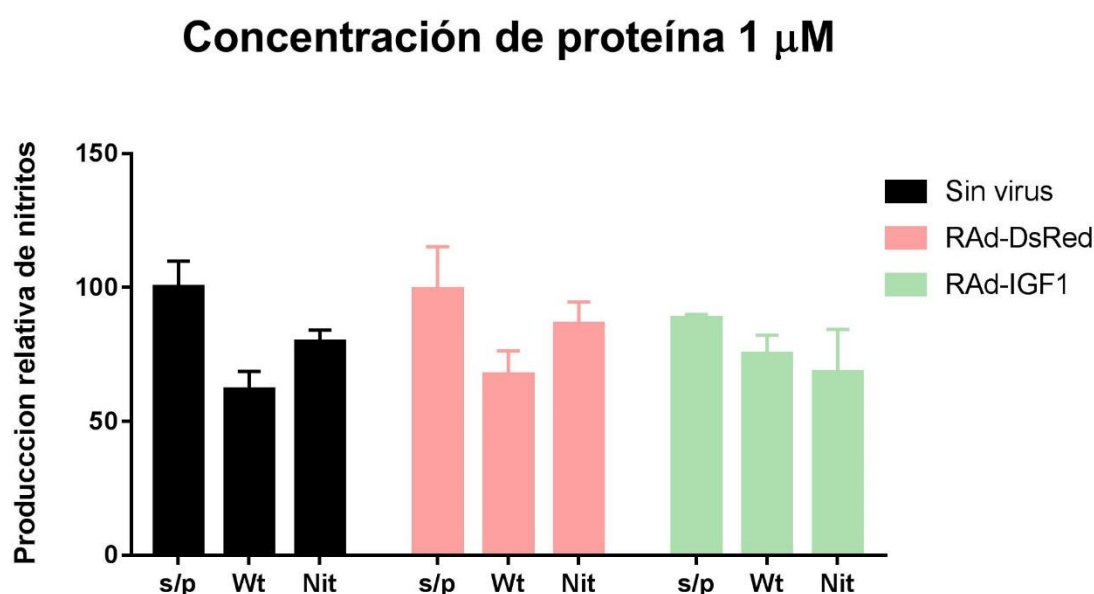


Figura 14. Producción relativa de nitritos frente al agregado de proteína α -Syn 0,1. La figura muestra la producción de nitritos frente a la exposición de α -Syn Wt y Nit a concentración 0,1 μ M relativizada a la producción de nitritos de células sin tratamiento alguno (sin virus, sin proteína) y normalizada al porcentaje de viabilidad celular.

Con un aumento aun mayor de proteína α -Syn, 2,5 μ M, se puede observar una disminución significativa de la producción de nitritos al agregar la forma wild type a las células sin virus y aquellas con virus RAd-DsRed frente a sus contrapartes sin proteína (**Figura 15**). Contrariamente, las células tratadas previamente con RAd-IGF1 presentan un aumento significativo en la producción de nitritos luego de la exposición a α -Syn Wt, respecto sus controles tratados con RAd-DsRed o sin virus.

