



Universidad Nacional de Córdoba (UNC)
Facultad de Ciencias Químicas – Departamento de Química Biológica
Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC – CONICET)

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**ALTERACIONES EN LA NEUROTRANSMISIÓN
GLUTAMATÉRGICA DURANTE EL
DESARROLLO DE LA ENCEFALOMIELITIS
AUTOINMUNE EXPERIMENTAL**

Lic. en Qca. Natalí Luján Chanaday Ricagni

Director de tesis: Dr. German Alfredo Roth

Córdoba, 22 de Abril de 2015

Comisión de Tesis: Dr. German A. Roth (Director)

Dra. Alicia L. Degano

Dra. Mariela F. Pérez

Dra. Virginia E. Rivero

Tribunal Evaluador: Dra. Alicia L. Degano

Dra. Mariela F. Pérez

Dra. Virginia E. Rivero

Dra. Ana María Adamo (Evaluadora Externa)

*A mis padres, Angélica y Juan Carlos,
a mi hermana, Jacqui,
a mi compañero, Ale,
por haber creído en mí y estar incondicionalmente.*

AGRADECIMIENTOS



*Las luces de la razón y la religión, propagadas por la enseñanza pública
deben tarde o temprano hacer la felicidad de los que mandan y los que
obedecen.*

Deán Gregorio Funes.

En primer lugar deseo agradecer al Dr. German Roth por la confianza y el apoyo que me brindó. Por haberme dado libertad de pensamiento y de acción, sin por ello dejar de guiarme y de enseñarme a investigar.

Me siento orgullosa de haber podido formarme como profesional en la Universidad Nacional de Córdoba. Agradezco al Departamento de Química Biológica (Facultad de Ciencias Químicas) y al CIQUIBIC (CONICET) por abrirme sus puertas, muy en especial a todos sus integrantes, quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudarme con las mejores intenciones, tanto en lo material como en lo intelectual.

A las Dras. Mariela Pérez y Virginia Rivero, por haber seguido y aportado al desarrollo de esta tesis, y por la gran dedicación y rigurosidad con que analizaron el manuscrito.

A mis compañeros de laboratorio, los que están y los que estuvieron, de quienes recibí un gran apoyo y cariño. Mario, aún no puedo dimensionar la enorme paciencia con la que me enseñaste y me auxiliaste constantemente cuando entré al grupo. Dra. Clara Monferrán, Clarita, por las largas discusiones sobre diversos temas, de las que aprendí muchísimo. Laura, Nico e Inés, es una alegría compartir el día a día con ustedes, hacen del laboratorio un lugar más bello. Alicia, no tengo palabras para describir lo importante que fuiste durante estos años, sos una gran mentora, tu cariño y tus consejos me ayudaron a crecer tanto profesional como personalmente.

Al Dr. Carlos Arce, quien me inició en la ciencia y fue mi primer maestro. A la gente de su laboratorio, Guille, Quío, Mauge, Gastón; y de otros laboratorios, Nico, Pablo, Vane, Vicky, Paula, Fede, Vity, Damián, Yani, Alín, Vicky, Samy, Euge, Romy, Juan, Hernán, Francesca, Agustín, Jorge, Maury, Edu, Marce, etc, etc... Tuve la suerte de haber encontrado en ellos personas maravillosas y buenos amigos.

Además del compañerismo y el soporte de los integrantes de este Departamento, agradezco profundamente la cooperación desinteresada de otros investigadores, cuyos aportes fueron muy importantes: Dres. Gustavo Chiabrandó, Gastón Calfa y Pablo López.

Agradezco el apoyo incondicional de mis amigos, cuya compañía fue fundamental para conservar mi salud mental durante esta tesis. Caro, Mary, Cin, Luz, Franco, Juan, Naty, los años de estudio, salidas, juntas, su apoyo y consejo en las buenas y en las malas, hicieron que la etapa universitaria fuera una de las más felices de mi vida. Pau, Palo, Flor, Anita, Javi, Gabi, Dani, Saulo, Cintia, crecimos juntos, caminamos la vida acompañándonos y sin dudas que hoy llegué hasta aquí en gran medida gracias a su amor.

Agrupación Mazamorra, ustedes aparecieron más recientemente y me dieron muchísimo más de lo que yo pude darles a ustedes. Pau, Gaviota, Magui, Gabi, Juli, Omar, Lilén, Gabi, Alexis, Selva, Bruno, Vicky, Majo, Lu, Ale, gracias por soñar y trabajar para construir un mundo mejor, y por compartir ese sueño conmigo.

Guardo un recuerdo especial de mis profesores del secundario, quienes me mostraron cómo era ser “científico” en la vida real. Particularmente, a “la seño Tesi”, la profesora Teresa Rico de Huespe, que a través de su pasión por la biología y la docencia descubrí mi propia pasión y vocación.

Las primeras personas que me enseñaron a pensar críticamente y a indagar fueron mis padres, Angélica y Juan Carlos. Agradezco y les dedico esta tesis a ellos, porque los amo y admiro, y fueron, son y serán mis ídolos. A mi hermana, Jacqui, mi primera amiga y con quien aprendí a compartir desde los juguetes y los amigos hasta el gusto por la investigación y la química. A mi tía Mary, que me contagió la adicción a la lectura y me regaló los primeros libros de ciencia, abriendo mi imaginación.

Le dedico esta tesis especialmente a Ale, que fue durante estos años guía, mentor, aliento, amigo, compañero; pero sobre todas las cosas me enseñó a amar y le dio plenitud a mi vida.

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
ABSTRACT	7
ABREVIATURAS y ACRÓNIMOS.....	8
INTRODUCCIÓN.....	11
ESCLEROSIS MÚLTIPLE	12
EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA	12
FISIOPATOLOGÍA DE LA EM	13
I. Síndrome aislado clínicamente (SAC).....	14
II. EM con remisiones y recaídas (EM-RR).....	14
III. EM progresiva secundaria (EM-PS)	14
IV. EM progresiva primaria (EM-PP).....	15
V. EM subclínica o asintomática.....	15
ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL.....	15
DE LA VACUNA CONTRA LA RABIA A UN MODELO DE DESMIELINIZACIÓN AUTOINMUNE	15
LA EAE COMO MODELO ANIMAL DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE	16
INDUCCIÓN, CLÍNICA E HISTOPATOLOGÍA DE LA EAE	17
I. Inducción	17
II. Inmunopatogénesis.....	18
III. Progresión clínica e histopatología	19

NEURODEGENERACIÓN EN EAE Y EM	21
ATROFIA CEREBRAL Y SU CONTRIBUCIÓN A LA PROGRESIÓN DE LA PATOLOGÍA	21
NEUROINFLAMACIÓN Y NEURODEGENERACIÓN	23
FUNCIONAMIENTO DE LA SINAPSI Y REGULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR EN EL SNC	24
LA SINAPSI	24
CICLO DE LAS VESÍCULAS SINÁPTICAS Y MAQUINARIA PRESINÁPTICA DE LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR	26
SINAPSINAS Y REGULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR	29
EL SINAPTOSOMA COMO SISTEMA MODELO PARA EL ESTUDIO DEL CICLO DE LAS VESÍCULAS SINÁPTICAS Y LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR	32
OBJETIVOS	35
OBJETIVO GENERAL	37
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	38
MATERIALES.....	39
REACTIVOS	39
MIELINA BOVINA	39
ANIMALES	39
ANTICUERPOS	40
MÉTODOS	41
INDUCCIÓN ACTIVA DE LA EAE	41

PERFUSIÓN E HISTOLOGÍA.....	41
I. Azul de Toluidina	42
II. Azul de Luxol Rápido	42
III. Inmunohistoquímica	42
FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR	43
I. Obtención de sinaptosomas	43
II. Obtención de vesículas sinápticas y membrana sinaptosomal	44
ENSAYO DE LIBERACIÓN DE GLUTAMATO.....	44
CUANTIFICACIÓN DEL GLUTAMATO TOTAL INTRASINAPTOSOMAL	46
INMUNOFLUORESCENCIA DE SINAPTOSOMAS.....	46
ENSAYO DE FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS.....	47
ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOT	47
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	48
REAL TIME RT-PCR	49
I. Purificación del ARN.....	49
II. Transcripción reversa	49
III. PCR en tiempo real.....	50
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	51
RESULTADOS	52
CARACTERIZACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LA CORTEZA FRONTAL DE RATAS CON EAE	53
LA REDUCCIÓN EN LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO APARECE CONJUNTAMENTE CON LOS SIGNOS CLÍNICOS.....	53

LA CINÉTICA DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO DEPENDIENTE DE CALCIO SE ENCUENTRA ALTERADA EN LA REGIÓN FRONTAL DE LA CORTEZA	54
BASES BIOQUÍMICAS DE LAS ALTERACIONES FUNCIONALES EN SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATAS CON EAE	62
FALLAS EN LA REDISTRIBUCIÓN DE SYN I ANTE DESPOLARIZACIÓN	62
ALTERACIONES EN LA FOSFORILACIÓN DE SYN I Y LAS QUINASAS Y FOSFATASAS INVOLUCRADAS.....	65
I. Disminución en la fosforilación del sitio 3 de SynI y localización de CaMKII.....	65
II. Aumento en la fosforilación de los sitios 4/5 de SynI y su relación con Erk1/2 y CN	69
ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LOS SINAPTOSOMAS Y DE LA MOVILIDAD DE LAS VESÍCULAS SINÁPTICAS	73
DISTRIBUCIÓN EN EL CEREBRO DE ALTERACIONES HISTOLÓGICAS EN LA ETAPA AGUDA DE LA EAE	76
HISTOLOGÍA: ANÁLISIS DE LA INTEGRIDAD DEL TEJIDO Y LA MATERIA BLANCA MEDIANTE LAS TINCIONES DE AZUL DE TOLUIDINA Y AZUL DE LUXOL RÁPIDO	77
INMUNOHISTOQUÍMICA: ACTIVACIÓN DE MICROGLÍA Y ASTROCITOS EN EL CEREBRO DE ANIMALES CON EAE	83
PCR EN TIEMPO REAL: EXPRESIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS EN LA CORTEZA FRONTAL DE ANIMALES CON EAE	89
DISCUSIÓN	92
I. MATERIA BLANCA Y MATERIA GRIS EN EM Y EAE.....	93
II. DISFUNCIÓN NEURONAL EN EM Y EAE	94

III. INFLAMACIÓN EN EM Y EAE.....	98
IV. CONCLUSIONES	102
ANEXO I.....	104
MAPA DE DISECCIÓN DEL CEREBRO DE RATAS Y DEFINICIÓN DE LA CORTEZA FRONTAL	104
I. Definición de la Corteza Frontal.....	105
ANEXO II.....	108
ALTERACIONES GLUTAMATÉRGICAS EN EL ESTRIADO DORSAL (CAUDADO- PUTAMEN) EN LA ETAPA AGUDA DE LA EAE	108
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS REALIZADAS DURANTE ESTA TESIS	110
REFERENCIAS	111

RESUMEN

La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) es un modelo animal que reproduce la mayoría de las características clínicas y patológicas de la enfermedad humana esclerosis múltiple (EM). Ambas son patologías inflamatorias, desmielinizantes y neurodegenerativas del sistema nervioso central que se asocian a deterioro motriz, sensorial y cognitivo. En EM, la atrofia en materia gris se relaciona con la aparición de discapacidad cognitiva y contribuye a la progresión clínica. En particular, el daño y la disfunción en ciertas áreas de la corteza frontal han sido correlacionados con el desarrollo de fatiga cognitiva, uno de los síntomas más comunes e incapacitantes en los pacientes con EM. Sin embargo, las bases moleculares de estos cambios aún son desconocidas.

Valiéndonos de las similitudes existentes entre la EAE y la EM, en esta tesis se analizaron cambios funcionales, bioquímicos y morfológicos en terminales presinápticos purificados (sinaptosomas) de corteza en animales con EAE aguda.

En sinaptosomas aislados de la región frontal de la corteza, los cuales se componen en un ~80% de terminales glutamatérgicas, se encontró disminuida la liberación del neurotransmisor excitatorio glutamato, tanto en la cantidad total liberada como en la velocidad de liberación. Este defecto apareció concomitantemente con los signos clínicos clásicos de EAE, y se revirtió rápidamente cuando los animales comenzaron a recuperarse de la patología. Análisis bioquímicos de los sinaptosomas del grupo EAE revelaron la presencia de alteraciones en la maquinaria molecular presináptica y en su respuesta al estímulo despolarizante, lo cual se vio acompañado de una fosforilación y redistribución subcelular anormal de sinapsina I. Estos cambios se asociaron a una reducción en el número de vesículas sinápticas que se movilizan hacia la zona activa ante estimulación, sin cambios en la morfología de los sinaptosomas, según se observó mediante microscopía electrónica.

Este trabajo es el primero en describir en detalle mecanismos moleculares de disfunción neuronal en la corteza frontal durante el desarrollo de la EAE. Estos mecanismos podrían ser responsables también de las alteraciones observadas en pacientes con EM y podrían contribuir al deterioro cognitivo.

ABSTRACT

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is an animal model that mimics many of the clinical and pathological features of the human disease multiple sclerosis (MS). Both are inflammatory demyelinating and neurodegenerative pathologies of the central nervous system associated with motor, sensory, and cognitive deficits. In MS, gray matter atrophy is related to the emergence of cognitive deficits and contributes to clinical progression. In particular, injury and dysfunction in certain areas of the frontal cortex have been correlated to the development of cognitive fatigue, one of the most common and disabling symptoms in MS. However, the molecular bases of these changes remain unknown.

Taking advantage of EAE and MS similarities, we herein analyze functional and morphological changes in isolated cortical presynaptic terminals (synaptosomes) from an acute EAE rat model.

In synaptosomes isolated from the frontal cortex, which are composed of ~80% of glutamatergic terminals, we found that glutamate release was impaired in the EAE group. This defect appeared along with the onset of the disease, and reversed when clinical signs were no more evident. Biochemical analysis of EAE synaptosomes revealed alterations in the presynaptic release machinery and in the response to depolarization, which was accompanied by abnormal synapsin I phosphorylation and dispersion. These changes were associated with reduced synaptic vesicle mobility, with no alterations in synaptosomal morphology as evidenced by electron microscopy.

The present are the first evidences unraveling the molecular mechanisms of frontal cortex neuronal dysfunction in EAE and, possibly, MS.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<i>4-AP</i>	4-aminopiridina
<i>ABS</i>	Albúmina sérica bovina
<i>AFC</i>	Adyuvante de Freund completo
<i>AMPA</i>	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato
<i>ANOVA</i>	Análisis de varianza
<i>ATP</i>	Adenosina trifosfato
<i>BDNF</i>	Factor neurotrófico derivado de cerebro (siglas en inglés)
<i>BHE</i>	Barrera hematoencefálica
<i>β-ME</i>	β -mercaptoetanol
<i>CaMKII</i>	Quinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina II
<i>CCAV</i>	Canales de Ca^{2+} activados por voltaje
<i>CN</i>	Calcineurina
<i>CPA</i>	Célula presentadora de antígenos
<i>dpi</i>	Días post-inducción
<i>DPS</i>	Densidad post-sináptica
<i>DTT</i>	Ditiotreitol
<i>EAE</i>	Encefalomiелitis autoinmune experimental
<i>EDTA</i>	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>EM</i>	Esclerosis múltiple
<i>Erk1/2</i>	Quinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2
<i>GABA</i>	Ácido γ -aminobutírico
<i>GB</i>	Solución tampón del gradiente

<i>GDH</i>	Deshidrogenasa de glutamato
<i>GLL</i>	Grupo de vesículas sinápticas listas para ser liberadas
<i>GR</i>	Grupo de vesículas sinápticas de reserva
<i>HBM</i>	Solución tampón de HEPES
<i>HEPES</i>	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetil sulfónico
<i>IF</i>	Inmunofluorescencia
<i>IFN-γ</i>	Interferón gamma
<i>IHQ</i>	Inmunohistoquímica
<i>IL-1</i>	Interleuquina 1
<i>IL-17</i>	Interleuquina 17
<i>IRM</i>	Imagen por resonancia magnética
<i>MB</i>	Materia blanca
<i>MG</i>	Materia gris
<i>MI</i>	Matriz intervesicular
<i>MOG</i>	Glicoproteína de mielina de oligodendrocito
<i>MS</i>	Membrana sinaptosomal
<i>NMDA</i>	Ácido N-metil-D-aspártico
<i>PAGE</i>	Electroforesis en geles de poliacrilamida
<i>PB</i>	Solución tampón de fosfato
<i>PBM</i>	Proteína básica de mielina
<i>PBS</i>	Solución tampón de fosfato salino
<i>PCR</i>	Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés)
<i>PFA</i>	Paraformaldehído
<i>PKA</i>	Quinasa de proteínas A
<i>PKC</i>	Quinasa de proteínas C
<i>PP1</i>	Fosfatasa de proteínas 1

<i>PP2A</i>	Fosfatasa de proteínas 2 A
<i>RT</i>	Transcripción reversa (siglas en inglés)
<i>SB</i>	Solución tampón de muestra (para Western blot)
<i>SDS</i>	Dodecil sulfato de sodio
<i>SFB</i>	Suero fetal bovino
<i>SNC</i>	Sistema nervioso central
<i>SynI</i>	Sinapsina I
<i>syns</i>	sinapsinas
<i>TBS</i>	Solución tampón de TRIS salino
<i>TNFα</i>	Factor de necrosis tumoral alfa
<i>Tris</i>	Tris (hidroximetil) aminometano
<i>VS</i>	Vesícula sináptica
<i>WB</i>	Western blot
<i>ZA</i>	Zona activa

INTRODUCCIÓN



A man is but the product of his thoughts.

What he thinks, he becomes.

Mahatma Gandhi.

ESCLEROSIS MÚLTIPLE

EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA

A pesar de ser una de las patologías más estudiadas a nivel mundial, la esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad que carece de cura y cuya etiología es aún desconocida. Afecta mayormente a la población caucásica, siendo muy común en el norte de Europa y de América donde tiene una prevalencia del 0,1-0,2 % y una incidencia anual de 6-7 personas cada 100.000 habitantes [1]. En América Latina la prevalencia de la EM varía entre muy baja e intermedia, siendo menos frecuente en regiones geográficas cercanas al Ecuador y/o con población principalmente mestiza, mulata o africana. En Sudamérica, Argentina presenta la mayor prevalencia, que ronda entre 15 y 25 cada 100.000 habitantes [2].

El evento primario en la génesis de la enfermedad sigue siendo una incógnita. Basados en las evidencias genéticas y epidemiológicas, algunos autores proponen que la etiología de la EM es autoinmune. La activación del sistema inmunológico sería ocasionada por patógenos que infecten al sistema nervioso central (SNC) y/o que presenten mimetismo molecular^A [3,4]. Desencadenando así un proceso en el cual las células autoreactivas son activadas en la periferia, migran al SNC y atraviesan la barrera hemato-encefálica (BHE), provocando desmielinización y neurodegeneración [5]. Otros autores postulan que la EM es una enfermedad degenerativa progresiva, posiblemente de oligodendrocitos, sobre la cual se desarrolla la respuesta autoinmune, debido a la alta inmunogenicidad de los componentes de mielina [6,7]. Más allá de la patogénesis, el resultado es el mismo: un proceso complejo de desmielinización/neurodegeneración e inflamación que ocurren en paralelo y se retroalimentan entre sí, exacerbando el daño al SNC.

Si bien se ignoran las causas de la EM, se reconoce que se trata de un proceso complejo donde se combinan factores genéticos y eventos ambientales. En cuanto al factor genético, la asociación más fuerte con el riesgo a contraer EM se encontró en alelos específicos de la región HLA en el cromosoma 6 [8]. Esta región codifica para las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés)^B y se caracteri-

^A La teoría del **mimetismo molecular** postula que similitudes de secuencia entre péptidos foráneos y péptidos propios puede activar de manera cruzada a células del sistema inmune, causando una reacción autoinmune.

^B Las moléculas del **MHC** son proteínas integrales de membrana que se expresan en todas las células del organismo y cuya función es la presentación de péptidos a las células T, permitiendo la discriminación entre antígenos propios y foráneos.

za por un grado excepcional de polimorfismo. Particularmente, los alelos asociados a EM corresponden al MHC de clase II, el cual se expresa exclusivamente en células presentadoras de antígenos (CPAs). Se postula que la razón de esta asociación es que esos alelos generan complejos MHCII que presentan péptidos por los cuales las células T tienen una avidéz considerablemente mayor [9]. Otras 57 variantes fuera de la región HLA fueron implicadas en la susceptibilidad a desarrollar EM, la mitad de ellas compartidas con otras enfermedades autoinmunes. Estas regiones se encuentran fuertemente enriquecidas en genes inmunológicos que participan en procesos como el procesamiento de antígenos y la migración, adhesión y proliferación de leucocitos [8]. Con un menor grado de interacción, también se han descrito genes de vías de señalización neuronales asociados a la EM [10], entre ellos componentes de las cascadas que regulan el proceso de guía axonal durante el desarrollo y los fenómenos plásticos que ocurren durante la formación de memorias. Llamativamente, dentro de estos genes se encuentran algunos alelos de receptores de glutamato que se cree podrían regular la susceptibilidad a la excitotoxicidad.

Por otra parte, es ampliamente aceptado que la aparición patología no depende exclusivamente de la predisposición genética, sino que deben actuar eventos ambientales. Sin embargo, la identificación de los eventos específicos no es sencilla. El desarrollo de episodios clínicos en la EM se ha asociado, de manera controvertida, a infecciones bacterianas y/o virales. Esto se postuló tanto en base a evidencia epidemiológica (infecciones infantiles y juveniles, distribuciones geográficas) como a la respuesta anormal que muestran los pacientes con EM a determinados virus, sumado a la comparación con otros trastornos autoinmunes y los modelos experimentales [11]. La deficiencia de vitamina D también ha sido relacionada a la susceptibilidad de padecer EM y al aumento de la prevalencia de esta enfermedad con la latitud [1]. Otros disparadores ambientales han sido propuestos, como la composición lipídica de la dieta, vacunaciones, trauma, estrés, consumo de tabaco, exposición a sustancias tóxicas, etc., aunque las evidencias existentes son poco concluyentes.

FISIOPATOLOGÍA DE LA EM

Los signos clínicos más comunes de la EM incluyen: neuritis óptica desmielinizante aguda, mielitis parcial de los tractos motriz, sensorial, intestinal y/o de vejiga (lo cual lleva a debilidad muscular, hormigueo y entumecimiento de extremidades, incontinencia, dis-

función sexual, dolor), síndromes asociados al daño en tallo encefálico (visión doble, debilidad facial y lingual, vértigo), falta de equilibrio (por daño en cerebelo), discapacidad cognitiva (disminución en la velocidad de procesamiento de información, disfunción ejecutiva, pérdida de memoria visual y verbal a largo plazo), fatiga cognitiva^c y migrañas. Los pacientes también cursan con síntomas psicológicos como depresión, apatía, ansiedad e irritabilidad. Además, los pacientes con EM presentan sensibilidad al calor (altas temperaturas agravan los síntomas) [12].

La EM puede clasificarse en diferentes tipos, según el fenotipo o patrón de progresión que presenta el paciente:

I. Síndrome aislado clínicamente (SAC)

Se trata de personas con el primer ataque desmielinizante agudo que aún no pueden ser diagnosticadas fehacientemente con EM. Alrededor del 80 % de estos casos desarrollan EM en los siguientes 15-20 años.

II. EM con remisiones y recaídas (EM-RR)

Esta es la forma de EM más común, presentándose en el 80-90 % de los pacientes. El primer episodio clínico se produce entre los 20 y 40 años de edad y, en promedio, ocurren 1-2 ataques al año. Sin embargo, por imagen de resonancia magnética (IRM) puede evidenciarse la formación de nuevas y numerosas lesiones inflamatorias por año, indicando que gran parte de la patología se desarrolla de forma silente. Las lesiones consisten en focos de desmielinización inflamatoria reversible, lo cual da cuenta, en parte, de las remisiones clínicas.

III. EM progresiva secundaria (EM-PS)

Alrededor del 50 % de los pacientes con EM-RR desarrollan luego de 10-20 años un deterioro físico y cognitivo que se acumula y empeora con el tiempo, es decir, es progresivo secundario. En esta etapa aparecen la mayoría de las discapacidades irreversibles y gran parte de los pacientes se vuelven no ambulatorios en pocos años. Las terapias inmunomoduladoras de rutina que son utilizadas para atenuar la progresión de la EM-RR dejan de ser efectivas en esta etapa, de hecho, no existen tratamientos para la EM-PS.

^c La **fatiga cognitiva** se define como una sensación abrumadora de agotamiento mental y se evidencia como una capacidad disminuida de sostener el rendimiento cognitivo.

IV. EM progresiva primaria (EM-PP)

Entre el 10 y el 20 % de los pacientes nunca presentan episodios recurrentes, sino que muestran un agravamiento progresivo de los síntomas clínicos desde el comienzo. La edad de manifestación de la EM-PP y la EM-PS es la misma (alrededor de los 40 años de edad), y ambas formas comparten las mismas características clínicas e histopatológicas. Esto llevó a algunos investigadores a pensar que la EM-PP es un tipo de EM-PS donde la primera etapa de recidivas fue subclínica. Aquí cabe destacar que alrededor de un 5 % de los pacientes desarrolla una forma mixta de EM, con recaídas y remisiones superpuestas a un curso progresivo (EM progresiva recurrente).

