# Activacion de astrocitos por deiminacion post-translacional

Mabel E. Algeciras, BS

Supervisor: Sanjoy K. Bhattacharya

Co-supervisor: Horacion M. Serra

RESUMEN

Una relación en el nivel elevado y aberrante en la deiminación post traduccional ha sido demostrado en estudios relacionados a la esclerosis múltiple (MS) (Bates et al, 2002; Kim et al, 2003) y más recientemente en el nervio óptico de pacientes con glaucoma con alta presión intraocular (Bhattacharya et al., 2006) y en pacientes con glaucoma con presión intraocular normal (Cafaro et al, 2010). La esclerosis múltiple es vista como una enfermedad autoinmune y algunos componentes de la autoinmunidad también han sido relacionados con el glaucoma (Tezel & Wax, 2007). Nosotros intentamos demostrar que el nivel de expresión de la enzima deiminasa de la peptidyl arginina 2 (PAD2) es más elevado en los astrocitos a diferencia de otras células como respuesta a una variedad de parámetros fisicoquímicos. Nuestro trabajo preliminar demuestra que la elevación de la presión ambiental es uno de esos parámetros (Algeciras et al, 2008). También hemos demostrado que la elevación en el nivel de PAD2 está asociada con una elevación en el nivel de parámetros bioquímicos relacionados con la activación de astrocitos (Govindarajan et al, 2009). En mi tesis yo evaluaré diferentes estrategias para intentar elevar los niveles de PAD2 y consecuentemente la deiminación, así como intentaré también llegar a un estimado cuantitativo de activación bioquímica. Finalmente, utilizaré anticuerpos y diferentes técnicas para tratar de demostrar que los astrocitos pueden ser capaces de expresar moléculas importantes en la presentación antigénica y potencialmente estar capacitados, bajos condiciones de activación, para actuar como células presentadores de antígeno y activar a los linfocitos T. *Nuestra*

*hipótesis es que la elevación en la deiminación post traduccional en el nervio óptico de pacientes con glaucoma o en el tejido cerebral de pacientes con esclerosis múltiple puede desencadenar una cascada lenta y progresiva: la modificación de las proteínas de la mielina por la deiminación post traduccional genera productos auto catalíticos que activan a los astrocitos. Cuando los astrocitos son activados, pueden obtener habilidades de células presentadoras de antígenos y así iniciar una reacción con participación de diferentes componentes inmunológicos que contribuye a la muerte de las neuronas en ciertas enfermedades neurodegenerativas.*

**Lista de abreviaturas**

| | |
|---|---|
| AGM | Medio de crecimiento de astrocitos/Astrocyte growth media |
| ALDH1L1 | Aldehido deshidrogenasa 1, miembro familiar 1L/Aldehyde dehydrogenase 1, family member L1 |
| AQP 4 | Acuaporina 4 |
| AH | Humor o líquido acuoso/Aqueous humor |
| APC | Células presentadoras de antígeno/Antigen presenting cells |
| BBB | Barrera hematoencefálica/Blood–brain barrier |
| CD80/B7-1 | Molécula co- estimuladora CD80/Co-stimulatory molecule CD80 |
| CD86/B7-2 | Molécula co- estimuladora CD86/Co-stimulatory molecule CD86 |
| CNS | Sistema nervioso central/Central nervous system |
| CNTF | Factor neurotrofico ciliar/Ciliary neurotrophic factor |
| CX43 | Conexina 43 |
| CSF | Liquido cefalorraquídeo |
| DAPI | 4’,6’-diamino-2-fenilindol |
| DEPDC5 | DEP domain containing protein 5 |

| | |
|---|---|
| dMBP | Proteína básica de mielina deiminada/deiminated myelin basic protein |
| DMEM | Suero modificado Dulbecco's |
| DTT | Ditiotreitol |
| ECM | Matriz extracelular/Extracellular matrix |
| EAE | Encefalitis autoinmune experimental/Experimental autoimmune encephalitis |
| ELISA | Técnica immunoenzimática tipo ELISA/Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay |
| FACS | Citómetro de flujo/Fluorescence-activated cell sorting |
| FBS | Suero bovino fetal/Fetal bovine serum |
| GFAP | Proteína acida fibrilar glial/Glial fibrillary acidic protein |
| $H_2O_2$ | Peróxido de hidrogeno/Hydrogen peroxide |
| HPLC | Cromatografía de líquidos de alta definición/High Performance Liquid Chromatography |
| IFNγ | Interferón γ/Interferon γ |
| IL | Interleucinas/Interleukins |
| IOP | Presión intraocular/Intraocular pressure |
| ISO[4]$LGE_2$ | Aducto de isolevuglandina |
| LC | Lámina cribosa |

| | |
|---|---|
| LDH | Lactato deshidrogenasa |
| LN | Ganglios/Lymph nodes |
| MAG | Glicoproteina asociada a la mielina/Myelin associated glycoprotein |
| MBP | Proteína básica de la mielina/Myelin basic protein |
| MHC II | Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad/Major histocompatibility complex |
| MFI | Promedio de intensidad de fluorescencia/Mean fluorescence intensity |
| MS | Esclerosis múltiple/Multiple Sclerosis |
| MS/MS | Espectrometría de masas en serie/Tandem mass spectrometry |
| MRI | Imagen por resonancia magnética/Magnetic resonance imaging |
| m/z | Relación masa a carga/Mass to charge ratio |
| NCAM | moleculas de adhesion celular neural/Neural cell adhesión molecule |
| NGF | Factor de crecimiento nervioso/Nerve growth factor |
| NO | Oxido nitrico |
| non dMBP | Proteína básica de mielina no deiminada/non deiminaded myelin basic protein |

| | |
|---|---|
| NOS | Sintetasa de oxido nitrico/Nitric oxide synthase |
| ON | Nervio óptico |
| ONH | Cabeza del nervio óptico |
| PADs | Enzima deiminasa de la peptidyl arginina/Peptidyl arginine deiminases |
| PERG | Electrorretinograma por patrón/Pattern electroretinogram |
| PLP | Proteína proteolipida de la mielina/Myelin proteolipid protein |
| POAG | Glaucoma primario de ángulo abierto/Primary open angle glaucoma |
| PTMs | Modificaciones post traduccionales/Posttranslational modifications |
| PVDF | Polifluoruro de vinilideno |
| RGC | Células ganglionares de la retina/Retinal ganglion cells |
| ROS | Especies reactivas de oxigeno/Reactive oxigen species |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico |
| tARN | ARN de transferencia/ transfer RNA |
| TGF-β | Factor de crecimiento transformante β |
| TNF-α | Factor de necrosis tumoral α/Tumor necrosis factor α |
| TSP 1 | Trombospondina 1 |

## Introducción

Las modificaciones post traduccionales (PTMs) a las proteínas son procesos fundamentales requeridos para la regulación de muchas y variadas funciones celulares. En los mamíferos, algunas de estas PTMs son la fosforilación, acetilación y oxidación de cadenas auxiliares de amino ácidos, como de prolina, arginina, lisina, histidina, residuos de cisteína por sistemas de mezcla de función de oxidación; la deamidación de residuos de asparagina y glutamina; la racemización y isomerización de residuos de aspartato, asparagina, prolina y la metilación de residuos de arginina y lisina. Una PTM importante es la deiminación post traduccional, en la que la arginina en el contexto de proteínas es convertida a citrulina (Vossenaar et al, 2003) (**Figura 1A**). El término conocido como “citrulinacion” es intercambiable con el término “deiminación”. Para mantener la consistencia en este trabajo de tesis doctoral, voy a utilizar el término deiminación para referirme a la reacción de la conversión de arginina en citrulina en el contexto de proteínas.

### I. La deiminación y las enzimas PADs.

Las células de los mamíferos poseen diferentes genes PAD, PAD1–4 y 6 (Vossenaar et al, 2003). La deiminación en las proteínas ocurre en diferentes tipos de tejidos, epidermis, músculos y células neuronales. La deiminación es catalizada por la enzima deiminasa de la peptidyl arginina (PAD) que está presente en ese tejido y de acuerdo a la distribución celular. PAD1, 3 catalizan la deiminación en la piel; PAD2 es la PAD mas abundante en el ojo y el cerebro; y PAD4 es una enzima nuclear y omnipresente(Asaga & Ishigami, 2001;

Bhattacharya et al, 2006b; Vossenaar et al, 2003). La activación de PAD4 ha sido sugerida como una causa de represión de transcripción (Wang et al, 2009). La deiminación catalizada por PADs requiere de la presencia de calcio para su activación y genera amonio como producto residual. La arginina en el contexto proteínico, no la arginina libre es un sustrato para PADs (Vossenaar et al, 2003). Las reacciones de las argininas libres son catalizadas por la sintetasa de oxido nítrico (NOS) para generar oxido nítrico (NO) y citrulina libre. Las argininas en el contexto proteínico no son buenos sustratos para NOS. Hasta el momento no se conoce de ninguna ARN de transferencia (tARN) para transferir el aminoácido de citrulina, entonces la deiminación es considerada una reacción irreversible catalizada únicamente por PADs. La actividad enzimática de los PADs es usualmente medida por la cantidad de benzol citrulina que es convertida a partir de benzol arginina; este producto es evaluado mediante un análisis de absorción a 470nm (Liao et al, 2005; Watanabe et al, 1988).

La conversión de arginina a citrulina ocasiona pequeños cambios a la estructura y el peso molecular, excepto por el cambio de la molécula de positiva a neutra. Muchos han intentado detectar la citrulina en el contexto proteínico. En uno de los métodos más modernos, la citrulina es modificada y detectada por un anticuerpo específico para esta modificación. En este método, la citrulina en un ambiente de extrema acidez es forzada a reaccionar con butano-2,3-diona y antipirino generando un aducto en una reacción de dos pasos (Senshu et al, 1992) (**Figura 1B**). Este proceso en que la modificación química es realizada en un ambiente acido no es eficiente para la citrulina libre y preferido por la arginina

en el contexto proteínico. Existe un anticuerpo que está disponible para detectar el aducto de la citrulina generada por esta reacción con el cual se utiliza butano-2,3-diona y antipirino (Senshu et al, 1992). Más recientemente, anticuerpos que detectan a la citrulina no modificada han sido desarrollados, un ejemplo es el F95 (Nicholas & Whitaker, 2002) y otros más de la compañía Abcam, pero la sensibilidad y especificidad todavía necesitan ser evaluadas con más rigor. La deiminación ha sido reportada en los astrocitos (Bhattacharya et al, 2006a), microglia y oligodendrocitos (Asaga et al, 2002; Asaga & Ishigami, 2007), células Schwann (Keilhoff et al, 2008)y en las neurons (Enriquez-Algeciras et al, 2013). Solamente unas cuantas proteínas, entre ellas la queratina, la proteína básica de la mielina (MBP), proteína acida fibrilar glial (GFAP), vimentina, tricohialina, histonas (H2A, H3 and H4), filagrina y fibrinógeno han sido reportados como modificados por la deiminación (Algeciras & Bhattacharya, 2007). En la retina humana, 2',3'- nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa, MBP y la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) han sido identificadas como proteínas que pueden ser deiminadas y otras investigaciones independiente han confirmado su estado de deiminación en el cerebro también (Wood et al, 2008). Mediante el uso de espectrometría de masa cuantitativa, se han identificado otras proteínas susceptibles a deiminación (Grant et al, 2007).

## II. PADs y las enfermedades.

Los PADs y por ende la deiminación han sido implicados como participes en la enfermedad autoinmune de artritis reumatoide (Scofield, 2004). La elevación en

PAD2, proteínas citrulinadas y/o, citrulina ha sido reportada como implicada en enfermedades neurológicas, con y sin manifestaciones ópticas, mas prominentemente en la esclerosis múltiple (Moscarello et al, 2002), encefalomielitis autoinmune (Nicholas et al, 2005), Alzheimer (Ishigami et al, 2005; Louw et al, 2007), esclerosis lateral amiotrofia(Chou et al, 1996) y glaucoma (Bhattacharya et al, 2006a), abriendo las puertas a un posible uso de inhibidores de PAD y/o inhibidores  para PAD2 en especifico en el tratamiento de estas enfermedades.

Una enzima procariotica que deimina a proteínas y a argininas libres en ausencia de calcio ha sido identificada en *Porphyromonas gingivalis*. Esta enzima no está relacionada con los PADs de los vertebrados y comparte homología con deiminasas de la arginina correspondientes a bacterias. Inhibidores a esta enzima han sido considerados efectivos para el tratamiento contra la periodontitis (McGraw et al, 1999). La deiminación dirigida por PAD2 ha sido asociada con la neurodegeneración inducida por kainita en estudios con cerebros de ratas (Asaga et al, 2002; Asaga & Ishigami, 2001).  El gran potencial en la explotación de los PADS para el tratamiento de diferentes enfermedades ha recibido amplia atención. Un numero de patentes ya establecidas y de otras en el proceso de aplicación se han centrado en PADS y auto-anticuerpos a PADs en artritis reumatoide, ya sea como biomarcador o como estrategias de intervencion terapeuticas (Serre et al, 2005; Serre & Sebbag, 2006). PAD1 y PAD3 han sido propuestos como moléculas importantes en enfermedades de la piel, incluyendo psoriasis (Hunter, 2003). Las proteínas con mucha similaridad a

PADs (con al menos un 40% de homología a PADs) han sido estudiadas con un posible rol en la contracepción (Allis et al, 2006; Herr et al, 2005). Una proteína muy parecida a PAD3 también has sido propuesta como involucrada en ciertos tipos de cáncer (Challita-Eid et al, 2006). PAD2 se ha propuesto como un posible tratamiento para la esclerosis múltiple (Hunter, 2002; Moscarello & Chamczuk, 2003) y el glaucoma (Bhattacharya & Crabb, 2006).

## III. La deiminación en la esclerosis múltiple.

La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por una inflamación recurrente y por formación de placas deiminadas localizadas en el sistema nervioso central (CNS; cerebro y espina dorsal) y está asociada con la degeneración de las axonas (Ziemssen, 2005). MS posee una etiología multifactorial,(Ziemssen, 2005) frecuentemente multifacética(Frohman et al, 2008) y multifocal (Pittock & Lucchinetti, 2007). MS posee manifestaciones heterogéneas y es una efermedad debilitante mediante déficits sensoriales, motores, autonómicos y de cognición neurológica. La esclerosis múltiple se manifiesta con pérdida de visión, desórdenes de movimiento de músculos extra oculares, parestesia, perdida de sensación, debilidad, disartria, espasticidad, ataxia y problemas con el control de la vejiga (Noseworthy et al, 2000). Las disfunciones oculares se pueden identificar temprano en el proceso de la enfermedad y se manifiestan como movimientos oculares dolorosos (Soderstrom et al, 1998). Actualmente existen dos escuelas o “corrientes” de pensamiento en cuanto a los mecanismos relacionados a la demielinación en la esclerosis

múltiple. La hipótesis autoinmune o ‘‘outside-in’’ propone que los linfocitos T auto reactivos son activados en la periferia iniciando un proceso inmunológico, que implica a agentes ajenos que comparten epitopes con componentes de la mielina (Libbey et al, 2007).Las alteraciones en modificaciones post trasduccionales de las proteínas pueden indicar algunos de los cambios críticos en el proceso inicial de la patología de MS, causando activación inmunológica, lo cual puede desempeñar un papel muy importante en el proceso de la enfermedad (Arnon & Aharoni, 2007; Ziemssen, 2005). La teoría neurodegenerativa o ‘‘inside-out’’ propone que la infección primaria o disfunción neuronal que existe en el sistema nervioso central (CNS) eventualmente recluta a células inflamatorias del sistema sanguíneo periférico, algo que amplifica el daño a los tejidos y que puede inducir a la liberación de antígenos en el CNS (Trapp & Nave, 2008).

La deiminación ha sido identificada como una de las PTMs más importantes en cuanto a la patología de MS. Cuando se comparan los cerebros de pacientes con MS con los cerebros de personas normales (sin patología de MS), en los cerebros de MS existen regiones con híper deiminación y niveles elevados de PAD2. Mas allá de eso, la MBP derivada de cerebros de pacientes con MS contiene un nivel de deiminación más elevado que la de los sujetos normales (Moscarello et al, 1994) y demuestra susceptibilidad a autocatalisis (D'Souza et al, 2005) y a proteolisis mediada por la catepsina D (Pritzker et al, 2000). Los productos proteolíticos de la MBP tienen la capacidad de sensibilizar a los linfocitos T provocando una reacción inmunológica (Belogurov et al, 2008;

D'Souza et al, 2005). Estos productos proteolíticos pueden también activar a los astrocitos para que estos adquieran un rol activo, posiblemente un rol doble: aumentando la respuesta inmunológica y desarrollando un rol protector que limita la inflamación en el CNS.

## IV. Deiminación en el nervio óptico de pacientes con glaucoma.

Las consecuencias de la deiminación en el nervio óptico son muchas y variadas. La capa de mielina contiene muchas proteínas que son susceptibles a la deiminación, como la MBP. Esto es a consecuencia de contener residuos ricos en arginina que pueden servir como sustratos para las enzimas PADS. De todas las proteínas en la vaina de mielina, la MBP es la más abundante y ha sido identificada como la proteína con mas nivel de deiminación en el nervio óptico de pacientes con glaucoma. La MBP deiminada demuestra alteración de sus propiedades, incluyendo una más baja carga positiva, que altera la estructura terciaria y la habilidad de la MBP de interactuar con los lípidos que la rodean y por ende mantener la estructura compacta de la vaina de mielina (Boggs et al, 1997). La MBP alterada por la deiminación también demuestra un aumento en la susceptibilidad a proteólisis por catepsina D, lo cual puede generar péptidos auto dominantes que causan la sensibilización de los linfocitos T hacia una respuesta autoinmune en las patologías desmielinizantes (Pritzker et al, 2000). La deiminación también parece que puede tiene un papel en la inhibición de la proliferación de células, causando así un paro en el ciclo celular y apoptosis (Gong et al, 1999). Dichos mecanismos pueden ser parte de los múltiples mecanismos causantes de la neuropatía glaucomatosa. La presencia de

múltiples proteínas deiminadas en el nervio óptico de pacientes con POAG, incluyendo la MBP, PLP y MAG entre otras podría indicar que estas proteínas deiminadas podrían ser importantes en interrumpir el proceso normal de mielinización (Algeciras & Bhattacharya, 2007). La deiminación de proteínas de la matriz del nervio óptico también puede causar debilitamiento en su punto de anclaje y un debilitamiento general de las proteínas de la cabeza del nervio óptico (ONH). En POAG, los astrocitos en la cabeza del nervio óptico están muchas veces expuestos a elevación excesiva en la presión intraocular (IOP).

## V. Consecuencias biológicas de la deiminación y sus sustratos.

En las enfermedades de la epidermis y en la artritis reumatoide, las proteínas deiminadas generan auto-anticuerpos, a menudo suscitando una respuesta autoinmune (Ishida-Yamamoto et al, 2000; van Venrooij & Pruijn, 2000).PAD3 ha sido relacionado con enfermedades de la piel, incluyendo psoriasis(Ishida-Yamamoto et al, 2000). Los histonas pueden también actuar como sustratos de la deiminación y poseen el potencial de estar involucradas en un rango amplio de enfermedades (Denman, 2005). PAD4 está implicado en la revocación/anulación de la metilación de proteínas, algo crucial en la señalización celular a largo plazo (Cuthbert et al, 2004; Denman, 2005).En el sistema nervioso, PAD2 es la enzima principal y la que está involucrada en la desregulación observada en los diferentes estados patológicos (Mastronardi et al, 2007). Mientras PAD4 es una enzima nuclear, y como tal está prevista a alterar eventos de transcripción, la modificación de los histonas es sugestiva de procesos de modulación traduccional (Kearney et al, 2005; Thompson & Fast,

2006).Otras proteínas que han sido demostradas como sustratos de PADS son el fibrinógeno, vimentina y GFAP, proteínas que tienen funciones en procesos de adhesión, migración y comunicación celular.

## VI. Los astrocitos y la deiminación elevada.

Los astrocitos son las células más abundantes en el sistema nervioso central, superando al número de neuronas en una proporción de 10:1. En el siglo diecinueve, los astrocitos fueron primeramente descritos como “el pegamento” del CNS con un rol pasivo, apoyando las funciones de las neuronas. Sin embargo, desde hace más de una década, diversos estudios han ofrecido evidencias de la función de los astrocitos, la cual definitivamente es mucho más extensa e importante que solo proveer sostén trófico, metabólico y estructural a las neuronas. Ha sido demostrado en muchos estudios que los astrocitos desempeñan un papel activo en la comunicación glial-neuronal, señalización sináptica, regulación de flujo sanguíneo, etc. (Allen & Barres, 2009; Meyer-Franke et al, 1999; Ullian et al, 2004; Ullian et al, 2001).

Los astrocitos son una población heterogénea, cuya morfología y heterogeneidad está basada en su ubicación dentro del cerebro. Basado en esos dos factores, existen diferentes tipos de astrocitos. Los astrocitos fibrosos residen en la sustancia blanca y tienen una apariencia estrellada. Los astrocitos de la sustancia gris se llaman protoplásmicos y poseen procesos mucho más irregulares que los astrocitos fibrosos. Las glías conocidas como “Bergmann glia” son más pequeñas y poseen procesos bien elaborados. Estas están

localizadas en el cerebelo, desde el nivel de la capa de las células Purkinje hasta la superficie pial. Las “Muller glia” están localizadas en la retina y ocupan alrededor de un 20% del volumen total de esta, donde hacen contacto con las células ganglionares de la retina. El nivel elevado en la deiminación está asociado con el sistema nervioso central en enfermedades como la esclerosis múltiple, glaucoma y Alzheimer (Bhattacharya et al, 2006b; Bradford et al, 2014; Nicholas, 2013; Wood et al, 1996).Nosotros hemos observado ambos fenómenos, híper y hipo deiminación simultáneamente relacionados con la desmielinización, pero hemos logrado discernir que los astrocitos son el tipo de célula responsable por el nivel elevado (Enriquez-Algeciras et al, 2013). Los astrocitos responden a señales ambientales físico químicas, estímulos como cambios de temperatura, presión ambiental, hipoxia, cambios en la concentración de iones de hidrogeno y otros estímulos bioquímicos como exposición a citocinas y otras señales biológicas. La respuesta de los astrocitos es normalmente diseñada a la protección contra daños contra el sistema neuronal o a promover la reparación del sistema después de una lesión (Ridet et al, 1997).No obstante, los astrocitos si son sobre activados también pueden liberar niveles excesivos de glutamato, algo que puede causar acumulación de niveles tóxicos de calcio en el citoplasma, como es requerido por PAD2. Como consecuencia, la activación de PAD2 es más accesible y por ende las proteínas son deiminadas, lo cual es un posible mecanismo en la patología de enfermedades neurodegenerativas.

Un mejor entendimiento de los resultados que estos estímulos pueden ocasionar en el organismo proveerá una visión más profunda de los efectos de dichos estímulos en las funciones normales y en la expresión aberrante como la que es observada en los estados patológicos.

## VII. Marcadores de activación de astrocitos

Para lograr caracterizar mas adecuadamente a los astrocitos basado en cambios de expresión en el perfil de sus proteínas durante el cambio de inactividad o quiescencia a activación, necesitamos utilizar una combinación extensa de marcadores. Muchos de los marcadores tradicionales para astrocitos se expresan en las células gliales y en las no gliales, haciendo necesario el uso de marcadores complementarios variados para así obtener una identificación más fiable en cuanto a la reactividad de los astrocitos.

**GFAP**: El marcador más utilizado y mejor caracterizado como indicador de reactividad de astrocitos es el aumento en expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Esta proteina es un filamento intermediario estructural tipo III que es un componente del citoesqueleto astrocitico (Fitch & Silver, 1997; Hausmann, 2003; Hol & Pekny, 2015; Yang & Wang, 2015). Aparte de desarrollar un papel estructural, esta también involucrada en adhesión celular, re-organización del cito esqueleto y en la mielinización. Mutaciones en el gen de GFAP son la causa de la enfermedad de Alexander (Alexander’s disease), una condición rara del sistema nervioso en la que la mielina es destruida (Liem & Messing, 2009).

**ALDH1L1**: Aldehido deshidrogenasa 1 L1 (Aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1 ALDH1L1), es una enzima que cataliza la conversión de 10-formiltetrahidrofolato, NADP+ y agua a tetrahidrofolato, NADPH y dióxido de carbono. La función de ALDH1L1 es importante para la formación del tubo neural y también posee funciones anti tumorales. ALDH1L1 tiene un papel en la biosíntesis de los nucleótidos, impactando la división y el crecimiento celular (Krupenko, 2009). ALDH1L1 ha sido seleccionada como un antígeno especifico para los astrocitos en un estudio proteómico, ya que tiene un patrón de expresión muy similar a GFAP(Cahoy et al, 2008; Yang et al, 2011).

**S100β**: Es una proteína ligadora de iones de calcio la cual es segregada por los astrocitos. Esta proteína está asociada a la regulación, evolución y diferenciación del ciclo celular. Aunque es preferencialmente expresada por los astrocitos adyacentes a los capilares cerebrales, también se puede detectar en las células precursoras de oligodendrocitos. Los astrocitos segregan S100β al ser estimulados por el estrés metabólico. Altos niveles de S100β en el líquido cefalorraquídeo (CSF) y el sistema de sangre periférico han sido reportados en investigaciones clínicas en Alzheimer, depresión, accidente cerebro vascular isquémico, lesión cerebral traumática y esquizofrenia (Ambree et al, 2015; Griffin et al, 1989; Peskind et al, 2001).

**Trombospondina (TSP 1)**: El laboratorio del Dr. Barres (Christopherson et al, 2005; Liauw et al, 2008) identificó a TSP 1, una proteína segregada por los astrocitos que promueve la formación de sinapsis neuronales. Los TSPs pertenecen a una familia de proteínas de la matriz celular que se expresan

temprano en el proceso post natal de los astrocitos y en la que el nivel disminuye a medida que estos maduran.

**Acuaporina-4 (AQP4)**: Es una proteína de las membranas celulares importantes para el transporte de agua. Esta proteína está localizada en los terminales de los astrocitos en todo el sistema nervioso central. AQP4 participa en el intercambio de fluidos entre los compartimentos del líquido cefalorraquídeo y el cerebro. Un aumento en la expresión de AQP4 ha sido reportado en condiciones patológicas caracterizadas por activación de astrocitos y alteraciones en la barrera hematoencefálica, incluyendo la neuromielitis óptica o enfermedad de Devic (Papadopoulos & Verkman, 2012), demencia relacionada con el VIH (St Hillaire et al, 2005), hipertensión intracraneal (Eide et al, 2016) y Alzheimer (Yang et al, 2016).

**Conexina 43 (CX43)**: Esta proteína es uno de los componentes de las conexiones inter celulares de los astrocitos (gap junctions) en el cerebro adulto. Estas conexinas gliales median la comunicación intercelular entre los astrocitos y las neuronas (Boulay et al, 2015; Kunze et al, 2009; Nakase et al, 2004; Theis et al, 2004). Un aumento en el nivel de CX43 ha sido reportado en enfermedades neurológicas como Parkinson, Huntington y Alzheimer (Almad et al, 2016; Kawasaki et al, 2009; Mei et al, 2010; Vis et al, 1998).

**J1-31**:  En 1987, Malhotra y sus colegas generaron un anticuerpo monoclonal, (mAb J1-31), contra placas provenientes de pacientes con esclerosis múltiple, el antígeno que fue detectado mas en astrocitos activados que en astrocitos no

activados (Malhotra et al, 1989). El uso de este marcador es un poco controversial ya que aunque cuando fue primeramente caracterizado fue mostrado como diferente a GFAP (Predy et al, 1988), otros investigadores después demostraron que comparte epitopes en común con GFAP (Garcia et al, 2003).

## VIII. Astrocitos reactivos/activados

Durante el proceso de neurodegeneración, los astrocitos reactivos pueden desempeñar un papel beneficioso o dañino. Por ejemplo, cuando estos forman la cicatriz glial para demarcar las lesiones, encapsulan el área de la lesión con el propósito de protegerla y contenerla dentro de la cicatriz glial. Sin embargo, también pueden ocasionar efectos dañinos interfiriendo en el proceso de regeneración de los axones y en la mielinización.

Los astrocitos proveen factores metabólicos a las neuronas y ayudan a eliminar los productos de excreción neuronal (Neufeld & Liu, 2003). En POAG, los astrocitos en el ONH están constantemente expuestos a elevación de presión a causa de elevación en el nivel de IOP. Igualmente, en lesiones cerebrales traumáticas, los astrocitos están sometidos a niveles anormales de presión elevada también (Vandevord et al, 2008).Cambios en los gradientes de presión han sido propuestos como involucrados en lesiones neuronales (Gurdjian et al, 1964). Después de una lesión al CNS, los astrocitos no reactivos se transforman a astrocitos reactivos (Hernandez, 2000) y segregan factores de crecimiento y moléculas de adhesión, como por ejemplo factor de crecimiento derivado de plaquetas, proteoglicanos, GFAP y vimentina (Calvo et al, 1990; Calvo et al,

1991). Los astrocitos reactivos han sido implicados en muchas enfermedades neurodegenerativas (Duncan & Heales, 2005; Ferrer & Blanco, 2000) y en neuropatías del nervio óptico en glaucoma (Hernandez, 2000). Los astrocitos migran para la localidad donde está localizado el daño en el nervio óptico de glaucoma y producen factores neurotóxicos como óxido nítrico (NO) y factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF$\alpha$) (Nakazawa et al, 2006; Neufeld et al, 1999).

