

Tesis de Doctorado en Neurociencias

**Estudio del efecto protector de la Glicoproteína
Asociada a Mielina (MAG) frente a estrés oxidativo
inducido por glutamato**

por

Biól. Ana Laura Vivinetto

Director de Tesis: Dr. Pablo H. H. Lopez

Lugar de trabajo:

Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra.

INIMEC-CONICET-UNC



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina 2017

Comisión asesora:

Dr. Alfredo Lorenzo. Instituto de Investigaciones Médicas Mercedes y Martín Ferreyra INIMEC CONICET. Universidad Nacional de Córdoba.

Dr. Gustavo Nores. Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba, CIQUIBIC-CONICET. Universidad Nacional de Córdoba.

Evaluador externo:

Dr. Javier Ramos. Instituto de Biología Celular y Neurociencia Profesor E. de Robertis, CONICET. Universidad de Buenos Aires.

Defensa oral y pública.

Lugar y Fecha:

Calificación:

Tribunal

Firma:.....

Firma:.....

Firma:.....

Aclaración:.....

Aclaración:.....

Aclaración:.....

Índice de contenido

Introducción	1
1. Células gliales	1
1.2. Oligodendrocitos (OLs).....	2
1.2.1. Fisiopatología de los OLs.....	2
2. Glutamato como factor clave de desregulación homeostática.....	3
2.1. Compartimentación de glutamato	3
2.2. Sobrecarga glutamatérgica	4
2.2.1. Fuentes de sobrecarga glutamatérgica	4
2.2.2. Mecanismos de toxicidad	5
2.2.2.1. Muerte de neuronas por aumento de glutamato.....	7
2.2.2.2. Suceptibilidad de OLs a la muerte por aumento de glutamato. Rol del estrés oxidativo	7
2.2.3. Glutamato en patologías de la sustancia blanca.....	9
2.2.3.1. Accidente cerebrovascular y otras formas isquémicas	10
2.2.3.2. Esclerosis Múltiple	12
2.2.3.2.1. Disrupción de la homeostasis de glutamato en EM	13
2.2.3.2.2. Estrés oxidativo en esclerosis múltiple	15
3. Defensas contra la toxicidad inducida por glutamato y el estrés oxidativo	15
3.1. Mecanismos de captación de glutamato	15
3.1.1. Transportadores de glutamato.....	16
3.2. Defensas contra estrés oxidativo	16
3.2.1. Glutati6n (GSH)	16
3.2.1.1. Síntesis de glutati6n.....	17
3.2.2. Nrf2: factor de transcripci6n contra especies reactivas de oxígeno	19
3.2.2.1. Rol de PKC en la activaci6n de Nrf2	19
3.2.2.2. Nrf2 como regulador maestro de la respuesta antioxidante.	20
4. MAG como puente de se1alizacion bidireccional entre neurona-oligodendrocito	22

4.1. Estructura y expresión de MAG.....	23
4.2. Señalización bidireccional de MAG	25
4.2.1.2. Funciones de MAG sobre neuronas.....	27
4.2.1.2.1. Efectos protectores y estabilizadores de MAG en neuronas	27
4.2.2. Señalización de MAG en el oligodendrocito	28
4.2.2.1. Activación farmacológica de MAG en el Oligodendrocito	29
4.2.2.1.1. Efectos protectores de Anti-MAG mAb ¿Sólo regeneración axonal?	29
4.2.2.1.2. Anticuerpo anti-MAG como estrategia de entrecruzamiento/activación	31
Objetivo general.....	33
Hipótesis.....	34
Objetivos específicos.....	34
Materiales y métodos.....	35
1. Experimentos in vitro	35
1.1. Cultivo primario de oligodendrocitos	35
1.2. Cultivo organotípico de cerebelo	36
1.3. Tratamiento de cultivos.....	36
1.4. Inhibidores farmacológicos	37
1.5. Cuantificación de glutatión intracelular	37
1.6. Análisis de producción de especies reactivas de oxígeno	38
1.7. Análisis de dinámicas de glutamato por FRET.....	38
1.8. Inmunofluorescencia.....	41
1.9. Análisis de activación de Nrf2 y expresión de xCT por inmunocitoquímica	41
1.10. Western Blot	42
1.11. Purificación de ARN y PCR en tiempo real	43
1.12. Análisis de activación de PLC	45
2. Modelos animales	46
2.1. Modelo de excitotoxicidad.....	46
2.1.1 Cirugía	46

2.1.2. Histología, Fluoro Jade C y cuantificación del volumen de lesión	47
2.2. Encefalitis Autoinmune Experimental.....	48
2.2.1. Inmunización y determinación del valor clínico motor.....	48
2.2.2. Cuantificación axonal	49
3. Análisis Estadístico	50
Resultados	51
1. Caracterización del mecanismo de protección generado por entrecruzamiento de MAG en la membrana del oligodendrocito frente a la sobrecarga glutamatérgica.....	51
1.1. El entrecruzamiento de MAG mediante el uso de un anticuerpo monoclonal específico genera un aumento de las defensas antioxidantes de los oligodendrocitos y previene la depleción de glutatión (GSH) por estrés oxidativo generado por sobrecarga de glutamato	51
1.2. El aumento de GSH derivado del entrecruzamiento de MAG con su anticuerpo monoclonal posee un curso temporal definido	53
1.3. El intercambiador sistema Xc- y los transportadores de glutamato se encuentran involucrados en el aumento de GSH dependiente de la activación de MAG.....	54
1.4. El aumento de las defensas antioxidantes por entrecruzamiento de MAG puede modular la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	55
1.5. La activación de MAG por entrecruzamiento con su anticuerpo genera un aumento en la recaptación de glutamato extracelular en el oligodendrocito.....	56
1.6. Los transportadores de glutamato (EAATs) del oligodendrocito se encuentran involucrados en la captación de glutamato activada por MAG.....	59
2. Caracterización de la señalización intracelular asociada a defensas antioxidantes generada por entrecruzamiento/activación de MAG en OLS	61
2.1. El entrecruzamiento/activación de MAG resulta en una activación del factor nuclear derivado de eritrocitos Nrf2.....	61
2.2. La activación del factor Nrf2 derivada de entrecruzamiento de MAG genera un aumento en la transcripción del intercambiador Xc- y enzimas involucradas en la síntesis de glutatión	63
2.3. La activación de MAG genera un incremento en la expresión del sistema Xc- en OLS.....	64
2.4. La activación de MAG mediada por anticuerpo no afecta los niveles transcripcionales de los transportadores de glutamato	66
2.5. El incremento en GSH derivado de la activación de MAG en OLS es dependiente de la actividad de PKC	67
2.6. La activación de MAG induce una cascada de señalización via fosfoinosítidos.....	68

3. Caracterización de los receptores axonales de MAG capaces de estimular el efecto protector frente a condiciones de estrés oxidativo en OLs.....	72
3.1. La unión de MAG a su receptor neuronal GT1b puede generar un incremento en la respuesta antioxidante del oligodendrocito.....	72
4. Análisis del efecto de la activación de MAG mediante su modulación con un anticuerpo específico en la sobrevida de OLs y neuronas en modelos animales de excitotoxicidad	73
4.1. El Tratamiento con el anticuerpo anti-MAG protege a las neuronas frente la toxicidad mediada por glutamato en cultivos organotípicos	73
4.2. La activación de MAG-anticuerpo ejerce un efecto neuroprotector en un modelo in vivo de excitotoxicidad caracterizado por sobrecarga de glutamato	75
4.3. El tratamiento con anticuerpo anti-MAG mejora los signos clínicos en un modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE).....	77
Discusión	82
Conclusiones.....	99
Referencias	101

Resumen

La glicoproteína asociada a mielina (MAG) es un componente minoritario del Sistema Nervioso que se encuentra localizada en la zona periaxonal de la vaina de mielina, donde participa en la comunicación bidireccional entre Oligodendrocitos (OLs) y neuronas. Más allá del rol estabilizador/protector sobre axones/neuronas en el sistema nervioso, se conoce que bajo ciertas condiciones patológicas MAG es capaz de inhibir la extensión de neuritas de neuronas en cultivo mediante la unión a diversos receptores axonales. Este hallazgo llevó al desarrollo de potentes inhibidores farmacológicos de MAG, entre los que se destaca el anticuerpo monoclonal anti-MAG bloqueante de función (anti-MAG mAb, clon 513). Su uso terapéutico en modelos preclínicos de accidentes cerebrovasculares (ACVs) derivó en una rápida mejora clínica, aunque la velocidad de la recuperación clínica sugiere un mecanismo de neuroprotección más que un proceso de promoción de la regeneración axonal. Por el contrario, el uso del anti-MAG mAb en ensayos preclínicos en humanos falló en demostrar su utilidad terapéutica en ACV. En adición a esto, se ha reportado que el tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-MAG puede proteger a los OLs frente a la toxicidad por sobrecarga de glutamato, aunque no se conocen aún los mecanismos intervinientes. Este trabajo explora los mecanismos moleculares que subyacen al efecto protector de la terapia anti-MAG en modelos experimentales, con foco en la neuroprotección frente a toxicidad mediada por glutamato. Los resultados muestran que la unión/activación de MAG en OLs genera una rápida recaptación de glutamato extracelular mediada a través de la actividad sinérgica de los transportadores de aminoácidos excitatorios de alta afinidad y el intercambiador glutamato/cistina (sistema X_c^-), lo que resulta en protección de OLs y neuronas aledañas. A su vez, el tratamiento con anticuerpo anti-MAG inicia una cascada de señalización via fosfoinosítidos que se traduce en la activación del factor de transcripción Nrf2 en forma dependiente de la actividad de la proteína quinasa C y la subsecuente activación de la respuesta antioxidante, que incluye incremento de ARNm para las enzimas de la vía metabólica de glutatión y para la cadena regulatoria del sistema X_c^- , lo que resulta en un incremento intracelular de glutatión reducido (GSH), la principal defensa antioxidante. La eficacia de la administración temprana de anti-MAG mAb se demostró en un modelo preclínico de ACV por administración intracranial de glutamato y fue replicada en un modelo murino de encefalitis autoinmune experimental, que asemeja la enfermedad humana

esclerosis múltiple, caracterizado por daño axonal secundario a la desmielinización. El aumento de GSH también se evidenció al utilizar una forma multimérica del gangliósido GT1b, un conocido ligando neuronal de MAG. Como conclusión, la activación de MAG genera una recaptación de glutamato por OLs bajo condiciones de sobrecarga del aminoácido, e induce una respuesta antioxidante robusta. Estos resultados nos permiten proponer a los OLs como moduladores críticos del daño por sobrecarga glutamatérgica en la sustancia blanca y al mismo tiempo identificar a MAG y sus vías de señalización como posibles blancos terapéuticos.

Abstract

The Myelin-associated glycoprotein (MAG) is a minor component of the Nervous System localized in the periaxonal myelin sheath where it participates in a bidirectional communication with neurons. Beyond its stabilizing/protective role on axons/neurons, it is known that MAG can inhibit neurite extension in cultures by crosslinking with its axonal receptors. This finding led to the development of pharmacological inhibitors of MAG, like a function blocking monoclonal antibody (anti-MAG mAb, clone 513). Administered as a therapeutic agent, anti-MAG mAb increased clinical improvement on preclinical stroke models, although the early onset of the changes suggest a mechanism of immediate neuroprotection rather than enhanced axon regeneration. Conversely, administration of anti-MAG mAb in human patients failed to demonstrate therapeutic effects after stroke. In addition, MAG crosslinking mediated by anti-MAG mAb can protect OLs from toxicity by glutamate overload, although the underlying mechanisms remain to be discovered. This work explores the molecular mechanisms responsible for the protective effect of anti-MAG therapy with a focus on neuroprotection against glutamate (Glu) toxicity. Results show that MAG crosslinking (activation) triggered the clearance of extracellular Glu by a synergic activity of both high affinity excitatory amino acid transporters and the cystine/Glu antiporter (system X_c⁻). This resulted not only in protection of oligodendrocytes but also nearby neurons. MAG activation led to a phosphoinositides signaling cascade that activated Nrf2 (nuclear-erythroid related factor-2) in a PKC-dependent way and a subsequent activation of antioxidant responses including increased mRNA expression of metabolic enzymes from the glutathione biosynthetic pathway and the regulatory chain of system X_c⁻ resulting in an increase in reduced glutathione, the main antioxidant in cells. The efficacy of early anti-MAG mAb administration was demonstrated in a preclinical model of stroke induced by intrastriatal Glu administration and extended to a model of Experimental Autoimmune Encephalitis showing axonal damage secondary to demyelination. GSH increase on primary OLs was also achieved using GT1b, a well-known neuronal ligand of MAG. Concluding, MAG activation triggers Glu uptake into oligodendrocytes under conditions of Glu overload and induces a robust protective antioxidant response. These results allow us to propose OLs as

critical modulators of high extracellular glutamate in white matter and at the same time to identify MAG and its signalling events as possible therapeutic targets.

Lista de abreviaturas

- **AAA:** Ácido aminoadípico
- **ACVs:** Accidentes cerebrovasculares
- **AMPA:** Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
- **anti-MAG mAb:** Anticuerpo monoclonal contra la glicoproteína asociada a mielina
- **ARE:** Elementos de respuesta antioxidante
- **bFGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos beta
- **BSA:** Albúmina sérica bobina
- **CaM Kinasa:** Calcio calmodulina-kinasa
- **Cul3:** Cullin3
- **DAG:** Diacilglicerol
- **EAATs:** Transportadores de aminoácidos excitatorios
- **EAE:** Encefalitis Autoinmune Experimental
- **EC50:** Concentración efectiva media
- **EM:** Esclerosis Múltiple
- **FRET:** Transferencia de energía de resonancia de Förster
- **GCL:** Glutamato cisteína ligasa
- **Gclc:** Subunidad catalítica de la enzima glutamato cisteína ligasa
- **Gclm:** Subunidad modificadora de la enzima glutamato cisteína ligasa
- **GPI:** Glicofosfatidil-inositol
- **GS:** Glutación sintetasa
- **GSH:** Glutación reducido, forma sulfihriilo
- **GSR:** Glutación-reductasa
- **GSSG:** Glutación disulfuro
- **H₂O₂:** Peróxido de hidrógeno
- **Ig:** Inmunoglobulina

- **IgSF:** Superfamilia de inmunoglobulinas
- **Kcat:** Constante de especificidad
- **Ki:** Constante de inhibición
- **Km:** Constante de Michaelis-Menten
- **L-MAG:** Isoforma larga de la glicoproteína asociada a mielina
- **MAG:** Glicoproteína asociada a mielina
- **MAP1B:** Proteína 1B asociada a microtúbulos
- **mBCI:** Monochlorobimane
- **NGRs:** Receptores nogo
- **NMDA:** N-metil-D-aspartato
- **NOS:** Óxido nítrico sintetasa
- **NRF2:** Factor Nuclear 2 derivado de eritrocitos
- **O₂⁻:** Aniones superóxido
- **OLs:** Oligodendrocitos
- **ONOO⁻:** Radicales peroxinitrito
- **PDC:** L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxilato
- **PDGF-AA:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas
- **PFA:** Paraformaldehido
- **PIP2:** Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
- **PiRb:** Receptor B similar a inmunoglobulina
- **PKA:** Proteína quinasa A
- **PKC:** Proteína kinasa C
- **PLCy:** Proteína kinasa C gamma
- **PPMS:** Esclerosis múltiple primaria progresiva
- **ROI:** Región de interés
- **ROS:** Especies reactivas de oxígeno
- **Rpl13a:** Proteína ribosomal l13a
- **RRMS:** Esclerosis múltiple remitente-recurrente

- **S-MAG:** Isoforma corta de la glicoproteína asociada a mielina
- **SLC7A11:** Solute carrier family 7 member 11
- **SNC:** Sistema nervioso central
- **SPMS:** Esclerosis múltiple secundaria progresiva
- **V_{max}:** Velocidad máxima
- **X_c⁻:** Intercambiador glutamato-cistina

Introducción

1. Células gliales

El término “glia” fue introducido por primera vez en 1856 por el físico alemán Rudolph Virchow para describir a la sustancia conectiva entre la cual se encontraban embebidos los elementos del sistema nervioso (Armati y Mathey 2010). A pesar de que una proporción importante de las células del sistema nervioso son gliales, su rol activo en la fisiología cerebral y las consecuencias de su disfunción sobre las patologías del sistema nervioso sólo han sido enfatizados durante los últimos tiempos (Baumann y Pham-Dinh 2001).

Las células gliales se encuentran involucradas virtualmente en cada aspecto de la función neuronal. Participan guiando la migración neuronal durante el desarrollo, removiendo células no deseadas, mielinizando axones y formando la barrera hemato-nerviosa. En condiciones fisiológicas estas células mantienen un ambiente homeostático apropiado para la función nerviosa mediante diversas funciones, como el almacenamiento de energía, la regulación del pH, el balance de la concentración de iones, el reciclado de neurotransmisores luego de la excitación neuronal, entre otros. Además, descubrimientos recientes han generado indicios de una posible comunicación sináptica con neuronas (revisado por Zhang 2001).

Bajo condiciones patológicas las células gliales pueden adoptar un rol dual, ya que por un lado actúan como un sistema de defensa colaborando con la respuesta inmune y la producción de factores tróficos pero por otra parte su desbalance puede mediar ciertos procesos patológicos. Por todo esto, generalmente estas células son blancos importantes para diversas intervenciones terapéuticas (Zhang 2001)

1.2. Oligodendrocitos (OLs)

El término oligodendroglía (oligo=pocos, dendros=procesos) fue introducido por primera vez por Rio Hortega para describir un tipo específico de célula glial. El nombre hace referencia a los pocos procesos que se visualizaban debido a la tinción subóptima de los antiguos métodos inmunohistoquímicos, pero actualmente se sabe que esta concepción es incorrecta considerando la cantidad de procesos de estas células, cada uno de los cuales envuelve un único segmento axonal (Kettenmann y Ransom 2012).

Respecto a su función, los OLs se caracterizan por ser las células mielinizantes del sistema nervioso central. Un OL puede extender múltiples procesos, cada uno de los cuales contacta y envuelve repetidamente un segmento axonal formando una membrana multiespiral que subsecuentemente se condensa generando la mielina. En contraste con las células de Schwann (células mielinizantes del sistema nervioso periférico), los OLs pueden mielinizar a más de un axón. Se ha estimado que una sola célula oligodendrocitaria puede mantener hasta 60 segmentos axonales distintos (Verkhratsky y Butt 2013) A su vez, en un mismo axón, los segmentos adyacentes de mielina pertenecen a diferentes OLs (Baumann y Pham-Dinh 2001).

1.2.1. Fisiopatología de los OLs

Las células oligodendrogliales y los axones que ellas mielinizan son unidades funcionales completamente interdependientes, ya que ningún elemento funciona correctamente sin la presencia del otro. En consecuencia, la pérdida de OLs o mielina genera efectos devastadores en la función nerviosa, mientras que los OLs se vuelven redundantes sin los axones. El nivel de interdependencia neurona-oligodendrocito requiere un alto grado de señalización axoglial e interacciones específicas que generan un panorama de estudio sobre el cual todavía se conoce muy poco (Verkhratsky y Butt 2013).

Existen gran número de correlaciones entre enfermedades clínicas y daño o disfunción oligodendrocitaria, entre las cuales se encuentran la apoptosis de OLs y pérdida selectiva de mielina en lesiones tempranas de esclerosis múltiple, el daño difuso de la sustancia blanca

profunda iniciada por una isquemia cerebral en la leucomalacia periventricular y la presencia característica de inclusiones de synucleina filamentosa en el citoplasma de los OLs en la atrofia de sistemas múltiples, entre otras (revisado por Benarroch 2009).

2. Glutamato como factor clave de desregulación homeostática

2.1. Compartimentación de glutamato

El aminoácido glutamato ha sido reconocido históricamente como el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central de los mamíferos, pero muchos estudios han logrado expandir su repertorio funcional demostrando que los receptores glutamatérgicos están presentes en una gran variedad de células no excitables. De esta manera, sus efectos se extienden más allá de la generación de corrientes excitatorias hacia cambios a largo plazo en el potencial de membrana y en los niveles de Ca^{+2} citosólicos, junto con una articulación con sistemas de segundos mensajeros (revisado por Nedergaard, Takano, y Hansen 2002).

Existe una importante compartimentación en términos de concentraciones de glutamato dentro del sistema nervioso central. En primera instancia, el nivel de glutamato en el líquido cefalorraquídeo ($<1\mu\text{M}$) es más bajo que en plasma ($30\text{-}80\ \mu\text{M}$) debido a que la barrera hematoencefálica previene su entrada hacia el SNC y la mayor parte del glutamato presente en el cerebro proviene de la síntesis por astrocitos. Respecto a las concentraciones intracelulares, se han reportado niveles de glutamato citoplasmático que rondan en 5mM para neuronas y $2\text{-}3\text{mM}$ para astrocitos. A su vez, el mantenimiento de niveles extracelulares bajos es un requerimiento esencial para la correcta función del aminoácido como neurotransmisor: estudios utilizando técnicas de microdiálisis han reportado niveles extracelulares en el rango de $1\text{-}2\mu\text{M}$, pero probablemente estos resultados estén sobrestimando los niveles reales debido a limitaciones técnicas. De hecho, se sabe que los transportadores de glutamato tienen la

capacidad de reducir su concentración extracelular a un rango nanomolar (revisado por Nedergaard, Takano, y Hansen 2002).

2.2. Sobrecarga glutamatérgica

2.2.1. Fuentes de sobrecarga glutamatérgica

Las fuentes de sobrecarga glutamatérgica extracelular pueden ser diversas. Por un lado dicho proceso puede generarse por alteraciones en los ciclos metabólicos normales de glutamato cerebral, por una disminución en la recaptación o transporte desde el espacio sináptico así también como puede derivarse de un derrame de glutamato desde neuronas dañadas (revisado por Mark et al. 2001).

A su vez, existen fuentes no neuronales que contribuyen a este aumento. En este sentido, ha sido reportado que los astrocitos son células capaces de liberar grandes cantidades de glutamato al medio extracelular por diferentes mecanismos tales como exocitosis señalizada por Ca^{+2} , actividad reversa de transportadores de glutamato, liberación por estrés hipo-osmolar y por hemicanales o poros generados por receptores purinérgicos (revisado por Simard y Nedergaard 2004). Sumado a esto, el glutamato puede inducir edema astrocítico por cambios en la concentración de Ca^{+2} y en la actividad osmótica intracelular derivados de la captación de Na^{+} y glutamato. El incremento en el volumen de los astrocitos implica una reducción del espacio extracelular, generando un aumento en la concentración de las sustancias neuroactivas presentes, entre ellas, el mismo glutamato (Hansson 2000).

También durante los eventos de isquemia, las alteraciones en el medio celular que incluyen cambios en el pH resultan sumamente nocivas para la correcta función de las proteínas de membrana celular como los transportadores de glutamato, en los cuales aparece un mecanismo de transporte reverso (revisado por Medina Marín y Escobar Bethancourth 2002).

Sumado a estos efectos, la enzima glutaminasa puede introducir una fuente de glutamato extra en condiciones patológicas. Esta enzima es responsable de la conversión de glutamina en glutamato y se encuentra en la membrana mitocondrial interna de ciertas subpoblaciones de

neuronas glutamatérgicas. En casos de lesión neuronal, la glutaminasa puede liberarse al medio extracelular, convirtiendo glutamina en glutamato en ese sitio, exacerbando y propagando el efecto tóxico (Tian et al. 2012).

2.2.2. Mecanismos de toxicidad

Una estimulación excesiva del aminoácido excitatorio sobre sus receptores conlleva a una respuesta metabólica exagerada que puede ocasionar daño neuronal. Este proceso es conocido como *excitotoxicidad*. Sin embargo, éste no es el único mecanismo de lesión celular. Un fenómeno paralelo, caracterizado por el aumento de radicales libres, puede presentarse en situaciones de elevación aguda o crónica del glutamato extracelular. A este mecanismo se lo conoce como *toxicidad oxidativa de glutamato*.

En el proceso de excitotoxicidad, una concentración intracelular excesiva de Ca^{+2} es el mediador clave de la toxicidad por glutamato a través de la sobre-activación de sus receptores. Los receptores de glutamato se clasifican en dos familias: ionotrópicos y metabotrópicos. Existen tres familias de receptores ionotrópicos de glutamato, que actúan como canales de cationes: los receptores de N-metil-D-aspartato (receptores NMDA), los de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (receptores AMPA), y los de kainato (receptores de kainato). En cuanto a los receptores metabotrópicos, estos están acoplados a proteínas G y modifican la respuesta de los canales de membrana y las concentraciones de segundos mensajeros como el diacilglicerol o el AMP cíclico (revisado por Madden 2002).

Los receptores NMDA activan canales que permiten la entrada de Na^+ y Ca^{+2} a las neuronas. La sobrestimulación de este tipo de receptor glutamatérgico puede entonces llevar a una sobrecarga de Ca^{+2} . Los receptores AMPA y kainato también contribuyen al incremento del ion ya que sus canales iónicos acoplados a la membrana son al menos parcialmente permeables al Ca^{+2} (Mark et al. 2001). A su vez, el influjo de Na^+ y Ca^{+2} por la estimulación de los receptores glutamatérgicos resulta en la despolarización de la membrana, que también activa los canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje, aumentando aún más la concentración intracelular de este ión (Mark et al. 2001).

La entrada de Ca^{+2} y su liberación desde el retículo endoplasmático induce la activación de diversas enzimas, como la calcio calmodulina-quinasa (CaM Kinasa) entre cuyos sustratos se encuentran dos tipos de oxido nítrico sintetetas (NOS). La actividad prolongada de estas enzimas lleva a la depleción del sustrato L-arginina. La producción de oxido nítrico se reemplaza entonces por la generación de radicales peroxinitrito (ONOO^-) y aniones superóxido (O_2^-). Esto conlleva a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), disfunción mitocondrial, estrés de retículo y liberación de enzimas lisosomales.

Simultáneamente el aumento de la concentración de glutamato extracelular modifica la función del intercambiador glutamato-cistina (Xc^-), el cual exporta ácido glutámico al exterior de la célula a cambio de cistina necesaria para la síntesis de glutatión (GSH), el principal antioxidante de la célula, encargado de la neutralización de radicales libres. Los efectos celulares de estos radicales incluyen la alteración en la fluidez de membranas, cambios en los sistemas de transporte mitocondrial y de membrana plasmática, inhibición de la enzima glutamina sintasa, que impide la conversión de glutamato en glutamina, lo cual termina exacerbando el proceso excitotóxico (revisado por Medina Marín y Escobar Bethancourth 2002). Un resumen gráfico de los procesos detallados puede encontrarse en la figura 1.

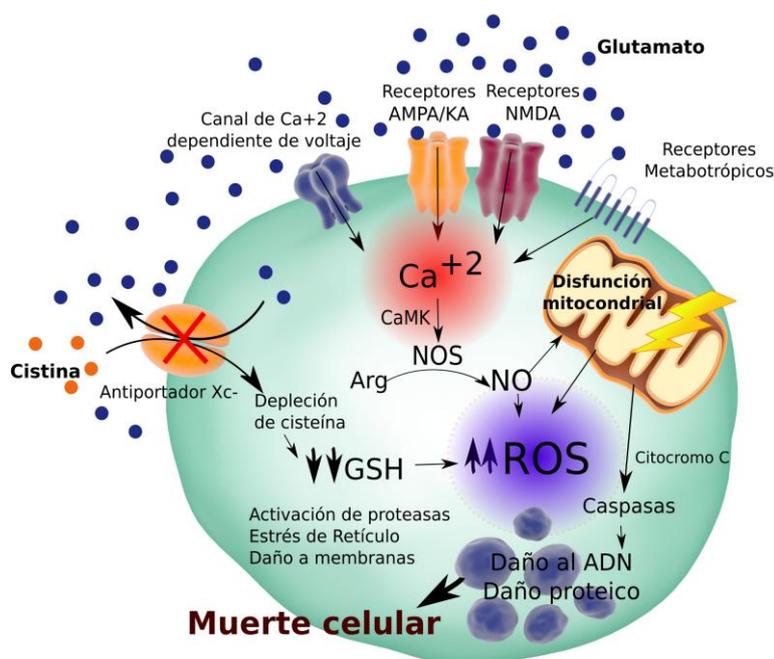


Figura 1: Resumen de los eventos excitotóxicos y de estrés oxidativo derivados de la sobrecarga glutamatérgica en células. En la mayoría de las células, incluidas las neuronas, los receptores inotrópicos están presentes coexistiendo con el intercambiador glutamato-cistina. Esto fortalece la suposición de que el efecto tóxico del glutamato es una suma acumulativa de la excitotoxicidad y el estrés oxidativo (Kritis et al. 2015).

2.2.2.1. Muerte de neuronas por aumento de glutamato

Dentro de las poblaciones celulares que pueden sufrir daños por acumulación de glutamato extracelular en el SNC, las neuronas representan uno de los grupos más sensibles. Se ha reportado un amplio espectro de concentraciones tóxicas de glutamato para neuronas en modelos in vitro, variando desde rangos micromolar a milimolares. La concentración EC50 o concentración efectiva media, depende de factores como el tipo de células (cultivos primarios o líneas), el fenotipo neuronal, la densidad celular, la edad de los cultivos, los suplementos agregados al medio, el tipo de tratamiento (crónico o agudo) y la técnica usada para evaluar los procesos de muerte neuronal entre muchos otros parámetros. Dentro de este panorama, muchos trabajos establecen que una concentración de glutamato de 100 μM es suficiente para generar una muerte neuronal significativa en cultivos primarios de neuronas corticales y cerebelares tanto en paradigmas de tratamiento agudo (10, 15 o 30 minutos)(Amin 1997; Ankarcona et al. 1995; Dessi et al. 1993; Schubert y Piasecki 2001; Vaarmann et al. 2013), como en tratamientos prolongados de 24 horas (Park, Nozell, y Benveniste 2012; Zhang y Bhavnani 2005).

La toxicidad del glutamato en neuronas parece ocurrir principalmente por activación de los receptores de aminoácidos excitatorios (revisado por Ankarcona et al. 1995). También se ha descrito que los procesos de estrés oxidativo tienen participación activa (revisado por Atlante et al. 2001).

2.2.2.2. Susceptibilidad de OLs a la muerte por aumento de glutamato. Rol del estrés oxidativo

Se ha reportado que las células oligodendroglarias, tanto en su forma progenitora como madura, son sensibles al daño por sobrecarga de glutamato (revisado por Butts, Houde, y Mehmet 2008; McTigue y Tripathi 2008). Las concentraciones de glutamato que generan un daño en OLs son amplias y dependen de muchos factores, pero se reportan como sustancialmente más altas que las que afectan a las poblaciones neuronales, generalmente de 200 μ M a 10 mM (McDonald et al. 1998; Irving et al. 2005; Xu 2004).

Los procesos que median la sensibilidad hacia la toxicidad inducida por glutamato dependen de la etapa de desarrollo de los OLs (Butts, Houde, y Mehmet 2008) ya que durante las mismas la expresión de receptores ionotrópicos para glutamato se encuentra diferencialmente regulada. De esta manera, los receptores tipo AMPA y kainato disminuyen su expresión en las células oligodendroglarias maduras de rata (Rosenberg et al. 2003; Benarroch 2009). Sumado a esto, dichos receptores no han sido encontrados en OLs humanos maduros (Wosik et al. 2004).

Por otra parte, la toxicidad por glutamato en OLs no puede bloquearse por MK801, un antagonista no competitivo de los receptores NMDA ni por CNQX, un antagonista competitivo de receptores no-NMDA, ni por la combinación de estos dos inhibidores farmacológicos (Oka et al. 1993). La activación de receptores glutamatérgicos por NMDA o por AMPA no provoca muerte en OLs (Rosin, Bates, y Skaper 2004). Respecto a su expresión, por mucho tiempo se creyó que los receptores NMDA no existían o no eran funcionales en OLs maduros (revisado por R. Káradóttir y Attwell 2007) Nuevos estudios han demostrado que estos receptores se expresan sólo en los procesos celulares durante las etapas de mielinización (Salter y Fern 2005; Káradóttir et al. 2005)

En cuanto a los receptores metabotrópicos, estos median la toxicidad en estadios tempranos, pero su expresión va decreciendo a medida que se diferencian y la excitotoxicidad severa sobrepasa la habilidad de estos receptores para modular el daño (Deng et al. 2004).

En función de lo mencionado anteriormente se desprende que los OLs maduros son susceptibles a la toxicidad por glutamato mediante vías independientes de receptores. Los eventos parecen operar por mecanismos que involucran la actividad del antiportador o intercambiador glutamato/cistina, denominado sistema X_c^- . La inactivación de este sistema por altas concentraciones extracelulares de glutamato provoca una depleción de cisteína en el

citoplasma del OL, lo cual conlleva a una disminución de la producción de glutatión y al daño celular mediado por el ataque de radicales libres (figura 2). Se ha demostrado que el tratamiento con cisteína previene la totalidad de la toxicidad de glutamato en OLs (Irving et al. 2005; Oka et al. 1993). Existen evidencias que demuestran que los niveles de glutatión reducido disminuyen marcadamente en OL expuestos a glutamato, y este decremento precede la pérdida de viabilidad celular (Oka et al. 1993).

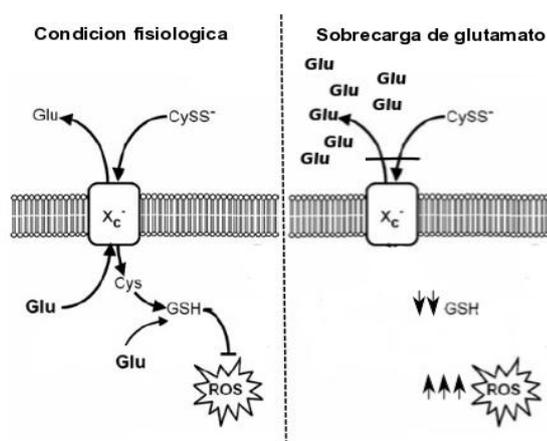


Figura 2: Estrés oxidativo por sobrecarga glutamatérgica derivada de la desregulación del sistema X_c^- . En condiciones fisiológicas el antiportador permite la entrada de cistina ($CySS^-$), un dímero de cisteína, mientras el aminoácido glutamato se exporta a favor de su gradiente de concentración (mayor en el espacio intracelular). La cistina intracelular se metaboliza a cisteína y se utiliza en forma conjunta con glutamato para la síntesis de glutatión (GSH), un importante antioxidante. En condiciones patológicas que involucran exceso de glutamato extracelular, el gradiente químico normal de este aminoácido se pierde, eliminando la capacidad de importar cistina y por lo tanto de generar una respuesta antioxidante (modificado de Lewerenz, Klein, y Methner 2006).

2.2.3. Glutamato en patologías de la sustancia blanca.

Numerosos estudios han demostrado que los eventos de sobrecarga glutamatérgica y de estrés oxidativo son procesos fundamentales que median la muerte celular en un gran número de patologías neurodegenerativas severas tales como la esclerosis múltiple y los accidentes cerebrovasculares (Hohlfeld y Kerschensteiner, 2016; Kostic et al., 2013; Macrez et al., 2016; Morales-Pantoja et al., 2016; Offen et al., 2004; Pampliega et al., 2011; Piani et al., 1991; Pitt et al., 2000; Srinivasan et al., 2005; Stover et al., 1997)

2.2.3.1. Accidente cerebrovascular y otras formas isquémicas

Los accidentes cerebrovasculares (ACVs) tienen una incidencia aproximadamente de 250-400 casos en 100.000 habitantes y una tasa de mortalidad del 30%, lo que los posiciona como la tercera causa de muerte en países industrializados (Dirnagl, Iadecola, y Moskowitz 1999).

El accidente cerebrovascular isquémico resulta de una reducción permanente o transiente en el flujo sanguíneo cerebral, restringido al territorio de una arteria cerebral principal. La reducción del flujo puede darse, en la mayoría de los casos, tanto por un émbolo como por una trombosis local. Los accidentes isquémicos representan el 80% del total de los ACVs. La otra clase de accidentes cerebrales se denomina accidentes cerebrovasculares hemorrágicos, que se generan cuando un vaso sanguíneo se daña, aumentando la presión intracraneal y reduciendo el flujo sanguíneo al tejido circundante. Aunque los mecanismos de generación del ACV difieren en estas dos clases, ambos inducen muerte celular (Sangha y Gonzales 2011).

El impedimento focal del flujo sanguíneo restringe la distribución de sustratos, particularmente oxígeno y glucosa, mientras que perjudica el suministro energético necesario para mantener los gradientes iónicos y adicionalmente provoca despolarización de las membranas y un aumento de Ca^{+2} citosólico que activa enzimas dependientes de Ca^{+2} , desencadenando un daño irreversible en los axones y glía de sustancia blanca (revisado por Matute, 2011). El Ca^{+2} comienza una serie de eventos citoplasmáticos y nucleares que tienen un profundo impacto en el desarrollo del daño tisular, como la activación de enzimas proteolíticas que degradan proteínas del citoesqueleto y de la matriz extracelular. La activación de las enzimas fosfolipasa A y ciclooxigenasa genera radicales libres que superan los mecanismos

antioxidantes endógenos produciendo peroxidación lipídica y daño de la membrana celular (revisado por Dirnagl, Ladecola, y Moskowitz 1999).