V. EM subclínica o asintomática

Con el avance de las técnicas de IRM se ha descrito la existencia de lesiones clásicas de EM en personas que no presentan ningún tipo de signo o síntoma clínico. Más aún, en autopsias de personas fallecidas por otras causas, se han descubierto accidentalmente lesiones cerebrales histopatológicamente compatibles con la EM. Esto indica que un porcentaje de las personas que sufren EM (se calcula que alrededor de un tercio del total) son completamente asintomáticas durante toda su vida (reseñas sobre los cursos clínicos y diagnóstico de la EM pueden encontrarse en [13,12,1]).

ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL

DE LA VACUNA CONTRA LA RABIA A UN MODELO DE DESMIELINIZACIÓN AUTOINMUNE

El concepto de vacunación como método preventivo de ciertas enfermedades ya era conocido en la antigüedad por las culturas China e India. Varios siglos después, a finales de 1700 Edward Jenner, “el padre de la inmunología”, llevó a cabo los primeros estudios científicos sobre la vacunación y su mecanismo de acción. Sin embargo no fue hasta finales de 1800 que Robert Koch, “el fundador de la bacteriología moderna”, demostró que los microorganismos podían causar enfermedades. A partir de allí, la búsqueda de los organismos responsables de enfermedades que afectaban fuertemente a la población de la época así como de nuevas terapias que permitieran su atenuación y administración fue

foco de investigación tanto en la medicina humana como en la veterinaria [14,15]. En este contexto, el laboratorio de Louis Pasteur aplicó sus descubrimientos en técnicas de esterilización en el desarrollo de la primera vacuna contra la rabia. Sabiendo que esta enfermedad afectaba al sistema nervioso, atenuaron el virus mediante desecación de la médula espinal de conejos infectados. Esta vacuna fue ampliamente utilizada a principios de 1900 y fue muy importante para la erradicación de la rabia. Sin embargo, generó nuevas complicaciones. Algunos individuos desarrollaban graves efectos secundarios, que podían llevar a la muerte. Se trataba de una esclerosis diseminada aguda, caracterizada por desmielinización perivascular en el SNC [16]. En la búsqueda de las causas de esta encefalomiелitis postvacunal (como se la denominó más adelante), se descubrió que inyecciones de extractos de cerebro o médula espinal en diferentes animales producía una enfermedad desmielinizante del SNC. Esta enfermedad parecía ser producto de un ataque autoinmune (aunque el concepto de autoinmunidad, tal como se lo conoce hoy en día, aún no había sido desarrollado). En pocos años, gracias a la invención de los adyuvantes^D [17] se logró un modelo animal más reproducible y efectivo con sólo una inyección de antígeno [18], el cual más adelante se denominó encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Dado que la vacuna contra la rabia también contenía restos de tejido nervioso, se llegó a la conclusión de que la EAE y la encefalomiелitis postvacunal compartían un mismo mecanismo patogénico: autoinmunidad contra algún componente del SNC.

LA EAE COMO MODELO ANIMAL DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Con el desarrollo de los modelos de EAE, miembros de la comunidad científica se vieron asombrados por sus similitudes clínicas e histopatológicas con la enfermedad humana EM. Nuevos trabajos de investigación fueron dedicados a comparar en detalle ambas patologías, resaltando la importancia científica de las semejanzas [19,20]. Esta importancia radicaba en que este modelo podría servir para desentrañar tanto las causas como el mecanismo por el cual se generaban las placas escleróticas en EM. De esta manera, se llegó a postular que en la EM algún “agente infeccioso” (ya que el funcionamiento del sistema inmune aún no se conocía en detalle) atravesaba la BHE y se combinaba con proteínas cerebrales que se volvían “antigénicas” y desencadenaban la producción de autoanticuerpos, al igual que se había descrito para la EAE [21]. En pocos años se asentó en la

^D **Adyuvante:** *los adyuvantes inmunológicos son sustancias que potencian la respuesta inmune contra el antígeno de interés, sin conferir inmunidad por sí mismos.*

comunidad científica el uso de diferentes modelos de EAE que se asemejaban a distintas clases y/o etapas de la EM. Y se definió a la EAE como modelo experimental exclusivo de la EM.

Esto tuvo un impacto muy grande sobre el estudio de la EM y el desarrollo de terapias paliativas. Principalmente reforzó la hipótesis de que la EM es una enfermedad desmielinizante autoinmune. En los años sucesivos se descubrió que los antígenos blanco de este ataque autoinmune eran las proteínas que forman parte de la vaina de mielina en el SNC, lo cual llevó al desarrollo de modelos de EAE más específicos. Lentamente la EAE se volvió el modelo de EM más utilizado en todo el mundo, no sólo para el estudio de la patogénesis y progresión de la enfermedad, sino también para el diseño y validación de nuevas terapias [22]. Junto con ello, la teoría de un origen autoinmune de la EM fue ganando consenso, a pesar de haber sido cuestionada desde los inicios [23] y de que a la actualidad no haya pruebas contundentes respecto a cuál es el evento primario. Sin embargo es indiscutible que, una vez establecida, la EM es una enfermedad desmielinizante, autoinmune y neurodegenerativa. Todos estos procesos son reproducidos en la EAE, lo cual, más allá de sus limitaciones, convierte a este modelo en un buen sistema de estudio para comprender los mecanismos patológicos de EM, tanto inmunológicos como nerviosos.

INDUCCIÓN, CLÍNICA E HISTOPATOLOGÍA DE LA EAE

I. Inducción

La EAE puede ser inducida en cepas de animales genéticamente susceptibles de dos maneras: activa o pasivamente. La inducción activa consiste en la inyección subcutánea de mielina completa o antígenos (péptidos) de mielina, emulsionada en un adyuvante adecuado (generalmente se emplea adyuvante de Freund completo). Esto genera una fuerte respuesta inflamatoria que lleva al desarrollo de signos clínicos característicos entre 9 y 12 días después de la inducción con una alta incidencia. Dependiendo de la especie y cepa de animal, y del método de inducción empleados existen diferentes modelos de EAE que varían en las características clínicas y patológicas, y en la respuesta a terapias. Esta heterogeneidad se asemeja a la variedad de subclases de EM y la variabilidad existente entre pacientes [4].

Por otra parte, la inducción pasiva de la EAE, también llamada inducción por transferencia adoptiva, consiste en la inyección de animales genéticamente susceptibles con

células T encefalitogénicas^E extraídas de animales desafiados activamente para la EAE. Este modelo permite marcar las células y estudiar *in vivo* las etapas de los procesos de migración e infiltración del SNC [24].

II. Inmunopatogénesis

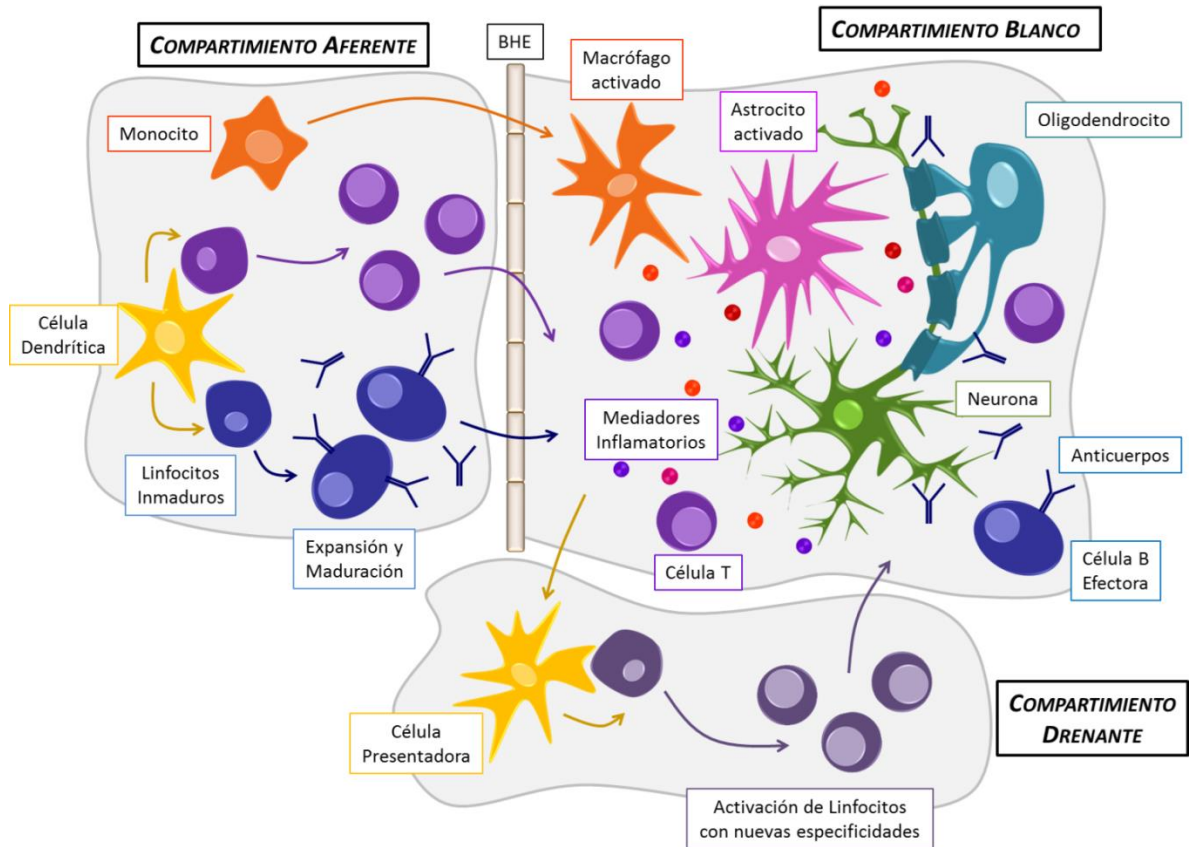


Figura 1. Modelo de tres compartimientos para la patogénesis de la EAE y la EM.

El modelo más aceptado que explica la generación de la EAE a partir de la inducción se denomina modelo de tres compartimientos (Fig. 1) [3]. En un primer paso, células dendríticas de la zona de inducción captan el antígeno y son transportadas por el torrente sanguíneo hasta el ganglio más cercano (compartimiento aferente). Allí presentan el antígeno a linfocitos B y T específicos, los cuales proliferan y se diferencian. Estas células auto-reactivas se acumulan en el bazo, donde vuelven a interactuar con CPAs locales, quienes aumentan la capacidad migratoria e infiltrante de los linfocitos [24]. En un segundo paso, las células activadas son reclutadas al SNC, donde vuelven a encontrar los antígenos encefalitogénicos presentados por CPAs perivasculares y de meninges. Allí son reactivadas y

^E **Encefalitogénico:** Que tiene la capacidad de generar encefalitis, en nuestro caso particular, la EAE.

secretan mediadores pro-inflamatorios que llevan a la ruptura de la BHE y al reclutamiento de más células inmunes (linfocitos T y B, neutrófilos, macrófagos), retroalimentando la cascada inflamatoria [25]. Esto lleva a la penetración de las células sanguíneas en el parénquima nervioso (compartimiento blanco) donde se activan la microglía y los astrocitos. La inflamación resultante provoca degeneración de oligodendrocitos y neuronas, con pérdida de mielina, axones y dendritas [4]. En un tercer paso, los restos de células de SNC son limpiados mediante fagocitosis por CPAs. Éstas pasan al torrente sanguíneo y presentan nuevos antígenos nerviosos en ganglios cervicales (compartimiento drenante), activando un nuevo grupo de linfocitos T (amplificación de epítopes) que exacerbaban la reacción autoinmune [3]. Se postula que la inmunopatogénesis de la EM ocurriría también según este mecanismo de tres compartimientos. Aunque, a diferencia de lo que sucede en los modelos de EAE, la activación primaria del sistema inmune sería causada por alguna lesión del SNC y/o por mímica molecular [3].

III. Progresión clínica e histopatología

Como se mencionó anteriormente, los modelos clásicos de EAE^F inducida activamente presentan una gran variabilidad dependiendo del antígeno utilizado (mielina completa, péptidos de mielina o neuronales), de la presencia y tipo de adyuvante, del método de inyección y de la especie y cepa de animal de experimentación. Generalmente los primeros signos clínicos aparecen entre 9 y 12 días post-inducción (dpi; según el modelo del que se trate) y se caracterizan por parálisis flácida ascendente [13], comenzando en la cola y subiendo hacia las extremidades posteriores pudiendo llegar a cuadriplejía. Esto se debe a que el blanco principal de la inflamación en estos modelos es la médula espinal (mayormente la región lumbar) y los nervios ópticos, con una menor participación del cerebro. La gravedad de los signos clínicos alcanza un pico en 2 a 4 días y, dependiendo del tipo de EAE, pueden revertirse completamente sin presentar recaídas (modelo agudo), pueden revertirse y entrar en ciclos sucesivos de remisiones y recaídas (modelo recurrente-remitente), pueden revertirse sólo en parte y permanecer indefinidamente (modelo crónico), o también pueden ser combinaciones de los anteriores (modelos remitentes que evolucionan a crónicos).

^F *En este trabajo solo haremos referencia a los modelos de EAE clásica, sin embargo cabe destacar que actualmente existen modelos de EAE espontánea y de EAE atípica, cuyos mecanismos patogénicos y signos clínicos difieren de los modelos clásicos (ver referencia [13]).*

Todos los modelos clásicos de EAE comparten los mismos mecanismos patogénicos, pero difieren en la intensidad de la inflamación y del daño en el SNC. En médula espinal, gran parte de la infiltración ocurre a través de meninges y de vasos sanguíneos en la zona de materia blanca (MB) [26,27]. Estos infiltrados se componen mayormente de linfocitos T secretores de interleuquina 17 (IL-17) e interferón gamma (IFN- γ), y de macrófagos. La aparición de los focos inflamatorios coincide temporal y espacialmente con el desarrollo de placas fuertemente desmielinizadas [28], aunque no son determinantes para el desarrollo de los signos clínicos (en algunos animales se observa una EAE subclínica, con presencia de cambios histológicos y ausencia de parálisis; [29]). A nivel bioquímico, el inicio del proceso desmielinizante es evidenciado antes del desarrollo de los signos clínicos, mediante la pérdida de la proteína básica de mielina (PBM; una de las proteínas mayoritarias que componen la vaina de mielina) y la disminución de la actividad CNPasa [30]. Además, se ha observado deposición de anticuerpos y ataque por leucocitos citotóxicos en motoneuronas acompañada de degeneración y apoptosis de las mismas [31].

Por otra parte, a pesar de tener un nivel menor de inflamación, el cerebro también se encuentra afectado durante la EAE. Mediante imagen por resonancia magnética se describieron lesiones cerebrales durante la EAE crónica, similares en tipo y distribución a las observadas en pacientes con EM [32]. Estas lesiones incluyen pérdida de volumen cortical en cerebelo con degeneración de células de Purkinje, atrofia en cerebro, pérdida progresiva de materia gris (MG) en la corteza cerebral relacionada a disminución de mielina, axones, conexiones sinápticas y número total de neuronas. Tanto en modelos en roedores como en primates no humanos existe una infiltración leucocitaria temprana en cerebro, que puede ser anterior o coincidir con el comienzo de los signos clínicos, dependiendo del tipo de EAE [33]. Estas células ingresarían en primera instancia al líquido cefalorraquídeo (LCR) a través del plexo coroideo⁶, transitarían los ventrículos y designarían los puntos de infiltración al parénquima cerebral. El proceso inflamatorio se compone de infiltrados leucocitarios (linfocitos T y B, neutrófilos, macrófagos) así como también de células residentes del SNC (microglía y astrocitos activados) [34,33].

Junto con los mediadores inflamatorios clásicos (citoquinas y quemoquinas), los leucocitos infiltrantes y la microglía activada secretan grandes cantidades de glutamato. Al

⁶ *En el cerebro, hay cuatro plexos coroideos, uno en cada ventrículo. Consisten en un conjunto de capilares, separados de los ventrículos por células epiteliales coroideas. Los plexos producen el LCR, y actúan como sistema de filtro y de transporte entre la sangre y el LCR.*

ser éste un neurotransmisor excitatorio, su exceso en el medio provoca excitotoxicidad, es decir, muerte neuronal por sobre-activación de receptores de aminoácidos excitatorios [35]. Además, el proceso inflamatorio somete tanto a las neuronas como a la glía a estrés oxidativo, incrementando el daño [34]. La combinación de todos estos factores afecta la transmisión y la plasticidad sinápticas e incluso puede llevar a muerte neuronal. En diferentes modelos de EAE se ha descrito la presencia de infiltrados y activación de microglía y astrocitos en regiones cerebrales de MB, como el cuerpo caloso, y en regiones de MG profundas, como el hipocampo y el estriado. En estas estructuras se encontraron cambios en la transmisión sináptica, neurodegeneración (tanto de neuronas excitatorias como inhibitorias), pérdida de volumen del tejido, muerte de astrocitos y oligodendrocitos, acompañados o no de desmielinización (dependiendo de la región) [36-39].

Los mecanismos moleculares detrás de las alteraciones en la neurotransmisión son desconocidos. Se han encontrado cambios en la expresión de receptores inotrópicos y metabotrópicos de glutamato y de ácido γ -aminobutírico (GABA; principal neurotransmisor inhibitorio del SNC) en neuronas [37,40,41], así como de las moléculas transportadoras que recaptan estos neurotransmisores y de las enzimas que las degradan en astrocitos [42]. Asimismo, la contribución o participación de las diferentes estructuras cerebrales en el desarrollo de la patología ha sido pobremente explorada en la EAE. Sólo para el caso de la neurodegeneración en hipocampo se ha demostrado que se asocia a la disfunción en los procesos de aprendizaje y memoria relacionados a tareas espaciales [36].

NEURODEGENERACIÓN EN EAE Y EM

ATROFIA CEREBRAL Y SU CONTRIBUCIÓN A LA PROGRESIÓN DE LA PATOLOGÍA

La EM y la EAE no son afecciones exclusivas de MB, sino que también existe daño en zonas de MG cerebral, tanto en la corteza como en estructuras profundas. Ya las primeras descripciones histológicas de la EM realizadas por Jean-Martin Charcot, “el fundador de la neurología moderna”, en 1869 mostraban la presencia de daño neuronal y pérdida de axones en tejido cerebral *post-mortem* [43]. Sin embargo, debido a la falta de técnicas lo suficientemente sensibles, no fue hasta este siglo que comenzaron a comprenderse los

procesos involucrados. En la actualidad, gran parte de la investigación en EM está enfocada al estudio del daño neuronal en regiones de MG, ya que éste sería el principal contribuyente a la aparición y la acumulación irreversible de discapacidad motriz y cognitiva [44].

Todo el cerebro se encuentra afectado durante la EM, y ocurre pérdida de volumen tanto de MB como de MG. Llamativamente, los procesos patológicos de MB y MG ocurren de forma parcialmente independiente, acumulándose con el tiempo mayor nivel de daño y número de lesiones en MG que en MB [45]. En los últimos años se han podido relacionar diferentes manifestaciones de la EM con el grado y localización regional de la atrofia cerebral. Por ejemplo, cambios en las cortezas motriz y sensorial se asocian a problemas de locomoción, daño en las cortezas prefrontal y orbitofrontal lleva a fallas en procesos cognitivos superiores (planeamiento, organización, atención, manipulación de información, monitoreo de acciones, memoria de trabajo), desmielinización en tractos de MB afecta el desempeño y la velocidad en tareas cognitivas (pérdida de conectividad), cambios en el funcionamiento de la corteza frontal, los ganglios basales y/o pérdida de conectividad entre ellos correlaciona fuertemente con la aparición y la gravedad de la fatiga cognitiva (una sensación abrumadora de agotamiento mental que constituye el síntoma más común e incapacitante de la EM) [44-48]. Además, el volumen de lesión en cerebro correlaciona con la duración y gravedad de la EM, y constituye un buen predictor de la progresión clínica a 10 años [49].

Por otra parte, estudios en modelos de EAE también mostraron la participación del cerebro en la generación de ciertos signos clínicos, tanto en el período pre-sintomático (fase inductora) como sintomático (fase efectora). Antes de la aparición de la parálisis, ratones con EAE presentan un mayor dinamismo en las conexiones sinápticas de la corteza somato-sensorial en ausencia de neuroinflamación, lo cual influiría en la plasticidad neuronal y el deterioro cognitivo [50]. Además, los niveles de citoquinas inflamatorias aumentan en el hipotálamo, afectando la secreción de hormonas y provocando ansiedad y comportamientos depresivos en los animales [51]. En la fase efectora aparecen leucocitos infiltrantes en médula espinal, cerebelo y cerebro, inicialmente en regiones de MB y luego en MG. El daño en MB también precedería a la atrofia en MG, sin embargo el volumen de daño se vuelve mayor en las regiones de MG (al igual que se observó en la EM) [52,34]. Estas alteraciones incluyen pérdida progresiva de neuronas y contactos sinápticos [53], desmielinización, muerte de oligodendrocitos maduros y fallas en su maduración [39], es-

trés oxidativo, desbalance homeostático de iones [54], excitotoxicidad [55]. En particular, la pérdida de volumen cortical cerebelar correlacionaría con la graduación clínica (probablemente porque la misma se realiza en base a coordinación motriz) [53] y la neurodegeneración en hipocampo se asocia a disfunción en aprendizaje y memorias asociativas o contextuales [56]. La contribución de las lesiones en corteza cerebral y en estriado al desarrollo y/o resolución de la EAE aún es desconocida. Interesantemente, la forma y distribución de estas lesiones son similares en los diferentes modelos de EAE y en la EM.

NEUROINFLAMACIÓN Y NEURODEGENERACIÓN

Como se mencionó anteriormente, una vez generados, los mecanismos de inflamación y degeneración neuronal ocurren de forma simultánea, modulándose entre sí. Esta no es una característica exclusiva de la EM y la EAE, sino que ocurre en otras enfermedades neurodegenerativas y/o inflamatorias del SNC. Los leucocitos infiltrantes así como la glía activada (microglía y astrocitos) pueden regular la transmisión sináptica y la sobrevivencia de las neuronas, tanto de manera positiva como negativa. Es decir, por un lado cumplen un rol en la remoción de los restos celulares, mediante fagocitosis, y en la estimulación de mecanismos de sobrevivencia y regeneración en neuronas y oligodendrocitos, mediante la secreción de factores tróficos. Mientras que por otro lado pueden activar mecanismos de neurodegeneración, siendo la desmielinización, el estrés oxidativo y la excitotoxicidad los más relevantes en la EM y la EAE [57-60,37].

La destrucción de la vaina de mielina lleva a la redistribución de canales de Na^+ a lo largo del axón, que de otra forma se encontrarían concentrados en los nodos de Ranvier. Esta respuesta es capaz de restaurar, en parte, la velocidad y la eficiencia de la transmisión del impulso nervioso, sin embargo aumenta las necesidades energéticas por parte de la Na^+/K^+ -ATPasa. Sumado a esto, el estrés oxidativo y las citoquinas pro-inflamatorias perturban la integridad funcional de las mitocondrias, disminuyendo la producción de ATP. Como resultado, se acumula Na^+ en el interior de la neurona, lo cual lleva al funcionamiento inverso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y la acumulación de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), desencadenando mecanismos apoptóticos [48,61]. Al mismo tiempo, las células inflamatorias secretan grandes cantidades de glutamato lo cual provoca excitotoxicidad, llevando a la lisis de la membrana plasmática, al desbalance del estado redox y la acumulación de iones,

principalmente Ca^{2+} , en el citoplasma. Todo lo cual contribuye al daño mitocondrial y a la activación de procesos degenerativos letales [37].

Cabe destacar que el término neurodegeneración no implica necesariamente muerte neuronal, sino que se refiere a la pérdida progresiva de estructura y/o de función, pudiendo ser reversible. Tanto en EAE como en EM se han descrito alteraciones funcionales y metabólicas en neuronas, cuyas bases moleculares aún son desconocidas.

FUNCIONAMIENTO DE LA SINAPSIS Y REGULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR EN EL SNC

LA SINAPSIS

La transducción de señales en una sinapsis consiste en la conversión de una señal eléctrica, es decir el impulso nervioso que alcanza la terminal del axón o presinapsis, en una señal química que sea percibida por la neurona postsináptica. Esta señal química consta de pequeñas moléculas llamadas neurotransmisores, los cuales generalmente se almacenan en vesículas secretoras específicas denominadas vesículas sinápticas (VS) y son liberados al espacio sináptico mediante exocitosis regulada. Los neurotransmisores se unen a receptores en la membrana postsináptica iniciando un nuevo impulso nervioso que se propagará a lo largo de la neurona postsináptica. Todo este proceso ocurre en el rango de los milisegundos [62].

Actualmente, el modelo de sinapsis más aceptado es el de la sinapsis tripartita (Fig. 2), formada por la presinapsis, la postsinapsis y el espacio sináptico junto con la glía (astrocitos). La presinapsis será descrita en detalle en la próxima sección. La postsinapsis se compone de receptores, proteínas de anclaje y adhesión, quinasas, fosfatasa y componentes de citoesqueleto, formando complejos macromoleculares de alta densidad, por lo que se la denomina densidad postsináptica (DPS), y es una estructura altamente dinámica. Esto significa que su composición y capacidad de respuesta son modulables, alterando la fuerza de la transmisión sináptica, propiedad conocida con el nombre de plasticidad postsináptica. El espacio sináptico es muy estrecho (20-30 nm) y es generado por integrinas, quienes mantienen la presinapsis y la postsinapsis yuxtapuestas [62]. Los astrocitos participan en la remoción de neurotransmisores del espacio sináptico, evitando que alcancen

concentraciones tóxicas, y en su reciclado. Además, son capaces de responder a la actividad sináptica y de regular la plasticidad de la sinapsis, participando en la transmisión, integración, procesamiento y almacenamiento de la información. Por ello se los considera un miembro importante de la sinapsis [63].