Concentración de proteína 2,5 μ M

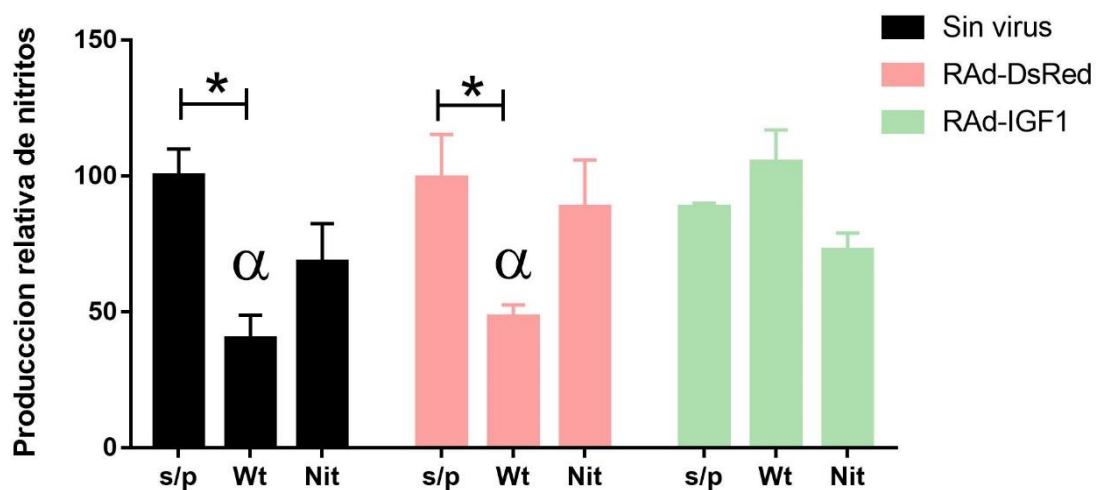


Figura 15. Producción relativa de nitritos frente al agregado de proteína α -Syn 2,5. La figura muestra la producción de nitritos frente a la exposición de α -Syn Wt y Nit a concentración 2,5 μ M relativizada a la producción de nitritos de células sin tratamiento alguno (sin virus, sin proteína) y normalizada al porcentaje de viabilidad celular. "α" $p < 0.05$ respecto a células wt, RAd-IGF1. Los grupos con igual letra no presentan diferencias significativas entre sí. "*" $p < 0.05$

5.2-Efecto de la α -sinucleína sobre la expresión de genes inflamatorios.

Con el objetivo de analizar el efecto de α -Syn wild type (Wt) y nitrada (Nit) y del tratamiento terapéutico sobre la expresión de genes pro y anti inflamatorios, se procedió a medir por PCR final la expresión de diversos genes. Como genes pro-inflamatorios se seleccionaron las interleuquinas 6 y 1 β (IL-6 y IL-1 β) y como anti-inflamatorios, la interleuquina 4 (IL-4) y la enzima Arginasa 1 (Arg-1).

Las mediciones se realizaron sobre el RNA extraído de las células BV2 tratadas con las proteínas en cuestión a una concentración de 2,5 μ M, debido a que estas condiciones no afectan la viabilidad de las células. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

En la **Figura 16** se muestra la expresión relativa de IL-6. Como se observa en el gráfico, las células BV2 no alteran su expresión de IL-6 ante la exposición a α -Syn, tanto Wt como Nit. En cuanto a las células tratadas previamente con RAd-DsRed, puede observarse un aumento no significativo del mensajero de IL-6. Sin embargo, el IGF1 transgénico es capaz de contrarrestar este efecto propio del virus y logra disminuir la expresión de IL-6 en las células tratadas con α -Syn Nit. El RAd-IGF1 no parece tener el efecto suficiente para disminuir la expresión de IL-6 en las células tratadas con la α -Syn Wt ni de las células que no se expusieron a proteínas.

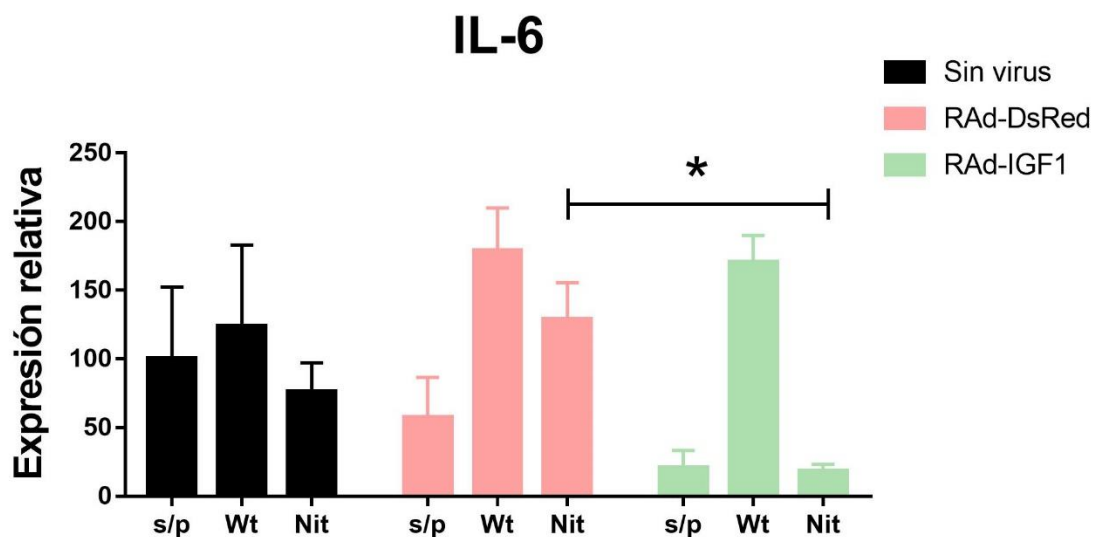


Figura 16. Expresión relativa de IL-6. La figura muestra la expresión de IL-6 de los distintos tratamientos normalizados a la expresión del gen Housekeeping 18S, y relativizado a la expresión de IL-6 de células que no recibieron tratamiento alguno (sin virus, s/p). * $p < 0.05$