A su vez, la despolarización genera liberación de aminoácidos excitatorios al espacio extracelular, mientras que los procesos dependientes de energía tales como la recaptación presináptica de aminoácidos excitatorios se encuentran impedidos, lo que genera una acumulación aún mayor de glutamato en el espacio extracelular (revisado por Dirnagl, Ladecola, y Moskowitz 1999). Como resultado de una sobreactivación mediada por glutamato, tanto Na^+ como Cl^- ingresan a las neuronas mediante canales para iones monovalentes (por ejemplo, los canales/receptores AMPA). El agua sigue pasivamente a estos iones, generando un edema que afecta la perfusión de las regiones periféricas a la zona de lesión.

Estos cambios metabólicos e iónicos no afectan homogéneamente al territorio isquémico: en el centro de la lesión el flujo sanguíneo es un 20% menor de lo normal y una despolarización permanente y anóxica se desarrolla en minutos, por lo que las células mueren rápidamente por lipólisis, proteólisis y desagregación de microtúbulos. Entre esta área irreversiblemente dañada y el tejido cerebral normal se encuentra la zona de penumbra, un área con flujo sanguíneo constreñido y metabolismo energético parcialmente preservado. Sin tratamiento, la penumbra progresa en el tiempo hacia el infarto debido al proceso de excitotoxicidad en curso o a fenómenos deletéreos secundarios como lo son la propagación de la despolarización, la inflamación post-isquémica y la apoptosis (figura 3). Es entonces evidente que el principal objetivo de los tratamientos neuroprotectores sea modular la muerte en el área de penumbra (Dirnagl, Ladecola, y Moskowitz 1999).

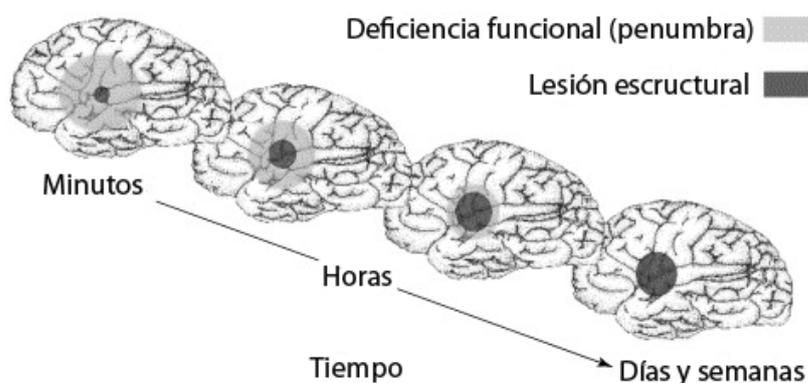


Figura 3: Progresión temporal del daño en un accidente cerebrovascular (ACV). Se muestra la progresión de la lesión estructural en ausencia de tratamiento (modificado de Dirnagl, Ladecola, y Moskowitz 1999).

2.2.3.2. Esclerosis Múltiple

La Esclerosis Múltiple (EM, o MS por sus siglas en inglés) representa la enfermedad desmielinizante más importante del Sistema Nervioso Central, ya que se trata de una patología crónica inhabilitante en adultos jóvenes.

Esta enfermedad está caracterizada por lesiones focales con inflamación, desmielinización, infiltración de células inmunes, muerte oligodendroglial y degeneración axonal. Estas alteraciones celulares están acompañadas por déficits neurológicos, tales como trastornos sensoriales, pérdida de la coordinación motora y discapacidad visual. Sumado a esto, hasta un 65% de los pacientes presentan alteraciones cognitivas (Jongen, Ter Horst, y Brands 2012).

Los pacientes con EM presentan varios patrones sintomáticos comunes, cada uno asociado a intensidades variables de la respuesta inflamatoria. La forma más común, que afecta al 85% de los pacientes diagnosticados es la remitente-recurrente (RRMS, por sus siglas en inglés) que se caracteriza por recaídas en la disfunción neurológica que pueden durar de semanas a meses y afectan varias zonas del cerebro, nervios ópticos y/o médula espinal. Las zonas con anormalidades pueden observarse mediante un análisis de resonancia magnética típicamente (pero no exclusivamente) en la sustancia blanca (Stys et al. 2012).

La mayoría de los pacientes con RRMS entran a una fase secundaria progresiva (SPMS) la cual presenta poca inflamación y se caracteriza por un declive neurológico lento y progresivo asociado con atrofia del SNC. En algunos pacientes la enfermedad asume desde el comienzo un curso progresivo con un perfil inflamatorio relativamente bajo y se denomina como primaria progresiva (PPMS) (revisado por Stys et al. 2012) (figura 4).

Respecto a la etiología de EM, en primera instancia se propuso que poseía orígenes autoinmunes e inflamatorios, ya que la enfermedad posee un marcado fenotipo inflamatorio. Sin embargo, los análisis clínicos arrojan algunas inconsistencias con esta hipótesis, generando

una idea paralela en la que la enfermedad puede poseer una etiología diferente con inflamación secundaria (Stys et al. 2012).

Por un lado, las anomalías más tempranas aparecen en la capa más interna de mielina (Aboul-Enein et al. 2003; Rodriguez y Scheithauer 1994) y el daño mielínico muchas veces no se presenta en zonas de máxima inflamación (Rodriguez y Scheithauer 1994). A su vez, los pacientes con EM presentan comúnmente una sustancia blanca difusamente anormal en la que tanto la mielina como la densidad axonal se encuentran reducidas, pero la inflamación no es aparente (Seewann et al. 2009) Paralelamente, aunque la Esclerosis Múltiple sea caracterizada por la pérdida de mielina, los escaneos cerebrales en conjunto con el material de autopsias de algunos pacientes con esclerosis secundaria progresiva muestran una pérdida extensiva de axones y neuronas. De esta manera, la esclerosis debe representarse en parte como una enfermedad neurodegenerativa (no solamente una enfermedad glial) que resulta de una disrupción de la comunicación normal de las neuronas con la glía en las fibras mielínicas. En este contexto, las mejoras en los métodos para tratar estas enfermedades deberían centrarse desde el estudio de las vías de señalización de la glía a los axones (Fields 2002).

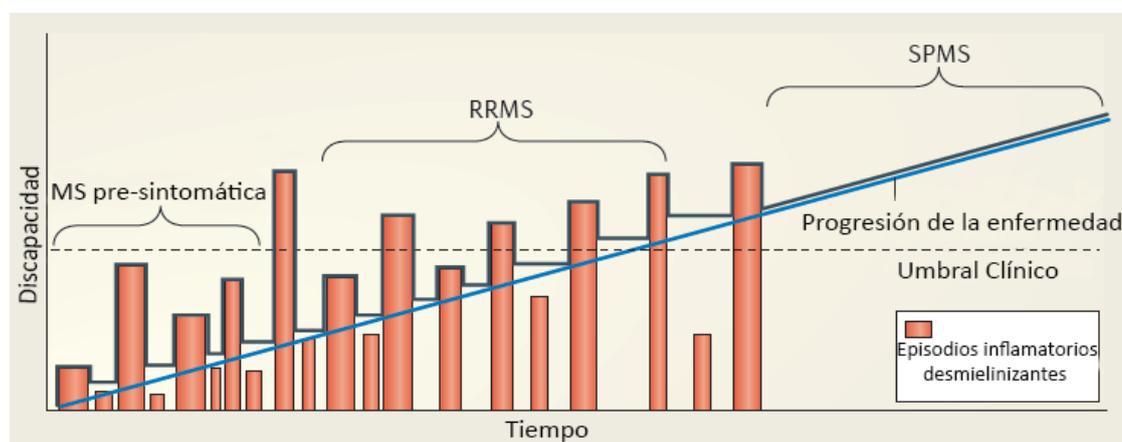


Figura 4: Desmielinización y progresión de la enfermedad en EM. Luego de una etapa presintomática, formas RRMS se caracterizan por déficits neurológicos transitorios con un retorno a la normalidad junto a una patología de desmielinización e inflamación focal. Cuando la enfermedad progresa a la forma SPMS, el daño y la disfunción neurológica comienzan a acumularse (modificado de Stys et al. 2012).

2.2.3.2.1. Disrupción de la homeostasis de glutamato en EM

Se han llevado a cabo diversos análisis acerca del rol del glutamato y su homeostasis en casos de EM, tanto en modelos animales (D. Pitt, Werner, y Raine 2000) como examinando muestras humanas (Werner, Pitt, y Raine 2001). Las concentraciones elevadas del neurotransmisor que se encuentran al analizar plasma, líquido cefalorraquídeo o mediante resonancia magnética en pacientes (Pampliega et al. 2008; Srinivasan et al. 2005; Stover et al. 1997) son consecuencia de una homeostasis glutamatérgica alterada (Vallejo-Illarramendi et al. 2006). Esto genera una destrucción tóxica de OLs y mielina como así también axones (María Domercq et al. 2005) y ha llevado a un cambio radical en la visión de la enfermedad, posicionando al aumento de glutamato como uno de los principales agentes etiológicos, un biomarcador importante de la enfermedad y un factor clave a la hora del diseño de nuevas estrategias terapéuticas (Hohlfeld y Kerschensteiner 2016; Kostic, Zivkovic, y Stojanovic 2013; Macrez et al. 2016)

Dentro de los mecanismos que contribuyen al aumento de glutamato se encuentra la activación microglial, fuente de liberación de citoquinas y radicales libres que disminuyen la captación de glutamato en oligodendrocitos (María Domercq et al. 2005). A su vez, estas células pueden liberar el neurotransmisor directamente, lo que en conjunto resulta en elevados niveles extracelulares, generando sobre-activación de receptores de glutamato permeables a Ca^{+2} y excitotoxicidad (Domercq et al. 2007).

Otros factores de susceptibilidad incluyen variabilidad genética del promotor del transportador de glutamato EAAT2, lo que resulta en una menor expresión del transportador (Pampliega et al. 2008). A su vez estudios previos han encontrado una escasez significativa en las enzimas de metabolización de glutamato así como también en los transportadores del neurotransmisor en la sustancia blanca de pacientes con esclerosis múltiple, sugiriendo un procesamiento intracelular reducido y acumulación del glutamato extracelular por extrapolación a esto, con consecuencias potencialmente tóxicas (Pitt et al. 2003). Además, el glutamato en concentraciones no tóxicas también contribuye a la patología desmielinizante al inducir muerte de los OLs por sensibilización de estas células al ataque del complemento, que genera aumento en la conductancia de membrana, incremento de Ca^{+2} intracelular,

despolarización mitocondrial y estrés oxidativo por aumento en los niveles de las especies reactivas de oxígeno (Alberdi 2006).

2.2.3.2.2. Estrés oxidativo en esclerosis múltiple

Sumadas al estrés oxidativo precipitado por las cascadas excitotóxicas de glutamato, existen evidencias robustas respecto al rol de las especies reactivas de oxígeno en EM. Por un lado, la inflamación puede aumentar los niveles de ROS mediante la activación mitocondrial, que genera un golpe oxidativo (Lull y Block 2010). También los radicales libres de oxígeno y nitrógeno generados por macrófagos se han implicado como mediadores de la desmielinización y daño axonal tanto en EM como en su modelo animal EAE (Bö et al. 1994; Van der Goes et al. 1998).

Estudios previos encontraron evidencias de peroxidación de lípidos en el líquido cefaloraquídeo y en el plasma de pacientes con EM (Hunter, Nlemadim, y Davidson 1985; Naidoo y Knapp 1992). Además, se ha demostrado que las células mononucleares activadas de pacientes con EM producen grandes cantidades de ROS y óxido nítrico (Vladimirova et al. 1999) y que el daño oxidativo al ADN genómico y mitocondrial se desarrolla en asociación con la inflamación en las placas activas de EM en el SNC (Vladimirova et al. 1998).

Respecto a los componentes antioxidantes, se determinó que las concentraciones de glutatión reducido total así como sus enzimas sintetizadoras limitantes y sus mARNs correspondientes se encuentran disminuidas en EAE, el modelo de EM. Junto a esto, el factor de transcripción Nrf2, que representa un factor clave en la regulación de la respuesta antioxidante, también presenta una disminución (Morales-Pantoja et al. 2016).

3. Defensas contra la toxicidad inducida por glutamato y el estrés oxidativo

3.1. Mecanismos de captación de glutamato

Ya que no parece existir una enzima extracelular capaz de metabolizar el glutamato (David Pitt et al. 2003) las proteínas transportadoras representan el único mecanismo significativo que permite removerlo desde el fluido extracelular. Su importancia para el mantenimiento a largo plazo de concentraciones no tóxicas de glutamato está ampliamente documentada (Danbolt 2001).

3.1.1. Transportadores de glutamato

El transporte rápido de glutamato hacia el interior de las células se lleva a cabo por transportadores de glutamato de alta afinidad dependientes de Na^+ , denominados EAATs (del inglés Excitatory Amino Acid Transporters).

Se han logrado clonar 5 tipos de transportadores en humanos, denominados EAAT1, EAAT2, EAAT3 (que corresponden a la denominación GLAST, GLT1 y EAAC-1 respectivamente en roedores), EAAT4 y EAAT5. Previos estudios han identificado a EAAT1 y EAAT2 como los principales transportadores presentes en glía, mientras que EAAT3 parece ser el principal transportador en neuronas. EAAT4 y EAAT5 se expresan exclusivamente en células de Purkinje y retina respectivamente (Pitt et al. 2003).

3.2. Defensas contra estrés oxidativo

3.2.1. Glutación (GSH)

GSH es una molécula única que participa en aspectos esenciales de la homeostasis celular, teniendo un rol central en la defensa contra el daño oxidativo. El GSH (L-g-glutamyl-L-cisteinil-glicina) es un tripéptido hidrosoluble formado por los aminoácidos ácido glutámico,

cisteína y glicina que se encuentra presente en el citoplasma de todas las células. La forma oxidada de la molécula, GSSG, se encuentra principalmente en forma extracelular (Denzoin Vulcano, Soraci, y Tapia 2013).

El GSH es una molécula multifuncional que tiene una participación clave en varios procesos celulares, siendo fundamental para la supervivencia celular. Entre sus funciones más importantes se puede encontrar:

a) detoxificación de xenobióticos,

b) mantenimiento del balance redox intracelular: Este equilibrio redox regula diversos procesos metabólicos intracelulares que incluyen la actividad enzimática, el transporte celular, transducción de señales y la expresión génica mediada por la transcripción de factores.

c) función antioxidante: presenta defensas frente al estrés oxidativo generado de la respiración mitocondrial, reacciona con intermediarios tales como el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que pueden llevar a la formación de formas tóxicas del oxígeno que causan peroxidación lipídica y daño celular. Del mismo modo, GSH reacciona con los intermediarios reactivos del nitrógeno.

d) regulación del crecimiento y la muerte celular: Para que la célula entre en la fase de síntesis del ADN durante del ciclo celular se requieren niveles altos de GSH. El GSH también está implicado en la modulación de la muerte celular, tanto en el proceso de necrosis como en el proceso de apoptosis. Los niveles de GSH disminuidos juegan un rol importante en la iniciación del proceso de apoptosis y la disminución drástica de los niveles de GSH especialmente a nivel mitocondrial, llevan a la disfunción mitocondrial y a la muerte celular.

e) fuente continua de cisteína. El aminoácido cisteína es altamente inestable en el espacio extracelular sufriendo una rápida auto-oxidación a cistina. Este proceso produce radicales libres potencialmente tóxicos. El ciclo de síntesis hace del GSH una continua fuente de cisteína para las células (revisado por Denzoin Vulcano, Soraci, y Tapia 2013).

3.2.1.1. Síntesis de glutatión

La síntesis de GSH se produce en el citosol de todas las células a partir de sus aminoácidos precursores: glicina, cisteína y ácido glutámico. La síntesis se produce por la acción consecutiva de dos enzimas: glutamato cisteína ligasa (GCL) y glutatión sintetasa (GS). En una primera reacción, la enzima glutamato cisteína ligasa usa como sustratos a los aminoácidos glutamato y cisteína y forma el dipéptido γ -L-glutamilcisteína que en una segunda reacción es combinado con glicina en la reacción catalizada por la enzima glutatión sintetasa formando GSH. El ATP (adenosintrifosfato) actúa como co-sustrato para ambas enzimas (figura 5).

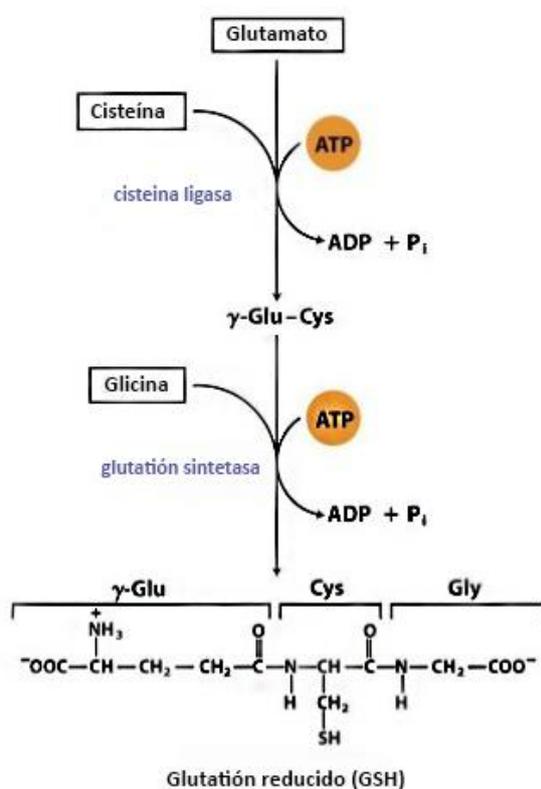


Figura 5: Síntesis de glutatión (GSH) a partir de los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina. (modificado de Denzoin Vulcano, Soraci, y Tapia 2013)

En condiciones fisiológicas, la tasa de síntesis de GSH se encuentra determinada en gran parte por dos factores: Uno de ellos es la actividad de GCL y el otro es la disponibilidad del sustrato cisteína. La GCL es considerada la enzima limitante de la velocidad de síntesis ya que la sobreexpresión de GS no aumenta los niveles de GSH en tanto que la sobreexpresión de GCL incrementa la síntesis del tripéptido (revisado por Denzoin Vulcano, Soraci, y Tapia 2013)

La síntesis de GSH sólo ocurre en el citoplasma, sin embargo en las células eucariotas, GSH se encuentra en casi todos los compartimentos celulares, incluyendo al núcleo.

3.2.2. Nrf2: factor de transcripción contra especies reactivas de oxígeno

Nrf2 (por sus siglas “nuclear factor erythroid 2 [NF-E2]-related factor 2”, en español Factor Nuclear 2 derivado de eritrocitos) es un factor de transcripción que funciona como un activador esencial de la transcripción coordinada de genes que codifican enzimas antioxidantes y enzimas detoxificantes de fase II mediante su unión a una secuencia regulatoria llamada ARE (Elemento de Respuesta Antioxidante) La vía de Nrf2 representa el regulador más importante de respuestas citoprotectoras al estrés oxidativo y electrofílico (Baird y Dinkova-Kostova 2011; Motohashi y Yamamoto 2004)

La proteína Nrf2 se degrada rápidamente. Su vida media bajo condiciones basales es de 7 a 15 minutos, mientras que aumenta a 30-100 minutos bajo presencia de inductores. La estabilidad de Nrf2 se ve regulada principalmente por la proteína Keap1, que sirve como un sustrato adaptador de un complejo E3 ubiquitin-ligasa dependiente de Cullin3. De esta manera, la unión de Keap1 con Nrf2 media su ubiquitinación y la subsecuente degradación proteosomal del factor de transcripción (revisado por Espinosa-Diez et al. 2015).

La estabilización de Nrf2 por disociación de Keap1 puede darse por oxidación y modificación de esta última debido a condiciones de estrés oxidativo (Taguchi, Motohashi, y Yamamoto 2011), o por una fosforilación directa de Nrf2 que permite su disociación del complejo.

3.2.2.1. Rol de PKC en la activación de Nrf2

Se han reportado evidencias del papel activo de la proteín-quinasa C (PKC) en la expresión de genes mediados por AREs. La fosforilación de Nrf2 por PKC representa un paso

crítico de la cascada hacia la activación de ARE (Bloom y Jaiswal 2003), ya que promueve la translocación nuclear de Nrf2. Esta fosforilación se da a nivel del residuo de serina 40 del factor de transcripción (Nrf2-ser-40) y facilita su liberación del anclaje citoplasmático de Keap1 (Huang, Nguyen, y Pickett 2002) (figura 6). Se ha evidenciado que el inhibidor de PKC staurosporina bloquea la traslocación nuclear de Nrf2 (Bloom y Jaiswal 2003).

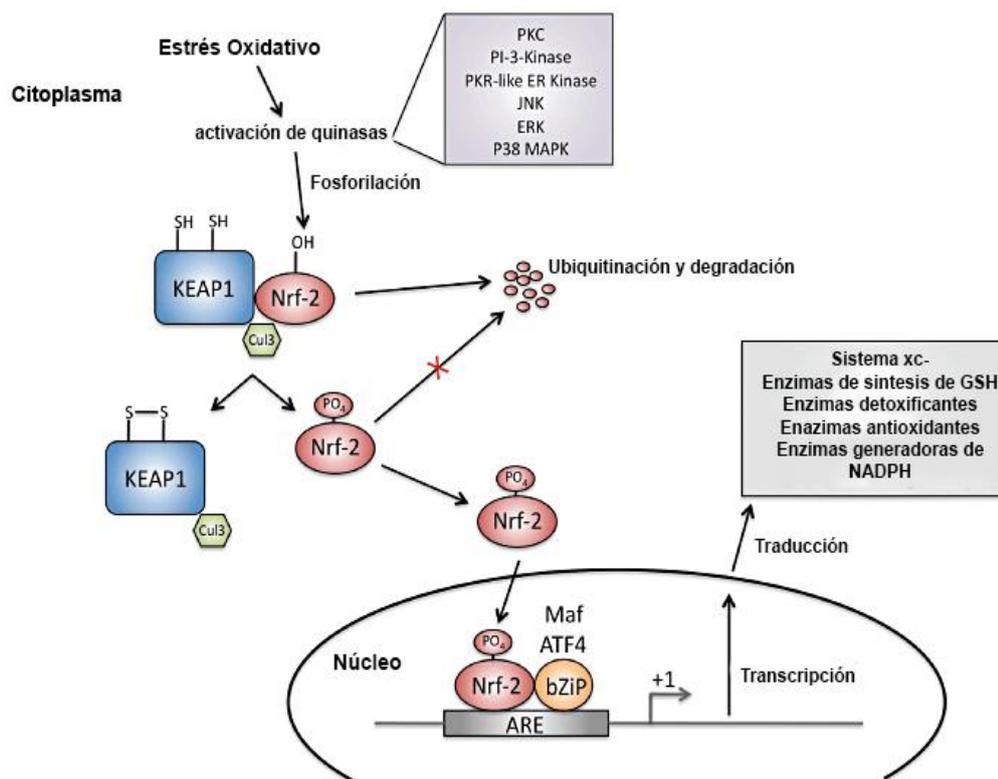


Figura 6: Vía de activación de Nrf2/Are. Bajo condiciones basales, Nrf2 se encuentra unido a Keap1 y continúa una vía de degradación por ubiquitinación de Cul3. La ruptura de esta unión por estrés oxidativo o fosforilación de la serina 40 de Nrf2 mediante proteína quinasas permiten la translocación nuclear del factor, donde puede unirse a proteínas adaptadoras (Mafs y ATF4) e incrementar la transcripción de los Elementos de Respuesta Antioxidantes (modificado de Bridges, Natale, y Patel 2012).

3.2.2.2. Nrf2 como regulador maestro de la respuesta antioxidante.

Nrf2 es el único controlador de las enzimas responsables de la producción de glutatión (revisado por Gorrini, Harris, y Mak 2013) (figura 7). Este factor de transcripción dirige la expresión de:

a) Complejo glutamato-cisteína ligasa (GCL): Consta de dos subunidades, una llamada subunidad cataítica (Gclc) que cataliza la unión γ -carboxilo del glutamato a cisteína. Requiere ATP y Mg^{++} como cofactores, paso que representa la reacción más importante en la generación de glutatión. La otra subunidad se denomina subunidad modificadora (Gclm) e incrementa la velocidad máxima (V_{max}) de reacción y la constante de especificidad (K_{cat}) de la enzima. También disminuye la K_m para glutamato y ATP e incrementa la K_i para la inhibición mediada por el producto GSH (K_i representa la concentración de inhibidor requerida para producir la mitad de la inhibición máxima) (Franklin et al. 2009).

b) Glutatión-reductasa (GSR): cataliza la reducción de glutatión disulfuro (GSSG) a su forma sulfidrilo (GSH). La relación GSSG/GSH representa un factor clave en la mantención del balance oxidativo en las células, ya que es crítico que se mantengan altos niveles de la forma reducida y bajos niveles de su forma oxidada. Este balance se mantiene por la acción de la enzima GSR (Deponte 2013).

c) Intercambiador glutamato/cistina (xCT): Nrf2 también controla la abundancia de cisteína dentro de las células, cuya concentración es limitante para la síntesis de GSH, y la síntesis de otras numerosas moléculas. Esto ocurre a través de la promoción de la expresión de la subunidad de cadena liviana específica del sistema X_c^- , llamada xCT o SLC7A11 (Solute carrier family 7 member 11) (Gorrini, Harris, y Mak 2013).

A su vez, Nrf2 no sólo promueve la síntesis de GSH sino también su utilización, como así también controla la expresión de numerosas enzimas detoxificantes tales como GPX2 y varias glutatión-S-transferasas.

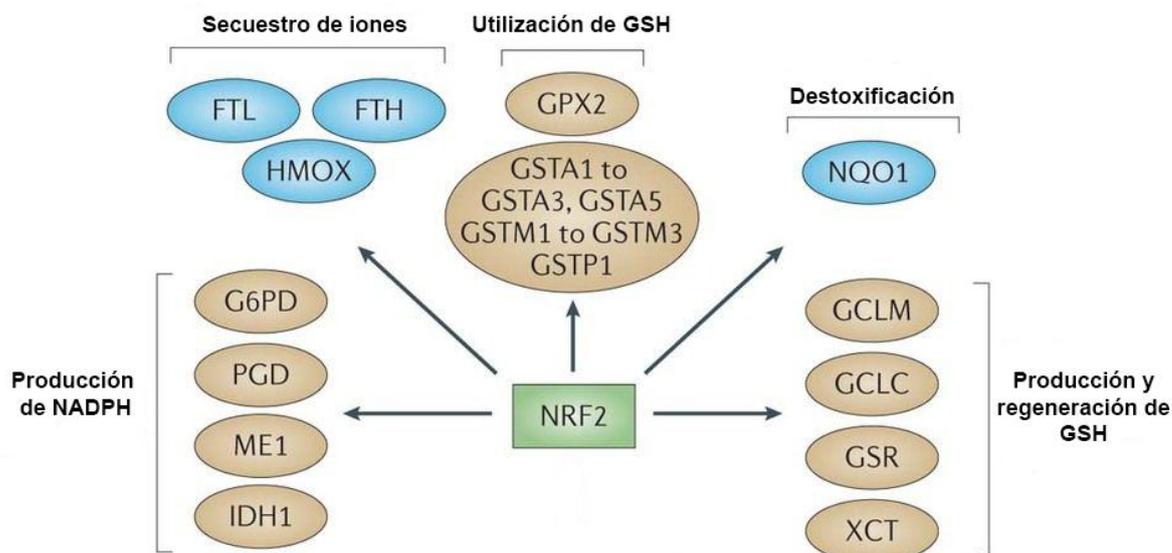


Figura 7: Nrf2 es un regulador maestro de las respuestas antioxidantes. Este factor controla muchas vías antioxidantes diferentes, involucrando las de producción y regeneración de GSH reguladas por la subunidades modificadora y catalítica del complejo glutamato-cisteina ligasa, la subunidad reguladora del transportador cistina-glutamato xCT, y la enzima glutatión reductasa GSR. Por otro lado también regula las vías de utilización de GSH mediante las glutatión-S-transferasas (GSTA1, GSTA2, GSTA3, GSTA5, GSTM1, GSTM2, GSTM3 y GSTP1) y la glutatión peroxidasa 2 (GPX2), así como también la vía de producción de NADPH regulando las glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), fosfoglicerato deshidrogenasa (PHGDH), enzima málica 1 (ME1) e isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1). Factores antioxidantes adicionales incluyen a la NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO1) y a las enzimas responsables de regular el secuestro de iones, como la hemoxigenasa (HMOX1) y las cadenas pesadas y livianas de ferritina (FTH y FTL) (modificado de Gorrini, Harris, y Mak 2013).

4. MAG como puente de señalización bidireccional entre neurona-oligodendrocito

El proceso de mielinización favorece una rápida conducción nerviosa, esencial para la función del sistema nervioso en vertebrados. Además, la mielina posee un rol estabilizador sobre los axones que envuelve, regula el citoesqueleto axonal, contribuye a la organización de los nodos de Ranvier y promueve la supervivencia neuronal. Sin embargo, en condiciones patológicas se ha demostrado que puede inhibir la regeneración axonal luego de una lesión

(revisado por Schnaar y Lopez 2009). Todas estas funciones sugieren una intensa comunicación molecular entre la membrana axonal y la capa de mielina más interna.

Existe abundante evidencia de que esta comunicación involucra la interacción de diversos complejos ligando-receptor capaces de generar una cascada de señalización intracelular que se traduce en cambios en la fisiología neuronal (revisado por Schnaar y Lopez 2009). Una de las moléculas derivadas de mielina que participa en estas interacciones es la “glicoproteína asociada a mielina” (MAG, por las siglas en inglés de Myelin-Associated Glycoprotein), identificada por primera vez en el año 1973 por Richard Quarles, quien la aisló como la principal glicoproteína de extractos de mielina, expresada tanto en sistema nervioso central como en sistema nervioso periférico (Everly, Brady, y Quarles 1973).

4.1. Estructura y expresión de MAG.

MAG, también conocida como Siglec-4, es una glicoproteína integral de tipo 1 de 100 KDa perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF) y miembro de la familia de proteínas de superficie celular denominadas Siglecs, un subgrupo de IgSF que comparten características estructurales y funcionales, entre ellas la capacidad de unión a ácido siálico. La estructura de MAG consiste en un dominio extracelular que media la unión a los axones y contiene cinco dominios de tipo inmunoglobulina (dominios Ig), un segmento transmembrana y un dominio citoplasmático (Quarles 2007)(figura 8).

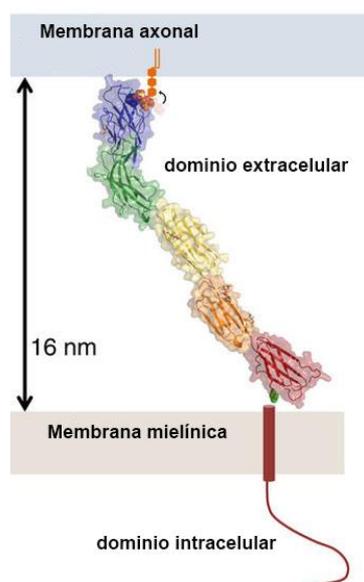


Figura 8: MAG presenta tres zonas porciones distintas: la zona extracelular con 5 dominios IgG, una zona transmembrana y una porción citoplasmática (modificado de Pronker et al. 2016).

En el sistema nervioso, MAG existe predominantemente como dos isoformas que surgen de un empalme alternativo de su mRNA, generando dos proteínas con dominios extracelulares y transmembrana idénticos pero diferentes en la longitud de las porciones citoplasmáticas, lo que les confiere distintas capacidades de señalización. Estas dos formas se denominan S-MAG y L-MAG, presentando un dominio citoplasmático corto y largo, respectivamente.

La expresión de MAG se encuentra regulada temporal y espacialmente en el sistema nervioso. L-MAG predomina durante el desarrollo del SNC y es la forma más abundante durante el proceso de mielinización, mientras que S-MAG se acumula en las etapas posteriores. En el SNP, S-MAG es la forma predominante durante el desarrollo mientras que L-MAG permanece con baja expresión (Inuzuka et al. 1991; Lai et al. 1987; Pedraza et al. 1990; Tropak et al. 1988).

Esta glicoproteína es producida específicamente por células gliales mielinizantes, OLs, células de Schwann y células de Müller en retina. Durante la mielinización, MAG se expresa en los cuerpos y procesos celulares. Luego de completarse el primer bucle de mielina, su expresión se limita a la capa de mielina más interna, en íntimo contacto con la membrana axonal (revisado por Lopez 2014)(figura 9).

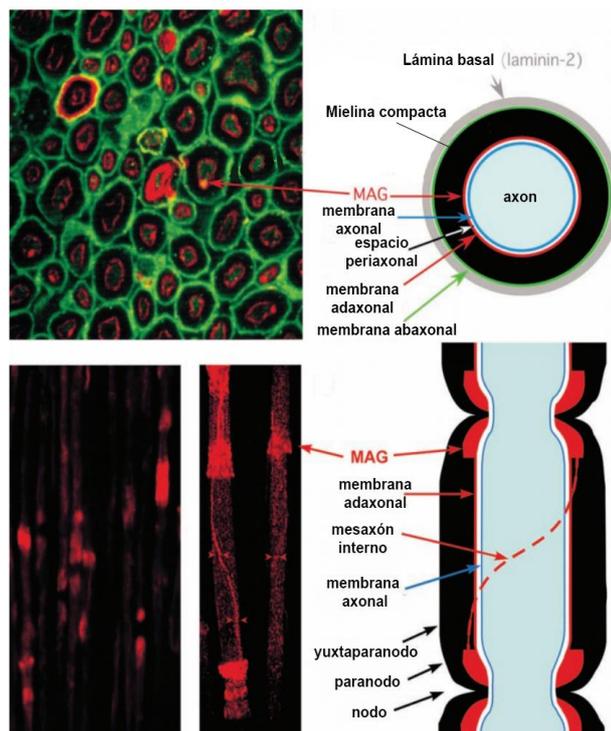


Figura 9: Distribución de MAG en secciones nerviosas mielinizadas. Arriba: imagen confocal de una sección transversal de un nervio ciático de rata, marcado para MAG (rojo) y $\beta 4$ integrina (verde). MAG se localiza en la membrana interna y adaxonal. La organización en circunferencia de MAG se muestra esquemáticamente a la derecha. Abajo: La imagen de la izquierda demuestra la marca de MAG por inmunohistoquímica en una sección longitudinal de nervio ciático. A la derecha se puede observar la organización longitudinal esquemática de la glicoproteína (modificado de Scherer y Arroyo 2002).

4.2. Señalización bidireccional de MAG

4.2.1. Señalización de MAG en neuronas

4.2.1.1. Receptores axonales

Simultáneamente a los primeros descubrimientos de sus funciones, se develó la capacidad de MAG de unirse a sialoglicanos basada en la similitud de su secuencia una familia de proteínas de unión a ácido siálico denominadas siglecs (Kelm et al. 1994). Estos estudios demostraron la alta especificidad de MAG por el terminal oligosacárido NeuAc α 2-3Gal β 1-3 GalNAc (Yang y Col 1996), los cuales son abundantes en dos sialoglicanos predominantes en el cerebro: los gangliósidos GD1a y GT1b, lo que permitió identificarlos como los primeros receptores funcionales reconocidos por MAG (Pan et al. 2005; Vyas et al. 2002).

Posteriormente se describió un nuevo receptor axonal perteneciente a la familia de los receptores nogo (NGRs), que se caracterizan por estar anclados a la membrana plasmática a través de un residuo glicofosfatidil-inositol (GPI). Por otro lado, se han descrito otros receptores funcionales de MAG, tales como PirB, perteneciente a la familia de inmunoglobulinas de tipo B; LRP1, proteína 1 relacionada con la lipoproteína LDL, β -1 integrina y el receptor MAP1B, proteína 1B asociada a microtúbulos (revisado por Lopez 2014)(figura 10).

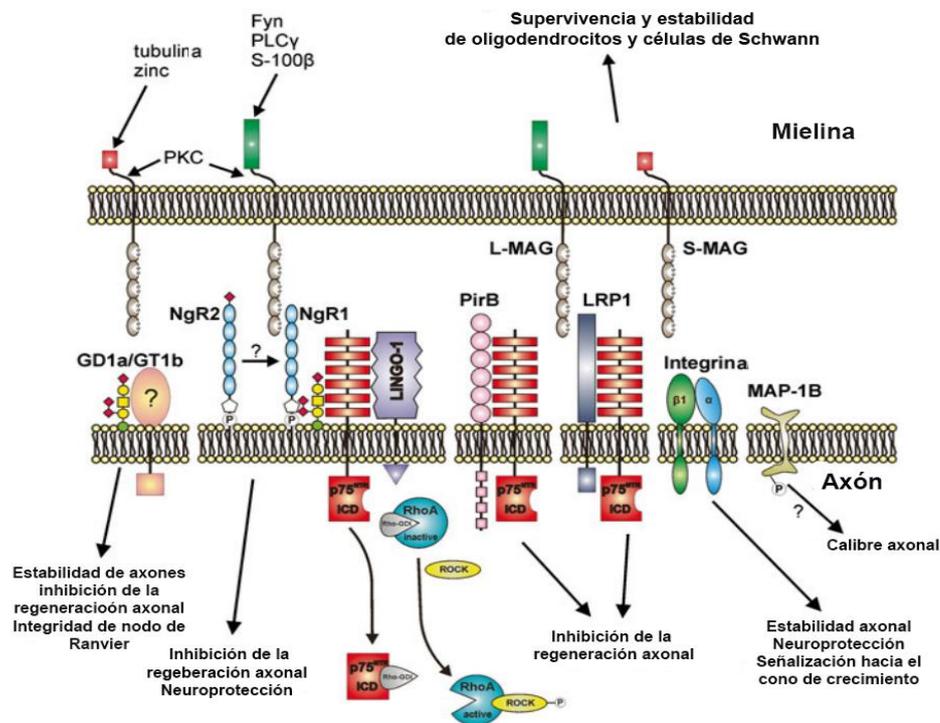


Figura 10: Receptores axonales de MAG y señalización bidireccional. La figura resume el conocimiento que se tiene actualmente acerca de los receptores y mecanismos de señalización asociados con MAG. Al

presente han sido descritos cinco receptores funcionales de MAG que incluyen los gangliósidos complejos (GD1a y GT1b), los receptores Nogo 1 y 2 (NgR1 y NgR2), el receptor de inmunoglobulinas del tipo B (PirB), el receptor β -1 integrina y la proteína 1 relacionada con la lipoproteína LDL (LRP1) (modificado de Lopez 2014).