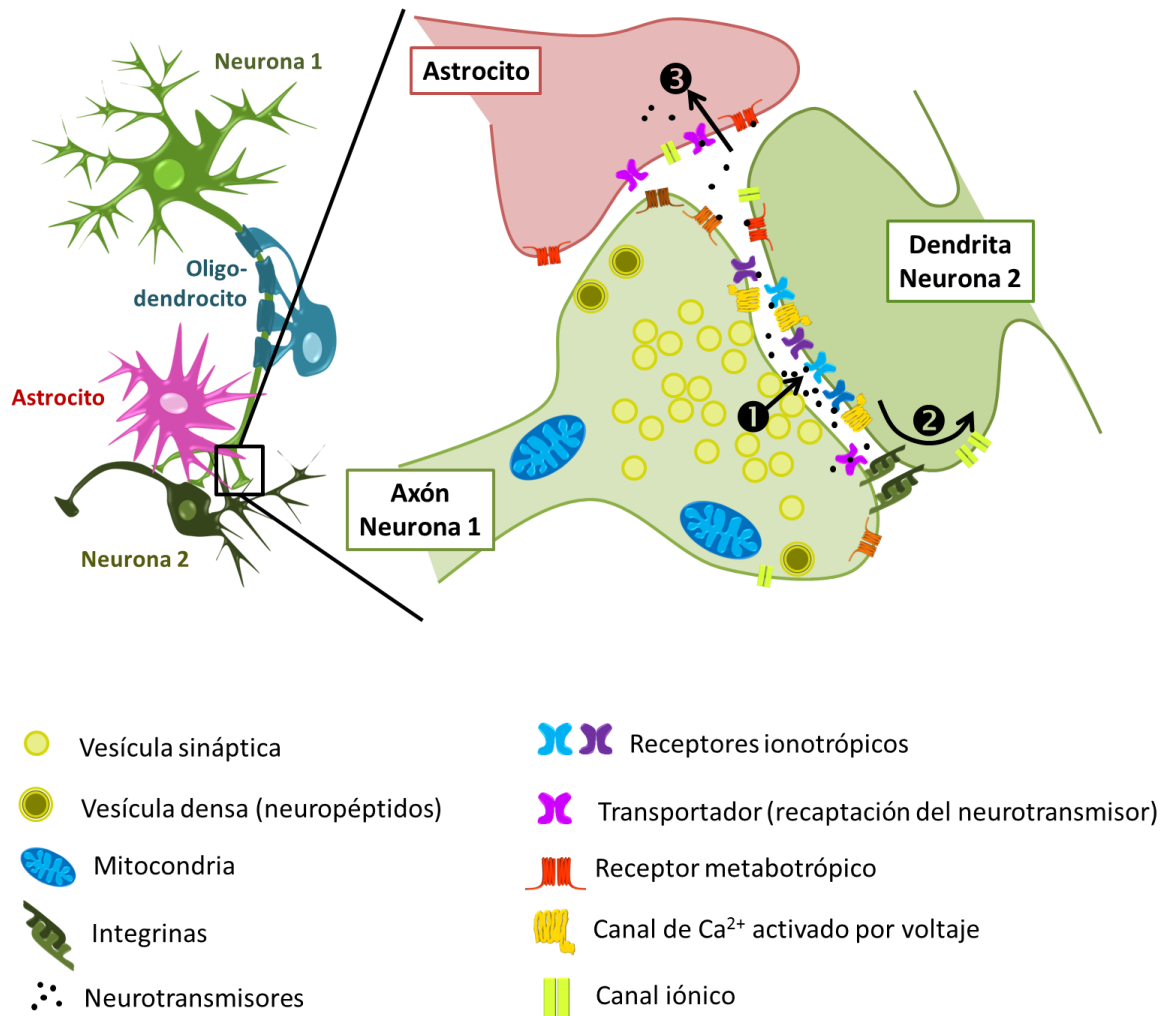


Figura 2. *Esquema simplificado de la sinapsis tripartita.*

- ❶ *Fusión de las VSs y liberación al espacio sináptico del neurotransmisor.*
- ❷ *El neurotransmisor, luego de unirse a sus receptores específicos, cambia el potencial de la membrana post-sináptica y desencadena cascadas de señalización intracelular. En sinapsis excitatorias, esto genera un nuevo potencial de acción.*
- ❸ *En los astrocitos, el neurotransmisor puede unirse a receptores, activándolos, y también puede ser removido del medio por captación a través de proteínas transportadoras.*

CICLO DE LAS VESÍCULAS SINÁPTICAS Y MAQUINARIA PRESINÁPTICA DE LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR

La unidad de comunicación en una sinapsis es el neurotransmisor. Como se mencionó anteriormente, los neurotransmisores se almacenan en la terminal presináptica en VSs. En respuesta a la actividad eléctrica, las VSs entran en un ciclo que permite que sean reutilizadas manteniendo así la capacidad de respuesta de la neurona (Fig. 3).

Las VSs se clasifican en distintas poblaciones según sus propiedades funcionales: el **grupo listo para ser liberado** (GLL), constituye el ~1 % de las VSs totales, consiste en vesículas ancladas mediante proteínas a la zona activa^H (ZA) y están disponibles para fusionarse inmediatamente ante una estimulación; el **grupo de reciclado**, representa un ~10-15 % de las VSs totales, estas VSs se reciclan y reponen la población continuamente y rápidamente, mantienen el rendimiento de liberación ante estimulaciones fisiológicas o moderadas; el **grupo de reserva** (GR), la mayoría de las VSs pertenecen a este grupo, ~80-90 %, son muy resistentes a fusionarse en neuronas de mamíferos y sólo se liberan ante estimulaciones intensas, cuando las VSs de reciclado se agotan [64]. La velocidad de intercambio entre el GLL y las vesículas de reciclado es muy rápida, mientras que las VSs del GR se mezclan muy lentamente con las otras poblaciones (o no se mezclan). El GR y el grupo de reciclado también se diferencian en el mecanismo de reciclado. Ante estimulaciones moderadas, que sólo inducen la exocitosis del grupo de reciclado, estas vesículas son recuperadas por un mecanismo de endocitosis rápido mediado por clatrina. Cuando la estimulación es intensa y prolongada, se produce la movilización y fusión de un gran número de vesículas de reserva, esto gatilla la activación de un mecanismo de endocitosis masivo que es más lento y costoso energéticamente. Este mecanismo requiere intermediarios del tipo endosomal y repone exclusivamente las VSs del GR [65]. Además, se postula la existencia de un tercer mecanismo de endocitosis, ultraveloz, que recuperaría sólo las VSs del GLL y del grupo de reciclado, denominado *kiss-and-run* (nombre en inglés que literalmente significa besar-y-correr). En este caso ocurriría una fusión transitoria con la membrana plasmática y la vesícula se recuperaría por el simple cierre del poro de fusión [66,64]. Mientras que las

^H La **ZONA ACTIVA** es una zona especializada de la membrana plasmática presináptica que se encuentra exactamente opuesta a la DPS. Está formada por una matriz compleja de proteínas que ancla y prepara a las VSs para la exocitosis, entre ellas SNAREs, proteínas adaptadoras, canales de Ca^{2+} , quinasas. Este complejo media la probabilidad de liberación y la plasticidad presináptica contribuyendo a la regulación de la fuerza sináptica.

vesículas del GLL se encuentran posicionadas a pocos nm de la ZA, las VSs del grupo de reciclado y del GR están distribuidas en el interior de la terminal presináptica, entremezcladas entre ellas (es decir que no se encuentran segregadas anatómicamente). Estudios recientes proponen que las características funciones únicas que posee cada población de VSs podrían estar determinadas por su composición proteica y/o grado de asociación al citoesqueleto [67].

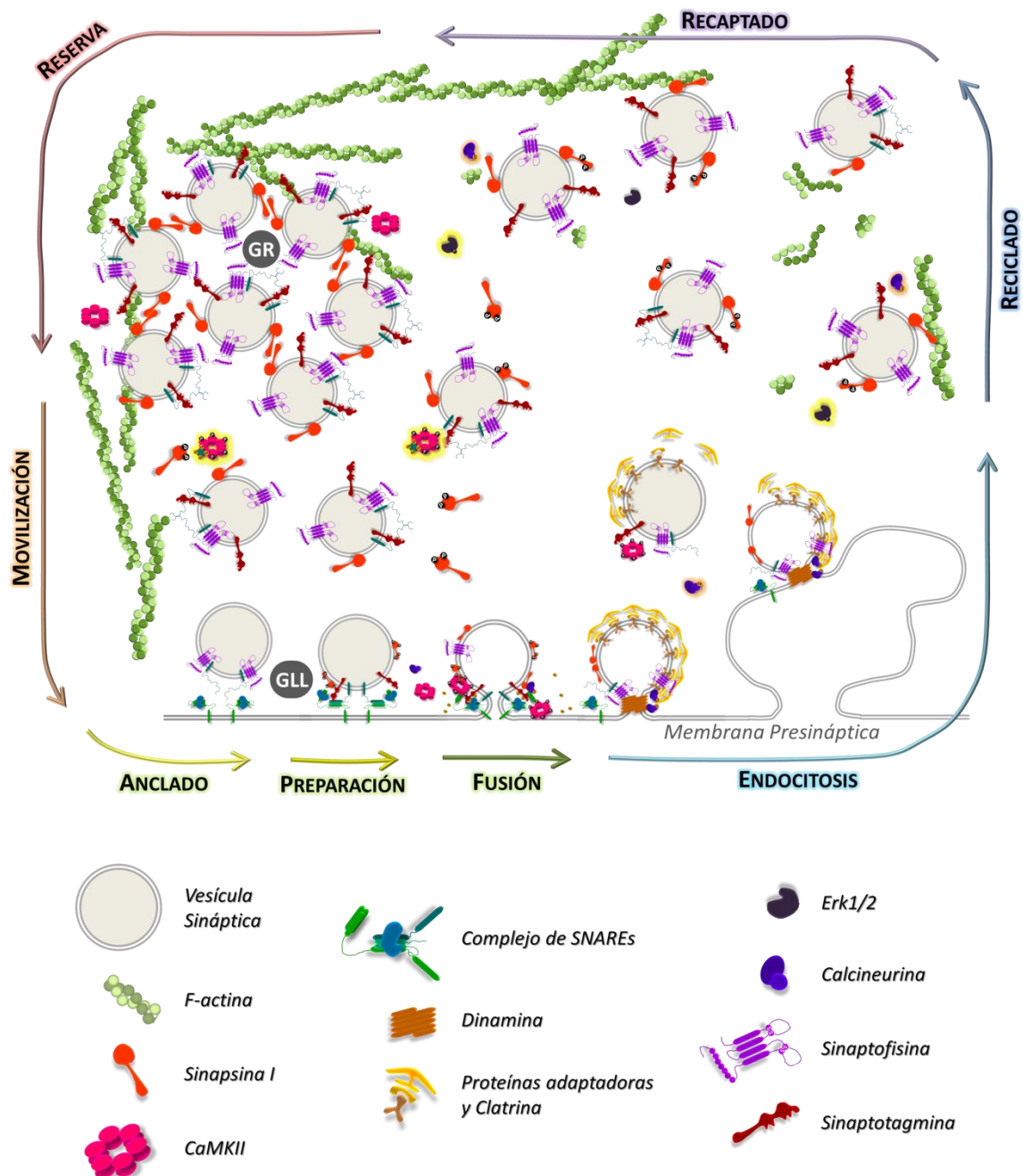


Figura 3. Representación esquemática del ciclo de las vesículas sinápticas.

En terminales en reposo, las VSs son ancladas y preparadas para exocitar, mediante SNAREs y otras proteínas de la ZA. La despolarización lleva al aumento de $[Ca^{2+}]_i$ y la rápida fusión del GLL. Estímulos intensos, se activa la movilización y posterior fusión del GR. Las distintas poblaciones de VSs se reponen mediante endocitosis, reciclado y recaptado de las VSs a los diferentes grupos.

En cuanto a la maquinaria molecular que controla las diferentes fases del ciclo de las VSs, las etapas de exo/endocitosis y su regulación por Ca^{2+} han sido los procesos más ampliamente estudiados. De hecho, por el descubrimiento de dichos mecanismos obtuvieron el premio Nobel en Fisiología o Medicina los Dres. Rothman, Schekman y Südhof en 2013, y los Dres. Neher y Sakmann en 1991, respectivamente. A excepción de la fusión de las membranas de la ZA y la VS, el resto de procesos involucrados en el ciclo de las VSs son dependientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ya sea directa o indirectamente. Cuando el impulso nervioso alcanza la terminal del axón se produce la apertura de canales de Ca^{2+} activados por voltaje (CCAV) y el aumento localizado de Ca^{2+} (es decir, en la vecindad inmediata del canal; los dominios de aumento de Ca^{2+} pueden ser del orden de los nm o de los μm dependiendo de la intensidad y el tiempo de estimulación). Este aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ regula la velocidad de intercambio entre el GLL y el grupo de reciclado, la velocidad de endocitosis y la velocidad de reclutado y anclado de nuevas VSs a la ZA [68]. El mecanismo de exocitosis es mediado por SNAREs y regulado por proteínas adaptadoras, quinasas y chaperonas. Involucra tres etapas: el anclado de las VSs a la ZA mediante el ensamblado del complejo SNARE altamente estable; la preparación, que posiciona a los complejos proteínicos y las VSs de forma que responden rápidamente al aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$; y la fusión de las membranas [69] (ver Fig. 3). La endocitosis es mediada por un grupo de proteínas llamadas defosfinas, ya que son activadas por desfosforilación rápida y coordinadamente ante el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La única fosfatasa (conocida) que regula este proceso es calcineurina (CN). Consta de cuatro etapas: nucleación, donde se forma el complejo adaptador que recluta a clatrina y el complejo de nucleación que permite el crecimiento de la cobertura; invaginación, donde se forma la vesícula; fisión, mediada por dinamina; y desensamble del recubrimiento [70]. La endocitosis masiva discutida anteriormente también es dependiente de CN, pero difiere en las proteínas adaptadoras y en los pasos (primero se forma un gran endosoma de reciclado y luego se desprenden las VSs individuales en un proceso mediado por clatrina; ver Fig. 3) [65].

Cuando la terminal nerviosa está en reposo, la mayoría de las VSs se encuentran inmovilizadas. El mantenimiento de las VSs dentro de la terminal (que de otra forma se dispersarían en el axón) se adjudica en gran parte a sinapsina I (SynI), proteína que será descrita en detalle en la siguiente sección. Además, los agregados de VSs se encuentran estrechamente rodeados de citoesqueleto de actina (“encerradas en una caja de actina”), lo cual se postula que tendría la doble función de evitar la dispersión y pérdida de las VSs

(manteniendo su posición cercana a la ZA) y de direccionar de vuelta hacia los agregados a las VSs recicladas [64].

SINAPSINAS Y REGULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR

Las sinapsinas (syns) fueron descubiertas y caracterizadas por el Dr. Paul Greengard y su grupo, y por estos descubrimientos recibió, junto con los Dres. Carlsson y Kandel, el premio Nobel en Fisiología o Medicina en el año 2000. Las syns son las fosfoproteínas mayoritarias en SNC y su familia está codificada por tres genes, SYN1, SYN2 y SYN3, que por empalme alternativo generan 10 isoformas (syn Ia-b, IIa-b, IIIa-f). A pesar de que los distintos miembros de esta familia poseen diferentes patrones de expresión en cerebro, la mayoría de las terminales nerviosas coexpresan varias isoformas, indicando que sus funciones serían complementarias [71]. Las syns son sustratos de numerosas y variadas modificaciones postraduccionales, entre ellas fosforilación/desfosforilación, N-acetilación, metilación, fucosilación, formación de isoaspartato y piroglutamato, deaminación, oxidación de triptófano, etc. Estas modificaciones podrían regular la capacidad de syns de oligomerizar y de interactuar con otras proteínas y con fosfolípidos [71]. Se han descrito roles de syns tanto durante el desarrollo del SNC como en el funcionamiento de sinapsis en SNC adulto. En el desarrollo, syns participarían en el crecimiento de neuritas y en la formación, mantenimiento y rearreglo de contactos sinápticos [72]. En cerebro maduro, se proponen funciones de syns de pre- y post-anclado de las VSs a la ZA. El rol de syns en el pre-anclado de VSs sería su función central (y más ampliamente estudiada) como conector en la matriz intervesicular (MI)¹. De esta forma determina la **localización** subcelular de las VSs en la presinapsis y la **retención** de las VS en el botón sináptico en forma de agregados compactos, previniendo su dispersión. Las syns regulan el número de VSs que están disponibles para ser excitadas ante una estimulación sostenida, modulando la movilización/inmovilización de VS a partir de los agregados (es decir, modulando la estabilidad de la MI) [73]. De esta manera modifican las propiedades plásticas de la presinapsis actuando como **restringidoras** (o sea, contribuyen a la tenacidad de la terminal) y como **integradoras** de señales (ya que su función depende del conjunto de modificaciones postraduccionales

¹ La **matriz intervesicular** es una red difusa de filamentos que mantienen unidas entre sí a las VS, cuya composición sería diferente a la de la matriz axoplásmica, es decir, por fuera de los agregados. Está compuesta principalmente por syns I y II, pero también se ha demostrado la participación de otras proteínas (cuya identidad es aún desconocida).

que acumule) [74]. La participación de syns en procesos de post-anclado es más controvertida. Algunos autores han propuesto que podrían regular etapas tardías de la exocitosis, es decir la preparación y la fusión de VSs (lo cual modificaría la probabilidad de liberación del neurotransmisor) [75]. Además, se postula que syns podrían comportarse como las desfosfinas (e incluso interactuar con algunas de ellas) y de esta manera promoverían la endocitosis de VSs al mismo tiempo que desestabilizarían la MI. Finalmente, también regularían etapas tardías de la endocitosis, es decir la recuperación de VS y la reconstitución de los agregados, a través de su interacción con actina en la zona periactiva¹ [76,73].

Dentro de la familia de syns, sinapsina I (SynI) ha sido la primera en descubrirse y su estructura, función y modificaciones postraduccionales se conocen más detalladamente. La mayoría de los roles descritos en el párrafo anterior son mediados por este miembro de la familia. En la Fig. 4 se muestran los diferentes dominios de SynI (isoforma *a*) junto con un resumen de sus características, sus propiedades de interacción con lípidos y proteínas, y las modificaciones que pueden sufrir (basado en las referencias [71] y [73]). A pesar de todos los cambios postraduccionales que le han sido adjudicados, sólo la fosforilación/desfosforilación de SynI se ha relacionado fehacientemente al control de los agregados de VSs (aunque se postula que sólo esta modificación no sería suficiente para su funcionamiento). Los sitios de fosforilación de SynI pueden dividirse en tres grupos según la quinasa de la cual son sustrato: sitio de proteína quinasa A (PKA), sitios de quinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2 (Erk1/2) y sitios de quinasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina II (CaMKII). PKA fosforila el sitio 1 de SynI (Ser 9), el cual se encuentra en el dominio A. Esta fosforilación inhibe la unión directa a fosfolípidos, es decir, disminuye la interacción con VSs [77]. Los sitios 2 y 3 (Ser 566 y 603) se ubican en el dominio D y son sustrato de CaMKII, siendo desfosforilados por proteína fosfatasa 2A (PP2A). Mientras PP2A posee actividad en condiciones basales, CaMKII es activada luego del incremento de $[Ca^{2+}]_i$, lo cual lleva a que estos sitios presenten niveles de fosforilación muy bajos en presinapsis en reposo y aumenten proporcionalmente al estímulo [78]. La fosforilación de los sitios 2/3 es la que provoca los mayores cambios conformacionales en SynI, afectando no sólo al dominio D sino también al C [79], y reduce drásticamente la afinidad por actina y por VSs tanto directa como indirectamente, mediante la regulación de la oligomerización de syns (ya que la formación de dímeros de syns es necesaria para formar la MI) [77].

¹ La **zona periactiva** corresponde a la región que rodea a la zona activa y la periferia de los agregados de VS. Se encuentra muy enriquecida en actina.

Erk1/2 fosforila a los sitios 4,5 y 6,7 (Ser 62,67 y Ser 549, 551), situados en los dominios B y D, respectivamente. Estos sitios son desfosforilados por CN, la única fosfatasa conocida que se activa por la unión a Ca^{2+} y a Ca^{2+} -calmodulina [80]. Al contrario de lo que sucedía para los sitios 2 y 3, en los sitios 4,5 y 6,7 es la quinasa, Erk1/2, la que posee algo de actividad basal, y la fosfatasa, CN, se activa ante el aumento de $[Ca^{2+}]_i$. Por esto, los sitios 4,5 y 6,7 se encuentran parcialmente fosforilados en terminales en reposo y, dependiendo de la intensidad y/o tiempo de la estimulación, pueden fosforilarse aún más o desfosforilarse luego de la despolarización [78,81]. La fosforilación de SynI en estos sitios disminuye su afinidad por G- y F-actina y también inhibe su capacidad de nuclear y polimerizar G-actina y de formar manojos de F-actina, sin alterar la unión a fosfolípidos [82,83]. Como consecuencia de las diferentes distribuciones subcelulares de las quinasas, fosfatasas, actina y otras proteínas la maquinaria presináptica, en combinación con el gradiente de concentración de Ca^{2+} generado por la estimulación, se postula que habría distintos grupos de syns que cumplirían roles diferentes dentro del ciclo de las VSs. Retomando los conceptos del párrafo anterior, los sitios de PKA y CaMKII en SynI regularían las funciones de pre-anclado (retención de las VSs y formación de la MI), mientras los sitios de Erk1/2 participarían en el post-anclado (reciclado y recaptado de VSs en la zona periaxónica).

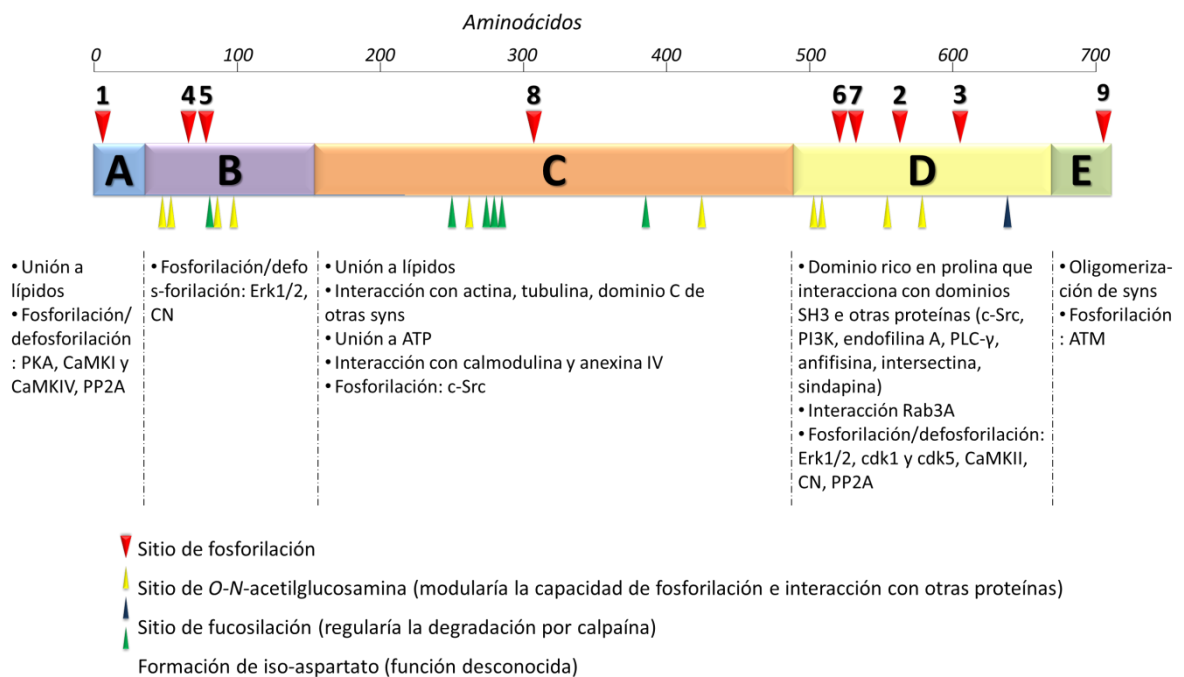


Figura 4. Dominios en la secuencia de SynIa de rata, modificaciones postraduccionales e interacción con lípidos y proteínas.