En la **Figura 17** se muestra la expresión relativa de IL-1 β . Como puede observarse, la exposición a α -Syn Wt (sin virus) aumenta significativamente la expresión de IL-1 β respecto a las células que no recibieron tratamiento alguno. El tratamiento previo con ambos virus disminuye significativamente la expresión de esta interleuquina cuando se comparan con las células no tratadas con virus. No se observan diferencias significativas entre las células tratadas con RAd-IGF1 o RAd-DsRed independientemente de la exposición o no a α -Syn.

El tratamiento con RAd-IGF1 aumenta significativamente la expresión IL-1 β en las células expuestas a α -Syn Nitrada frente a su contraparte tratada con RAd-DsRed.

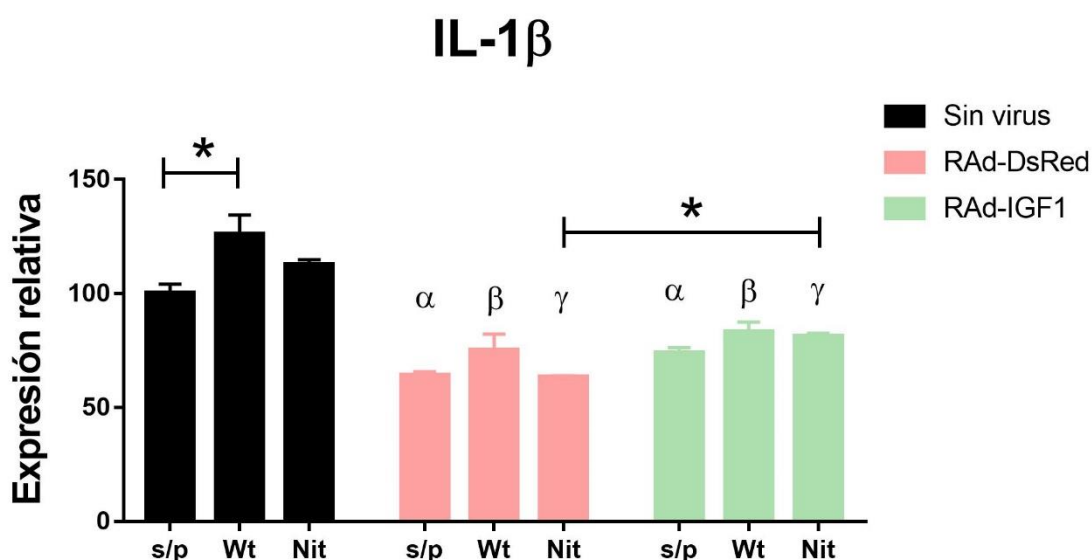


Figura 17. Expresión relativa de IL-1 β . La figura muestra la expresión de IL-1 β de los distintos tratamientos normalizados a la expresión del gen Housekeeping 18S y relativizado a la expresión de IL-1 β de células que no recibieron tratamiento alguno (sin virus, s/p). "α" $p < 0.05$ respecto a células s/p, sin virus. "β" $p < 0.05$ respecto a células Wt, sin virus. "γ" $p < 0.05$ respecto a células Nit, sin virus. "*" $p < 0.05$. Los grupos con igual letra no presentan diferencias significativas entre sí.

La **Figura 18** muestra la expresión relativa de IL-4. Respecto a las células sin tratamiento viral, puede observarse que sólo la α -Syn Wt aumenta de manera significativa la expresión del mensajero IL-4 respecto a las células que no recibieron tratamiento alguno. Por el contrario, no se observaron diferencias significantes entre las células tratadas con RAd-IGF1 o RAd-DsRed, independientemente de la exposición o no a α -Syn.

Nuevamente, puede observarse que el tratamiento previo con ambos virus afecta la expresión de IL-4, en este caso aumentándola, cuando se comparan con las células que no recibieron tratamiento viral. Puede observarse además que el efecto de IGF-1 logra aumentar la expresión de esta interleuquina de manera significativa en las células tratadas con α -Syn Wt, frente a su control tratadas con RAd-DsRed. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas entre las células tratadas con α -Syn Nit y RAd-DsRed respecto a su contraparte control tratadas con RAd-DsRed.