4.2.1.2. Funciones de MAG sobre neuronas

4.2.1.2.1. Inhibición de la regeneración axonal

El interés en el estudio de MAG se intensificó cuando fue identificado como el primer factor inhibidor de la regeneración axonal derivado de mielina, siendo este rol fue extensamente estudiado en modelos in vitro de cultivos neuronales (DeBellard et al. 1996; Johnson et al. 1989; McKerracher et al. 1994; Mukhopadhyay et al. 1994; Pronker et al. 2016; Tang et al. 2001; Vinson et al. 2001).

Posteriormente se analizaron los posibles receptores de MAG implicados en el rol inhibitorio de la regeneración axonal. En un principio se identificaron a los gangliósidos, principalmente GT1b como los implicados en los procesos inhibitorios de MAG (Vinson et al. 2001; Yang et al. 1996) A su vez se evidenció que el bloqueo de los receptores de tipo NgR inhibe el crecimiento neurítico dependiente de MAG (Domeniconi et al. 2002). Al presente, todos los receptores descritos para MAG están asociados con las señales inhibitorias o repulsivas para el crecimiento neurítico al nivel del cono de crecimiento (revisado por Lopez 2014). Las cascadas de señalización aguas abajo de los receptores se han identificado a través de numerosos trabajos (revisado por Lopez 2014).

4.2.1.2.2. Efectos protectores y estabilizadores de MAG en neuronas

El efecto de MAG como proteína estabilizadora de axones fue descrito gracias a la generación de ratones carentes del gen *mag* (Mag-null). Estos ratones producen abundante

mielina con mínimas alteraciones estructurales, pero muestran una degeneración axonal progresiva de aparición tardía y una reducción del calibre axonal (Montag et al. 1994; Pan et al. 2005; Yin et al. 1998). En 2009, los estudios de Nguyen y colaboradores demostraron por primera vez *in vitro* un rol estabilizador de MAG sobre el citoesqueleto de tubulina y en diferentes modelos de toxicidad axonal (Nguyen et al. 2009). Estudios posteriores posicionaron a los gangliósidos como los receptores involucrados en mediar el efecto protector de MAG sobre axones (Mehta et al. 2010).

De manera interesante, el rol neuroprotector de MAG no se encuentra restringido a los axones que envuelve, si no que de igual manera puede generar eventos de señalización que promueven la supervivencia neuronal en modelos de excitotoxicidad, involucrando los receptores NgRs y β 1-integrinas. (Lopez et al. 2011).

4.2.2. Señalización de MAG en el oligodendrocito

La localización de MAG en estructuras no compactas de mielina en donde hay presencia de citoplasma, en adición a la existencia de varios sitios de fosforilación dentro de los dominios citoplasmáticos de MAG han conducido a la hipótesis de que esta proteína, especialmente en su isoforma larga, podría poseer un rol en la transducción de señales, tanto dentro de la célula glial como entre ésta y las neuronas (Petri. Kursula 2000).

A diferencia de las vías de señalización de MAG hacia las neuronas, los efectores aguas abajo de la glicoproteína se encuentran poco estudiados en las células oligodendrocitarias. Estudios llevados a cabo para definir el rol de MAG en la transducción de señales identificaron sitios de fosforilación de serinas comunes para L-MAG y S-MAG en sus regiones yuxtamebrana, así como también sitios adicionales específicos de fosforilación de serinas y tirosinas en la isoforma larga. El sitio de fosforilación de tirosinas más importante de L-MAG reside entre los últimos 21 aminoácidos del extremo carboxilo (Jaramillo et al. 1994). Sumado a estos reportes, se ha reconocido un sitio tirosina-620 que, al encontrarse fosforilado, interactúa específicamente con los dominios SH2 de la fosfolipasa C (PLCy) (Jaramillo et al. 1994). A su vez, MAG también puede unirse específicamente a la tirosin-quinasa Fyn.

Estos datos sugieren que MAG actúa como una proteína andamio que permite la interacción entre diferentes moléculas de señalización (Jaramillo et al. 1994). Fortaleciendo esta hipótesis, posteriormente se caracterizaron otros factores que pueden interaccionar con la glicoproteína. S-MAG puede interaccionar con zinc y tiene unión directa con tubulina (Kursula, Lehto, y Heape 2001). A su vez, se ha demostrado la interacción entre L-MAG y S100b, una proteína de unión a Ca^{+2} importante en numerosos procesos celulares. Adicionalmente se ha reportado que L-MAG puede ser fosforilada por la proteína quinasa A (PKA) entre los aminoácidos 573 y 626 (Kursula 2000) así también como por PKC en el caso de ambas isoformas (Kirchhoff, Hofer, y Schachner 1993), aunque la relevancia funcional de estos procesos permanece incierta (figura 11).

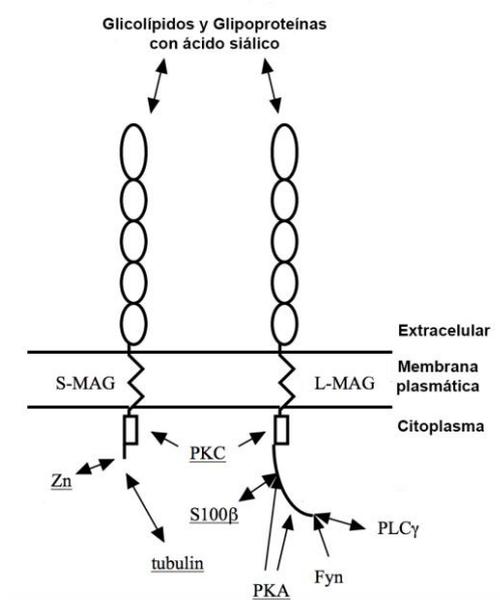


Figura 11: Factores citoplasmáticos con interacción a MAG identificados (modificado de Petri, Kursula 2000).

4.2.2.1. Activación farmacológica de MAG en el oligodendrocito

4.2.2.1.1. Efectos protectores de Anti-MAG mAb ¿Sólo regeneración axonal?

Los estudios de MAG como inhibidor de regeneración axonal contemplaron el uso de herramientas para dilucidar su función, entre las cuales se desarrollaron anticuerpos anti-MAG con el fin de bloquear el efecto inhibitorio específico de la glicoproteína en los procesos de regeneración del axón (Johnson et al. 1989; McKerracher et al. 1994; Mears, Schachner, y Brushart 2003; Mukhopadhyay et al. 1994; Tang et al. 2001; Vinson et al. 2001; Wong et al. 2003).

El anticuerpo monoclonal anti-MAG proveniente del clon murino 513 o anticuerpo 513 (nombrado anticuerpo anti-MAG o anti-MAG mAb en el desarrollo de la tesis) ha sido extensivamente usado como una herramienta para estimular la regeneración axonal y sus efectos benéficos han sido demostrados tanto en cultivos primarios de neuronas (Johnson et al. 1989; L. McKerracher et al. 1994; Mears, Schachner, y Brushart 2003; Tang et al. 2001) como en modelos animales (Irving et al. 2005; Thompson et al. 2006).

Los resultados de la administración del anticuerpo anti-MAG en modelos animales de injuria traumática cerebral reportaron una mejora en la recuperación sensorio-motriz, progresos en la función cognitiva y disminución en la pérdida de tejido (Thompson et al. 2006). En modelos de isquemia por oclusión de arteria cerebral medial en ratas, el tratamiento demostró ser efectivo disminuyendo los volúmenes de lesión, con una robusta mejora de la función motriz (Irving et al. 2005), como así también en la función nerviosa y en el desempeño en pruebas motrices de cajas con escaleras (Cash et al. 2016).

De manera interesante, la administración de este anticuerpo no sólo posee la capacidad de neutralizar el efecto inhibitorio de MAG en neuronas, sino que también puede proteger directamente a los OLs de la muerte por estrés oxidativo mediado por glutamato (Irving et al. 2005)(figura 12), a partir de lo cual se hipotetizó que este anticuerpo podría ejercer efectos protectores paralelos a la promoción de la regeneración axonal. De hecho, la mayoría de los efectos observados en animales parecen ser muy tempranos como para ser atribuidos a procesos de regeneración (Barbay et al. 2015; McKerracher y Rosen 2015), lo cual sugiere que el anticuerpo poseería un efecto protector adicional que se da de manera rápida y todavía no ha sido dilucidado.

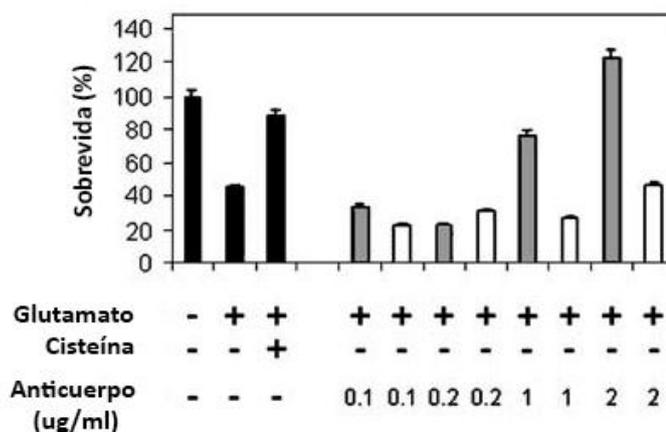


Figura 12: El tratamiento con anticuerpo anti-MAG es eficaz al proteger OLS cultivados in vitro frente a toxicidad por sobrecarga glutamatérgica (2mM). La adición de cistina al medio también puede aumentar la supervivencia, indicando que el glutamato induce un efecto de estrés oxidativo por eliminación de la incorporación intracelular de cistina. Columnas grises, anticuerpo anti-MAG; columnas blancas, anticuerpo control (modificado de Irving et al. 2005).

4.2.2.1.2. Anticuerpo anti-MAG como estrategia de unión/activación

El descubrimiento de que los efectos protectores de MAG podrían no ser resultado directo de procesos de regeneración axonal llevó a hipotetizar, teniendo en cuenta la bidireccionalidad de la señalización de MAG, que podrían atribuirse a procesos generados en los OLS por activación de esta glicoproteína debido a la unión con su anticuerpo monoclonal, simulando su unión a sus correspondientes receptores neuronales. Estudios previos han dado fuerza a esta hipótesis. Con el objetivo específico de analizar las moléculas de señalización en el oligodendrocito involucradas en la interacción axo-glial, el anticuerpo anti-MAG se utilizó como una estrategia de activación de MAG mimetizando la unión axonal. Estos resultados demostraron que, en efecto, la unión del anticuerpo con MAG en la superficie del oligodendrocito conlleva a una redistribución de la glicoproteína en complejos insolubles en detergente (asociados a balsas lipídicas y citoesqueleto), hiperfosforilación de Fyn, desfosforilación de residuos serina y treonina de proteínas específicas, como la lactato

dehidrogenasa y la subunidad β del complejo trimérico de proteína G, y el clivaje de α -fodrina seguido de una despolimerización transiente de actina (Marta et al. 2004).

Objetivos e Hipótesis

Objetivo general

El proceso de mielinización promueve una rápida conducción nerviosa y además posee un rol estabilizador sobre los axones que envuelve, lo cual sugiere una intensa comunicación molecular entre la membrana axonal y la capa de mielina más interna. Uno de los principales componentes de mielina que media estos efectos es la glicoproteína asociada a mielina (MAG), expresada selectivamente por células mielinizantes en la capa de mielínica más interna, en contacto directo con los axones. A su vez, MAG posee la capacidad de mediar las señales desde los axones que impactan sobre los oligodendrocitos. De esta manera, la glicoproteína representa un factor clave en bidireccionalidad de las interacciones axon mielínicas, llevando a cabo funciones múltiples en la fisiología y patofisiología en neuronas y células gliales.

Si bien al presente una gran cantidad de estudios han confirmado la multifuncionalidad de MAG sobre las neuronas, establecido tanto los receptores axonales que median los efectos como también las vías de señalización asociadas con los mismos, consideramos que es importante indagar en las vías de señalización desencadenadas por la activación de MAG sobre el oligodendrocito, que hasta el momento han sido escasamente estudiadas.

El presente plan de trabajo se propone estudiar el mecanismo y las bases moleculares del efecto protector contra estrés oxidativo que ejerce MAG sobre oligodendrocitos. Esta función protectora de MAG, activada a través de la unión con un anticuerpo anti-MAG en la membrana, confiere resistencia a la toxicidad mediada por glutamato y adicionalmente incrementa la supervivencia neuronal. Estos estudios, además de clarificar la importancia de la interacción axón-mielina en la estabilidad y supervivencia tanto de oligodendrocitos como de neuronas, brindan la posibilidad de potenciar este efecto protector de MAG, y al mismo tiempo generan una oportunidad para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas tendientes a contrarrestar los efectos nocivos del glutamato en patologías del SNC

Hipótesis

Como parte de la interacción axón-glia, la modulación de MAG cumple un rol crucial en ejercer efectos protectores tanto en neuronas como en oligodendrocitos mediante la activación de una vía de señalización intracelular en las células mielinizantes que impacta sobre las defensas antioxidantes y la regulación de la concentración de glutamato extracelular en la sustancia blanca del SNC y por lo tanto en la sobrevida tanto de oligodendrocitos como de neuronas.

Objetivos específicos

1. Determinar el mecanismo por el cual el tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-MAG (clon 513) incrementa la resistencia a la toxicidad inducida por glutamato en modelos in vitro.
2. Analizar los componentes de la vía de señalización intracelular asociada a la estimulación de MAG en la membrana del oligodendrocito.
3. Caracterizar los receptores axonales de MAG capaces de estimular su efecto protector frente a condiciones de estrés oxidativo en oligodendrocitos.
4. Analizar el efecto de la activación de MAG mediante su modulación con el anticuerpo anti-MAG en la sobrevida de oligodendrocitos y neuronas en modelos animales cuya etiología involucre mecanismos de excitotoxicidad.

Materiales y métodos

1. Experimentos in vitro

1.1. Cultivo primario de oligodendrocitos

Con el objetivo de obtener oligodendrocitos purificados desde tejidos de rata, se utilizó un protocolo previamente descrito (Mecha 2011) con algunas modificaciones menores. Se disecaron los hemisferios cerebrales de ratas de cero a dos días postnatales (P0-P2). En condiciones de esterilidad, se procedió a la remoción de meninges y posteriormente a la disociación mecánica utilizando una pipeta Pasteur previamente absorbida en suero. Las células resultantes fueron recuperadas por centrifugación, resuspendidas en medio de crecimiento (DMEM/F12, 10% suero esquino inactivado, 2% suero fetal bovino inactivado, 1% glutamax, 15mM glucosa, 1% penicilina/streptomicina) y sembradas en frascos de plástico de 45cm² previamente tratados con poli-L-lisina. Luego de completar once días de incubación (37°C 5% CO₂) se obtuvo un cultivo mixto consistente en células progenitoras de oligodendrocitos (OPCs) y microglía creciendo sobre una monocapa de astrocitos. La purificación de oligodendrocitos se realizó a través de un proceso de agitación orbital a 260 rpm por 16 horas, previa eliminación de la población microglial mediante agitación a 50 rpm por 45 minutos y recambio de medio. La suspensión celular resultante se transfirió a una cápsula de Petri por 24 horas para eliminar células adherentes contaminantes (microglía o astrocitos). Transcurridas las 24 horas, las células en suspensión fueron colectadas por centrifugación (1000 rpm por 10 minutos) y resuspendidas en medio de crecimiento. Las células se sembraron en gota sobre vidrios estériles de 12mm de diámetro tratados con poli-L-lisina a una densidad de 30.000 células por vidrio. Transcurridas dos horas, el medio fue reemplazado por medio de crecimiento de oligodendrocitario (DMEM/F12, 1% suplemento N1, 1% glutamax, 15 mM glucosa, 1% suero fetal bovino inactivado, 1% penicilina/streptomicina, 10nM biotina, 5 ng/ml PDGF-AA, and 5 ng/ml bFGF). Para estimular la

maduración, los factores de crecimiento se depletaron dos días luego del sembrado de los oligodendrocitos. Para el diseño experimental, los cultivos primarios purificados se mantuvieron en cultivo por cuatro días.

1.2. Cultivo organotípico de cerebelo

El cerebelo de ratas postnatales de 7 a 9 días fue removido y colocado en medio de disección que consistente en HBSS, bicarbonato de sodio (4,3 mM), Hepes (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazine-1-ethanesulfonic, 10 mM), D-glucosa (33,3 mM), sulfato de magnesio (5,8 mM), 0,03% albúmina sérica bovina y penicilina/estreptomicina a 4°C. Luego, las meninges fueron removidas y el tejido se seccionó en lonjas de 250 µm de espesor usando un cortador de tejido. A continuación las secciones (5 por pocillo en una placa de 6 pocillos) fueron transferidas a insertos de cultivo celular (millicell-PCF 0,4 µm, Millipore) y cultivadas por una semana en incubador al 5% de dióxido de carbono a 37°C en 50% de DMEM suplementado con 25% de HBSS, 25% de HI-HS, Hepes (25 mM), D-glucosa (35 mM), glutamina (2 mM) y penicilina/estreptomicina (1x) hasta el momento de los tratamientos.

1.3. Tratamiento de cultivos

El anticuerpo monoclonal anti-MAG (clon 513) se purificó desde células de hibridoma (Poltorak et al. 1987). La dosis de anticuerpo para los tratamientos de cultivos de oligodendrocitos fueron elegidas en previos trabajos in vitro que describen una sobrevida máxima de oligodendrocitos frente a glutamato administrando el anticuerpo a 2µg/ml (Irving et al. 2005). Como control se utilizó la misma dosis de un anticuerpo del correspondiente subtipo de inmunoglobulina (IgG1 anti C-Myc, clon 9E10), que no posee efectos sobre los sistemas empleados en los estudios.

Para estimular la toxicidad por glutamato en cultivos se utilizó ácido L-glutámico (Sigma, cat G1251) disuelto en DMEM (8,6mg/ml) en una concentración final de 2mM de acuerdo a lo

expuesto por Irving et. Al. (Irving et al. 2005). En casos de combinación con el tratamiento con anticuerpo, el glutamato se administró 24 horas luego de la activación de MAG.

En el caso de tratamiento con gangliósidos, todos los utilizados se administraron ligados a BSA 24 horas antes de la fijación de los cultivos. GT1b10-BSA, GM317-BSA y GM115-BSA fueron previamente caracterizados y donados generosamente por el laboratorio de Dr. Ronald Schnaar, Universidad de Johns Hopkins, Estados Unidos.

1.4. Inhibidores farmacológicos

La concentración del inhibidor de el sistema X_c^- , L-2 ácido aminoacético (AAA) fue elegida en base a una curva piloto de dosis-respuesta desde 0,6mM a 2.5mM. La concentración final de 0.6 mM fue efectiva sin afectar la viabilidad de los oligodendrocitos. El inhibidor de los transportadores de glutamato L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxilato (PDC) se administró a una concentración final de 300 μ M de acuerdo a trabajos previamente publicados en oligodendrocitos (DeSilva et al. 2009). El inhibidor selectivo de PKC, calphostina C se utilizó a 50 nM de acuerdo a bibliografía previa (Baron et al. 2000; DeSilva et al. 2009). El inhibidor de PLC, U-73122 se administró a una concentración de 10 μ M, basada en el rango de actividad previamente descrito para oligodendrocitos (Deng et al. 2004; Gudz 2006)

Todos los inhibidores utilizados fueron administrados 60 minutos antes del tratamiento con anticuerpo anti-MAG o anticuerpo control.

1.5. Cuantificación de glutatión intracelular

El método de monochlorobimane (mCBI) provee una vía de evaluación específica del contenido intracelular de glutatión reducido en cultivos primarios gliales

(Chatterjee et al. 1999; Keelan et al. 2001). Para realizar el correspondiente análisis, los cultivos primarios fueron tratados con 60mM de monoclorobirmano por 20 minutos. Luego de lavar con PBS y fijar con 4%PFA + 0,2% glutaraldehído por 10 minutos, los oligodendrocitos fueron marcados mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo para O4, un marcador

de oligodendrocitos maduros que permite delimitar los cuerpos celulares y los procesos de las células analizadas, o anticuerpo anti-MAG para identificar células positivas para la expresión de la glicoproteína. Las imágenes de mCBI intracelular en OLs se obtuvieron mediante microscopia confocal (Olympus Fluoview 1000 microscopio espectral, laser 450 nm, objetivo 60x, 1.4 N/A). La intensidad media de fluorescencia del canal azul (mCBI) de los cuerpos celulares de las células se calculó utilizando el software Fiji en imágenes crudas.

1.6. Análisis de producción de especies reactivas de oxígeno

Los cultivos primarios de OLs maduros se transfectaron con el vector de expresión en mamíferos pHyPer-dMito (cat FP942 evrogen) que codifica para el biosensor HyPer y le confiere expresión mitocondrial. Este sensor (Belousov et al. 2006) posee afinidad micromolar a la producción específica de peróxido de hidrógeno. En ausencia de peróxido, HyPer posee dos picos de excitación con máximos a los 420 y 500nm y un sólo pico de emisión con un máximo de 516 nm. Bajo la producción mitocondrial de peróxido, el pico de excitación de 420 nm disminuye proporcionalmente al aumento del de 500nm, permitiendo de esta manera la medición radiométrica de la presencia de esta sustancia.

Luego del tratamiento control o con el anticuerpo anti MAG, los cultivos se fijaron y se prepararon para el análisis radiométrico mediante el microscopio confocal espectral Olympus Fluoview FV1000 objetivo 60x, objetivo 1.4 N/A, que consistió en la excitación con longitudes de onda de 488 y 405 nm. La emisión se colectó en un rango de 500-520 nm en ambos casos. Mediante Fiji, la imagen de la fluorescencia emitida bajo la excitación a 488nm se dividió por la de la emisión bajo la excitación a 405 (488:405). Por último, para generar un mapa de producción de H₂O₂, el ratio 488:405 se dividió por una máscara binaria para las mitocondrias de los OL y se procedió a la cuantificación de los valores arrojados.

1.7. Análisis de niveles de glutamato por FRET

Con el objetivo de lograr un análisis cualitativo de las concentraciones de glutamato en oligodendrocitos, se utilizaron plásmidos desarrollados por Okumoto (Okumoto et al. 2005). Estos plásmidos contienen las secuencias codificantes para un sensores FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster) que responden a la presencia de glutamato. En estos sensores, la proteína indicadora fluorescente para glutamato (FLIPE) consiste en una fusión de ybeJ, una proteína de unión a glutamato de *Escherichia coli*, junto a las proteínas fluorescentes ECFP y Venus. En este complejo, la presencia de glutamato genera un cambio de conformación que separa las proteínas fluorescentes, disminuyendo la eficiencia de FRET en las células. Existen sensores que responden a diversos rangos de concentraciones de glutamato, generados mediante mutaciones en residuos que rodean al sitio de unión ybeJ.

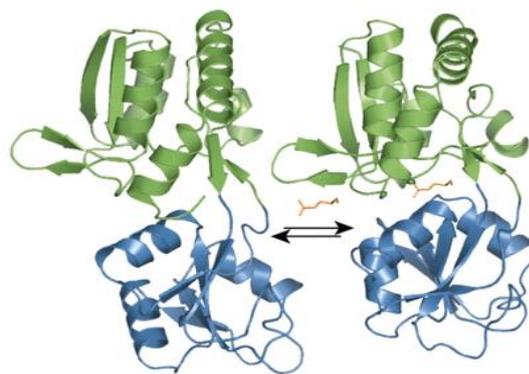


Figura 13: Estructura general de los sensores FRET para glutamato, mostrando cambio de conformación por la presencia y unión del aminoácido. Verde: dominio N terminal, azul: segundo dominio, naranja: glutamato. (figura original de Okumoto et al. 2005)

Para registrar los cambios de glutamato en el espacio extracelular cerca de la membrana plasmática del oligodendrocito, se utilizó la versión pDisplay FLIPE-1m (Plasmido #13548, addgene). Este sensor puede expresarse en la membrana plasmática, exponiendo las proteínas fluorescentes hacia la cara externa y de esta manera sensando el glutamato presente en microambiente extracelular cercano a la membrana. Esta variante, menos sensible, puede reconocer concentraciones de glutamato de hasta 20mM.

Para el registro de los cambios en el glutamato citoplasmático, las células se transfectaron con una versión de expresión citosólica, pcDNA3.1 FLIPE-10u (Plasmido #13542, addgene), que permite analizar cambios de glutamato a nivel micromolar.

Los plásmidos fueron transfectados utilizando lipofectamina 2000 (2ul de lipofectamina y 0,8 ug de ADN en un volumen final de 80ul por vidrio) antes del tratamiento correspondiente con anticuerpo anti-MAG. 23 horas después, las células fueron tratadas con 2mM de glutamato y posteriormente fijadas con 4% PFA por 20 minutos. Para el análisis de glutamato extracelular, el tratamiento con glutamato tuvo 1 hora de duración, mientras que para el citosólico los tiempos se acortaron a 30 minutos, ya que luego de ese tiempo los resultados se ven afectados por la metabolización intracelular del aminoácido. Luego de la fijación, las células fijadas fueron montadas en mowiol y procesadas para el cálculo de FRET mediante el método de análisis radiométrico.

Para el sensor de membrana, las imágenes de los canales CFP y FRET se obtuvieron mediante un microscopio de disco giratorio (DSU) con láser multilínea de Argon de 40 mw Modelo 35-IMA 040-220 de CVI MellesGriot, usando un objetivo de inmersión 60x con 1,42 de apertura numérica, haciendo foco en la membrana celular adaxial, opuesta a la unida al sustrato. Para el análisis intracelular las imágenes se generaron mediante cortes confocales utilizando el microscopio espectral Olympus Fluoview 1000 con objetivo de inmersión 60x. En ambos casos se adquirió un par de imágenes de manera simultánea: la del canal del donador (excitación del donador y adquisición en el canal del donador: 480-495 nm) y la del canal de FRET (excitación del donador con láser de 458nm y adquisición en el canal del aceptor: 535-565 nm).

El procesamiento de las imágenes y el cálculo del mapa de FRET fueron realizados usando el programa Fiji. El cálculo del mapa de FRET se realizó mediante la siguiente formula:

$$\text{Mapa de FRET} = \text{Canal de FRET} / \text{canal donador}$$

En primer lugar, el canal de FRET, que posee la relación más alta entre señal y ruido y por lo tanto provee la mejor distinción entre las células y el fondo, se utilizó para generar una máscara binaria con valor 0 fuera de la célula y 1 dentro de ella. Luego de la multiplicación por esta máscara, la imagen del canal FRET se dividió por la imagen del canal donador para obtener así un

mapa de la eficiencia FRET reflejando la presencia de glutamato en los oligodendrocitos. Las cuantificaciones se realizaron seleccionando las áreas de interés de las células (procesos y soma en el caso del sensor citoplasmático y célula total en el del sensor de membrana).

Los resultados se expresaron como cambios en la eficiencia de FRET respecto al FRET basal de células controles (Δ FRET/ FRET control).

1.8. Inmunofluorescencia

Los cultivos organotípicos se fijaron por 1 hr en paraformaldehído 4% (PFA) seguido de 3 lavados con PBS. Luego de la recuperación antigénica (Citrato de sodio 10mM 0,05% Tween-20 pH 6 a 60°C por 30 min) los cultivos se incubaron por 6 hrs. a temperatura ambiente en solución de bloqueo (1mmol/L HEPES, 2% NHS, 10% SFB, 1% BSA, 0,25% tritón x-100 en HBSS). Los anticuerpos primarios (anti-NeuN, Chemicon MAB377, 1:1000, anti-caspasa-3 clivada, 1:500, Cell Signalling Asp175) se añadieron en solución de bloqueo. Luego de una incubación de 48 horas a 4 °C, se procedió al lavado con PBS, al agregado de anticuerpos secundarios (Alexa Fluor 488-burro anti-conejo, 1:1000, Cy3-burro anti-ratón, 1:1000; Jackson Immunoresearch Laboratories) en PBS por 24 horas a 4 °C y a la incubación con 3 μ M Dapi por 1 hr. Por último los cultivos fueron lavados y montados en Mowiol.

Por su parte los cultivos primarios se fijaron con PFA 4% por 20 min. y se permeabilizaron por 10 minutos con 0,2% de Tritón X-100. El paso de permeabilización se omitió en casos de inmunocitoquímica de proteínas de membrana. Luego de un bloqueo con 10% NHS en PBS por 1 hr., los Ols se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios (anti-O4, Neuromics, MO15002, 1:500, anti x-CT, Abcam, ab60171, 1:500, anti-Ser-40-Nrf2, Bioss, bs-2013R, 1:200, anti-MAG mAb clon 513, 1:300) durante toda una noche en 5% NHS y PBS a 4° C. Luego de los lavados, se agregaron los correspondientes anticuerpos secundarios (Cy3-burro anti-ratón, 1:1000; Alexa Fluor 488-burro anti ratón, Cy3-burro anti-conejo, 1:1000, Alexa Fluor burro anti-cabra, 1:1000; JIL) en PBS por 4 hrs a temperatura ambiente y por último se procedió al lavado y montado en Mowiol.

1.9. Análisis de activación de Nrf2 y expresión de xCT por inmunocitoquímica

Para analizar la activación del factor de transcripción Nrf2, se utilizó un anticuerpo que presenta unión específica hacia el factor de transcripción Nrf2 fosforilado en su serina 40 (Nrf2-ser 40, forma activa). Luego de los tratamientos, los cultivos primarios de OLs fueron fijados y marcados mediante inmunocitoquímica para MAG y Nrf2 –ser40. Para distinguir la porción nuclear de las células se realizó una marcación con DAPI. Se tomaron imágenes confocales mediante un microscopio espectral Olympus Fluoview 1000, objetivo 60x, 1.4 N/A. Los OLs fueron escaneados por todo su volumen celular utilizando cortes ópticos de 1µm. La información de la serie de imágenes de Nrf2-ser 40 para cada célula se colapsó en una proyección Z (función sum slices) mediante el software Fiji. En aquellas células positivas para MAG, se delimitó un ROI (región de interés) del núcleo utilizando el canal de DAPI. El ROI nuclear fue redirigido a la imagen colapsada de Nrf2 para obtener el valor medio de fluorescencia del factor de transcripción en la zona nuclear de los oligodendrocitos.

El análisis de expresión de xCT en cultivos se llevó a cabo en una manera similar. Las intensidades de fluorescencia medias de la proyección Z del conjunto de cortes ópticos de 1µm se analizaron utilizando una máscara binaria que contuviera procesos y soma de las células.

1.10. Western Blot

Los cultivos primarios de OL se homogenizaron en buffer RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,2, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% dodecilsulfato sódico (SDS) y 1% de deoxicolato sódico), conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma, P8340). Los homogenatos fueron sonicados durante 20 segundos y centrifugados a 4°C durante 10 min a 14.000 x g. Se determinó la concentración de proteínas totales en sobrenadante utilizando un ensayo de ácido bicinonínico (BCA, Pierce, Rockford, IL, US). A continuación, las muestras fueron diluidas en buffer Laemmli 4x (8% SDS, 40% glicerol, 20% 2-mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol) equivalente a 0,25 volúmenes de muestra y estas se incubaron durante 5 min a 100°C. 50 µg de proteína total por muestra fueron separadas mediante electroforesis en geles de 12% de acrilamida/bisacrilamida conteniendo 12% de SDS. La electroforesis se realizó en un buffer conteniendo 25 mM Tris, 192 mM glicina y 1 % SDS, y el gel fue corrido

electroforéticamente a un voltaje constante de 100V, durante 90 min. Una vez finalizada la electroforesis, las muestras fueron transferidas desde el gel a membranas de nitrocelulosa (Bio Rad) en un buffer igual al usado en el paso anterior, pero conteniendo 20% de metanol. La transferencia se llevó a cabo durante 90 min a un amperaje constante de 250 mA. Una vez transferidas las proteínas, las membranas fueron teñidas con una solución de 0.1% Ponceau S (Sigma) en 5% de ácido acético con el fin de visualizar la correcta transferencia, lavadas y bloqueadas con 5% de leche en TBS con 0,05% de Tween 20 (TBS/Tween) durante 1 hora. La incubación se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti-Ser-40-Nrf2, Bioss, bs-2013R, 1:500 diluido en TBS/Tween con 1% de leche. Luego de la incubación, el anticuerpo fue removido y las membranas recibieron 3 lavados de 10 min con TBS/Tween para posteriormente incubarlas con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa anti-IgG de conejo (IgG-HRP, Bio- Rad, Hercules, CA, US) en una dilución 1:5000, con 1% de leche descremada en TBS/Tween durante 1 hora a temperatura ambiente. Como control de carga se utilizó un anticuerpo policlonal anti-alfa-tubulina (NS-1) diluido 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) y reveladas con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa anti-IgG de ratón (anti-ratón IgG-HRP de cabra, Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grove, PA, USA) en una dilución 1:5000. Finalmente, las membranas fueron reveladas mediante quimioluminiscencia utilizando un kit comercial (ECL, Amersham Life Science). La presencia de las bandas se detectó mediante autoradiografía utilizando placas radiográficas de uso médico (Agfa X-ray film, Buenos Aires, Argentina).

Las autoradiografías fueron luego digitalizadas por medio de un scanner y el análisis densitométrico de las bandas se realizó mediante el uso del software Fiji. Los valores densitométricos de las proteínas de interés se normalizaron con respecto a los del anticuerpo anti-alfa-tubulina.

1.11. Purificación de ARN y PCR en tiempo real

El ARN total se extrajo de cultivos primarios de oligodendrocitos maduros mediante el uso de Trizol (Invitrogen) a 4°C y fue purificado de acuerdo al protocolo del fabricante y cuantificado por espectrofotometría (NanoDrop, Thermo Scientific) a 260 nm. La pureza del RNA se evaluó

mediante la relación 260/280 nm. El ARN total fue tratado con DNAsa I (Invitrogen). Luego, se utilizaron 1,5 ug de ARN para llevar a cabo la reacción de transcripción reversa en un volumen total de 20 ul utilizando un kit comercialmente disponible (Superscript III First-Strand Synthesis System, Invitrogen) empleando hexámeros aleatorios.

Para la PCR en tiempo real (rt-PCR) se diseñaron sets de cebadores (primers) mediante el software Primer3plus que permitieran la amplificación específica en la especie *Rattus norvegicus* de Glutatión reductasa (NM_053906.2), subunidad xCT del sistema x_c^- (NM_001107673.2), subunidad catalítica de la enzima glutamato-cistein ligasa (NM_012815.2), subunidad moduladora de glutamato cisteín-ligasa (NM_017305.2). También se utilizaron primers para amplificar los distintos transportadores de glutamato descriptos en oligodendrocitos, GLAST (NM_019225.2), GLT1 (NM_017215.2) y EAAC1 (NM_013032.3).

El gen para la proteína ribosomal l13a, Rpl13a (NM_173340.2) fue elegido como gen de referencia (housekeeping) teniendo en cuenta un estudio de comparación de genes de referencia para rt PCR en oligodendrocitos de rata (Nelissen et al. 2010). Todos los cebadores utilizados se encuentran especificados en la Tabla 1.

abreviatura	gen	nomenclatura	secuencia 5'-3'	Tm	concentración	producto
GSR	glutatión reductasa	NM_053906.2	F cccgatgtatcacgctgtga R tggatgccaaccactttctc	60 °C	400 nM	90 pb
Xc-	subunidad xCT del sistema Xc-	NM_001107673.2	F tactctgcaggccaatgtgag R tgaagatgcccgatccgatg	60 °C	400 nM	148 pb
Gclm	Glutamato-cistein ligasa Subunidad modificadora	NM_017305.2	F gaaaaagtgtccgtccacgc R ggctgattgggagctccat	60 °C	400 nM	83 pb
Gclc	Glutamato-cistein ligasa subunidad catalítica	NM_012815.2	F accagtggccactatctgc R tctgacacgtagcctcgga	60 °C	400 nM	76 pb
GLAST	Transportador glutamato aspartato	NM_019225.2	F ctggtaacccggaagaacc R gtgatcgctttgccacacc	60 °C	400 nM	146 pb
GLT1	Transportador de glutamato 1	NM_017215.2	F cagattcgtcctcccagtcg R tcgccagagttctgtaagg	60 °C	400 nM	149 pb
EAAC1	Transportador de glutamato EAAC1	NM_013032.3	F atccactccctcgtagtgct R gtaactggaagggtgccga	60 °C	400 nM	137pb
Rpl13a	Proteína ribosomal L13A	NM_173340.2	F ggatccctccaccctatgaca R ctggtacttccaccgacctc	60 °C	400 nM	131pb

Tabla 1: lista de primers usados en ensayos de rtPCR

Cada muestra se ensayó por duplicado en una placa óptica de 48 pocillos (Applied Biosystems) utilizando una concentración 400nM de cada set de primers, 2X SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems) y 10ng de cADN en un volumen total de 20 ul. La amplificación de llevó a cabo en el equipo Step One™ Real Time PCR System (Applied Biosystems) con

condiciones universales de ciclado (10 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 15 seg a 95 °C y 60 seg at 60 °C).