EL SINAPTOSOMA COMO SISTEMA MODELO PARA EL ESTUDIO DEL CICLO DE LAS VESÍCULAS SINÁPTICAS Y LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR

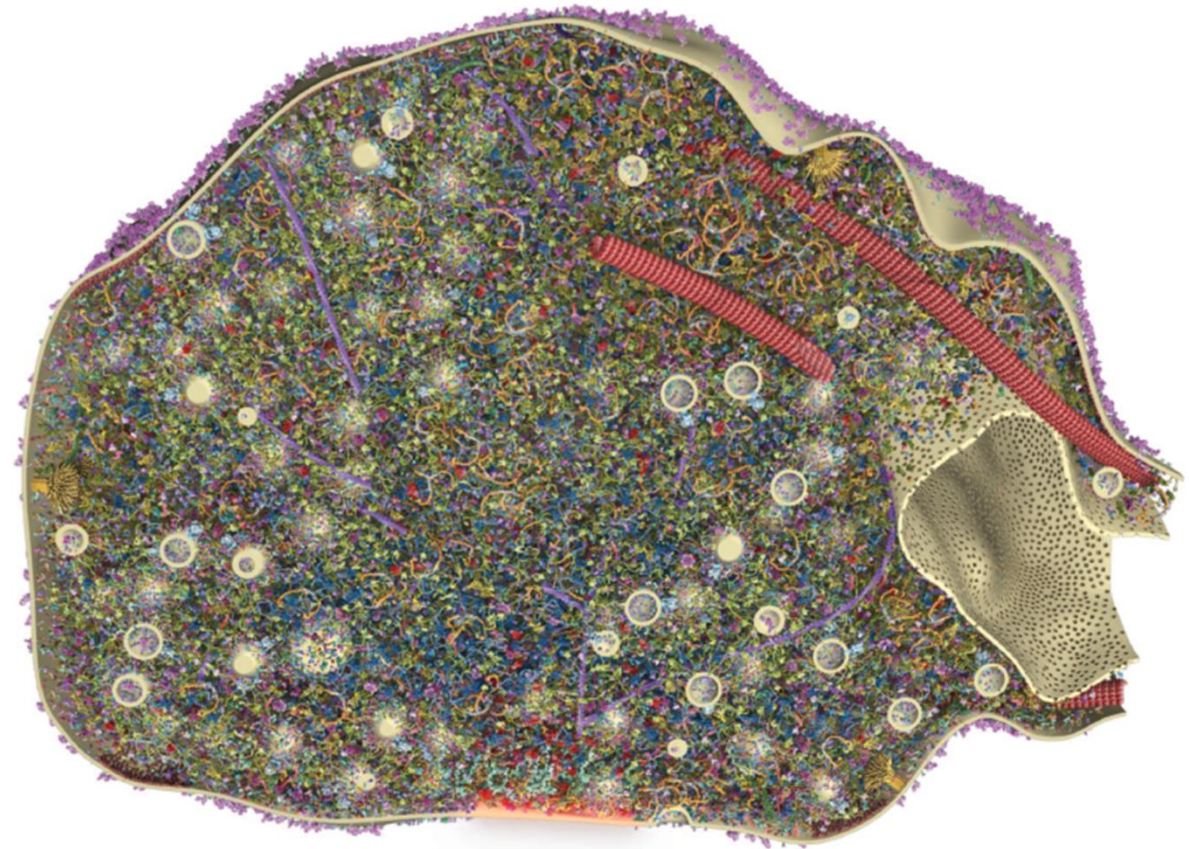
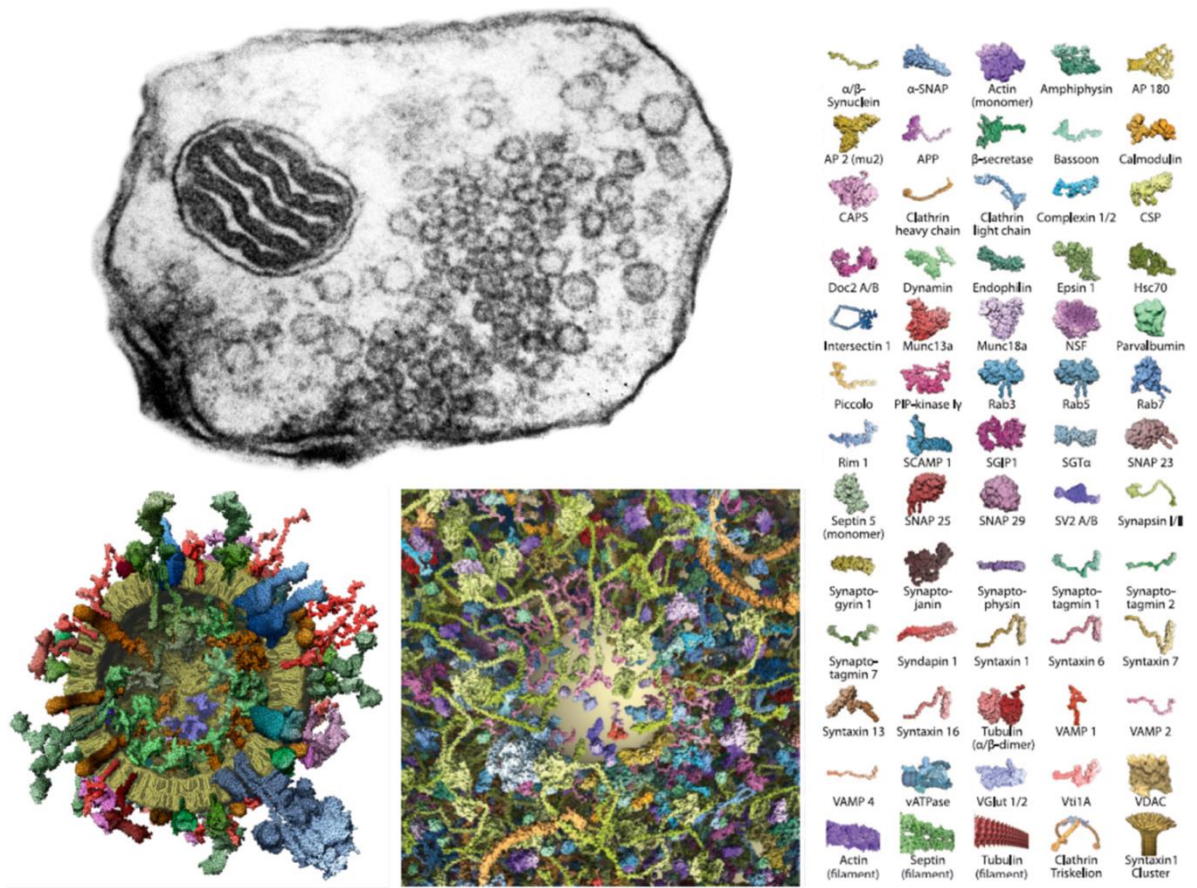
Los sinaptosomas son terminales nerviosas (también llamadas botones sinápticos o, antiguamente, varicosidades) que han sido separadas del axón, y de la neurona postsináptica y la glía, durante la homogeneización del tejido. Luego de esto, la membrana vuelve a sellarse, manteniendo en su interior el citoplasma intacto, el citoesqueleto, mitocondrias, VSs y toda la maquinaria molecular presináptica (Fig. 5). Es un sistema totalmente funcional y es el más simple que puede purificarse en mamíferos. Pueden prepararse a partir de un homogenato de SNC (ya sea completo o sólo del área de interés) de cualquier animal (vertebrado o invertebrado) sin importar su edad, a diferencia de los cultivos primarios de neuronas u organotípicos que constituyen preparaciones metodológicamente más complejas y con restricciones de edad (deben utilizarse animales en etapas prenatales o postnatales tempranas) [84]. El método de homogeneización no afecta fuertemente la formación de los sinaptosomas [85] si se realiza en medios no iónicos e isosmóticos [86], y distintas técnicas de purificación resultan en estructuras morfológicamente similares (analizadas por microscopía electrónica), que se diferencian en el grado de contaminación con restos celulares, mielina y mitocondrias libres [86-88]. Una desventaja de estas preparaciones es que no son homogéneas en cuanto al tipo de neurotransmisor (no hay evidencias que durante la purificación se favorezca alguna en particular), sin embargo recientemente se han podido aislar poblaciones específicas de sinaptosomas (con un sólo tipo de neurotransmisor) en un alto grado de pureza utilizando marcadores y citometría de flujo [89]. Otra desventaja es que sinapsis de gran tamaño (como las de las fibras musgosas en el cerebelo) sufren rupturas y no pueden ser purificadas por los métodos tradicionales.

La primer gran ventaja de los sinaptosomas es que constituyen una preparación de mitocondrias neuronales más homogénea que las obtenidas por métodos de purificación de mitocondrias a partir de tejido nervioso, con el beneficio de que éstas además conservan su entorno fisiológico, es decir, el citoplasma y la membrana plasmática con sus componentes y mecanismos intactos [90]. Esto ha posibilitado el estudio de la velocidad y pasos de producción de ATP, el metabolismo de glucosa, aminoácidos y sustratos oxidantes, la transferencia de equivalentes reductores y de sustratos con el citosol, la cadena respiratoria, la interdependencia entre la producción de ATP y la liberación de Ca^{2+} desde la mito-

condría con el transporte de iones y nutrientes a través de la membrana plasmática así como sus efectos en el ciclo de las VSs y la liberación de neurotransmisor [91].

La segunda gran ventaja es que los sinaptosomas son muy similares a las terminales nerviosas intactas en cuanto a las propiedades eléctricas, bioquímicas, metabólicas y morfológicas, ya sea que se comparen con cultivos neuronales o rodajas de tejido [86]. Esto ha permitido el estudio de los mecanismos involucrados en el ciclo de las VSs, es decir: el funcionamiento de la maquinaria de exocitosis y endocitosis, la participación de diferentes quinasas y fosfatasas, el descubrimiento y la purificación de nuevas proteínas neuronales y sus funciones, la cinética y la regulación de la liberación de neurotransmisor, el funcionamiento de canales iónicos, el funcionamiento, el reciclado y la señalización de diferentes receptores (ionotrópicos y metabotrópicos) y transportadores de membrana, la cinética de los microdominios de $[Ca^{2+}]$, el efecto de neurotoxinas y otras drogas, los cambios neuronales en enfermedades neurodegenerativas y durante el envejecimiento, etc. [86,90]. Recientemente, mediante la combinación de técnicas de microscopía de fluorescencia de alta resolución, microscopía electrónica, proteómica, lipidómica y simulaciones de dinámica molecular, y gracias al uso de los sinaptosomas, se pudo generar un mapa tridimensional de una VS promedio (conteniendo las proporciones y distribuciones superficiales de los distintos tipos de lípidos y proteínas que la forman) y también de una terminal nerviosa completa (con la cantidad, distribución y posición de las proteínas y las organelas que la componen; ver Fig. 5) [92,93]. Estos trabajos dejan en evidencia la extremada complejidad de la presinapsis y de la red de proteínas que la conforman, mostrando una clara diferencia entre los esquemas utilizados para explicar su funcionamiento y la realidad.

Figura 5. En la parte superior izquierda, imagen de microscopía electrónica de un sinaptosoma (realizada en nuestro laboratorio), el cual contiene una mitocondria y numerosas vesículas sinápticas en forma de agregados, y se encuentra unido a la DPS (la cual se observa como una membrana con mayor grado de tinción en la región inferior izquierda de la imagen). Centro izquierda, modelado de una VS seccionada mostrando las proteínas que la conforman (tomado de [92]). A su lado, simulación de una VS inmersa en la MI, es decir, el agregado de VSs. Zona inferior, se muestra la reconstrucción tridimensional (a escala) del sinaptosoma. La ZA se esquematiza como una región rojiza de la membrana sinaptosomal. La nomenclatura de las proteínas mostradas se encuentra en la parte superior derecha (extraído de [93]).



OBJETIVOS



Aprende del pasado, vive el presente, ten esperanza en el futuro. Lo importante es nunca dejar de preguntarse.

Albert Einstein.

Como se describió en la introducción de esta tesis, tanto la EM como la EAE constituyen patologías con una amplia variedad de manifestaciones clínicas, y son producto de la compleja interacción entre factores ambientales, inmunológicos y neurológicos. Ya no se las considera enfermedades puramente desmielinizantes, sino que cada vez se le atribuye mayor importancia a la componente neurodegenerativa. Este cambio en la comunidad científica no sólo se debe al avance tecnológico, sino también a la falta de correlación, tanto en pacientes como en modelos animales, entre la desmielinización y la acumulación irreversible de discapacidad. Sin embargo, a pesar del gran número de trabajos que se publican cada año en esta área, el mecanismo de neurodegeneración^k aún no se conoce en detalle. Particularmente, en nuestro laboratorio se describió por primera vez que, en un modelo agudo de EAE, sinaptosomas corticales liberan menor cantidad del neurotransmisor excitatorio glutamato [95]. Esto también fue observado, posteriormente, en un modelo de EAE crónico por otro grupo de investigación [27]. Mientras que estructuras como el cerebelo, el estriado y el hipocampo han sido clásicamente estudiadas en los últimos años, las alteraciones y la participación de la corteza cerebral en el desarrollo de la EAE han sido pobremente exploradas. En pacientes con EM, cambios en la activación y en la conectividad de la corteza han sido relacionados con problemas motrices, fatiga mental y deterioro cognitivo general [44,46,49]. Por estas razones, el estudio de los mecanismos responsables de la disfunción neuronal en la corteza de animales con EAE no sólo sería novedoso sino que tendría relevancia para la comprensión del proceso patológico en humanos.

^k *La definición de neurodegeneración, incluye no sólo a la muerte neuronal y/o axonal, sino también a la degradación paulatina o el proceso de pérdida de las funciones y estructuras neuronales, que pueden o no ser reversibles [94].*

OBJETIVO GENERAL

Comprender los eventos bioquímicos que llevan a la disfunción neuronal en la corteza de animales con Encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) y su posible implicancia en la inducción de los síntomas clínicos y el desarrollo de la enfermedad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ∞ Analizar en detalle la liberación de glutamato y sus componentes en sinaptosomas corticales durante diferentes etapas clínicas de la EAE.
- ∞ Investigar las bases bioquímicas de las alteraciones en la liberación de glutamato:
 - Examinar las fosfatasas y quinasas involucradas en el proceso de liberación del neurotransmisor, con énfasis en cambios de fosforilación y redistribución subcelular de sinapsina I.
 - Caracterizar morfológicamente a los sinaptosomas de ratas con EAE y estudiar la movilización de vesículas sinápticas.
- ∞ Estudiar la posible correlación espacial y temporal entre eventos inflamatorios y las alteraciones presinápticas.

MATERIALES Y MÉTODOS



*Ten fe ciega no en tu capacidad para el triunfo,
sino en el ardor.*

Horacio Quiroga.

MATERIALES

REACTIVOS

Adyuvante de Freund completo (AFC), albúmina sérica bovina (ABS), enzima deshidrogenasa de glutamato (GDH), NADP⁺, ácido L-glutámico y 4-aminopiridina (4-AP) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Co. LLC (St. Louis, MO, USA). Percoll fue obtenido de GE Healthcare (General Electric Company, Fairfield, CT, USA). TRIzol Reagent, DNAsa I y SYBR green PCR master mix se adquirieron en Invitrogen (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Inhibidor de RNAsas recombinante (RNasin) y enzima transcriptasa reversa M-MLV se compraron en Promega (Madison, WI, USA). Cuando fue necesario, la concentración de proteínas de las muestras fue determinada mediante el método de Bradford utilizando un reactivo comercial (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). El resto de reactivos utilizados fueron de calidad analítica, de la mayor pureza disponible.

MIELINA BOVINA

La mielina total se obtuvo a partir de médula espinal bovina fresca siguiendo el protocolo de purificación de Haley y cols. [96], el cual consiste en tres ciclos de ultracentrifugación (75.000 x g) en un gradiente discontinuo de sacarosa (0,8 y 0,32 M), alternados con lisis osmótica en agua bidestilada y deionizada. La fracción de membranas de mielina resultante fue liofilizada durante 24-48 h y almacenada a -20 °C.

ANIMALES

Se utilizaron ratas de una cepa originalmente Wistar endocriada en el Bioterio del Departamento de Química Biológica-CIQUIBIC de la Facultad de Ciencias Químicas por más de 40 años. Los animales fueron mantenidos en condiciones estándares de luz y temperatura, y fueron tratados de acuerdo a las regulaciones de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto nacional de salud (NIH) de los Estados Unidos. El Comité para el uso y cuidado de animales de la Facultad de Ciencias Químicas aprobó todos los procedimientos experimentales utilizados (exp. No. 15-99-40426), los cuales fueron diseñados de manera de minimizar el sufrimiento y el número de los animales usados.

ANTICUERPOS

ANTICUERPOS PRIMARIOS						
Proteína que reconoce	Abreviatura	Peso molecular	Hecho en:	Dilución		Número de catálogo
				WB	IFHQ	
Sinaptofisina	Syp	38 KDa	Conejo	1/1000	1/200	A 0010
Quinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2	Erk1/2	44/42 KDa	Ratón	1/500		#9102
Fosfo-quinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2	p-Erk1/2	44/42 KDa	Conejo	1/1000		#9101
β III-Tubulina	NST	55 KDa	Ratón	1/2500	1/500	MMS-435P
Quinasa dependiente de Ca^{2+} -Calmodulina II α / β	CaMKII α / β	50/60 KDa	Conejo	1/1000		#4436
Fosfo-quinasa dependiente de Ca^{2+} -Calmodulina II α	p-CaMKII α	50 KDa	Conejo	1/1000		#3361
Transportador vesicular de glutamato 1	VGLUT1	Banda gruesa 55-60 KDa	Conejo	1/2000	1/500	135302
Decarboxilasa de glutamato 65/67	GAD 65/67	65/67 KDa	Conejo	1/1000	1/500	AB1511
Transportador vesicular de GABA	VGAT	57 KDa	Conejo	1/2000	1/500	131002
Sinapsina I	Syn1	~80 KDa (banda doble)	Ratón	1/1000	1/500	SM3651
Fosfo-Sinapsina I sitio 3 (Ser 603)	p-Syn1 s3	80 KDa	Conejo	1/2000		—
Fosfo-sinapsina I sitios 4/5 (Ser 62/67)	p-Syn1 s4/5	80 KDa	Conejo	1/2000		p1560-6267
Quinasa de proteínas C clásica	cPKC	82 KDa	Conejo	1/500		ADI-KAP-PK003
Fosfo-quinasa de proteínas C α / β II	p-PKC α / β II	82 KDa	Conejo	1/2000		#9375
α -Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa	NKA	112 KDa	Ratón	1/2000		A276
Molécula adaptadora unidora de calcio ionizado	Iba1	17 KDa	Cabra	1/100	1/500	ab107159
Proteína ácido fibrilar glial	GFAP	~50 KDa	Conejo	1/500	1/250	G9269
Receptor metabótrico de glutamato 4	mGluR4	100 KDa	Cobayo	1/1000		—
Receptor metabótrico de glutamato 8 α	mGluR8 α	101 KDa	Cobayo	1/1000		—

ANTICUERPOS SECUNDARIOS						
Especie que reconoce	Unido a:	Aplicación	Dilución	Fabricante	Número de catálogo	
Ratón	IRDye®800CW (fluorescente en el infrarrojo - verde)	WB (Odyssey®)	1/20000	LI-COR Biosciences (Lincoln, NE, USA)	926-32210	
Conejo	IRDye®800CW (fluorescente en el infrarrojo - verde)	WB (Odyssey®)	1/20000	LI-COR Biosciences (Lincoln, NE, USA)	926-32211	
Conejo	IRDye®680RD (fluorescente en el infrarrojo - rojo)	WB (Odyssey®)	1/20000	LI-COR Biosciences (Lincoln, NE, USA)	926-68071	
Estreptavidina	IRDye®800CW (fluorescente en el infrarrojo - verde)	WB (Odyssey®)	1/20000	LI-COR Biosciences (Lincoln, NE, USA)	926-32230	
Cobayo	Biotina	WB	1/5000	Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA)	106-065-003	
Ratón	Alexa 488 (fluorescente - verde)	IF	1/1000	Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA)	715-545-150	
Conejo	Cy3 (fluorescente - rojo)	IF	1/500	Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA)	111-165-144	
Cabra	Alexa 546 (fluorescente - rojo)	IF	1/1000	Molecular Probes® (Life Technologies)	A-11056	

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en la presente tesis de doctorado.

MÉTODOS

INDUCCIÓN ACTIVA DE LA EAE

Ratas de 40-45 días de edad, de ambos sexos, fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal (ip) de una mezcla de ketamina:xilazina 3:1 (100 μ L cada 100 g de peso corporal). Posteriormente fueron inyectadas intradérmicamente en las almohadillas de grasa de ambas patas traseras con 0,5 mL de una emulsión constituida por 8 mg de mielina bovina homogeneizada en 0,25 mL de AFC y 0,25 mL de solución tampón de fosfato salino (PBS; grupo EAE). Los animales controles recibieron 0,5 mL de la misma emulsión sin preparado antigénico (grupo AFC).

A fin de seguir el curso clínico de la patología los animales fueron pesados y examinados diariamente. La severidad de los signos clínicos fue graduada de acuerdo a la siguiente escala: 0- similar al control; 1- flacidez de la cola, dificultad para recuperar la posición normal; 2- ataxia moderada, parálisis de las extremidades posteriores; 3- ataxia severa, parálisis completa de las extremidades posteriores e incontinencia urinaria; 4- cuadriplejía severa; 5- estado moribundo o muerte.

PERFUSIÓN E HISTOLOGÍA

El día de aparición de los signos clínicos, 2 animales de cada grupo experimental (EAE y AFC) fueron anestesiados con una mezcla de ketamina:xilazina 3:1 (200 μ L cada 100 g de peso corporal). Con el fin de fijar el tejido cerebral se realizó una perfusión utilizando una bomba peristáltica P-3 (código 19-0626-01, Pharmacia, Estocolmo, Suecia), con mangueras de goma de 2 mm de diámetro interno (1 mm de espesor) y agujas de puntas romas de 21 G. La misma se realizó a través del ventrículo cardíaco izquierdo, previa oclusión de la aorta descendente de forma tal de sólo fijar el cerebro. Primeramente se lavó la sangre con solución tampón de fosfato 0,1 M (PB; 0,016 M NaH_2PO_4 , 0,084 M Na_2HPO_4) a 4 °C y a 1.000 mL/h por 10 min. A continuación se fijó el tejido con paraformaldehído (PFA) 4 % en PB a a 4 °C y a 600 mL/h por 30 min. Cerebro, cerebelo y tronco encefálico fueron extraídos de la cavidad craneal e incubados en PFA 4 % en PB a 4 °C por 24 h. Para crioprotección, los tejidos fueron pasados a soluciones de sacarosa de concentración creciente (15 % y 30 % en agua bidestilada y deionizada) hasta que decantaran al fondo del recipiente.

te. Finalmente, fueron embebidos en medio de montaje Cryoplast® (Biopack, Buenos Aires, Argentina) y conservados a -80 °C. Secciones sagitales de 20 µm de espesor fueron cortadas con criostato y adheridas a portaobjetos de vidrio previamente silanizados. De esta forma se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

I. Azul de Toluidina

Esta tinción se utilizó para analizar la apariencia e integridad del tejido. Se empleó una solución de azul de toluidina 0,25 % en tampón ácido (ácido acético 0,088 M, acetato de sodio 0,012 M). Los criocortes, previamente secados durante toda la noche a 37 °C, se colorearon por 30 s sumergidos en azul de toluidina, y luego se lavaron con agua destilada. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente y se montaron con líquido de montaje similar bálsamo de Canadá.

II. Azul de Luxol Rápido

Esta es una tinción clásica para marcar mielina en el SNC. Se secaron los criocortes toda la noche a 37 °C y se lavaron 2 veces por 5 min en PBS. Posteriormente se incubaron en la solución de azul de luxol rápido (azul de luxol rápido 1,0 %, etanol 95 %, ácido acético 0,5 %) toda la noche, en oscuridad, a 60 °C. El día siguiente, se enjuagaron las muestras con alcohol 95 % y agua destilada. Luego se realizó el siguiente procedimiento: incubación en Li_2CO_3 0,05 % por 30 s, dos cambios de etanol 70 % por 30 s, y lavado en agua destilada por 1 min. Este ciclo se repitió varias veces hasta observar contraste de color azul-celeste entre la MB y la MG. Finalmente, se deshidrataron los cortes en soluciones de concentración creciente de etanol (70 %, 95 % y 100 %, durante 30 s cada una) y se montaron con líquido de montaje similar bálsamo de Canadá.

Los tejidos teñidos con azul de toluidina o con azul de luxol rápido fueron observados y fotografiados utilizando un microscopio Axioplan (Carl Zeiss) equipado con objetivos 20x y 40x (de aire) y una cámara Olympus XM10.

III. Inmunohistoquímica

Los criocortes fueron secados durante toda la noche a 37 °C y se lavaron en PBS 3 veces por 10 min cada una. Luego los tejidos se permeabilizaron durante 15 min a temperatura ambiente con Tritón X-100 0,2 % en PBS, y se bloquearon con SFB 4 % (preparado en la solución de permeabilización) por 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se agregaron los anticuerpos primarios (preparados en solución de bloqueo, ver diluciones en

Tabla 1) y se incubaron toda la noche a 4 °C (todo el procedimiento debe realizarse en cámara húmeda). Al día siguiente se lavaron los cortes con PBS 3 veces por 10 min cada una y se marcaron con los anticuerpos secundarios (preparados en PBS, ver diluciones en Tabla 2) durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se incubó con una solución de DAPI por 5 min a temperatura ambiente, se realizaron tres lavados de 10 min y se montó utilizando Mowiol. Los tejidos fueron fotografiados utilizando un microscopio confocal Olympus Fluoview 1000, objetivos 20x y 60x (de inmersión), y se analizaron con el programa ImageJ (NIH). Las áreas a fotografiar se seleccionaron mediante la coloración con Dapi.

FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

I. Obtención de sinaptosomas

Los sinaptosomas fueron purificados según la técnica descrita por Dunkley y cols. [97], puesta a punto en nuestro laboratorio por Vilcaes y cols. [95]. Los animales fueron sacrificados por decapitación y cerebro y cerebelo fueron extraídos. El cerebro fue disecado y se extrajo la corteza frontal, la cual incluye a las cortezas motriz y prefrontal (ver detalles y coordenadas del corte referidas al atlas en el Anexo I).