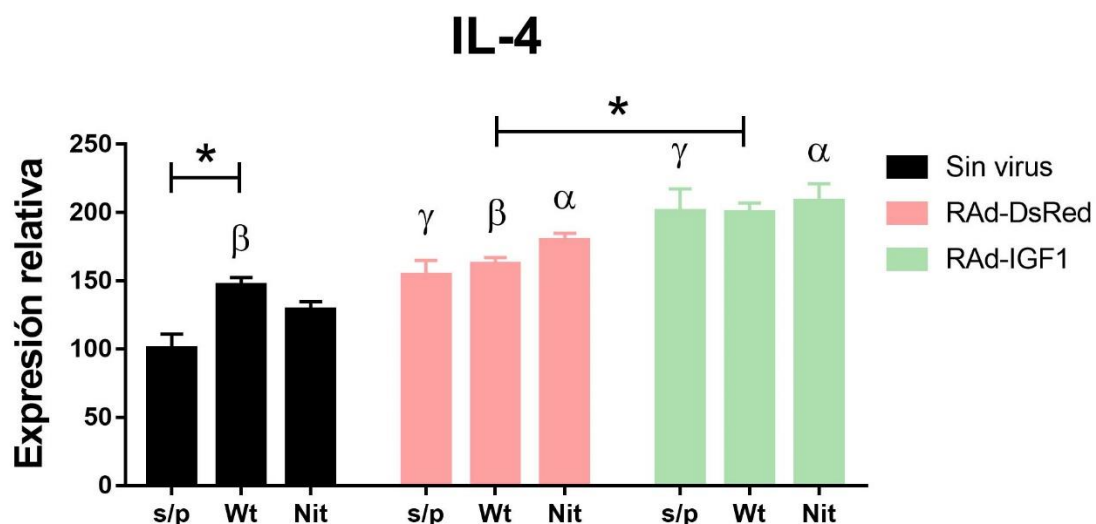


Figura 18. Expresión relativa de IL-4. La figura muestra la expresión de IL-4 de los distintos tratamientos normalizados a la Expresión del gen Housekeeping 18S y relativizado a la expresión de IL-4 de células que no recibieron tratamiento alguno (sin virus, s/p). "α" $p < 0.05$ respecto a células sin virus, Nit. "β" $p < 0.05$ respecto a células tratadas con RAd-IGF1, Wt. "γ" $p < 0.05$ respecto a células sin virus, s/p. "*" $p < 0.05$. Los grupos con igual letra no presentan diferencias significativas entre sí.

La **Figura 19** muestra la expresión relativa de la enzima Arg-1. Se observa en el gráfico que los tratamientos con ambos tipos de adenovirus aumentan de manera significativa la expresión de Arg-1 respecto a las células no tratadas en los 3 tratamientos proteicos ensayados. El virus terapéutico RAd-IGF1 aumenta de manera significativa la expresión de Arg-1 respecto al virus control RAd-DsRed cuando se compara cada tratamiento proteico. No se observan diferencias significativas intertratamiento viral por el agregado de proteína α -Syn.