Los datos se analizaron mediante el método comparativo $\Delta\Delta Ct$. Para validar el método, se realizaron las correspondientes curvas de calibración utilizando 4 puntos de diluciones 1:3. Los valores CT de las muestras de cultivo cayeron en el rango lineal dinámico de la curva de calibración. La amplificación fue seguida por una curva de melting para analizar la especificidad del producto y la ausencia de dímeros de cebadores.

Los niveles de expresión de cada ARNm y sus errores asociados se calcularon utilizando fórmulas matemáticas recomendadas por el manual de uso de Applied Biosystems (Applied Biosystems User Bulletin, No. 2, 1997).

Brevemente:

$$\Delta Ct = Ct(\text{control}) - Ct(\text{experimental})$$

$$2^{-\Delta Ct}$$

$$(E = 10^{-1/\text{pendiente}})$$

1.12. Análisis de activación de PLC

La activación de la enzima fosfolipasa C se determinó mediante el uso de dos biosensores basados en FRET que pueden reconocer tanto el sustrato la enzima fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), llamado “Frubby” (Mavrantoni et al. 2015) como su producto diacilglicerol (DAG) mediante el biosensor “Digda” (Nishioka et al. 2008).

Los cultivos primarios de oligodendrocitos se transfectaron con los sensores FRET 24 horas antes de la exposición al anticuerpo anti-MAG o a su control. Los cultivos se fijaron a diferentes tiempos desde el comienzo del tratamiento y las imágenes confocales se obtuvieron mediante un microscopio confocal espectral Olympus Fluoview-1000 con un objetivo de 60x 1,4 N/A de manera idéntica que la descrita para los sensores de glutamato. Una vez obtenida la relación FRET/CFP, la eficiencia de FRET en la membrana plasmática de los OL se determinó mediante el software Fiji utilizando una selección o ROI lineal de 4 píxeles de ancho que incluyó en todos los casos la membrana celular y cinco procesos aleatorios equidistantes hasta 10 μm desde el soma de la célula.

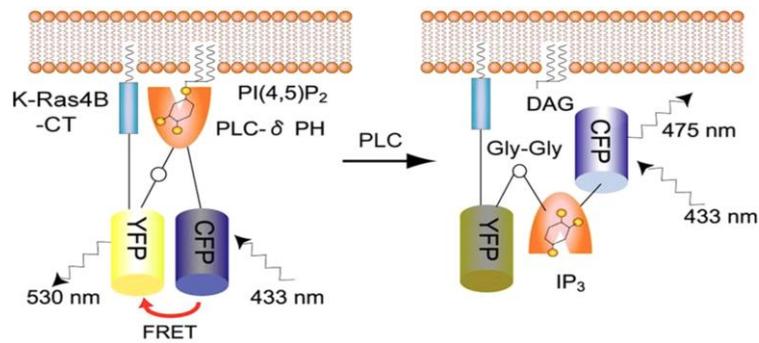


Figura 14: representación esquemática del biosensor FRET para PI(4,5)P₂. CFP e YFP representan la proteína fluorescente cian y la proteína fluorescente amarilla respectivamente, fusionadas al dominio con homología de plekstrinas de PLC, que posee afinidad por el fosfoinosítido PIP₂ (Nishioka et al. 2008)

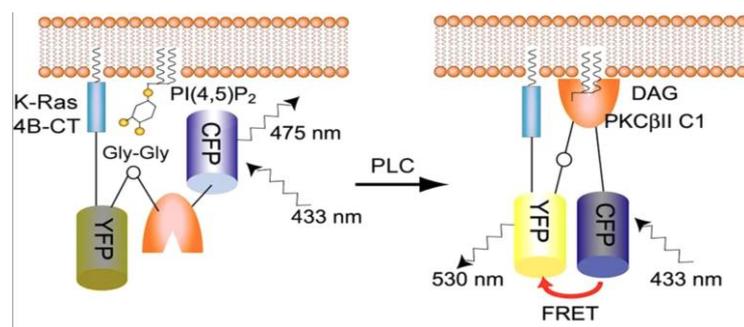


Figura 15: Representación esquemática del biosensor de DAG, Digda. El dominio C1 de PKCβII se utiliza como dominio de unión a DAG. En este diseño, los niveles de FRET aumentan cuando el sensor reconoce DAG (Nishioka et al. 2008)

2. Modelos animales

2.1. Modelo de excitotoxicidad

2.1.1 Cirugía

Para este estudio se usaron ratones adultos de 3 meses de edad de la cepa c57bl/6. Los animales fueron anestesiados con ketamina y xilazina y ubicados en un marco estereotáxico de rata con adaptador para ratón. La crujía consistió en posicionar una cánula cerca del estriado izquierdo (AP +0.8mm, L -1.5 y V -1.2 de acuerdo con el atlas (Franklin y Paxinos 2008)). La administración de anticuerpo se llevó a de dos formas: en la versión “pre-tratamiento”, los ratones fueron anestesiados empleando isoflurano luego de 48 horas de recuperación de la cirugía y fueron inyectados con anticuerpo anti-MAG o con IgG control (anticuerpo 9E10) (1ul, 5ug/ul, 1ul/min) utilizando la cánula para ingresar una aguja 30G deltajet en las coordenadas AP +0.8mm, L -1.5 y V -3.2. La aguja se retiró 5 minutos después del término de la administración. 24 horas más tarde, se utilizó el mismo procedimiento para inyectar glutamato monosódico (Sigma St. Louis MO, USA) solubilizado en agua destilada. Se seleccionó una dosis de 500 nmoles/0,5ul de acuerdo a experimentos piloto y a literatura previa que la indica como una dosis correcta para generar una lesión significativa en estriado (Estrada-Sánchez et al. 2009). En el caso del “post-tratamiento”, se administró la misma dosis de anticuerpo luego de una hora de la inyección con glutamato. Todos los animales se dejaron recuperar de los efectos anestésicos y se ubicaron en cajas individuales con agua y comida ad libitum.

2.1.2. Histología, Fluoro Jade C y cuantificación del volumen de lesión

24 horas luego de la inyección intraestriatal de glutamato, los ratones se anestesiaron profundamente con isoflurano y se les realizó una perfusión transcardíaca con 10 ml de PBS ph7 seguidos de 35ml de PFA al 4% en PBS ph 7,4 (1ml/min). Los cerebros se removieron inmediatamente para continuar con una fijación por inmersión en la misma solución fijadora a 4 °C toda la noche y luego fueron transferidos a una solución de glucosa al 30%. El tejido cerebral fijado fue embebido en OCT para obtener series consecutivas de secciones coronales de 40 µm de espesor mediante el uso de un criostato. Las secciones se montaron en portaobjetos de vidrio. Para el análisis de volúmenes de lesión se utilizaron secciones seriadas separadas por 120 µm. El protocolo de tinción de Fluoro Jade C (Chemicon Temecula, CA, USA) se realizó de

acuerdo a descripciones previas (Schmued et al. 2005). Las secciones cerebrales se dejaron secar para luego ser sumergidas 5 min en 1% NaOH diluido en etanol 80%, seguido por un lavado con etanol al 70%. Los portaobjetos se cubrieron con una solución de permanganato de potasio al 0.06% por 10 minutos e inmediatamente fueron lavados e incubados en una solución de FluoroJade al 0,0001% disuelta en 0,1% de ácido acético por 20 minutos. Finalmente, las secciones se lavaron, secaron y fueron montadas con DPX (Sigma). Las áreas dañadas (FJC+) se examinaron bajo un microscopio de epifluorescencia (Zeiss, Alemania) equipado con una cámara Leica LC200 objetivo aereo 40x 1,42 NA. Se tomaron microfotografías 40x para cada sección de área dañada, las cuales fueron fusionadas y analizadas mediante el software Fiji. El área FJC+ se delimitó en forma manual y fue medida con la ayuda de un plugin calculador de volúmenes para Fiji (Volumest) (Merzin, 2008). Además de la lesión estriatal, la lesión cortical producida por la difusión de glutamato hacia áreas adyacentes fue incluida para el análisis de volúmenes de lesión finales.

2.2 Encefalitis Autoinmune Experimental (EAE)

2.2.1. Inmunización y determinación del valor clínico motor

Ratones machos de cepa C57BL/6 que se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos fueron inmunizados subcutáneamente en la base de la cola con 100µl de un péptido derivado de MOG (MOG35–55 secuencia NH₂-MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK-COOH) emulsificado en adjuvante de Freund completo (CFA) suplementado con 8 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* inactivada por calor. El día de inmunización y dos días subsiguientes se inyectaron 250 ng de toxina pertúsica por vía intravenosa. Paralelamente, un grupo de animales no fueron inmunizados (grupo naive) y se utilizaron como grupo control sin expresión de la enfermedad para los análisis de pérdida axonal.

El tratamiento consistió en cuatro inyecciones intraperitoneales de 100 µg (1mg/ml) de anticuerpo anti-MAG o anticuerpo control en los días 3,5,7 y 9 post inmunización (5 animales por grupo).

Los ratones inmunizados fueron evaluados diariamente desde el día 10 post inmunización en búsqueda de déficits motores, atribuyéndoles un valor clínico de los siguientes (Jones et al. 2008): 0, sin déficit motor; 0,5 pérdida parcial de tono de la cola o movilidad ligeramente anormal; 1, parálisis completa de la cola o pérdida parcial del tono de la cola junto a debilidad en los miembros traseros; 1,5, parálisis completa de la cola y debilidad ligera en los miembros traseros; 2, parálisis completa de la cola y debilidad moderada en los miembros traseros evidenciada por una frecuente caída de las patas al caminar entre las barras de acero de la caja; 3, parálisis de los miembros traseros completa sin evidencia de movimiento residual; 3,5, parálisis de los miembros traseros con debilidad baja de los miembros delanteros; 4, cuadriplegia completa con movimientos de la cabeza; 4,5, moribundo; 5, muerto. Valores fraccionales pueden resultar al asignarlos a fenotipos parciales per distintos, por ejemplo cuando la parte distal de la cola cae mientras la otra parte de la cola puede elevarse, se asigna un valor de 0,5 y cuando el animal arrastra una pata pero el otro miembro acarrea una parte importante del peso permitiendo que este pueda caminar, se asigna un valor de 2,5 o 2,75.

2.2.2. Cuantificación axonal

A los 30 días desde la inmunización, los ratones fueron anestesiados con una sobredosis de isofluorano y perfundidos con PFA 4% y 2,5% de glutaraldehído. Se procedió a extraer las médulas espinales y a fijarlas posteriormente durante la noche en la misma solución. Luego de este paso, las secciones cervicales C3 a C5 se aislaron, se trataron con una solución de tetróxido de osmio al 1% y fueron embebidas en Epon812. Posteriormente se cortaron secciones semmifinas de 1 μ m en la región C5 que se tiñeron con azul de toluidina.

Se obtuvieron microfotografías de las secciones montadas utilizando un microscopio con campo claro (Zeiss, Jena, Germany) equipado con una cámara Leica LC200 (Heerbrugg, Switzerland) y un objetivo de 40x de magnificación, 1.42 N/A. Las imágenes pertenecientes a la misma médula fueron fusionadas para reconstituir la columna dorsal y las áreas adyacentes. Los axones pertenecientes a las columna dorsal medial de la médula espinal en la región cervical 5 se contaron manualmente. Se eligió esa zona particular ya que se conoce que el modelo EAE produce daños reproducibles en la misma, mientras que el daño a nivel rostral-caudal es menos

predecible. Además, la región cervical posee fibras ascendentes de los miembros posteriores y anteriores (Jones et al. 2008).

Mediante la utilización del software Fiji, se dibujó una región de interés triangular en el interior del fascículo grácil: una línea desde el canal central de la médula hacia la superficie dorsal se dividió a la mitad para indicar la mitad dorsal de la columna (altura del triángulo) y una línea perpendicular a esta se proyectó hacia los dos lados desde la parte más medial de la columna hasta el final del fascículo grácil en la superficie dorsal tal como se estableció anteriormente (Nguyen et al. 2009). El conteo axonal se realizó manualmente utilizando “cell counter”, una aplicación de Fiji. Sólo fueron contabilizados los axones visibles, intactos y mielinizados de más de 1 μ m de diámetro.

3. Análisis Estadístico

Todos los experimentos fueron repetidos tres veces en condiciones independientes. Los valores de los gráficos muestran las medias del n total y su error estándar. El análisis de datos se llevó a cabo utilizando paquetes estadísticos estándar (Software Infostat en todos los experimentos salvo el análisis clínico de los animales EAE donde se usó el análisis de medidas repetidas del software Statistica). En primera instancia, todos los grupos de datos se analizaron en búsqueda de distribuciones normales y homogeneidad de varianzas. Para los datos cumpliendo las condiciones de normalidad y homogeneidad, las diferencias entre los tratamientos se obtuvieron mediante test t de Student o análisis de la varianza (ANOVA) seguidos de un test post hoc DGC. En el caso de distribuciones no normales los datos fueron evaluados mediante el análisis de la varianza no paramétrico Kruskal-Wallis.

Resultados

1. Caracterización del mecanismo de protección generado por tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-MAG frente a la sobrecarga glutamatérgica

1.1. El tratamiento con un anticuerpo monoclonal específico para MAG (anticuerpo anti-MAG) genera un aumento de las defensas antioxidantes de los oligodendrocitos y previene la depleción de glutatión (GSH) por estrés oxidativo generado por sobrecarga de glutamato

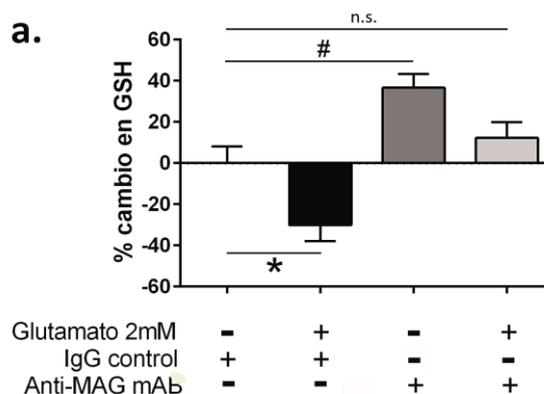
Se ha descrito que la activación de MAG utilizando un anticuerpo anti-MAG anteriormente caracterizado previene la toxicidad generada por glutamato en OLs (Irving et al. 2005). Ya que en dichas células este tipo de toxicidad es mediada en mayor parte por procesos de estrés oxidativo (Oka et al. 1993; Rosin, Bates, y Skaper 2004; Irving et al. 2005), se propuso evaluar si la unión de MAG con el anticuerpo monoclonal afecta la concentración de GSH, la defensa antioxidante intracelular más importante.

Los niveles intracelulares de glutatión se analizaron mediante la intensidad de fluorescencia de monochlorobimane (mBCI), una sustancia que presenta selectividad hacia su forma reducida (GSH).

Tanto los tratamientos con glutamato como la administración de anticuerpo generaron cambios en los niveles de GSH intracelular ($F(3,401)=17,74$ $p<0,0001$) (figura 16). Por un lado, acorde a los mecanismos de oxirosis (muerte por estrés oxidativo) previamente descritos por Albrecht (Albrecht et al. 2010), el tratamiento con una concentración tóxica de glutamato (2mM) por un término de 24 horas provocó una disminución significativa de los niveles de GSH. Por otra parte, aquellos OLs que fueron expuestos sólo al anticuerpo anti-MAG evidenciaron un incremento en el GSH intracelular de aproximadamente el 40% respecto a células controles ($F(3,401)= 52,66$, $p<0,0001$). Finalmente, el tratamiento de MAG con el anticuerpo monoclonal

en OLS previo al tratamiento con glutamato permitió mantener valores de glutatión intracelular similares a los basales.

Estos resultados sugieren que la unión de MAG a su anticuerpo monoclonal tiene como efecto un aumento en las defensas antioxidantes de los OLS, protegiéndolos de la depleción de GSH generada por estrés oxidativo de glutamato.



b.

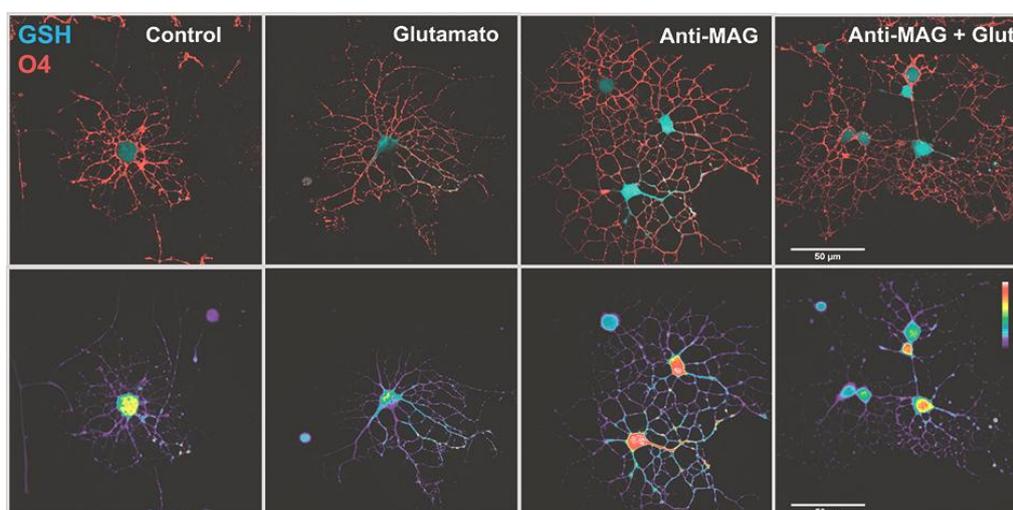


Figura 16: Efectos del tratamiento con 2mM de glutamato y anticuerpo monoclonal anti-MAG en las defensas antioxidantes de los OLS primarios. Panel a: Efectos del tratamiento con anti-MAG mAb sobre el glutatión reducido (GSH) intracelular en OLS primarios. * el tratamiento con glutamato 2mM por 24 horas disminuyó significativamente los niveles de GSH (DGC $p < 0,05$; $n = 404$ células). # el tratamiento con anticuerpo aumentó substancialmente los niveles de GSH (DGC $p < 0,05$; $n = 404$ células) y fue capaz de restablecer los niveles basales en condiciones de sobrecarga glutamatérgica. n.s.=diferencias no significativas.

El gráfico muestra las medias y errores estándar de tres experimentos independientes. Como control, los OLS se trataron un anticuerpo del mismo isotipo (denominado IgG control en el gráfico) para aquellos tratamientos que no incluyeran el tratamiento con anti-MAG. Panel b: Fotomicrografías representativas de los tratamientos en OLS primarios. Arriba: fluorescencia de mBCL (azul) y tinción para el marcador de OLS maduros O4. Abajo: intensidad de fluorescencia de mBCL en escala de pseudocolor (colores fríos; bajo GSH, colores cálidos; alto GSH).

1.2. El aumento de GSH derivado de la unión de MAG con su anticuerpo monoclonal posee un curso temporal definido

Con el fin de realizar una exploración temporal del aumento de glutatión, los cultivos primarios de oligodendrocitos fueron tratados con mBCL, fijados y analizados a distintos tiempos posteriores al tratamiento con el anticuerpo anti-MAG.

Se registraron cambios en los niveles de GSH a lo largo del tiempo ($F(3,431)=6,71$, $p<0,05$). El incremento de GSH intracelular se volvió significativo desde las 10 horas posteriores al tratamiento, punto en el cual se registró un aumento de 30% respecto al basal. A las 24 horas los niveles de glutatión alcanzaron un 40% de incremento (Figura 17).

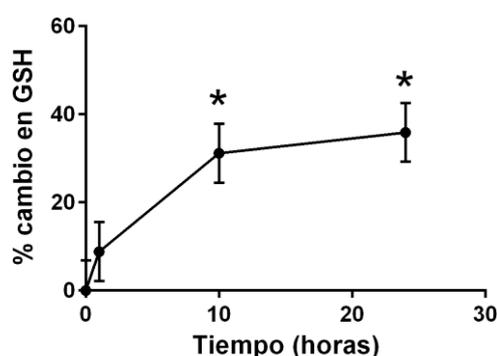


Figura 17: Estudio temporal en los cambios de glutatión intracelular en cultivos primarios de OLS maduros luego del tratamiento con anticuerpo anti-MAG (0 horas). Los niveles de GSH aumentan significativamente a las 10 horas posteriores al tratamiento (*DGC $p<0,05$; $n=434$ células). El gráfico muestra las medias y errores estándar de tres experimentos independientes.

1.3. El intercambiador sistema X_c^- y los transportadores de glutamato se encuentran involucrados en el aumento de GSH dependiente de la activación de MAG

El intercambiador glutamato-cistina (sistema X_c^-) es uno de los sistemas más importantes involucrados en los cambios intracelulares de glutatión, ya que permite importar cistina, un sustrato limitante en su biosíntesis. A su vez, este sistema exporta glutamato al medio extracelular, por lo que es de gran importancia la actividad conjunta con los transportadores de glutamato (EAATs) con el fin de lograr la recaptación del aminoácido, manteniendo bajas su concentración extracelular y favoreciendo a su vez la formación de un gradiente químico que permita el funcionamiento del intercambiador.

Para modular la actividad de estos sistemas in vitro, se utilizaron inhibidores farmacológicos tanto para el intercambiador sistema X_c^- (AAA, ácido aminoadípico) como para los transportadores de glutamato (PDC, L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxilato), con el objetivo de analizar sus implicancias en el aumento de glutatión generado por la unión de de MAG con su anticuerpo.

De la misma manera que en los resultados previos, la intensidad de fluorescencia de mBCI denotó un aumento de GSH intracelular 24 horas posteriores al tratamiento con anticuerpo anti-MAG. Este efecto se vio suprimido al tratar previamente los cultivos primarios tanto con AAA ($F(3,452)=28,73$ $p<0,0001$) como con L-trans-2,4-PDC ($F(3,191)=2,91$ $p<0,05$)(Figura 18).

Estos resultados indican que tanto el sistema intercambiador como los transportadores de glutamato se encuentran involucrados en el incremento en las defensas antioxidantes generadas por activación de MAG.

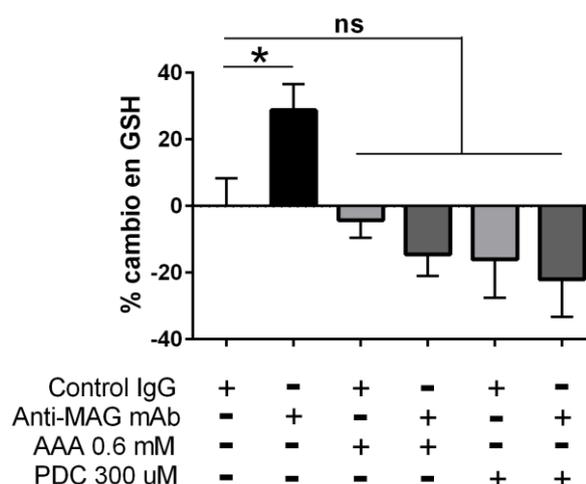


Figura 18: Efectos de la modulación farmacológica del sistema X_c^- como de los transportadores de glutamato sobre el incremento el GSH generado por la activación de MAG. Los cultivos de OLS fueron tratados con AAA, inhibidor del antiportador x_c^- y L-trans 2,4-PDC, inhibidor de todos los transportadores de glutamato. *la unión de MAG con el anticuerpo monoclonal anti-MAG produce un aumento de GSH intracelular medido como intensidad de fluorescencia de mBCL (DGC $p < 0,05$; $n = 651$ células). La modulación farmacológica tanto del transportador como del antiportador impide el aumento de GSH generado por el anticuerpo. n.s.=diferencias no significativas. Se grafican las medias y errores estándar de tres experimentos independientes.

1.4. El aumento de las defensas antioxidantes por activación de MAG puede reducir los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para comprobar la funcionalidad del aumento de GSH generado por vías asociadas a la activación de MAG se utilizó un sensor redox radiométrico, denominado MitoHyPer, que permitió evaluar los niveles de peróxido (H_2O_2) mitocondrial en OLS primarios. En estas células, la activa mielinización y la peroxidación lipídica provocan un incremento en la demanda de la capacidad reductora (Ravera y Panfoli 2015)

La activación de MAG mediada por su anticuerpo resultó en una reducción significativa en los niveles de peróxido de hidrógeno mitocondrial, comparados a cultivos de OL tratados con un anticuerpo control ($T(1,28) = -2,53$ $p < 0,05$) (Figura 19). Este resultado brinda una evidencia directa de la respuesta antioxidante mediada por MAG.

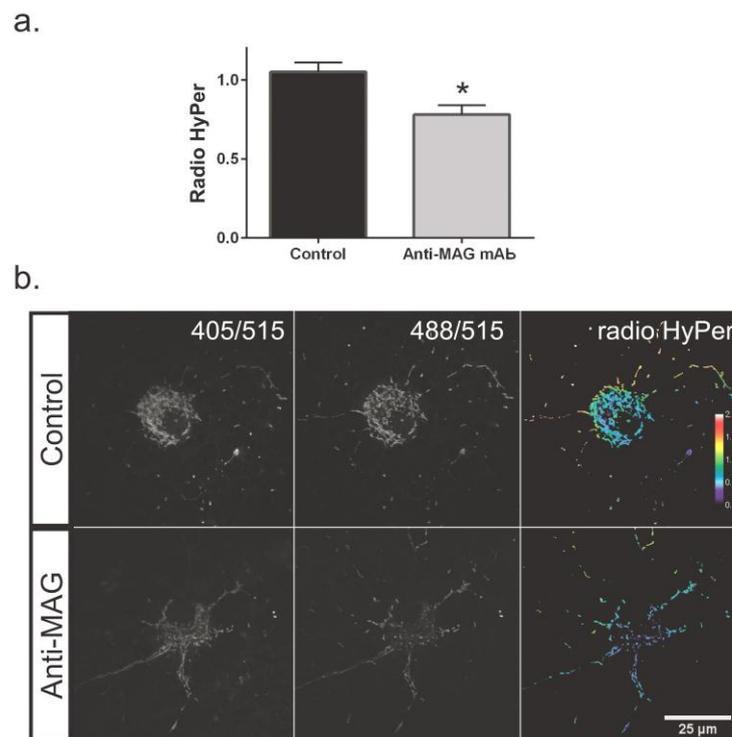


Figura 19: Efectos de la activación de MAG por unión con un anticuerpo monoclonal sobre los niveles de H_2O_2 mitocondrial oligodendrocitos primarios. Los OLS fueron transfectados con un biosensor de H_2O_2 (mitoHyPer) para monitorear su producción mitocondrial y posteriormente tratados con anticuerpo anti-MAG o anticuerpo control por 24 horas. Panel a: La unión de MAG con su anticuerpo reduce en un 30% los niveles basales de peróxido mitocondrial (* $p < 0,05$; $n = 30$ células). Panel b: mapas termales de pseudo-color representativos de las concentraciones de peróxido mitocondrial (radio HyPer), estimados a partir de la medición radiométrica de los pares de excitación y emisión 405/515 y 488/515. Colores fríos representan niveles de peróxido bajos; colores cálidos muestran altos niveles de peróxido.

1.5 La activación de MAG por unión con su anticuerpo genera un aumento en la recaptación de glutamato extracelular en el oligodendrocito

Dado que el glutatión es un tripéptido sintetizado a partir de cisteína, glicina y glutamato, un aumento de GSH por activación de MAG podría implicar mayor actividad de síntesis y por consiguiente un ingreso de glutamato hacia el citoplasma de los OLS.

Para registrar los cambios de concentración de glutamato en el espacio extracelular en proximidad a la membrana del OL se utilizó un biosensor basado en FRET para glutamato contenido en un vector con expresión y anclaje en membrana plasmática (pDisplay FLIPE-1m)

El análisis radiométrico del biosensor (Figura 20) reveló niveles de FRET similares entre aquellos cultivos tratados con un anticuerpo control de isotipo y los tratados con anti-MAG por 24 horas sin presencia de glutamato. Por otra parte, demostró una disminución significativa en la eficiencia de FRET al analizar OLs tratados con 2mM de glutamato por un periodo de 60 minutos ($F(3,112)= 4,82, P<0,005$) en presencia de un anticuerpo control de isotipo 9E10, lo que indica un aumento de la concentración de este aminoácido en el microambiente extracelular adyacente a la membrana plasmática de las células. Este efecto del tratamiento con glutamato en la eficiencia de FRET no se registró en aquellas células tratadas previamente con anti-MAG y luego expuestas al aminoácido, en las que los niveles de FRET se correspondieron a los registrados para OLs controles. Este último resultado indica una disminución en la concentración de glutamato en el microambiente que rodea al OL, dado lo cual la unión de MAG con el anticuerpo monoclonal anti-MAG parecería inducir un cambio en la disponibilidad del glutamato en condiciones tóxicas, disminuyendo su concentración en el espacio extracelular cerca de la membrana plasmática.

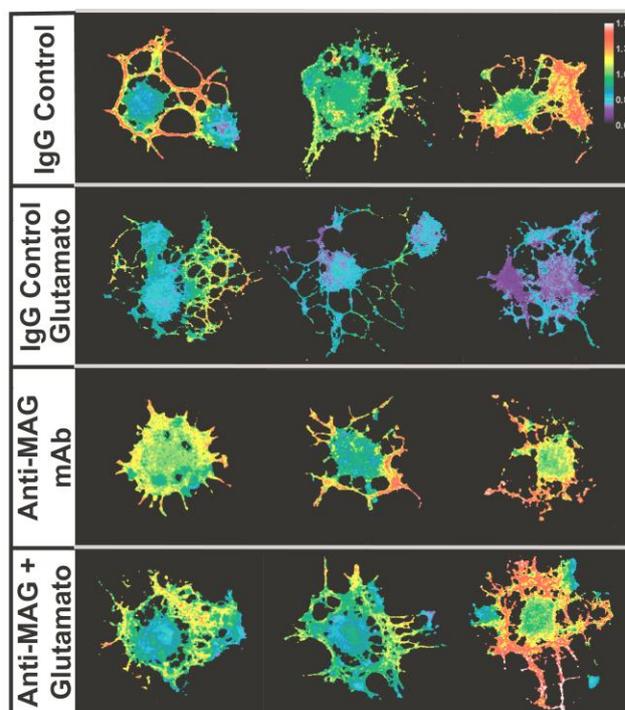
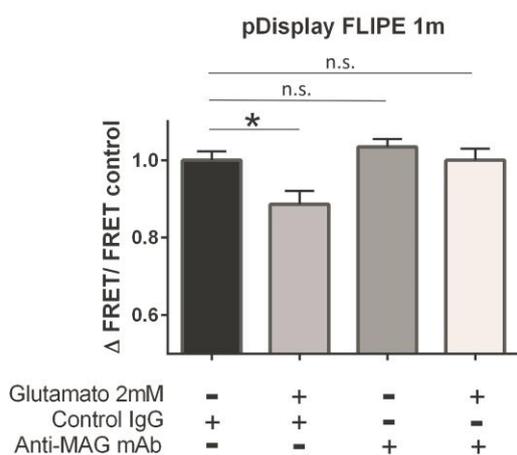


Figura 20: Efecto del anticuerpo anti-MAG sobre los niveles de glutamato extracelular adyacente a la membrana plasmática del oligodendrocito. Como control, se administró un anticuerpo del mismo isotipo en aquellos tratamientos que no incluyeran el tratamiento con anti-MAG. Panel A: Resultados de la cuantificación de FRET mediante el biosensor de expresión en membrana pDisplay FLIPE 1m. La administración de glutamato en cultivo produjo una disminución en la eficiencia de FRET (*DGC $p < 0,05$; $n = 116$ células). En los cultivos administrados con glutamato, el pre-tratamiento con el anticuerpo anti-MAG incrementó la eficiencia de FRET a niveles basales, indicando una disminución en la concentración de glutamato en el microambiente que rodea al OL. Panel B: ejemplos representativos de los mapas de FRET de todos los tratamientos en escala de pseudocolor (colores cálidos: FRET alto/ bajas concentraciones de glutamato, colores fríos: FRET bajo/ altas concentraciones de glutamato).

Para evaluar la internalización de glutamato al cuerpo celular del OL, se registraron cambios en sus niveles intracelulares mediante otra versión del biosensor basado en FRET (pcDNA3.1 FLIPE-10u), que además de tener expresión citosólica, posee mayor sensibilidad en el rango de los cambios intracelulares esperados para el aminoácido. Los cultivos se trataron con anticuerpo anti-MAG o su control de isotipo y pasadas 24 horas se administró una concentración de 2mM de glutamato por 30 minutos, un tiempo adecuado para observar cambios en las concentraciones intracelulares del aminoácido antes de que éste comience a ser metabolizado, según un análisis temporal de FRET intracelular realizado con anterioridad al estudio (datos no mostrados). Los resultados fueron obtenidos mediante microscopía confocal y se definieron dos zonas de cuantificación: los somas (descontando el área correspondiente al núcleo) y los procesos.

A diferencia de los OLs pre tratados con IgG control por 24 horas y luego expuestos a glutamato, en los que la eficiencia de FRET no presentó cambios significativos respecto a cultivos sin tratamiento con el aminoácido, aquellos OLs tratados con anti-MAG y posteriormente expuestos a glutamato sí revelaron una disminución en la eficiencia de FRET citoplasmático, indicando un aumento significativo en la concentración de glutamato intracelular de las células a los 30 minutos desde la exposición extracelular. Este efecto se presentó en ambas regiones de cuantificación (soma, $H(3,141) = 8,11$ $p < 0,05$ procesos, $F(3,141) = 17,72$, $p < 0,0001$)(Figura 21).

Este resultado brinda indicios de que la activación de MAG mediante la unión a un anticuerpo monoclonal genera un incremento en la captación del glutamato desde el espacio extracelular al citoplasmático del OL, donde finalmente puede ser metabolizado.

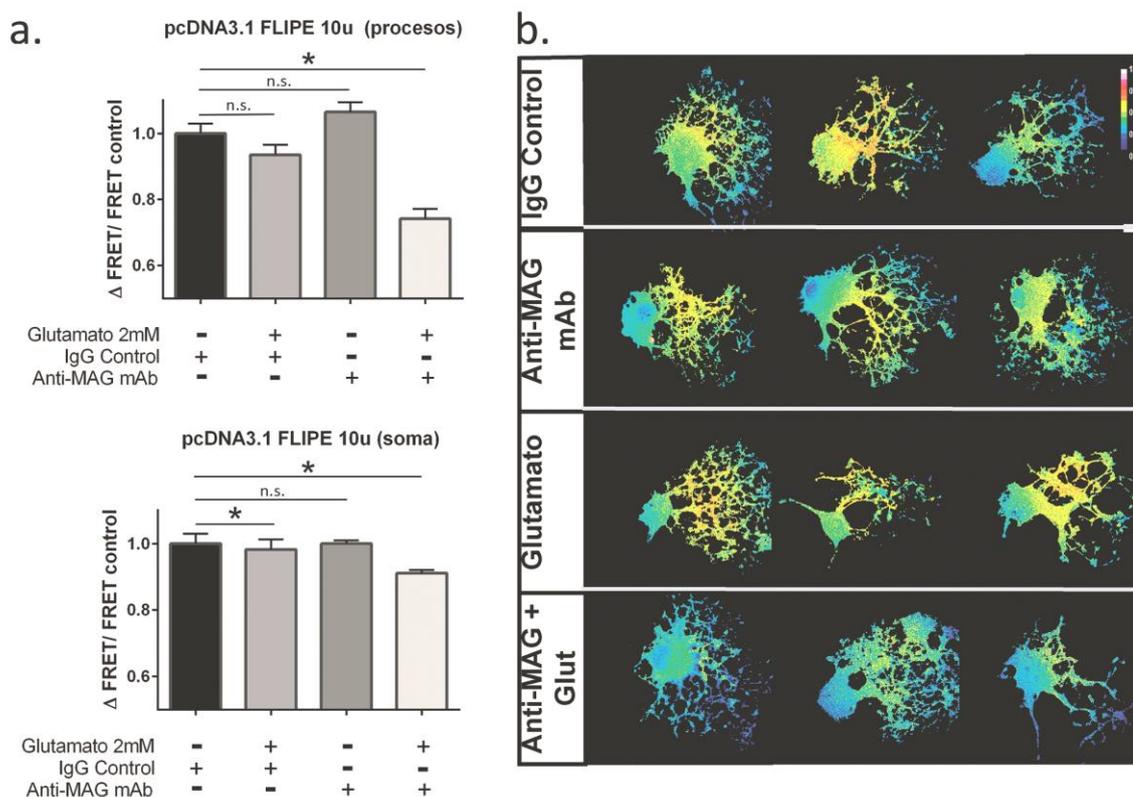


Figura 21: Efecto del anticuerpo anti-MAG en las dinámicas intracelulares de glutamato en un modelo in vitro de sobrecarga glutamatérgica. Paneles A y B: Resultados de la cuantificación de FRET detectando la presencia de glutamato con el biosensor citoplasmático pcDNA3.1 FLIPE10u en los procesos (Panel A) y en el soma de OLs (Panel B). La unión de MAG a su anticuerpo genera un aumento en la concentración de glutamato intracelular principalmente en los procesos de los OL 30 minutos luego de la administración de glutamato (* DGC $p < 0,05$; $n = 145$ células). Como control, se administró un anticuerpo del mismo isotipo en aquellos tratamientos que no incluyeran el tratamiento con anti-MAG. Panel C: Mapas FRET de imágenes confocales de OLs primarios en escala de pseudocolor (colores cálidos: FRET alto/ bajas concentraciones de glutamato, colores fríos: FRET bajo/ altas concentraciones de glutamato).