Los tejidos fueron homogeneizados individualmente en 10 mL de solución del gradiente (GB; sacarosa 0,32 M, EDTA 1 mM, DTT 1,25 mM, pH=7,3-7,4) y centrifugados a 3.000 x *g* por 5 min a 4 °C. El sobrenadante resultante se colocó sobre un gradiente discontinuo compuesto de fases de Percoll 3 %, 10 % y 23 % (preparado en GB, pH=7,3-7,4), y fue centrifugado a 32.500 x *g* durante 5 min a 4 °C. De esta forma los restos membranosos y la mielina son retenidos en la interfase entre el Percoll 3 % y el 10 %, los sinaptosomas se acumulan en la interfase formada entre el Percoll 10 % y el 23 %, y las mitocondrias sedimentan a la base del tubo. Los sinaptosomas son extraídos (2 mL aproximadamente), re-suspendidos en 20 mL de solución tampón de HEPES (HBM; NaCl 140 mM, KCl 5 mM, NaHCO₃ 5 mM, Na₂HPO₄ 1,2 mM, D-Glucosa 10 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM, pH=7,4), y centrifugados a 27.000 x *g* por 10 min a 4 °C. El sedimento resultante fue resuspendido suavemente en 2 mL de HBM y conservado a 4 °C hasta su uso. En estas condiciones, los sinaptosomas conservan su funcionalidad durante unas 4-5 h.

II. Obtención de vesículas sinápticas y membrana sinaptosomal

El protocolo de obtención de vesículas sinápticas fue diseñado en base al de Hutter y cols. [98] (ver control de identidad y contaminación de las diferentes fracciones subcelulares en la Fig. 6). Los sinaptosomas fueron sometidos a un choque osmótico mediante dilución 1:9 con agua bidestilada y deionizada, y homogeneizados vigorosamente durante 2 min. A esto se le adicionaron 100 μ L de HEPES/NaOH 1 M pH=7,4 y se incubó a 4 °C durante 30 min, tras lo cual se centrifugó a 25.000 x g por 20 min a 4 °C. El sedimento resultante corresponde a la fracción de membranas sinaptosomales (principalmente plasmática). El sobrenadante volvió a centrifugarse, a 200.000 x g durante 1 h 30 min a 4 °C. La fracción de vesículas sinápticas aparece como un sedimento muy pequeño, difuso y transparente cerca de la base del tubo.

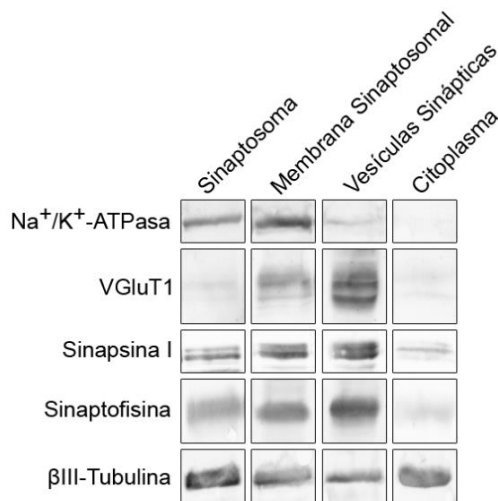
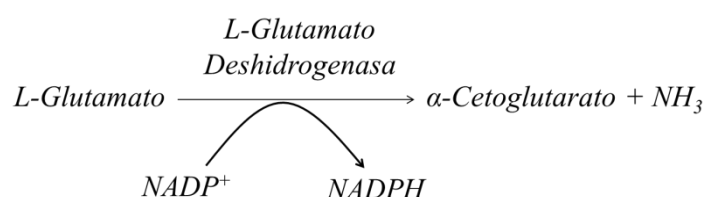


Figura 6. Revelado por Western blot de marcadores específicos en las diferentes fracciones subcelulares. Na^+/K^+ -ATPasa se utilizó como marcador de membrana plasmática. VGluT1 como marcador de vesículas sinápticas (recordar que la fracción de membrana sinaptosomal incluye vesículas ancladas). Observar los bajos niveles de Sinapsina I en el citoplasma sinaptosomal. Tubulina muestra una distribución ubicua, validando su uso como control de siembra. En la calle de Sinaptosoma se sembró la mitad de muestra (medidos como μg de proteína) que en el resto de calles.

ENSAYO DE LIBERACIÓN DE GLUTAMATO

El seguimiento del glutamato liberado por los sinaptosomas se realizó en base a la metodología descrita por Nicholls y Sihra [99], y posteriormente puesta a punto en nuestro laboratorio por Vilcaes y cols. [95]. La misma consiste en medir el glutamato de manera indirecta acoplándolo a la siguiente reacción:



Ya que NADPH es una molécula fluorescente, esto permite seguir en tiempo real la liberación de glutamato, excitando la muestra a 340 nm y midiendo la emisión a 455 nm (ancho de rendijas de 5 y 3 mm respectivamente).

Las muestras de sinaptosomas fueron diluidas en HBM a una concentración final de 300 mg de proteínas cada 1 mL y trasvasadas a una cubeta de cuarzo a 37 °C con agitación continua en un espectrofluorómetro FluoroMax-P (HORIBA Jobin Yvon, Kyoto, Japón). Luego de 2 min, se agregaron NADP^+ 1mM y CaCl_2 1,2 mM o CdCl_2 10 μM , y se incubó durante otros 3 min. Luego se adicionó la enzima GDH, 50 μmL , y se esperó hasta que el glutamato extrasinaptosomal fuera consumido por completo (aproximadamente 5 min, ver Fig. 7). Para despolarizar los sinaptosomas e inducir la liberación de neurotransmisor se utilizó 4-AP 3 mM, una droga que bloquea canales de potasio dependientes de voltaje de la familia Kv1 generando una estimulación repetitiva que simula a la excitación fisiológica [100]. La liberación de glutamato se siguió indirectamente mediante el registro de la fluorescencia de NADPH cada 1 s durante 8-10 min, tiempo en el cual la cantidad de glutamato liberado alcanza una meseta. En ese momento, se adicionaron como patrón interno 4 nmol de L-glutamato, cuyo cambio de fluorescencia se utilizó para transformar la intensidad de emisión en nmol de glutamato liberados por mg de proteína sinaptosomal (Fig. 7).

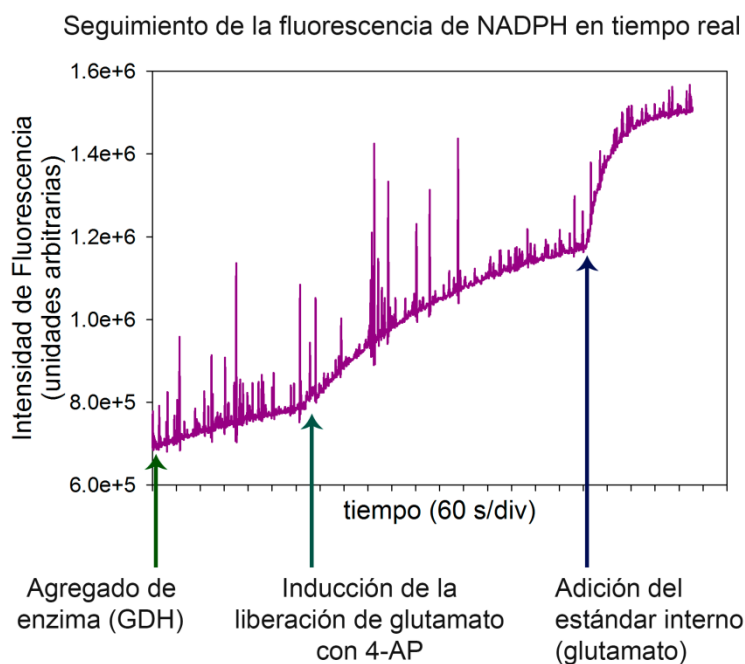


Figura 7. Seguimiento en tiempo real de la fluorescencia de NADPH en sinaptosomas de cerebro de ratas Wistar normales. Luego de que la GDH ha consumido todo el glutamato extrasinaptosomal, se despolariza con 4-AP. La cantidad de glutamato liberado se cuantifica a través de la señal del patrón interno (previamente se comprobó la linealidad de esta relación en el rango de concentraciones estudiados).

CUANTIFICACIÓN DEL GLUTAMATO TOTAL INTRASINAPTOSOMAL

Una alícuota de 150 μg de proteína de las muestras empleadas para el ensayo de liberación de glutamato fue centrifugada a $10.000 \times g$ por 5 min a 4°C y el sedimento fue sometido a un choque osmótico y disolución de membranas por resuspensión vigorosa en agua bidestilada y deionizada con Tritón X-100 0,5 %. Luego de una incubación a 4°C durante 1 h, se centrifugó a $100.000 \times g$ por 30 min a 4°C y se diluyó al sobrenadante 10 veces con HBM. Para medir la concentración de glutamato, se les agregó a las muestras NADP^+ 1 mM y GDH 50 u/mL y se incubaron a 37°C durante 20 min, midiéndose la emisión de fluorescencia a tiempo final (integrando la señal 20 s). La curva de calibración se realizó con muestras de L-glutamato de diferente concentración, preparadas en HBM y sometidas a la misma catálisis enzimática que las muestras.

INMUNOFLUORESCENCIA DE SINAPTOSOMAS

La técnica fue desarrollada en base a la descrita por Millán y cols. [101], quienes gentilmente nos enviaron el protocolo detallado, el cual luego fue modificado para adaptarlo a nuestro sistema experimental.

Una suspensión de sinaptosomas en HBM de concentración 1 mg de proteína cada 1,5 mL fue incubada a 37°C durante 15 min y disgregada suavemente con pipeta automática. 80 μL de esta suspensión se colocaron sobre cubreobjetos (redondos, 12 mm de diámetro) previamente poli-lisinados y se incubaron durante 45 min a temperatura ambiente para permitir su adhesión a la superficie. Luego los sinaptosomas se fijaron durante 5 min con PFA 4 % en PBS (pH=7,4) y se pretrataron por 15 min con Tritón X-100 0,1 % y Glicina 1 M en PBS (pH=7,4), para permeabilizar las membranas y disminuir la fluorescencia intrínseca, respectivamente. Los anticuerpos primarios fueron preparados en PBS con ASB 1 % y Tritón X-100 0,1 % (ver diluciones en Tabla 1), e incubados toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Luego de lavar, los anticuerpos secundarios se agregaron (ver Tabla 2), en la misma solución tampón de los primarios, y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, en cámara húmeda. El montado se realizó con FluorSave™ (Calbiochem, EMD Biosciences, La Jolla, CA, USA) y los sinaptosomas fueron observados con un microscopio FV300 (Olympus, Tokyo, Japan) con un objetivo 60x y 2x de aumento. Para el análisis de la colocalización, se utilizó el programa ImageJ (NIH). Las imágenes fueron binarizadas y los

canales rojo y verde se multiplicaron, la cantidad de partículas en la imagen resultante corresponden a los sinaptosomas con colocación de ambas marcaciones. Se contó el número de partículas circulares con diámetro entre 0,5 y 1,5 μm .

ENSAYO DE FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS

El procedimiento fue diseñado en base al descrito anteriormente por Vilcaes y cols. [95], con leves modificaciones. Distintas alícuotas de 150 μg de sinaptosomas fueron resuspendidas en 500 μL de HBM e incubadas a 37 °C por 2 min. Luego se agregó CaCl_2 1,2 mM por otros 3 min (esta será la condición basal o tiempo 0 min), tras los cuales se añadió 4-AP 3 mM. En cada alícuota se frenó la reacción a diferentes tiempos mediante la centrifugación en frío a 10.000 x g por 30 s seguida rápidamente de vigorosa resuspensión del sedimento en solución de muestra (SB; SDS 3 %, glicerol 10 %, Tris-HCl 0,067 mM, β -ME 5%, azul de bromofenol, en agua bidestilada y deionizada) con inhibidores de fosfatasa (NaF 10 mM, Na_3VO_4 1 mM, glicerofosfato 1 mM). Finalmente, las muestras se calentaron a 100 °C por 5 min, se centrifugaron 1 min para decantar posibles agregados, y se sembraron en geles de poli-acrilamida para analizar los niveles de proteínas totales y fosforiladas. En otros casos, la despolarización de los sinaptosomas fue frenada por centrifugación seguida de resuspensión en agua bidestilada y deionizada con NaF 1 mM (choque osmótico), y se continuó con el protocolo de purificación de vesículas sinápticas descrito anteriormente.

ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOT

Cantidades iguales de proteínas fueron separadas por SDS-PAGE [102]. Resumidamente, se utilizaron geles de poli-acrilamida al 10 % y de 1 mm de espesor, y la corrida electroforética se realizó a voltaje creciente, desde 120 V a 180 V. Luego, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (poro de 0,45 μm) durante 60 min a 350 mA. Para realizar el western blot, las membranas fueron bloqueadas con ABS 4 % en solución tampón de Tris salino con Tween20 (TBS-T; Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, Tween20 0,1 %, pH=7,6). La incubación de los anticuerpos primarios (ver diluciones en la Tabla 1) se realizó en TBS-T con ABS 1 %, toda la noche en agitación a 4 °C. Los anticuerpos secundarios unidos a una molécula fluorescente (ver Tabla 1) se diluyeron en TBS-T y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente en agitación. Luego de varios lavados, las

membranas fueron escaneadas con el equipo Odyssey Infrared Imager (LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA) y las imágenes fueron analizadas utilizando el programa GelAnalyzer2010a (Lazer software). Las membranas fueron reutilizadas hasta tres veces, permitiendo la detección de diferentes proteínas y de sus formas total y fosforilada en el mismo experimento. Para ello, se realizó un tratamiento que desnuda a la membrana de todas las proteínas asociadas a ella y que consiste en incubación en una solución de NaOH 2 M durante 5 min a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, se repitió el protocolo de Western blot desde el paso de bloqueo en adelante. En todos los casos, se marcó la proteína fosforilada en primera instancia y la proteína total en un segundo paso.

El grado de fosforilación de las diferentes proteínas analizadas se relativizó a la intensidad de fluorescencia de la proteína total correspondiente. Las proteínas totales se normalizaron a la señal de β III-tubulina (ésta última utilizada como un control de siembra). Todos los resultados se expresan como % con respecto al control (es decir, el grupo AFC en condiciones basales), el cual fue medido por duplicado y de manera independiente para cada experimento.

La cantidad de muestra (en μ g de proteínas) y la concentración de los anticuerpos primarios empleados para los experimentos de Western blot se estandarizaron mediante curvas de cambio de intensidad de marcación en función de cambios de concentración de ambas variables. De este modo se aseguró que los experimentos se realizaran en condiciones donde la intensidad de marcación variara linealmente con la concentración de la proteína de interés, validando su cuantificación.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La técnica fue realizada en colaboración con la Dra. Ana Lucía De Paul, del Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, INICSA (CONICET).

Los sinaptosomas fueron resuspendidos en HBM e incubados a 37 °C por 5 min, con la adición de CaCl₂ 1,2 mM los últimos 3 min (ésta es la condición basal). A continuación, se agregó 4-AP 3 mM y las muestras fueron mezcladas por inversión suavemente durante 3 s (ésta es la condición estimulada). La reacción fue frenada por dilución con solución de cacodilato de sodio 0,1 M y centrifugación a 200 x g a 4 °C por 3 min. Los sinaptosomas sedimentados se lavaron dos veces con la solución de cacodilato de sodio (sin resuspender

para evitar ruptura de membranas) y luego se fijaron toda la noche en una mezcla de formaldehído 4 % y glutaraldehído 2 % en cacodilato de sodio 0,1 M. Las muestras se trataron con OsO₄ 1 % durante 1 h y se tiñeron en bloque con acetato de uranilo 1 % en solución tampón de acetato 0,1 M (pH=5,2) por 20 min. Luego se deshidrataron con una serie de lavados en acetona fría de concentración creciente y se embebieron en resina epoxi (Araldite). Secciones finas (60 nm) se cortaron utilizando un ultramicrotomo JEOL JUM-7 (Nikon, Tokyo, Japón) con cuchilla de diamante. Las secciones fueron teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo, y examinadas usando un microscopio electrónico Zeiss Leo 906 E equipado con una cámara digital (Zeiss, Oberkochen, Alemania). 25-35 imágenes fueron analizadas por muestra de manera doble ciego, utilizando el programa ImageJ (NIH).

REAL TIME RT-PCR^L

I. Purificación del ARN

Dentro de las primeras 24 hs desde la aparición del primer signo clínico, animales de los grupos AFC y EAE fueron sacrificados rápidamente por decapitación y los cerebros fueron removidos. Se diseccionó la corteza frontal y se congeló instantáneamente en aire líquido. Las muestras se guardaron a -80 °C hasta su uso.

Los tejidos (50-100 mg) se pulverizaron en frío, se resuspendieron en 1 mL de TRIzol Reagent y se incubaron a temperatura ambiente por 5 min. El ARN se extrajo mediante el agregado de 0,2 mL de cloroformo de alta calidad y centrifugación a 13.800 x *g* a 4 °C por 15 min. 0,4 mL de la fase superior acuosa fueron incubados toda la noche a -20 °C con 1 mL de isopropanol de alta calidad, para permitir la precipitación del ARN. Este precipitado fue lavado dos veces con etanol 70% en frío y posteriormente se cuantificó el contenido de ARN mediante la medición de la absorbancia a 260 nm (se utilizó la relación Ab_{260nm}/Ab_{280nm} como medida del grado de pureza).

II. Transcripción reversa

1 µg de ARN se incubó a temperatura ambiente con la enzima DNAsa I (siguiendo las instrucciones del fabricante) para eliminar la posible contaminación con ADN genómico. Para sintetizar el ADN copia (o cDNA, por sus siglas en inglés), el producto del paso an-

^L Esta técnica es comúnmente conocida por su nombre en lengua inglesa, en español significa reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real tras transcripción reversa (RT).

terior se incubó con oligonucleótidos hexaméricos al azar, deoxinucleótidos y la enzima transcriptasa reversa M-MLV, en presencia de un inhibidor de RNAsas, en un volumen final de 25 μ L (siguiendo las especificaciones del fabricante). La transcripción reversa se realizó en el termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) en un solo ciclo como sigue: 6 min a 25 °C, 60 min a 37 °C, 18 min a 70 °C y 10 min a 4 °C.

El cDNA generado se llevó a un volumen final de 175 μ L con agua milliQ estéril y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

III. PCR en tiempo real

En cada tubo para PCR se mezclaron 6 μ L de cDNA, 0,375 μ L de cada solución madre 10 μ M de primer (su concentración final será de 250 nM, las secuencias de los iniciadores o primers se obtuvieron de trabajos previos de otros grupos [103-105], ver Tabla 2), 7,5 μ L de SYBR green PCR master mix y se llevó a un volumen final de 15 μ L con agua milliQ estéril. Se prepararon triplicados para cada muestra. La PCR en tiempo real se realizó en el termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, Venlo, Limburgo, Países Bajos) respetando el siguiente protocolo:

- Desnaturalización inicial: 10 min a 95 °C.
- Amplificación (45 ciclos): desnaturalización 15 s a 95 °C, hibridación 30 s a 60 °C y extensión 30 s a 70 °C.
- Para corroborar la presencia de un solo producto se realizó siempre una curva de desnaturalización del ADN cubriendo el rango de 50 a 95 °C.

<i>SECUENCIAS de los INCIADORES o PRIMERS para PCR</i>				
ARN mensajero	Número de acceso	Secuencias 5'→3'		Tamaño del amplicón
		Directo	Reverso	
S100B	NM_013191.1	GGGTCACCTGTAAGAATCAA	GAGGACAAGCAGTTGTAA	153 pb
GFAP	NM_017009.2	GACCGCTTTGCTAGCTACATCG	GGTTTCATCTTGGAGCTTCTGC	246 pb
IL-1 β	NW_047658	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG	GGGTTCATGGTGAAGTCAAC	79 pb
IL-1R1	NW_047814.1	GTTTTTGGAACACCCTTCAGCC	ACGAAGCAGATGAACGGATAGC	105 pb
IL-6	M26745	TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC	TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC	79 pb
TNF α	D00475	AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC	TCTGCTTGGTGGTTTGTACGAC	111 pb

Tabla 2. Secuencias de los primers empleados en la presente tesis de doctorado.

La semi-cuantificación se llevó a cabo mediante el método de $\Delta\Delta C_T$. Primeramente, se calculó la diferencia entre el valor de C_T^M del ARN mensajero amplificado de interés y el valor de C_T de un gen de expresión constitutiva (en nuestro caso, GAPDH). Luego, se calculó la diferencia entre el ΔC_T obtenido para cada muestra y el de una muestra control o referencia (en nuestro caso, el ΔC_T promedio del grupo AFC se empleó como control). El resultado del experimento se expresó como 2 elevado al $-\Delta\Delta C_T$.

Finalmente, cabe destacar que tanto la concentración empleada de cDNA como de los primers, el protocolo de PCR y el umbral para la determinación del C_T se establecieron experimentalmente mediante curvas de calibración (CT vs $\log[\text{Dilución}_{\text{cDNA}}]$). Las condiciones experimentales seleccionadas presentaron una eficiencia de PCR de $(100\pm 10)\%$ para todos los primers.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los datos experimentales se desarrolló usando el programa Prism 5 (GraphPad Software). Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. En aquéllos experimentos donde sólo hay una variable entre los grupos (por ejemplo, los niveles totales de proteína o de ARN mensajeros) se aplicó test t cuando había dos grupos experimentales y ANOVA de una vía cuando había tres grupos experimentales. Si este análisis revelaba efectos significativos ($p\leq 0,05$), se proseguía con una comparación por pares de los promedios (aplicando la prueba de Dunnett de comparaciones múltiples). Para los experimentos donde había más de dos variables entre los grupos (por ejemplo, diferentes tiempos de estimulación) se aplicó ANOVA de dos vías. En caso de encontrar diferencias significativas, se realizó un análisis posterior comparando todas las condiciones para cada variable (empleando la prueba de Bonferroni). En todos los casos, se consideró un $p\leq 0,05$ como una diferencia entre grupos estadísticamente significativa.

^M C_T es el ciclo umbral de la PCR, se define como el número de ciclos de PCR que son necesarios para obtener señal de fluorescencia positiva, es decir, una cantidad de producto por encima del nivel basal. Varía de manera inversa con la cantidad inicial de templado.

RESULTADOS



Nous ne voyons guère en somme que ce que nous sommes préparés à voir, ce que nous voulons et avons appris à voir; nous faisons abstraction de tout ce qui ne fait pas partie de nos préjugés.

Jean-Martin Charcot.

CARACTERIZACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LA CORTEZA FRONTAL DE RATAS CON EAE

LA REDUCCIÓN EN LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO APARECE CONJUNTAMENTE CON LOS SIGNOS CLÍNICOS

Con el fin de dilucidar la cronología de los cambios en los sinaptosomas de corteza frontal en relación al curso clínico de la EAE, se midió la liberación de glutamato, inducida por 4-AP, a diferentes dpi. Mientras en el grupo control (AFC) los valores de glutamato excitado fueron constantes a lo largo del tiempo (datos no mostrados), éstos variaron coincidentemente con el desarrollo de la patología en los animales con EAE. Los defectos en la liberación de glutamato no sólo se encontraron en la corteza frontal, sino también en otras áreas del SNC, como el estriado dorsal y el cerebelo, mostrando una cinética coincidente con el curso clínico de la EAE en todos los casos (ver Anexo II). En esta tesis, nos centraremos en el estudio de las alteraciones presinápticas en la región frontal de la corteza.

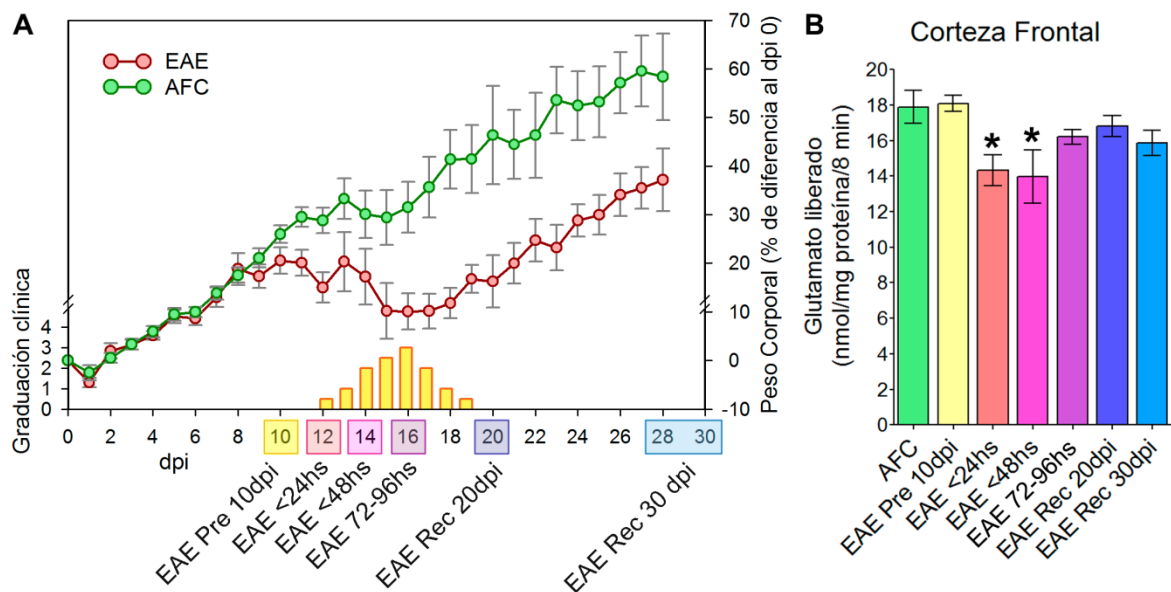


Figura 8. A. Cambio de peso corporal promedio y graduación clínica en función de los dpi (datos de 5 experimentos independientes, N=10 animales por grupo). Encuadrados en colores se muestran los dpi a los cuales se midió la liberación de glutamato. Se tomó un punto durante la fase inductora o preclínica de la patología (EAE Pre 10dpi), dos puntos durante la fase efectora (11-12 dpi o EAE <24hs; 12-14 dpi o EAE <48hs) y tres puntos durante la fase de recuperación (primeras horas de recuperación o EAE 72-96hs; recuperación moderada o EAE Rec 20dpi; recuperación completa o EAE Rec 30dpi).