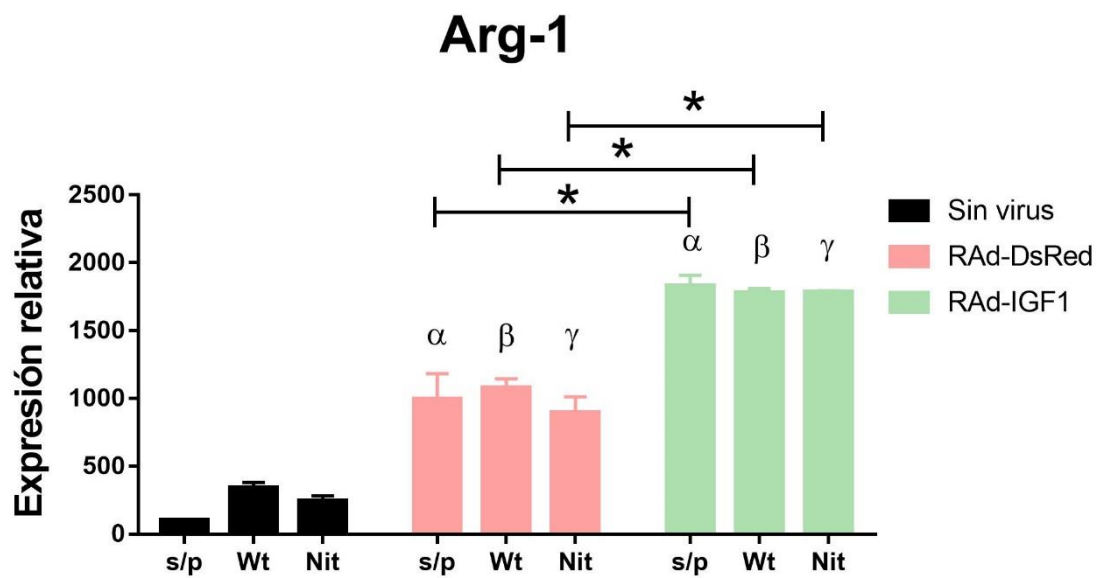


Figura 19. Expresión relativa de Arg-1. La figura muestra la expresión de Arg-1 de los distintos tratamientos normalizados a la expresión del gen Housekeeping 18S y relativizado a la expresión de Arg-1 de células que no recibieron tratamiento alguno (sin virus, s/p). " α " $p < 0.05$ respecto a células s/p, sin virus. " β " $p < 0.05$ respecto a células s/p, sin virus. " γ " $p < 0.05$ respecto a células s/p, sin virus. "*" $p < 0.05$. Los grupos con igual letra no presentan diferencias significativas entre sí.

Conclusiones y perspectiva a futuro

La Enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa de origen multigénico, asociada a casi dos docenas de loci (Park 1 a Park 23), así como una fuerte influencia de agentes exógenos vinculados principalmente a condiciones de disfunción mitocondrial y lisosomal, o estrés oxidativo y metabólico (Barker, 2014; Duda, Pötschke, & Liss, 2016). En este contexto, los fenómenos de oxidación y agregación proteica podrían estar desencadenando la toxicidad de α -Syn en las etapas más tempranas de la enfermedad, posiblemente a través de modificaciones post-traduccionales (PTMs), generando, por ejemplo, variantes nitradas de α -Syn. Existe una fuerte evidencia que sugiere que la liberación de α -Syn agregada o nitrada activa a las células microgliales y astrogiales, procesos que inducen la neuroinflamación, promoviendo la degeneración.

Nuestro objetivo fue evaluar el efecto tóxico de la α -Syn “salvaje” (Wt) y la variante nitrada, sobre células de origen neural o glial, y evaluar el potencial terapéutico de la terapia génica para IGF1.

Para excluir posibles efectos de las proteínas, así como de los virus sobre la viabilidad celular, realizamos el ensayo de MTT sobre dos líneas celulares, una de origen neural (SH-SY5Y) y una de origen microglial (BV2) (Figuras A y B). Este ensayo mostró que los tratamientos no presentaron ningún efecto perjudicial significativo sobre la viabilidad celular. Sin embargo, la disminución en la producción relativa de nitritos observada en células BV2 con el tratamiento proteico con α -Syn Wt a distintas concentraciones (Figura nitritos 0,1 y 2,5 μ M BV2) puede deberse a un leve aumento (no significativo) de la proliferación, hecho que ha sido reportado previamente por Yin et al (Yin et al., 2011). Dado que las células BV2 presentaron una viabilidad más homogénea frente a los tratamientos con α -Syn y virus que las células SH-SY5Y, decidimos continuar los ensayos sólo con esta línea celular.

Teniendo en cuenta que las células BV2 son de un origen microglial, nos preguntamos si, frente a la exposición a las variantes de α -Syn, podría observarse una polarización de las células hacia un fenotipo pro-inflamatorio. A su vez, si el IGF1 era capaz de contrarrestar este efecto, y polarizarlas hacia un fenotipo anti-inflamatorio. Para ello, analizamos si los distintos tratamientos provocaban cambios en la expresión de las interleuquinas pro-inflamatorias IL-6 y IL-1 β , y de la interleuquina anti-inflamatoria IL-4 y el marcador anti-inflamatorio Arginasa-1.

Estos ensayos revelaron que la exposición a α -Syn Wt aumenta de manera significativa la expresión de IL-1 β e IL-4, a la vez que no se observaron diferencias en la expresión de IL-6 ni Arg1. Por otro lado, la variante nitrada no produjo diferencias detectables al término del experimento.

Teniendo en cuenta que las diferentes especies de alfa-sinucleína están relacionadas con la neuroinflamación en las sinucleinopatías nuestros resultados muestran que el mecanismo detrás de la activación de la microglía depende de los tipos y de la concentración de α -Syn. Identificamos la alfa-sinucleína wild type como un potente inductor de respuestas inmune proinflamatorias de células BV2.