1.6. Los transportadores de glutamato (EAATs) del oligodendrocito se encuentran involucrados en la captación de glutamato activada por MAG

Con el objetivo de analizar la participación de los transportadores de glutamato en la recaptación de glutamato generado por activación de MAG, cultivos primarios de OLs fueron tratados 1 hora antes de la administración del anticuerpo anti-MAG con L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxilato, (L-trans-2,4-PDC). El análisis se llevó a cabo mediante la transfección de los cultivos con la versión citoplasmática del biosensor de glutamato (pcDNA3.1 FLIPE 10u).

En concordancia con los resultados anteriores, el tratamiento con anticuerpo anti-MAG generó una disminución de la eficiencia de FRET en OLs administrados con 2mM de glutamato por 30 minutos, indicando un aumento en los niveles intracelulares del aminoácido y por consiguiente un incremento en su captación respecto a OLs expuestos a glutamato y tratados con IgG control. El pretratamiento con L-trans-2,4-PDC bloqueó el efecto generado por el anticuerpo anti-MAG sobre la eficiencia de FRET intracelular ($F(3,126)=3,55$, $p<0,05$)(Figura 22), lo que indica que la inhibición farmacológica de los transportadores impide el incremento del glutamato intracelular generado por activación de la glicoproteína.

De esta manera, los resultados indican una participación de los transportadores de glutamato en la captación de Glu mediado por unión de MAG con el anticuerpo monoclonal.

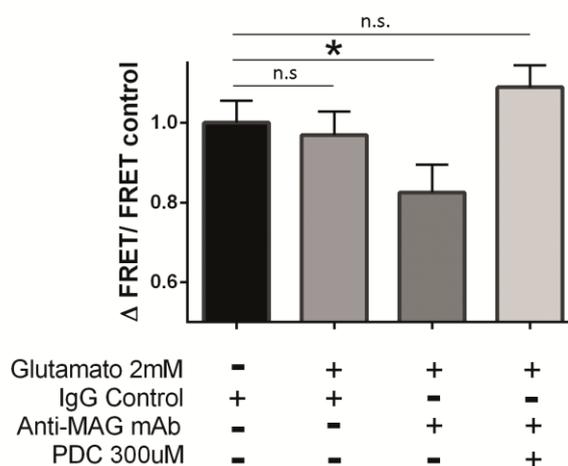


Figura 22: Análisis de la participación de los transportadores de glutamato (EAATs) en la vía de captación de glutamato inducida por activación de MAG. Cultivos primarios de OLs fueron transfectados con un biosensor FRET para glutamato de expresión citosólica (pcDNA3.1 FLIPE 10u) con el objetivo de monitorear los niveles intracelulares del aminoácido. Los cultivos fueron tratados con anticuerpo anti-MAG o su control de isotipo por 24 horas y luego expuestos a 2mM de glutamato por 30 minutos. La activación de MAG mediante el anticuerpo monoclonal produce una disminución en la eficiencia de FRET, indicando un aumento

en la recaptación del aminoácido. En el caso del pretratamiento con PDC, un inhibidor farmacológico de los EAATs, los cultivos tratados con anticuerpo anti MAG presentan eficiencias de FRET similares a las basales (DGC $p > 0,05$; $n = 130$ células), demostrando una prevención de la recaptación del aminoácido.

2. Caracterización de la señalización intracelular asociada a defensas antioxidantes generada por unión/activación de MAG en OLs

2.1. La unión/activación de MAG resulta en una activación del factor nuclear derivado de eritrocitos Nrf2

El factor nuclear 2 derivado de eritrocitos, también conocido como Nrf2, es un factor de transcripción clave en las defensas contra estrés oxidativo ya que regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes. Entre el grupo proteico inducible se encuentra el intercambiador glutamato-cisteína (sistema X_c^-) y las enzimas de síntesis de GSH.

Con el objetivo de corroborar si Nrf2 forma parte de la cascada de señalización inducida por MAG, los cultivos primarios de OLs se trataron con anticuerpo anti-MAG y se analizó la presencia de su forma activa en el núcleo del oligodendrocito mediante un anticuerpo específico para el factor de transcripción fosforilado en su serina 40 a diferentes tiempos.

La cuantificación de intensidades de fluorescencia para la inmunomarcación de Nrf2-ser-40 reveló la presencia de Nrf2 activo en los núcleos de cultivos de OLs controles, lo que indica actividad basal antioxidante frente a la peroxidación de lípidos generada por los procesos de mielinización característica de estas células. Un análisis en función del tiempo no reveló cambios significativos (control vs tratado) para Nrf2-ser-40 luego de cuatro horas desde la activación de MAG mediante el anticuerpo monoclonal, en cambio registró un aumento de aproximadamente 40% respecto a cultivos controles en la intensidad nuclear de Nrf2 en OLs a las 10 horas desde el tratamiento con anticuerpo ($F(1, 526) = 5,75$, $p < 0,005$)(Figura 23).

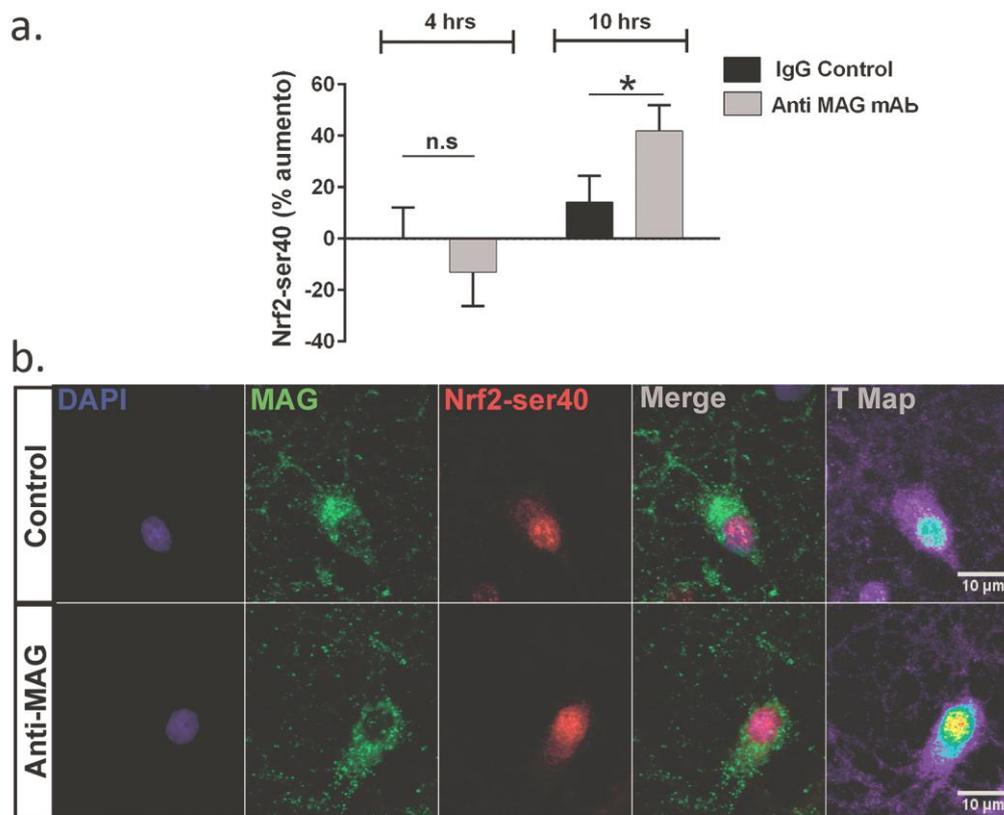


Figura 23: Efecto de la activación de MAG por unión a su anticuerpo en los niveles nucleares del factor de transcripción Nrf2 activo en OLs primarios. Panel A: Análisis del reclutamiento nuclear de Nrf2-ser40 a 4 y 10 horas en respuesta al tratamiento anti-MAG. * La activación de MAG incrementa significativamente la expresión nuclear de la forma activa del factor de transcripción a las 10 horas del tratamiento (DGC $p < 0,05$; $n = 528$ células). Panel B: Fotomicrografías representativas de OLs primarios (z stacks colapsados) mostrando de izquierda a derecha la localización nuclear (DAPI, canal azul), expresión de MAG (canal verde), el factor de transcripción activado, Nrf2-ser 40 (canal rojo), la unión de los tres canales y un mapa térmico del canal de Nrf2 (colores cálidos: mayor expresión de Nrf2-ser 40)

Posteriormente se corroboró por técnica de western-blot el aumento en la activación de Nrf2 a 10 horas luego del tratamiento con anti-MAG en homogenatos de cultivos primarios de oligodendrocitos (Figura 24).

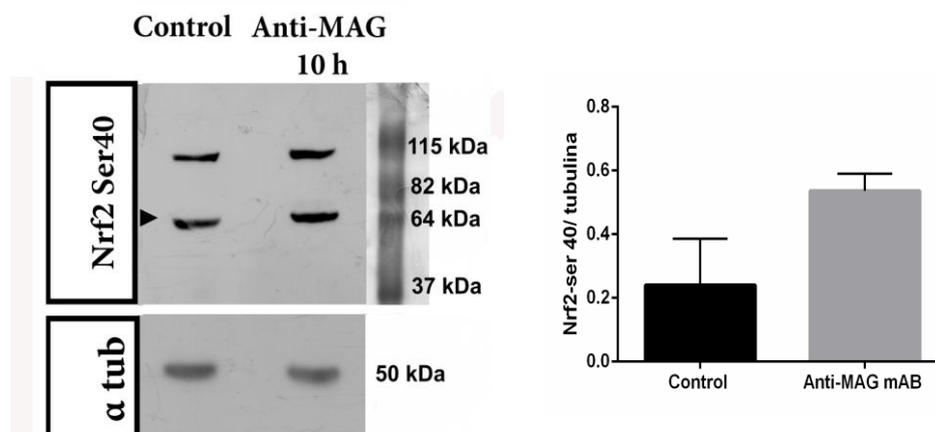


Figura 24: Análisis de expresión de el factor de transcripción Nrf2 mediante western blot de homogenatos de cultivos primarios de oligodendrocitos. Nrf2-ser 40 posee un peso molecular de 66 kDa.

Estos resultados en conjunto demuestran un aumento en la inducción del factor de transcripción de respuesta antioxidante Nrf2 luego de la activación de MAG por unión con su anticuerpo monoclonal. Nrf2 es entonces uno de los factores de regulación genética activados durante el proceso.

2.2. La activación del factor Nrf2 derivada de la unión de MAG con el anticuerpo monoclonal anti-MAG genera un aumento en la transcripción del intercambiador X_c^- y enzimas involucradas en la síntesis de glutatión

La activación del factor Nrf2 resulta en el incremento de la expresión de un pool de proteínas citoprotectoras, dentro de las cuales se encuentra el intercambiador glutamato-cistina y enzimas relacionadas con el metabolismo de glutatión.

Mediante un análisis de rtPCR se analizaron los niveles transcripcionales de la subunidad reguladora del intercambiador X_c^- (xCT), las subunidades modificadora (Gclm) y catalítica (Gclc) de la enzima heterodimérica glutamato-cisteina ligasa y la enzima glutatión reductasa (GSR) en cultivos primarios de oligodendrocitos.

Se evidenció un incremento en la transcripción del sistema xCT, GSR y las dos subunidades de Gcl 20 horas luego de la activación de MAG mediante el tratamiento de OLs con anti-MAG mAb (Gclc $F(1,6)=25,34$, $p<0,05$; Gclm $F(1,6)=53,91$ $p<0,05$; Xc- $F(1,6)=24,5$ $p<0,05$; GSR $F(1,6)=29,04$ $p<0,05$) (Figura 25).

De esta manera, la activación de MAG genera un aumento en la transcripción de las enzimas más importantes involucradas en la síntesis de GSH y del intercambiador X_c^- .

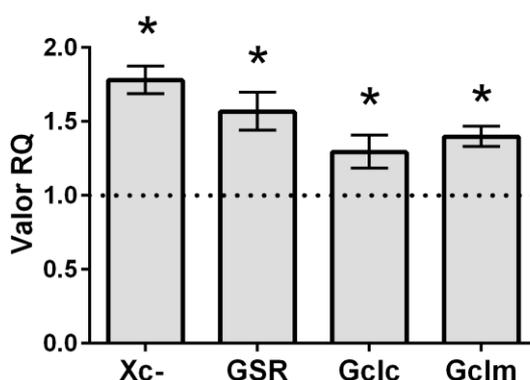


Figura 25: Efectos de la activación de MAG mediante unión al anticuerpo monoclonal anti-MAG en los niveles de transcripción del conjunto de genes con acción antioxidante controlados por el factor de transcripción Nrf2. Xc-, intercambiador glutamato-cistina; GSR, glutatión-reductasa; Gclc, subunidad catalítica de la enzima glutamato cisteína ligasa; Gclm, subunidad modificadora de la enzima glutamato cisteína ligasa. El gráfico muestra medias y errores estándar del valor RQ ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de 4 experimentos independientes. La línea punteada representa el valor referencia de muestras controles. *diferencias significativas ($p<0,05$) en los ΔCT de los cultivos controles vs tratados con anti-MAG mAb.

2.3 La activación de MAG genera un incremento en la expresión del sistema X_c^- en OLs

Teniendo en cuenta el aumento en la actividad transcripcional de los AREs, se realizó un análisis de inmunofluorescencia en cultivos primarios de OLs con el objetivo de corroborar los resultados encontrados mediante rtPCR, examinando la expresión proteica del intercambiador glutamato-cistina X_c^- .

Aquellos cultivos tratados con el anticuerpo presentaron un aumento en la expresión del intercambiador 24 horas posteriores al tratamiento ($T(1,178)=5,3$ $p<0,05$) en comparación a los tratados con un anticuerpo control (Figura 26). Cabe destacar que cualitativamente la inmunomarcación para X_c^- parece localizarse mayormente en los procesos de los OLs, zona donde MAG se encuentra enriquecida.

El aumento de expresión del intercambiador confirma los resultados hallados por rtPCR que denotan el aumento de X_c^- , validando su participación activa en los efectos del anticuerpo.

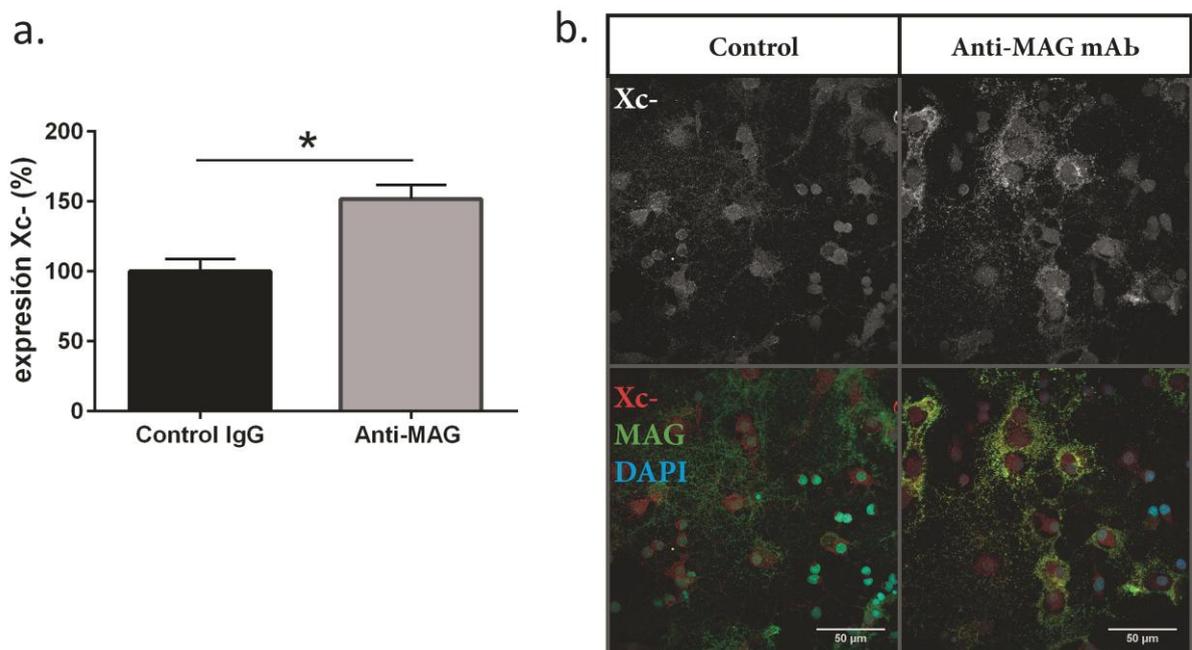


Figura 26: Efectos del tratamiento anti-MAG sobre la expresión del intercambiador glutamato-cistina X_c^- en cultivos primarios de OLs luego de 24 horas de tratamiento con el anticuerpo. Panel a: Cuantificación de la inmunoreactividad (intensidad de fluorescencia) del intercambiador en la membrana de los OLs (células no permeabilizadas). *El anticuerpo aumenta la intensidad de la expresión aproximadamente en un 50% respecto a cultivos no tratados ($p<0,05$; $n=180$ células). El gráfico representa medias y errores estándar de tres experimentos independientes del porcentaje de expresión del intercambiador, normalizado con un control tratado con IgG. Panel b: Microfotografías representativas. Arriba: Resultados de inmunohistoquímica para X_c^- en escala de grises. Abajo: Fusión de los canales para X_c^- (rojo), MAG (verde) y DAPI (azul).

2.4 La activación de MAG mediada por anticuerpo no afecta los niveles transcripcionales de los transportadores de glutamato

Dado que los EAATs son proteínas importantes en la regulación del glutamato extracelular en funcionamiento sinérgico con el intercambiador X_c^- ; y a su vez la respuesta de incremento del GSH mediada por activación de MAG se ve impedida al tratar las células con un inhibidor específico para esta familia de proteínas, se procedió a analizar si la activación de la MAG mediante un anticuerpo monoclonal podía generar un aumento en los niveles transcripcionales de los distintos transportadores de glutamato descritos en OLs.

Mediante rtPCR se evaluaron los niveles de expresión del ARNm para los transportadores de glutamato GLAST, GLT1 y EAAC1 en cultivos primarios de OLs a diferentes tiempos posterior al tratamiento con el anticuerpo anti-MAG. No se encontraron diferencias significativas generadas por el tratamiento anti-MAG para el nivel de transcripción de ninguno de los tres transportadores analizados tanto a las 10 hrs (GLT1 $T(1,6)=0,18$ $p>0,05$, GLAST $T(1,6)=0,06$ $p>0,05$, EAAC1 $T(1,6)=0,03$ $p>0,05$) como a las 20 hrs (GLT1 $T(1,6)=0,6$ $p>0,05$, GLAST $T(1,6)=0,39$ $p>0,05$, EAAC1 $T(1,6)=1,24$ $p>0,05$) desde la adición del anticuerpo, en comparación a cultivos controles (Figura 27).

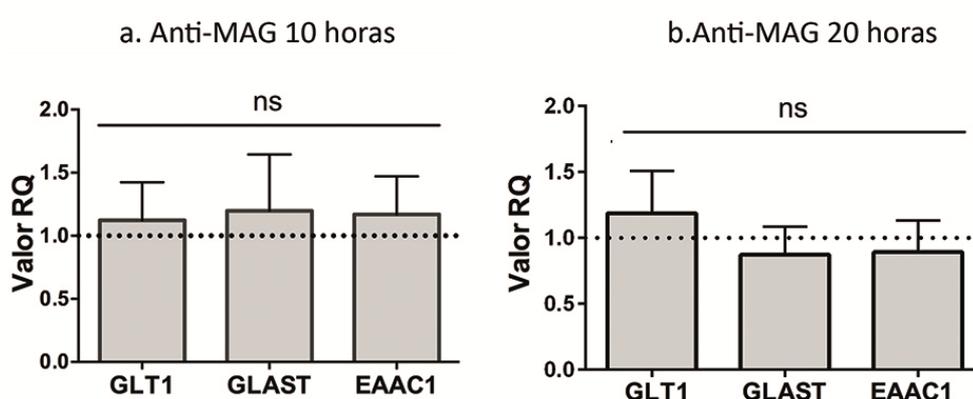


Figura 27: Efectos de la activación de MAG mediante unión a su anticuerpo monoclonal sobre los niveles de transcripción de los transportadores de glutamato (EAATs) en OLs. Los gráficos muestra medias y errores estándar del valor RQ ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de 4 experimentos independientes. Panel a: Análisis de los niveles

transcripcionales a las 10 horas posterior al tratamiento con anticuerpo anti-MAG. Panel b: análisis a las 20 horas posterior al tratamiento anti-MAG. ns= no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) en los Δ CT de los cultivos controles vs tratados con anti-MAG mAb. La línea punteada representa los valores de expresión de ARNm de cultivos controles.

2.5. El incremento en GSH derivado de la activación de MAG en OLs es dependiente de la actividad de PKC

Se ha reportado que PKC es uno de los factores más importantes de activación de Nrf2, ya que tiene la capacidad de fosforilar la serina 40 del factor de transcripción. A su vez, MAG puede contribuir al reclutamiento de esta quinasa cerca de la membrana interna del OL mediante una interacción directa con su dominio intracelular (Kirchhoff, Hofer, y Schachner 1993; Jaramillo et al. 1994). Por este motivo, se evaluó la participación de PKC en la señalización temprana generada por la unión de MAG con el anticuerpo monoclonal anti-MAG, hipotetizando que la glicoproteína podría inducir la activación del sistema de elemento de respuesta antioxidante (ARE) en una vía dependiente de PKC.

Para tal fin se analizó la respuesta de GSH inducida por el anticuerpo anti-MAG utilizando Calfofostina C, un potente inhibidor selectivo de las PKC. Se observó que el tratamiento combinado por 24 horas con el anticuerpo anti-MAG y 50nM del inhibidor bloqueó el incremento de GSH en los OLs ($F(3,1977) = 23,63$ $p < 0,0001$) (Figura 28), confirmando que el efector PKC se encuentra asociado a la cascada de señalización de MAG y al aumento de GSH derivado de esta, posiblemente como activador de Nrf2.

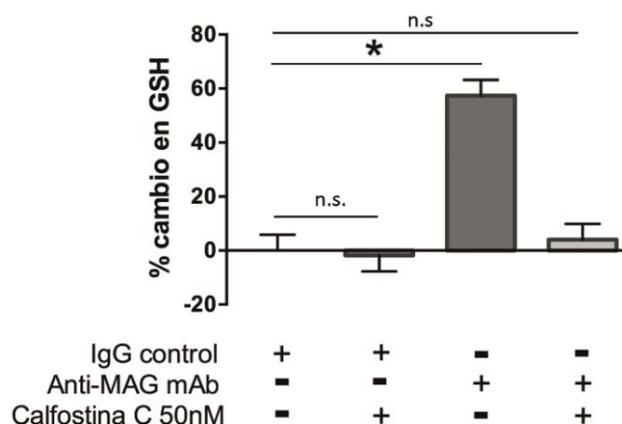


Figura 28: Evaluación de la participación de PKC en el incremento de GSH generado por el anticuerpo anti-MAG. Cultivos primarios de OLs fueron tratados con 50 nM de calfofostina C, un potente inhibidor de PKC y subsecuentemente expuestos a anticuerpo anti-MAG o control por 24 horas. Se analizaron los niveles de GSH mediante la intensidad de fluorescencia de la marca de mBCL citoplasmática. El tratamiento con el inhibidor bloquea el aumento generado por MAG en los niveles de GSH. * (DGC $p < 0,05$; $n=1981$ células).

2.6. La activación de MAG induce una cascada de señalización via fosfoinosítidos

La activación de PKC en principio no ha sido descrita como un efecto directo de la activación de MAG, pero sí su reclutamiento, ya que su dominio citoplasmático se ha propuesto como un andamio de señalización. Por otra parte, se ha demostrado *in vitro* que PKC puede ser activada por una proteína blanco directo de MAG: fosfolipasa $C\gamma$ (PLC), aunque hasta el momento no existen evidencias de este suceso en las células ni información respecto a la ventana temporal de actividad de la fosfolipasa por activación de MAG.

Para analizar si PLC puede ser activada en respuesta a la activación de MAG mediante el uso de un anticuerpo específico y caracterizar su curso temporal se utilizaron biosensores FRET específicos tanto para PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, sustrato de PLC) como para DAG (diacilglicerol, producto de la enzima)

La activación de MAG mediada por anticuerpo llevó a un aumento transiente en PIP2 en la membrana del OL (pico a los 15 minutos) ($H(4,190)=12,7$ $p < 0,05$), sugiriendo un incremento de la síntesis o el reclutamiento del fosfoinosítido, seguido de una degradación subsecuente hacia

DAG e inositol trifosfato (Figura 29). A su vez, el estudio temporal de los niveles de DAG confirmaron un incremento de sus niveles a los 40 minutos posterior al inicio del tratamiento, manteniéndose elevados hasta al menos los 60 minutos desde exposición al anticuerpo ($H(4,113)= 12,91$ $p<0,01$) (Figura 30).

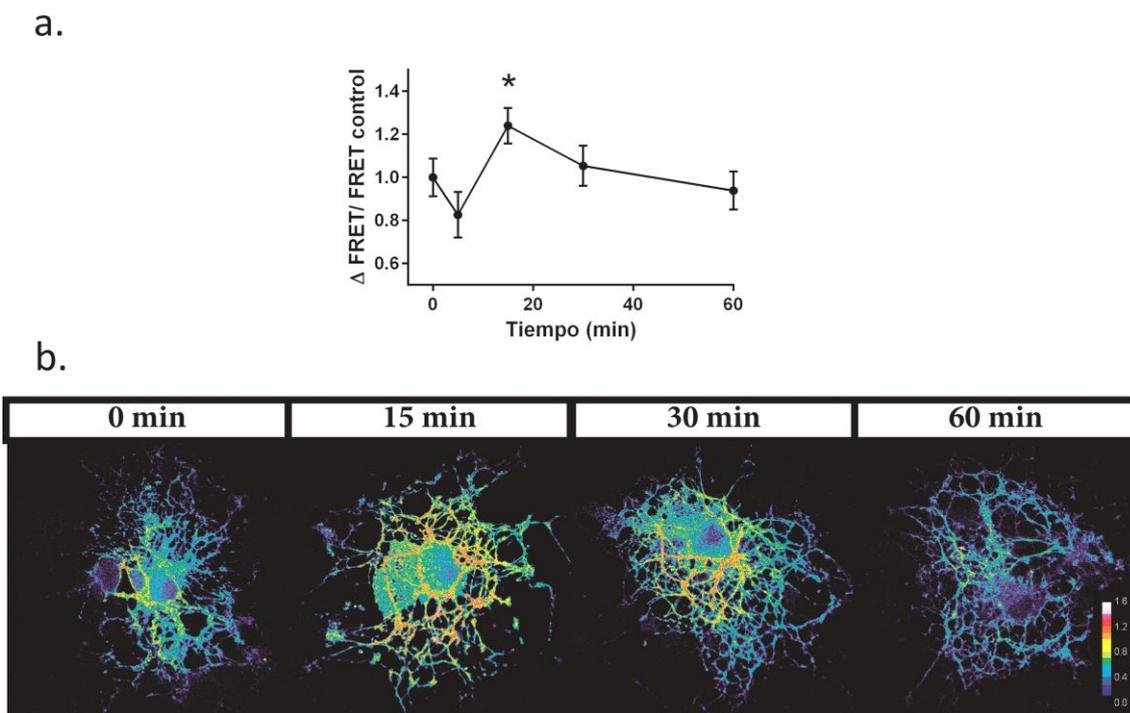


Figura 29: Efecto del tratamiento con anticuerpo anti-MAG en la disponibilidad del sustrato de PLC, PIP2. La disponibilidad del fosfolípido fue evaluada mediante transfección de cultivos primarios de OLS con Frubby, un biosensor que aumenta la eficiencia de FRET al unirse a PIP2. Panel A. La activación de MAG mediada por anticuerpo genera un aumento en la síntesis/reclutamiento de PIP2 seguido por una disminución del fosfoinosítido en el tiempo * PIP2 presenta cambios en el tiempo, aumentando a los 15 minutos desde la administración del anticuerpo anti-MAG (DGC $p<005$; $n=195$ células). Ese aumento decrece en el tiempo hasta igualarse a los niveles basales. Panel B: Mapas de FRET de cultivos de OLS a diferentes tiempos posteriores al tratamiento anti-MAG. Imagen termal en escala de pseudocolor. Colores cálidos: alta eficiencia de FRET; mayor disponibilidad de PIP2. Colores fríos: Baja eficiencia de FRET; menor disponibilidad de PIP2.

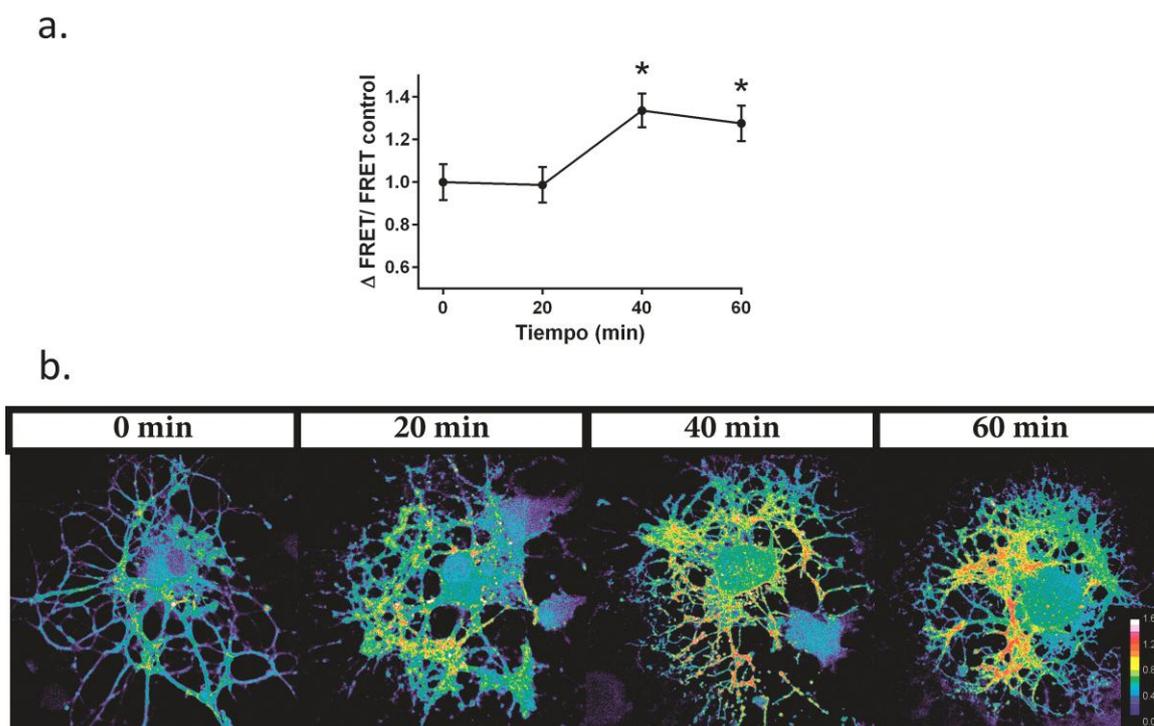


Figura 30: Efecto del tratamiento con anticuerpo anti-MAG en la disponibilidad de DAG. La disponibilidad del fosfolípido fue evaluada mediante transfección de cultivos primarios de OLGs con Digda, un biosensor que aumenta la eficiencia de FRET al unirse a DAG. Panel A: La activación de MAG mediada por anticuerpo genera un aumento en los niveles de diacilglicerol (DAG), producto de la actividad de PLC. * DAG presentó cambios en el tiempo, aumentando a los 40 y 60 minutos posterior a la administración del anticuerpo anti-MAG (DGC $p < 0.05$; $n = 118$ células), coincidente con la metabolización de PIP2. Panel B: mapas de FRET de OLGs a diferentes tiempos desde el inicio del tratamiento. Imagen termal en escala de pseudocolor. Colores cálidos: alta eficiencia de FRET; mayor disponibilidad de DAG. Colores fríos: Baja eficiencia de FRET; menor sustrato DAG.

Con el objetivo de demostrar la especificidad de la activación de PLC frente a los cambios en PIP2 y DAG generados por activación de MAG, los cultivos primarios de OLGs se trataron con U-73122, un inhibidor farmacológico de PLC. Se utilizó una concentración de 10 μ M del inhibidor y el análisis de FRET se llevó a cabo en los puntos temporales más significativos de disponibilidad de PIP2 (tiempo final 60 minutos, bajo PIP2) y DAG (tiempo final 40 min, alta disponibilidad de DAG). El tratamiento con U-73122 fue capaz de bloquear los cambios en ambos fosfoinosítidos inducidos por la activación de MAG mediada por Ab. Por un lado, se

bloqueó la hidrólisis de PIP2 luego de la activación de MAG, lo que resultó en un aumento neto en la concentración de PIP2 en la membrana plasmática del OL ($H(2,361)=12,69$ $p<0,05$). De manera similar, aquellas células tratadas con el inhibidor y luego expuestas al anticuerpo no demostraron un cambio en los niveles de DAG a los 40 minutos posterior al tratamiento ($H(2,128)=9,98$ $p<0,05$) (Figura 31).

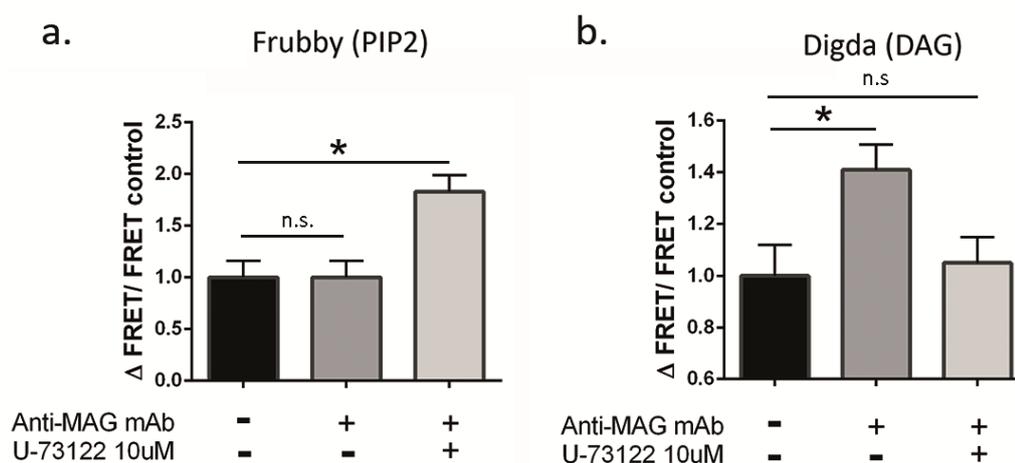


Figura 31: Analisis de la participación de PLC sobre la disminución de los niveles de PIP2 y el aumento de DAG mediados por anticuerpo anti-MAG. Panel A: Efecto de U-73122, inhibidor de PLC, en la disponibilidad de PIP2 a tiempo final. Luego del pico de abundancia de PIP2, su disponibilidad descendió hasta valores basales 60 minutos luego del tratamiento con anticuerpo. * El tratamiento con el inhibidor (10 μ M) bloqueó la disminución de PIP2 resultando en valores elevados (alta eficiencia de FRET) 60 minutos luego de la exposición al anticuerpo (DGC $p<0,05$). Panel B: Efecto de U-73122 en el sustrato de PLC, DAG. El pico de abundancia de DAG (aumento en la eficiencia de FRET) generado por activación de MAG se dio a los 40 minutos desde el inicio de la administración del anticuerpo (*DGC $p<0,05$). El tratamiento con 10 μ M del inhibidor de PLC eliminó el efecto de la activación de MAG sobre DAG, dado que la abundancia de DAG se mantiene en valores basales (DGC $p>0,05$).

Estos resultados confirman que la activación de MAG generada mediante uso de un anticuerpo monoclonal resulta en una estimulación de PLC y una activación subsecuente de las vías de señalización por DAG, un importante segundo mensajero. Este estudio corrobora observaciones previas donde se evidenció *in vitro* la unión y activación de PLC por la porción citoplasmática de MAG utilizando proteínas recombinantes (Jaramillo et al. 1994).

3. Caracterización de los receptores axonales de MAG capaces de estimular el efecto protector frente a condiciones de estrés oxidativo en OLs

3.1. La unión de MAG a su receptor neuronal GT1b puede generar un incremento en la respuesta antioxidante del oligodendrocito

La caracterización de ligandos axonales de MAG que presenten un efecto protector similar al encontrado al utilizar el anticuerpo anti-MAG brinda la posibilidad de extender las observaciones hacia moléculas con relevancia fisiológica, y a su vez abre la posibilidad de explotar el potencial terapéutico de éstas.