La meta óptima seria alcanzar un nivel de reactividad que sea capaz de inclinar la balanza hacia un rol beneficioso para re-establecer el balance/homeostasis perdido durante la degeneración o tal vez mejor lograr impedir el daño neuronal completamente.

## IX. Modelo de ratón transgénico para esclerosis múltiple (ND4).

Los modelos de estudio para MS facilitan la modificación de factores ambientales y asisten a elucidar el papel que estos factores pueden desempeñar en la evolución de la enfermedad. Los mecanismos básicos subyacentes al desarrollo de los oligodendrocitos y a la mielinización están bien conservados entre las especies. Como resultado de la disponibilidad, la duración de vida y fecundidad de los ratones, así como el parecido al modelo llamado encefalitis autoinmune experimental (EAE) de esclerosis múltiple en los humanos, los ratones sirven como un modelo valioso para los estudios de MS. Ya que esta enfermedad es muy heterogénea, el uso de diferentes modelos animales de enfermedad es óptimo para obtener información más relevante y dirigida a entender mejor la etiología de la enfermedad. Este modelo transgénico (ND4) ha

sido previamente utilizado para evaluar los niveles de deiminación de la retina (Mastronardi et al, 1993). Los ND4 se generaron mediante micro inyección de la variante DM-20 del transgen de PLP al ovulo fecundado y que fue después transferido a ratonas pseudofecundadas.

Después de este proceso se establecieron 4 líneas transgénicas estables—ND2, ND3A, ND4, ND5, portando de 2 a 70 copias del transgen. De esas cuatro líneas transgénicas estables, la ND4 fue portadora de aproximadamente 70 copias del transgen integrado al genoma, y poseía manifestaciones de la enfermedad menos severas. También la producción de mielina inicial era normal comparada con otros modelos de esclerosis múltiple en los cuales la enfermedad es inducida por inyección directa del immunógeno. El transgen para DM20, un proteolípido, es importante en el inicio de la formación de la mielina(Ikenaka et al, 1992).La variante DM-20 de  PLP es un producto del “splicing” alternativo de PLP en el que se eliminan 35 aminoácidos positivos. Es un proteolípido importante en los ratones jóvenes, causando trastornos y desorganización solamente en la mielina de los ratones más adultos. Es por esa razón que la persistencia de la mielina inmadura hasta la adultez en estos ratones produce desmielinización en este modelo transgénico (Enriquez-Algeciras et al, 2011). En modelos animales, cambios en la espasticidad y anomalías de movimiento (gait abnormalities) son normalmente utilizados como síntomas clínicos de enfermedades con componentes de destrucción de mielina(Gallo & Armstrong, 2008) (Rubio et al, 2008).  El modelo ND4 aparenta ser normal hasta los 3 meses de edad, pero desarrolla tambaleos de movimiento con temblores y

convulsiones alrededor de los 8-10 meses de edad. Es por eso que el modelo ND4 sirve como una herramienta relevante en el estudio de enfermedades relacionadas con la desmielinización.

**Objetivos**:

Nuestros objetivos específicos son:

(1) Establecer métodos para elevar la deiminación en los astrocitos (parámetros físico químicos). Para lograr este objetivo, en el capítulo 1, utilizaremos parámetros como elevación de presión ambiental, cambios de temperatura, exposición a estrés oxidativo y estiramiento mecánico para intentar elevar el nivel de deiminación en los cultivos primarios de astrocitos.

(2) Evaluar si los productos auto catalíticos de la MBP, los cuales han sido reportados como elevados en enfermedades neurodegenerativas poseen la capacidad de activar bioquímicamente a los astrocitos. Para evaluar este objetivo, en el capítulo 2, trataremos a los astrocitos con péptidos sintéticos derivados de un fragmento de la MBP que ha sido reportado como deiminado en los cerebros de pacientes con MS. Vamos a evaluar a los astrocitos morfológicamente basados en cambios al cito esqueleto (actina), modificación de peroxidación de lípidos, todos factores que nos pueden indicar el nivel de activación en los astrocitos. Además, utilizaremos marcadores convencionales de activación de astrocitos como GFAP en combinación con múltiples marcadores seleccionados luego de una extensa búsqueda en la literatura científica.

(3) Determinar si los astrocitos ya activados pueden expresar moléculas utilizadas por células presentadoras de antígenos que existen en el sistema inmune y por lo tanto eventualmente tener el potencial de presentar antígenos/péptidos a los linfocitos T. En el capítulo 3, vamos a cultivar los astrocitos con y sin péptidos deiminados para evaluar la expresión de moléculas co-estimulatorias y moléculas MHC.

Utilizaremos ratones de la misma cepa ya la esclerosis multiple es una enfermedad autoinmune y queremos investigar el efecto que el péptido modificado pudiese ejercer para que el sistema immunologico lo reconozca como un producto foráneo con capacidad de provocar una respuesta immune. Esta patología requiere que los linfocitos T reconozcan a un auto-péptido (self-peptide) en el contexto de MHC I o II (CD8 y CD4 respectivamente) con una fuerte afinidad por el complejo de MHC-péptido además de co-estimulación.

## Capitulo 1: Métodos para elevar el nivel de deiminación en los astrocitos (parámetros físico químicos).

### 1.1 Resumen

Los parámetros físico químicos como la presión, hipoxia, cambios en el pH y cambios de temperatura han demostrado tener un efecto específico en ciertas enfermedades neurológicas. Nuestro interés en la deiminación como un posible activador de astrocitos comenzó después del descubrimiento de PAD2 mediante análisis proteómico de nervios ópticos de pacientes con glaucoma, algo ausente o a un nivel muy bajo en los tejidos provenientes del nervio óptico normal . Las células de mamíferos poseen cinco tipos de deiminasas, PAD1–4 y 6 (Vossenaar et al, 2003). PAD1, 3 catalizan la deiminación en la piel; PAD2 es la principal PAD en el ojo y el cerebro y PAD4 es nuclear y omnipresente (Asaga & Ishigami, 2001). El nivel de deiminación que el tejido del sistema nervioso experimenta es elevado durante la evolución de enfermedades como el glaucoma y la esclerosis múltiple (Bates et al, 2002; Kim et al, 2003). Nosotros intentaremos demostrar que la expresión de PAD2 es elevada en los astrocitos como respuesta a estímulos físico químicos e insultos ambientales. Morfológicamente, los astrocitos reactivos desarrollan hipertrofia en sus cuerpos celulares y en el núcleo, alargamiento de los procesos citoplasmáticos, hiperplasia y un aumento en el nivel de GFAP (Malhotra et al, 1990). GFAP es una proteína filamentosa expresada por los astrocitos y una elevación en su expresión es considerada como el principal marcador de reactividad para los astrocitos. En el sistema nervioso normal, los astrocitos expresan una gran variedad de factores de crecimiento y de receptores, muchos de los cuales

sirven como factores tróficos y de supervivencia para las neuronas (Hernandez et al, 2008). El factor neurotrópico ciliar (CNTF) ha sido capaz de activar a los astrocitos *in vivo e in vitro*, causando que estos segreguen factor de crecimiento fibroblástico 2 (Wang et al, 2002). Los astrocitos reactivos demuestran elevación de expresión de diferentes moléculas de superficie que son responsables de funciones relacionadas con reconocimiento intercelular, adhesión celular con sustratos, varios tipos de factores de crecimiento, citocinas y receptores celulares (Ricard et al, 2000). Los astrocitos reactivos además expresan proteínas de la matriz extracelular como laminina, tenascina y proteoglicanos (Pena et al, 1999).

En las enfermedades es muy probable que las células *in vivo* experimenten un efecto combinatorio complejo de muchos parámetros. Futuros modelos que combinen esos aspectos podrán proveer un mejor entendimiento y una visión más profunda de lo que ocurre en dichas enfermedades. Adicionalmente, *in vivo*, las células están rodeadas por poblaciones de otras células vecinas y por una matriz, algo que debería ejercer un efecto en el ambiente celular de una manera que posiblemente no pueda ser captada *in vitro* con insultos como el estiramiento mecánico y la presión ambiental entre otros. En el futuro próximo, modelos más sofisticados asistirán a analizar las diferencias causadas por cada uno de los factores involucrados en la enfermedad.

### 1.1.1 Presión:

La presión intraocular es crítica para el desarrollo de enfermedades neurológicas irreversibles como el glaucoma (Ahmed et al, 2001), mientras que la presión y la hipoxia están asociadas con diferentes tipos de derrames cerebrales (Sambandam et al, 2004; Zhang et al, 2014).

El glaucoma pertenece a un grupo de enfermedades neurodegenerativas progresivas. Estas tienen un inicio tardío que resulta en ceguera irreversible a consecuencia de pérdida de neuronas ganglionares de la retina (RGCs). La elevación en la presión intraocular en glaucoma actua como un estrés crónico para los RGCs La presión intraocular afecta a diferentes tipos de células en la cabeza del nervio óptico. El reto más grande en estos momentos es que no existe una cura, solo existen estrategias de intervención para demorar la evolución de la enfermedad y por ende la ceguera. En la mayor parte de los casos de glaucoma, el impedimento o demora en la salida del líquido acuoso (AH) de la cámara anterior del ojo es el causante del desbalance entre la producción y eliminación del mismo. Esto resulta en elevación de la presión intraocular. El glaucoma puede ser visto como un tipo de degeneración inducida por la presión, en la cual el daño al nervio óptico ocurre con el transcurso del tiempo y como consecuencia de la elevación en la IOP. Sin embargo, existen casos de enfermedad en individuos con presión intraocular normal y cada vez está más clara la idea de que el glaucoma es una enfermedad compleja y multifactorial y que el IOP es solamente uno de los muchos factores

contribuyentes a la patología. Muchos individuos con IOP elevado no llegan a desarrollar glaucoma y por otro lado, muchos individuos que tienen un rango de IOP normal (10-21 mm Hg) si llegan a desarrollar la enfermedad (Cafaro et al, 2010; Hollows & Graham, 1966).

Estudios previos revelan cambios en la morfología de los astrocitos en la cabeza del nervio óptico como también modulación de varias moléculas, como por ejemplo óxido nítrico, óxido nítrico sintetasa, elastina y moléculas de adhesión celular neural (NCAM) (Liu & Neufeld, 2001; Ricard et al, 2000) como respuesta a un incremento en la presión hidrostática. Otros estudios han evaluado los efectos de la presión en astrocitos en el contexto de daños/lesiones cerebrales (Vandevord et al, 2008).

Si logramos elucidar otros factores adicionales al IOP que puedan contribuir a aumentar la susceptibilidad a adquirir glaucoma neurodegenerativo, podremos expandir nuestro conocimiento de la enfermedad y por ende identificar nuevos mecanismos y medicamentos para el uso terapéutico.

### 1.1.2 Temperatura:

La exposición a temperaturas que se desvían de la temperatura óptima para las células (37°C) puede resultar en trauma en el sistema neuronal. Por ejemplo, una proporción significativa de individuos que sufren de MS experimentan un empeoramiento de sus síntomas neurológicos como consecuencia a exposición a temperaturas elevadas. La elevación en la temperatura inducida por el ejercicio físico ha sido reportada como un riesgo para los pacientes con MS

(Guthrie & Nelson, 1995). Por otra parte, el someter a los pacientes a una elevación temporal rápida de hasta 40°C (hipertermia) ha ocasionado beneficios temporales aunque también complicaciones neurológicas en otros estudios. Es por esa razón que esta práctica no se utiliza mas (Berger & Sheremata, 1982). En cambio, la hipotermia terapéutica (reducción controlada de la temperatura a menos de 36°C) (Polderman & Herold, 2009) es utilizada con efectos beneficiosos después de una lesión cerebral traumática. El sistema nervioso central está poblado por muchas células que efectuan diferentes y complicadas funciones. Estas células responden a insultos físicos, químicos y bioquímicos de una manera diferente. Los astrocitos, siendo las células más abundantes en el CNS reaccionan activándose como respuesta a diferentes patologías como el derrame cerebral, trauma y enfermedades neurodegenerativas (Pekny & Nilsson, 2005). Los astrocitos son una fuente importante de citocinas inflamatorias como interleukina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral α (TNF-α) después de una lesión cerebral (Gruol & Nelson, 1997; Martin et al, 2001). Sin embargo, el efecto que la temperatura pueda ejercer en la deiminación de los astrocitos no ha sido anteriormente estudiado. El entendimiento extenso de las respuestas de las diferentes células en cuanto a cada parámetro nos ayudará a descifrar la contribución precisa de cada célula y la respuesta integral a nivel de órgano y eventualmente del organismo. Analizar las respuestas de tipos de células individuales dentro de los tejidos o en una mezcla de diferentes tipos de células es difícil. Un cultivo primario de células permite realizar un estudio amplio del efecto de cada parámetro.  Los astrocitos se activan como respuesta a

fluctuaciones ambientales en la temperatura. Sin embargo, si las vías bioquímicas o si la expresión de proteínas y la deiminación son uniformemente activadas es algo que no ha sido investigado. Acá presentamos nuestros experimentos que evaluan cambios en marcadores establecidos de activación de astrocitos, PAD2 y deiminación de astrocitos sometidos a tratamentos con temperatura diferentes de la temperatura ideal para las células.

### 1.1.3 Estrés oxidativo:

El estrés oxidativo ha sido implicado como un factor importante en las enfermedades neurodegenerativas (Barnstable & Tombran-Tink, 2006; Calabrese et al, 2006). El ojo y el cerebro son órganos que consumen gran cantidad de oxígeno, cantidad que a veces excede su capacidad en producir defensas antioxidativas y así resulta en generación de radicales libres y ocasionando una elevación en los niveles de estrés oxidativo. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) que son producidas por la cadena respiratoria en la mitocondria son responsables del estrés oxidativo en los ojos y el cerebro (Emerit et al, 2004; Sacca et al, 2007).Los niveles elevados en los ojos y el cerebro también los hacen susceptibles a peroxidación de lípidos ya que hay una gran presencia de lípidos que incorporan ácidos araquidónicos y docohexahenoicos (Bazan, 2005; Moriguchi et al, 2004; Uauy et al, 2001). El ácido araquidónico ha sido detectado en el nervio óptico bovino (Bartley et al, 1962; Das et al, 1978). Los astrocitos expresan y segregan factores neurotróficos como NGF, TGFβ, y citocinas como TNF-α que estimulan la supervivencia de las neuronas y las protegen de insultos oxidativos (Mattson et

al, 1995). Los astrocitos, no las neuronas poseen la capacidad de sintetizar los ácidos araquidónicos y docosahexaenoicos (Govindarajan et al, 2009). Las isolevuglandinas son producidas por la oxidación de radicales libres del ácido araquidónico por vía de señalización de isoprostano (Salomon, 2005). Las isolevuglandinas han sido involucradas en desórdenes neurológicos como el Alzheimer (Boutaud et al, 2002), esclerosis múltiple (Greco et al, 2000), esclerosis lateral amiotrófica (Montine et al, 1999), y glaucoma (Govindarajan et al, 2008a; Govindarajan et al, 2008b). Los astrocitos, como proveedores de factores metabólicos a las neuronas también ayudan a desechar los productos excretorios de las mismas (Neufeld & Liu, 2003). El efecto que el estrés oxidativo en los astrocitos puede ocasionar, podría a la vez afectar su rol de apoyo a las neuronas contribuyendo a la degeneración de las mismas.

### 1.1.4 Estiramiento mecánico:

El modelo de cámara de presión para los astrocitos ha sido utilizado en estudios previos (Ju et al, 2007; Ricard et al, 2000; Yang et al, 1993). Sin embargo, este modelo refleja un efecto mixto de hipoxia y cambios de concentración en iones de oxígeno, en adición a cambios pequeños incrementales en la presión (Bhattacharya et al, 2006a).

Distintos cambios ocurren en la ECM y en la ONH en los ojos con glaucoma. La ECM del ONH sufre una remodelación en el glaucoma, donde las proteínas del ECM cambian y se hacen mas rígidas y resistentes a deformaciones causadas por el exceso de presión (Clark, 2012). Algunos estudios proponen que la

regulación del fluido dentro y fuera de la lamina cribosa puede contribuir a su protección contra las fluctuaciones normales que ocurren en el sistema (Li et al, 2015). Los astrocitos de la lámina cribosa se degeneran por el daño isquémico producido por el estiramiento de vías de suministro de sangre en el nervio óptico. Por consiguiente las células inmovilizadas en una superficie, una situación como la que ocurre en el nervio óptico pueden servir como modelo de estiramiento mecánico como respuesta a cambios incrementales en presión. Nosotros utilizamos un método de inmovilización de astrocitos para descifrar si el estiramiento mecánico puede o no inducir la expresión de PAD2 y como resultado la deiminación.

## 1.2 Resultados y conclusiones:

### 1.2.1 Detección de deiminación a consecuencia de elevación de presión

Nuestra primera meta para determinar si la deiminación en los astrocitos puede ser elevada a consecuencia de exposición a parámetros físicos y químicos fue el someter el cultivo de astrocitos a elevación de presión en cámara presurizada. Utilizamos un método rutinario en nuestro laboratorio (Bhattacharya et al, 2006b). Como en el ojo humano la presión normal intraocular varía entre 10-20 mm de mercurio, nosotros decidimos utilizar 40 mm de mercurio para nuestro experimento para asi asegurarnos de que la presión iba a estar suficientemente elevada.

Brevemente, colocamos los cultivos en la cámara presurizada a una temperatura de 37ºC y procedimos a elevar gradualmente la presión por cinco horas consecutivas. El razonamiento por el cual seleccionamos 5 horas está basado en un análisis extenso de la literatura científica en el que se reporta que después de 5 horas la concentración de oxigeno comienza a disminuir y entonces la hipoxia se puede introducir como otra variable experimental mas fuerte. Después de 5 horas de incubación a alta presión, permitimos que las células se estabilizaran a presión atmosférica por 16 horas más. Como controles utilizamos cultivos de astrocitos pertenecientes a un pasaje idéntico, los que fueron mantenidos bajo presión atmosférica normal a 37 ºC.

Nuestros resultados indican que las células que no fueron sometidas a alta presión, no muestran reactividad al anticuerpo de PAD2, algo contrario a las células que fueron expuestas a presión de 40 mm de mercurio. Este nivel de reactividad fue mantenido hasta 4 días después del fin del tratamiento, como puede ser observado por el Western blot **(Figura 2A)** y análisis de inmunofluorescencia **(Figura 2B)**.Un nivel elevado de deiminación también se observó en los astrocitos sometidos a tratamiento de presión elevada **(Figura 2C)**.

Los resultados sugieren que la presión elevada puede inducir la expresión de PAD2 en los astrocitos. Sin embargo, factores competitivos en este modelo de presión pueden contribuir a los resultados observados. Por ejemplo, otros ya han demostrado que la hipoxia es capaz de inducir expresión de PAD2, deiminación y elevación en la concentración intracelular de calcio (Osborne et al, 1999;

Sambandam et al, 2004). Consiguientemente, fluctuaciones en la composición gaseosa durante las 5 horas de tratamiento pueden haber alterado la concentración de oxígeno y de dióxido de carbono, resultando en hipoxia y/o cambios en el pH del medio de cultivo impactando la expresión de PAD2. Entonces, evaluaremos además otros métodos para elevar la deiminación en los astrocitos.

Normalmente cuando se mide el nivel de activación se hace con medidas morfológicas que incluyen observar los procesos hipertróficos y la elevación en el nivel de GFAP. Nosotros hemos decidido incluir todos esos métodos convencionales pero también utilizar faloidina para visualizar la actina y la expansión del citoesqueleto. Además utilizaremos isolevuglandinas como un marcado para medir cambios en oxidación de lípidos. Las isolevuglandinas son ketoaldehidos producidas por los radicales libres del ácido araquidónico de los astrocitos. Nuestro razonamiento fue basado en que la elevación de presión produce mas estrés oxidativo, por lo tanto esto debería elevar la oxidación de lípidos y de sus productos, que es lo que nuestro anticuerpo contra ISO[4]LGE$_2$ reconoce (Govindarajan et al, 2008a)

El análisis de los astrocitos tratados con presión elevada demostraron un aumento en expresión de ISO[4]LGE$_2$ **(Figura 3A,A')** aunque la morfología de las células por tinción con faloidina/actina no demostró mucha variación **(Figura 3B,B').**

Los resultados de la inmunohistoquímica donde se demuestra elevación en el aducto de proteína reconocida por el ISO[4]LGE$_2$ son consistentes con la observación de agrandamiento de astrocitos a consecuencia de elevación de presión. Una célula agrandada va a demostrar una expansión de su membrana celular, exponiendo a los lípidos de la membrana a más estrés oxidativo, algo que corresponde con más fluorescencia del aducto ISO[4]LGE$_2$ en la superficie celular.

### 1.2.2 El nivel en la deiminación y la expresión de PAD 2 están elevados en los astrocitos después del tratamiento de elevación de temperatura.

Un análisis inmunohistoquimico utilizando marcadores de activación de astrocitos **(Tabla 1)** fue realizado escogiendo marcadores después de una búsqueda extensa de la literatura científica como fue indicado en el capitulo introductorio de esta tesis. Los astrocitos fueron sometidos a evaluación de celularidad nuclear, morfología, tinción de filamentos de actina y GFAP independientemente para cada grupo de células analizadas. GFAP sirve como un marcador de activación de astrocitos, de todas maneras, como cada grupo de células pueden tener un nivel diferente de activación y porque siempre hay una variación inherente en la exposición de los epitopes y el nivel de antígeno-anticuerpo, cada grupo de astrocitos fue sometido a tinción para GFAP y DAPI independientemente.

El análisis inmunohistoquimico revelo una mayor intensidad de fluorescencia de GFAP en los cultivos sometidos a 41°C que en los sometidos a 37°C, y 31°C

mostro el menor nivel de intensidad de GFAP de todos los grupos de cultivos **(Figura 4-5)**. La intensidad de la faloidina/actina y del producto de la peroxidación de lípido medido por ISO[4]$LGE_2$ mostro una tendencia paralela, sugiriendo que las medidas de activación por GFAP corresponden con las medidas de la actina/expansión del citoesqueleto y acumulación de productos de peroxidación como la isolevuglandina **(Figura 5G, G',G")**. La línea de razonamiento para estos experimentos fue basada en tratar de establecer proteínas específicas que sufran una alteración significativa en su expresión como resultado de cambios de temperatura con una determinación simultanea de su localización en el tejido celular.

Inmunohistoquimicamente, los marcadores de activación TSP, AQP4, y S100β **(Figura 4D, D', D'', 5E, E', E'', 5, F, F', F")** demostraron un patrón opuesto al de GFAP y ALDH1L **(Figura 4C, C', C")**. De hecho, TSP, AQP4, y S100β mostraron un nivel elevado en la intensidad de su fluorescencia a 31ºC con una disminución progresiva a 37°C y 41°C; lo opuesto fue demostrado para GFAP y ALDH1L **(Figura 4-5)**. La intensidad de la fluorescencia fue cuantificada por tres observadores independientes los cuales utilizaron un valor arbitrario de 10 para registrar fluoresencia máxima **(Figura Suplementaria 1A)**. Para obtener una idea de cómo la función de los astrocitos pudiese ser afectada a diferentes temperaturas, nosotros realizamos una evaluación del nivel de comunicación intercelular (gap junction) mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo contra la proteína conexina 43 (Cx43). Aunque la conexina 43 no es una medida directa de astrogliosis o de reactividad de astrocitos, puede ser utilizada como

medida de función intercelular, muy importante para la comunicación entre astrocitos y entre astrocitos y neuronas (Theodoric et al, 2012). Nosotros demostramos que la función de comunicación intercelular de los astrocitos fue afectada o reducida con la incubación a altas temperaturas **(Figura 6A)**.

Los procesos de los astrocitos contactan muchas sinapsis por célula, y para medir si la incubación a diferentes temperaturas afectó la interacción de los procesos astrocíticos con sus células vecinas también hemos medido el cambio en la longitud de dichos procesos. Los resultados demuestran que solamente después del tratamiento hipotérmico la longitud de los procesos astrocíticos fue significantemente reducida al compararla con las condiciones normo térmicas **(Figura 6B)**. La motivación para realizar estos experimentos fue el tratar de determinar alguna medida de función celular *in vitro* la cual pudiese ser afectada por cambios en la temperatura ambiental. El nivel de PAD2 se mostro a su nivel más bajo a 31°C, aumentando progresivamente a 37°C y 41°C. Los resultados correspondieron con las medidas de deiminación utilizando el anticuerpo contra citrulina (cit), una medida de actividad de PAD2 **(Figura 4A-B”)**.

Los análisis de ELISA **(Figura 7A,B)** y Western blot **(Figura 7C,D, Figura Suplementaria 1B)** también demostraron una elevación progresiva en los niveles de GFAP, ALDH1L, PAD2, Citrulina, J1-31, actina e ISO[4]$LGE_2$ correspondiendo a una elevación en la temperatura de 31º C a 41º C. Los astrocitos probablemente se activen de una manera que corresponda con una elevación de actividad metabólica de 31º C a 41ºC.Este aumento en GFAP y ALDHL1 que se observa de 31º C a 41º C es consistente con activación de

astrocitos y un metabolismo elevado respectivamente. La activación en los astrocitos también está asociada a la expansión en el tamaño de las células, por lo tanto una proteína del citoesqueleto como J1-31 muy probablemente debe también mostrar una expresión elevada como la que observamos nosotros. Algo para tomar en cuenta es que como J1-31 comparte epitopes con GFAP, que también muestra niveles elevados, cabe la posibilidad de que la expresión elevada de J1-31 sea a consecuencia de superposición de epitopes (Garcia et al, 2003) algo que no podemos obviar. Una tendencia opuesta fue demostrada en los marcadores TSP, AQP4, y S100β, confirmado los resultados de la inmunohistoquímica semicuantitativa **(Figura 4-5)**.

Con el propósito de investigar si otras proteínas muestran una expresión selectiva elevada a 31ºC, 37ºC, o 41ºC, nosotros realizamos un análisis adicional por espectroscopia de masas **(Tabla 2)**, y los resultados son sugestivos de que diferentes proteínas son selectivamente afectadas a diferentes temperaturas. Por ejemplo la DEPDC5 (DEP domain-containing protein 5), una proteína cuyas mutaciones han sido implicadas con la epilepsia (Striano et al, 2015) y el carcinoma hepatocelular (Burza et al, 2016) mostro un nivel de expresión más elevado a ambos espectros de la temperatura óptima de 37ºC. A la temperatura de 37ºC, la expresión de DEPDC5 fue mínima. Del otro lado del espectro, algunas proteínas estuvieron asociadas solamente con la condición de normotermia (37ºC): proteínas como la cadena pesada 10 dineina, la helicasa putativa de ADN INO80 complejo homólogo 1, la pequeña subunidad del processome (componente 20 con homología UTP20), el cual es un complejo

de proteínas asociadas con la biogénesis de ribosomas, y el factor de remodelación BPTF, un factor de transcripcion regulador de cromatina. Algunas de las proteínas elevadas solamente durante hipertermia fueron ankyrin 1 (Okada-Ogawa et al, 2009) y ATP-binding cassette subfamilia A, miembro 5 (Kim & Halliday, 2012), mientras algunas proteínas como serina–treonina kinasa ,proteina SMG1 y CLIP associating protein 1 (proteína 1 asociada al citoplasmo), fueron reportadas con un nivel de expresión alta en condiciones hipertérmicas (41ºC). Las proteínas mostradas en la **Tabla 2** basicamente pertenecen a cuatro categorías: 1) factores de transcripción y/proteínas de metabolismo de ADN, 2) proteínas enzimáticas, 3) proteínas asociadas con el metabolismo energético, y 4) proteínas asociadas con el transporte celular. Algún nivel de modulación en estas categorías es previsto. Por ejemplo, la temperatura debe aumentar y disminuir diferentes tipos de factores de transcripción. Lo mismo debe ser aplicable a las enzimas del metabolismo del ADN, cuyas acciones están asociadas con la elevación o disminución de proteínas, como las de formación de cromatina. Muchas enzimas son moduladas más allá de temperaturas óptimas, por ejemplo, serina–treonina kinasa esta elevada a una temperatura más baja de la normal, probablemente para aumentar la capacidad de señalización y sobrevivencia de las células.

Las proteínas asociadas al transporte, como por ejemplo dineina, muestran un nivel bajo en ambas temperaturas (31°C y 41ºC) que no son óptimas para las funciones celulares. Proteínas involucradas en el metabolismo, como la succinato dehidrogenasa y ATP binding proteins, están elevadas a 41ºC pero no

a bajas temperaturas. La elevación vista en proteínas de metabolismo sugiere que más producción de energía es requerida para el mantenimiento de la homeostasis y la síntesis de proteínas y de factores que cancelan los efectos dañinos que pueden ser causados por exposición a altas temperaturas. Enzimas como la hidrolasa de ubiquitina también muestran elevación como consecuencia de corta exposición a temperaturas elevadas, tal vez para eliminar proteínas agregadas o dañadas después de exposición a temperaturas elevadas.

### 1.2.3 Efecto del estrés oxidativo en el cultivo de astrocitos

El estrés oxidativo fue provocado en los cultivos de astrocitos mediante la adición de peroxido de hidrógeno ($H_2O_2$) 100 µM, o agua como control al medio de cultivo por una hora y seguido por un periodo de estabilización de 24 horas a 37°C. La concentración de $H_2O_2$ usada en nuestros experimentos fue seleccionada después de varios intentos de optimización a diferentes concentraciones, variando de 50-300 µM $H_2O_2$. Una concentración de 100 µM de $H_2O_2$ fue finalmente la concentración óptima ya que ocasionó menos muerte celular de acuerdo al ensayo de Tunel y la citotoxicidad de $H_2O_2$ en los astrocitos fue medida por medición de actividad del LDH segregado por los astrocitos al medio de cultivo. Además, esta concentración de 100 µM es muy parecida a la reportada en ratas expuestas a condiciones isquémicas y también es similar a los niveles fisiológicos reportados en condiciones de post-isquemia (Hyslop et al, 1995). Nosotros utilizamos $H_2O_2$ como estimulo de oxidación

porque es una ROS producida endógenamente y porque sirve de precursor a radicales de hidroxilo (Finkel, 2003).