Se ha demostrado que α -Syn Nitrada es capaz de aumentar la concentración de NF- κ B en el núcleo de células microgliales de ratón (Reynolds et al., 2008), por lo que es probable que los efectos de esta proteína sobre la expresión de los distintos marcadores no se hayan observado debido a la ventana de tiempo en la que se analizaron los resultados.

El mecanismo de activación de células BV2 observado en nuestro trabajo podría ser facilitado a través de ciertos receptores importantes para el reconocimiento y la internalización de especies específicas de alfa-sinucleína, siendo necesario aclarar aún más cómo diferentes especies de alfa-sinucleína se internalizan y activan la microglía y si esta activación de las células microgliales promueve o impide la progresión de la enfermedad

En cuanto al tratamiento terapéutico, pudimos observar que el IGF-1 logró disminuir la expresión de las interleuquinas pro-inflamatorias a la vez que logró aumentar la expresión de los marcadores anti-inflamatorios. Estos resultados reafirman datos anteriormente observados por nuestro grupo, los cuales sugieren que el IGF1 posee un rol anti-inflamatorio (Falomir-Lockhart et al., manuscrito en preparación).

Como perspectivas a futuro, nos proponemos hacer una curva de tiempo de exposición a ambas variantes de α -Syn, con el fin de optimizar el análisis de expresión de las interleuquinas y marcadores inflamatorios.

Así como también realizar mediciones de NF- κ B y otros marcadores de fenotipo microglial, complementados con ensayos inmunohistoquímicos para la identificación del tipo celular

Como paso siguiente, es nuestro deseo trasladar esta puesta a punto a cultivos primarios de células gliales y neurales de rata y ratón.

Referencias

- Bangari, D., & Mittal, S. (2006). Current strategies and future directions for eluding adenoviral vector immunity. *Current Gene Therapy*, 6(2), 215–226. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1455550/>
- Barker, R. (2014). Environmental toxins and Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences*, 12(5), 182. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90066-0](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90066-0)
- Basarkar, A., & Singh, J. (2007). Nanoparticulate systems for polynucleotide delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 2(3), 353–360. <https://doi.org/10.2147/IJN.S>
- Bellini, M. J., Hereñú, C. B., Goya, R. G., & Garcia-Segura, L. M. (2011). Insulin-like growth factor-I gene delivery to astrocytes reduces their inflammatory response to lipopolysaccharide. *Journal of Neuroinflammation*, 8(1), 21. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-21>
- Benihoud, K., Yeh, P., & Perricaudet, M. (1999). Adenovirus vectors for gene delivery. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5), 440–447. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)00007-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00007-5)
- Bilbo, S. D., & Schwarz, J. M. (2012). The immune system and developmental programming of brain and behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 33(3), 267–286. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2012.08.006>
- Blasi, E., Barluzzi, R., Bocchini, V., Mazzolla, R., & Bistoni, F. (1990). Immortalization of murine microglial cells by a v-raf / v-myc carrying retrovirus. *Journal of Neuroimmunology*, 27(2–3), 229–237. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(90\)90073-V](https://doi.org/10.1016/0165-5728(90)90073-V)
- Block, M. L., & Hong, J. S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. *Progress in Neurobiology*, 76(2), 77–98. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.06.004>
- Burre, J., Sharma, M., & Sudhof, T. C. (2015). Definition of a Molecular Pathway Mediating - Synuclein Neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*, 35(13), 5221–5232. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4650-14.2015>
- Cai, D. (2013). Neuroinflammation and neurodegeneration in overnutrition-induced diseases. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 24(1), 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.11.003>
- Campos, C., Rocha, N. B. F., Lattari, E., Paes, F., Nardi, A. E., & Machado, S. (2016). Exercise-induced neuroprotective effects on neurodegenerative diseases: the key role of trophic factors. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 16(6), 723–734. <https://doi.org/10.1080/14737175.2016.1179582>
- Castilla-Cortazar, I., Guerra, L., Puche, J. E., Muñoz, U., Barhoum, R., Escudero, E., & Lavandera, J. L. (2014). An experimental model of partial insulin-like growth factor-1 deficiency in mice. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 70(1), 129–139. <https://doi.org/10.1007/s13105-013-0287-y>
- Cherry, J. D., Olschowka, J. A., & O'Banion, M. (2014). Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1), 98. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-98>
- Cotman, C. W., Berchtold, N. C., & Christie, L. A. (2007). Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends in Neurosciences*, 30(9), 464–472. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.06.011>
- Cremades, N., Cohen, S. I. A., Deas, E., Abramov, A. Y., Chen, A. Y., Orte, A., ... Klenerman, D. (2012). Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of α -synuclein. *Cell*, 149(5), 1048–1059. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.037>