Para analizar si el efecto protector en OLs puede generarse mediante la unión de MAG a sus receptores neuronales, se analizó la respuesta de GSH en cultivos primarios de OLs administrando el gangliósido GT1b ligado a albúmina sérica bobina (GT1b₁₀-BSA), el primer ligando funcional descrito para MAG . También se suministró tratamiento con GM3 (GM3₁₇-BSA), un ligando de baja afinidad que presenta homología estructural compartiendo el dominio sialil-gal con GT1b. El tratamiento con GT1b generó una respuesta antioxidante significativa en los cultivos primarios, aumentando los niveles de GSH de manera similar al tratamiento con el anticuerpo, mientras que no se observó aumento significativo utilizando el ligando de baja afinidad. ($F(3,127)=4,01$, $p<0,005$) (Figura 32).

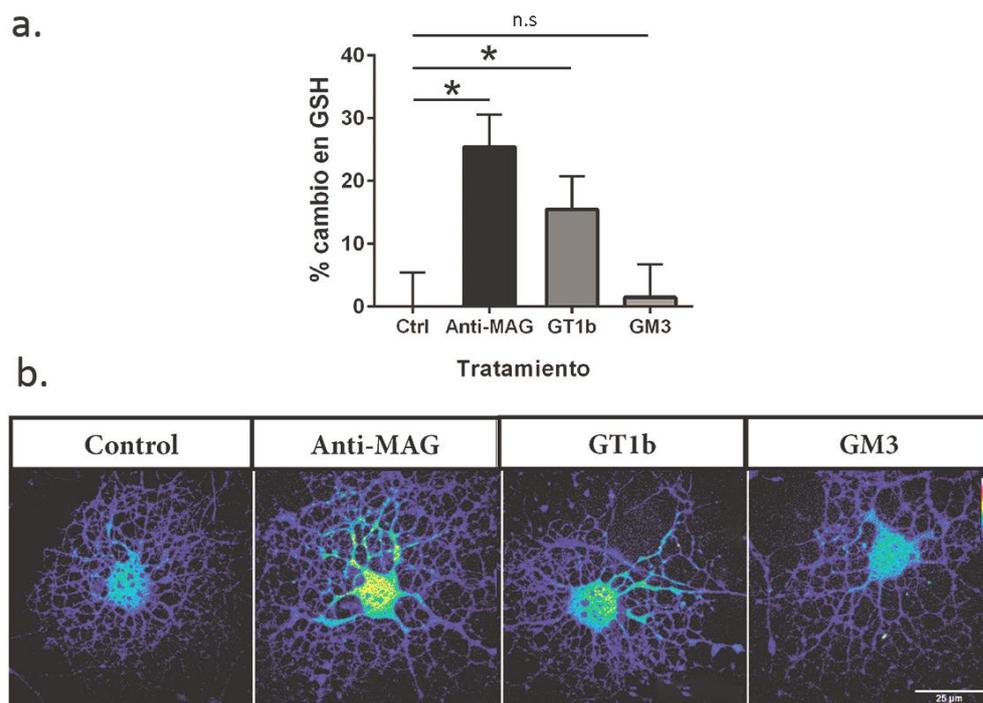


Figura 32: Efecto de la unión de MAG con sus receptores neuronales en la producción intracelular de GSH en cultivos primarios de OLs. Panel a: El tratamiento con GT1b ligado a albúmina, uno de los receptores axonales de MAG más estudiados, genera un aumento en los niveles intracelulares de GSH. El ligando GM3, de baja afinidad por MAG, no genera cambios en las defensas antioxidantes. * cambios significativos en GSH (DGC $p < 0,05$ $n = 131$ células). El gráfico representa valores medios y errores estándar de tres experimentos independientes. Panel b: Imágenes representativas de los niveles de GSH en OLs evaluados por la intensidad de fluorescencia del marcador mBCL bajo una escala de pseudocolor. Colores fríos representan bajos niveles de GSH. Colores cálidos indican niveles altos de GSH.

4. Análisis del efecto de la activación de MAG mediante su modulación con un anticuerpo específico en la sobrevida de OLs y neuronas en modelos animales de excitotoxicidad

4.1. El tratamiento con el anticuerpo anti-MAG protege a las neuronas frente la toxicidad mediada por glutamato en cultivos organotípicos

Para analizar si el efecto de la activación de MAG podría resultar en una protección para las células cercanas a los OLs como consecuencia de la remoción de glutamato extracelular, se

utilizó un modelo de cultivo organotípico de cerebelo de ratas postnatales. El mismo conserva la arquitectura tridimensional del tejido con un alto grado de mielinización y permite el estudio de las interacciones entre distintas poblaciones celulares. Utilizando este modelo se puede estudiar el efecto de la unión de MAG al anticuerpo separando las funciones dependientes de contacto con neuronas de otras funciones indirectas, como la captación de glutamato, ya que en el cerebelo existen poblaciones neuronales mielinizadas (células de Purkinje) así como también no mielinizadas (células granulares).

Los cultivos organotípicos se mantuvieron en cultivo por siete días, luego de los cuales fueron tratados por 24 horas con anticuerpo anti-MAG o anticuerpo control. Pasado este tiempo, se administró glutamato en el medio de cultivo a una concentración final de 2mM para inducir toxicidad por 24 horas. Se analizó la presencia de neuronas en apoptosis mediante inmunofluorescencia utilizando microscopía confocal. Se emplearon tres criterios para identificar las neuronas apoptóticas: ser positivas para el anticuerpo anti-NeuN (marcador neuronal), poseer marca positiva para la forma clivada de caspasa-3, un conocido marcador de apoptosis, y presentar signos evidentes de fragmentación nuclear.

El tratamiento con el anticuerpo anti-MAG fue eficiente en bloquear el efecto tóxico sobre las células granulares ($F(2,19)=9,93$ $p<0,005$), sugiriendo que el efecto protector de la recaptación de glutamato por OLs puede prevenir la muerte de las células aledañas más sensibles a este factor tóxico (Figura 33).

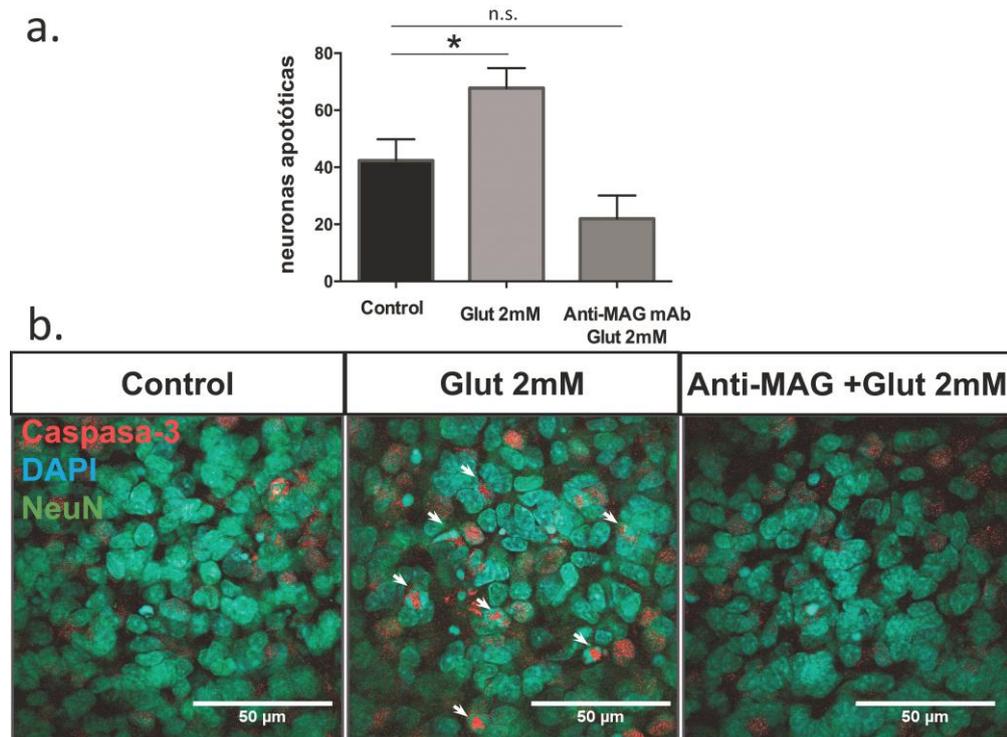


Figura 33: Efectos de la activación de MAG sobre la protección de neuronas frente a la toxicidad mediada por glutamato en un modelo de cultivo organotípico. Los anticuerpos (control o Anti-MAG mAb) se administraron a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 24 horas previo al inicio del tratamiento con glutamato (2mM por 24 horas). Los cultivos se fijaron y se realizó una inmunotinción con anticuerpos anti NeuN (marcador de neuronas granulares) y anti caspasa-3 clivada (marcador de apoptosis). El tejido cultivado se analizó mediante microscopia confocal en zonas positivas para los dos marcadores con cortes cada 5 μm de profundidad. En muestras de 0,02 mm² las neuronas apoptóticas (positivas para NeuN y caspasa3) se identificaron además en base a su morfología (condensación y de ADN y fragmentación nuclear). Panel a: El tratamiento con glutamato por 24 horas incremento la muerte apoptótica de las neuronas granulares (*DGC $p < 0,05$) mientras que el tratamiento con anticuerpo anti-MAG fue efectivo en bloquear la toxicidad. Panel b: Fotomicrografías de secciones confocales de cultivos organotípicos de cerebelo representativas de cada tratamiento. Las flechas muestran células granulares apoptóticas.

4.2. La activación de MAG-anticuerpo ejerce un efecto neuroprotector en un modelo *in vivo* de excitotoxicidad caracterizado por sobrecarga de glutamato

Con el objetivo de probar la efectividad del anticuerpo monoclonal anti-MAG en un modelo in-vivo, disecando en lo posible los efectos tempranos por sobrecarga glutamatérgica de los generados por inflamación tardía, utilizó un modelo de excitotoxicidad generado a partir de una administración directa de glutamato por inyección intracranial (500nmoles/0,5µl). Este modelo aproxima los eventos excitotóxicos tempranos que ocurren en un ACV.

En primera instancia, con el objetivo de probar el concepto de protección neuronal generado por unión/activación de MAG mediante el anticuerpo monoclonal, los animales fueron pre tratados con anticuerpo anti-MAG o IgG control 24 horas antes de la inyección de glutamato y se llevó a cabo un análisis volumétrico de las lesiones inducidas por el aminoácido mediante el uso de FloroJadeC un marcador fluorescente selectivo de degeneración neuronal. Los resultados demostraron un fuerte efecto protector del pretratamiento con anticuerpo anti-MAG. Aquellos animales tratados con el anticuerpo presentaron una reducción del aproximadamente 60% del volumen de lesión neuronal en comparación con individuos tratados con anticuerpo control ($F(1,13)=12,71$ $p<0,05$).

Posteriormente, en otro grupo de experimentos, se analizó la posible eficacia terapéutica del anticuerpo administrándolo una hora posterior a la inyección de glutamato. Esta ventana temporal se utilizó como una aproximación a la clínica humana, por ser el tiempo promedio que transcurre desde que un paciente sufre un ACV hasta que recibe asistencia hospitalaria. El post-tratamiento con anticuerpo anti-MAG también resultó efectivo para modular el tamaño de la lesión ($F(1,13)=7,62$ $p<0,05$) (Figura 34).

De esta manera, la activación de MAG podría prevenir la muerte de las células de la penumbra de la lesión, evitando la propagación de la onda excitotóxica y modulando el daño oxidativo secundario, generando como resultado lesiones de menor volumen.

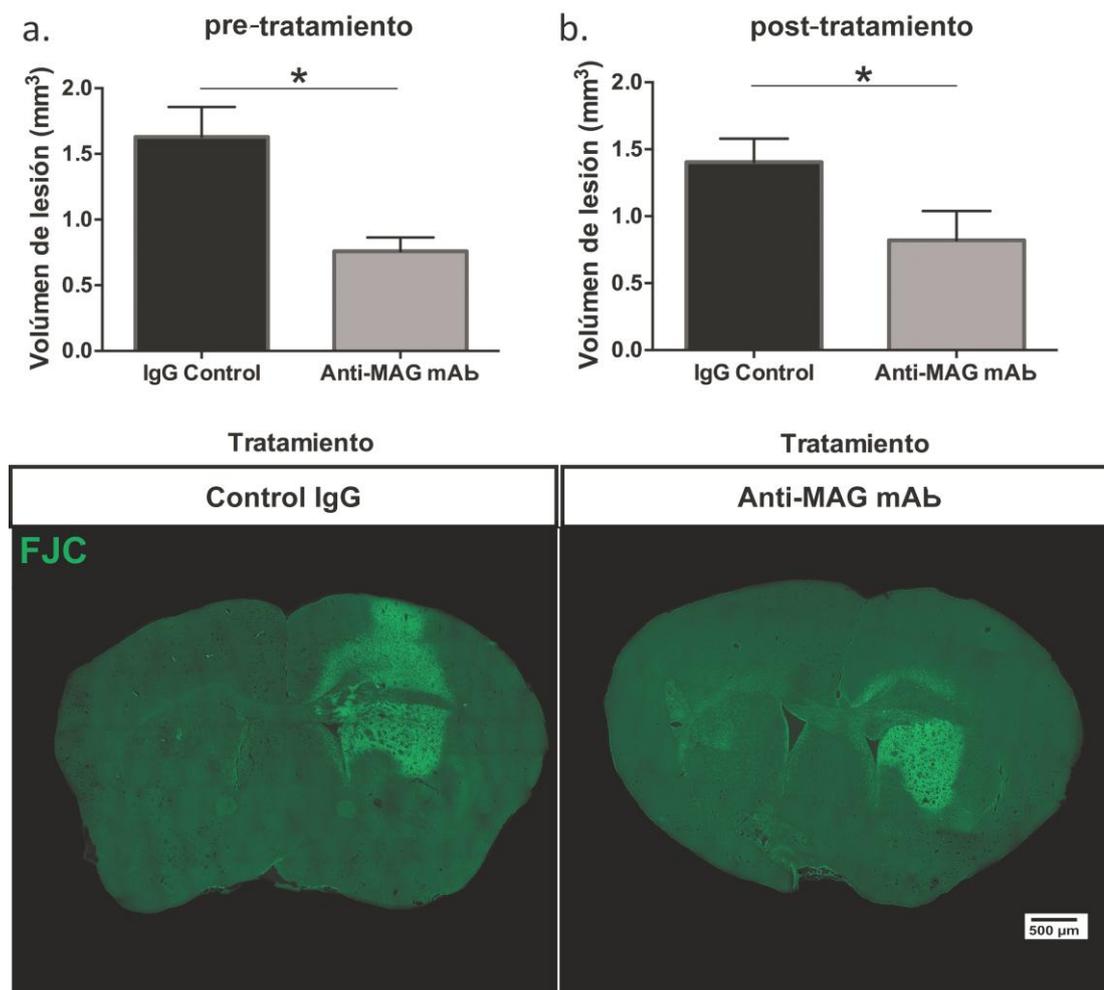


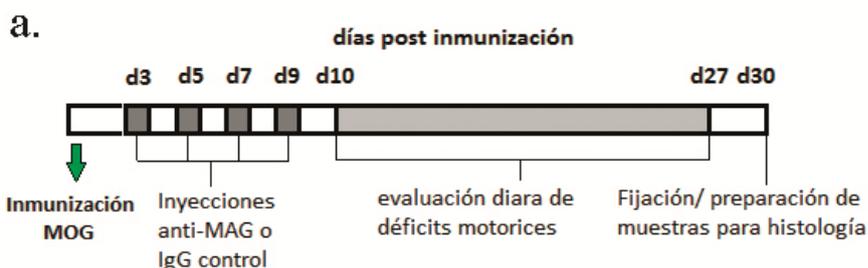
Figura 34: Evaluación de los efectos de la activación de MAG mediada por un anticuerpo monoclonal sobre los volúmenes de lesión en un modelo de sobrecarga glutamatérgica que asemeja los primeros eventos de un ACV. Panel A: El pre-tratamiento (24 horas antes de la administración de glutamato) previene el aumento del volumen de las lesiones cerebrales teñidas con fluoro jadeC ($t=12,71$ $p=0,007$). Panel B: El tratamiento post-lesión excitotóxica con anticuerpo anti-MAG (1 hora posterior al glutamato) sigue siendo efectivo para restringir la propagación del daño del tejido nervioso ($t=7,62$; $p=0,02$). Abajo: Imágenes representativas de cortes de cerebros tratados con Ab anti-MAG o anticuerpo control mostrando áreas de lesión (verde claro, FJC positivo).

4.3. El tratamiento con anticuerpo anti-MAG mejora los signos clínicos en un modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)

Se ha establecido que el daño axonal en la esclerosis múltiple posee estrecha relación con un metabolismo de glutamato alterado y aumento de estrés oxidativo. Por esta razón se puso a prueba la efectividad de la protección generada por activación de MAG como tratamiento para amortiguar los efectos tóxicos del glutamato y aumentar las defensas antioxidantes.

Se evaluaron los efectos del tratamiento anti-MAG en ratones con encefalomiелitis autoinmune experimental, un modelo animal que asemeja la enfermedad humana esclerosis múltiple. La EAE se generó experimentalmente como resultado de la inmunización con MOG (glicoproteína de mielina de oligodendrocito), un componente minoritario de la vaina de mielina. Este modelo genera un daño axonal característico y secundario a los eventos de desmielinización. Se utilizaron cinco animales por tratamiento asignado, que consistió en cuatro inyecciones intraperitoneales de 100 μ g de anticuerpo anti-MAG o su control (1mg/ml) en los días tercero, quinto, séptimo y noveno posteriores a la inmunización con MOG. Los animales fueron evaluados en el tiempo para determinar la progresión de los déficits motores en base a una escala de disfunción motora estandarizada.

Los resultados del análisis revelaron diferencias causadas por el tratamiento en los patrones temporales del grado de parálisis de los animales. Aquellos animales inyectados con el anticuerpo anti-MAG presentan valores de la escala clínica menores que los animales enfermos tratados con una inmunoglobulina control (reducción de 0.59 puntos en la escala clínica). A su vez, el comienzo de la enfermedad se ve retrasado (promedio de dos días en el inicio y de 4 días en el pico de los síntomas clínicos) ($F(2,8)=3,02$ $p<0,0001$) (Figura 35).



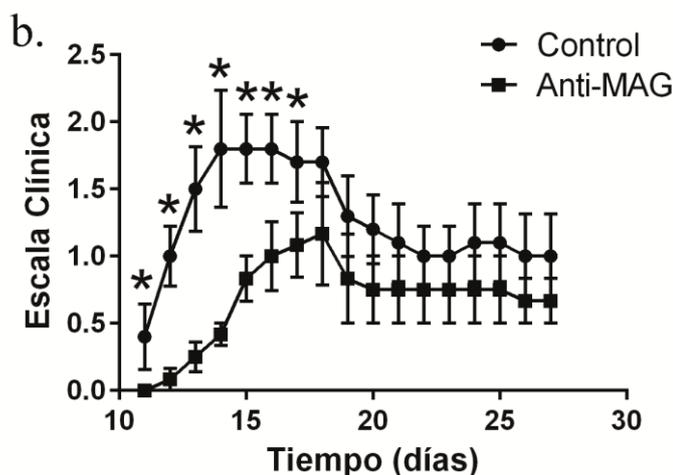


Figura 35: Diseño experimental y evaluación clínica en el modelo de EAE. Panel A. Diseño experimental. Los animales fueron tratados con inyecciones intraperitoneales de 100 μ g de anticuerpo anti-MAG o IgG control en los días tercero, quinto, séptimo y noveno posteriores a la inmunización con MOG y fueron evaluados en el tiempo (desde los 10 días post inmunización hasta los 27 días post inmunización) para determinar la progresión de los déficits motores en base a una escala de disfunción motora estandarizada. Panel B. Evaluación de déficits motrices de animales con EAE tratados con anti-MAG o anticuerpo control. El tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-MAG disminuyó los síntomas clínicos y generó un retraso en el inicio de los síntomas en un modelo de esclerosis múltiple (EAE) (* $p < 0,05$).

4.4. El tratamiento con anticuerpo anti-MAG posee un efecto axonoprotector en un modelo de EAE

Con el objetivo de determinar el grado de protección axonal determinada por la modulación del ambiente tóxico generada por activación de MAG, luego del análisis clínico los animales EAE fueron sacrificados a tiempo final (27 días posterior a la inducción de la enfermedad) y se procedió a cuantificar el número de axones mielinizados remanentes en el fascículo grácil de la médula espinal en la región cervical C5 en cortes semifinos de 1 μ m de espesor teñidos mediante azul de toluidina. Para evaluar la pérdida axonal, como control se utilizó un grupo de animales no inducido a EAE (naive).

Aquellos animales EAE tratados con IgG presentaron una pérdida axonal media del 50% en las zonas cuantificadas en comparación a animales naive ($F(2,12)=5,08, p<0,05$). En contraste, el grupo que recibió el tratamiento anti-MAG evidenció una reducción axonal de solo el 25%, siendo esta diferencia no significativa respecto al grupo naive (Figura 36)

A su vez, se correlacionó el conteo axonal con el del grado individual de parálisis motriz media y el grado individual más alto de parálisis, demostrando una alta relación entre estos valores (valores de correlación de Pearson: conteo axonal/valor clínico medio $P=-0,94$; conteo axonal/valor clínico más alto $P=-0,98$)

Este conjunto de resultados brinda evidencias de que la activación de MAG mediada a través de la administración sistémica de un anticuerpo específico posee efectos protectores sobre los axones neuronales en un modelo animal *in vivo* de la enfermedad humana esclerosis múltiple.

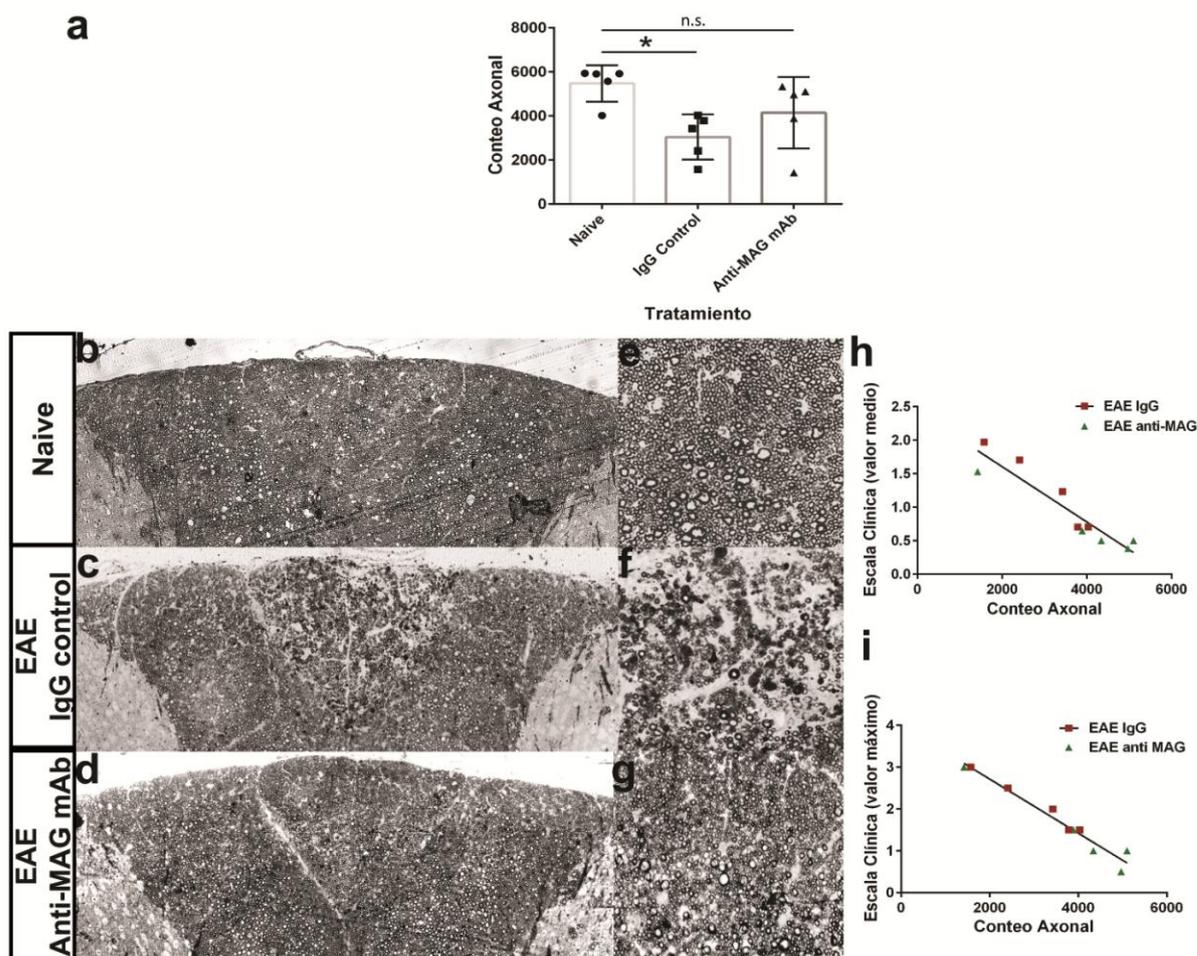


Figura 36: Efectos del anticuerpo anti-MAG sobre los axones del fascículo gracile en la sección C5 de la médula espinal luego de 27 días de inducción de la EAE. Panel A: Conteo axonal. La inducción de la EAE generó una mayor pérdida de los axones mielinizados en animales tratados con IgG control respecto a controles naive (*diferencia significativa entre animales no inducidos y EAE-controles $p < 0,05$). Los animales tratados con anti-MAG mostraron una respuesta intermedia, con una evidente amortiguación de la pérdida axonal en la mayoría de los casos. Paneles B a G: Microfotografías representativas de cortes de 1 μm de espesor teñidos con azul de toluidina mostrando el fascículo grácil de la médula espinal en región cervical 5. b, animales naive o no inducidos; c, EAE+ con tratamiento IgG control; d, EAE+ con tratamiento anti-MAG. Se proveen magnificaciones y detalle de los axones en las imágenes e, f y g. Paneles h, i: Correlaciones entre la valoración clínica individual promedio de 30 días de observaciones (h) o el valor clínico máximo individual (i) y el conteo axonal. Correlaciones de Pearson: conteo axonal/valor clínico medio $P = -0,94$; conteo axonal/valor clínico más alto $P = -0,98$.

Discusión

Durante los últimos años y gracias a gran cantidad de evidencias experimentales se han develado muchas de las funciones oligodendrogiales con respecto al soporte axonal, demostrando claramente los efectos protectores de la mielina sobre los axones que envuelve (Morrison, Lee, y Rothstein 2013; Simons y Nave 2016). La identificación de factores asociados a mielina que contribuyen a estos efectos se ha transformado en un paso crítico hacia la comprensión de los mecanismos moleculares que controlan la homeostasis del SNC, al mismo tiempo abriendo la posibilidad de desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Uno de estos factores es MAG, un componente minoritario del sistema nervioso expresado preferencialmente en la zona periaxonal de mielina, en íntimo contacto con los axones. Dada su localización, la glicoproteína se encuentra comprometida en la comunicación bidireccional entre axones y células mielinizantes (Quarles 2007).

Se conoce que MAG actúa como una proteína multifuncional. Bajo condiciones fisiológicas muchas de sus funciones se encuentran relacionadas a la promoción de estabilidad tanto de las vainas de mielina como de los axones que envuelve. De esta manera, MAG se encuentra implicada en la formación de mielina y en el mantenimiento a largo plazo de la misma (revisado por Schachner y Bartsch 2000). Es a su vez capaz de regular el calibre axonal, controlar la distribución de moléculas en los nodos de Ranvier y promover la estabilidad de los axones que envuelve.

Adicionalmente a estos efectos, MAG posee un amplio rol protector. Se ha reportado que la glicoproteína ejerce un efecto protector frente a la apoptosis de motoneuronas durante el desarrollo postnatal a través de la unión con su ligandos NgRs y una cascada de señalización que involucra a p75 y la vía RhoA/ROCK (Palandri et al. 2015). Bajo condiciones patológicas promueve la estabilidad de citoesqueleto de tubulina y la resistencia al daño axonal *in vitro* mientras que *in vivo* previene eventos de degeneración axonal (Nguyen et al. 2009). Este efecto se extiende más allá de los axones mielinizados, impactando directamente en la supervivencia neuronal frente a condiciones de excitotoxicidad (Lopez et al. 2011).

La mayoría de los estudios acerca de las funciones biológicas de MAG se centran en sus efectos sobre neuronas y las vías de transducción asociadas, en cambio existen pocos estudios respecto de cómo las señales originadas en el axón podrían tener un impacto sobre los OLs, más aún teniendo en cuenta la presencia de dominios intracelulares en MAG capaces de interactuar y/o activar diferentes vías de señalización y la naturaleza bidireccional de la comunicación axón-glia.

Previamente se ha reportado que la unión de MAG con un anticuerpo monoclonal específico (anti-MAG, clon 513) tiene la capacidad de generar eventos de señalización en los OLs que incluyen redistribución de la glicoproteína en balsas lipídicas, hiperfosforilación de Fyn, defosforilación de proteínas específicas y una despolimerización temporal de actina (Marta et al. 2004). De esta manera, el anticuerpo anti-MAG ha sido propuesto como una herramienta que simula la interacción de la glicoproteína con sus receptores axonales (Marta et al. 2004) volviéndose útil para dilucidar las vías de señalización de MAG sobre las células mielinizantes, que hasta el momento han sido poco estudiadas.

Por otra parte, se ha encontrado que el tratamiento con anticuerpo anti-MAG genera un efecto protector in vitro contra la toxicidad por glutamato en OLs (Irving et al. 2005), aunque no se ha reportado el mecanismo ni la vía de señalización subyacente a estos resultados.

En la presente tesis, utilizando diferentes metodologías, se buscó identificar tanto los mecanismos como las vías de señalización intracelulares que contribuyen al efecto de protección frente a sobrecarga glutamatérgica en un modelo in vitro de cultivo de OLs primarios. A su vez, se evaluó la efectividad de la administración de anticuerpo anti-MAG sobre la modulación de la muerte neuronal y pérdida axonal en dos modelos animales que asemejan enfermedades humanas en las que la desregulación del aminoácido posee un rol central.

Respecto a los mecanismos de protección, se lograron identificar dos efectos que parecen funcionar de manera sinérgica elevando las defensas frente a la toxicidad inducida por la sobrecarga glutamatérgica en OLs y a su vez brindando un entorno protector a células cercanas sensibles, como las neuronas. Por un lado, la unión y activación de MAG en OLs maduros genera como consecuencia final un aumento de las defensas antioxidantes en dichas células, evidenciado

por un incremento en la cantidad de glutatión intracelular. Por otra parte se registró un efecto de internalización de glutamato extracelular que conlleva a una disminución de la excitotoxicidad.

Respecto del efecto de recaptación de glutamato, por mucho tiempo, tanto la expresión de transportadores glutamatérgicos gliales y la función de recaptación fue atribuida exclusivamente a las células astrocíticas (Anderson y Swanson 2000). En este sentido, es importante aclarar que dichas células se encuentran especializadas en la captación del aminoácido en las zonas sinápticas de la sustancia gris, pero hasta el momento hay escasa evidencia acerca de su rol sobre las modulación de glutamato extrasináptico en sustancia blanca. En esta región, los transportadores de glutamato se encuentran presentes también en células oligodendrocitarias: se ha detectado la presencia tanto de ARNs mensajeros para GLAST, GLT1 y EAAC1 (Kondo et al. 1995; Martínez-Lozada et al. 2014) como de sus correspondientes proteínas (Martínez-Lozada et al. 2014; Domercq et al. 1999) en cultivo de OLs de rata, que concuerdan con estudios funcionales de recaptación de glutamato in vitro (Pitt et al. 2003).

Todavía existen controversias respecto a la participación de cada subtipo de transportador en la recaptación glutamatérgica comparando diferentes tipos celulares. Se ha sugerido que el transporte de glutamato es mediado principalmente por GLT1 en OLs y por GLAST en astrocitos, pero los datos inmunohistoquímicos demuestran que las células oligodendrocitarias expresan principalmente GLAST mientras que GLT1 está enriquecida en astrocitos, por lo que las contribuciones relativas de estos dos tipos celulares en la recaptación glutamatérgica no se encuentran claras (Domercq et al. 1999). De manera interesante, las enzimas claves del metabolismo de glutamato y los transportadores para este aminoácido se encuentran presentes predominantemente en células oligodendrocitarias y con menos extensión en astrocitos (Pitt, Werner, y Raine 2000), mientras que los cultivos de OLs humanos expresan en forma robusta tanto EAAT1 como EAAT2 (Pitt et al. 2003). Por otra parte, la mayoría de los astrocitos de la materia blanca (a excepción de algunos de las capas subcorticales, que presentan baja expresión) carecen relativamente de transportadores de glutamato, especialmente EAAT2, responsable de más del 90% de la recaptación de glutamato en el SNC (Rothstein et al. 1996). De esta manera, los OLs se

posicionan como componentes clave para mantener la homeostasis del neurotransmisor (Pitt et al. 2003; Werner, Pitt, y Raine 2001; Haroon, Miller, y Sanacora 2017).

Con respecto al aumento de GSH en los OLs generado por el tratamiento con anticuerpo anti-MAG, es importante aclarar que las defensas antioxidantes cumplen un importante rol de protección frente a la muerte de los OLs por glutamato, ya que el estrés oxidativo constituye una de las causas más importantes de toxicidad y muerte oligoendocitaria mediada por glutamato. En este sentido, la expresión de receptores glutamatérgicos ionotrópicos y metabotrópicos se encuentra disminuida en los OLs maduros (Deng et al. 2004; Benarroch 2009) y se ha reportado que dichas células presentan resistencia a la toxicidad mediada por NMDA (Guo et al. 2012), por lo que se asume que la toxicidad se genera en mayor medida por depleción de glutatión como resultado de la inhibición de la importación de cistina (Oka et al. 1993; Rosin, Bates, y Skaper 2004; Irving et al. 2005). Cabe aclarar que también existen estudios que ponen en evidencia un cierto peso de factores de excitotoxicidad en los procesos de daño y muerte de estas células, por ejemplo la sobrestimulación de receptores AMPA (McDonald et al. 1998). Estos receptores se expresan en OLs maduros derivados de rata (Steinhäuser y Gallo 1996) en contraste con los derivados de tejido humano, que presentan baja expresión y son resistentes a la muerte inducida por AMPA/Kainato (Wosik et al. 2004). Es importante destacar que tanto los procesos de depleción de GSH como las vías de excitotoxicidad convergen finalmente en un estado de estrés oxidativo general, que puede ser atenuado por los efectos de estimulación de MAG.

Se conoce que el GSH intracelular representa el factor antioxidante más importante en el sistema nervioso de mamíferos (Lewerenz, Klein, y Methner 2006). Para su síntesis, el sistema X_c^- y los EAATs trabajan en forma sinérgica proveyendo dos de los tres precursores necesarios: cistina y glutamato. En este trabajo se ha demostrado que el incremento de GSH debido a la activación de MAG es, en efecto, dependiente tanto de la actividad del sistema X_c^- como la de los transportadores.

Uno de los moduladores clave de la actividad antioxidante celular es Nrf2. En situaciones fisiológicas este factor de transcripción se encuentra retenido en la porción citoplasmática por Keap1 o Inrf2, que desencadena una vía de degradación proteasomal. Se conoce que la

fosforilación mediada por PKC de la serina 40 de Nrf2 puede lograr la disociación de su inhibidor, lo que conlleva a una relocalización nuclear del factor y posterior activación de genes maestros conteniendo el dominio regulatorio ARE, encargados de regular la respuesta frente a estrés oxidativo (Huang, Nguyen, y Pickett 2002; Bloom y Jaiswal 2003). De manera interesante, la activación de Nrf2 se encuentra asociada al aumento transcripcional del intercambiador glutamato-cistina y de las enzimas limitantes para la síntesis de glutatión, lo que convierte a este factor en un probable nodo de señalización por MAG en el OL. En efecto, los resultados demostraron que tanto la inmunomarcación nuclear de Nrf2 activo como los niveles de ARN mensajero para las enzimas de síntesis de GSH se encuentran incrementados luego de la activación de MAG mediada por anticuerpo.

Sumado a lo anterior, se registró un aumento en la expresión del intercambiador glutamato-cistina en la membrana citoplasmática de los OLs luego del tratamiento con el anticuerpo anti-MAG, confirmando que los altos niveles de ARNm encontrados se traducen en efecto a proteína. Como observación cualitativa adicional, dicho aumento fue más evidente en los procesos celulares con relación al soma, y presentó una alta relación espacial con la expresión de la glicoproteína. Se abre entonces la posibilidad de que la estimulación de MAG no sólo aumente la expresión del intercambiador, si no que también influya en la relocalización del mismo mediante activación de las vías de señalización relacionadas directamente con su dominio citoplasmático.

Paralelamente se observó que los niveles transcripcionales de los transportadores de glutamato no son afectados por la activación de MAG. Estos transportadores son parte funcional del incremento de glutatión en el OL, ya que el tratamiento con un inhibidor de EAATs eliminó la respuesta de GSH inducido por activación de MAG, pero al contrario que X_c^- , su expresión no se encuentra regulada por Nrf2. Se puede hipotetizar entonces que el factor desencadenante de la generación de GSH posterior a la activación de MAG es el aumento de la expresión de AREs, que no sólo induce las enzimas de síntesis de GSH si no que también genera un incremento de expresión de la cadena reguladora del intercambiador, posibilitando la entrada del sustrato cistina al citoplasma del OL.