Hemos evaluado el nivel de expresión en la deiminación con Western blot, ELISA y análisis inmunohistoquímico. Los resultados de los Western blot y la densitometría muestran una elevación en la expresión de PAD2 y GFAP cuando los cultivos son sometidos a la condición de estrés oxidativo (**Figura 8A-B)**. Lo mismo es demostrado inmunohistoquimicamente utilizando anticuerpos para GFAP y PAD2 **(Figura 8C-C').** Basado en la importancia que el estrés oxidativo tiene como un factor importante en condiciones patológicas asociadas con la generación de radicales libres, nuestra evaluación de la deiminación de astrocitos puede ofrecer un mejor entendimiento al respecto.

### 1.2.4 El estiramiento mecánico eleva el nivel de expresión de PAD2 en los astrocitos.

Nosotros sometimos a los astrocitos a estiramiento mecánico, un proceso similar a lo que les ocurre en la cabeza del nervio óptico. Utilizamos una membrana de polietileno donde inmovilizamos las células antes de realizar el estiramiento. Las células pasaron por múltiples ciclos de estiramiento ya que *in vivo* están sometidas a un estiramiento dinámico (Balestrini & Billiar, 2006) y también porque en el nervio óptico, los astrocitos experimentan fluctuaciones en el IOP que probablemente son mas similares a múltiples ciclos de estiramiento que a un estiramiento estático (Shuba et al, 2007). La repetida aplicación de presión a la membrana por un minuto con un período de relajación de un minuto fue

considerado como un ciclo. Nosotros establecimos que un mínimo de 5 ciclos fueron suficientes para detectar diferencias en el nivel de PAD2, actividad y cambios en el nivel de deiminación. **(Figura 9A)**. Entre 5–20 ciclos de estiramiento, hubo un doblaje en el nivel del PAD2 y de su actividad. El nivel de PAD2 correspondió con la actividad de PAD2 y con la deiminación, la cual siguió aumentando hasta los 30 ciclos y ya después de los 30-35 ciclos se mantuvo más constante **(Figure 9A)**. Otro detalle observado fue que el aumento de ciclos en el estiramiento mecánico no tuvo ningún efecto en la viabilidad de las células. El análisis inmunohistoquimico revelo que repetidos ciclos de estiramiento fueron suficientes para causar sobre expresión de PAD 2 **(Figura 9B)**. Los astrocitos que mostraban elevación en PAD2 (fluorescencia roja) también mostraban elevación en GFAP (fluorescencia verde); **Figura 9B, C**).Los astrocitos usados como control, o sea no sometidos a estiramiento no mostraron expresión de PAD2 **(Figura 9B')**. Es muy probable que *in vivo*, las células experimenten un efecto combinatorio de muchos factores, es por eso que en el futuro, otros modelos que usen una combinación de factores/insultos podrán ayudar a ampliar el conocimiento de lo que realmente ocurre con los astrocitos en esta patología. Además, las células *in vivo*, no están aisladas y la contribución de las otras células alrededor de su entorno en general puede que no sea totalmente captado en condiciones *in vitro.*

## CAPÍTULO 2: La deiminación produce productos autocatalíticos de MBP, los cuales pueden activar a los astrocitos.

### 2.1 Resumen:

La esclerosis múltiple y el glaucoma poseen algunas características en común, incluyendo un nivel aberrante en el nivel de deiminación y la presencia de astrocitos reactivos en el tejido nervioso. En ambas enfermedades (nervio óptico en glaucoma y cerebro en MS), los componentes de la MBP y de MAG han sido reportados con niveles abundantes de deiminación (Wood et al, 2008).

En adición al nivel elevado en la deiminación de la MBP en los cerebros humanos de pacientes con MS (Moscarello et al, 1994), también ha sido demostrado que esta forma deiminada de MBP presente en las placas posee un nivel elevado de auto catálisis (D'Souza et al, 2005).

En el Glaucoma, nuestro grupo ya ha demostrado previamente un aumento en el nivel de deiminación de otro de los componentes de la mielina, la glicoproteína oligodendrocitica de la mielina (MOG) en el nervio óptico de pacientes con glaucoma .

Aunque es incierto si la MBP es el antígeno principal en la esclerosis múltiple, lo que se sabe con seguridad es que definitivamente esta proteína está involucrada en la patología de la enfermedad. La inmunización de ratones con determinados

fragmentos de la MBP induce una patología con reacción inflamatoria conocida como Encefalomielitis alérgica experimental (EAE) (Recks et al, 2015; Weissert, 2016).Productos autocatalíticos de MOG también provocan una reacción la cual ha demostrado activación de los astrocitos en el nervio óptico (Chun et al, 2015).

Los astrocitos ya no se perciben solamente como células cuyo rol es el de apoyar a las neuronas, si no como células con un papel más activo, incluyendo el de influir en la mielinización (Kiray et al, 2016), aumentar las reacciones inmunes y como siempre seguir apoyando a las neuronas en funciones de regeneración de axones y en la oligodendrogénesis.(Christopherson et al, 2005; Miyamoto et al, 2015; Ullian et al, 2004). Los astrocitos también son importantes para la madurez sináptica y plasticidad neuronal (Eroglu et al, 2009; Ullian et al, 2004).

La MBP es sintetizada por los oligodendrocitos creando varias formas de la misma, la cual sufren de un sinnúmero de modificaciones post trasduccionales (PTMs). El procesamiento postransduccional de la MBP determina su nueva configuración y su afinidad con los ligandos, actuando así como un regulador importante de sus funciones y estructuras. La forma clásica de MBP varia en peso molecular, de 14 a 21.5 kDa, y todas sus formas son esenciales en el mantenimiento de la integridad estructural de la vaina de mielina en el sistema nervioso central. (Harauz & Boggs, 2013). Existe un nivel alto en la homología de la secuencia de la MBP entre los humanos, especies bovinas y roedores **(Tabla 3)**.  La isoforma 5 de la MBP, 18.5 kDa (P02686-5) es la isoforma que predomina en el cerebro humano adulto, y es también la variedad mas

estudiada. Esta isoforma contiene 170 residuos y en los sujetos normales está relativamente intacta, sin modificaciones. Sin embargo, en pacientes con MS, puede estar deiminada en seis de sus residuos de arginina. En la forma fulminante de MS, conocida como Marburg's Disease, 18 de las 19 argininas presentes en la MBP están citrulinadas.(Cao et al, 1999).

La escisión auto catalítica de la MBP derivada de pacientes con MS es más elevada en pacientes con MS que en sujetos normales (D'Souza et al, 2005). Ya que es muy difícil obtener cantidades grandes de MBP deiminada de donaciones de tejidos de autopsias, y porque la deiminación in vitro utilizando PADs es irreproducible e inespecífica, nosotros hemos adquirido un péptido sintético generado utilizando la secuencia del mismo fragmento identificado como el fragmento que es el producto de la auto catálisis de la MBP derivada de la isoforma 5 (D'Souza et al, 2005). En este péptido sintético, la arginina correspondiente al amino acido 122 ha sido reemplazada con una citrulina en esa posición. La siguiente es la secuencia de aminoácidos de la isoforma 5 de la MBP:

MASQKRPSQRHGSKYLATASTMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFGGDRGA
PKRGSGKDSHHPARTAHYGSLPQKSHGRTQDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQ
GKGRGLSLSRF**SWGAEGQRPGFGYGG**RASDYKSAHKGFKGVDAQGTLSKIFK
LGGRDSRSGSPMARR

Hemos utilizado los servicios de creación de péptidos a pedido (Genescript Corporation, Piscataway, NJ) para generar los siguientes fragmentos, cuyas secuencias están a continuación:

SWGAEGQRPGFGYGG (Péptido 1-no deiminado= non dMBP)

SWGAEGQ(CIT)PGFGYGG (Péptido 2-deiminado= dMBP)

Nosotros entonces sometimos a los cultivos a un tratamiento con ambos péptidos, no citrulinados (non dMBP) y citrulinados (dMBP) para investigar el papel que estos productos autocatalíticos pueden ejercer en la activación de los astrocitos. Esto lo evaluaremos utilizando los mismos marcadores de expresión de actividad/morfología/oxidación de astrocitos seleccionados en el capítulo 1. Es muy importante mencionar que el propósito de utilizar estos péptidos sintéticos deiminados es tratar de establecer un modelo *in vitro* que emule lo que puede estar ocurriendo fisiológicamente a los astrocitos bajo condiciones de neurodegeneración en las que hay sobre expresión de estos productos autocatalíticos de la MBP.

Para añadir más información relevante a este capítulo, adicionalmente a los péptidos sintéticos, también hemos utilizado al modelo animal ND4 en la evaluación de activación de astrocitos. En este modelo, que alberga copias múltiples de la isoforma DM-20 de PLP, los signos clínicos comienzan después de los 3 meses de edad, y sin necesidad de inmunizarlos con antígeno de la MBP, ellos espontáneamente comienzan a sufrir de desmielinización

(Mastronardi et al, 1993; Mastronardi et al, 1996) Alrededor de los 8 meses de edad, ya se puede observar un nivel alto de anormalidades de movimiento y otras deficiencias motoras, muy parecido a lo que experimentan los pacientes con MS. Es por esta razón que escogimos evaluar a los astrocitos en este modelo ya que es un modelo genéticamente modificado, no artificialmente obligado a exhibir una reacción inflamatoria. Este modelo puede darnos una visión más profunda sobre lo que puede estar ocurriendo a nivel celular con los astrocitos y la relación que esto puede tener con la esclerosis múltiple. Además, este modelo ha sido extensamente evaluado no solo en cuanto a desmielinización mediante el uso de técnicas de MRI si no también de defectos visuales que corresponden con pérdida de mielina mediante el uso de electrorretinograma por patrón (PERG) en nuestro laboratorio (Enriquez-Algeciras et al, 2011).

## 2.2 Resultados y conclusiones:

### 2.2.1 Efecto del tratamiento con péptidos sintéticos en la viabilidad de las células

El primer paso que tomamos para optimizar el tratamiento con péptidos sintéticos fue la evaluación de apoptosis basada en dosis de péptido y duración de tratamiento. Queríamos estar seguros de que un número suficiente de astrocitos sobrevivieran por la mayor cantidad de tiempo de incubación con los péptidos. Entonces expusimos a los cultivos a dosis diferentes de péptidos (100 ng, 200 ng, 500 ng), por 24 horas, 36 horas, 48 horas, 60 horas y 72 horas y evaluamos la viabilidad después de cada tratamiento utilizando el ensayo

TUNEL. Los resultados indican que la concentración óptima de péptido sintético la cual promovió mas supervivencia de astrocitos fue 200 ng. Además, la duración más larga de tratamiento, en la que las células estuvieron en contacto con los péptidos sintéticos sin comprometer su viabilidad fue de 60 horas **(Figura 10A)**. También evaluamos el porcentaje de astrocitos apoptóticos después del tratamiento con y sin INFγ para luego poder utilizarlo como un estimulador de MHC clase II **(Figura 10C)**.Después de considerar todos los parámetros de optimización decidimos tratar a los cultivos con 200 ng de péptidos sintéticos por 60 horas. Además, evaluamos si había cambios en la morfología de los astrocitos a consecuencia del tratamiento con los péptidos y para esto utilizamos tintura con GFAP. Nuestros resultados indican que la morfología de los astrocitos después de 60 horas de tratamiento, con o sin INFγ no fue alterada **(Figura 10B)**.No sabemos cómo estos péptidos pueden estar afectando a la MBP o como están activando a los astrocitos pero pensamos que probablemente estos péptidos trastornan de alguna manera la estructura ordenada de la MBP y provocan que una molécula de MBP actué como sustrato para otra molécula de MBP, un proceso que puede explicar el nivel tan elevado de auto catálisis de la MBP. Pensamos que la deiminación incompleta y heterogenia causa que la MBP que esta deiminada actúe como sustrato de la MBP que esta menos deiminada y en la que la falta de deiminación hace que la actividad proteolítica siga intacta. Como el modelo de MS mas estudiado es el de EAE, en el cual la enfermedad es inducida por inyección de un fragmento de un péptido derivado de MOG, nosotros quisimos evaluar el efecto *in vitro* de otro

fragmento derivado de la MBP el cual fue identificado como deiminado en tejidos cerebrales de pacientes con MS (Mastronardi et al, 1993; Moscarello et al, 2007; Moscarello et al, 1994).A pesar que nuestro trabajo hasta el momento es *in vitro*, en visionamos que si somos capaces de provocar una reacción inmune similar a la observada en la enfermedad con la introducción de este péptido, esto puede servir para generar otro modelo animal para la enfermedad, que tenga otro mecanismo de patología diferente al que es actualmente utilizado. Mientras más comprendamos el efecto que estos fragmentos de proteínas de mielina pueden ocasionar en los astrocitos *in vitro* podremos contribuir a la creación de un mejor modelo animal para estudiar mejor esta enfermedad neurodegenerativa que tal vez sea más parecida a la enfermedad en los humanos o desafíe otros aspectos de la patología.

### 2.2.2 Evaluación de marcadores de citoesqueleto y otros marcadores de activación después del tratamiento con péptidos.

Cuando comenzamos nuestros experimentos de cultivo de astrocitos con los péptidos sintéticos por las 60 horas de tratamiento quisimos también cuantificar el nivel de activación de los astrocitos midiendo los siguientes parámetros (1) tinción de faloidina/actina para el citoesqueleto (2) productos de la peroxidación de lípidos basado en producción de ISO[4]LGE$_2$, (3) PAD2, GFAP, Acuaporina 4, ALDH-L1, S100β y Trombospondina.

Mediante el análisis por Western blot hemos podido demostrar la existencia de varios niveles de activación de astrocitos en los diferentes marcadores después

del tratamiento con los péptidos sintéticos. Interesantemente, con estos péptidos, todos los marcadores de activación muestran un aumento en su expresión después de la adición de los pedidos deiminados de la MBP **(Figura 11A)**, algo lo cual validamos mediante un análisis densitométrico realizado por tres observadores independientes al menos de tres experimentos diferentes y para cada marcador evaluado **(Figura11B)**.Además, realizamos análisis de ELISA para cuantificar los niveles de GFAP, faloidina/actina, nivel de productos de peroxidación de lípidos con anticuerpo para ISO[4]LGE$_2$ y relacionamos los resultados con los niveles de PAD2. Ambos marcadores para actina y ISO[4]LGE$_2$ mostraron un aumento en su expresión con un patrón similar a los resultados de expresión de PAD2 y GFAP después del tratamiento con los péptidos deiminados **(Figura 11C)**. El análisis por inmunohistoquímica arrojo la misma conclusión en cuanto a lo referente a ISO[4]LGE$_2$ **(Figura 12A',B')** y a GFAP**(Figura 12A,B).** El tratamiento con péptidos sintéticos de fragmentos de MBP ha sido la condición experimental o el insulto que ha demostrado un nivel más consistente de activación en todos los marcadores y con todas las técnicas utilizadas. Esta condición además fue en la que el nivel elevado en la deiminación, cambios de citoesqueleto y modificaciones de lípidos coincidieron en demostrar un aumento de manera consistente.

### 2.2.3 Identificación por espectrometría de masas de proteínas después del tratamiento con péptidos.

En adición a los métodos anteriormente mencionados nosotros también realizamos un análisis por espectrometría de masa de las proteínas obtenidas después del tratamiento con los péptidos sintéticos. Como esperábamos, pudimos identificar proteínas asociadas con actividades típicas de astrocitos relacionadas con la remodelación de su citoesqueleto (GFAP, vimentina, sinaptopodina), funciones de comunicación intercelular o gap junctions (conexina 43), proteínas relacionadas a la traducción (40S proteína ribosómica S16) y otras proteínas importantes para la señalización entre astrocitos y neuronas Proteina C4 similar a neuropéptido (neuropeptide-like protein C4). El detalle más importante revelado por la espectrometría de masas fue que en los astrocitos estimulados con IFNγ y en los que estuvieron expuestos al péptido deiminado logramos identificar proteinas deiminadas immunologicamente relevantes, como interleucinas. Esto es algo que investigaré de mejor manera en el capitulo 3. El grupo de proteínas presentadas **(Tabla 4)** son proteínas específicamente identificadas como deiminadas, o sea proteínas en las que al menos un péptido de los que fueron identificados poseía un residuo o más que había sido modificado por deiminación post trasduccional.

### 2.2.4 Elevación de deiminación en astrocitos provenientes del modelo animal ND4.

Queríamos saber si la elevación artificial provocada por los anteriores insultos en los cultivos astrocitos podría ser emulada en el modelo de desmielinización animal ND4. Entonces utilizamos astrocitos provenientes de los ND4 y de su

cepa control CD1, los purificamos y evaluamos el nivel de deiminación en estos. Los resultados de la inmunohistoquímica confirmaron que los astrocitos provenientes de los ND4 muestran un nivel de deiminación y un aumento de expresión de GFAP **(Figura 13 D-E)** mucho mayor que el de los controles **(Figure 13A-C)**. Tambien con este experimento descubrimos que aunque la deiminacion ocurre en ambos tipos de células del raton control, astrocitos y neuronas,, en el modelo animal ND4, las neuronas positivas para Thy1 exhibieron un nivel menos elevado en su deiminacion comparado con los astrocitos, algo que corroboramos con un análisis ELISA **(Figura Suplementaria 2, A–J)**. Con esto tenemos una evidencia indirecta de que en este modelo, en el que hay una disminución sustancial de componentes inmunológicos e inflamatorios, podemos demostrar que la elevación observada en la deiminación tiene especificidad a un nivel celular. En este modelo al menos, demostramos que existe elevación en el nivel de deiminación en los astrocitos mientras que las neuronas muestran un patrón completamente opuesto. Estos resultados también confirman lo reportado por otros estudios de enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, estudios en los que utilizan modelos de lesiones cerebrales traumáticas (Lazarus et al, 2015) y de enfermedades causadas por priones (Jang et al, 2013) han también reportado que la deiminación es un fenómeno experimentado a mayor escala por los astrocitos, no las neuronas, oligodendrocitos o las microglias.

## CAPÍTULO 3: Los astrocitos activados son capaces de expresar en su superficie moléculas co-estimulatorias y moléculas MHC clase II, las cuales son necesarias para la presentación antigénica.

### 3.1 Resumen:

El sistema nervioso central (CNS) es considerado como un sitio inmunológicamente privilegiado ya que posee su propio sistema de circulación linfática y está separado del sistema inmune por la barrera hematoencefálica (BBB).Dentro del CNS, las microglias son vistas como las principales participantes en la defensa contra infecciones y procesos inflamatorios. Las microglias (células presentadoras de antígeno profesionales) y los astrocitos (posibles células presentadoras de antígeno no profesionales) producen IL-12, una citoquina producida por células presentadoras de antígeno, las cuales han sido implicadas en reacciones inmunologicas de tipo Th-1 (Constantinescu et al, 1996). Nosotros proponemos que los astrocitos, siendo las células más abundantes en el sistema nervioso central, células con roles convencionales no asociados a la presentación de antígeno, pueden ser estimuladas/activadas para actuar como células presentadoras de antígeno no tradicionales. El mecanismo por el cual ellas hacen este cambio puede involucrar la deiminación post-trasduccional de proteínas del CNS, incluyendo GFAP y MBP mediante la citrulinacion de residuos de arginina. Estos residuos de arginina ahora citrulinados crean nuevos epitopos, y estos nuevos epitopos pudieran a su vez ser reconocidos por linfocitos T conduciendo a una reacción inmunológica de autoinmunidad. La localización de los astrocitos en el cerebro junto a la barrera hematoencefálica permite encuentros tempranos con los linfocitos que están

migrando al CNS. Los astrocitos son capaces de producir no solo IL-12 (Th1) pero también, IL-4 (Th2), IL-23 (Th17), IL-6 y TGF-β (Th17) TNFα, citoquinas que pueden modificar a los recién activados linfocitos T y polarizarlos hacia un linaje o subtipo de linfocitos T con un perfil inflamatorio especifico. Todo lo anterior seria posible, comenzando a partir de la activación de linfocitos T naïve por medio de la presentación de antígeno vía astrocitos a dichas células (Constantinescu et al, 2005).

El modelo animal mas estudiado en cuanto a la esclerosis múltiple es el de encefalitis autoinmune experimental (EAE). En este modelo la inyección de un péptido derivado de la proteína MOG, que es uno de los componentes de la mielina, es introducido en ratones causando síntomas parecidos a los de la enfermedad. De una manera similar, en esta última parte del trabajo de tesis, estamos tratando de evaluar el efecto inmunológico *in vitro* de un fragmento de péptido, esta vez proveniente de la MBP, identificado anteriormente con elevación de deiminación en pacientes con MS (Mastronardi et al, 1993; Moscarello et al, 2007; Moscarello et al, 1994). Nuestra hipótesis es que los astrocitos, al adquirir y procesar dichos péptidos, los cuales son productos autocatalíticos de la MBP, se activan adquiriendo así la capacidad de comportarse cómo células presentadoras de antígeno, capacidad que no poseían anteriormente.

Las respuestas mediadas por los linfocitos T en la MS se cree resultan después de una sensibilización de algunos linfocitos T a antígenos provenientes de la mielina (Cao et al, 1999).

Mecanismos inmunes (Joachim et al, 2008) y autoinmunes (Yang et al, 2001) han sido implicados anteriormente en la degeneración neuronal en el glaucoma. Los astrocitos, siendo las células gliales más prominentes en la parte no mielinada de la cabeza del nervio óptico son responsables de proveer apoyo celular y metabólico a los axones de las células ganglionares de la retina (RGCs). La lamina cribosa en la cabeza del nervio óptico es probablemente el sitio donde mas estrés es generado a consecuencia de elevación en IOP (Bellezza et al, 2003). Las señales generadas aquí son detectadas por las células de la lamina cribosa, de la cual los astrocitos son su mayor componente (Hernandez, 2000). Esta serie de eventos que ocurre en el glaucoma in en MS en adición al hecho de que los astrocitos son las células mas prominentes en el sistema nervioso central nos han hecho enfocar nuestro interés en el estudio de los astrocitos en lugar de otro tipo de célula. El efecto particular que los astrocitos puedan ejercer en la patología inmunológica y el proceso inflamatorio depende de muchos factores, entre ellos factores que puedan influir en su activación (Nair et al, 2008; Yang et al, 2001).

Para evaluar si los productos autocatalíticos generados a consecuencia del proceso de deiminación pueden o no activar inmunológicamente a los astrocitos, se utilizaron astrocitos provenientes de la corteza cerebral de ratones C57BL/6,

los cuales purificamos y cultivamos en presencia de péptidos de MBP deiminada (dMBP) y de MBP no deiminada (non dMBP).

El aspecto o interrogante principal a examinar consistiría en comprobar si los astrocitos, una vez activados en presencia de péptidos deiminados, son capaces de expresar las moléculas coestimuladoras de la familia B7 y el MHC clase II, ambas necesarias para inducir la activación de linfocitos T. Estudios previos utilizando astrocitos no activados han demostrado una cantidad detectable a nivel de mARN correspondientes a las moléculas coestimuladoras de la familia B7, mas dichas moléculas no fueron detectadas a nivel de proteína en la superficie celular. Para comenzar a responder esta pregunta, se utilizaron anticuerpos para detectar la presencia de las moléculas coestimuladoras CD80/B7-1, CD86/B7-2 y MHC clase II ($IA^b$) en la superficie de los astrocitos presuntamente activados en presencia de péptidos deiminados utilizando Western blot e immunohistocitoquimica. Otro dato revelado en los estudios antes mencionados demuestra que los astrocitos primarios pueden expresar un modesto nivel de moléculas coestimuladoras y de MHC clase II en su superficie solamente cuando son estimulados con IFNγ (Wong et al, 1984). Por esta razón decidimos estimular astrocitos primarios con una dosis adecuada de IFN γ para ser utilizados como control positivo de la expresión de MHC clase II (Nikcevich et al, 1997).

También, en este mismo estudio ha sido demostrado por Nikcevich y colegas que los astrocitos primarios estimulados por IFNγ son capaces de provocar una respuesta allogenica de los linfocitos T.

Nosotros utilizaremos astrocitos, incluyendo los controles positivos mencionados arriba, serán estimulados con INFγ por un período de 24 horas, tomado de (Fontana et al, 1986; Massa et al, 1987). Nuestra teoría se basa en que la expresión de moléculas de coestimuladoras además de MHC clase II por los astrocitos activados pudiera interpretarse como que estos poseen la capacidad de actuar como células presentadoras de antígeno, algo que pudiera ejercer un papel muy importante en el comienzo de la patología de MS, por ejemplo, estimulando la secreción de citoquinas y quimo quinas inflamatorias además otras actividades citotóxicas que pudieran contribuir a la degeneración de los axones. Si logramos demostrar que los astrocitos activados por los péptidos deiminados procedentes de la autocatálisis de MBP pueden expresar las moléculas coestimuladoras B7 y de MHC clase II en su superficies, entonces podremos en un futuro investigar lo que sucede en un sistema autólogo utilizando astrocitos y linfocitos T de la misma cepa de raton. Esto seria clínicamente consistente con el origen autoinmune de MS, la cual requiere que los linfocitos T reconozcan a un auto-péptido (self-peptide) en el contexto de MHC I o II (CD8 y CD4 respectivamente) con una afinidad fuerte por el complejo de MHC-péptido además de una señal coestimuladora.

Si los astrocitos activados poseen la capacidad de ser presentadores de antígeno, significaría un mecanismo novedoso, una vez mas con ramificaciones importantes en el contexto inmunopatologico de estas enfermedades neurodegenerativas y por ende en el campo terapéutico. Sin duda un proyecto interesante para continuar evaluando a futuro.

Por otra parte, en el caso de que los astrocitos activados por los péptidos deiminados no logren expresar moléculas co-estimuladoras o de MHC clase II, entonces en un futuro podríamos investigar la posible expresión de moléculas inhibidoras de activación o coestimulación en los astrocitos. Esto debido a que también puede existir la posibilidad de que los astrocitos se comporten como una célula tolerizante, actividad que exhiben ciertas poblaciones de células presentadoras de antígenos en las que no se observan moléculas o prevalecen señales de coestimulación. Aunque esto forma parte del objetivo principal de este trabajo de tesis, seria un proyecto interesante para dar continuidad a esta línea de investigación en el futuro.

## 3.2 Resultados y conclusiones:

### 3.2.1 Evaluación de presentación de antígeno por astrocitos activados por tratamiento con péptidos deiminados por inmunocitoquimica

Después de los experimentos del capítulo 2, hemos podido establecer que los astrocitos expuestos a los péptidos deiminados que son productos de auto catálisis de la MBP demuestran signos de activación bioquímica, como ha sido confirmado por elevación de expresión de los marcadores de activación de astrocitos. Sabemos que las moléculas MHC clase I y II son requeridas para presentar antígeno a los linfocitos T CD8 and CD4, respectivamente. Los astrocitos no activados expresan un nivel modesto de clase I y no expresan clase II. Las moléculas co-estimulatorias B7 (CD80/B7-1, CD86/B7-2) son

requeridas para la activación de los linfocitos T naïve. Estas moléculas son sobre expresadas en varias poblaciones de células inmunológicas que son presentadoras de antígeno a consecuencia de su activación inmunológica y su expresión ha sido reportada anteriormente en astrocitos que han sido activados por citocinas (Tan et al, 1998). Como el objetivo es evaluar si los astrocitos pueden ser inmunológicamente activados, seleccionamos la condición de activación (del capítulo 2) que consistentemente mostró más activación basada en expresión de la mayoría de moléculas de activación seleccionadas. **(Figura 10-12)**. Para evaluar la función de presentación de antígeno, hemos utilizado anticuerpos específicos para CD80 y CD86 y los hemos analizado por Western blot **(Figura 14A)** y densitometría **(Figura 14B)** así como por análisis inmunohistoquimico **(Figura 15)**. Como se demuestra en la figura 15A, con la adición de los péptidos deiminados, hay una elevación de expresión en las moléculas co-estimulatorias que coincide con la elevación de expresión de PAD2 y GFAP. Como los astrocitos no activados pueden expresar un nivel modesto de MHC clase I pero no de clase II, también utilizamos anticuerpos para estas moléculas y evaluamos su expresión inmunohistoquimicamente **(Figura 16)**. Los resultados demuestran que después de la adición de los péptidos en el cultivo, hay una sobre expresión de moléculas MHC clase II en la superficie de los astrocitos tratados por el péptido deiminado **(Figura 16B')** en comparación con los tratados con el péptido no deiminado **(Figura 16B)**, mientras que la expresión en la clase I fue similar en ambas condiciones de tratamiento **(Figura 16 C, C')**. Estos resultados sugieren que después de estar expuestos a los

péptidos deiminados, los astrocitos tal vez pueden adquirir funciones de presentación de antígeno que normalmente no poseen.