- de Rijk, M. C., Tzourio, C., Breteler, M. M. B., Dartigues, J. F., Amaducci, L., Lopez-Pousa, S., ... Rocca, W. A. (1997). Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe : the EUROPARKINSON collaborative study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 62, 10–15. <https://doi.org/10.1136/jnnp.62.1.10>
- Duda, J., Pötschke, C., & Liss, B. (2016). Converging roles of ion channels, calcium, metabolic stress, and activity pattern of Substantia nigra dopaminergic neurons in health and Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 156–178. <https://doi.org/10.1111/jnc.13572>
- Dudek, S. M., Chiang, E. T., Camp, S. M., Guo, Y., Zhao, J., Brown, M. E., ... Garcia, J. G. N. (2010). Abl tyrosine kinase phosphorylates nonmuscle Myosin light chain kinase to regulate endothelial barrier function. *Molecular Biology of the Cell*, 21(22), 4042–4056. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09>
- Ebrahimi-Fakhari, D., Cantuti-Castelvetri, I., Fan, Z., Rockenstein, E., Masliah, E., Hyman, B. T., ... Unni, V. K. (2011). Distinct Roles In Vivo for the Ubiquitin-Proteasome System and the Autophagy-Lysosomal Pathway in the Degradation of α -Synuclein. *Journal of Neuroscience*, 31(41), 14508–14520. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1560-11.2011>
- Espinet, C., Gonzalo, H., Fleitas, C., Menal, M. J., & Egea, J. (2015). Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Neurotrophic Approach. *Current Drug Targets*, 16(1), 20–30. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150107153233>
- Fauvet, B., Mbefo, M. K., Fares, M. B., Desobry, C., Michael, S., Ardah, M. T., ... Lashuel, H. A. (2012). α -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and Escherichia coli exists predominantly as disordered monomer. *Journal of Biological Chemistry*, 287(19), 15345–15364. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.318949>
- Fernandez, A. M., & Torres-Aleman, I. (2012). The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(4), 225–239. <https://doi.org/10.1038/nrn3209>
- Gao, X., Kim, K.-S., & Liu, D. (2007). Nonviral gene delivery: What we know and what is next. *The AAPS Journal*, 9(1), E92–E104. <https://doi.org/10.1208/aapsj0901009>
- Hansen, C., Angot, E., Bergström, A. L., Steiner, J. A., Pieri, L., Paul, G., ... Brundin, P. (2011). α -Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *Journal of Clinical Investigation*, 121(2), 715–725. <https://doi.org/10.1172/JCI43366>
- Hanson, C. D., & Clarke, C. (2013). Is expressed emotion related to estimates of ability made by older people with cognitive impairments and their partners? *Aging and Mental Health*, 17(5), 535–543. <https://doi.org/10.1080/13607863.2013.770447>
- Hardy, J., Cookson, M. R., & Singleton, A. (2003). Genes and parkinsonism. *Lancet Neurology*, 2(4), 221–228. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(03\)00350-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(03)00350-8)
- Hidaka, C., Milano, E., Leopold, P. L., Bergelson, J. M., Hackett, N. R., Finberg, R. W., ... Crystal, R. G. (1999). CAR-dependent and CAR-independent pathways of adenovirus vector-mediated gene transfer and expression in human fibroblasts. *J Clin Invest*, 103(4), 579–587. <https://doi.org/10.1172/JCI5309.supplement>
- Hodaie, M., Neimat, J. S., & Lozano, A. M. (2007). The dopaminergic nigrostriatal system and Parkinson's disease: Molecular events in development, disease, and cell death, and new therapeutic strategies. *Neurosurgery*, 60(1), 17–28. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000249209.11967.CB>
- Hoffmann, A., Ettle, B., Bruno, A., Kulinich, A., Hoffmann, A. C., von Wittgenstein, J., ... Schlachetzki, J. C. M. (2016). Alpha-synuclein activates BV2 microglia dependent on its aggregation state. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 479(4), 881–886. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.109>
- Józkowicz, A., & Dulak, J. (2006). Europe PMC Funders Group Helper-dependent adenoviral vectors in experimental gene therapy *, 52(November 2004), 589–599. <https://doi.org/20051116> [pii]
- Kettenmann, H., & Verkhratsky, A. (2011). Neuroglia, der lebende Nerven Kitt. *Fortschritte*