Al no evidenciar cambios en la expresión de EAATs, se genera el interrogante sobre el mecanismo subyacente al incremento en la recaptación de glutamato generado por activación de MAG y en este sentido es posible hipotetizar diferentes escenarios. Por un lado, se encuentra ampliamente establecido que el sistema X_c^- y los EAATs funcionan en forma acoplada y se ha observado que existen mecanismos subyacentes que los co-regulan, ya que por ejemplo el uso de fármacos desarrollados para incrementar la expresión de los EAATs también inducen un incremento en Nrf2 y X_c^- (Lewerenz et al. 2009). Al tratarse de un sistema sinérgico, probablemente existan además diversas vías alternativas de modulación entre el intercambiador y los transportadores que todavía permanecen sin dilucidarse. De esta manera, un incremento en la expresión del intercambiador podría ejercer un incremento en la actividad de los EAATs, a pesar de que no existan cambios significativos a nivel proteico. Por otro lado, el consumo de glutamato para síntesis de GSH genera una demanda intracelular del aminoácido, reestableciendo o incrementando el gradiente químico de glutamato dentro y fuera del OL, impulsando la entrada del aminoácido a través de EAATs. Adicionalmente, se deben considerar mecanismos regulatorios que impacten exclusivamente sobre los EAATs. En este sentido, se ha descrito la existencia de un mecanismo regulatorio de EAATs dependiente de la actividad de PKC en una línea celular de origen glial, en donde la cinética de fosforilación se encuentra relacionada a un incremento en la recaptación de glutamato (Casado et al. 1993), por lo que este proceso podría estar mediando el efecto de recaptación observado.

A su vez, un aumento de la recaptación de glutamato sin que medien incrementos en la expresión de EAATs contribuiría al efecto protector. Existen evidencias de que los transportadores de glutamato oligodendrogiales son uno de los mediadores principales de la toxicidad del aminoácido, razón por la cual una sobreexpresión de estas proteínas podría desencadenar un aumento de toxicidad en vez de aumentar la protección contra el mismo (Oka et al. 1993). En base a esto, el aumento del intercambiador y por consiguiente de la síntesis de GSH generan un efecto de recaptación de glutamato para su utilización metabólica sin intervenir en la sobreexpresión de los transportadores y sin generar una acumulación potencialmente tóxica del aminoácido en el citoplasma del OL.

Cabe puntualizar que el sistema X_c^- , a medida que permite la entrada de cistina, exporta glutamato hacia el espacio extracelular. Este proceso aislado podría en teoría generar un aumento en la concentración extracelular del aminoácido, pero dado por un lado su gradiente químico y por el otro el hecho de que la síntesis de GSH lo utiliza como sustrato, es de esperar que reingrese hacia el OL a través de los transportadores existentes para luego ser metabolizado.

La PKC juega un papel central en articular la señalización de MAG con la activación de Nrf2. Se conoce que la glicoproteína posee un dominio intracelular con función de andamio para varios mensajeros moleculares (Jaramillo et al. 1994) y que PKC posee la capacidad de fosforilar la porción yuxtamembrana de MAG (Kursula 2000), aunque hasta el momento no se conoce si esta vía es bidireccional, pudiendo MAG activar directamente a PKC. Este trabajo de tesis demuestra una forma de activación indirecta de PKC por MAG a través de la producción de DAG mediante la activación de PLC γ . Esto se puso de manifiesto mediante la caracterización una vía temprana de señalización de MAG a través del uso de biosensores específicos para fosfolípidos. Hasta el momento sólo existían evidencias de que el residuo Tyr-620 de la porción citoplasmática de la glicoproteína podía interactuar específicamente con los dominios SH2 de la proteína PLC γ (Jaramillo et al. 1994), por lo que este trabajo es el primero en confirmar la activación de PLC mediante activación de MAG en un sistema biológico y en describir su curso temporal.

El metabolismo de PIP2 por PLC genera dos importantes segundos mensajeros: IP3 y DAG. Estos intermediarios, además de activar a PKC en la membrana, desencadenan vías de señalización paralelas, ya que el producto IP3 es soluble y difunde a través del citoplasma donde puede interactuar con el retículo endoplasmático y provocar la liberación de Ca^{+2} . Aunque existen estudios sobre la relación entre la activación de MAG y Ca^{+2} en neuronas (Wong et al. 2002), la dinámica de Ca^{+2} generada por activación de MAG en los OLs aún no ha sido evaluada. La señalización por Ca^{+2} es un paso fundamental para la activación de PKC y abre la puerta a nuevos estudios respecto a las vías de transducción de señales en células mielinizantes.

Además de la interacción del dominio citosólico de MAG con PLC γ , todavía quedan por identificar otros potenciales ligandos intracelulares de MAG que puedan unirse mediante un dominio SH2 y contribuir a este u otros efectos mediados por la glicoproteína. Sumado a esto, la vía

de señalización temprana de MAG podría ser más compleja, involucrando a la proteína quinasa de tirosinas Fyn, el efector citoplasmático de MAG más estudiado en OLS debido a su papel en procesos de mielinización. Se ha hipotetizado con anterioridad que Fyn actúa aguas arriba de PLC ya que el motivo de unión de MAG a PLC es regulado por fosforilación de los residuos tirosina (Jaramillo et al. 1994). De esta manera, el reclutamiento de efectores de MAG podría tener un grado de complejidad aún mayor.

La señalización temprana generada por activación de MAG mediante un anticuerpo monoclonal puede desencadenarse de diversas maneras. Se conoce que la unión del anticuerpo a la glicoproteína genera su distribución en microdominios lipídicos (lipid rafts) dependientes de la actividad de citoesqueleto (Marta et al. 2004). Por otra parte, recientes análisis por cristalografía del dominio extracelular de MAG han revelado que dicha porción posee una conformación extendida con flexibilidad limitada entre los dominios tipo inmunoglobulina y que las zonas extracelulares de diferentes monómeros de MAG pueden generar dímeros mediante la unión de sus dominios IgG4 e IgG5 más cercanos a la membrana, aunque esta interacción cis resulta débil y necesita ser estabilizada in trans mediante ligandos (Pronker et al. 2016). Teniendo esto en cuenta, el tratamiento con anticuerpo podría generar un reclutamiento de monómeros de MAG facilitando la generación de dímeros y su estabilización. El estudio de las estructuras cristalográficas han demostrado que en los dímeros las zonas C-terminal de los dominios extracelulares de las formas monoméricas de MAG se encuentran separados por 5.4nm, lo que genera una gran proximidad de sus regiones citosólicas (Pronker et al. 2016). Este acercamiento podría potencialmente generar una trans activación de éstas para dar curso a la cascada de señalización en el OL.

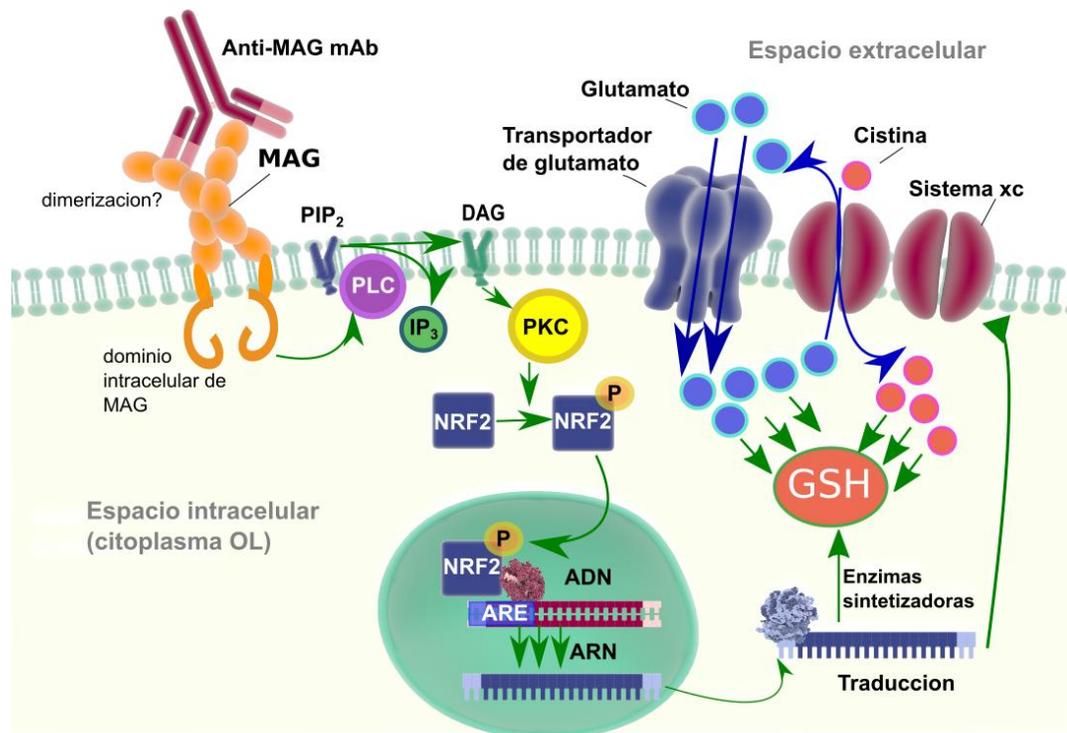


Figura 37: Representación esquemática de la vía de señalización descrita en este trabajo.

Los efectos derivados de la activación de MAG por tratamiento anti-MAG no sólo afectan directamente a los OLs sino que repercuten en poblaciones celulares más vulnerables a la toxicidad por glutamato, como las neuronas. En este trabajo se ha demostrado que la activación de la glicoproteína puede generar sobrevida de neuronas granulares en un cultivo organotípico de cerebelo. Esta población neuronal es la más numerosa del SNC y utiliza glutamato como neurotransmisor, por lo que son sensibles a desbalances del aminoácido. Es importante puntualizar que los axones de las neuronas granulares no se encuentran mielinizados, por lo que los efectos de protección descritos se generan por vías independientes de contacto con la población oligodendroglial, presumiblemente a través de la disminución en el glutamato extracelular potencialmente tóxico discutido anteriormente. En este sentido, la captación y metabolización de

glutamato por OLs generada por tratamiento con el anticuerpo anti-MAG se sumaría al efecto ya conocido de captación del aminoácido por las células astrocíticas, presentes en estos cultivos.

Dados estos resultados, una cuestión que permanece abierta es la existencia de vías de protección no dependientes de contacto, diferentes a la reducción de glutamato extracelular, que puedan contribuir al efecto protector observado en neuronas luego del tratamiento con el anticuerpo anti-MAG. Por un lado, el efecto protector en células granulares podría ser indirecto y deberse a una preservación de las neuronas de Purkinje, que poseen vaina de mielina y se encuentran integradas en circuito con las neuronas granulares. Por otra parte, también puede existir liberación de factores protectores parácrinos desde los OLs hacia neuronas no mielinizadas. En este sentido se ha observado que los exosomas de OLs pueden proteger neuronas frente a estrés oxidativo (Frühbeis et al. 2013). Ya que las concentraciones de glutatión son consistentemente mayores en células gliales en relación a las neuronas (Chatterjee et al. 1999), es posible especular que los OLs estimulados puedan ejercer neuroprotección mediante la exportación de GSH a través de dichas estructuras.

Respecto al posible uso terapéutico del anticuerpo monoclonal anti-MAG, recientemente anticuerpo monoclonal anti-MAG ha sido humanizado (comercialmente denominado Refanezumab o GSK249320), modificado con el fin de reducir interacciones potenciales con el sistema inmune y su eficacia se ha probado tanto en estudios pre-clínicos en amínales como en ensayos clínicos que incluyeron pacientes con ACV (Cramer et al. 2013, 2017).

Por una parte, en los estudios preclínicos con modelos animales, la terapia anti-MAG ha demostrado ser efectiva para disminuir los volúmenes de lesión en un modelo de isquemia por oclusión de la arteria cerebral medial (MCAO) (Irving et al. 2005). Adicionalmente se demostró que dicha terapia promueve la recuperación funcional luego de un daño traumático cerebral experimental (TBI) (Thompson et al. 2006). Con respecto a la forma humanizada del anticuerpo (GSK249320), la misma ha sido probada en ratas con isquemia por oclusión arterial, donde ha demostrado su efectividad para penetrar hacia el área de lesión, asociándosele efectos de mejoras

moderadas respecto al desempeño funcional de los animales cuando el tratamiento se inicia a las 24 horas post-daño pero no en ventanas temporales mayores (Cash et al. 2016). Adicionalmente su efectividad se ha determinado en primates en un modelo de infarto focal isquémico cortical, facilitando la recuperación funcional a través de un tratamiento administrado 24 horas luego del daño (Barbay et al. 2015). En la mayoría de los casos anteriores, se ha dado sentido a los resultados encontrados bajo la premisa de un aumento en la regeneración axonal que ocurre al bloquear la capacidad inhibitoria de MAG.

Respecto a los ensayos en humanos se pronosticó, basado en los resultados de los estudios en animales, que el anticuerpo humanizado promovería recuperación clínica en pacientes con ACV por medio del bloqueo de la actividad inhibitoria de MAG, generando por consiguiente una recuperación funcional en el SNC. Sin embargo, a pesar de no presentar efectos tóxicos en voluntarios saludables (Abila, Cunningham, y Simeoni 2013), el tratamiento con anticuerpo no fue eficiente para reproducir los resultados preclínicos: administrado dentro de las 72 horas de instauración de los síntomas clínicos del ACV, GSK249320 demostró no tener efecto sobre la recuperación de la velocidad de marcha de los pacientes en comparación con individuos que recibieron placebo (Cramer et al. 2017).

La discrepancia observada en los resultados de la terapia anti-MAG entre modelos pre-clínicos y clínicos puede tener varias explicaciones. Por un lado los modelos animales de ACV no reflejan las particularidades observadas en las formas humanas. Por otro lado, también se podría argumentar que la promoción de la regeneración axonal asociado con la terapia anti-MAG no es el principal efecto protector, lo que conlleva a una tardía instauración del tratamiento si se considera la recaptación del glutamato extracelular como el mecanismo de acción central.

En primera instancia, pese a las numerosas evidencias *in vitro* acerca del rol inhibitorio de MAG sobre el sprouting (ramificación) axonal, las evidencias de MAG como inhibidor de la regeneración *in vivo* no son contundentes. Por un lado, la mielina de los ratones MAG-null es tan inhibitoria para el crecimiento axonal de explantos neuronales como la de animales controles en forma opuesta a lo observado en cultivos disociados de neuronas (Lee et al. 2010). Por otro lado, aunque los mutantes para MAG presentan un aumento en el sprouting luego de una hemisección

del tracto rafeespinal, no se encontraron mejoras significativas en las pruebas motoras analizadas. Adicionalmente los ratones MAG-null presentan una disminución en el sprouting del tracto corticoespinal luego de hemisecciones o transecciones completas de médula (Lee et al. 2010).

Muchos de los efectos benéficos descritos en los estudios preclínicos utilizando GSK249320 son demasiado tempranos como para deberse a eventos de regeneración y/o sprouting axonal y por el contrario parecen evidenciar un mecanismo neuroprotector. Un ejemplo de ello es la reducción significativa en los volúmenes de lesión y la mejora de la función motora que se observan a las 24 horas luego del evento de isquemia por MCAO, ya que no se observaron evidencias de un incremento en el sprouting axonal del área lesionada cuando los animales fueron analizados una semana posterior al daño (Irving et al. 2005; Thompson et al. 2006). Por otro lado, se asoció la administración de GSK249320 en un modelo de ACV en primates dentro de las 24 a 72 horas con una recuperación rápida de las habilidades motrices a sólo tres días del inicio del tratamiento (Barbay et al. 2015). Estos resultados llevaron a varios autores a sugerir un efecto neuroprotector (revisado por McKerracher y Rosen 2015) así como también protector de OLs (Barbay et al. 2015).

Los modelos de isquemia como el de MCAO apoyan la noción de que la excitotoxicidad mediada por glutamato es el mecanismo patológico principal durante las primeras horas posterior a la instauración de la sintomatología clínica (Dirnagl, Iadecola, y Moskowitz 1999). Al comprobar la efectividad del tratamiento anti-MAG sobre un modelo de excitotoxicidad *in vivo* que implica administración directa del aminoácido glutamato, los resultados del presente trabajo confirman un mecanismo de acción diferente al de promoción de la regeneración axonal, demostrando protección de OLs y neuronas frente a la sobrecarga del aminoácido. Estos resultados suman nueva evidencia a los efectos protectores de MAG que se desglosan al analizar ratones deficientes en la glicoproteína, los cuales presentan una alta susceptibilidad a la excitotoxicidad en modelos de stroke y epilepsia (Lopez et al. 2011).

Es importante resaltar que los estudios preclínicos dan indicio de que la eficacia de la administración del anticuerpo anti-MAG disminuye cuando se agranda la ventana temporal entre el comienzo del daño primario y la instauración del tratamiento. Se ha descrito que la administración de anticuerpo es efectiva sólo bajo una ventana temporal temprana de 24 horas y no a tiempos

más largos (Cash et al. 2016), lo que es coincidente con los tiempos registrados in vitro para el efecto de incremento sobre defensas antioxidantes y recaptación de glutamato. En el modelo animal de sobrecarga glutamatérgica, la administración del anticuerpo luego de una hora desde el comienzo del daño excitotóxico mediado por glutamato demostró ser efectiva para reducir la lesión, presumiblemente al actuar modulando el daño en la zona de penumbra, amortiguando la cascada primaria de glutamato y estrés oxidativo que precede a los procesos inflamatorios. Es plausible que el tratamiento a tiempos mayores a 24 horas desde el daño primario, el grado de expansión del evento excitotóxico sobrepase ampliamente el aumento de GSH y la recaptación de glutamato inducidas por el anticuerpo, a lo que también se suma el componente inflamatorio que comienza a tener más peso a medida que transcurren los días. En aquellos pacientes tratados con GSK249320, la administración se realizó durante las primeras 72 horas luego del inicio de los síntomas clínicos por vía intravenosa. Podría entonces especularse que la falta de eficiencia de la terapia anti-MAG en los ensayos clínicos humanos se debe al retraso del inicio del tratamiento, en donde las altas concentraciones de glutamato asociadas a la enfermedad no logran ser removidas lo suficientemente rápido como para evitar su toxicidad. En este sentido, nuestros hallazgos proveen evidencias que sugieren la revisión de los protocolos clínicos para mejorar la eficacia de la terapia.

Otra derivación importante de la presente tesis resultados es la contribución al estudio de los mecanismos patofisiológicos en enfermedades neurodegenerativas relacionadas con daño excitotóxico asociadas a desmielinización. Uno de estos ejemplos es la enfermedad humana Esclerosis Múltiple, una afección degenerativa crónica del sistema nervioso central en la cual la sobrecarga glutamatérgica presenta un rol central en formas avanzadas de la patología y en donde virtualmente todos los aspectos de la homeostasis de glutamato se encuentran alterados (revisado por Kostic, Zivkovic, y Stojanovic 2013). En pacientes con EM, las concentraciones incrementadas de glutamato generadas por los macrofágos infiltrantes y células microgliales correlacionan con la discapacidad clínica observada (Pampliega et al. 2011; Hohlfeld y Kerschensteiner 2016; Macrez et al. 2016). Sumado a esto, la disfunción o pérdida de OLs que caracteriza la EM podría reducir la capacidad de la sustancia blanca para recaptar el glutamato extracelular, resultando en un

incremento de la toxicidad glutamatérgica en neuronas y células gliales. Los análisis de espectroscopia en las lesiones de pacientes con EM detectaron niveles incrementados de glutamato en sustancia blanca con apariencia normal, así como también en las placas activas de desmielinización con daño axonal (Macrez et al. 2016). Sumado a esto, estudios de espectroscopia multivoxel en 343 pacientes con EM han demostrado que las altas concentraciones de glutamato correlacionan con la tasa de pérdida de volumen encefálico, desempeño en el test de funcionalidad clínica PASAT (de sus siglas en inglés Paced Auditory Serial Addition Test) y valoración clínica mediante las pruebas múltiples MSFC (Multiple Sclerosis Functional Composite Measure) (Azevedo et al. 2014).

En este trabajo de tesis se ha probado la eficacia del tratamiento por activación de MAG en un modelo de EAE crónico que presenta desmielinización asociada con daño axonal extensivo. En este modelo la toxicidad por glutamato tiene un rol importante, ya que ha sido reportado que el tratamiento con antagonistas AMPA-kainato resulta en una atenuación sustancial de la enfermedad, siendo efectivo para reducir el daño axonal e incrementar la supervivencia de los OLS (Pitt, Werner, y Raine 2000; Smith et al. 2000).

La terapia anti-MAG iniciada antes de la fase aguda de degeneración axonal, la cual comienza aproximadamente al día 7 postinmunización, y mantenida hasta la aparición de los primeros síntomas clínicos (día 11 postinmunización) ha demostrado ser eficaz al retrasar la manifestación y reducir la sintomatología clínica, así como también el daño axonal en la médula espinal.

De manera interesante, se ha reportado con anterioridad que MAG presenta una expresión reducida en la fase aguda de la formación de placas activas de EM. Este cambio es uno de los primeros signos encontrados en análisis *postmortem* de estos pacientes (revisado por Stys et al. 2012). De esta manera, una desregulación en la expresión de esta glicoproteína parece ser un factor importante que podría desencadenar o potenciar las siguientes fases de la enfermedad.

En otros trabajos, el modelo de EAE crónico mediante inmunización con MOG se ha replicado en ratones mag-null. En estos animales existe un marcado aumento en la pérdida axonal asociado con el desarrollo de la enfermedad que ha sido interpretado como una consecuencia de la pérdida de las propiedades axonoprotectoras de MAG (Jones et al. 2013; Nguyen et al. 2009). Sin embargo

en los resultados de la presente tesis, la terapia anti-MAG resulta en un efecto de protección axonal. En este sentido, el anticuerpo anti-MAG bloquea las interacciones de MAG con sus receptores axonales y por lo tanto se asemeja al modelo mag-null respecto a la falta de señalización hacia las neuronas. De esta manera, esta observación aporta nuevas evidencias al concepto de un efecto protector proveniente de los oligodendrocitos vía activación de MAG y en este sentido, los resultados del modelo mag-null podrían atribuirse a la pérdida directa de las funciones relacionadas con la glicoproteína en las células mielinizantes.

La ausencia de terapias efectivas para las formas primaria y secundaria progresivas de EM deriva de la falta de conocimiento de las causas específicas que desencadenan la enfermedad. Al presente existen terapias que permiten modificar el curso de la enfermedad en la forma remitente recurrente de EM. Estas terapias funcionan principalmente a través de la reducción de la inflamación del SNC afectando la llegada de las células inmunes al SNC o alternativamente modulando su capacidad proliferativa, pero las mismas no resultan efectivas sobre el curso de la enfermedad en formas en las formas primaria y secundaria progresivas donde la degeneración axonal tiene un peso mayor que los procesos inflamatorios en el progreso de la enfermedad.

Del 10-15% de los pacientes con EM nunca desarrolla la fase remitente recurrente. Sus síntomas empeoran progresivamente en el tiempo en una condición denominada primaria progresiva.

Esta tesis representa el primer trabajo en evaluar la efectividad de la activación de MAG mediada a través del uso de un anticuerpo específico en un modelo experimental de EM. De forma general, la terapia anti-MAG parece ser un tratamiento prometedor para mitigar la progresión de la enfermedad en las formas de EM caracterizadas por atrofia axonal. Debido al nuevo avance en los estudios sobre las fases tempranas de la enfermedad que ponen en foco la importancia de procesos como la desregulación de glutamato o el estrés oxidativo, este tratamiento podría potencialmente tener efectos benéficos sobre las formas primarias y secundarias de EM.

Este trabajo de tesis tuvo como objetivo el análisis de la activación oligodendrocitaria generada por MAG como una estrategia terapéutica en casos de estrés oxidativo y excitotoxicidad derivadas de un incremento extracelular de glutamato en situaciones patológicas. Queda entonces

abierta la posibilidad de analizar la implicancia de la señalización de MAG en situaciones fisiológicas. El inicio de la expresión de MAG a nivel postnatal temprano coincide con una ventana temporal de mielinización activa que requiere una gran demanda de poder reductor por parte de los OLs. Cabe entonces la posibilidad que el aumento de expresión de MAG y su posterior activación mediante la asociación con sus receptores neuronales fortalezca las defensas antioxidantes necesarias para afrontar el estrés oxidativo derivado de la meelinización. A su vez, MAG también podría sobreexpresarse como mecanismo de defensa oligodendrocitario hacia ciertos estímulos nocivos, aumentando la intensidad de la respuesta.

Por otra parte, los resultados desarrollados en esta tesis permiten extender una hipótesis sobre las causas de daño neuronal y oligodendrocitario en situaciones patológicas en las que la pérdida de MAG se presenta como uno de los signos más tempranos. La falta o disminución de la expresión de la glicoproteína desencadenaría una desregulación de la interacción bidireccional entre neuronas y OLs que podría de esta manera acarrear un aumento del estrés oxidativo en ambos, junto con una disminución de la recaptación de glutamato. Este proceso podría resultar clave para el inicio o progresión de distintos trastornos caracterizados por una alteración en los niveles de expresión de MAG. Existen diversas enfermedades humanas en donde se ha reportado pérdida selectiva de la glicoproteína, por ejemplo, como ha sido mencionado anteriormente las lesiones desmielinizantes activas de pacientes con EM denominados patron III caracterizadas por un curso clínico severo y distrofia de OLs presentan una pérdida preferencial de esta glicoproteína mientras que otras proteínas mielínicas se mantienen bien conservadas. En adición a estos casos, un patrón similar de pérdida selectiva se presenta en ciertos episodios de encefalitis viral así como también en lesiones causadas por isquemia aguda (revisado por Aboul-Enein et al. 2003). El síndrome Kearns-Sayre, una enfermedad mitocondrial caracterizada por oftalmoplejía externa progresiva, retinitis pigmentaria, sordera, ataxia cerebelar y bloqueo cardiaco ha sido relacionada con una pérdida de MAG y oligodendropatía (Campbell 2012) Interesantemente, una disminución de MAG se ha visto implicada en desórdenes psiquiátricos como la esquizofrenia (Flynn et al. 2003; Hakak et al. 2001; Tkachev et al. 2003; Aston, Jiang, y Sokolov 2004) y se ha identificado una correlación entre polimorfismos de nucleótido único del gen *mag* y propensión a la enfermedad

(Wan et al. 2005). Más aún, recientemente se ha descubierto que la síntesis de GSH se encuentra impedida en estos pacientes, lo que fortalece la hipótesis de un posible rol patológico de MAG en la esquizofrenia (Fournier et al. 2017).

En función de lo anteriormente expuesto, los resultados desarrollados en la presente tesis por un lado sientan la base de un mecanismo asociado a una vía de señalización que resulta novedosa en las células oligodendrocitarias y por otra parte abren nuevas preguntas tanto en el ámbito de biología glial básica como en el ámbito clínico, en donde pueden servir como base para mejorar los tratamientos ya existentes para enfermedades relacionadas con desbalances del glutamato así como también permitir el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Sumado a esto, la búsqueda de ligandos neuronales de MAG que sean capaces de generar un efecto similar al encontrado utilizando el anticuerpo monoclonal es el primer paso hacia el desarrollo de nuevas terapias. En este trabajo se evaluó la respuesta antioxidante de los OLS estimulados mediante la administración con GT1b, un gangliósido descrito como ligando de alta afinidad para MAG (Yang et al. 1996; Vyas et al. 2002). El tratamiento con GT1b unido covalentemente a BSA generó cambios en la respuesta antioxidante basal de los OLS, de manera similar a la encontrada con el anticuerpo. Estos resultados sientan precedentes para continuar el estudio del gangliósido GT1b como una molécula con potencialidad terapéutica y con bajo riesgo de reacciones adversas. Un aumento en el reclutamiento y enriquecimiento de MAG por unión con moléculas de GT1b, facilitando la dimerización de la glicoproteína es potencialmente un proceso que puede explicar los resultados encontrados. Aunque estudios previos han demostrado que el tratamiento con GT1b libre (2-10 $\mu\text{g/ml}$) no genera la incorporación de MAG en microdominios lipídicos como lo hace el anticuerpo anti-MAG pese a ser completamente soluble en ese rango de concentraciones (Marta et al. 2004), la presentación de GT1b en forma oligomérica probablemente permita la activación de la glicoproteína mediante su dimerización.

Es importante destacar entonces que el aumento de GSH en OLS generado por unión/activación de MAG no se trata sólo de un efecto farmacológico inducido por el anticuerpo, si no que por el contrario puede generarse también mediante el uso de ligandos naturales de la

glicoproteína. De esto se desprende entonces que las vías de señalización descritas sean relevantes en la fisiología de la comunicación axon-glía. Se puede hipotetizar que los gangliósidos y su interacción con MAG podrían tener un papel importante como defensa natural en otras situaciones de desbalances homeostáticos. En este sentido se ha descrito que las caspasas iniciadoras del programa apoptótico también cumplen la función de metabolizar esfingomielina en ceramida, y esta última puede ser utilizada para la biosíntesis de gangliósidos (revisado por Medina Marín y Escobar Bethancourth 2002). Dado que las neuronas son más susceptibles al daño por glutamato, cabe la posibilidad de que liberen o expresen mayor proporción de estos ligandos, los cuales a su vez puedan unirse a MAG en los OLs, o que la sobreexpresión de gangliósidos genere una respuesta de aumento de la glicoproteína y por ende un fortalecimiento de las vías de señalización en el OL, desencadenando mecanismos que permitan modular el daño en las zonas afectadas. De manera interesante, se ha descrito que el animal *Galgt1-null*, que carece de la capacidad de síntesis para gangliósidos complejos como GD1a y GT1b, presenta una pérdida selectiva y progresiva de MAG; indicando una evidente estrecha regulación entre la glicoproteína y sus ligandos (Sun 2004)

Conclusiones

En el presente trabajo de tesis se proponen las bases de un nuevo mecanismo molecular que deriva en protección oligodendroglial generada por la activación de MAG en la membrana celular mediante el uso de un anticuerpo monoclonal. Estos estudios contribuyen con conocimiento novedoso acerca de las funciones biológicas de MAG en los OLs así como también sobre efectos diferentes a la promoción del crecimiento neurítico generados por administración del anticuerpo anti-MAG. Una participación activa en la regulación de las concentraciones de glutamato extracelulares así como también sobre el metabolismo del aminoácido y el incremento de las defensas antioxidantes vuelven a la activación de MAG una herramienta terapéutica interesante, al

mismo tiempo que estos datos proveen nuevas aproximaciones hacia las funciones oligodendrogiales.

Los mecanismos de acción, las vías de señalización y las evaluaciones en escalas temporales pueden contribuir a una mejora en tratamientos ya existentes para ACV a la vez que abre una nueva oportunidad terapéutica para otras enfermedades neurodegenerativas.

Referencias

Abila, B, E Cunningham, y M Simeoni. 2013. «First-Time-in-Human Study With GSK249320, a Myelin-Associated Glycoprotein Inhibitor, in Healthy Volunteers». *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 93 (2): 163-69.

Aboul-Enein, Fahmy, Helmut Rauschka, Barbara Kornek, Christine Stadelmann, Andreas Stefferl, Wolfgang Brück, Claudia Lucchinetti, Manfred Schmidbauer, Kurt Jellinger, y Hans Lassmann. 2003. «Preferential Loss of Myelin-Associated Glycoprotein Reflects Hypoxia-like White Matter Damage in Stroke and Inflammatory Brain Diseases». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 62 (1): 25-33.

Alberdi, E. 2006. «Activation of Kainate Receptors Sensitizes Oligodendrocytes to Complement Attack». *Journal of Neuroscience* 26 (12): 3220-28.

Albrecht, Philipp, Jan Lewerenz, Sonja Dittmer, Rebecca Noack, Pamela Maher, y Axel Methner. 2010. «Mechanisms of Oxidative Glutamate Toxicity: The Glutamate/Cystine Antiporter System Xc- as a Neuroprotective Drug Target». *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* 9 (3): 373-82.

Amin, N. 1997. «Glutamate toxicity in neuron-enriched and neuron-astrocyte co-cultures: effect of the glutamate uptake inhibitor β -trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate». *Neurochemistry International* 30 (3): 271-76.

Anderson, C. M., y R. A. Swanson. 2000. «Astrocyte Glutamate Transport: Review of Properties, Regulation, and Physiological Functions». *Glia* 32 (1): 1-14.

Ankarcrona, Maria, Jeannette M. Dypbukt, Emanuela Bonfoco, Boris Zhivotovsky, Sten Orrenius, Stuart A. Lipton, y Pierluigi Nicotera. 1995. «Glutamate-Induced Neuronal Death: A Succession of Necrosis or Apoptosis Depending on Mitochondrial Function». *Neuron* 15 (4): 961-73.

Armati, Patricia J, y Emily K Mathey. 2010. *The Biology of Oligodendrocytes*. Cambridge; New York: Cambridge University Press.

Aston, Christopher, Lixin Jiang, y Boris P. Sokolov. 2004. «Microarray Analysis of Postmortem Temporal Cortex from Patients with Schizophrenia». *Journal of Neuroscience Research* 77 (6): 858-66.

Atlante, A., P. Calissano, A. Bobba, S. Giannattasio, E. Marra, y S. Passarella. 2001. «Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria». *FEBS Lett* 497.

- Azevedo, Christina J., John Kornak, Philip Chu, Mehul Sampat, Darin T. Okuda, Bruce A. Cree, Sarah J. Nelson, Stephen L. Hauser, y Daniel Pelletier. 2014. «In Vivo Evidence of Glutamate Toxicity in Multiple Sclerosis: Glutamate and MS Severity». *Annals of Neurology* 76 (2): 269-78.
- Baird, Liam, y Alben T. Dinkova-Kostova. 2011. «The Cytoprotective Role of the Keap1–Nrf2 Pathway». *Archives of Toxicology* 85 (4): 241-72.
- Barbay, S., E. J. Plautz, E. Zoubina, S. B. Frost, S. C. Cramer, y R. J. Nudo. 2015. «Effects of Postinfarct Myelin-Associated Glycoprotein Antibody Treatment on Motor Recovery and Motor Map Plasticity in Squirrel Monkeys». *Stroke*, abril. doi:10.1161/STROKEAHA.114.008088.
- Baron, Wia, Bernard Metz, Rashmi Bansal, Dick Hoekstra, y Hans de Vries. 2000. «PDGF and FGF-2 Signaling in Oligodendrocyte Progenitor Cells: Regulation of Proliferation and Differentiation by Multiple Intracellular Signaling Pathways». *Molecular and Cellular Neuroscience* 15 (3): 314-29.
- Baumann, N., y D. Pham-Dinh. 2001. «Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System». *Physiological Reviews* 81 (2): 871-927.
- Belousov, Vsevolod V, Arkady F Fradkov, Konstantin A Lukyanov, Dmitry B Staroverov, Konstantin S Shakhbazov, Alexey V Terskikh, y Sergey Lukyanov. 2006. «Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide». *Nature Methods* 3 (4): 281-86.
- Benarroch, E. E. 2009. «Oligodendrocytes: Susceptibility to Injury and Involvement in Neurologic Disease». *Neurology* 72 (20): 1779-85.
- Bloom, David A., y Anil K. Jaiswal. 2003. «Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by Protein Kinase C in Response to Antioxidants Leads to the Release of Nrf2 from INrf2, but Is Not Required for Nrf2 Stabilization/Accumulation in the Nucleus and Transcriptional Activation of Antioxidant Response Element-Mediated NAD(P)H:quinone Oxidoreductase-1 Gene Expression». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (45): 44675-82.
- Bö, Lars, Ted M. Dawson, Steven Wesselingh, Sverre Mörk, Steven Choi, Pei Ann Kong, Daniel Hanley, y Bruce D. Trapp. 1994. «Induction of Nitric Oxide Synthase in Demyelinating Regions of Multiple Sclerosis Brains: NOS Induction in MS Brain Regions». *Annals of Neurology* 36 (5): 778-86.
- Bridges, Richard J, Nicholas R Natale, y Sarjubhai A Patel. 2012. «System xc- cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS». *British Journal of Pharmacology* 165 (1): 20-34.
- Butts, B D, C Houde, y H Mehmet. 2008. «Maturation-dependent sensitivity of oligodendrocyte lineage cells to apoptosis: implications for normal development and disease». *Cell Death and Differentiation* 15 (7): 1178-86.