### 3.2.2 Evaluación de presentación de antígeno por astrocitos activados por tratamiento con péptidos deiminados por citometria de flujo

Como ha sido mencionado anteriormente, el procesamiento de antígenos y la expresión de moléculas MHC clase I y clase II constituyen factores esenciales para lograr la presentación de antígenos de manera adecuada por células con dicha capacidad. Por otra parte, la activación exitosa de linfocitos T 'naïve' requiere no solamente de la interacción especifica entre en receptor de la célula T y el MHC -péptido, sino también del establecimiento de señales co-estimulatorias apropiadas de parte de la célula presentadora de antígenos. Las moléculas CD80/86 pertenecen sin lugar a dudas a una de las familias de moléculas co-estimulatorias más estudiadas en el contexto de activación de linfocitos T. Para investigar la posibilidad de que los astrocitos se comporten como células presentadoras de antígenos, astrocitos primarios fueron cultivados en por si solos, en presencia de péptido no deiminado y deiminado y con IFNγ como inductor de MHC II y evaluados por citometría de flujo.

Las condiciones de cultivo empleadas indican que una fracción importante de los astrocitos en cultivo expresan MHC clase II (>50%) y CD86 (>70%) **(Figura 17**

**A, B)**, sin observarse un incremento notable en las que fueron cultivadas en presencia de IFNγ **(Figura 17 C,D)**.

Aunque esto parezca contradecir los resultados de immunohistoquimica con anticuerpos de MHC clase II en los que en los astrocitos cultivados con pepdidos no deiminados (non-dMB) parece haber muy poca expresión de dicha molecula **(Figura 16 B)** en comparación a la sobre expresión observada con la adicion de péptidos deiminados (dMB) **(Figura 16B')**, sabemos que las dos técnicas poseen una sensitividad muy diferente. La citometria de flujo es una técnica con mayor sensitividad y poder cuantitativo que analiza una población mayor de células a la vez, mientras que la inmunohistoquimica posee muchas mas limitaciones y menor sensitividad.

Como otra manera de interpretar los resultados de la citometria de flujo, tambien calculamos los valores de MFI (mean fluorescence intensity), los valores para cada marcador han sido mostrados en la **figura 17** bajo la categoría "MFI" con sus adecuados histogramas correspondientes encima de dichos valores. Monitoreamos el cambio de intensidad de fluorecencia de cada marcador por celula ya que una población con un mayor indice de MFI demuestra mayor expresion que una poblacion con un indice menor. Los resultados indican que el marcador astrocitico GFAP fue el que mostró mas expresion de ese marcador en las condiciones de cultivo en las que había IFNγ **(Figura 17 C', D').** Una ligera elevación en el nivel de MFI en MHC II fue observada en la condición de cultivo con IFNγ y péptido deiminado **(Figura 17D')**. Estos resultados pueden ser

porque existen muy pocos estudios que utilizan IFNγ como estimulador de MHC clase II específicamente en cultivos de astrocitos y la dosis adecuada pudiese no ser la mejor bajo nuestras condiciones de cultivo. Nosotros utilizamos un periodo de 24 horas de estimulación con IFNγ (Fontana et al, 1986; Massa et al, 1987) pero otros estudios han recomendado utilizar un periodo mas extenso de hasta 72 horas (Frei et al, 1987).

En cuando a la molecula co-estimuladora CD86, claramente también se muestra un aumento significativo en ella, algo que coincide con los resultados de Western blot analisis **(Figura 14)** e immunohistoquimica **(Figura 15 B. B')**. Estos resultados confirman que los astrocitos activados por péptidos producidos por deiminacion de MBP en nuestro sistema *in vitro*, podrían poseer la maquinaria necesaria para presentar antígeno a los linfocitos T, algo que aunque no es parte de este trabajo de tesis, ameritaría ser investigado detalladamente mas adelante.

## CAPITULO 4: Discusion

La esclerosis multiple y el glaucoma son enfermedades degenerativas caracterizadas por daños al sistema nervioso y degeneracion de los axones neuronales.La aberrante y simultanea ocurrencia de hipo y hiper deiminacion han sido demostrada por nuestro grupo en estudios donde utilizamos retinas de pacientes con MS y del modelo animal de desmielinizacion ND4(Enriquez-Algeciras et al, 2013). Las consecuencias de un nivel reducido o elevado en la deiminacion probablemente se manifiestan como sintomas fisiologicos en estas

enfermedades. La observacion de que la capa donde se encuentran las celulas ganglionares de la retina exhibe un nivel reducido en la deiminacion, en contraste con las otras capas de la retina, nos sugirió que las diferencias en la regulacion de esta modificacion post trasduccional es probablemente específica para diferentes tipos de celulas. Nosotros pensamos entonces que la disminución en la deiminacion en esta capa de la retina es probablemente causada por la ausencia de astrocitos en la misma. Como las consecuencias que el aumento de deiminacion puede ocasionar en los astrocitos nunca antes habian sido investigadas, decidimos ser los primeros en hacerlo y basar el trabajo de tesis en esto.

Nuestros resultados indican que el nivel de deiminacion, elevado en enfermedades neurodegenerativas como el glaucoma y la esclerosis multiple ejerce un efecto en la activacion bioquímica e immunológica de los astrocitos. Las modificaciones post trasduccionales juegan un papel importante en el procesamiento de proteinas, vias de señalizacion, interaccion entre proteinas, interaccion entre proteinas-organos, entre proteinas-celulas y entre celulas – celulas. Como la deiminacion es un proceso irreversible, las implicaciones que esta modificacion ocacione pueden ser muy importantes, no solamente durante el proceso de activacion de astrocitos bioquimicamente pero tambien immunologicamente.  En este trabajo de tesis hemos podido demostrar que los diferentes estimulos fisicoquimicos ambientales como el aumento de presión, temperatura , estress oxidative, etc… pueden ser capaces de elevar el nivel de deiminacion en los astrocitos en un sistema de cultivo. Tambien hemos

comprobado que los productos autocatalícos procedentes de la deiminacion de la MBP tienen la capacidad de activar a los astrocitos en cultivo de una manera que emula lo que tal vez este ocurriendo en vivo. De igual manera tambien demostramos que la deiminacion en los astrocitos del modelo animal de desmielinizacion ND4 muestra un nivel elevado.  Finalmente hemos logrado demostrar algun tipo de expresion de algunos marcadores immunologicos como moleculas de co-estimulación y marcadores de CMH II por astrocitos en cultivo con los péptidos deiminados. Estas propiedades nunca antes reportadas podrian tener implicaciones en las patologias en las que la deiminacion muesra un nivel elevado en los astrocitos.

Una de las limitaciones de este trabajo es el uso de cultivos ya que en la mayoria de las enfermedades, es probable que las celulas experimenten efectos combinatoriales y multifactoriales que no son iguales a lo que experimentan in vitro. De todas maneras, utilizando cultivos pudimos investigar cada aspecto independientemente y asi dirijir nuestros esfuerzos apropiadamente con el proposito final de combinar lo aprendido para encontrar curas o al menos tratar de desarrollar terapias para aliviar, suprimir o contener el nivel patologico en estas enfermedades.

Aunque mas estudios sistemáticos van a ser necesarios para comprender los mecanismos de estas enfermedades en las que la deiminacion afecta a los astrocitos de manera diferente que a otras celulas del sistema nervioso, al menos con este trabajo de tesis hemos comenzado a comprender algunos

aspectos importantes de la patologia de estas enfermedades, específicamente en lo concerniente a los astrocitos.

Este trabajo en general es un concepto innovador que reta el dogma que estipula que los astrocitos activados son mas detrimentales que beneficiosos. No es siempre de esa manera y cuando comprendamos mejor que aspectos modificar para inclinar la balanza hacia el lado beneficioso podremos trabajar para encontrar o crear terapias innovadoras. Esta tesis incluye ademas nuevas ideas y técnicas que integran la biologia molecular, bioquímica, neurociencia, proteómica e immunologia para investigar un problema biologico con fines de en un futuro aplicarlos a la ciencia translacional.

## CAPITULO 5: Métodos y materiales

### 5.1 Preparación de tejidos

Los astrocitos fueron separados quirúrgicamente de la corteza cerebral siguiendo métodos ya publicados (Gregorios et al, 1985). Brevemente, las cortezas fueron diseccionadas en ratones C57/Bl6 , CD1 o ND4 a los 7 dias de nacidos cerciorándonos de remover las meninges y los vasos capilares. Pedazos de un tamaño de 1 mm cubico fueron transferidos a tubos de centrifugar de 15 ml y dejados reposar por unos minutos. Los pedazos de tejidos fueron incubados con una solución de 0.25% Trypsina/EDTA a 37ºC por 10 minutos. La digestion con tripsina la interrumpimos añadiendo medio DMEM + 10% sero fetal bovino; (FBS) + 40 µg/ml gentamicina. El homogenato con el tejido fue triturado con una pipeta Pasteur de cristal. El tejido fue sembrado en

un flasco de cultivo T-75 que estaba previamente recubierto con poly-L-lisina. El medio de cultivo fue cambiado cada 3-4 dias y despues de 10 dias lo sustituimos por un medio que contenia suero de caballo en vez de suero bovino. Esto produce un cultivo mixto en donde las microglias son visibles como una capa que se puede distinguir por encima de los astrocitos. Despues de 14 dias, la mayoria de las células vivas son solamente astrocitos pero todavia existe la posibilidad de contaminación con algunas microglias. Esto se soluciona dando pequeñas palmaditas a los bordes del flasco ya que las microglias no se adhieren tanto al plato como los astrocitos y se pueden despegar mucho mas facilmente. Para cerciorarnos de que no existan mas microglias incubamos el cultivo con 0.5mM dibutyryl cAMP (BML-CN125, Enzo Life Science, NY, USA) y despues de 14 dias obtenemos un cultivo con un nivel de pureza de>95% astrocitos, los cuales estan listos para utulizar en los estudios despues de 25-28 dias. En ese momento, las células adherentes se enjuagan con PBS. Si van a ser utilizadas para análisis de immunohistoquímica se fijan por 30 minutos con 4% paraformaldehido antes de ser permeabilizadas for 30 minutos con 0.05% Triton (T-8532, Sigma Aldrich,St. Louis, MO, USA) . Las células son incubadas con anti-GFAP Ab (ab4674, Abcam, Cambridge, MA, USA) por 1 hora, enjuagadas 3 veces con PBS e incubadas con “rabbit anti-chicken FITC-conjugated IgY” (ab6749, Abcam, Cambridge, MA, USA) por 1 hora y anticuerpos para las microglias, anti-Iba 1 (ab107159,Abcam, Cambridge, MA, USA) revelados por un IgG conjugado a Alexa 594 (ab150132, Abcam, Cambridge, MA, USA). Examinación con un microscopio de fluorecencia

confirma si los cultivos son de 95% a 98% positivos para GFAP. Los cultivos restantes se expanden reemplazando la media una vez por semana.

**5.2 Modelo animal ND4**

La linea original transgénica ND4 (Mastronardi et al, 1993) fue obtenida de “The Hospital for Sick Children” (Toronto, Canada) como un regalo investigativo “research gift”. Los animales fueron sometidos a re-derivación utilizando los servicios de Charles River Laboratory (Wilmington, MA).Despues de confirmar el estado genético, una colonia fue mantenida en el bioterio de Bascom Palmer Eye Institute. Los animals se mantuvieron de acuerdo a las reglas del Comité Institucional del cuidado animal (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) , y todos los experimentos fueron realizados siguiendo protocolos aprobados por IACUC en la Universidad de Miami.

**5.3 Tratamiento de incubacion a diferentes temperaturas**

Los cultivos primarios de astrocitos a una densidad de $1\times10^5$ cells/well fueron cultivados en la superficie de18mm vidrios circulares para diapositivas (48382-041, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) dentro de platos de 12-wells (3737, Corning, NY, USA). Las células fueron divididas en tres grupos, cada uno con un período de incubación de una hora a 31°, 37° or 41°C, seguido de un periodo de estabilización de 24 horas a temperatura normal (37°C). Las incubadoras fueron monitoreadas para asegurarnos de que no hubiese variación en la temperatura o

una concentración alterada de dióxido de carbono durante la hora de tratamiento.

**5.4 Viabilidad celular**

La viabilidad celular fue medida utilizando “Cell Titer Blue assay” (Promega, Madison, WI) mediante la adición del reactivo Cell Titer Blue a los wells (20µl de reactivo por 100µl de medio de cultivo en un plato de 96-wells) por 4 horas seguidos por cuantificación por ELISA utilizando un leedor de platos a 590nm. La viabilidad de las células fue comparada entre todos los tratamientos y normalizada con el número de células no tratadas. Triplicados de wells sin células sirvieron como controles negativos para establecer la flluorecencia del plato por su cuenta (background fluorescence).

**5.5 Microscopia confocal**

Las células fueron fijadas con 4% paraformaldehyde (#15710, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) en cover slips for 30 minutos, permeabilizadas con 0.2% Triton X-100 en 1X PBS for 30 minutos y bloqueados con PBS que contiene 0.2% BSA. El “Labeling” o teñido de las células fue realizado con los diferentes anticuerpos seleccionados.Utilizamos los siguientes anticuerpos: (GFAP; mouse monoclonal, BD Biosciences Pharmingen), Aquaporin-4 (AQP4; goat polyclonal, Santa Cruz), rabbit polyclonal anti-iso[4]LGE2(Govindarajan et al, 2009), anticuerpo monoclonal contra PAD2 recombinante (Koike et al, 1994), Anti-ALDH1L1 - Astrocyte

Marker(Boesmans et al, 2014; Foo & Dougherty, 2013) (rabbit polyclonal, Abcam), anti-Astrocytomas-low grade antibody (J1-31; mouse monoclonal, Abcam)(Garcia et al, 2003; Malhotra et al, 1995; Predy et al, 1988; Shuangshoti et al, 2009), anti-S100β protein (mouse monoclonal, clone 4C4.9, EMD Millipore), Thrombospondin (TSP1- mouse monoclonal, Abcam Inc.) y anti connexina 43 (Cx43; mouse monoclonal; Invitrogen, Carlsbad,CA).Los anticuerpos secundarios fueron: anti-mouse, anti-rabbit, anti-chicken o anti-goat conjugados con FITC, Alexa 594 or Cy5. Despues de incubar con los anticuerpos secundarios apropiados, las celulas fueron teñidas con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) por 45 minutos. Las células que fueron teñidas por faloidina [rhodamine-phalloidin (1:100 dilucion en 1X PBS) por 5 minutos] para observar cambios en los filamentos de actina. Despues de la tintura, los “cover slips” fueron invertidos, puestos en diapositivas, sellados con Vectashield (Vector Labs, Burlingame, CA) y visualizados con microscopia confocal utilizando un microscopio Leica ( laser scanning confocal microscope TCS-SP5, Leica, Exton, PA). Los controles negativos consistieron en células incubadas con el anticuerpo negativo solamente. La determinación de la intensidad relativa de la fluorecencia fue realizada usando Image J y Leica Application Suite, Advanced Fluorescence, 1.7.0 Build 1240 software. En todos los experimentos que incluyen microscopia en este trabajo, los conteos fueron realizados por 3 observadores independientes de una manera en la que ellos no sabian las condiciones experimentales (masked study). Para obtener imágenes representativas, una serie de imagenes de1 µm xy (en face) hasta el plano Z

fueron colectadas y combinadas para obtener una proyección en tres dimensiones. Para las imágenes teñidas con Thy 1 (SC-9163, rabbit, Santa Cruz, CA) utilizamos in anticuerpo secundario conjugado a Alexa 594 y anti-citrulline, anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488 y DAPI.

### 5.6 Tratamiento con péptidos sintéticos

Los astrocitos ($1\times10^5$ cells/well) fueron cultivados como anteriormente mencionamos en platos de cultivo de 100mm (430167, Corning, NY, USA). Las células fueron divididas en dos grupos, cada uno cumplió con un período de incubación de 60 horas con 200ng de péptido no deiminado de MBP o con 200 ng de péptido deiminado .Las incubadoras fueron monitoreadas periódicamente para asegurarnos de que no existía variabilidad en la temperatura o en la concentración de dióxido de carbono.

### 5.7 Cuantificacion para Western blots, immunohistoquimica

Para los Western blots, las proteinas extraídas de los cultivos de astrocitos (10µg) fueron separadas por geles SDS-PAGE con gradiente de 4-20%, transferidas a una membrana de polyvinylidene fluoride (PVDF), y bloqueadas con 5% de leche descremada. Las membranas fueron incubadas con los diferentes anticuerpos seleccionados. El anticuerpo monoclonal contra PAD2 fue un regalo del Professor Hidenari Takahara (Ibaraki University, Ibaraki, Japan) (Takahara et al, 1989; Terakawa et al, 1991). Los otros anticuerpos usados

fueron: GFAP; mouse monoclonal, BD Biosciences Pharmingen, Aquaporin-4 (AQP4; goat polyclonal, Santa Cruz), rabbit polyclonal anti-iso[4]LGE2 (Salomon et al. 1997). Anti-ALDH1L1 marcador astrocitico (rabbit polyclonal, Abcam), Anti-Astrocytomas-low grade antibody (J1-31; mouse monoclonal, Abcam Inc), Thrombospondin (TSP1, mouse monoclonal, Abcam Inc) y anti peptidyl citrulline IgM, clone F95 (mouse monoclonal, Millipore) o anti citrulline (17–347, Millipore Corporation, Billerica, MA). Los complejos de anticuerpo-antígenos fueron detectados utilizando los anticuerpos secundarios adecuados.Las proteinas fueron visualizadas con un kit de quemiluminescencia (ECL; GE Healthcare). Todos los blots fueron tambien incubados con Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, mouse monoclonal, Chemicon) como “loading control”. Las imagenes de los blots fueron pasadas a un programa donde la intensidad fue determinada usando ImageJ. Los resultados de Western blots cuantitativos fueron tambien confimados con IR-700 dye conjugado a anticuerpo secundario (non-amplified signal capture) usando un sistema llamado Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE).

Para cuantificar las imagenes tomadas con el microscopio confocal, en la imagen, el area utilizada para medicion fue demarcada usando ImageJ software, y normalizada. Determinamos la intensidad relativa de la fluorescencia utilizando Leica Application Suite, Advanced Fluorescence, 1.7.0 Build 1240 software. La intensidad de la señal fue utilizada para derivar un factor normalizante de intensidad DAPI y después de contar al menos 100 nucleos positivos para DAPI, el cual fue aplicado a los otros parámetros. Para verificar la cuantificación

y confirmar los niveles de fluorecencia, un grupo de 3 observadores independientes documentaron la intensidad de la fluorecencia utilizando una escala del 1-10 (10 siendo la fluorecencia mas intensa o 100%, 1 siendo la intensidad mas débil). Todas las cuantificaciones fueron realizadas después de al menos tres experimentos diferentes mediante análisis de variación (ANOVA) y expresados como average ± desviación estándar o error estándar de la media (SD o SEM). Toda la data fue sometida a test T a dos colas pareado referente a los controles y fueron considerados significativos si $p \leq 0.05$.

**5.8 ELISA**

Aproximadamente 10 µg de lisado de proteina astrocítica fue centrifugado a10000 × g por 10 minutos y el sobrenadante fue transferido a un plato de 96 wells (9018,Corning, NY, USA) e incubado por 20 minutos a temperatura ambiental. Para detectar citrulina, las proteinas fueron incubadas con 40 µl/well de 1:1 reactivos A y B del kit de citrullina (Millipore Corporation, Billerica, MA; 17–347) a 37◦C por 90 minutos. El sobrenadante fue descartado y el plato lavado con PBS y bloqueado con 1% Ovalbumin por 1 hora, lavado otra vez con PBS e incubado por 1 hora con rabbit polyclonal antibody contra citrulina modificada( Millipore Corporation, Billerica, MA; 17–347). Despues de mas lavados con PBS, los platos fueron incubados con los anticuerpos secundarios apropiados conjugados con fosfatasa alkalina por 1 hora, lavados con PBS e incubados con sustrato de fosfatasa (100 µl/well) en diethanolamine buffer, pH7.5. La absorción fue medida a 405 nm. Para la detección de PAD2, el paso

de los reactivos A y B fue omitido y en su lugar usamos un anticuerpo “rabbit polyclonal” contra PAD2 (ab16478,Abcam, Cambridge, MA, USA). Los resultados del análisis de ELISA son expresados como average ± desviacion estandar o error standard de la media. El análisis estadistico fue realizado para cada muestra utilizando un test t a dos colas pareado y fue encontrado significativo si $p \leq 0.05$.

**5.9 Tratamiento de cultivos a presión elevada**

Los astrocitos fueron sometidos a presion hidrostatica por 5 horas. Las celulas a una densidad de $7 \times 10^4$ cells/well fueron sembradas en platos de cultivo de 35mm (3294, Corning, NY, USA) e incubadas en medio libre de sero por 12 horas. Utilizamos una camara presurizada (5% carbon dioxide) equipada con un manometro (constructed at Washington University Instrument Machine Shop, St. Louis, MO) para someter a las celulas a elevacion de presion. Brevemente, las celulas fueron colocadas en la camara y la presion fue elevada a 40 mm Hg dentro de una incubadora a 37◦C. Las celulas fueron incubadas a alta presionpor 5 horas y a presion normal por 16 horas despues para estabilizarlas. Celulas controles derivadas del mismo pasaje fueron incubadas a presion atmosferica normal en una incubadora a 37◦C. Despues del tratamiento las celulas fueron tripsinizas y utilizadas para Western blot, ELISA o ensayo de actividad de PAD2.

**5.10 Ensayo de actividad enzimatica de PAD2**

La determinacion in vitro de actividad enzimatica de PAD fue realizada usandoun espectrofotometro (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Brevemente, PAD2 purificado o extracto de astrocito fue anadido a la mezca para la iniciacion del ensayo. La mezcla de reaccion contenia 100mMTris-HCl, pH 7.5, 10mMCaCl2, 2.5 mM dithiotheritol (DTT), 10 Benzoyl Arginine Ethyl Ester Solution (BAEE)y 5 μg de lisado de celula/muestra en un volumen final de 50 μl. Esta mezcla fue incubada por 3 horas 37ºC. La reaccion fue interrumpida anadiendo 10 µl de 5 M acido perclorico y la fraccion soluble en acido perclorico fue mezclada con 150 µl de un reactivo (carbidino detection reagent) el cual fue preparado al momento usado dos componentes, una parte de(A) 0.5% diacetyl monoximine y 0.01% thiosemicarbazide añadida a dos partes de(B) 0.25 mg de $FeCl_3$/ml en 24.5% acido sulfurico ($H_2SO_4$) y 17% acido phosphorico ($H_3PO_4$).La mezcla fue calentada a 95ºC por 5 minutes.Las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiental y la absorcion medida a 535 nm. Una solucion de L-citrulline (10–100 mM) sirvio como referencia para la cuantificacion.

**5.11 Estiramiento mecánico**

Los astrocitos fueron sometidos a estiramiento mecánico usando una membrana de polietileno en la que las celulas fueron immobilizadas antes del tratamiento La immobilizacioó fue realizada ya que los astrocitos en vivo se mantienen immobilizados en el nervio óptico. Usamos una membrana (Birla Textiles Ltd.,Amritsar, India), previamente tratada con colágeno purificado (Sigma

Chemical Co., St. Louis, C9879–1G) en su superficie (1–5mg de proteina por 5 sq cm) y sometido a tratamiento para immobilización en un microondas por 10 segundos. La superfice de la membrana tratada con colágeno tambien fue tratada con riboflavina (vitamin B2; Sigma Chemical Co., St. Louis, R7649–25G) solution (100 µg/ml). Subsecuentemente 5000 astrocitos fueron colocados en la membranay sometidos a reticulación usando365 nm luz ultravioleta (lampara de mano) por 5–10 segundos. Este método de immobilizacion fue adoptado de un metodo de reticulación de corneas (Spoerl et al, 1998; Spoerl et al, 2007).La membrana con los astrocitos fue sumergida en medio de crecimiento de astrocitos (AGM, #CC-3187 , Lonza, Basel, Switzerland)con 5% FBS de tal manera que los bordes quedaran fuera del petri dish. Los astrocitos fueron sometidos a estiramiento mecánico estirando de ambos lados de la membrana. El estiramiento fue aplicado por ambos lados por un minuto y relajado por 1 minuto, lo que fue considerado un ciclo. Las celulas fueron mantenidas in una incubadora a 37ºC y la membrane colocada en un petri dish durante el tratamiento (serum free medium (AGM) with5% FBS).

**5.12 Modificacion en-solucion para detectar citrulinacion por espectroscopia de masa**

Despues de triptinizar al cultivo astrocitico y centrifugarlos para obtener un sedimento celular, utilizamos 100 µg de proteina para preparar un extracto homogenizandolo con un tampon con 0.1% SDS.El lisado es centrifugado a 12k y el sobrenadante hervidoa 95 ºC por 5 minutes. Para detectar proteinas

citrulinadas, los reactivos A y B del kit de citrulina (Millipore Corporation) fueron añadidos en una proporcion de  a 1:1  y la mezcla incubada por 90 minutos. Para neutralizar la acidez añadimos 250 µl de 100 mM Tris, pH10e incubamos la mezcla por 15 minutos adicionales. Para precipitar la proteina fuera de la solucion, se anaden de 2-4 volumenes de acetona fria, se incuba en hielo por 15 minutos y se centrifuga otra vez. En este momento el sobrenadante se desecha y el sedimento celular usando un speed vaccum (centrifuga de alta velocidad al vacio). El sedimento es entonces resuspendido en agua, reducido con dithiotheritol (DTT) y alkilado con iodoacetamido. Las proteinas son digeridas con “sequencing grade” chymotripsina (V1062 , Promega, Madison, WI)  durante la noche (0.1ug/20ul N-ethyl morpholine), lavada con  Acetonitrilo: agua (1:1) y una vez mas en acetronitrilo puro, secado con el speed vaccum hasta que el perdigon luzca seco. En el momento del analisis por espectroscopia de masas el perdigon es re-supendido en  5% acetronitrila (ACN) con 0.1% ácido fórmico (FA).

**5.13 Procesamiento de bandas de gel para digestion por espectroscopia de masas**

Las bandas de proteinas son primeramente separadas en un gel de 4-20% SDS-PAGE, cortadas a un tamaño 1mm$^3$y sometidas a digestión de proteinas. Brevemente, las bandas de gel son desteñidas co Acetonitrilo y agua (1:1) y 100mMde bicarbonato de Amonio, reducidas con dithiotheritol (DTT), y alkiladas con iodoacetamida. Las proteinas son digeridas con “sequencing grade”

chymotrypsina (V1062 , Promega, Madison, WI) durante la noche (0.1ug/20ul N-ethyl morpholine), lavada con Acetonitrila: agua (1:1) y una vez mas en acetronitrila puro, secado con el speed vaccum hasta que el perdigon luzca seco. En el momento del analisis por espectroscopia de masas el perdigon es re-supendido en 5% acetronitrile (ACN) con 0.1% acido formico (FA).

**5.14 Analisis de espectroscopia de masas**

Los péptidos son cargados en una columna analítica (Betabasic C18 capillary chromatography column) de 2.1 x100 mm, empaquetada con resina de 3 µm C18 reversed-phased (RP)- fase inversa (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Los péptidos son ionizados y cargados a una trampa iónica linear siguendo el siguiente gradiente: 0-20 minutos: A (15%) ,B (85%); 20-25 minutos: A (5%) y B (95%), lascondiciones son mantenidas por 25-43 minutos y despues en 43-47 min A (97%) y B (3%) a condiciones iniciales con un flujo de 250µl/min (fase móbil A: 100% agua/0.1% acido fórmico y fase móbil B: 100% acetonitrilo/0.1% ácido fórmico). El espectro fue adquirido con un instrumento de espectroscopia de masas Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). Durante el análisis LC- MS/MS , el instrumento realizó adquisición de data independiente con un escáner MS (“scan”) entre 450 y 1800 m/z seguidos por tres MS/MS “scans” (30% energia de colisión) de los tres iones mas intensos del escáner previo. Todos los espectros de MS/MS fueron buscados utilizando los programas de base de datos proteómicas Mascot, (Matrix Science, Boston, MA) y SEQUEST (Proteome Discoverer) usando la base de datos de Swiss Prot (base

de datos que combina información  comisariada por expertos  mas información evaluada por programas de analísis computacionales) y consolidando los resultados en Scaffold de Proteome Software, una plataforma para visualizar y validar los experimentos de MS/MS .

**5.15 Evaluacion de estado transgénico para los ratones ND4**

El estado transgénico de los ratones fue evaluado por analísis genotípico. Basicamente el ADN derivado de las colas fue analizado por PCR. Brevemente los recortes de las colas fueron sumergidos en 300 µl  de reactivo de lisis (DirectPCR, catalog no. 101-T; Viagen Biotech Inc., Los Angeles, CA), a lo que se le añadieron 9 µl de proteinasa K (10 mg/mL ; Sigma, St. Louis, MO). La mezcla fue incubada a 55°C por 12 horas. Despues de la incubación, la muestra fue centrifugada a 10,000*g* por 1 minute e incubada otra vez a 85°C por 45 minutos. Aproximadamente 1 µl (200 ng ADN) del lisado fue usado por cada 50 µl por muestra para la reaccion de PCR. Los ND4 son heterozigoticos y entonces los ratones CD1 sirven de controles por no serlo.La presencia del transgen (proteolipid protein isoform DM-20) fue confirmada utilizando el siguente set de primers: forward, 5’-GTGGATGTGGACATGAAGCTCTC-3’reverse, 5’-CAGGAGCCATACAACAGTC-3’. Para determinar si la ADN aislada de las colas de los ratones es un buen sustrato para el PCR, utilizamos un gen endógeno  en los ratones, β-*globin* y el gen fue amplificado con los siguientes primers: 5’-CCAATCTGCTCACACAGGATAGAGAGGGCAGG-3’ and5’-

CCTTGAGGCTGTCCAAGTGATTCAGGCCATCG-3', esperando un producto de amplificacion de 494 pares de base.