B. Glutamato total liberado durante 8 min (relativizado a los mg de proteínas sinaptosomales) para los diferentes grupos (sinaptosomas purificados de corteza frontal, datos de 3 experimentos independientes, N=4-6 animales por grupo, * $p < 0,05$).

Como puede observarse en la Fig. 8B, el grupo EAE mostró una disminución en la cantidad de glutamato liberado, concomitantemente con la aparición de los signos clínicos (dentro de las primeras 24 hs de desarrollada la parálisis, representado como EAE<24hs). Este cambio se mantuvo durante aproximadamente 48 hs, tendiendo a valores similares al control cuando los animales comenzaban a recuperarse de la patología y manteniéndose en dichos niveles luego de la recuperación total. Atento a que en esta tesis la inducción de la EAE llevó a una incidencia del 100 %, con graduaciones y cursos clínicos homogéneos en cada experimento y entre experimentos independientes, se pudo analizar la liberación de glutamato en períodos pre-sintomáticos, encontrándose niveles equivalentes a los del grupo AFC (barra amarilla en la Fig. 8B). Esto indica que la aparición de las alteraciones presinápticas en neuronas glutamatérgicas ocurre concomitantemente con la manifestación de los signos clínicos clásicos de la EAE, siguiendo ambos procesos un curso temporal agudo concurrente.

Para la realización de los estudios subsiguientes, se eligieron 3 grupos experimentales de los nombrados en la figura 8: el grupo control negativo o AFC, el grupo de animales enfermos o EAE (correspondiente a EAE<24hs) y el grupo de ratas recuperadas completamente de los signos clínicos o EAE Rec (correspondiente a EAE Rec 30 dpi).

LA CINÉTICA DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO DEPENDIENTE DE CALCIO SE ENCUENTRA ALTERADA EN LA REGIÓN FRONTAL DE LA CORTEZA

Dado el alto número de recambio de la enzima GDH, la velocidad de aparición de glutamato en el ensayo de liberación (Fig. 7) depende de la rapidez con que este neurotransmisor es excitado. Esto permite obtener información cinética acerca del proceso de liberación. Como se observa en la Fig. 9B, y al igual que se mencionó anteriormente, la cantidad total de glutamato excitado por sinaptosomas del grupo EAE se encuentra disminuida aproximadamente un 25 %. Esto podría deberse a varias razones: un menor contenido de glutamato total en terminales del grupo EAE, una menor proporción de sinaptosomas glutamatérgicos en las preparaciones, fallas en las maquinaria de liberación, o una combinación de varios de estos factores. En cuanto a la primera opción, mediante lisis de los sinaptosomas se midió el glutamato total intraterminal y se encontraron cantidades

comparables en todos los grupos experimentales, descartando este factor como responsable de las alteraciones en la liberación (Fig. 9E).

Por otro lado, al analizarse la liberación de glutamato a tiempos cortos, se encontró que también la velocidad inicial de liberación es menor, es decir que ocurre más lentamente, en sinaptosomas de corteza frontal del grupo EAE (Fig. 9D). Junto con lo discutido en el párrafo anterior, esto indica que probablemente fallas en la maquinaria presináptica estén contribuyendo a los cambios observados. Por último, como se nombró anteriormente, las alteraciones en la liberación de glutamato se revierten en el grupo de animales recuperados completamente de los signos clínicos.

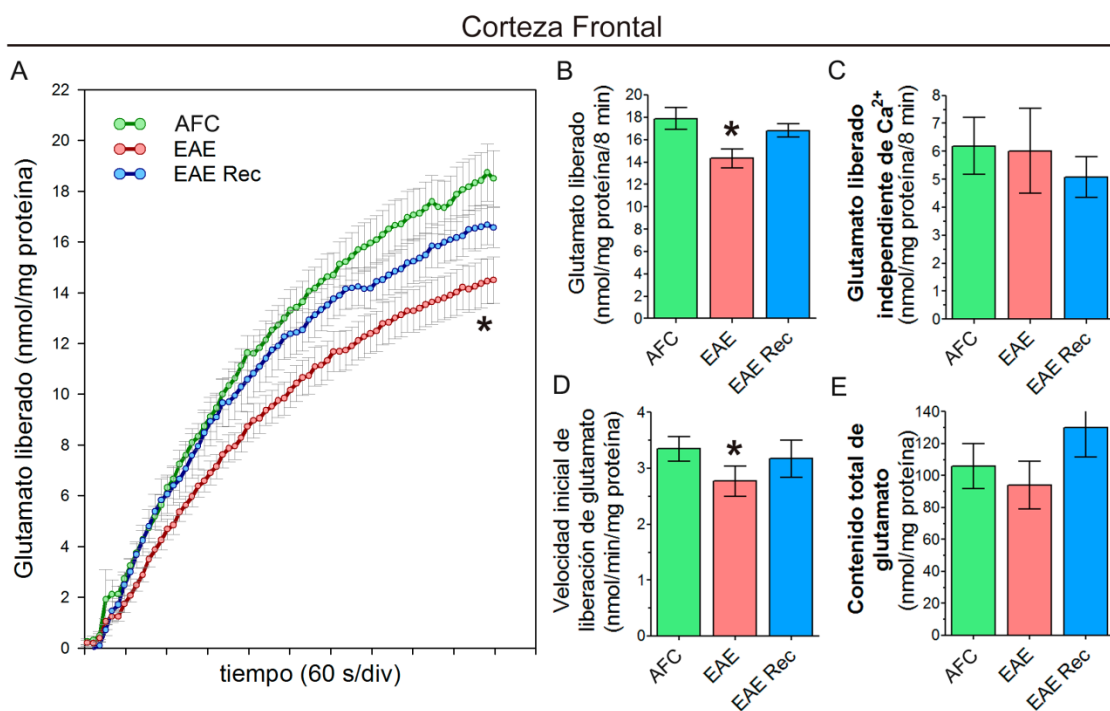


Figura 9. **A.** Cinética de la liberación de glutamato. **B.** Glutamato liberado durante 8 min ($F=3,498$). **C.** Liberación de glutamato independiente de $[Ca^{2+}]_i$ ($F=0,3308$). **D.** Velocidad de liberación a tiempos cortos ($F=2,078$). **E.** Contenido total de glutamato intrasinosomal ($F=1,169$). Sinaptosomas purificados de corteza frontal, datos de 5 experimentos independientes, $N=10$ animales por grupo ($*p<0,05$).

El glutamato liberado durante este tipo de ensayos proviene de dos fuentes: una liberación dependiente del aumento de $[Ca^{2+}]_i$ y que es producto de la fusión de las VSs; y una liberación independiente de $[Ca^{2+}]_i$ mediada por la acción reversa de transportadores de glutamato de membrana plasmática [106]. Para dilucidar si ambos tipos de liberación se encuentran afectados en la EAE o si, por el contrario, sólo uno de ellos es el responsable, se midió la liberación de glutamato, inducida con 4-AP, en ausencia de Ca^{2+} extracelular y

en presencia de CdCl_2 . El Cd^{2+} es un bloqueante de amplio espectro de CCAV. De esta forma se midió la liberación de glutamato independiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fig. 9C), encontrándose niveles similares en los tres grupos experimentales. Esto indica que solamente la liberación de glutamato dependiente del aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se encuentra afectada en la corteza frontal, durante la etapa aguda de la EAE.

Llamativamente, las alteraciones detalladas anteriormente no se observaron en sinaptosomas purificados del resto de la corteza. Es decir, las terminales nerviosas purificadas tanto del grupo AFC como de los grupos EAE y EAE Rec se comportaron de modo similar (Fig. 10). Esto podría indicar que los cambios estarían concentrados en la región frontal, aunque no podemos descartar que haya áreas afectadas en el resto de la corteza (ya que no realizamos subdivisiones de dicha región).

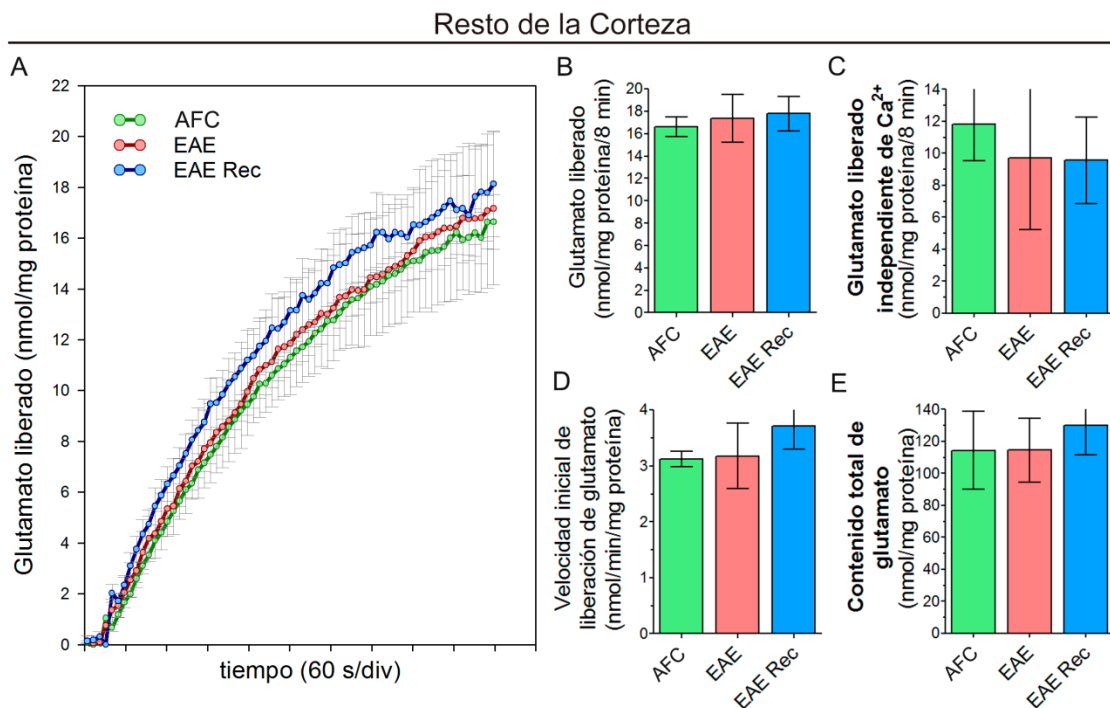


Figura 10. **A.** Cinética de la liberación de glutamato en sinaptosomas purificados del resto de la corteza cerebral. **B.** Glutamato liberado durante 8 min ($F=0,4336$). **C.** Liberación de glutamato independiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($F=0,1981$). **D.** Velocidad de liberación a tiempos cortos ($F=0,6046$). **E.** Contenido total de glutamato intrasynaptosomal ($F=1,169$). Datos de 3 experimentos independientes, $N=6$ animales por grupo.

Como se planteó en el primer párrafo de esta sección, una posible explicación para los defectos en la liberación de glutamato reside en la composición de los preparados. Existen evidencias de que la respuesta neuronal a la excitotoxicidad no es uniforme, sino que las neuronas GABAérgicas son resistentes mientras un alto porcentaje de las glutama-

térgicas degenera y muere [107]. En nuestro sistema experimental, esto implica que los preparados sinaptosomales del grupo EAE podrían contener un menor porcentaje de terminales glutamatérgicas. Para analizar esta hipótesis se tiñeron las terminales nerviosas por inmunofluorescencia y se observaron mediante microscopía confocal. Se empleó Syn1 como marcador específico de sinaptosomas, y para obtener qué proporción de ellos eran GABAérgicos o glutamatérgicos se examinó la colocación de las partículas con los marcadores GAD65/67 y VGLuT1^N, respectivamente. El resultado de la cuantificación se muestra en la Fig. 11 (imágenes representativas pueden observarse en las Figs. 12 y 13). En primer lugar, se encontró que el porcentaje de sinaptosomas GABAérgicos y glutamatérgicos es similar en la corteza frontal y en el resto de la corteza ($\approx 10\%$ y $\approx 80\%$, respectivamente), siendo además comparable con lo mostrado previamente por otros investigadores para sinaptosomas corticales de ratas Wistar [101]. En segundo lugar, no hubo diferencias entre los grupos experimentales, indicando que no habría una pérdida, al menos significativa, de terminales glutamatérgicas en la corteza cerebral durante la EAE.

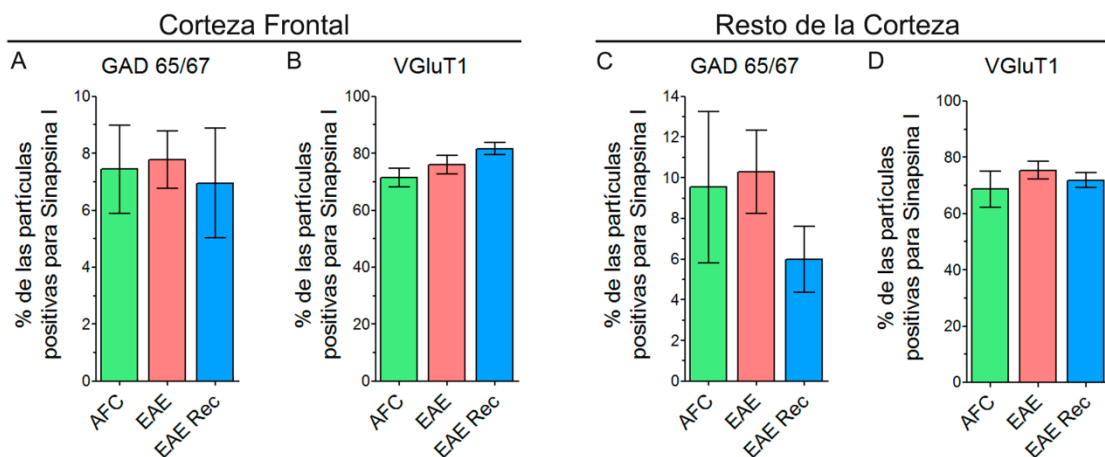


Figura 11. Caracterización de las preparaciones sinaptosomales mediante inmunofluorescencia. Syn1 se usó para identificar el total de los sinaptosomas. Las partículas mostrando colocación entre de Syn1 con GAD65/67 o VGLuT1 fueron definidas como GABAérgicas o glutamatérgicas, respectivamente. **A.** Porcentaje de sinaptosomas GABAérgicos en la corteza frontal ($F=0,2010$). **B.** Porcentaje de sinaptosomas glutamatérgicos en la corteza frontal ($F=1,238$). **C.** Porcentaje de sinaptosomas GABAérgicos en el resto de la corteza cerebral ($F=0,8537$). **D.** Porcentaje de sinaptosomas glutamatérgicos en el resto de la corteza cerebral ($F=1,461$). Datos de 5 experimentos independientes, $N=5$ ratas por grupo (se analizaron 10 imágenes por muestra).

^N Estas proteínas son ampliamente utilizadas como marcadoras del tipo de neurotransmisor que libera una terminal nerviosa. GAD es la enzima glutamato decarboxilasa, tiene dos isoformas de 65 y 67 KDa, y es la única encargada de la síntesis de GABA. Esta enzima se asocia al transportador vesicular de GABA (VGAT) en las VSs asegurando el correcto cargado de las vesículas. Además, tiene otras funciones en condiciones fisiológicas y en patologías, ver [108]. Por otro lado, VGLuT es el transportador vesicular de glutamato, tiene tres isoformas denominadas 1, 2 y 3, y transportan glutamato hacia el interior de las VSs utilizando el gradiente electroquímico (principalmente de H^+). Su expresión es regulada durante el desarrollo del SNC y participan en la modulación de la neurotransmisión, ver [109].

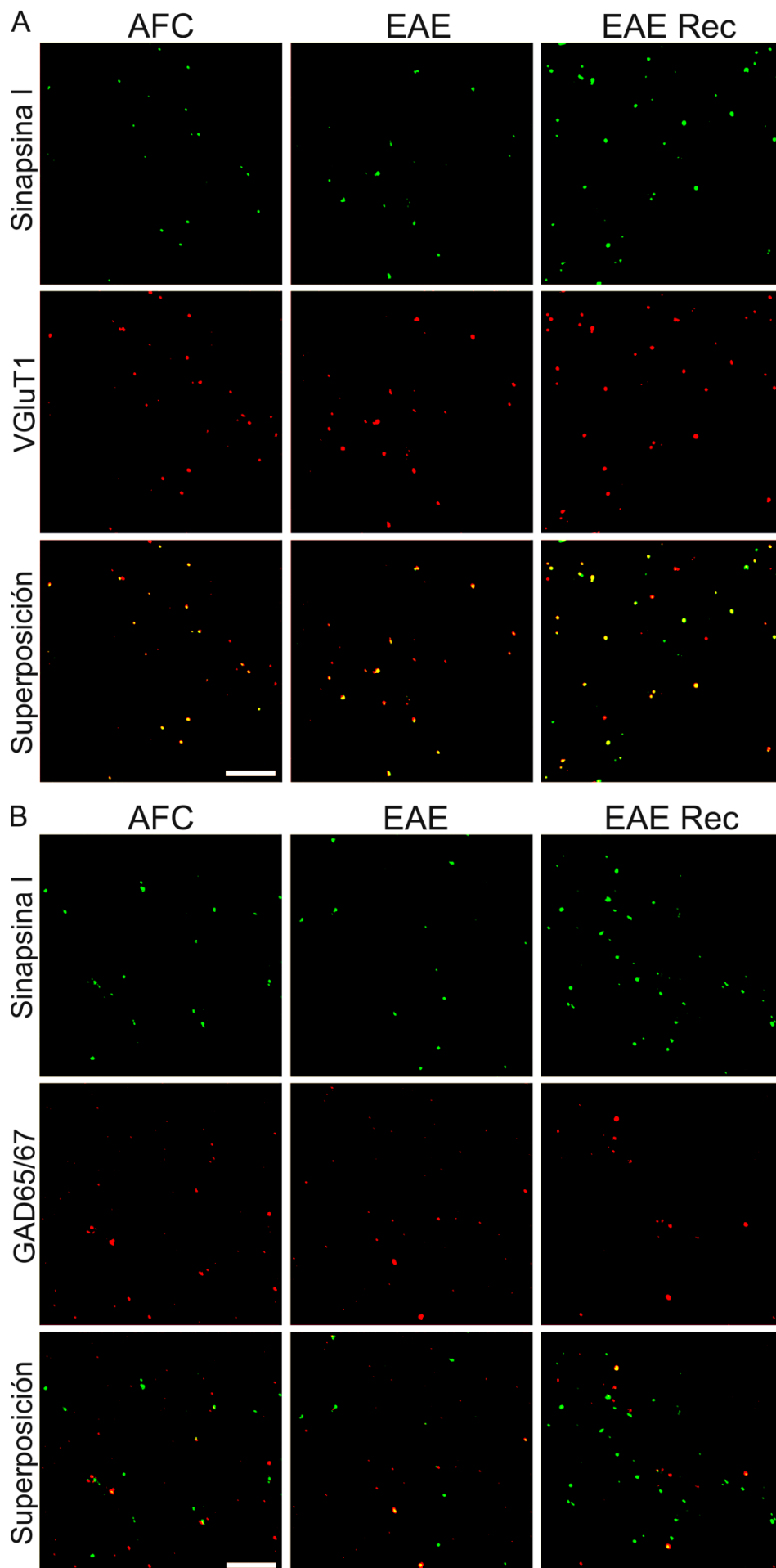


Figura 12. Imágenes representativas de inmunofluorescencia (magnificación 60x, confocal) de sinaptosomas purificados de la corteza frontal. **A.** Colocalización entre Syn1 y VGlut1 (marcador de terminales glutamatérgicas). **B.** Colocalización entre Syn1 y GAD65/67 (marcador de terminales GABAérgicas).

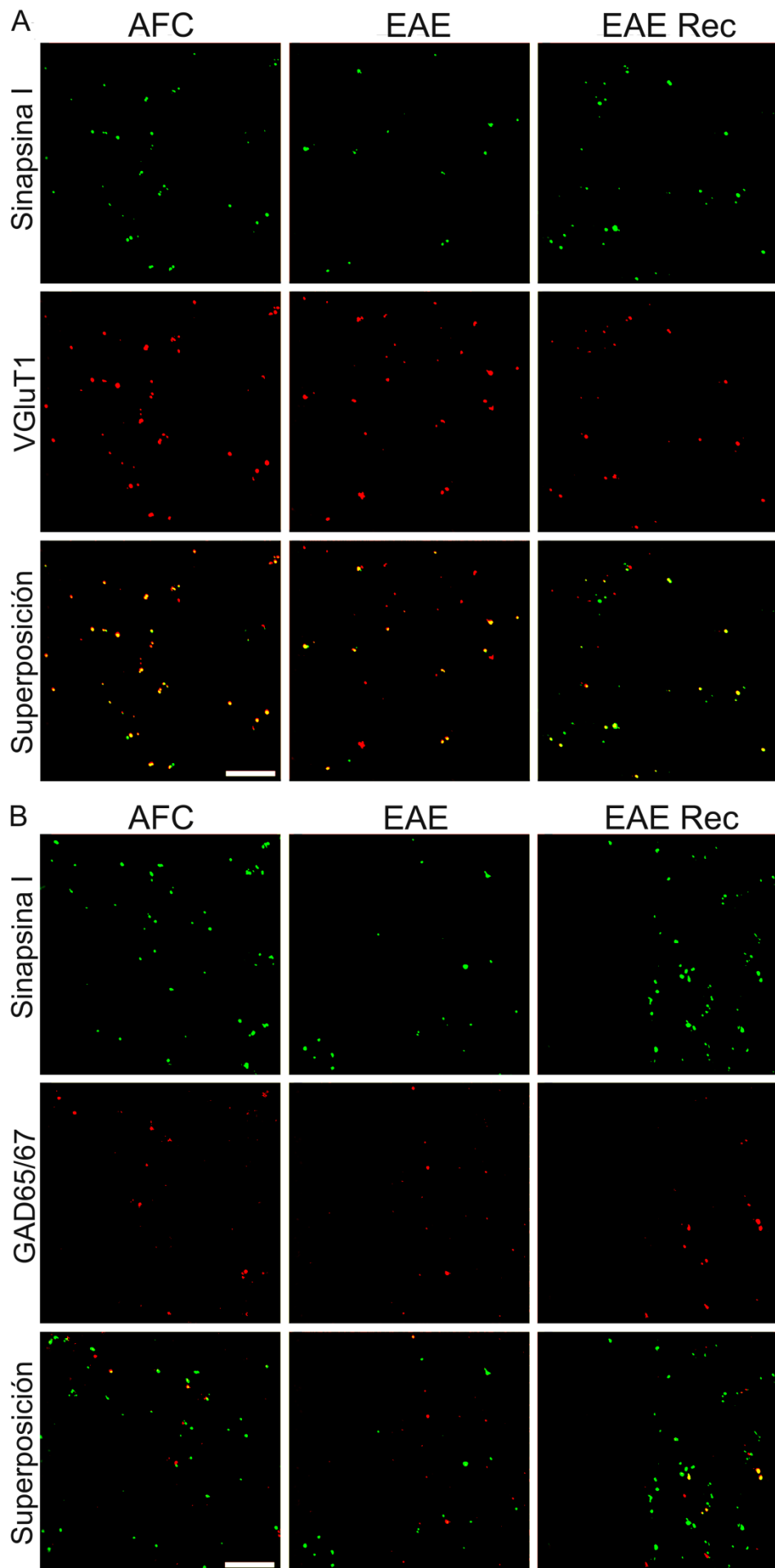


Figura 13. Imágenes representativas de inmunofluorescencia (magnificación 60x, confocal) de sinaptosomas purificados del resto de la corteza cerebral. **A.** Colocalización entre Syn1 y VGlut1 (marcador de terminales glutamatérgicas). **B.** Colocalización entre Syn1 y GAD65/67 (marcador de terminales GABAérgicas).

Las proteínas VGLuT1, VGAT y GAD 65/67 también fueron analizadas mediante WB, para determinar sus niveles totales en los sinaptosomas. A pesar de observarse una leve tendencia a aumentar de los marcadores GABAérgicos VGAT y GAD 65/67, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos experimentales. Junto con lo observado en la cuantificación por fluorescencia del glutamato total intrasinaptosomal (ver Fig. 9E), estos resultados indican que la producción y almacenamiento en VSs de los neurotransmisores mayoritarios en la corteza frontal (GABA y glutamato) no estarían afectadas de manera considerable durante la EAE.

Los niveles totales de sinaptofisina, una proteína intrínseca de la membrana de las VSs que se utiliza como marcador específico, también fueron similares en todos los grupos (Fig. 14A, no se muestra la cuantificación). Esto sugeriría que el número de VSs sería similar en los tres grupos experimentales.