- Campbell, Graham R. 2012. «Loss of Myelin-Associated Glycoprotein in Kearns-Sayre Syndrome». *Archives of Neurology* 69 (4): 490.
- Casado, M., A. Bendahan, F. Zafra, N. C. Danbolt, C. Aragón, C. Giménez, y B. I. Kanner. 1993. «Phosphorylation and Modulation of Brain Glutamate Transporters by Protein Kinase C». *The Journal of Biological Chemistry* 268 (36): 27313-17.
- Cash, Diana, Alanna C. Easton, Michel Mesquita, John Beech, Steve Williams, Andrew Lloyd, Elaine Irving, y Steven C. Cramer. 2016. «GSK249320, A Monoclonal Antibody Against the Axon Outgrowth Inhibition Molecule Myelin-Associated Glycoprotein, Improves Outcome of Rodents with Experimental Stroke». *Journal of Neurology and Experimental Neuroscience* 2 (2): 28-33.
- Chatterjee, Shampa, Heiko Noack, Heiko Possel, Gerburg Keilhoff, y Gerald Wolf. 1999. «Glutathione Levels in Primary Glial Cultures: Monochlorobimane Provides Evidence of Cell Type-Specific Distribution». *Glia* 27 (2): 152-61.
- Cramer, Steven C., Bams Abila, Nicola E. Scott, Monica Simeoni, Lori A. Enney, y MAG111539 Study Investigators. 2013. «Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Escalating Repeat Doses of GSK249320 in Patients with Stroke». *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 44 (5): 1337-42.
- Cramer, Steven C., Lori A. Enney, Colleen K. Russell, Monica Simeoni, y Thomas R. Thompson. 2017. «Proof-of-Concept Randomized Trial of the Monoclonal Antibody GSK249320 Versus Placebo in Stroke Patients». *Stroke* 48 (3): 692-98.
- Danbolt, Niels C. 2001. «Glutamate Uptake». *Progress in Neurobiology* 65 (1): 1-105.
- DeBellard, Maria-Elena, Song Tang, Gitali Mukhopadhyay, Ying-Jing Shen, y Marie T. Filbin. 1996. «Myelin-Associated Glycoprotein Inhibits Axonal Regeneration from a Variety of Neurons via Interaction with a Sialoglycoprotein». *Molecular and Cellular Neuroscience* 7 (2): 89-101.
- Deng, Wenbin, Hong Wang, Paul A. Rosenberg, Joseph J. Volpe, y Frances E. Jensen. 2004. «Role of Metabotropic Glutamate Receptors in Oligodendrocyte Excitotoxicity and Oxidative Stress». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (20): 7751-56.
- Denzoin Vulcano, Laura, Alejandro Soraci, y María Ofelia Tapia. 2013. «Homeostasis del glutati6n». *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 47 (3): 529-39.
- Deponte, Marcel. 2013. «Glutathione Catalysis and the Reaction Mechanisms of Glutathione-Dependent Enzymes». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830 (5): 3217-66.
- DeSilva, T. M., A. Y. Kabakov, P. E. Goldhoff, J. J. Volpe, y P. A. Rosenberg. 2009. «Regulation of Glutamate Transport in Developing Rat Oligodendrocytes». *Journal of Neuroscience* 29 (24): 7898-7908.

- Dessi, Frédéric, Christiane Charriaut-Marlangue, Michel Khrestchatisky, y Yezekiel Ben-Ari. 1993. «Glutamate-Induced Neuronal Death Is Not a Programmed Cell Death in Cerebellar Culture». *Journal of Neurochemistry* 60 (5): 1953-55.
- Dirnagl, U., C. Iadecola, y M. A. Moskowitz. 1999. «Pathobiology of Ischaemic Stroke: An Integrated View». *Trends in Neurosciences* 22 (9): 391-97.
- Domeniconi, Marco, Zixuan Cao, Timothy Spencer, Rajeev Sivasankaran, Kevin C. Wang, Elena Nikulina, Noriko Kimura, et al. 2002. «Myelin-Associated Glycoprotein Interacts with the Nogo66 Receptor to Inhibit Neurite Outgrowth». *Neuron* 35 (2): 283-90.
- Domercq, M., M. V. Sánchez-Gómez, P. Areso, y C. Matute. 1999. «Expression of Glutamate Transporters in Rat Optic Nerve Oligodendrocytes». *The European Journal of Neuroscience* 11 (7): 2226-36.
- Domercq, María, Estibaliz Etxebarria, Alberto Pérez-Samartín, y Carlos Matute. 2005. «Excitotoxic Oligodendrocyte Death and Axonal Damage Induced by Glutamate Transporter Inhibition». *Glia* 52 (1): 36-46.
- Domercq, María, María Victoria Sánchez-Gómez, Catherine Sherwin, Estibaliz Etxebarria, Robert Fern, y Carlos Matute. 2007. «System Xc- and Glutamate Transporter Inhibition Mediates Microglial Toxicity to Oligodendrocytes». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178 (10): 6549-56.
- Espinosa-Diez, Cristina, Verónica Miguel, Daniela Mennerich, Thomas Kietzmann, Patricia Sánchez-Pérez, Susana Cadenas, y Santiago Lamas. 2015. «Antioxidant Responses and Cellular Adjustments to Oxidative Stress». *Redox Biology* 6 (diciembre): 183-97.
- Estrada-Sánchez, Ana María, Teresa Montiel, José Segovia, y Lourdes Massieu. 2009. «Glutamate Toxicity in the Striatum of the R6/2 Huntington's Disease Transgenic Mice Is Age-Dependent and Correlates with Decreased Levels of Glutamate Transporters». *Neurobiology of Disease* 34 (1): 78-86. doi:10.1016/j.nbd.2008.12.017.
- Everly, J. L., R. O. Brady, y R. H. Quarles. 1973. «Evidence That the Major Protein in Rat Sciatic Nerve Myelin Is a Glycoprotein». *Journal of Neurochemistry* 21 (2): 329-34.
- Fields, R. D. 2002. «New Insights into Neuron-Glia Communication». *Science* 298 (5593): 556-62.
- Flynn, S W, D J Lang, A L Mackay, V Goghari, I M Vavasour, K P Whittall, G N Smith, et al. 2003. «Abnormalities of myelination in schizophrenia detected *in vivo* with MRI, and post-mortem with analysis of oligodendrocyte proteins». *Molecular Psychiatry* 8 (9): 811-20.
- Fournier, M., A. Monin, C. Ferrari, P. S. Baumann, P. Conus, y K. Do. 2017. «Implication of the Glutamate–cystine Antiporter xCT in Schizophrenia Cases Linked to Impaired GSH Synthesis». *Npj Schizophrenia* 3 (1).

Franklin, Christopher C., Donald S. Backos, Isaac Mohar, Collin C. White, Henry J. Forman, y Terrance J. Kavanagh. 2009. «Structure, Function, and Post-Translational Regulation of the Catalytic and Modifier Subunits of Glutamate Cysteine Ligase». *Molecular Aspects of Medicine* 30 (1-2): 86-98.

Franklin, Keith B. J, y George Paxinos. 2008. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Amsterdam: Boston : Elsevier/Academic Press.

Frühbeis, Carsten, Dominik Fröhlich, Wen Ping Kuo, Jesa Amphornrat, Sebastian Thilemann, Aiman S. Saab, Frank Kirchhoff, et al. 2013. «Neurotransmitter-Triggered Transfer of Exosomes Mediates Oligodendrocyte–Neuron Communication». Editado por Ben A. Barres. *PLoS Biology* 11 (7): e1001604.

Goes, A. van der, J. Brouwer, K. Hoekstra, D. Roos, T. K. van den Berg, y C. D. Dijkstra. 1998. «Reactive Oxygen Species Are Required for the Phagocytosis of Myelin by Macrophages». *Journal of Neuroimmunology* 92 (1-2): 67-75.

Gorrini, Chiara, Isaac S. Harris, y Tak W. Mak. 2013. «Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy». *Nature Reviews Drug Discovery* 12 (12): 931-47.

Gudz, T. I. 2006. «Glutamate Stimulates Oligodendrocyte Progenitor Migration Mediated via an α 5 β 1 Integrin/Myelin Proteolipid Protein Complex». *Journal of Neuroscience* 26 (9): 2458-66.

Guo, F., Y. Maeda, E. M. Ko, M. Delgado, M. Horiuchi, A. Soulika, L. Miers, et al. 2012. «Disruption of NMDA Receptors in Oligodendroglial Lineage Cells Does Not Alter Their Susceptibility to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis or Their Normal Development». *Journal of Neuroscience* 32 (2): 639-45.

Hakak, Y., J. R. Walker, C. Li, W. H. Wong, K. L. Davis, J. D. Buxbaum, V. Haroutunian, y A. A. Fienberg. 2001. «Genome-Wide Expression Analysis Reveals Dysregulation of Myelination-Related Genes in Chronic Schizophrenia». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (8): 4746-51.

Hansson, E. 2000. «Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication». *Neurochemistry International* 37 (2-3): 317-29.

Haroon, Ebrahim, Andrew H Miller, y Gerard Sanacora. 2017. «Inflammation, Glutamate, and Glia: A Trio of Trouble in Mood Disorders». *Neuropsychopharmacology* 42 (1): 193-215.

Hohlfeld, Reinhard, y Martin Kerschensteiner. 2016. «Antiglutamatergic Therapy for Multiple Sclerosis?» *The Lancet Neurology* 15 (10): 1003-4.

Huang, H.-C., Truyen Nguyen, y Cecil B. Pickett. 2002. «Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by Protein Kinase C Regulates Antioxidant Response Element-Mediated Transcription». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (45): 42769-74.

Hunter, M. I., B. C. Nlemadim, y D. L. Davidson. 1985. «Lipid Peroxidation Products and Antioxidant Proteins in Plasma and Cerebrospinal Fluid from Multiple Sclerosis Patients». *Neurochemical Research* 10 (12): 1645-52.

Inuzuka, T., N. Fujita, S. Sato, H. Baba, R. Nakano, H. Ishiguro, y T. Miyatake. 1991. «Expression of the Large Myelin-Associated Glycoprotein Isoform during the Development in the Mouse Peripheral Nervous System». *Brain Research* 562 (1): 173-75.

Irving, Elaine A., Mary Vinson, Claudia Rosin, Jenny C. Roberts, Debra M. Chapman, Laura Facci, David J. Virley, et al. 2005. «Identification of Neuroprotective Properties of Anti-MAG Antibody: A Novel Approach for the Treatment of Stroke?» *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 25 (1): 98-107.

Jaramillo, M. L., D. E. Afar, G. Almazan, y J. C. Bell. 1994. «Identification of Tyrosine 620 as the Major Phosphorylation Site of Myelin-Associated Glycoprotein and Its Implication in Interacting with Signaling Molecules». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (44): 27240-45.

Johnson, P. W., W. Abramow-Newerly, B. Seilheimer, R. Sadoul, M. B. Tropak, M. Arquint, R. J. Dunn, M. Schachner, y J. C. Roder. 1989. «Recombinant Myelin-Associated Glycoprotein Confers Neural Adhesion and Neurite Outgrowth Function». *Neuron* 3 (3): 377-85.

Jones, M. V., T. T. Nguyen, C. A. Deboy, J. W. Griffin, K. A. Whartenby, D. A. Kerr, y P. A. Calabresi. 2008. «Behavioral and Pathological Outcomes in MOG 35-55 Experimental Autoimmune Encephalomyelitis». *Journal of Neuroimmunology* 199 (1-2): 83-93.

Jones, Melina V., Thien T. Nguyen, Osefame Ewaleifoh, Lori Lebson, Katherine A. Whartenby, John W. Griffin, y Peter A. Calabresi. 2013. «Accelerated Axon Loss in MOG35-55 Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in Myelin-Associated Glycoprotein-Deficient (MAGKO) Mice». *Journal of Neuroimmunology* 262 (1-2): 53-61.

Jongen, P. J., A. T. Ter Horst, y A. M. Brands. 2012. «Cognitive Impairment in Multiple Sclerosis». *Minerva Medica* 103 (2): 73-96.

Káradóttir, R., y D. Attwell. 2007. «Neurotransmitter Receptors in the Life and Death of Oligodendrocytes». *Neuroscience* 145 (4): 1426-38.

Káradóttir, Ragnhildur, Pauline Cavelier, Linda H. Bergersen, y David Attwell. 2005. «NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia». *Nature* 438 (7071): 1162-66.

Keelan, J., N. J. Allen, D. Antcliffe, S. Pal, y M. R. Duchon. 2001. «Quantitative Imaging of Glutathione in Hippocampal Neurons and Glia in Culture Using Monochlorobimane». *Journal of Neuroscience Research* 66 (5): 873-84.

- Kelm, S., A. Pelz, R. Schauer, M. T. Filbin, S. Tang, M. E. de Bellard, R. L. Schnaar, J. A. Mahoney, A. Hartnell, y P. Bradfield. 1994. «Sialoadhesin, Myelin-Associated Glycoprotein and CD22 Define a New Family of Sialic Acid-Dependent Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Superfamily». *Current Biology: CB* 4 (11): 965-72.
- Kettenmann, Helmut, y Bruce R. Ransom. 2012. *Neuroglia*. Third Edition. Oxford University Press.
- Kirchhoff, F., H.-W. Hofer, y M. Schachner. 1993. «Myelin-Associated Glycoprotein Is Phosphorylated by Protein Kinase C». *Journal of Neuroscience Research* 36 (4): 368-81.
- Kondo, Kaoru, Hitoshi Hashimoto, Jun-ichi Kitanaka, Makoto Sawada, Akio Suzumura, Tohru Marunouchi, y Akemichi Baba. 1995. «Expression of Glutamate Transporters in Cultured Glial Cells». *Neuroscience Letters* 188 (2): 140-42.
- Kostic, Milos, Nikola Zivkovic, y Ivana Stojanovic. 2013. «Multiple Sclerosis and Glutamate Excitotoxicity». *Reviews in the Neurosciences* 24 (1): 71-88. doi:10.1515/revneuro-2012-0062.
- Kritis, Aristeidis A., Eleni G. Stamoula, Krystallenia A. Paniskaki, y Theofanis D. Vavilis. 2015. «Researching glutamate induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9 (marzo).
- Kursula, P., V. P. Lehto, y A. M. Heape. 2001. «The Small Myelin-Associated Glycoprotein Binds to Tubulin and Microtubules». *Brain Research. Molecular Brain Research* 87 (1): 22-30.
- Kursula, Petri. 2000. «Cytoplasmic Domains of the Myelin-Associated Glycoprotein». Oulu: Oulun yliopisto.
- Lai, C., M. A. Brow, K. A. Nave, A. B. Noronha, R. H. Quarles, F. E. Bloom, R. J. Milner, y J. G. Sutcliffe. 1987. «Two Forms of 1B236/Myelin-Associated Glycoprotein, a Cell Adhesion Molecule for Postnatal Neural Development, Are Produced by Alternative Splicing». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (12): 4337-41.
- Lee, Jae K., Cédric G. Geoffroy, Andrea F. Chan, Kristine E. Tolentino, Michael J. Crawford, Marisa A. Leal, Brian Kang, y Binhai Zheng. 2010. «Assessing Spinal Axon Regeneration and Sprouting in Nogo-, MAG-, and OMgp-Deficient Mice». *Neuron* 66 (5): 663-70.
- Lewerenz, Jan, Philipp Albrecht, Mai-Ly Tran Tien, Nadine Henke, Saravanan Karumbayaram, Harley I. Kornblum, Martina Wiedau-Pazos, Dave Schubert, Pamela Maher, y Axel Methner. 2009. «Induction of Nrf2 and xCT Are Involved in the Action of the Neuroprotective Antibiotic Ceftriaxone *in Vitro*». *Journal of Neurochemistry* 111 (2): 332-43.
- Lewerenz, Jan, Mathias Klein, y Axel Methner. 2006. «Cooperative Action of Glutamate Transporters and Cystine/Glutamate Antiporter System Xc- Protects from Oxidative Glutamate Toxicity». *Journal of Neurochemistry* 98 (3): 916-25.

- Lopez, Pablo H. H. 2014. «Role of Myelin-Associated Glycoprotein (Siglec-4a) in the Nervous System». *Advances in Neurobiology* 9: 245-62.
- Lopez, Pablo H. H., Abdullah S. Ahmad, Niraj R. Mehta, Mayu Toner, Elizabeth A. Rowland, Jiangyang Zhang, Sylvain Doré, y Ronald L. Schnaar. 2011. «Myelin-Associated Glycoprotein Protects Neurons from Excitotoxicity: Myelin-Associated Glycoprotein Protects Neurons». *Journal of Neurochemistry* 116 (5): 900-908.
- Lull, Melinda E., y Michelle L. Block. 2010. «Microglial Activation and Chronic Neurodegeneration». *Neurotherapeutics* 7 (4): 354-65.
- Macrez, Richard, Peter K Stys, Denis Vivien, Stuart A Lipton, y Fabian Docagne. 2016. «Mechanisms of Glutamate Toxicity in Multiple Sclerosis: Biomarker and Therapeutic Opportunities». *The Lancet Neurology* 15 (10): 1089-1102.
- Madden, Dean R. 2002. «The structure and function of glutamate receptor ion channels». *Nature Reviews Neuroscience* 3 (2): 91-101.
- Mark, L. P., R. W. Prost, J. L. Ulmer, M. M. Smith, D. L. Daniels, J. M. Strottmann, W. D. Brown, y L. Haein-Bey. 2001. «Pictorial Review of Glutamate Excitotoxicity: Fundamental Concepts for Neuroimaging». *AJNR. American Journal of Neuroradiology* 22 (10): 1813-24.
- Marta, C.B., C.M. Taylor, S. Cheng, R.H. Quarles, R. Bansal, y S.E. Pfeiffer. 2004. «Myelin Associated Glycoprotein Cross-Linking Triggers Its Partitioning into Lipid Rafts, Specific Signaling Events and Cytoskeletal Rearrangements in Oligodendrocytes». *Neuron Glia Biology* 1 (01).
- Martinez-Lozada, Zila, Christopher T. Waggener, Karam Kim, Shiping Zou, Pamela E. Knapp, Yasunori Hayashi, Arturo Ortega, y Babette Fuss. 2014. «Activation of Sodium-Dependent Glutamate Transporters Regulates the Morphological Aspects of Oligodendrocyte Maturation via Signaling through Calcium/Calmodulin-Dependent Kinase II β 's Actin-Binding/-Stabilizing Domain: Glu Transport and Oligodendrocyte Maturation». *Glia* 62 (9): 1543-58.
- Mavrantoni, Angeliki, Veronika Thallmair, Michael G. Leitner, Daniela N. Schreiber, Dominik Oliver, y Christian R. Halaszovich. 2015. «A method to control phosphoinositides and to analyze PTEN function in living cells using voltage sensitive phosphatases». *Frontiers in Pharmacology* 6 (marzo).
- Mcdonald, John W., Sandy P. Althomsons, Krzysztof L. Hyrc, Dennis W. Choi, y Mark P. Goldberg. 1998. «Oligodendrocytes from Forebrain Are Highly Vulnerable to AMPA/Kainate Receptor-Mediated Excitotoxicity». *Nature Medicine* 4 (3): 291-97.
- McKerracher, L., S. David, D.L. Jackson, V. Kottis, R.J. Dunn, y P.E. Braun. 1994. «Identification of Myelin-Associated Glycoprotein as a Major Myelin-Derived Inhibitor of Neurite Growth». *Neuron* 13 (4): 805-11.

- McKerracher, Lisa, y Kenneth M. Rosen. 2015. «MAG, myelin and overcoming growth inhibition in the CNS». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 8 (septiembre).
- McTigue, Dana M., y Richa B. Tripathi. 2008. «The Life, Death, and Replacement of Oligodendrocytes in the Adult CNS». *Journal of Neurochemistry* 107 (1): 1-19.
- Mears, Simon, Melitta Schachner, y Thomas M Brushart. 2003. «Antibodies to Myelin-Associated Glycoprotein Accelerate Preferential Motor Reinnervation». *Journal of the Peripheral Nervous System* 8 (2): 91-99.
- Mecha, Miriam. 2011. «An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: A beginners approach.» *Protocol Exchange*.
- Medina Marín, Adriana, y Martha Escobar Bethancourth. 2002. «Sistema glutamatérgico, primera parte: Sinaptología, homeostasis y muerte celular.» *Revista Colombiana de Psiquiatría* 31 (septiembre): 193-218.
- Mehta, Niraj R., Thien Nguyen, John W. Bullen, John W. Griffin, y Ronald L. Schnaar. 2010. «Myelin-Associated Glycoprotein (MAG) Protects Neurons from Acute Toxicity Using a Ganglioside-Dependent Mechanism». *ACS Chemical Neuroscience* 1 (3): 215-22.
- Montag, D., K. P. Giese, U. Bartsch, R. Martini, Y. Lang, H. Blüthmann, J. Karthigasan, D. A. Kirschner, E. S. Wintergerst, y K. A. Nave. 1994. «Mice Deficient for the Myelin-Associated Glycoprotein Show Subtle Abnormalities in Myelin». *Neuron* 13 (1): 229-46.
- Morales-Pantoja, Itzy E., Che-lin Hu, Nora I. Perrone-Bizzozero, Jianzheng Zheng, y Oscar A. Bizzozero. 2016. «Nrf2-Dysregulation Correlates with Reduced Synthesis and Low Glutathione Levels in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis». *Journal of Neurochemistry*, agosto.
- Morrison, Brett M., Youngjin Lee, y Jeffrey D. Rothstein. 2013. «Oligodendroglia: Metabolic Supporters of Axons». *Trends in Cell Biology* 23 (12): 644-51.
- Motohashi, Hozumi, y Masayuki Yamamoto. 2004. «Nrf2–Keap1 Defines a Physiologically Important Stress Response Mechanism». *Trends in Molecular Medicine* 10 (11): 549-57.
- Mukhopadhyay, Gitali, Patrick Doherty, Frank S. Walsh, Paul R. Crocker, y Marie T. Filbin. 1994. «A Novel Role for Myelin-Associated Glycoprotein as an Inhibitor of Axonal Regeneration». *Neuron* 13 (3): 757-67.
- Naidoo, R., y M. L. Knapp. 1992. «Studies of Lipid Peroxidation Products in Cerebrospinal Fluid and Serum in Multiple Sclerosis and Other Conditions». *Clinical Chemistry* 38 (12): 2449-54.
- Nedergaard, Maiken, Takahiro Takano, y Anker J. Hansen. 2002. «Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter». *Nature Reviews Neuroscience* 3 (9): 748-55.

- Nelissen, Katherine, Karen Smeets, Monique Mulder, Jerome J.A. Hendriks, y Marcel Ameloot. 2010. «Selection of Reference Genes for Gene Expression Studies in Rat Oligodendrocytes Using Quantitative Real Time PCR». *Journal of Neuroscience Methods* 187 (1): 78-83.
- Nguyen, Thien, Niraj R. Mehta, Katherine Conant, Kee-Jun Kim, Melina Jones, Peter A. Calabresi, Giorgia Melli, et al. 2009. «Axonal Protective Effects of the Myelin-Associated Glycoprotein». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (3): 630-37.
- Nishioka, T., K. Aoki, K. Hikake, H. Yoshizaki, E. Kiyokawa, y M. Matsuda. 2008. «Rapid Turnover Rate of Phosphoinositides at the Front of Migrating MDCK Cells». *Molecular Biology of the Cell* 19 (10): 4213-23.
- Oka, A., M. J. Belliveau, P. A. Rosenberg, y J. J. Volpe. 1993. «Vulnerability of Oligodendroglia to Glutamate: Pharmacology, Mechanisms, and Prevention». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 13 (4): 1441-53.
- Okumoto, S., L. L. Looger, K. D. Micheva, R. J. Reimer, S. J. Smith, y W. B. Frommer. 2005. «Detection of Glutamate Release from Neurons by Genetically Encoded Surface-Displayed FRET Nanosensors». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (24): 8740-45.
- Palandri, A, V R Salvador, J Wojnacki, A L Vivinetto, R L Schnaar, y P H H Lopez. 2015. «Myelin-associated glycoprotein modulates apoptosis of motoneurons during early postnatal development via NgR/p75NTR receptor-mediated activation of RhoA signaling pathways». *Cell Death and Disease* 6 (9): e1876.
- Pampliega, Olatz, María Domercq, Federico N Soria, Pablo Villoslada, Alfredo Rodríguez-Antigüedad, y Carlos Matute. 2011. «Increased Expression of Cystine/Glutamate Antiporter in Multiple Sclerosis». *Journal of Neuroinflammation* 8 (1): 63.
- Pampliega, Olatz, María Domercq, Pablo Villoslada, Jorge Sepulcre, Alfredo Rodríguez-Antigüedad, y Carlos Matute. 2008. «Association of an EAAT2 Polymorphism with Higher Glutamate Concentration in Relapsing Multiple Sclerosis». *Journal of Neuroimmunology* 195 (1-2): 194-98.
- Pan, Baohan, Susan E. Fromholt, Ellen J. Hess, Thomas O. Crawford, John W. Griffin, Kazim A. Sheikh, y Ronald L. Schnaar. 2005. «Myelin-Associated Glycoprotein and Complementary Axonal Ligands, Gangliosides, Mediate Axon Stability in the CNS and PNS: Neuropathology and Behavioral Deficits in Single- and Double-Null Mice». *Experimental Neurology* 195 (1): 208-17.
- Park, Keun W., Susan E. Nozell, y Ety N. Benveniste. 2012. «Protective Role of STAT3 in NMDA and Glutamate-Induced Neuronal Death: Negative Regulatory Effect of SOCS3». Editado por Michal Hetman. *PLoS ONE* 7 (11): e50874.

Pedraza, L., G. C. Owens, L. A. Green, y J. L. Salzer. 1990. «The Myelin-Associated Glycoproteins: Membrane Disposition, Evidence of a Novel Disulfide Linkage between Immunoglobulin-like Domains, and Posttranslational Palmitoylation». *The Journal of Cell Biology* 111 (6 Pt 1): 2651-61.

Pitt, D., P. Werner, y C. S. Raine. 2000. «Glutamate Excitotoxicity in a Model of Multiple Sclerosis». *Nature Medicine* 6 (1): 67-70.

Pitt, David, Iris E. Nagelmeier, Heather C. Wilson, y Cedric S. Raine. 2003. «Glutamate Uptake by Oligodendrocytes: Implications for Excitotoxicity in Multiple Sclerosis». *Neurology* 61 (8): 1113-20.

Poltorak, M., R. Sadoul, G. Keilhauer, C. Landa, T. Fahrig, y M. Schachner. 1987. «Myelin-Associated Glycoprotein, a Member of the L2/HNK-1 Family of Neural Cell Adhesion Molecules, Is Involved in Neuron-Oligodendrocyte and Oligodendrocyte-Oligodendrocyte Interaction». *The Journal of Cell Biology* 105 (4): 1893-99.

Pronker, Matti F., Suzanne Lemstra, Joost Snijder, Albert J. R. Heck, Dominique M. E. Thies-Weesie, R. Jeroen Pasterkamp, y Bert J. C. Janssen. 2016. «Structural basis of myelin-associated glycoprotein adhesion and signalling». *Nature Communications* 7 (diciembre): 13584.

Quarles, Richard H. 2007. «Myelin-Associated Glycoprotein (MAG): Past, Present and beyond». *Journal of Neurochemistry* 100 (6): 1431-48. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04319.x.

Ravera, Silvia, y Isabella Panfoli. 2015. «Role of Myelin Sheath Energy Metabolism in Neurodegenerative Diseases». *Neural Regeneration Research* 10 (10): 1570.

Rodriguez, M., y B. Scheithauer. 1994. «Ultrastructure of Multiple Sclerosis». *Ultrastructural Pathology* 18 (1-2): 3-13.

Rosenberg, Paul A., Weimin Dai, Xiao Dong Gan, Sanjida Ali, Jennifer Fu, Stephen A. Back, Russell M. Sanchez, et al. 2003. «Mature Myelin Basic Protein-Expressing Oligodendrocytes Are Insensitive to Kainate Toxicity». *Journal of Neuroscience Research* 71 (2): 237-45.

Rosin, Claudia, Timothy E. Bates, y Stephen D. Skaper. 2004. «Excitatory Amino Acid Induced Oligodendrocyte Cell Death in Vitro: Receptor-Dependent and -Independent Mechanisms». *Journal of Neurochemistry* 90 (5): 1173-85.

Rothstein, J. D., M. Dykes-Hoberg, C. A. Pardo, L. A. Bristol, L. Jin, R. W. Kuncl, Y. Kanai, et al. 1996. «Knockout of Glutamate Transporters Reveals a Major Role for Astroglial Transport in Excitotoxicity and Clearance of Glutamate». *Neuron* 16 (3): 675-86.

Salter, Michael G., y Robert Fern. 2005. «NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury». *Nature* 438 (7071): 1167-71.

Sangha, Navdeep, y Nicole R. Gonzales. 2011. «Treatment Targets in Intracerebral Hemorrhage». *Neurotherapeutics* 8 (3): 374-87.

- Schachner, Melitta, y Udo Bartsch. 2000. «Multiple Functions of the Myelin-Associated Glycoprotein MAG (Siglec-4a) in Formation and Maintenance of Myelin». *Glia* 29 (2): 154-65.
- Scherer, Steven S., y Edgardo J. Arroyo. 2002. «Recent Progress on the Molecular Organization of Myelinated Axons». *Journal of the Peripheral Nervous System: JPNS* 7 (1): 1-12.
- Schmued, Larry C., Chris C. Stowers, Andrew C. Scallet, y Lulu Xu. 2005. «Fluoro-Jade C Results in Ultra High Resolution and Contrast Labeling of Degenerating Neurons». *Brain Research* 1035 (1): 24-31.
- Schnaar, Ronald L., y Pablo H. H. Lopez. 2009. «Myelin-Associated Glycoprotein and Its Axonal Receptors». *Journal of Neuroscience Research* 87 (15): 3267-76.
- Schubert, D., y D. Piasecki. 2001. «Oxidative Glutamate Toxicity Can Be a Component of the Excitotoxicity Cascade». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (19): 7455-62.
- Seewann, Alexandra, Hugo Vrenken, Paul van der Valk, Erwin L. A. Blezer, Dirk L. Knol, Jonas A. Castelijns, C. H. Polman, Petra J. W. Pouwels, Frederik Barkhof, y Jeroen J. G. Geurts. 2009. «Diffusely Abnormal White Matter in Chronic Multiple Sclerosis: Imaging and Histopathologic Analysis». *Archives of Neurology* 66 (5).
- Simard, M., y M. Nedergaard. 2004. «The Neurobiology of Glia in the Context of Water and Ion Homeostasis». *Neuroscience* 129 (4): 877-96. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.09.053.
- Simons, Mikael, y Klaus-Armin Nave. 2016. «Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (1): a020479.
- Smith, Terence, Anthony Groom, Bin Zhu, y Lechoslaw Turski. 2000. «Autoimmune encephalomyelitis ameliorated by AMPA antagonists». *Nature Medicine* 6 (1): 62-66.
- Srinivasan, Radhika, Napapon Sailasuta, Ralph Hurd, Sarah Nelson, y Daniel Pelletier. 2005. «Evidence of Elevated Glutamate in Multiple Sclerosis Using Magnetic Resonance Spectroscopy at 3 T». *Brain: A Journal of Neurology* 128 (Pt 5): 1016-25.
- Steinhäuser, Christian, y Vittorio Gallo. 1996. «News on Glutamate Receptors in Glial Cells». *Trends in Neurosciences* 19 (8): 339-45.
- Stover, J. F., U. E. Pleines, M. C. Morganti-Kossmann, T. Kossmann, K. Lowitzsch, y O. S. Kempfski. 1997. «Neurotransmitters in Cerebrospinal Fluid Reflect Pathological Activity». *European Journal of Clinical Investigation* 27 (12): 1038-43.
- Stys, Peter K., Gerald W. Zamponi, Jan van Minnen, y Jeroen J. G. Geurts. 2012. «Will the real multiple sclerosis please stand up?» *Nature Reviews Neuroscience* 13 (7): 507-14.
- Sun, J. 2004. «Myelin-Associated Glycoprotein (Siglec-4) Expression Is Progressively and Selectively Decreased in the Brains of Mice Lacking Complex Gangliosides». *Glycobiology* 14 (9): 851-57.

- Taguchi, Keiko, Hozumi Motohashi, y Masayuki Yamamoto. 2011. «Molecular Mechanisms of the Keap1-Nrf2 Pathway in Stress Response and Cancer Evolution: Molecular Mechanisms of the Keap1-Nrf2 Pathway». *Genes to Cells* 16 (2): 123-40.
- Tang, Song, Jin Qiu, Elena Nikulina, y Marie T. Filbin. 2001. «Soluble Myelin-Associated Glycoprotein Released from Damaged White Matter Inhibits Axonal Regeneration». *Molecular and Cellular Neuroscience* 18 (3): 259-69.
- Thompson, Hilaire J., Niklas Marklund, David G. LeBold, Diego M. Morales, Carrie A. Keck, Mary Vinson, Nicolas C. Royo, Robert Grundy, y Tracy K. McIntosh. 2006. «Tissue Sparing and Functional Recovery Following Experimental Traumatic Brain Injury Is Provided by Treatment with an Anti-Myelin-Associated Glycoprotein Antibody». *The European Journal of Neuroscience* 24 (11): 3063-72.
- Tian, Changhai, Lijun Sun, Beibei Jia, Kangmu Ma, Norman Curthoys, Jianqing Ding, y Jialin Zheng. 2012. «Mitochondrial Glutaminase Release Contributes to Glutamate-Mediated Neurotoxicity during Human Immunodeficiency Virus-1 Infection». *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 7 (3): 619-28.
- Tkachev, Dmitri, Michael L Mimmack, Margaret M Ryan, Matt Wayland, Tom Freeman, Peter B Jones, Michael Starkey, Maree J Webster, Robert H Yolken, y Sabine Bahn. 2003. «Oligodendrocyte Dysfunction in Schizophrenia and Bipolar Disorder». *The Lancet* 362 (9386): 798-805.
- Tropak, M. B., P. W. Johnson, R. J. Dunn, y J. C. Roder. 1988. «Differential Splicing of MAG Transcripts during CNS and PNS Development». *Brain Research* 464 (2): 143-55.
- Vaarman, A, S Kovac, K M Holmström, S Gandhi, y A Y Abramov. 2013. «Dopamine protects neurons against glutamate-induced excitotoxicity». *Cell Death and Disease* 4 (1): e455.
- Vallejo-Illarramendi, Ainara, María Domercq, Fernando Pérez-Cerdá, Rivka Ravid, y Carlos Matute. 2006. «Increased Expression and Function of Glutamate Transporters in Multiple Sclerosis». *Neurobiology of Disease* 21 (1): 154-64.
- Verkhatsky, Alexei, y Arthur Butt. 2013. *Glial Physiology and Pathophysiology*. Wiley-Blackwell.
- Vinson, M., P. J. Strijbos, A. Rowles, L. Facci, S. E. Moore, D. L. Simmons, y F. S. Walsh. 2001. «Myelin-Associated Glycoprotein Interacts with Ganglioside GT1b. A Mechanism for Neurite Outgrowth Inhibition». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (23): 20280-85.
- Vladimirova, O., F. M. Lu, L. Shawver, y B. Kalman. 1999. «The Activation of Protein Kinase C Induces Higher Production of Reactive Oxygen Species by Mononuclear Cells in Patients with Multiple Sclerosis than in Controls». *Inflammation Research* 48 (7): 412-16.
- Vladimirova, O., J. O'Connor, A. Cahill, H. Alder, C. Butunoi, y B. Kalman. 1998. «Oxidative Damage to DNA in Plaques of MS Brains». *Multiple Sclerosis* 4 (5): 413-18.

- Vyas, A. A., H. V. Patel, S. E. Fromholt, M. Heffer-Laue, K. A. Vyas, J. Dang, M. Schachner, y R. L. Schnaar. 2002. «Gangliosides Are Functional Nerve Cell Ligands for Myelin-Associated Glycoprotein (MAG), an Inhibitor of Nerve Regeneration». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (12): 8412-17.
- Wan, Chunling, Yifeng Yang, Guoyin Feng, Niufan Gu, Huijun Liu, Shaomin Zhu, Lin He, y Li Wang. 2005. «Polymorphisms of Myelin-Associated Glycoprotein Gene Are Associated with Schizophrenia in the Chinese Han Population». *Neuroscience Letters* 388 (3): 126-31.
- Werner, P., D. Pitt, y C. S. Raine. 2001. «Multiple Sclerosis: Altered Glutamate Homeostasis in Lesions Correlates with Oligodendrocyte and Axonal Damage». *Annals of Neurology* 50 (2): 169-80.
- Wong, Eric V., Samuel David, Michele H. Jacob, y Daniel G. Jay. 2003. «Inactivation of Myelin-Associated Glycoprotein Enhances Optic Nerve Regeneration». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23 (8): 3112-17.
- Wong, Scott T., John R. Henley, Kevin C. Kanning, Kuo-hua Huang, Mark Bothwell, y Mu-ming Poo. 2002. «A p75^{NTR} and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein». *Nature Neuroscience* 5 (12): 1302-8.
- Wosik, Karolina, Francesca Ruffini, Guillermina Almazan, André Olivier, Josephine Nalbantoglu, y Jack P. Antel. 2004. «Resistance of Human Adult Oligodendrocytes to AMPA/Kainate Receptor-Mediated Glutamate Injury». *Brain: A Journal of Neurology* 127 (Pt 12): 2636-48.
- Xu, G. 2004. «Concentrations of Glutamate Released Following Spinal Cord Injury Kill Oligodendrocytes in the Spinal Cord». *Experimental Neurology* 187 (2): 329-36.
- Yang, L. J., C. B. Zeller, N. L. Shaper, M. Kiso, A. Hasegawa, R. E. Shapiro, y R. L. Schnaar. 1996. «Gangliosides Are Neuronal Ligands for Myelin-Associated Glycoprotein». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (2): 814-18.
- Yin, X., T. O. Crawford, J. W. Griffin, P. h Tu, V. M. Lee, C. Li, J. Roder, y B. D. Trapp. 1998. «Myelin-Associated Glycoprotein Is a Myelin Signal That Modulates the Caliber of Myelinated Axons». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 18 (6): 1953-62.
- Zhang, Su-Chun. 2001. «Defining glial cells during CNS development». *Nature Reviews Neuroscience* 2 (11): 840-43.
- Zhang, YueMei, y Bhagu R. Bhavnani. 2005. «Glutamate-induced apoptosis in primary cortical neurons is inhibited by equine estrogens via down-regulation of caspase-3 and prevention of mitochondrial cytochrome c release». *BMC Neuroscience* 6 (1): 13.