**5.16 Evaluacion de marcadores immunologicos por citometria de flujo**

Las celulas fueron extraidas de los cultivos y resuspendidas en medio (PBS with 0.5% BSA and 0.02% sodium azide) a $10^7$ cells/ml. La marcacion fue hecha en 100 µl de"staining medium" ($10^6$cells). Los anticuerpos fueron adicionados en las diluciones recomendadas por el proveedor de dichos anticuerpos y incubados por 25–30 minutos.Las celulas fueron despues lavadas con el staining medium y resuspendidas para analisis de citometria de flujo (BD LSRII Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) o sorteo (MoFlo Astrios EQ cell sorter, Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA).

| Ab | Fluorophore | Emmission | Company | Catalog# |
|---|---|---|---|---|
| **CD86** | **FITC** | **519** | **BD Pharmingen** | **553691** |
| **MHC II ($IA^b$)** | **APC** | **660** | **EBioscience** | **17- 5321- 81** |
| **GFAP** | **Alexa 700** | **716** | **Novus** | **NBP2-33184** |

**5.17 Analisis estadistico.**

Todos los experimentos fueron realizados al menos tres veces. Los análisis estadísticos fueron hechos utilizando IBM SPSS, version 21 (IBM,Armonk, NY). Los resultados fueron reportados como mean±SEM de al menos 3 experimentos independientes para cada condicion analizada. La data fue sometida a two-tailed paired t-test (test t a dos colas pareado) contra controles, o ANOVA, seguido por

el test post hoc least significantdifference (LSD).El nivel de significacion estadistica siempre fue de$P \leq 0.05$.

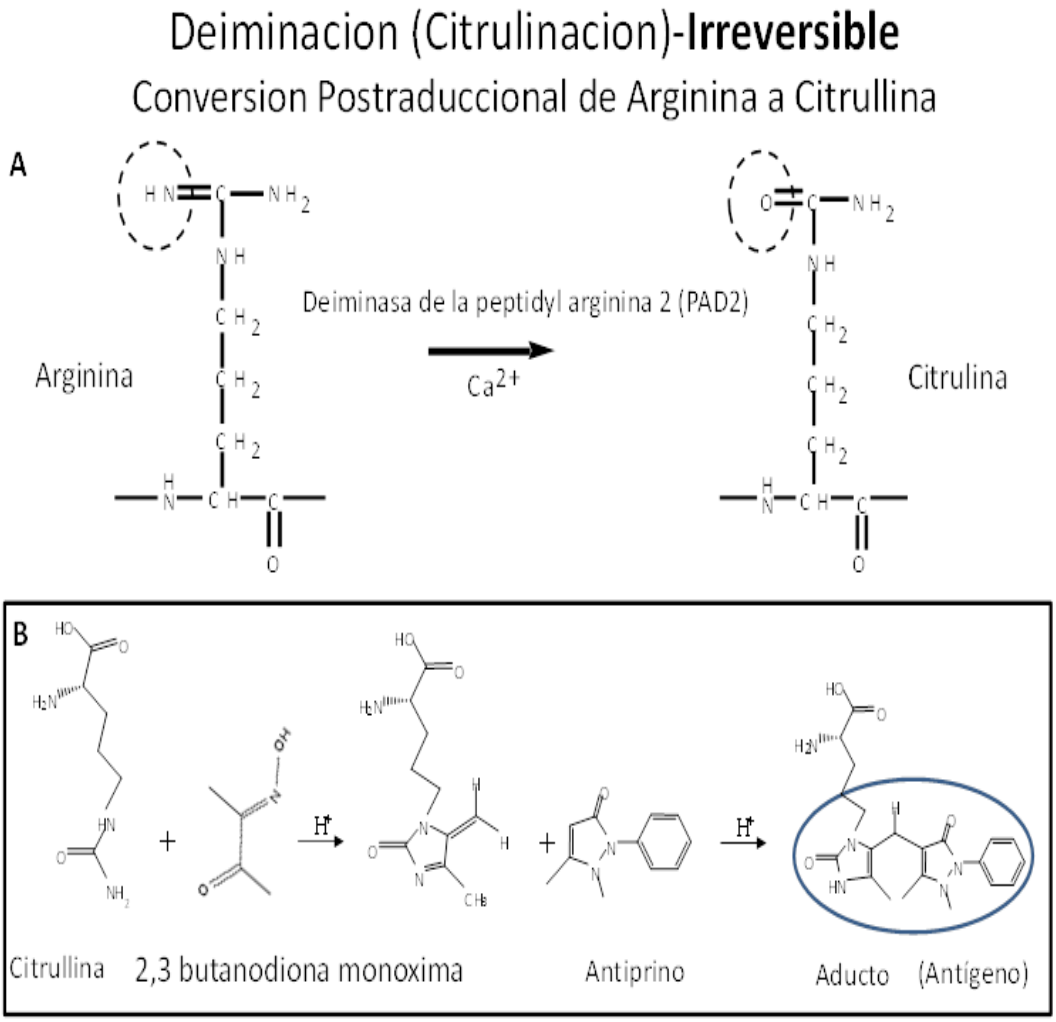


**Figura 1**. La reacción de deiminación. (A) La conversión irreversible de arginina en una proteína a citrulina en dicha proteína es llamada deiminación. Esta reacción es catalizada por PADs en presencia de Calcio. (B) Método de detección de la deiminación: La proteína citrulinada en un ambiente ácido y en presencia de 2,3 butanodiona monoxima y antipirina forma un compuesto que puede ser identificado por un anticuerpo.

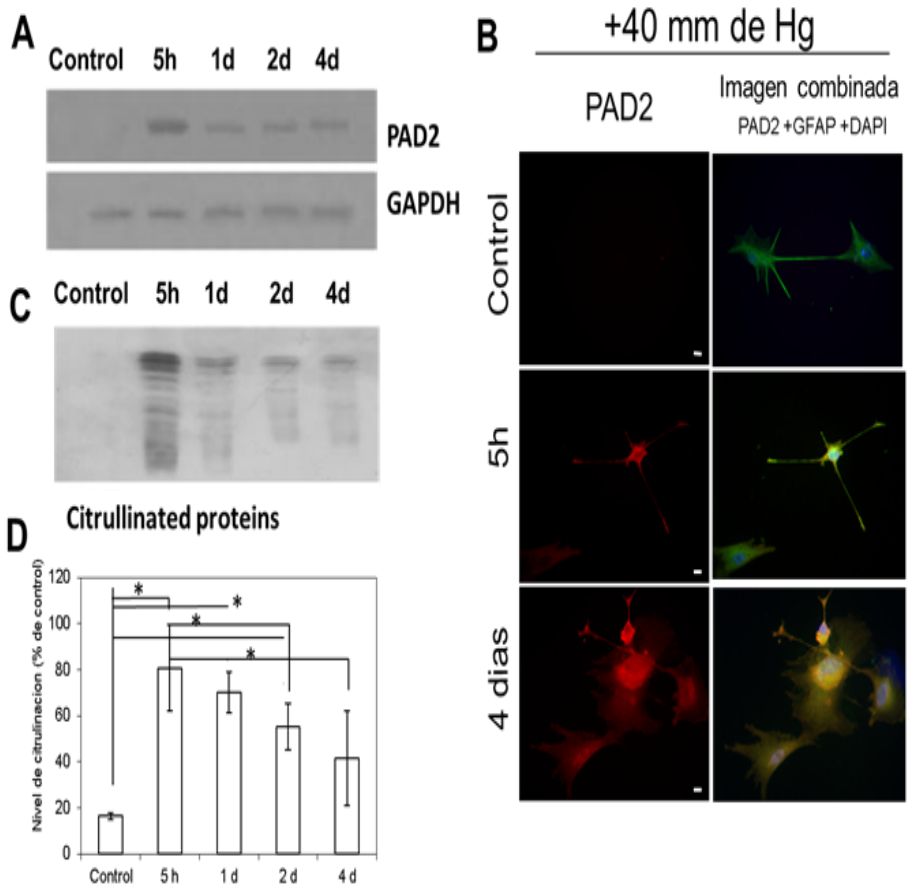


**Figura 2.** Expresión de PAD2 como respuesta a presión elevada. (A) Imagen representativa de análisis de Western blot con anti-PAD2 de astrocitos (corteza cerebral) sometidos a una presión elevada de 40 mm Hg por 5 horas y después estabilizados a presión ambiental por los siguientes 4 días. (B) Imágenes de inmunofluorescencia de astrocitos controles y tratados con presión alta (40 mm Hg) muestran immuno reactividad 5 horas después del tratamiento y hasta por 4 días después del tratamiento, utilizando anticuerpos para GFAP y PAD2. Los anticuerpos secundarios para GFAP estuvieron conjugados con Alexa 488 (verde) y para PAD2 con Alexa 594 (rojo). (C) Imagen representativa de Western blot con anti citrulina utilizando (5 µg) de proteínas de astrocitos sometidos a presión elevada como en (A). (D) Cuantificación de Western blot (promedio de tres lecturas) con ImageJ. Los valores (media ± error estándar de la media) de la intensidad de expresión de citrulinación de tres experimentos independientes, *$p<0.05$.

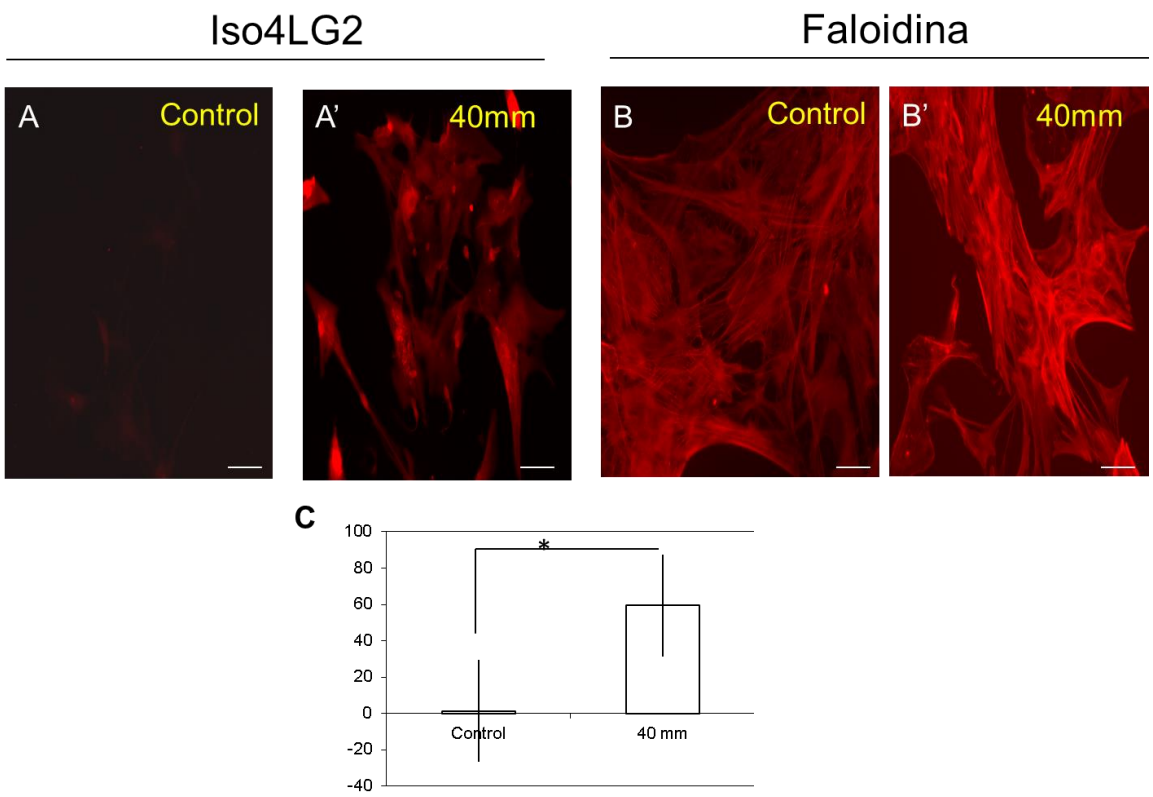


**Figura 3**. Imagen representativa del efecto de presión elevada en elementos del cito esqueleto y en modificación de lípidos. (A) Alrededor de 3000 astrocitos provenientes de la corteza cerebral de ratón fueron sometidos a alta presión. Los astrocitos fueron teñidos con anticuerpos para iso [4]LGE2 o rhodamina-phalloidina después de 5 horas a alta presión (40 mm Hg), seguido por un periodo de recuperación de 16 horas. (A) Iso [4]LGE2 ; (A') control; B) Faloidina; (B') control. Escala=50 µm

(C) Cuantificación de la intensidad de fluorecencia en imágenes de immunofluorescencia determinada utilizando Image J, de al menos 100 células por imagen y basado en la intensidad de fluorescencia /área. Los valores (media ± error estándar de la media) de la intensidad de fluorescencia de tres experimentos independientes, *$p<0.05$.

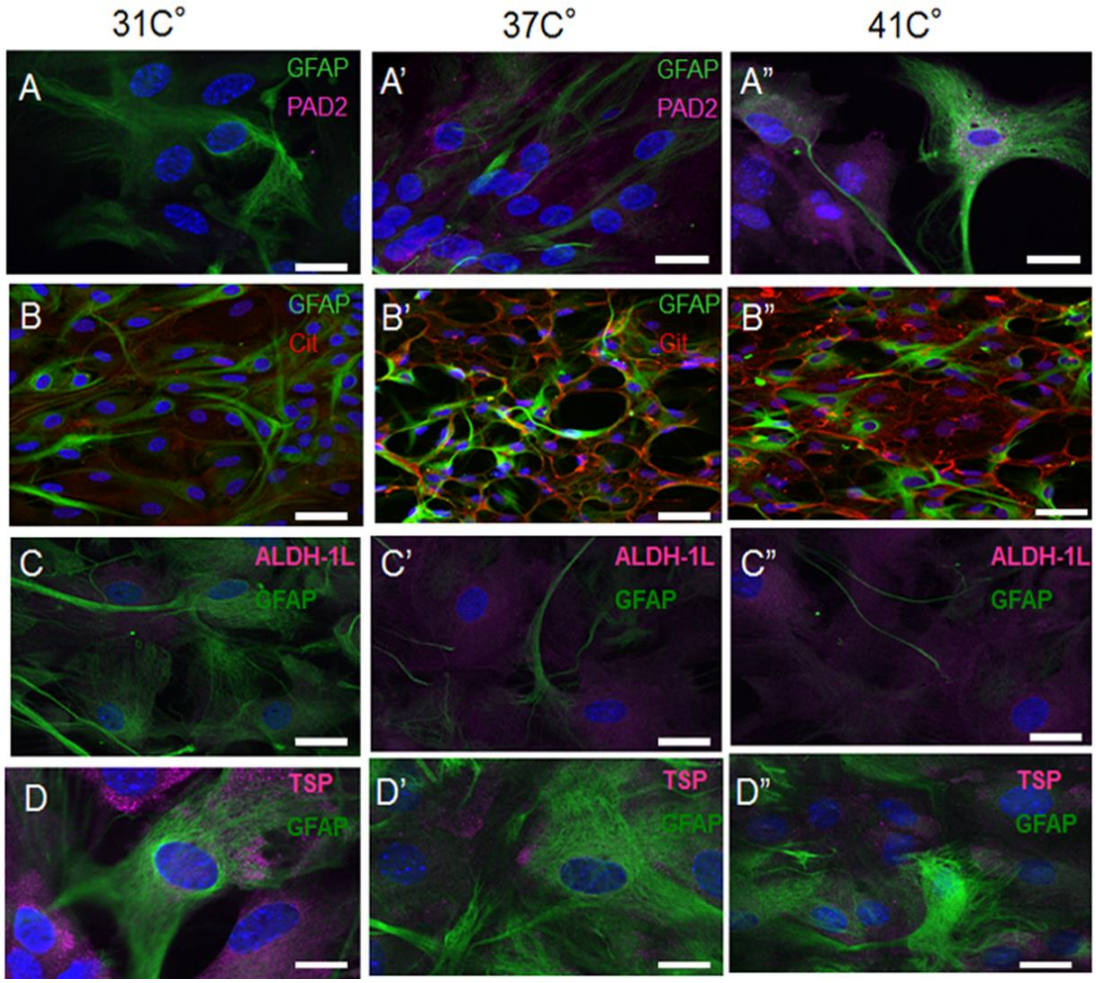


**Figura 4**. Los astrocitos fueron evaluados para marcadores de activación, PAD2 y deiminación luego de la incubación por 1 hora a temperaturas óptimas (columna central) y sub-optimas (columnas laterales). El análisis de immunofluorescencia fue realizado utilizando anticuerpos contra los siguientes antígenos: GFAP (FITC) y doble tinción con anti- PAD2 (Cy5; A,A',A"), anti-citrullina (Alexa 594; B,B',B"), anti-ALDH-1L (Cy5; C,C',C"), anti-TSP1 (Cy5; D,D',D"). Escala=50 µm en A–C", 25 µm en D–D".

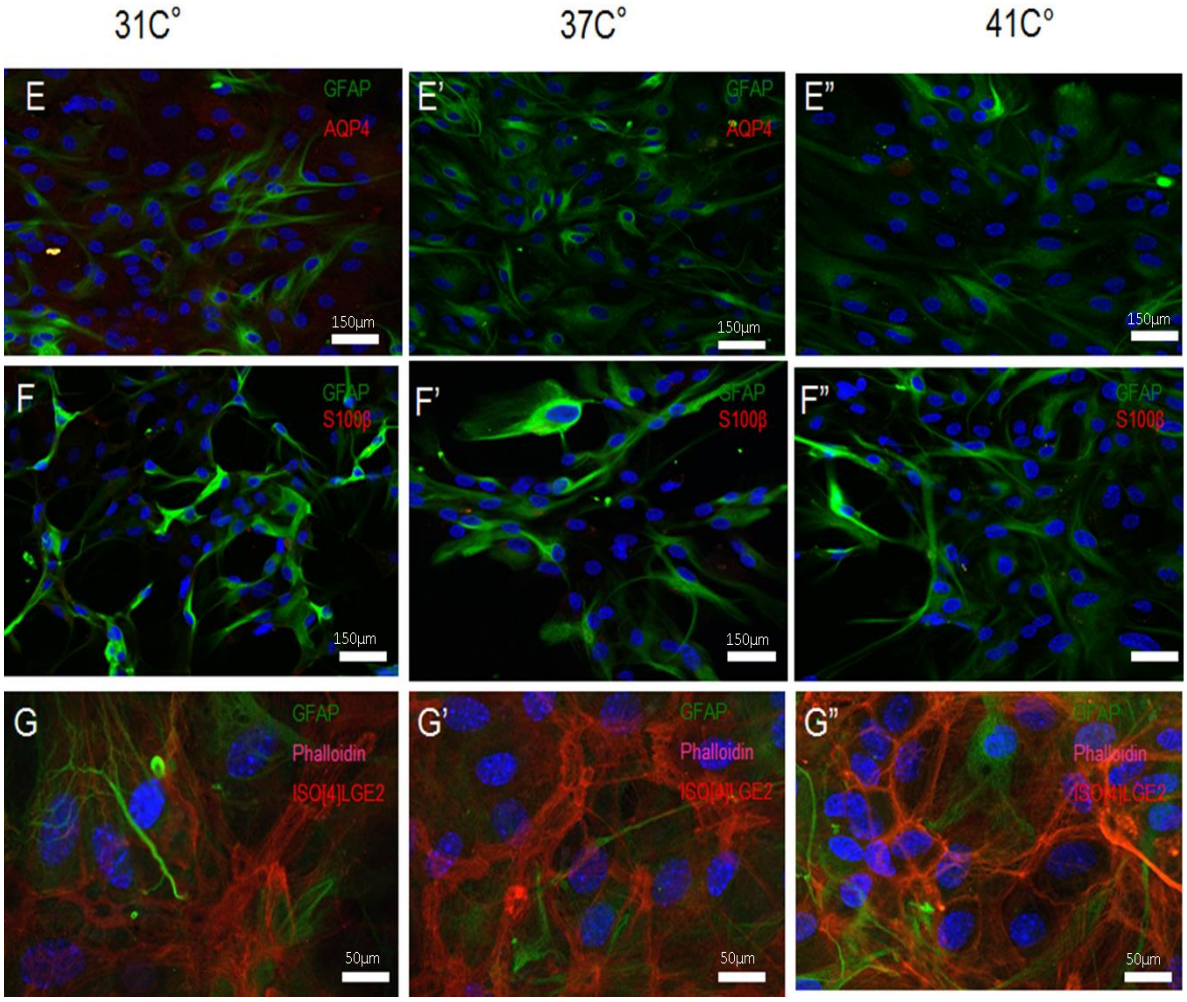


**Figura 5**. Los astrocitos fueron evaluados para marcadores de activación, PAD2 y deiminación luego de la incubación por 1 hora a temperaturas óptimas (columna central) y sub-optimas (columnas laterales). El análisis de immunofluorescencia fue realizado utilizando anticuerpos contra los siguientes antígenos: GFAP (FITC) y doble tinción con anti- AQP4 (Alexa 594; E,E'E"), anti-S100β (Alexa 594; F,F',F"), anti-faloidina (Cy5) y anti-iso[4]LG2 (Alexa 594; G,G',G"). Escala=150 µm en E–F", 50 µm en G–G".

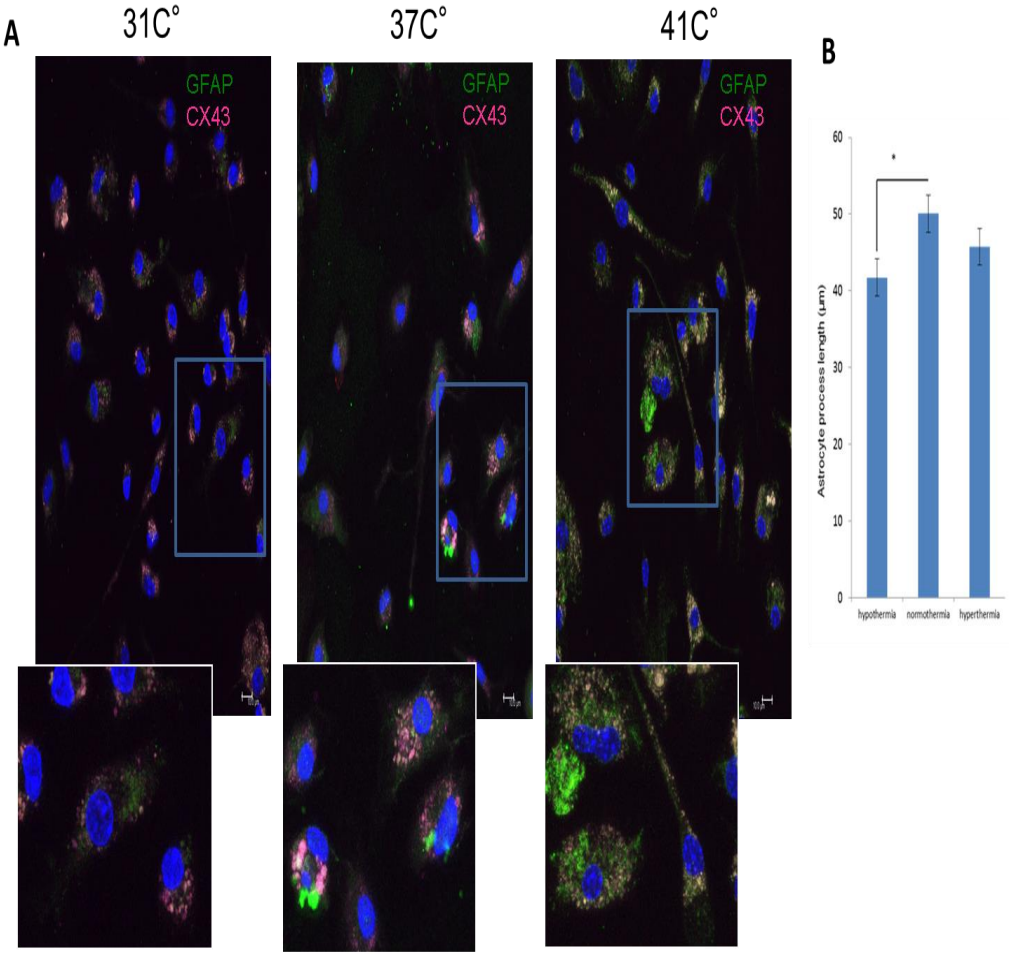


**Figura 6**. Evaluación de connectividad y procesos astrocíticos. A: Los astrocitos fueron evaluados para la expresión de proteínas relacionadas a la conectividad, como (CX43), después de ser incubados a temperaturas óptimas y sub-optimas por 1 hora. Análisis de immunofluorescencia utilizando anticuerpos contra GFAP (FITC) y CX43 (Cy5). Una magnificación de las aéreas demarcadas por un rectángulo se muestra en los paneles de abajo. B: Cuantificación de longitud de los procesos astrocíticos después de cada tratamiento de incubación. Los valores han sido expresados como media ± error estándar de la media de tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados utilizando "one-way ANOVA", seguido de post hoc LSD (*$p<0.05$). Escala=100 µm.

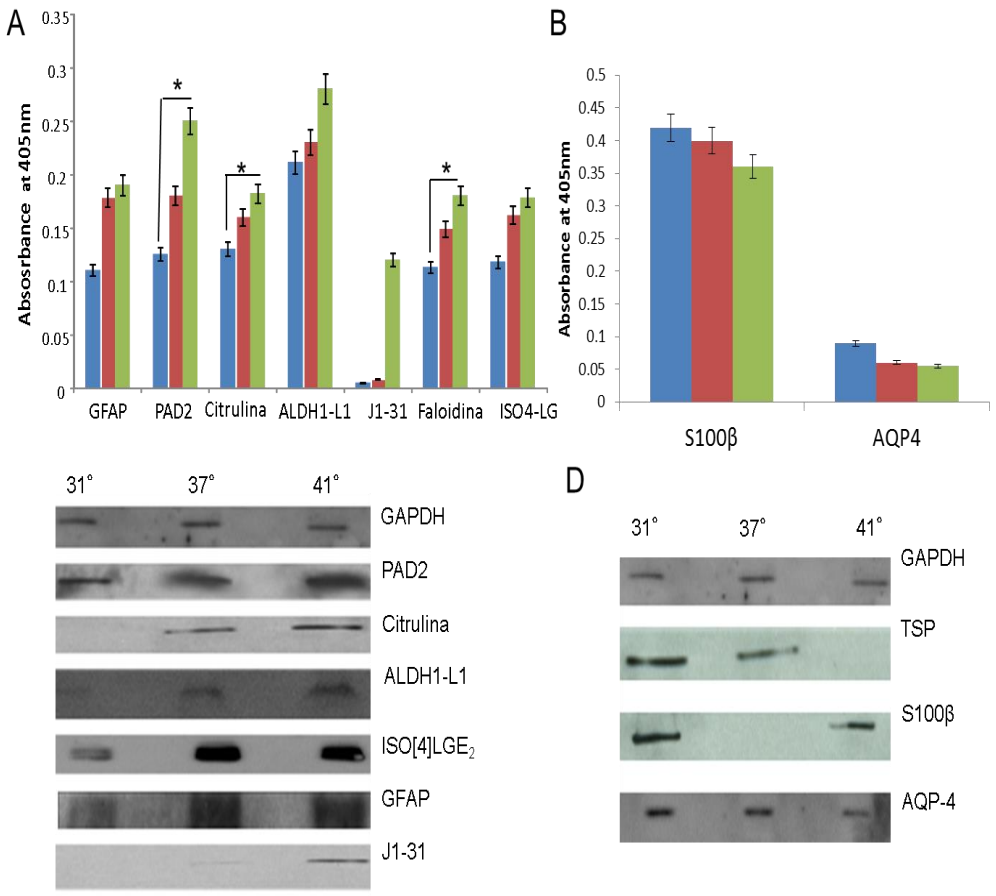


**Figura 7**. Confirmación de activación de astrocitos (marcadores de activación, PAD2y deiminación) utilizando metodologías inmunológicas cuantitativas. A: ELISA de astrocitos sometidos a diferentes temperaturas: 31ºC (azul), 37ºC (rojo), and 41ºC (verde) con los anticuerpos indicados. B: ELISA de astrocitos sometidos a diferentes temperaturas, como en A. Los valores han sido expresados como media ± error estándar de la media de tres experimentos independientes. C: Análisis de extractos de proteínas astrocíticas (10 µg de proteínas) por Western blot utilizando anticuerpos que muestran los marcadores que aumentan su expresión a consecuencia de tratamiento hipertérmico. D: Análisis de extractos de proteínas astrocíticas (10 µg de proteínas) por Western blot utilizando anticuerpos que muestran los marcadores que aumentan su expresión a consecuencia de tratamiento hipertérmico.