- Der Neurologie Psychiatrie*, 79(10), 588–597. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1281704>
- Kirk-Sanchez, N., & McGough, E. (2013). Physical exercise and cognitive performance in the elderly: current perspectives. *Clinical Interventions in Aging*, 51. <https://doi.org/10.2147/CIA.S39506>
- Klegeris, A., Pelech, S., Giasson, B. I., Maguire, J., Zhang, H., McGeer, E. G., & McGeer, P. L. (2008). ??-Synuclein activates stress signaling protein kinases in THP-1 cells and microglia. *Neurobiology of Aging*, 29(5), 739–752. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.11.013>
- Knusel, B., Michel, P. P., Schwaber, J. S., & Hefti, F. (1990). Selective and nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development in vitro by nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and the insulin-like growth factors I and II. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 10(February), 558–570.
- Landi, S., Ciucci, F., Maffei, L., Berardi, N., & Cenni, M. C. (2009). Setting the Pace for Retinal Development: Environmental Enrichment Acts Through Insulin-Like Growth Factor 1 and Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Journal of Neuroscience*, 29(35), 10809–10819. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1857-09.2009>
- Laporte, L. De, Rea, J. C., & Shea, L. D. (2009). NIH Public Access, 27(7), 947–954. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.09.036.Design>
- Lykkebo, S., & Jensen, P. H. (2002). Alpha-synuclein and presynaptic function: implications for Parkinson's disease. *Neuromolecular Medicine*, 2(2), 115–129. <https://doi.org/10.1385/NMM:2:2:115>
- McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (2008). Glial reactions in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 23(4), 474–483. <https://doi.org/10.1002/mds.21751>
- Patil, S. D., Rhodes, D. G., & Burgess, D. J. (2005). DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: A comprehensive review. *The AAPS Journal*, 7(1), E61–E77. <https://doi.org/10.1208/aapsj070109>
- Pellecchia, M. T., Santangelo, G., Picillo, M., Pivonello, R., Longo, K., Pivonello, C., ... Barone, P. (2014). Insulin-like growth factor-1 predicts cognitive functions at 2-year follow-up in early, drug-naïve Parkinson's disease. *European Journal of Neurology*, 21(5), 802–807. <https://doi.org/10.1111/ene.12137>
- Puntel, M., Curtin, J. F., Zirger, J. M., Muhammad, a K. M., Xiong, W., Liu, C., ... Castro, M. G. (2006). Quantification of high-capacity helper-dependent adenoviral vector genomes in vitro and in vivo, using quantitative TaqMan real-time polymerase chain reaction. *Human Gene Therapy*, 17(5), 531–544. <https://doi.org/10.1089/hum.2006.17.ft-204>
- Ramalingam, M., & Kim, S.-J. (2016). Protective effects of activated signaling pathways by insulin on C6 glial cell model of MPP + -induced Parkinson's disease. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 9893(June), 1–8. <https://doi.org/10.3109/10799893.2016.1171342>
- Reynolds, A. D., Glanzer, J. G., Kadiu, I., Ricardo-Dukelow, M., Chaudhuri, A., Ciborowski, P., ... Gendelman, H. E. (2008). Nitrated alpha-synuclein-activated microglial profiling for Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 104(6), 1504–1525. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05087.x>
- Schaffer, D. V., Koerber, J. T. J. T., & Lim, K. (2008). Molecular engineering of viral gene delivery vehicles. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 10(1), 169. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160514.Molecular>
- Singleton, A. B. (2013). NIH Public Access, 124(3), 325–338. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1013-5.The>
- Spielman, L. J., Little, J. P., & Klegeris, A. (2014). Inflammation and insulin/IGF-1 resistance as the possible link between obesity and neurodegeneration. *Journal of Neuroimmunology*, 273(1–2), 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.06.004>
- Torres-Aleman, I. (2010). Toward a comprehensive neurobiology of IGF-I. *Developmental Neurobiology*, 70(5), 384–396. <https://doi.org/10.1002/dneu.20778>
- Trejo, J. L., Carro, E., & Torres-Aleman, I. (2001). Circulating insulin-like growth factor I

mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 21(5), 1628–34. <https://doi.org/21/5/1628> [pii]

Yin, J., Han, J., Zhang, C., Ma, Q. L., Li, X., Cheng, F., ... Yu, S. (2011). C-terminal part of α -synuclein mediates its activity in promoting proliferation of dopaminergic cells. *Journal of Neural Transmission*, 118(8), 1155–1164. <https://doi.org/10.1007/s00702-011-0592-y>