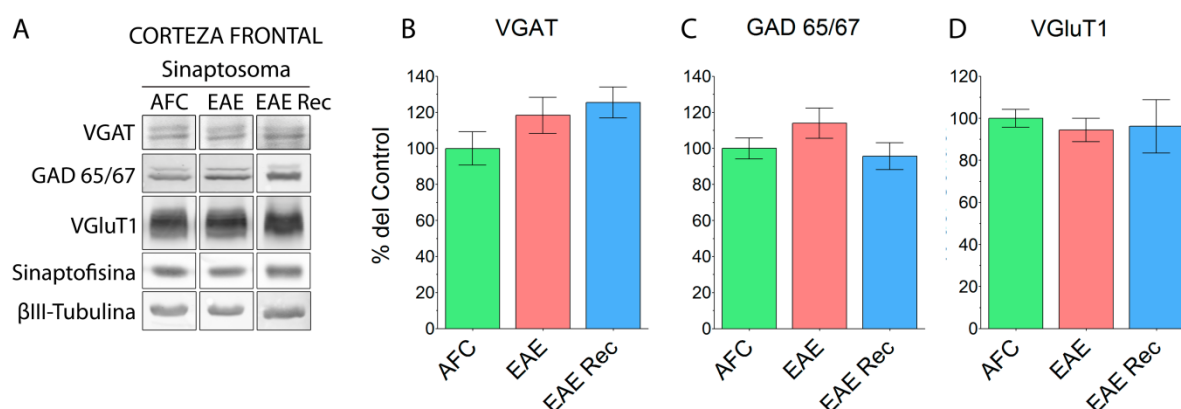


Figura 14. A. WB representativo. **B.** Niveles totales del transportador vesicular de GABA (VGAT; $F=1,585$). **C.** Niveles totales de la enzima que sintetiza GABA (GAD 65/67; $F=1,615$). **D.** Niveles totales del transportador vesicular de glutamato (VGLuT1; $F=0,1435$). Datos de 2 experimentos independientes, $N=8$ ratas por grupo.

Por otra parte, existen receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs; pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteína G) que modulan la neurotransmisión de manera lenta. A esta función la realizan ya sea a través de la producción de segundos mensajeros intracelulares y la regulación de la fosforilación de proteínas, o bien a través de la modulación directa de canales de Ca^{2+} o K^+ [110]. Los mGluRs se clasifican en tres grupos según la homología de su secuencia de aminoácidos, su farmacología y la vía de transducción de señales que activan. Dentro de ellos, el grupo III posee una localización preferencial presináptica (por lo que se denominan autoreceptores) e inhiben la excitación tanto de neurotransmisores excitatorios e inhibitorios como de neuromoduladores, consti-

tuyendo un importante punto de auto-regulación negativa. De esta manera modulan la excitabilidad neuronal, la transmisión sináptica, el metabolismo, la transcripción génica y ciertos aspectos de la comunicación neurona-glia [111]. Agonistas y antagonistas de mGluRs se han propuesto como nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, especialmente aquellas que involucran estrés oxidativo y excitotoxicidad [111]. Particularmente, en EM y EAE se han encontrado alterados los niveles de expresión de varios mGluRs en lesiones activas [37].

En base a estos antecedentes, se analizó el contenido de mGluRs del grupo III (pre-sinápticos e inhibitorios) en los sinaptosomas de corteza frontal. Esta sub-familia posee tres miembros que se expresan en cerebro: mGluR4, mGluR7 y mGluR8. Cuando se analizaron mediante WB los niveles de mGluR4 y mGluR8 α en las membranas sinaptosomales, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales (Fig. 15). Este resultado indica que la reducción en la liberación de glutamato no estaría mediada por cambios en estos auto-receptores. Por cuestiones de falta de disponibilidad de anticuerpos, no fue posible analizar a mGluR7, el receptor que se expresa en mayor cantidad y el cual se postula que mediaría respuestas de estrés en neuronas [112]. Es decir, no podemos descartar que alteraciones en mGluR7 estén contribuyendo a los defectos en la liberación de glutamato.

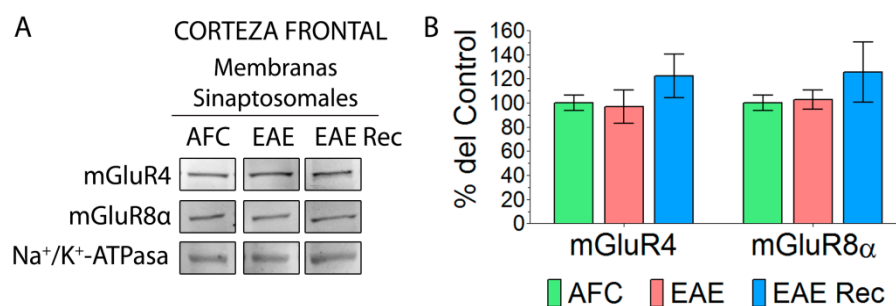


Figura 15. A. WB representativo. **B.** Cuantificación de los niveles totales de mGluR4 y mGluR8 α en las membranas sinaptosomales. Datos de 6 experimentos independientes, N=12 ratas por grupo (F=1,033 y 0,9787 respectivamente).

A partir de los resultados expuestos hasta aquí, podemos concluir que existe una deficiencia en la liberación de glutamato en terminales nerviosas de la corteza frontal durante la etapa aguda de la EAE, que aparece conjuntamente con los signos clínicos y desaparece cuando los animales alcanzan el pico de gravedad de la patología. Este defecto no se debe a cambios en la cantidad de glutamato intraterminal o en el cargado de las VSs con

este neurotransmisor, como tampoco a cambios en la síntesis o cargado del neurotransmisor inhibitorio GABA. También se puede descartar como causa diferencias en la composición de los preparados sinaptosomales. Finalmente, solamente la componente dependiente de $[Ca^{2+}]_i$ sería la responsable de la disminución en la velocidad y la cantidad de glutamato liberado, indicando que la maquinaria molecular presináptica estaría alterada en la EAE. A continuación se muestran experimentos orientados a comprobar esta hipótesis.

BASES BIOQUÍMICAS DE LAS ALTERACIONES FUNCIONALES EN SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATAS CON EAE

FALLAS EN LA REDISTRIBUCIÓN DE SYN I ANTE DESPOLARIZACIÓN

Como se mencionó en la introducción de esta tesis, las syns son fosfoproteínas específicas de las terminales nerviosas y participan en la regulación del número de VSs presentes en la terminal presináptica y su disponibilidad para ser excitadas [74].

Antecedentes de nuestro grupo revelan que, por un lado, células T y anticuerpos anti-PBM producidos por ratas con EAE presentan una reactividad cruzada contra SynI [113]. Por otro lado, la fosforilación temporal de SynI, inducida por agentes despolarizantes, se encuentra inhibida en sinaptosomas de cerebro durante la EAE (esto se analizará en más detalle en la sección siguiente, ver [95]). Teniendo en cuenta, además, que los resultados presentados en las secciones anteriores apuntan a defectos en la maquinaria molecular dependiente de Ca^{2+} , se decidió estudiar la cascada que involucra a SynI en sinaptosomas de corteza frontal de los diferentes grupos experimentales.

En primera instancia se midieron los niveles totales de SynI en sinaptosomas purificados de la corteza frontal (Fig. 16C), encontrándose cantidades equivalentes en los tres grupos experimentales. En los últimos años, diversos autores describieron que los niveles locales de proteínas en las terminales axonales son regulados por síntesis local (a partir de ARN mensajeros y ribosomas locales; [114,115]) y degradación vía proteasoma (mediada por ubiquitinación; [116]). Ambos procesos son, a su vez, estimulados o inhibidos por la actividad neuronal. Por esta razón, se analizaron los niveles de SynI no sólo en condiciones de reposo, sino también a diferentes tiempos luego de la despolarización con 4-AP (Fig. 16B). Se encontró que la cantidad de SynI intrasinaptosomal se mantiene constante para

todos los grupos, al menos en el rango de tiempo estudiado, indicando que no existe degradación o síntesis neta de esta proteína.

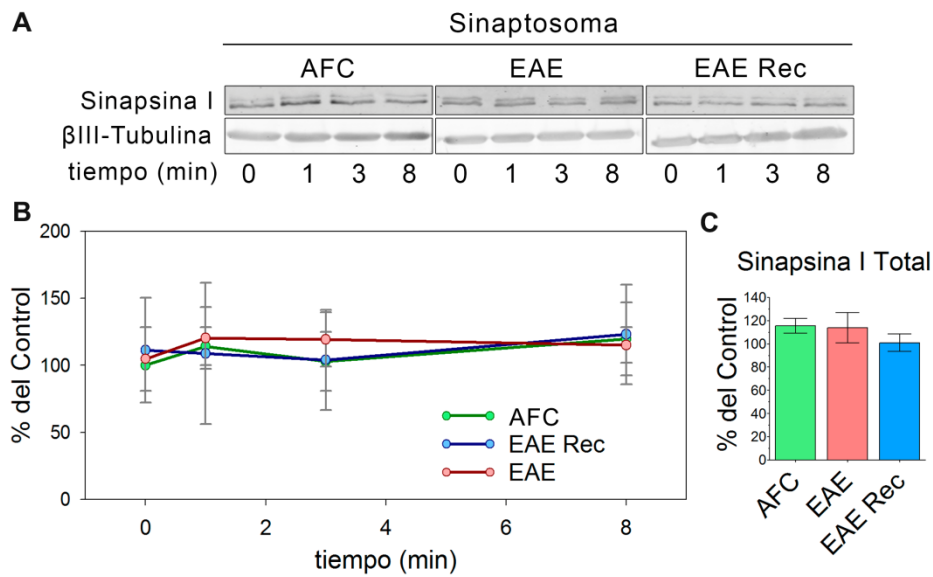


Figura 16. A. WB representativo de los niveles de Syn1 total en sinaptosomas de corteza frontal. **B.** Cambio en el tiempo, luego de la estimulación con 4-AP, de la cantidad de Syn1 intrasinaptosomal. **C.** Niveles totales de Syn1 intrasinaptosomal ($F=0,8851$). Datos de 3 experimentos independientes, $N=6$ ratas por grupo.

En base a esto, a continuación se analizó la distribución sub-sinaptosomal de esta proteína. Se ha descrito que Syn1 forma parte de los agregados de VSs en condiciones de reposo, mostrando una localización puntual en las terminales nerviosas. Cuando se aplica un estímulo despolarizante, $\approx 45\%$ de Syn1 se disocia de las VSs y se redistribuye en el axón, mostrando una localización difusa [77]. Se postula que, a consecuencia de ello, los agregados de VSs son disgregados liberando a las vesículas para que puedan fusionarse en la ZA. De hecho, la velocidad de fusión de VSs se encuentra relacionada a la velocidad de dispersión de Syn1 [77]. Mediante fraccionamiento de los sinaptosomas, se logró separar a los agregados de VSs de la membrana sinaptosomal (la cual incluye a la zona activa y a las VSs ancladas a la membrana mediante proteínas). Los niveles de Syn1 en ambas fracciones se midieron antes (condición basal o 0 min) o después (condición estimulada o 1 min) del agregado de 4-AP (Fig. 17). En el grupo control (AFC) se encontró que Syn1 efectivamente se disocia de las VSs luego de la estimulación en un $\approx 40\%$, coincidiendo con los antecedentes de otros grupos, mientras el resto de la proteína permanece unida a las vesículas. Además, se encontró que existe Syn1 asociada a las VSs ancladas a las membranas sinaptosomales, y estos niveles también decaen luego de la estimulación en un $\approx 30\%$ (esto había

sido postulado por otros grupos, pero existían pocas evidencias experimentales; ver barras verdes en la Fig. 17 C-D).

Ahora bien, si se observa el comportamiento del grupo EAE en la Fig. 17 (barras rosadas) se encuentra que la redistribución de SynI, o sea su disociación de las VSs, ocurre en menor medida que lo descrito para el grupo AFC ($\approx 20\%$ en VSs y $\approx 10\%$ en membranas, ambos cambios estadísticamente no significativos con respecto al estado basal). En otras palabras, la dispersión de SynI se encuentra impedida en ambas fracciones en sinaptosomas purificados de la corteza frontal en la etapa aguda de la EAE. Estas alteraciones en la redistribución de SynI se revierten en los animales recuperados de la patología (barras celestes en la Fig. 17 C-D; notar que los niveles basales de SynI asociada a VSs están significativamente elevados en el grupo EAE Rec, respecto al AFC, lo cual podría corresponder a una respuesta adaptativa ante los defectos funcionales).

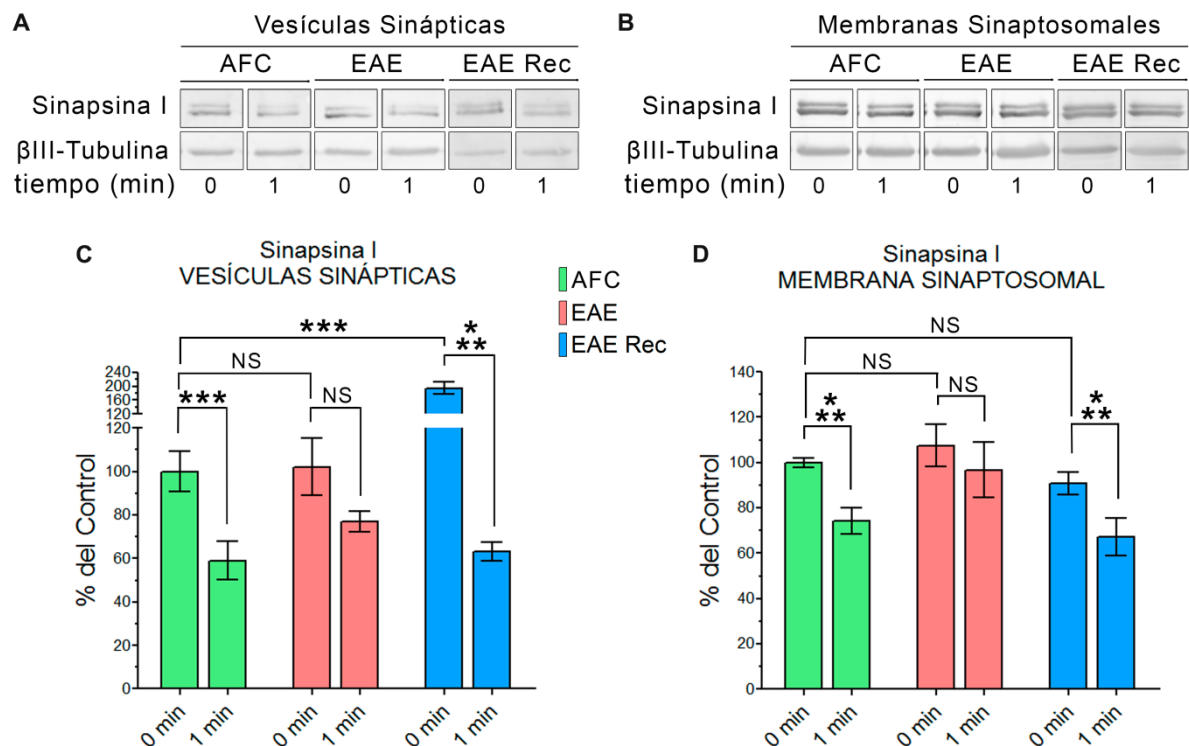


Figura 17. Redistribución de SynI ante la despolarización con 4-AP. **A-B.** Imágenes representativas de los WB de las fracciones revelados para SynI total. **C.** Niveles de SynI unida a los agregados citoplásmicos de VSs antes (0 min) y después (1 min) del agregado de 4-AP ($F_{\text{tiempo}}=45,98$; $F_{\text{grupo}}=14,09$). **D.** Niveles de SynI en la fracción de membranas sinaptosomales antes (0 min) y después (1 min) del agregado de 4-AP ($F_{\text{tiempo}}=15,69$; $F_{\text{grupo}}=3,831$). Datos de 2 experimentos independientes, $N=4$ muestras por grupo (cada muestra es un homogenato de dos cortezas frontales de animales clínicamente iguales; NS: no significativo; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

ALTERACIONES EN LA FOSFORILACIÓN DE SYN I Y LAS QUINASAS Y FOSFATASAS INVOLUCRADAS

La redistribución de SynI es regulada por su estado de fosforilación en diversos sitios (Fig. 4). Aquí es importante aclarar que las quinasas y fosfatasa que actúan sobre esos sitios no son específicas de SynI, sino que participan en la transducción de señales desencadenada por el estímulo despolarizante, actuando sobre diversos sustratos. Así, el conjunto de proteínas que participa en la cascada de liberación de neurotransmisores se denomina maquinaria (molecular) de liberación.

Centrándonos en el estudio de SynI, nos preguntamos si el defecto en su redistribución en el grupo EAE estaba relacionado a cambios en la fosforilación. Para ello se estimularon con 4-AP sinaptosomas de corteza frontal de los distintos grupos experimentales, y se tomaron muestras a diferentes tiempos. Sabiendo que la cantidad total de SynI no varía (ver Fig. 16B), se cuantificó mediante WB la fosforilación temporal de esta proteína en diferentes sitios. A su vez, se analizaron los componentes de la maquinaria de liberación que regulan cada sitio.

I. Disminución en la fosforilación del sitio 3 de SynI y localización de CaMKII

La fosforilación de SynI en el sitio 3 produce un dramático cambio conformacional en la proteína [79] que lleva a que ésta pierda afinidad tanto por las VSs como por los filamentos de actina [73]. Este sitio es sustrato de la enzima CaMKII, quien es activada por Ca^{2+} -calmodulina. Esto produce que los niveles de fosforilación del sitio 3 de SynI aumenten en respuesta a un estímulo despolarizante [78].

El estado de fosforilación de SynI en el sitio 3 en condiciones basales fue equivalente en todos los grupos experimentales (tiempo 0 min en la Fig. 18B). Cuando se estudió el curso temporal de dicha fosforilación, para el grupo control (AFC) se observó un comportamiento similar al descrito en bibliografía [78], presentando una rápida respuesta al agregado de 4-AP (Fig. 18B). El aumento de fosforilación alcanzó un valor máximo a tiempo 1 min, luego del cual la señal comenzó a decaer. Por el contrario, en sinaptosomas del grupo EAE, el sitio 3 de SynI alcanzó un máximo de fosforilación significativamente menor (≈ 50 % de la intensidad alcanzada por el grupo AFC). Nuevamente, estos defectos se re-vertieron completamente en el grupo de ratas recuperadas de los signos clínicos.

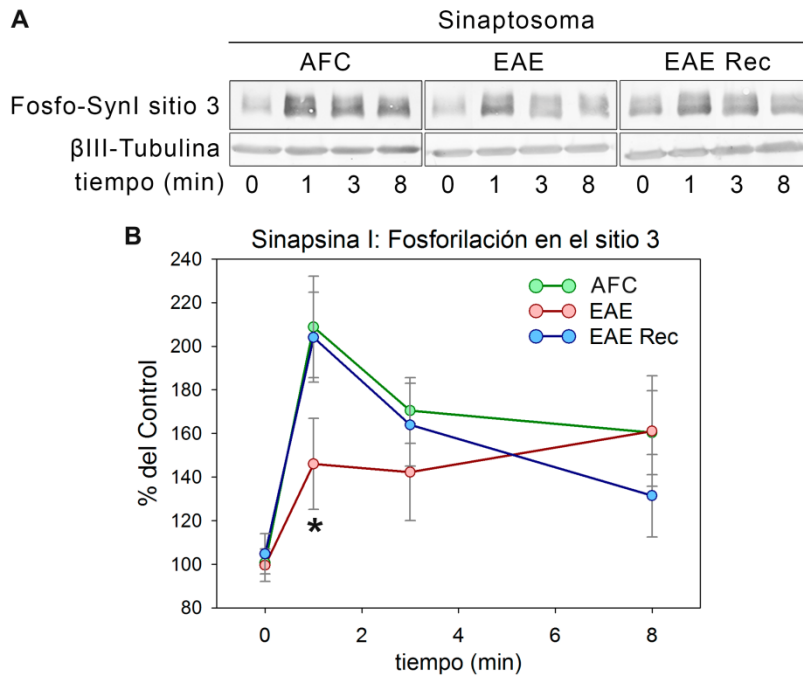


Figura 18. A. Imagen de WB representativa. **B.** Curso temporal de fosforilación de Syn1 en el sitio 3 luego del agregado de 4-AP ($F_{tiempo}=12,75$; $F_{grupo}=2,776$). Datos de 3 experimentos independientes, $N=6$ ratas por grupo (* $p<0,05$ respecto al mismo tiempo del grupo control).

CaMKII α , quien es la única quinasa responsable de fosforilar al sitio 3 de Syn1, también mostró niveles totales similares en los tres grupos experimentales (Fig. 19). Esta enzima es una de las proteínas cuya síntesis se ha demostrado que ocurre localmente, en la terminal sináptica, inducida por la actividad neuronal [117]. En las condiciones experimentales empleadas en nuestro laboratorio, sin embargo, no observamos cambios en los niveles totales de esta proteína a lo largo del tiempo, luego de la estimulación con 4-AP (datos no mostrados).

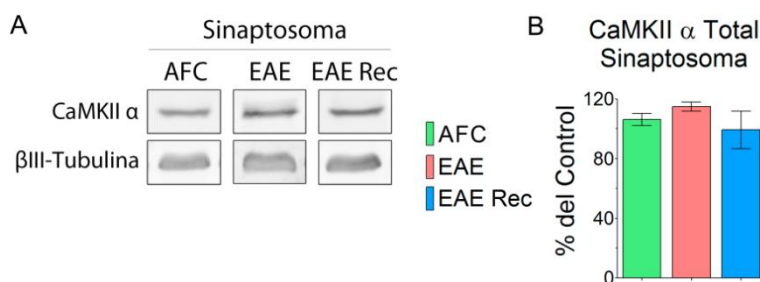


Figura 19. A. Imagen de WB representativa. **B.** Niveles totales de la proteína CaMKII α en sinaptosomas de corteza frontal ($F=1,857$). Datos de 3 experimentos independientes, $N=6$ ratas por grupo.

Por consiguiente, considerando que la cantidad total de CaMKII α en los sinaptosomas es constante en el rango de tiempo estudiado, proseguimos a analizar su distribución sub-sinaptosomal. Previamente, otros investigadores mostraron que, ante actividad neuronal, CaMKII α pasa de tener una distribución difusa en el citoplasma a concentrarse en la zona de sinapsis [117]. Este proceso depende de su interacción con Ca²⁺-calmodulina y de su autofosforilación en la Thr 286. Un estudio más detallado, mostró que CaMKII α se encuentra alrededor de los agregados de VSs en condiciones de reposo, mientras Syn1 se ubi-

ca dentro de ellos. La despolarización induce la activación de CaMKII α y la consecuente dispersión de VSs, desde la periferia hacia el centro de los agregados a medida que la quinaasa gana acceso a Syn1 [118]. Los cambios de localización de CaMKII α , entonces, serían importantes para su correcto funcionamiento.