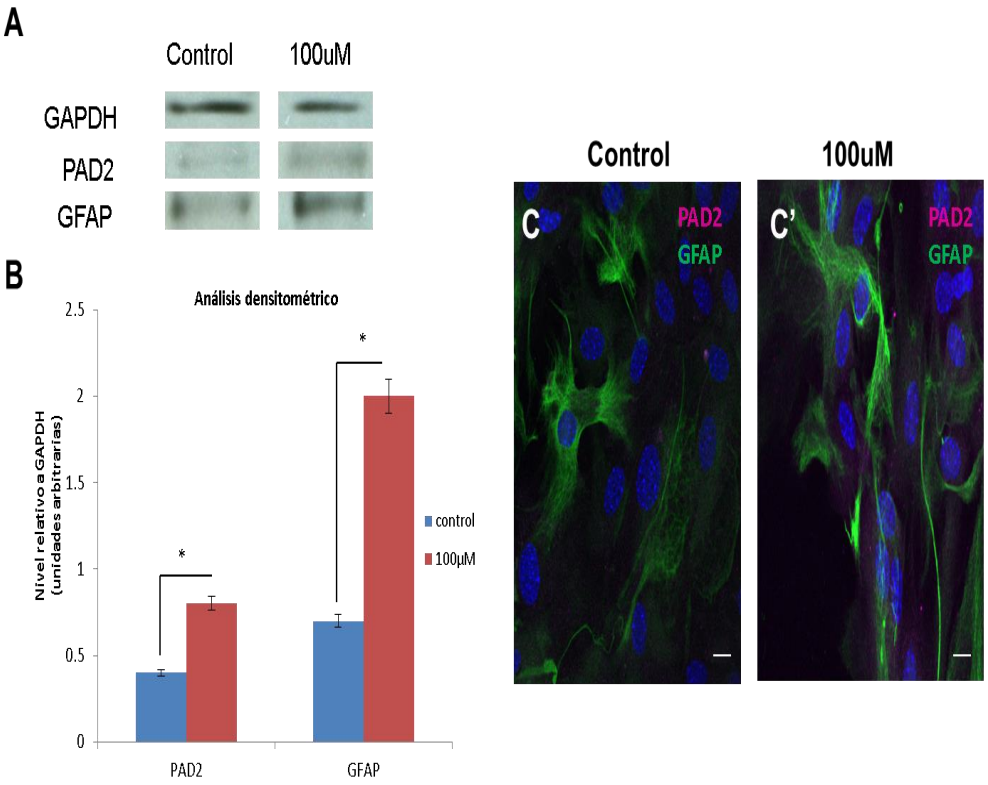


**Figura 8**. Efecto del estrés oxidativo (100 uM de H2O2) en cultivos de astrocitos. (A) Análisis de Western blot de proteínas astrocíticas (10 µg) con anticuerpos contra GFAP, PAD2 y GAPDH (control) muestran elevación de la expresión de GFAP y PAD2 después del tratamiento. (B) Cuantificación de immunoreactividad utilizando Western blot (promedio de 3 lecturas independientes normalizadas a GAPDH) utilizando ImageJ. Los valores están expresados como media ± error estándar de la media (*$p<0.05$). (C) Los astrocitos fueron evaluados también mediante immunohistoquímica para la expresión de PAD2 (Cy5) y GFAP (FITC) después de este tipo de tratamiento de estrés oxidativo. Escala=100 µm

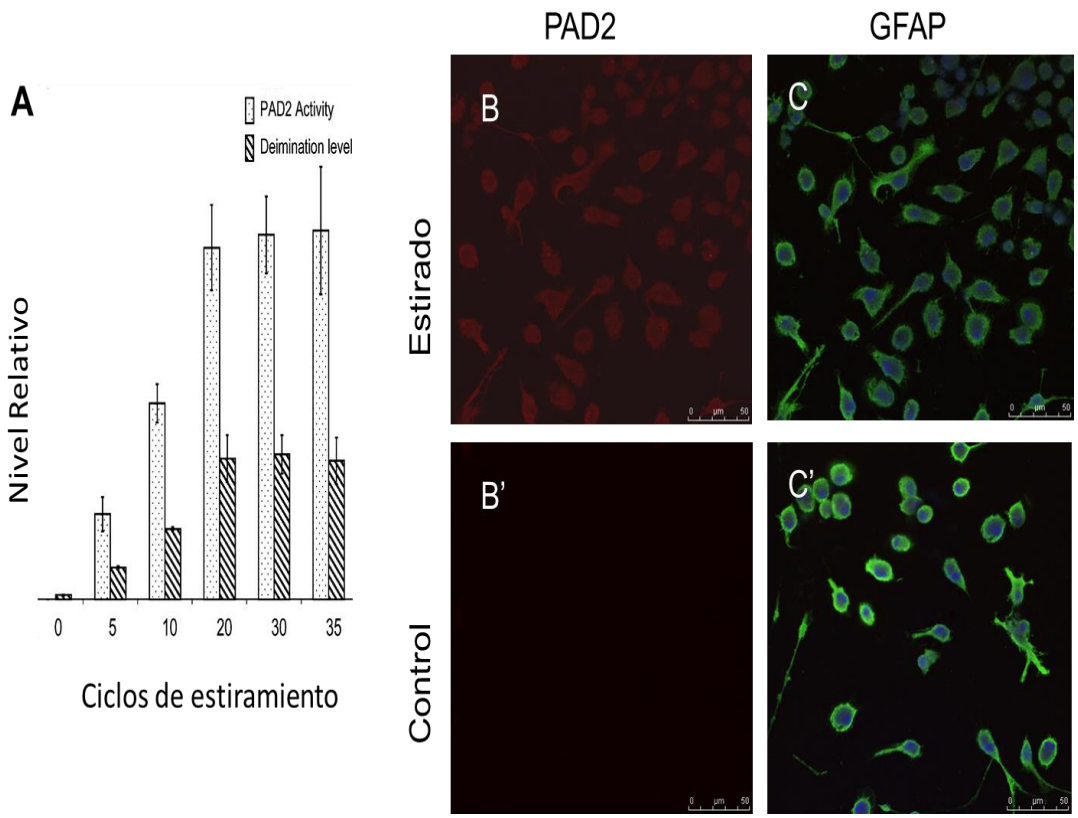


**Figura 9**. Expresión de PAD2 como respuesta a estiramiento mecánico. (A) Los astrocitos (5000 células) fueron sometidos a ciclos de estiramiento con una membrana de polietileno estirando la membrana con el número de ciclos indicados y sometidos a análisis de actividad enzimática de PAD2, y nivel de deiminación (ELISA). Actividad enzimática de PAD2 y el nivel de deiminación están representados por barras con círculos y barras con rayas diagonales, respectivamente. Los resultados muestran la desviacion standard de tres experimentos independientes. El student's t-test determino un valor p no significativo(B) Los astrocitos que fueron sometidos a estiramiento mecánico por 30 ciclos mostraron una expresión robusta de PAD2 como la inmunofluorescencia demuestra utilizando anti-PAD2 y anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594. En (C) se observa el resultado cuando las células luego del tratamiento fueron marcardas con anti-GFAP mas un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488. Las imágenes B' y C', corresponden a astrocitos controles (no sometidos a estiramiento mecánico y teñidos con anti-PAD2 y anti-GFAP respectivamente). Escala= 50 µm

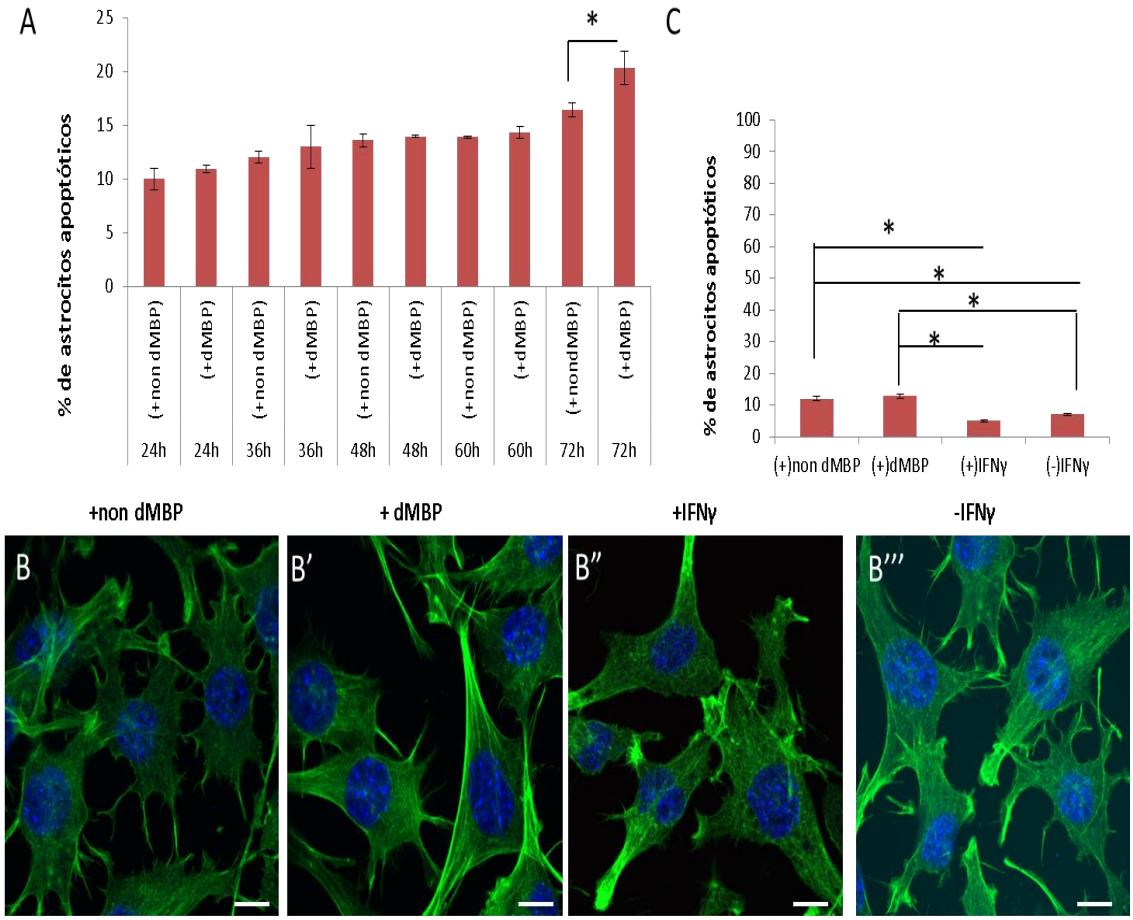


**Figura 10**. Evaluación de la viabilidad de astrocitos en cultivo después del tratamiento con péptidos. (A) Determinación de viabilidad celular con CellTiter-Blue assay. Grupos de astrocitos fueron incubados con péptidos no deiminados (+non dMBP) y deiminados (+dMBP) por un periodo de 24, 36, 48, 60 y 72 horas y su viabilidad evaluada. Los resultados expresan la media ± error estándar de la media de tres experimentos independientes (*$p<0.05$). El porcentaje de células no viables fue estimado del total de células utilizadas al inicio del cultivo. (B) Los cultivos fueron evaluados morfológicamente con GFAP después de 60 horas de tratamiento con los péptidos y con y sin IFNγ. Escala=25 µm (C) Porcentaje de células apoptóticas después del tratamiento por 60 horas, incluyendo IFNγ. Los resultados expresan la media ± el error estándar de la media de tres experimentos independientes (*$p<0.05$).

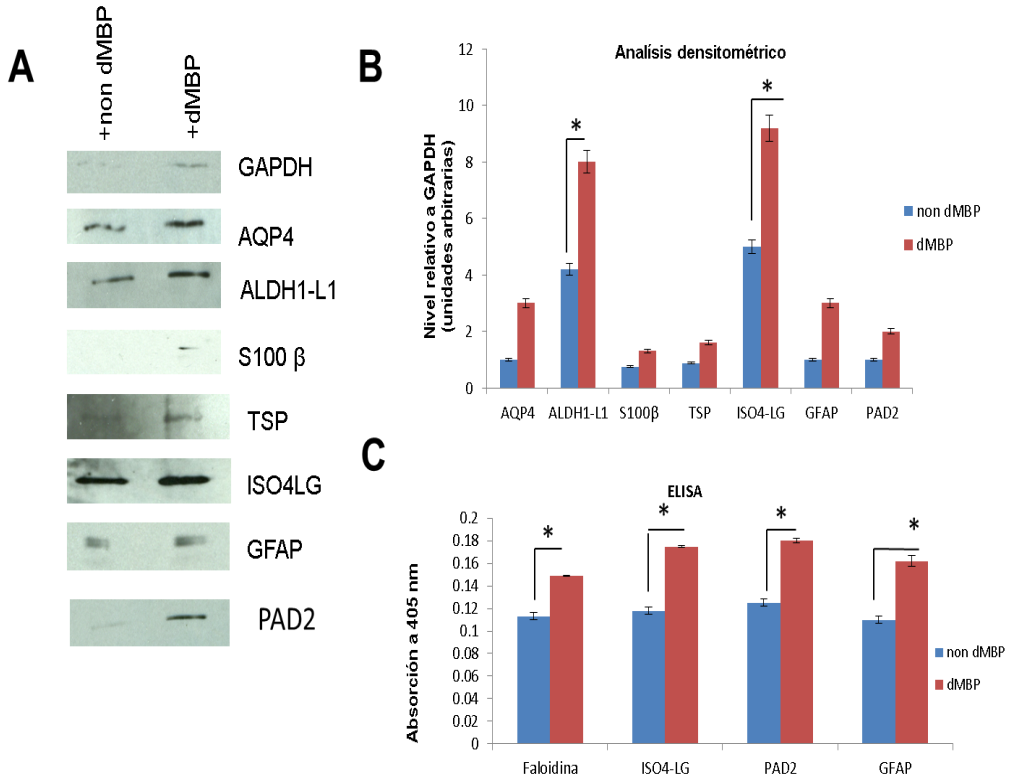


**Figura 11**. Evaluación de marcadores de activación después del tratamiento con péptidos. (A) Análisis de extracto de astrocitos (10 µg) por Western blot utilizando los anticuerpos indicados muestran sobre expresión después del tratamiento con péptidos deiminados. (B) Cuantificación de Western blot (promedio de tres lecturas) con ImageJ y normalizados utilizando GAPDH. (C) Análisis de ELISA después del tratamiento con péptidos utilizando los anticuerpos indicados. Los resultados expresan medias ± error estándar de la media de tres experimentos independientes, (*$p<0.05$).

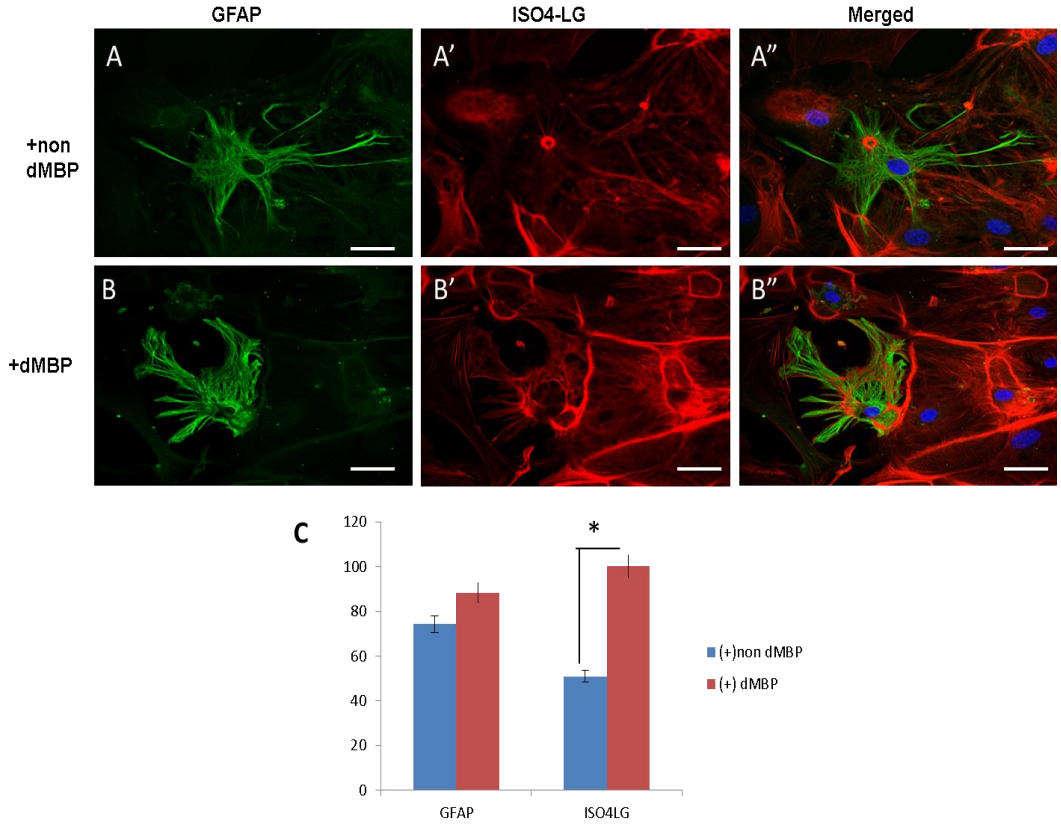


**Figura 12**. Figura representativa del efecto del tratamiento con péptidos en la morfología y modificaciones lipídicas de los cultivos de astrocitos. Los astrocitos fueron evaluados por inmunofluorescencia para la expresión de (A, B) GFAP (FITC) y (A'B') Iso[4]LG (Alexa 594) después del tratamiento con péptidos. (A", B") Imágenes combinadas de A, A' y B, B'. Escala=50 µm. (C) Cuantificación de intensidad de fluorecencia / área en imágenes de al menos 100 células utilizando Image. Los valores expresan medias ± error estándar de la media de tres experimentos independientes, (*$p<0.05$).

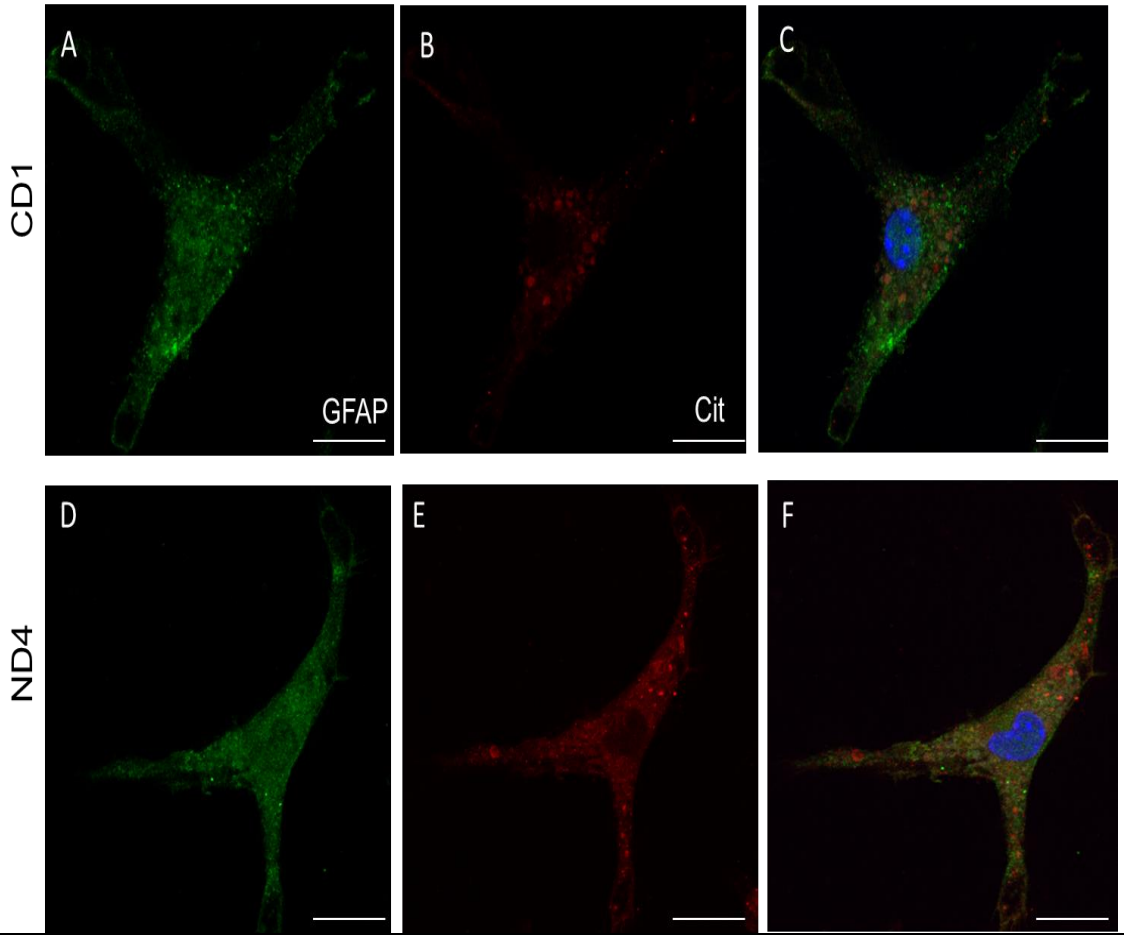


**Figura 13**. Figura representativa de elevación en el nivel de deiminación en los astrocitos del modelo animal de desmielinización ND4. Detección de deiminación utilizando anti-citrulina [Cit]) en astrocitos de ratones controles (A y B) y ratones ND4 (D y E). Los paneles C y F muestran la combinación de las imágenes de GFAP (verde) y deiminación (rojo). Escala= 20 µm.

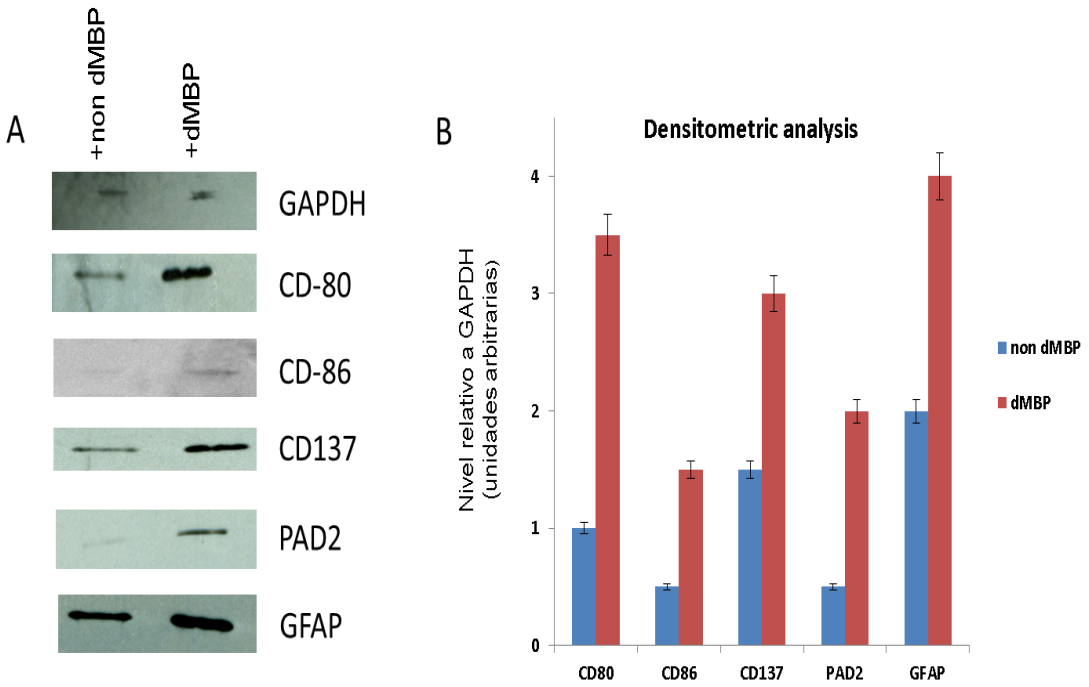


**Figura 14**. Análisis de Western blot y cuantificación de marcadores inmunológicos después del tratamiento de los cultivos de astrocitos con péptidos sintéticos. (A) Imagen representativa de un Western blot de extractos de astrocitos (10 µg de proteínas) utilizando los anticuerpos indicados muestran elevación de los marcadores evaluados después del tratamiento con péptido deiminado. (B) Cuantificación de immunoreactividad de Western blot (promedio de tres lecturas) con ImageJ con los valores normalizados a GAPDH. Los resultados expresan medias ± error estándar de la media de tres experimentos independientes, (*$p<0.05$).

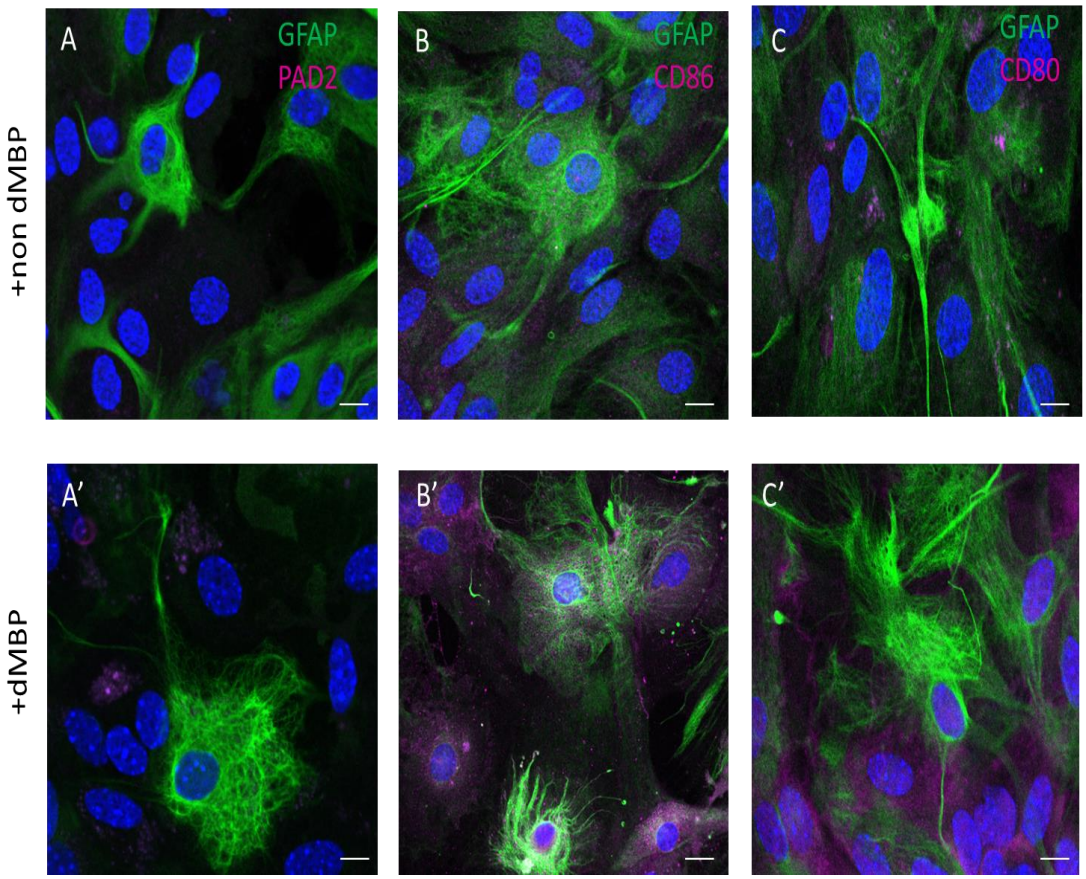


**Figura 15**. Evaluación mediante inmunofluorescencia de marcadores inmunológicos después del tratamiento de cultivos de astrocitos con péptidos sintéticos. Los astrocitos fueron evaluados para la expresión de marcadores de activación, PAD2, y GFAP. Las imágenes muestra GFAP (FITC) y doble tinción con (A,A') PAD2, (B,B') CD86 y (C,C') CD80. Escala=50 µm.

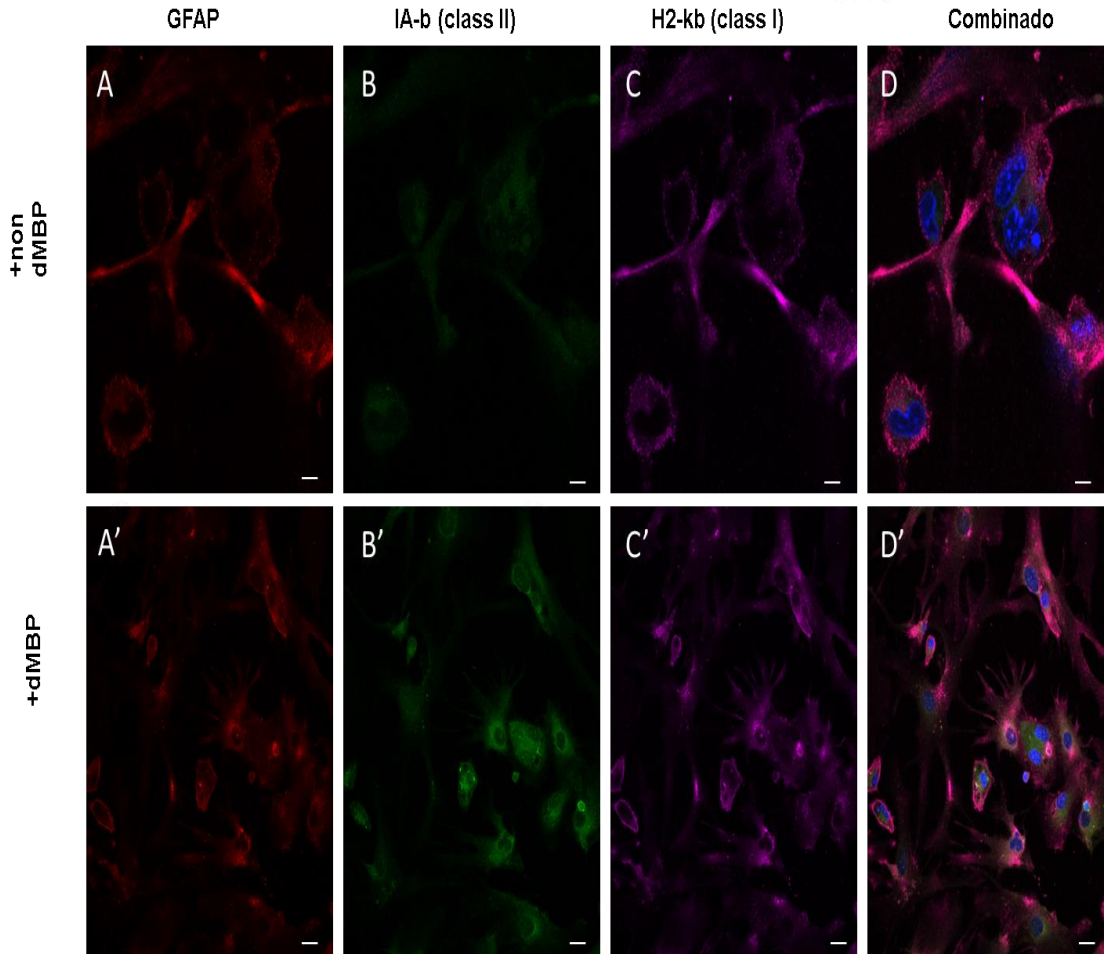


**Figura 16**. Elevación de marcador de clase MHC II después del tratamiento de astrocitos con péptido deiminado. Los astrocitos fueron evaluados por inmunofluorescencia para la expresión de distintas moléculas MHC luego de la incubación con péptidos sintéticos. Imágenes representativas se observan cuando fueron utilizados los anticuerpos indicados: (A,A') GFAP (Alexa 594), (B,B') MHC clase II (FITC), (C,C') MHC clase I (Cy5), (D,D') combinación de imágenes. (A-D) Escala=50 µm, (A'-D') Escala=150µm

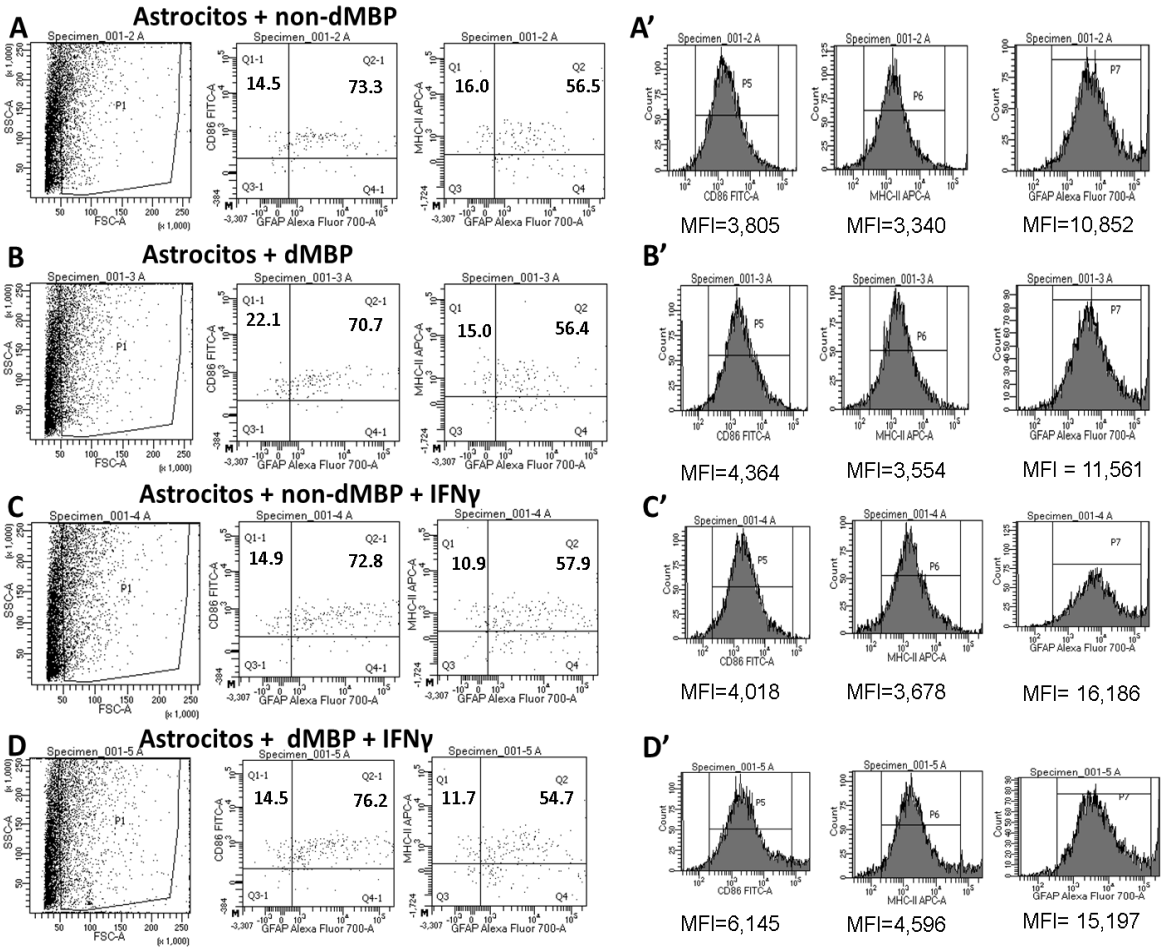


**Figura 17-** Resultados de citometría de flujo de cultivos de astrocitos y péptidos evaluando la expresión de moléculas requeridas para la presentación de antígenos. Varias condiciones de cultivo fueron utilizadas incluyendo (A) astrocitos en presencia de non-dMBP, (B) astrocitos en presencia de dMBP, (C) astrocitos en presencia de non-dMBP + IFNγ, y (D) astrocitos en presencia de dMBP + IFNγ. La mayoría de los astrocitos (>70%) expresan la molécula co-estimuladora CD86 (A-D, paneles centrales), independientemente de las condiciones de cultivo empleadas, aunque el cultivo de astrocitos en presencia de dMBP + IFNγ (D, panel del centro) demuestran un modesto incremento en el porcentaje de células positivas para CD86. Este incremento se puede apreciar con más claridad en el histograma D' (panel de la izquierda) mostrando el análisis de "intensidad media de fluorescencia (MFI)". De la misma manera, más de la mitad de los astrocitos en todas las condiciones de cultivo, expresan el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II, sin observarse un incremento notable en aquellas cultivadas en presencia de IFNγ (A-D, paneles a la derecha y A'-D', paneles centrales). Los histogramas denotan la intensidad media de fluoresencia (índice de fluorescencia por célula) de cada marcador estudiado: astrocitos (GFAP), molécula co-estimuladora (CD86) y CMH

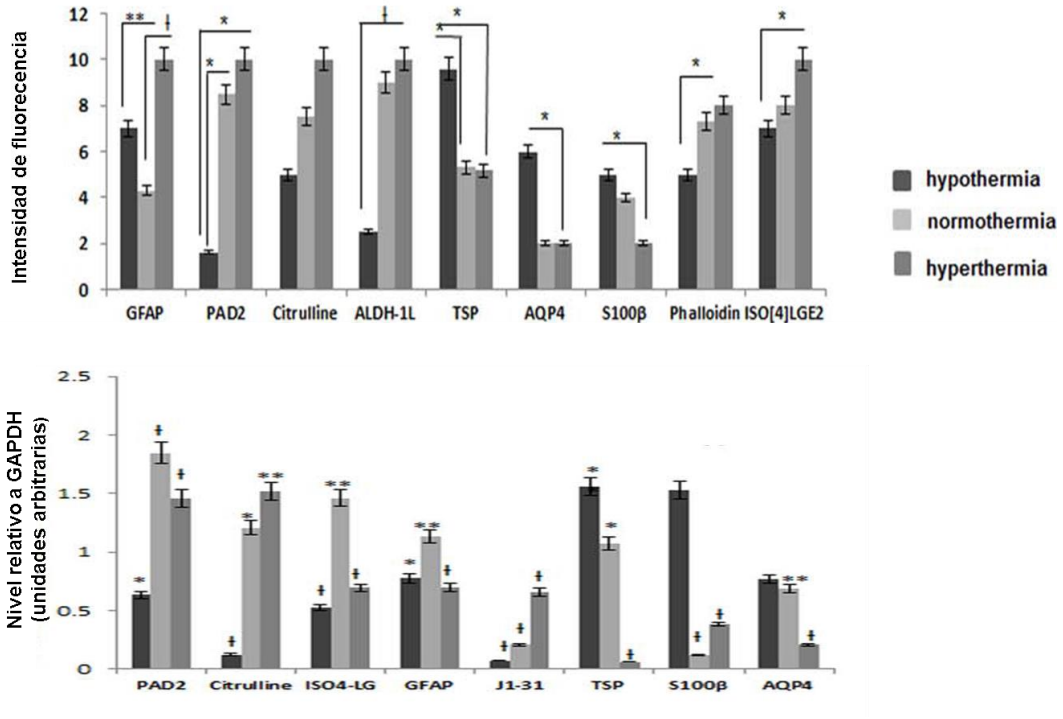


**Figura Suplementaria 1-**Cuantificacion de los resultados de inmunofluorescencia y de Western blots luego de la exposición de cultivos de astrocitos a diferentes temperaturas. (A) Intensidades de fluorescencia en imágenes determinadas por tres observadores independientes. La fluorescencia máxima fue determinada en un valor arbitrario de 10. Los datos fueron analizados con el test de ANOVA, seguido de post hoc LSD. Los valores están expresados como media ± error estándar de la media de tres experimentos independientes. *$p<0.05$, ** $p<0.005$, $^{\dagger}p<0.001$. (B) Cuantificación de immunoreactividad de análisis de Western blot utilizando Image J y normalizando con valores de GAPDH. Los datos fueron evaluados utilizando el Students t- test de dos extremos para comparar cada media con el valor de referencia de 1. Los valores son expresados como media ± error estándar de la media de tres experimentos independientes, *p<0.05, **p<0.005, $^{\dagger}$p<0.001.

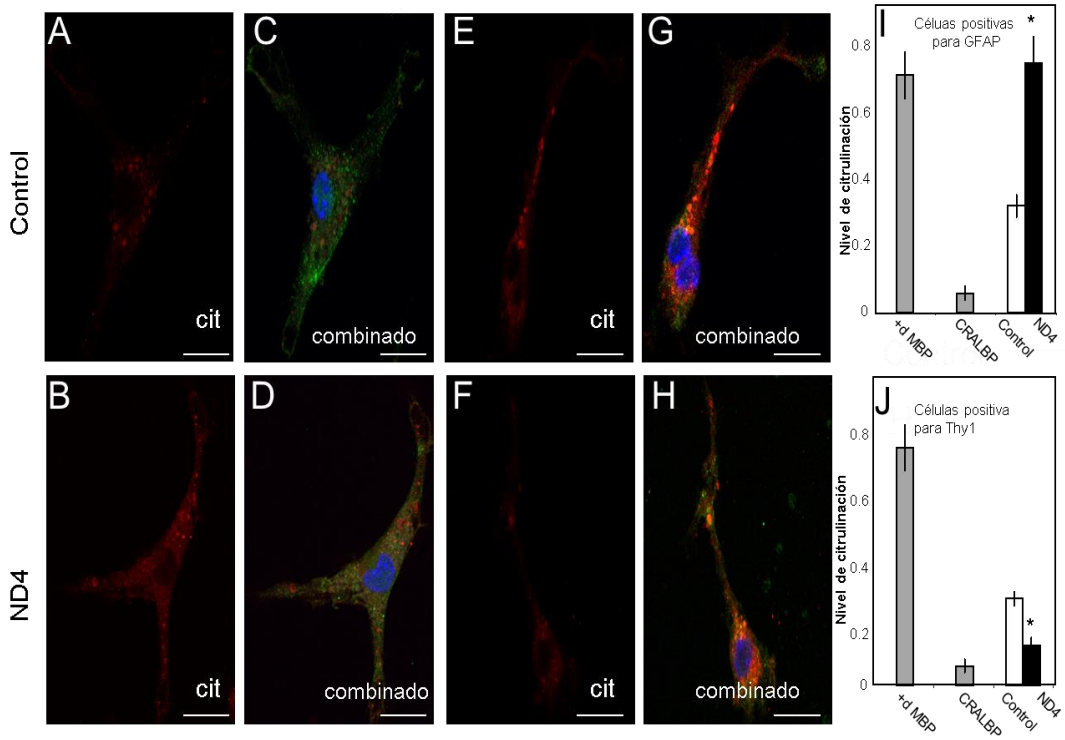


**Figura Suplementaria 2-** Elevación en el nivel de deiminación en astrocitos y disminución en neuronas en el modelo animal de desmielinización ND4. Detección de deiminación (utilizando anti-citrulina [Cit]) en astrocitos controles (**A** y **C**) y neuronas de ratones ND4 (**C** y **D**). Paneles **C** y **D** representan la combinación de imágenes de GFAP (verde) y deiminación. (**E**–**H**) Detección de deiminación (rojo) en neuronas de ratones control (**E** y **G**) y ND4 (**F** y **H**). Paneles **G** y **H** representan la combinación de imágenes de Thy1 (verde) y deiminación. Escala: 20 µm (**A**–**H**). (**I** y **J**) Análisis de ELISA con GFAP (**I**) y Thy1 (**J**) de ratones control y ND4. 10 µg de MBP deiminado y CRALBP fueron utilizados como controles positivo y negativo, respectivamente. La barra blanca muestra las células positivas para cada marcador en los controles. La barra negra muestra las celulas positivas para cada marcador en ND4. Los valores están expresados como media ± error estándar de la media de tres experimentos independientes. (*p<0.05)

## Marcadores seleccionados

| | GFAP | S100β | TSP-1 | ALDH1-L1 | AQP4 | J1-31 | ISO4-LG |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Neuronas** | + | | + | | | | + |
| **Oligodendrocitos** | + | + | | | | | + |
| **Astrocitos** | + | + | + | + | + | + | + |

Marcadores de reactividad de astrocitos- basado en revision extensiva de la literatura científica. La presencia esta indicada con un signo (+).

**Tabla 1:** Marcadores seleccionados

| Identified Proteins | Accession Number | 31°C | 37°C | 41°C |
|---|---|---|---|---|
| DEP domain-containing protein 5 | DEPD5_MOUSE | >70-99% | Less than 10% | >70-99% |
| Ankyrin repeat domain-containing protein 1 | ANKR1_MOUSE | Less than 10% | >70-99% | >70-99% |
| ATP-binding cassette sub-family A member 5 | ABCA5_MOUSE | Less than 10% | >70-99% | >70-99% |
| Nucleosome-remodeling factor subunit BPTF | BPTF_MOUSE | Less than 10% | >70-99% | Less than 10% |
| WD repeat-containing protein 19 | WDR19_MOUSE | >70-99% | Less than 10% | Less than 10% |
| Dynein heavy chain 10, axonemal | DYH10_MOUSE | Less than 10% | >70-99% | Less than 10% |
| Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34 | UBP34_MOUSE | Less than 10% | Less than 10% | >70-99% |
| Serine/threonine-protein kinase SMG1 | SMG1_MOUSE | >70-99% | Less than 10% | Less than 10% |
| Small subunit processome component 20 homolog | UTP20_MOUSE | Less than 10% | >70-99% | Less than 10% |
| Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial | DHSA_MOUSE | Less than 10% | Less than 10% | >70-99% |
| Putative DNA helicase INO80 complex homolog 1 | INO80_MOUSE | Less than 10% | >70-99% | Less than 10% |
| CLIP-associating protein 1 | CLAP1_MOUSE | >70-99% | Less than 10% | Less than 10% |
| Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14 | GLT14_MOUSE | >70-99% | Less than 10% | Less than 10% |
| Regulator of G-protein signaling 12 | RGS12_MOUSE | Less than 10% | Less than 10% | >70-99% |
| DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA49 | RPA49_MOUSE | Less than 10% | >70-99% | >70-99% |
| Beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase | GCNT1_MOUSE | >70-99% | Less than 10% | Less than 10% |
| E3 UFM1-protein ligase 1 | UFL1_MOUSE | Less than 10% | Less than 10% | >70-99% |

>70-99% 50-70% Less than 10%

**Tabla 2**: Proteinas identificadas por analisis de espectroscopia de masas despues de tratamiento de temperatura

| | |
|---|---|
| | 122 |
| MBP humana: | SWGAEGWRPGFGYGG |
| MBP bovina: | SWGAEGWKPGFGYGG |
| MBP de ratón: | SWGAEGQKPGFGYGG |
| MBP sintética (non dMBP): | SWGAEGQRPGFGYGG |
| MBP sintética (dMBP): | SWGAEGQ(CIT)PGFGYGG |

**Tabla 3**: **Homologia de fragmento de MBP**

| Protein name | Accession | Function | Unique peptides | Peptide sequence |
|---|---|---|---|---|
| **Selected proteins from (-) dMBP treatment** | | | | |
| Desmocollin-2 | D6RDD6 | Calcium binding | 1 | PGTGSSGAWDEAIQNPGRGL |
| CDC25b | Q9DBN8 | Transcription initiation | 1 | GPTLAPEQTRRVTRNSSTQTVSDKSTQTVL |
| Vimentin* | P20152 | Astrocyte development | 2 | GSALRPSTSRSLY, STRSVSSSSYRRMF |
| Protein Gm5435 | J3QNT2 | Protein kinase binding,+ regulator of cell cycle | 1 | SANTNTVPKL |
| Endonuclease 8-like 1 | Q8K4Q6 | DNA damage repair | 2 | CFVDIRRFGHW, ERFRENVL |
| Myomesin-1 | Q62234 | Cytoskeleton constituent | 1 | SSPPQEAAPEEEQSQSEPPKKKKDPVAVPSAPYDITCL |
| Dynein heavy chain 8 | Q91XQ0 | Microtubule motor activity | 2 | DTVTIHNEVLRQTKEEIITPPAEGVYIY, QSAVDNQVNL |
| Protein Dnhd1 | D3Z2X2 | Microtubule motor activity | 1 | KAQQEVFLEQMGKAF |
| **Selected proteins from (+) dMBP treatment** | | | | |
| Neuropeptide-like protein C4 | Q3UR78 | Signaling peptide, brain development | 1 | GARAEPATGSAVPAQSRPCVDCHAFEFMQRAL |
| Histone H4 | Q6BB22 | Regulation of transcription | 1 | LENVIRDAVTY |
| Interleukin-18 | A0PJ18 | Cytokine activity, inflammation, immune respons | 1 | KKKDENGDKSVMFTL |
| Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* | P16858 | Cytoskeleton organization, metabolism | 2 | RVPTPNVSVVD, GRIGRLVTRAAICSGKVEIVAINDPF |
| 40S ribosomal protein S16* | P14131 | RNA binding | 1 | PSKGPLQSVQVF |
| Connexin-43* | P08050 | Gap junction communication | 1 | SAEQNRMGQAGSTISNSHAQPF |
| Glial fibrillary acidic protein* | P47819 | Cytoskeleton constituent, astrocyte development | 1 | ASSETMVRGHGPTRHLGTIPRLSL |
| Synaptopodin* | Q8CC35 | Actin binding, involved in synaptic plasticity | 7 | SEVHLTLAKPASVVNRTARPF, HGYLPENGVLRPEPTKQQPY |
| Vimentin* | P20152 | Cytoskeleton constituent, astrocyte development | 3 | RRMFGGSGTSSRPSSNRSYVTTSTRTY, ESVAAKNLQEAEEW, GGSGTSSRPSSNRSY |
| Excitatory amino acid transporter 1* | P56564 | Neurotransmitter transport | 2 | QLIAQDNEPEKPVADSETKM, KNRDVEMGNSVIEENEMKKPY |
| Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency | B2RUC3 | DNA repair | 1 | PPESKCNSSRLSSDDETEGGQNPAPKACSTVHVPAEAMSNL |
| **Selected proteins from (+) IFNγ treatment** | | | | |
| Pleckstrin homology domain-containing family G member 2 | D3Z1B1 | Apoptosis, negative regulator of proliferation | 1 | GCGHQGEVCDCAAVSDTPTAAQAATTMASPRGSGSSTSLSTVGSEG |
| Mucin | A0A087WSP1 | Apoptosis, negative regulator of proliferation | 1 | CNCTMAICNHDNVVEIVPLKCDPPPMPTCANGLKPVRVPDADNCCW |
| Pro-interleukin-16 | O54824 | Stimulates migratory response in CD4+ Tcells | 1 | QEDTAGRAPCTAACCPGPAASTQTSSSTEGESRRSASPETPASPGKHPL |
| Transcription termination factor 1 | Q62187 | terminates ribosomal gene transcription | 1 | SIVREKLY |
| Vimentin* | P20152 | Astrocyte development | 1 | GSALRPSTSRSLY |
| Interleukin-1 receptor-associated kinase-1b | Q8K4N8 | kinase activity | 1 | TPGSHPSPASFREASCTQGGTTRESSVRSSPGFQPTTMEGSPTGSSSL, |
| Troponin T | A2A6H6 | skeletal muscle contraction | 1 | MSDEETEQVEEQYEEEEEAQEEEVQEEEEVQEEEKPRPKL |
| RNA polymerase II subunit A C-terminal domain phosphatase* | Q7TSG2 | cell division, exit from mitosis | 1 | SSDSESSESSSSRSEGQRAPAPQERTKAAPEHSGPQDTSGGRAAASPL |
| G-protein coupled receptor-associated sorting protein 2* | Q8BUY8 | G-coupled receptor binding | 1 | PRPRAREETSNESADENSTMSSFWTREETSIRSW |
| **Selected proteins from (-) IFNγ treatment** | | | | |
| Histone H4 | P62806 | | 1 | LENVIRDAVTY, KRQGRTLYGF |
| Vimentin* | P20152 | Cytoskeleton constituent, astrocyte development | 5 | GSALRPSTSRSL, RRMFGGSGTSSRPSSNRSY, GSALRPSTSRSLY, |
| 40S ribosomal protein S16* | P14131 | RNA binding | 1 | PSKGPLQSVQVF |
| Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* | P04797 | Cytoskeleton organization, metabolism | 2 | SRIVNGEDAIPGSWPW, ARVTALMPW, GKTKYNALKTPDKL |
| Tubulin beta-2A* | Q7TMM9 | Major constituent of microtubules, gap junction | 3 | RALTVPELTQQMF, SVMPSPKVSDTVVEPY |
| Sideroflexin-1* | Q63965 | Iron transport | 2 | RQGIVPAGLTENELW |
| Excitatory amino acid transporter 1 | P56564 | Neurotransmitter transport | 1 | QLIAQDNEPEKPVADSETKM |
| Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | P16858 | Cytoskeleton organization, metabolism | 1 | RVPTPNVSVVDL |
| Tubulin alpha-1C chain | P68373 | Major constituent of microtubules, gap junction | 1 | VDLEPTVIDEVRTGTY |

**Tabla 4: Proteinas identificadas por espectroscopia de masas despues de tratamiento con péptidos sintéticos**

## References

Ahmed F, Torrado M, Johnson E, Morrison J, Tomarev SI (2001) Changes in mRNA levels of the Myoc/Tigr gene in the rat eye after experimental elevation of intraocular pressure or optic nerve transection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42:** 3165-3172

Algeciras ME, Bhattacharya SK (2007) Targeting optic nerve citrullination in glaucoma: a role for protein-arginine deiminase 2 (PAD2) inhibitors. *Drugs of the Future* **32:** 999-1006.

Algeciras ME, Takahara H, Bhattacharya SK (2008) Mechanical stretching elevates peptidyl arginine deiminase 2 expression in astrocytes. *Curr Eye Res* **33:** 994-1001

Allen NJ, Barres BA (2009) Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* **457:** 675-677

Allis CD, Herr JC, Coonrod S, Wang Y. (2006) Epad, an oocyte specific protein. In USPTO (ed.). University of Virginia Patent Foundation, USA.

Almad AA, Doreswamy A, Gross SK, Richard JP, Huo Y, Haughey N, Maragakis NJ (2016) Connexin 43 in astrocytes contributes to motor neuron toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* **64:** 1154-1169

Ambree O, Bergink V, Grosse L, Alferink J, Drexhage HA, Rothermundt M, Arolt V, Birkenhager TK (2015) S100B Serum Levels Predict Treatment Response in Patients with Melancholic Depression. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* **19**

Asaga H, Akiyama K, Ohsawa T, Ishigami A (2002) Increased and type II-specific expression of peptidylarginine deiminase in activated microglia but not hyperplastic astrocytes following kainic acid-evoked neurodegeneration in the rat brain. *Neurosci Lett* **326:** 129-132

Asaga H, Ishigami A (2001) Protein deimination in the rat brain after kainate administration: citrulline-containing proteins as a novel marker of neurodegeneration. *Neurosci Lett* **299:** 5-8

Asaga H, Ishigami A (2007) Microglial expression of peptidylarginine deiminase 2 in the prenatal rat brain. *Cell Mol Biol Lett* **12:** 536-544

Balestrini JL, Billiar KL (2006) Equibiaxial cyclic stretch stimulates fibroblasts to rapidly remodel fibrin. *J Biomech* **39:** 2983-2990

Barnstable CJ, Tombran-Tink J (2006) Molecular mechanisms of neuroprotection in the eye. *Adv Exp Med Biol* **572:** 291-295

Bartley W, Van Heyningen R, Notton BM, Renshaw A (1962) Fatty acid composition of lipids present in different parts of the ox eye. *Biochem J* **85:** 332-335

Bates IR, Libich DS, Wood DD, Moscarello MA, Harauz G (2002) An Arg/Lys-->Gln mutant of recombinant murine myelin basic protein as a mimic of the deiminated form implicated in multiple sclerosis. *Protein Expr Purif* **25:** 330-341

Bazan NG (2005) Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress. *Brain Pathol* **15:** 159-166

Bellezza AJ, Rintalan CJ, Thompson HW, Downs JC, Hart RT, Burgoyne CF (2003) Anterior scleral canal geometry in pressurised (IOP 10) and non-pressurised (IOP 0) normal monkey eyes. *Br J Ophthalmol* **87:** 1284-1290

Belogurov AA, Jr., Kurkova IN, Friboulet A, Thomas D, Misikov VK, Zakharova MY, Suchkov SV, Kotov SV, Alehin AI, Avalle B, Souslova EA, Morse HC, 3rd, Gabibov AG, Ponomarenko NA (2008) Recognition and degradation of myelin basic protein peptides by serum autoantibodies: novel biomarker for multiple sclerosis. *J Immunol* **180:** 1258-1267

Berger JR, Sheremata W (1982) The hot bath test and multiple sclerosis. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **247:** 979

Bhattacharya SK, Bhat MB, Takahara H (2006a) Modulation of peptidyl arginine deiminase 2 and implication for neurodegeneration. *Curr Eye Res* **31:** 1063-1071

Bhattacharya SK, Crabb JS, Bonilha VL, Gu X, Takahara H, Crabb JW (2006b) Proteomics implicates peptidyl arginine deiminase 2 and optic nerve citrullination in glaucoma pathogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47:** 2508-2514

Bhattacharya SK, Crabb JW. (2006) Compositions and methods for inhibiting optic nerve damage. In USPTO (ed.), USA, Vol. 60/773,359, pp. 1-68.

Boesmans W, Rocha NP, Reis HJ, Holt M, Vanden Berghe P (2014) The astrocyte marker Aldh1L1 does not reliably label enteric glial cells. *Neuroscience letters* **566:** 102-105

Boggs JM, Yip PM, Rangaraj G, Jo E (1997) Effect of posttranslational modifications to myelin basic protein on its ability to aggregate acidic lipid vesicles. *Biochemistry* **36:** 5065-5071

Boulay AC, Mazeraud A, Cisternino S, Saubamea B, Mailly P, Jourdren L, Blugeon C, Mignon V, Smirnova M, Cavallo A, Ezan P, Ave P, Dingli F, Loew D, Vieira P, Chretien F, Cohen-Salmon M (2015) Immune quiescence of the brain is set by astroglial connexin 43. *J Neurosci* **35:** 4427-4439

Boutaud O, Ou JJ, Chaurand P, Caprioli RM, Montine TJ, Oates JA (2002) Prostaglandin H2 (PGH2) accelerates formation of amyloid beta1-42 oligomers. *J Neurochem* **82:** 1003-1006

Bradford CM, Ramos I, Cross AK, Haddock G, McQuaid S, Nicholas AP, Woodroofe MN (2014) Localisation of citrullinated proteins in normal appearing white matter and lesions in the central nervous system in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **273:** 85-95

Burza MA, Motta BM, Mancina RM, Pingitore P, Pirazzi C, Lepore SM, Spagnuolo R, Doldo P, Russo C, Lazzaro V, Fischer J, Berg T, Aghemo A, Cheroni C, De Francesco R, Fargion S, Colombo M, Datz C, Stickel F, Valenti L, Romeo S (2016) DEPDC5 variants increase fibrosis progression in Europeans with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* **63:** 418-427

Cafaro TA, Santo S, Robles LA, Crim N, Urrets-Zavalia JA, Serra HM (2010) Peptidylarginine deiminase type 2 is over expressed in the glaucomatous optic nerve. *Mol Vis* **16:** 1654-1658

Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Thompson WJ, Barres BA (2008) A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* **28:** 264-278

Calabrese V, Guagliano E, Sapienza M, Mancuso C, Butterfield DA, Stella AM (2006) Redox regulation of cellular stress response in neurodegenerative disorders. *The Italian journal of biochemistry* **55:** 263-282

Calvo JL, Carbonell AL, Boya J (1990) Coexpression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in astrocytes of the adult rat optic nerve. *Brain Res* **532:** 355-357

Calvo JL, Carbonell AL, Boya J (1991) Co-expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in reactive astrocytes following brain injury in rats. *Brain Res* **566:** 333-336

Cao L, Goodin R, Wood D, Moscarello MA, Whitaker JN (1999) Rapid release and unusual stability of immunodominant peptide 45-89 from citrullinated myelin basic protein. *Biochemistry* **38:** 6157-6163

Challita-Eid PM, Raitano AB, Faris M, Hubert RS, Morrison KJM, Morrison RK, Ge W, Jakobovits A. (2006) Nucleic acid and corresponding protein entitled 184P1E2 useful in treatment and detection of cancer. In USPTO (ed.). Agensys, Inc. (Santa Monica, CA) USA, Vol. 7,135,549.

Chou SM, Wang HS, Taniguchi A (1996) Role of SOD-1 and nitric oxide/cyclic GMP cascade on neurofilament aggregation in ALS/MND. *J Neurol Sci* **139 Suppl:** 16-26

Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mullowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, Bornstein P, Barres BA (2005) Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* **120:** 421-433

Clark AF (2012) The cell and molecular biology of glaucoma: biomechanical factors in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53:** 2473-2475

Constantinescu CS, Frei K, Wysocka M, Trinchieri G, Malipiero U, Rostami A, Fontana A (1996) Astrocytes and microglia produce interleukin-12 p40. *Ann N Y Acad Sci* **795:** 328-333

Constantinescu CS, Tani M, Ransohoff RM, Wysocka M, Hilliard B, Fujioka T, Murphy S, Tighe PJ, Das Sarma J, Trinchieri G, Rostami A (2005) Astrocytes as antigen-presenting cells: expression of IL-12/IL-23. *J Neurochem* **95:** 331-340

Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ, Kouzarides T (2004) Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118:** 545-553

D'Souza CA, Wood DD, She YM, Moscarello MA (2005) Autocatalytic cleavage of myelin basic protein: an alternative to molecular mimicry. *Biochemistry* **44:** 12905-12913

Das SK, Steen ME, McCullough MS, Bhattacharyya DK (1978) Composition of lipids of bovine optic nerve. *Lipids* **13:** 679-684

Denman RB (2005) PAD: the smoking gun behind arginine methylation signaling? *Bioessays* **27:** 242-246

Duncan AJ, Heales SJ (2005) Nitric oxide and neurological disorders. *Mol Aspects Med* **26:** 67-96

Eide PK, Eidsvaag VA, Nagelhus EA, Hansson HA (2016) Cortical astrogliosis and increased perivascular aquaporin-4 in idiopathic intracranial hypertension. *Brain Res*

Emerit J, Edeas M, Bricaire F (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother* **58:** 39-46

Enriquez-Algeciras M, Ding D, Chou TH, Wang J, Padgett KR, Porciatti V, Bhattacharya SK (2011) Evaluation of a transgenic mouse model of multiple sclerosis with noninvasive methods. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52:** 2405-2411

Enriquez-Algeciras M, Ding D, Mastronardi FG, Marc RE, Porciatti V, Bhattacharya SK (2013) Deimination restores inner retinal visual function in murine demyelinating disease. *J Clin Invest* **123:** 646-656

Eroglu C, Allen NJ, Susman MW, O'Rourke NA, Park CY, Ozkan E, Chakraborty C, Mulinyawe SB, Annis DS, Huberman AD, Green EM, Lawler J, Dolmetsch R, Garcia KC, Smith SJ, Luo ZD, Rosenthal A, Mosher DF, Barres BA (2009) Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell* **139:** 380-392

Ferrer I, Blanco R (2000) N-myc and c-myc expression in Alzheimer disease, Huntington disease and Parkinson disease. *Brain Res Mol Brain Res* **77:** 270-276

Finkel T (2003) Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* **15:** 247-254

Fitch MT, Silver J (1997) Glial cell extracellular matrix: boundaries for axon growth in development and regeneration. *Cell Tissue Res* **290:** 379-384

Fontana A, Erb P, Pircher H, Zinkernagel R, Weber E, Fierz W (1986) Astrocytes as antigen-presenting cells. Part II: Unlike H-2K-dependent cytotoxic T cells, H-2Ia-restricted T cells are only stimulated in the presence of interferon-gamma. *J Neuroimmunol* **12:** 15-28

Foo LC, Dougherty JD (2013) Aldh1L1 is expressed by postnatal neural stem cells in vivo. *Glia* **61:** 1533-1541

Frei K, Siepl C, Groscurth P, Bodmer S, Schwerdel C, Fontana A (1987) Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells. *European journal of immunology* **17:** 1271-1278

Frohman EM, Eagar T, Monson N, Stuve O, Karandikar N (2008) Immunologic mechanisms of multiple sclerosis. *Neuroimaging Clin N Am* **18:** 577-588, ix

Gallo V, Armstrong RC (2008) Myelin repair strategies: a cellular view. *Curr Opin Neurol* **21:** 278-283

Garcia DM, Weigum SE, Koke JR (2003) GFAP and nuclear lamins share an epitope recognized by monoclonal antibody J1-31. *Brain Res* **976:** 9-21

Gong H, Zolzer F, von Recklinghausen G, Rossler J, Breit S, Havers W, Fotsis T, Schweigerer L (1999) Arginine deiminase inhibits cell proliferation by arresting cell cycle and inducing apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **261:** 10-14

Govindarajan B, Junk A, Algeciras M, Salomon RG, Bhattacharya SK (2009) Increased isolevuglandin-modified proteins in glaucomatous astrocytes. *Mol Vis* **15:** 1079-1091

Govindarajan B, Laird J, Salomon RG, Bhattacharya SK (2008a) Isolevuglandin-modified proteins, including elevated levels of inactive calpain-1, accumulate in glaucomatous trabecular meshwork. *Biochemistry* **47:** 817-825

Govindarajan B, Laird J, Sherman R, Salomon RG, Bhattacharya SK (2008b) Neuroprotection in glaucoma using calpain-1 inhibitors: regional differences in calpain-1 activity in the trabecular meshwork, optic nerve and implications for therapeutics. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **7:** 295-304

Grant JE, Hu J, Liu T, Jain MR, Elkabes S, Li H (2007) Post-translational modifications in the rat lumbar spinal cord in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Proteome Res* **6:** 2786-2791

Greco A, Minghetti L, Levi G (2000) Isoprostanes, novel markers of oxidative injury, help understanding the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res* **25:** 1357-1364

Gregorios JB, Mozes LW, Norenberg MD (1985) Morphologic effects of ammonia on primary astrocyte cultures. II. Electron microscopic studies. *J Neuropathol Exp Neurol* **44:** 404-414

Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White CL, 3rd, Araoz C (1989) Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86:** 7611-7615

Gruol DL, Nelson TE (1997) Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. *Molecular neurobiology* **15:** 307-339

Gurdjian ES, Lissner HR, Hodgson VR, Patrick LM (1964) Mechanism of head injury. *Clin Neurosurg* **12:** 112-128

Guthrie TC, Nelson DA (1995) Influence of temperature changes on multiple sclerosis: critical review of mechanisms and research potential. *J Neurol Sci* **129:** 1-8

Harauz G, Boggs JM (2013) Myelin management by the 18.5-kDa and 21.5-kDa classic myelin basic protein isoforms. *J Neurochem* **125:** 334-361

Hausmann ON (2003) Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord* **41:** 369-378

Hernandez MR (2000) The optic nerve head in glaucoma: role of astrocytes in tissue remodeling. *Prog Retin Eye Res* **19:** 297-321

Hernandez MR, Miao H, Lukas T (2008) Astrocytes in glaucomatous optic neuropathy. *Prog Brain Res* **173:** 353-373

Herr JC, Coonrod SA, Wright P. (2005) Egg specific surface proteins. In USPTO (ed.). University of Virginia Patent Foundation (Charlottesville, VA), USA Vol. 6962988.

Hol EM, Pekny M (2015) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol* **32:** 121-130

Hollows FC, Graham PA (1966) Intra-ocular pressure, glaucoma, and glaucoma suspects in a defined population. *Br J Ophthalmol* **50:** 570-586

Hunter WL. (2002) Method for treating multiple sclerosis In USPTO (ed.). Angiotech Pharmaceuticals, Inc., USA, Vol. 6495579.

Hunter WL. (2003) Composition and methods of paclitaxel for treating psoriasis. In USPTO (ed.). Angiotech Pharmaceuticals, Inc. (Vancouver, CA) USA, Vol. 6,515,016.

Hyslop PA, Zhang Z, Pearson DV, Phebus LA (1995) Measurement of striatal H2O2 by microdialysis following global forebrain ischemia and reperfusion in the rat: correlation with the cytotoxic potential of H2O2 in vitro. *Brain Res* **671:** 181-186

Ikenaka Y, Yajima K, Yahara H, Maruyama H, Matsumoto K, Okada K, Ueshima S, Matsuo O (1992) Characterization of human tissue-type plasminogen activator variants with amino acid mutations in the kringle 1 domain. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* **3:** 381-387

Ishida-Yamamoto A, Senshu T, Takahashi H, Akiyama K, Nomura K, Iizuka H (2000) Decreased deiminated keratin K1 in psoriatic hyperproliferative epidermis. *J Invest Dermatol* **114:** 701-705

Ishigami A, Ohsawa T, Hiratsuka M, Taguchi H, Kobayashi S, Saito Y, Murayama S, Asaga H, Toda T, Kimura N, Maruyama N (2005) Abnormal accumulation of citrullinated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* **80:** 120-128

Jang B, Ishigami A, Maruyama N, Carp RI, Kim YS, Choi EK (2013) Peptidylarginine deiminase and protein citrullination in prion diseases: strong evidence of neurodegeneration. *Prion* **7:** 42-46

Joachim SC, Reichelt J, Berneiser S, Pfeiffer N, Grus FH (2008) Sera of glaucoma patients show autoantibodies against myelin basic protein and complex autoantibody profiles against human optic nerve antigens. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **246:** 573-580

Kawasaki A, Hayashi T, Nakachi K, Trosko JE, Sugihara K, Kotake Y, Ohta S (2009) Modulation of connexin 43 in rotenone-induced model of Parkinson's disease. *Neuroscience* **160:** 61-68

Kearney PL, Bhatia M, Jones NG, Yuan L, Glascock MC, Catchings KL, Yamada M, Thompson PR (2005) Kinetic characterization of protein arginine deiminase 4: a transcriptional corepressor implicated in the onset and progression of rheumatoid arthritis. *Biochemistry* **44:** 10570-10582

Keilhoff G, Prell T, Langnaese K, Mawrin C, Simon M, Fansa H, Nicholas AP (2008) Expression pattern of peptidylarginine deiminase in rat and human Schwann cells. *Dev Neurobiol* **68:** 101-114

Kim JK, Mastronardi FG, Wood DD, Lubman DM, Zand R, Moscarello MA (2003) Multiple sclerosis: an important role for post-translational modifications of myelin basic protein in pathogenesis. *Mol Cell Proteomics* **2:** 453-462

Kim WS, Halliday GM (2012) Changes in sphingomyelin level affect alpha-synuclein and ABCA5 expression. *Journal of Parkinson's disease* **2:** 41-46

Kiray H, Lindsay SL, Hosseinzadeh S, Barnett SC (2016) The multifaceted role of astrocytes in regulating myelination. *Exp Neurol*

Koike H, Sase K, Uchida H, Sudo T, Shiraiwa M, Sugawara K, Takahara H (1994) Production and epitope specificity of monoclonal antibody against mouse peptidylarginine deiminase type II. *Biosci Biotechnol Biochem* **58:** 2286-2287

Krupenko SA (2009) FDH: an aldehyde dehydrogenase fusion enzyme in folate metabolism. *Chemico-biological interactions* **178:** 84-93

Kunze A, Congreso MR, Hartmann C, Wallraff-Beck A, Huttmann K, Bedner P, Requardt R, Seifert G, Redecker C, Willecke K, Hofmann A, Pfeifer A, Theis M, Steinhauser C (2009) Connexin expression by radial glia-like cells is required for neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106:** 11336-11341

Lazarus RC, Buonora JE, Flora MN, Freedy JG, Holstein GR, Martinelli GP, Jacobowitz DM, Mueller GP (2015) Protein Citrullination: A Proposed Mechanism for Pathology in Traumatic Brain Injury. *Frontiers in neurology* **6:** 204

Li Y, Li D, Ying X, Khaw PT, Raisman G (2015) An energy theory of glaucoma. *Glia* **63:** 1537-1552

Liao YF, Hsieh HC, Liu GY, Hung HC (2005) A continuous spectrophotometric assay method for peptidylarginine deiminase type 4 activity. *Anal Biochem* **347:** 176-181

Liauw J, Hoang S, Choi M, Eroglu C, Choi M, Sun GH, Percy M, Wildman-Tobriner B, Bliss T, Guzman RG, Barres BA, Steinberg GK (2008) Thrombospondins 1 and 2 are necessary for synaptic plasticity and functional recovery after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* **28:** 1722-1732

Libbey JE, McCoy LL, Fujinami RS (2007) Molecular mimicry in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* **79:** 127-147

Liem RK, Messing A (2009) Dysfunctions of neuronal and glial intermediate filaments in disease. *J Clin Invest* **119:** 1814-1824

Liu B, Neufeld AH (2001) Nitric oxide synthase-2 in human optic nerve head astrocytes induced by elevated pressure in vitro. *Arch Ophthalmol* **119:** 240-245

Louw C, Gordon A, Johnston N, Mollatt C, Bradley G, Whiteley CG (2007) Arginine deiminases: therapeutic tools in the etiology and pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Enzyme Inhib Med Chem* **22:** 121-126

Malhotra SK, Bhatnagar R, Shnitka TK, Herrera JJ, Koke JR, Singh MV (1995) Rat glioma cell line as a model for astrogliosis. *Cytobios* **82:** 39-51

Malhotra SK, Predy R, Johnson ES, Singh R, Leeuw K (1989) Novel astrocytic protein in multiple sclerosis plaques. *J Neurosci Res* **22:** 36-49

Malhotra SK, Shnitka TK, Elbrink J (1990) Reactive astrocytes--a review. *Cytobios* **61:** 133-160

Martin ED, Araque A, Buno W (2001) Synaptic regulation of the slow Ca2+-activated K+ current in hippocampal CA1 pyramidal neurons: implication in epileptogenesis. *Journal of neurophysiology* **86:** 2878-2886

Massa PT, ter Meulen V, Fontana A (1987) Hyperinducibility of Ia antigen on astrocytes correlates with strain-specific susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84:** 4219-4223

Mastronardi FG, Ackerley CA, Arsenault L, Roots BI, Moscarello MA (1993) Demyelination in a transgenic mouse: a model for multiple sclerosis. *J Neurosci Res* **36:** 315-324

Mastronardi FG, Ackerley CA, Roots BI, Moscarello MA (1996) Loss of myelin basic protein cationicity in DM20 transgenic mice is dosage dependent. *J Neurosci Res* **44:** 301-307

Mastronardi FG, Noor A, Wood DD, Paton T, Moscarello MA (2007) Peptidyl argininedeiminase 2 CpG island in multiple sclerosis white matter is hypomethylated. *J Neurosci Res*: In press.

Mattson MP, Cheng B, Baldwin SA, Smith-Swintosky VL, Keller J, Geddes JW, Scheff SW, Christakos S (1995) Brain injury and tumor necrosis factors induce calbindin D-28k in astrocytes: evidence for a cytoprotective response. *J Neurosci Res* **42:** 357-370

McGraw WT, Potempa J, Farley D, Travis J (1999) Purification, characterization, and sequence analysis of a potential virulence factor from Porphyromonas gingivalis, peptidylarginine deiminase. *Infect Immun* **67:** 3248-3256

Mei X, Ezan P, Giaume C, Koulakoff A (2010) Astroglial connexin immunoreactivity is specifically altered at beta-amyloid plaques in beta-amyloid precursor protein/presenilin1 mice. *Neuroscience* **171:** 92-105

Meyer-Franke A, Shen S, Barres BA (1999) Astrocytes induce oligodendrocyte processes to align with and adhere to axons. *Mol Cell Neurosci* **14:** 385-397

Miyamoto N, Maki T, Shindo A, Liang AC, Maeda M, Egawa N, Itoh K, Lo EK, Lok J, Ihara M, Arai K (2015) Astrocytes Promote Oligodendrogenesis after White Matter Damage via Brain-Derived Neurotrophic Factor. *J Neurosci* **35:** 14002-14008

Montine TJ, Beal MF, Robertson D, Cudkowicz ME, Biaggioni I, O'Donnell H, Zackert WE, Roberts LJ, Morrow JD (1999) Cerebrospinal fluid F2-isoprostanes are elevated in Huntington's disease. *Neurology* **52:** 1104-1105

Moriguchi T, Lim SY, Greiner R, Lefkowitz W, Loewke J, Hoshiba J, Salem N, Jr. (2004) Effects of an n-3-deficient diet on brain, retina, and liver fatty acyl composition in artificially reared rats. *J Lipid Res* **45:** 1437-1445

Moscarello MA, Chamczuk A. (2003) Method for diagnosing multiple sclerosis and an assay therefore. In USPTO (ed.), USA.

Moscarello MA, Mastronardi FG, Wood DD (2007) The role of citrullinated proteins suggests a novel mechanism in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurochem Res* **32:** 251-256

Moscarello MA, Pritzker L, Mastronardi FG, Wood DD (2002) Peptidylarginine deiminase: a candidate factor in demyelinating disease. *J Neurochem* **81:** 335-343

Moscarello MA, Wood DD, Ackerley C, Boulias C (1994) Myelin in multiple sclerosis is developmentally immature. *J Clin Invest* **94:** 146-154

Nair A, Frederick TJ, Miller SD (2008) Astrocytes in multiple sclerosis: A product of their environment. *Cell Mol Life Sci*

Nakase T, Sohl G, Theis M, Willecke K, Naus CC (2004) Increased apoptosis and inflammation after focal brain ischemia in mice lacking connexin43 in astrocytes. *Am J Pathol* **164:** 2067-2075

Nakazawa T, Nakazawa C, Matsubara A, Noda K, Hisatomi T, She H, Michaud N, Hafezi-Moghadam A, Miller JW, Benowitz LI (2006) Tumor necrosis factor-alpha mediates oligodendrocyte death and delayed retinal ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci* **26:** 12633-12641

Neufeld AH, Liu B (2003) Glaucomatous optic neuropathy: when glia misbehave. *Neuroscientist* **9:** 485-495

Neufeld AH, Sawada A, Becker B (1999) Inhibition of nitric-oxide synthase 2 by aminoguanidine provides neuroprotection of retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96:** 9944-9948

Nicholas AP (2013) Dual immunofluorescence study of citrullinated proteins in Alzheimer diseased frontal cortex. *Neuroscience letters* **545:** 107-111

Nicholas AP, Sambandam T, Echols JD, Barnum SR (2005) Expression of citrullinated proteins in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Comp Neurol* **486:** 254-266

Nicholas AP, Whitaker JN (2002) Preparation of a monoclonal antibody to citrullinated epitopes: its characterization and some applications to immunohistochemistry in human brain. *Glia* **37:** 328-336

Nikcevich KM, Gordon KB, Tan L, Hurst SD, Kroepfl JF, Gardinier M, Barrett TA, Miller SD (1997) IFN-gamma-activated primary murine astrocytes express B7 costimulatory molecules and prime naive antigen-specific T cells. *J Immunol* **158:** 614-621

Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000) Multiple sclerosis. *N Engl J Med* **343:** 938-952

Okada-Ogawa A, Suzuki I, Sessle BJ, Chiang CY, Salter MW, Dostrovsky JO, Tsuboi Y, Kondo M, Kitagawa J, Kobayashi A, Noma N, Imamura Y, Iwata K (2009) Astroglia in medullary dorsal horn (trigeminal spinal subnucleus caudalis) are involved in trigeminal neuropathic pain mechanisms. *J Neurosci* **29:** 11161-11171

Osborne SL, Herreros J, Bastiaens PI, Schiavo G (1999) Calcium-dependent oligomerization of synaptotagmins I and II. Synaptotagmins I and II are localized on the same synaptic vesicle and heterodimerize in the presence of calcium. *J Biol Chem* **274:** 59-66

Papadopoulos MC, Verkman AS (2012) Aquaporin 4 and neuromyelitis optica. *Lancet Neurol* **11:** 535-544

Pekny M, Nilsson M (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* **50:** 427-434

Pena JD, Varela HJ, Ricard CS, Hernandez MR (1999) Enhanced tenascin expression associated with reactive astrocytes in human optic nerve heads with primary open angle glaucoma. *Exp Eye Res* **68:** 29-40

Peskind ER, Griffin WS, Akama KT, Raskind MA, Van Eldik LJ (2001) Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. *Neurochem Int* **39:** 409-413

Pittock SJ, Lucchinetti CF (2007) The pathology of MS: new insights and potential clinical applications. *Neurologist* **13:** 45-56

Polderman KH, Herold I (2009) Therapeutic hypothermia and controlled normothermia in the intensive care unit: practical considerations, side effects, and cooling methods. *Crit Care Med* **37:** 1101-1120

Predy R, Malhotra SK, Das GD (1988) Enhanced expression of a protein antigen (J1-31 antigen, 30 kilodaltons) by reactive astrocytes in lacerated spinal cord. *J Neurosci Res* **19:** 397-404, 466-397

Pritzker LB, Joshi S, Gowan JJ, Harauz G, Moscarello MA (2000) Deimination of myelin basic protein. 1. Effect of deimination of arginyl residues of myelin basic protein on its structure and susceptibility to digestion by cathepsin D. *Biochemistry* **39:** 5374-5381

Recks MS, Grether NB, van der Broeck F, Ganscher A, Wagner N, Henke E, Ergun S, Schroeter M, Kuerten S (2015) Four different synthetic peptides of proteolipid protein induce a distinct antibody response in MP4-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical immunology* **159:** 93-106

Ricard CS, Kobayashi S, Pena JD, Salvador-Silva M, Agapova O, Hernandez MR (2000) Selective expression of neural cell adhesion molecule (NCAM)-180 in optic nerve head astrocytes exposed to elevated hydrostatic pressure in vitro. *Brain Res Mol Brain Res* **81:** 62-79

Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends in neurosciences* **20:** 570-577

Rubio N, Gonzalez-Tirante M, Arevalo MA, Aranguez I (2008) Over-expression of GTP-binding proteins and GTPase activity in mouse astrocyte membranes in response to Theiler's murine encephalomyelitis virus infection. *J Neurochem* **104:** 100-112

Sacca SC, Izzotti A, Rossi P, Traverso C (2007) Glaucomatous outflow pathway and oxidative stress. *Exp Eye Res* **84:** 389-399

Salomon RG (2005) Distinguishing levuglandins produced through the cyclooxygenase and isoprostane pathways. *Chem Phys Lipids* **134:** 1-20

Sambandam T, Belousova M, Accaviti-Loper MA, Blanquicett C, Guercello V, Raijmakers R, Nicholas AP (2004) Increased peptidylarginine deiminase type II in hypoxic astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **325:** 1324-1329

Scofield RH (2004) Autoantibodies as predictors of disease. *Lancet* **363:** 1544-1546

Senshu T, Sato T, Inoue T, Akiyama K, Asaga H (1992) Detection of citrulline residues in deiminated proteins on polyvinylidene difluoride membrane. *Anal Biochem* **203:** 94-100

Serre G, Girbal-Neuhauser E, Vincent C, Simon M, Sebbag M, Dalbon P, Jolivet-Reynaud C, Arnaud M, Jolivet M. (2005) Antigens derived from filaggrin and their use for diagnosing rheumatoid polyarthritis. In USPTO (ed.). Biomerieux (Marcy-L'Etoile, FR), USA, Vol. 6890720.

Serre G, Sebbag M. (2006) Fibrin citrulline derivatives and their use for diagnosing or treating rheumatoid arthritis In USPTO (ed.). Universite Paul Sabatier (Toulouse, FR), USA, Vol. 7022485.

Shuangshoti S, Thorner PS, Ruangvejvorachai P, Saha B, Groshen S, Taylor CR, Malhotra S, Imam SA (2009) J1-31 protein expression in astrocytes and astrocytomas. *Neuropathology* **29:** 521-527

Shuba LM, Doan AP, Maley MK, Zimmerman MB, Dinn RB, Greenlee EC, Alward WL, Kwon YH (2007) Diurnal fluctuation and concordance of intraocular pressure in glaucoma suspects and normal tension glaucoma patients. *J Glaucoma* **16:** 307-312

Soderstrom M, Ya-Ping J, Hillert J, Link H (1998) Optic neuritis: prognosis for multiple sclerosis from MRI, CSF, and HLA findings. *Neurology* **50:** 708-714

Spoerl E, Huhle M, Seiler T (1998) Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res* **66:** 97-103

Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, Trokel S, Seiler T (2007) Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea* **26:** 385-389

St Hillaire C, Vargas D, Pardo CA, Gincel D, Mann J, Rothstein JD, McArthur JC, Conant K (2005) Aquaporin 4 is increased in association with human immunodeficiency virus dementia: implications for disease pathogenesis. *J Neurovirol* **11:** 535-543

Striano P, Serioli E, Santulli L, Manna I, Labate A, Dazzo E, Pasini E, Gambardella A, Michelucci R, Striano S, Nobile C (2015) DEPDC5 mutations are not a frequent cause of familial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* **56:** e168-171

Takahara H, Tsuchida M, Kusubata M, Akutsu K, Tagami S, Sugawara K (1989) Peptidylarginine deiminase of the mouse. Distribution, properties, and immunocytochemical localization. *J Biol Chem* **264:** 13361-13368

Tan L, Gordon KB, Mueller JP, Matis LA, Miller SD (1998) Presentation of proteolipid protein epitopes and B7-1-dependent activation of encephalitogenic T cells by IFN-gamma-activated SJL/J astrocytes. *J Immunol* **160:** 4271-4279

Terakawa H, Takahara H, Sugawara K (1991) Three types of mouse peptidylarginine deiminase: characterization and tissue distribution. *J Biochem* **110:** 661-666

Tezel G, Wax MB (2007) Glaucoma. *Chem Immunol Allergy* **92:** 221-227

Theis M, Speidel D, Willecke K (2004) Astrocyte cultures from conditional connexin43-deficient mice. *Glia* **46:** 130-141

Theodoric N, Bechberger JF, Naus CC, Sin WC (2012) Role of gap junction protein connexin43 in astrogliosis induced by brain injury. *PLoS One* **7:** e47311

Thompson PR, Fast W (2006) Histone citrullination by protein arginine deiminase: is arginine methylation a green light or a roadblock? *ACS Chem Biol* **1:** 433-441

Trapp BD, Nave KA (2008) Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci* **31:** 247-269

Uauy R, Hoffman DR, Peirano P, Birch DG, Birch EE (2001) Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids* **36:** 885-895

Ullian EM, Christopherson KS, Barres BA (2004) Role for glia in synaptogenesis. *Glia* **47:** 209-216

Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA (2001) Control of synapse number by glia. *Science* **291:** 657-661

van Venrooij WJ, Pruijn GJ (2000) Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* **2:** 249-251

Vandevord PJ, Leung LY, Hardy W, Mason M, Yang KH, King AI (2008) Up-regulation of reactivity and survival genes in astrocytes after exposure to short duration overpressure. *Neurosci Lett* **434:** 247-252

Vis JC, Nicholson LF, Faull RL, Evans WH, Severs NJ, Green CR (1998) Connexin expression in Huntington's diseased human brain. *Cell biology international* **22:** 837-847

Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ (2003) PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays* **25:** 1106-1118

Wang F, Lu JJ, Jin ZY, Xu Y, Guan HZ, Cai J (2009) [Application of magnetic resonance contrast agent ultrasmall superparamagnetic iron oxide combined with magnetic transfer imaging in the animal model of experimental allergic encephalopathy]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* **31:** 177-181

Wang N, Zeng M, Ruan Y, Wu H, Chen J, Fan Z, Zhen H (2002) Protection of retinal ganglion cells against glaucomatous neuropathy by neurotrophin-producing, genetically modified neural progenitor cells in a rat model. *Chin Med J (Engl)* **115:** 1394-1400

Watanabe K, Akiyama K, Hikichi K, Ohtsuka R, Okuyama A, Senshu T (1988) Combined biochemical and immunochemical comparison of peptidylarginine deiminases present in various tissues. *Biochim Biophys Acta* **966:** 375-383

Weissert R (2016) Actively Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Rats. *Methods Mol Biol* **1304:** 161-169

Wong GH, Bartlett PF, Clark-Lewis I, Battye F, Schrader JW (1984) Inducible expression of H-2 and Ia antigens on brain cells. *Nature* **310:** 688-691

Wood DD, Ackerley CA, Brand B, Zhang L, Raijmakers R, Mastronardi FG, Moscarello MA (2008) Myelin localization of peptidylarginine deiminases 2 and 4: comparison of PAD2 and PAD4 activities. *Lab Invest* **88:** 354-364

Wood DD, Bilbao JM, O'Connors P, Moscarello MA (1996) Acute multiple sclerosis (Marburg type) is associated with developmentally immature myelin basic protein. *Ann Neurol* **40:** 18-24

Yang C, Huang X, Huang X, Mai H, Li J, Jiang T, Wang X, Lu T (2016) Aquaporin-4 and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* **52:** 391-402

Yang J, Yang P, Tezel G, Patil RV, Hernandez MR, Wax MB (2001) Induction of HLA-DR expression in human lamina cribrosa astrocytes by cytokines and simulated ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42:** 365-371

Yang Y, Videnskyy S, Jin L, Jie C, Lorenzini I, Frankl M, Rothstein JD (2011) Molecular comparison of GLT1+ and ALDH1L1+ astrocytes in vivo in astroglial reporter mice. *Glia* **59:** 200-207

Yang Z, Wang KK (2015) Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci* **38:** 364-374

Zhang S, Zis O, Ly PT, Wu Y, Zhang S, Zhang M, Cai F, Bucala R, Shyu WC, Song W (2014) Down-regulation of MIF by NFkappaB under hypoxia accelerated neuronal loss during stroke. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*

Ziemssen T (2005) Modulating processes within the central nervous system is central to therapeutic control of multiple sclerosis. *J Neurol* **252 Suppl 5:** v38-45