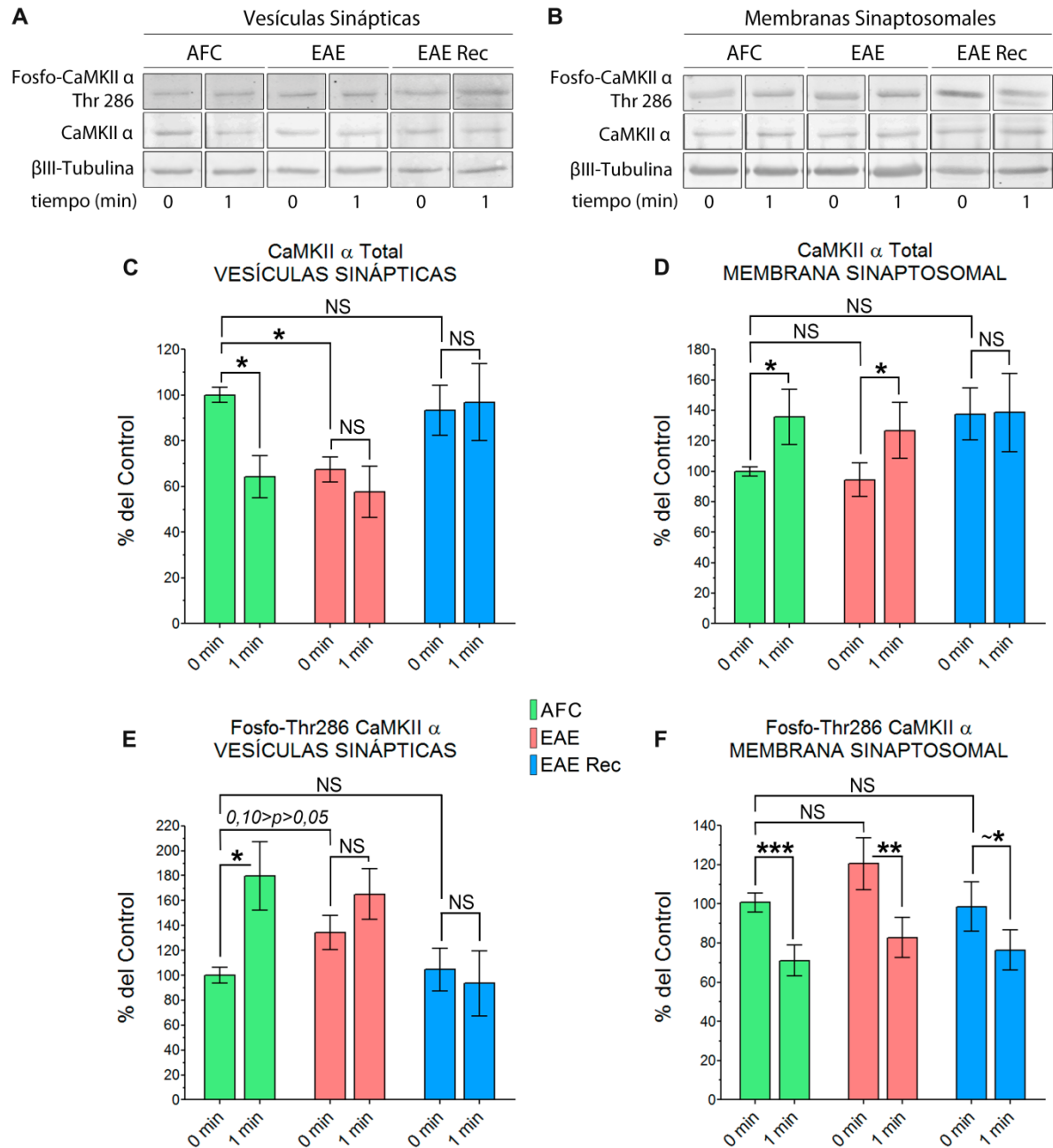


Figura 20. Redistribución de CaMKII α ante la despolarización con 4-AP. **A-B.** Imágenes representativas de los WB de las fracciones. **C.** Niveles de CaMKII α unida a los agregados citoplásmicos de VSs antes (0 min) y después (1 min) del agregado de 4-AP ($F_{tiempo}=70,12$; $F_{grupo}=10,94$). **D.** Niveles de CaMKII α en la fracción de membranas sinaptosomales antes (0 min) y después (1 min) del agregado de 4-AP ($F_{tiempo}=7,824$; $F_{grupo}=0,7209$). **E.** Niveles de CaMKII α autofosforilada interaccionando con los agregados de VSs ($F_{tiempo}=3,174$; $F_{grupo}=0,03$). **F.** Niveles de CaMKII α autofosforilada en la fracción de membranas sinaptosomales ($F_{tiempo}=63,23$; $F_{grupo}=0,57$). . Datos de 2 experimentos independientes, $N=4$ muestras por grupo (cada muestra es un homogenato de dos cortezas frontales de animales clínicamente iguales; NS: no significativo; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

Cuando se analizó la localización sub-sinaptosomal de esta enzima, en el grupo AFC y en condiciones basales se la encontró asociada tanto a los agregados de vesículas como a la membrana sinaptosomal (Fig. 20C-D). Luego de la estimulación con 4-AP, el grado de autofosforilación (Thr 286) de CaMKII α unida a las vesículas aumentó a casi el doble (Fig. 20E, barras verdes), acordando con lo mostrado en la bibliografía en cuanto a que esta quinasa penetra en los agregados cuando se activa. A su vez, la cantidad total de esta enzima disminuyó un $\approx 40\%$ en la fracción de VSs, dispersión también descrita previamente en la bibliografía [117,118]. El comportamiento de CaMKII α en las membranas sinaptosomales del control fue el inverso (Fig. 20D y F). Luego del agregado de 4-AP, aumentó su cantidad total en esa fracción en un $\approx 40\%$ y disminuyó su grado de autofosforilación (Thr 286). El aumento de la proteína total en membranas podría explicarse en base a trabajos que indican que CaMKII α es reclutada hacia la ZA ante actividad sináptica [117]. Sin embargo, para comprender en más profundidad el rol de la fosforilación de CaMKII α en la ZA serían necesarios más experimentos, ya que la mayoría de las investigaciones sobre la función de CaMKII α han sido realizadas a nivel postsináptico.

En resumen, la estimulación de los sinaptosomas e el grupo control (AFC) induce una redistribución de CaMKII α desde los agregados hacia la ZA y hacia el citoplasma, mientras la CaMKII α que permanece interaccionando con los agregados aumenta su fosforilación en la Thr 286, indicando que estaría penetrando en los agregados y dispersando las VSs, a través de la fosforilación de SynI en el sitio 3.

El fraccionamiento de sinaptosomas de corteza frontal purificados de animales del grupo EAE mostró que los niveles basales de CaMKII α interaccionando con los agregados de VSs se encuentran significativamente disminuidos (Fig. 20C, barras rosadas). Además, el agregado de 4-AP no produjo un aumento considerable en el grado de fosforilación de la Thr 286 en comparación con su nivel basal (Fig. 20E). Por otro lado, en la fracción de membranas sinaptosomales no se encontraron diferencias en el comportamiento de esta quinasa entre los grupos AFC y EAE. Estos resultados nos llevan a pensar que, al haber una menor cantidad de CaMKII α asociada a los agregados de VSs, el mecanismo propuesto de disgregado de vesículas desde la periferia hacia el centro ocurriría en menor medida. Esto explicaría, en primer lugar, el poco grado de cambio en el estado de fosforilación de CaMKII α , ya que es la forma fosforilada la que posee la capacidad de penetrar en los agregados. Y en segundo lugar, el defecto en el curso temporal de fosforilación de SynI en el

sitio 3, ya que al estar en el interior de los agregados, Syn1 sería inaccesible para la quinasa. Estos resultados también indican dos hechos interesantes. Por un lado, CaMKII α se encuentra más fosforilada basalmente en Thr 286, en el grupo EAE. Esto podría estar mostrando un mecanismo compensatorio a los defectos encontrados, aunque no sería suficiente. Por otro lado, la falta de alteraciones a nivel de membranas nos induce a pensar que solamente el mecanismo de reclutamiento de CaMKII α a los agregados de VSs estaría afectado. Esto se explicaría teniendo en cuenta las diferencias en la composición proteica de ambas fracciones, y en la distribución entre ambas de los sustratos de la quinasa.

Finalmente, en cuanto al grupo de animales recuperados, a pesar de que sus niveles basales en ambas fracciones revirtieron a los valores del control, éstos no se modificaron en respuesta al estímulo (Fig. 20C-F, barras celestes). Basándonos en que la liberación de glutamato y la fosforilación de Syn1 en el sitio 3 sí se recuperan, estos resultados revelan que la restauración del funcionamiento presináptico normal podría estar ocurriendo mediante un mecanismo diferente al presente en la situación control.

II. Aumento en la fosforilación de los sitios 4/5 de Syn1 y su relación con Erk1/2 y CN

Otros de los sitios de fosforilación de Syn1 más estudiados son los número 4 y 5, debido a que forman parte del mecanismo por el cual neuromoduladores (como factores tróficos) potencian la liberación de glutamato [82]. La fosforilación en estos sitios, mediada por Erk1/2, modula la dinámica de actina y, en parte, la formación de los agregados de VSs. De esta manera controlan la retención de las vesículas en la terminal sináptica y facilitan el reciclado de VSs [73,74].

En condiciones de reposo, sinaptosomas del grupo EAE presentaron niveles de fosforilación en los sitios 4/5 un ≈ 35 % mayores que el grupo control (Fig. 21B). A tiempos cortos (1 min) luego de la estimulación con 4-AP, el grado de fosforilación aumentó (≈ 20 %) en todos los grupos experimentales, manteniéndose la diferencia entre EAE y AFC. Sin embargo, a tiempos largos la fosforilación de los sitios 4/5 de Syn1 decayó en los sinaptosomas del grupo EAE, acercándose a los valores del control. La cinética de fosforilación de Syn1 en los sitios 4/5 para sinaptosomas de animales recuperados fue similar a la del grupo AFC.

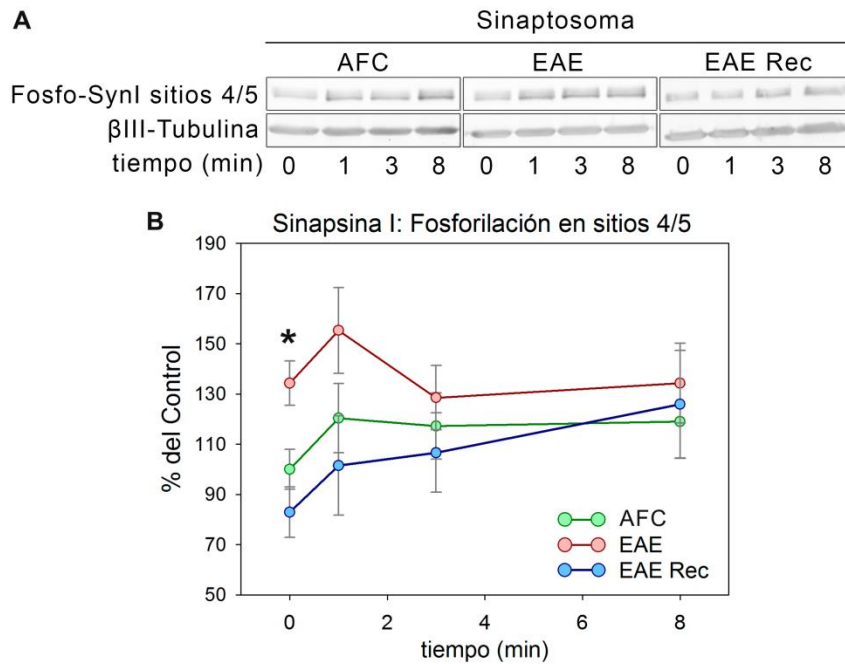


Figura 21. A. Imagen de WB representativa. **B.** Curso temporal de fosforilación de Syn1 en los sitios 4/5 luego del agregado de 4-AP ($F_{tiempo}=3,413$; $F_{grupo}=3,136$). Datos de 3 experimentos independientes, $N=6$ ratas por grupo ($*p<0,05$ respecto al mismo tiempo del grupo control).

Para tratar de explicar la causa de estos cambios, se analizó a Erk1/2. Concordando con lo observado para los sitios 4/5 de Syn1, se encontró aumentada la cantidad total de dicha quinasa en los sinaptosomas del grupo EAE ($\approx 25\%$, Fig. 22B). La proporción de Erk1/2 fosforilada (lo cual es un marcador de activación) fue similar para todos los grupos experimentales en condiciones de reposo (tiempo 0 min, Fig. 22C). No obstante, la despolarización mediada por 4-AP provocó una activación de Erk1/2 significativamente mayor en los sinaptosomas de corteza frontal del grupo EAE (medido como un aumento de fosforilación de $\approx 140\%$ en el grupo EAE contra un aumento de $\approx 80\%$ en los grupos AFC y EAE Rec).

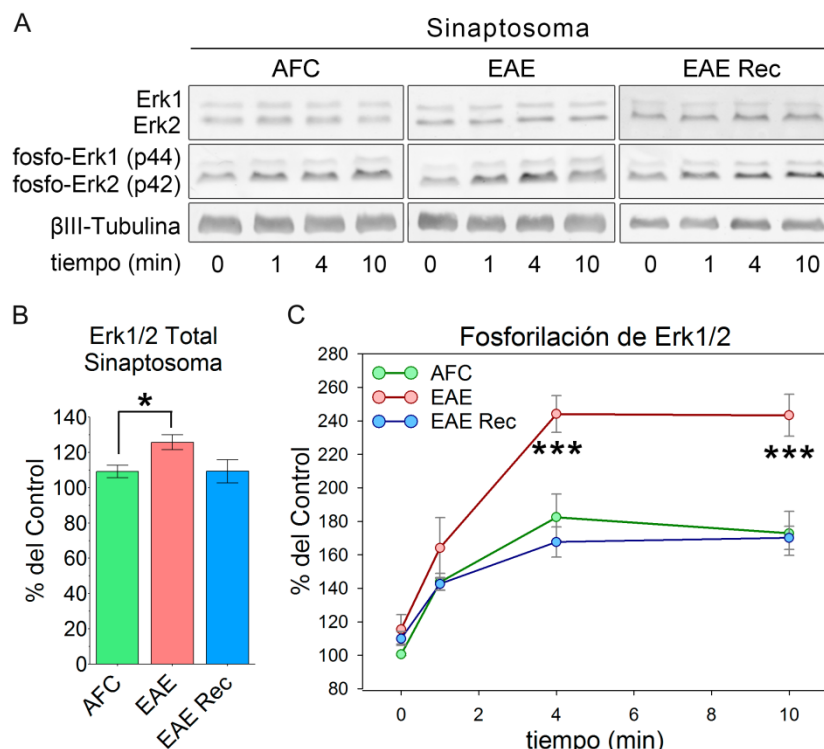


Figura 22. A. Imagen de WB representativa. **B.** Contenido intrasinaptosomal de la proteína Erk1/2 ($F=3,610$). **C.** Curso temporal de fosforilación de Erk1/2 (Thr 202/Thr 204) luego del agregado de 4-AP ($F_{tiempo}=21,93$; $F_{grupo}=50,44$). Datos de 3 experimentos independientes, $N=6$ ratas por grupo ($*p<0,05$; $***p<0,001$; respecto al mismo tiempo del grupo control).

Volviendo a SynI, la enzima encargada de desfosforilar los sitios 4/5 es CN, quien es activada por unión de Ca^{2+} y de Ca^{2+} -calmodulina. La actividad de esta enzima regula positivamente la endocitosis (a través de la desfosforilación de las defosfinas; [70]), el influjo de Ca^{2+} (a través de la desfosforilación CCAV; [119]), y el tamaño del grupo de vesículas de reciclado [120].

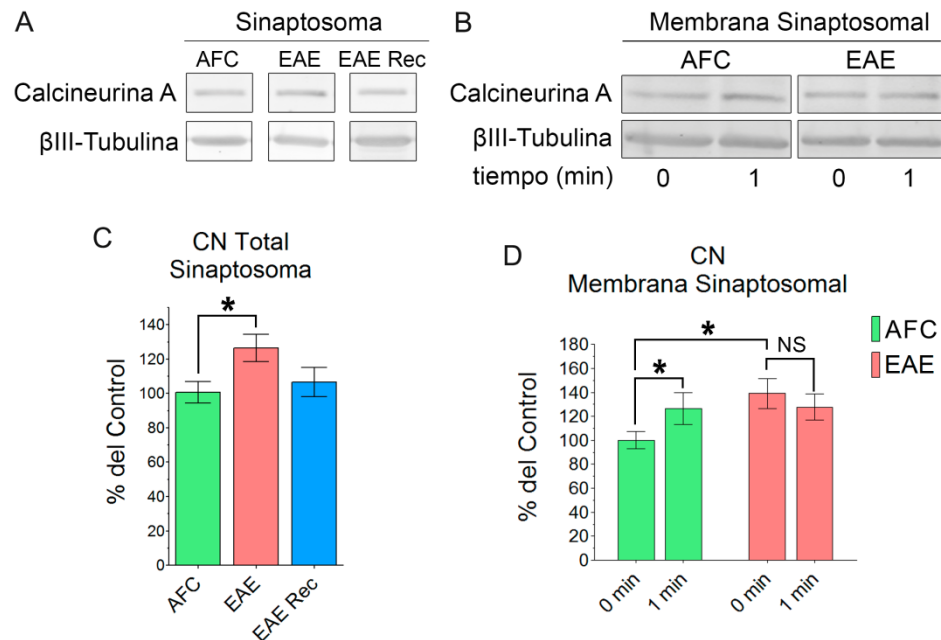


Figura 23. A-B. Imágenes de WB representativas. C. Contenido intrasinaptosomal de CN ($F=3,299$). Datos de 4 experimentos independientes, $N=48$ ratas por grupo ($\star p<0,05$). D. Niveles de CN en la fracción de membranas sinaptosomales antes (0 min) y después (1 min) del agregado de 4-AP ($F_{tiempo}=2,046$; $F_{grupo}=2,946$). Datos de 2 experimentos independientes, $N=4$ ratas por grupo ($\star p<0,05$).

El análisis de los niveles totales de CN en los sinaptosomas de los distintos grupos experimentales reveló un aumento significativo de $\approx 25\%$ en el grupo EAE, el cual se revierte en las ratas recuperadas (Fig. 23C). Debido a que las principales funciones de esta fosfatasa citosólica dependen de su reclutamiento hacia las membranas inducido por el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, se estudió su presencia en la fracción de membranas sinaptosomales. En condiciones basales, CN se encontró en un $\approx 40\%$ más en las membranas del grupo EAE, respecto al grupo control. De acuerdo a lo esperado según bibliografía, en el grupo AFC los niveles de CN asociada a membranas se vieron incrementados un $\approx 30\%$ luego del agregado de 4-AP, indicando su reclutamiento dependiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fig. 23D, barras verdes). Sin embargo, en el grupo EAE la cantidad de CN asociada a membranas no se modificó luego de la estimulación (Fig. 23D, barras rosadas).

Dado que tanto Erk1/2 como CN se encontraron elevadas en sinaptosomas de corteza frontal del grupo EAE, y teniendo en cuenta la cinética observada de fosforilación de SynI en los sitios 4/5, podríamos postular que: En condiciones basales y a tiempos cortos, la actividad de Erk1/2 superaría a la de CN, llevando a un mayor grado de fosfo-SynI en sitios 4/5, lo cual podría estar provocando una mayor desorganización del citoesqueleto de actina y una disgregación de los agregados de VSs en el grupo EAE. Al aumentar la actividad de CN con el tiempo de estimulación, a tiempos largos su actividad sobrepasaría a la de Erk1/2, llevando a la disminución medida en fosfo-SynI en sitios 4/5 en el grupo EAE, alcanzando valores similares al control.

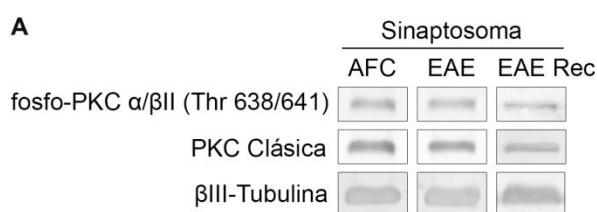
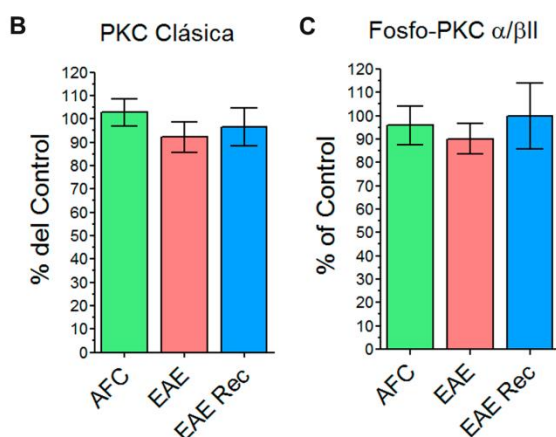


Figura 24. A. Imagen de WB representativa. **B.** Contenido total intrasinaptosomal de la proteína PKC ($F=0,4788$). **C.** Estado basal de fosforilación de PKC ($F=0,2710$). Datos de 3 experimentos independientes, $N=6$ ratas por grupo.



Finalmente, como se mencionó anteriormente, una de las principales funciones de CN en la presinapsis es activar la endocitosis mediante desfosforilación dependiente de $[Ca^{2+}]_i$ de las defosfinas. En este mecanismo, la quinasa de proteínas C (PKC) posee un rol preparativo, reacondicionando a las defosfinas mediante fosforilación, las cuales luego pueden intervenir en un nuevo ciclo de endocitosis [121]. Tanto los niveles totales como el estado de fosforilación de las PKC clásicas fueron analizados mediante WB, siendo similares para los tres grupos experimentales (Fig. 24B-C). Por lo tanto, dado que PKC no se encuentra alterada en terminales nerviosas de corteza frontal durante la EAE, pero sí hay cambios en CN, no podemos descartar que el proceso de endocitosis dependiente de Ca^{2+} y CN funcione anormalmente en dicha patología. Experimentos de endocitosis utilizando

sondas fluorescentes combinados con análisis de las defosfinas serían necesarios para responder este interrogante.

Los experimentos expuestos hasta aquí en terminales nerviosas de la corteza frontal, tanto funcionales como bioquímicos, nos llevan a postular que durante la etapa aguda de la EAE componentes de la maquinaria molecular que regula al ciclo de las VSs son disfuncionales, llevando a una inhibición parcial de la cinética de liberación del neurotransmisor glutamato. Para poner a prueba esta hipótesis, a continuación se estudió de manera directa el ciclado de las VSs en sinaptosomas.

ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LOS SINAPTOSOMAS Y DE LA MOVILIDAD DE LAS VESÍCULAS SINÁPTICAS

Los sinaptosomas, independientemente del método de purificación, tienen características morfológicas conservadas y similares a las terminales nerviosas de neuronas intactas (ya se trate de neuronas en cultivo o de láminas de tejido), validando la utilidad de estas estructuras para el estudio del funcionamiento presináptico [85,122,88].

Teniendo eso en cuenta, sinaptosomas de los grupos AFC y EAE fueron analizados mediante microscopía electrónica. Morfológicamente, el tamaño de los sinaptosomas así como de las VSs y de la DPS fue comparable en ambos grupos experimentales, y coincide con lo reportado previamente por otros investigadores [123,124]. Asimismo, el número total de VSs por corte transversal de sinaptosoma fue similar en todas las muestras estudiadas (Fig. 25C). Este hallazgo concuerda con lo supuesto a partir de resultados previos en esta tesis, que mostraron que los grupos control y EAE poseen el mismo contenido intrasínaptosomal de glutamato y de proteínas asociadas o intrínsecas de VSs (como sinapsina, sinaptofisina y VGluT1).

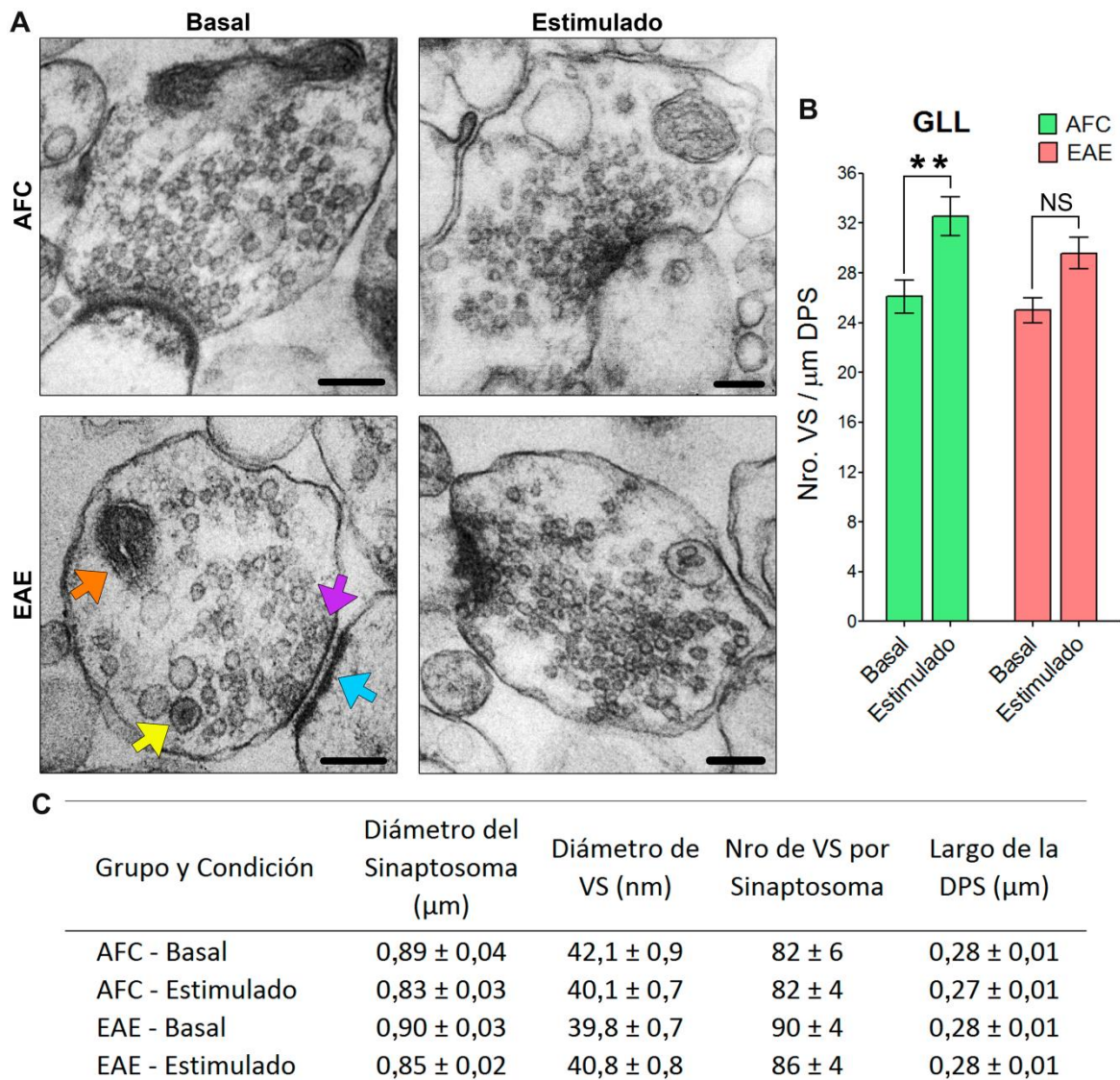


Figura 25. A. Imágenes representativas de microscopía electrónica de sinaptosomas de los grupos AFC y EAE. Barras negras=250nm. **B.** Tamaño del GLL antes (basal) y después (estimulado) de la despolarización con 4-AP ($F_{\text{tiempo}}=2,309$; $F_{\text{grupo}}=17,12$). El GLL se definió como el número de vesículas cuyo centro estuviera a menos de 20nm de la ZA, y se expresa en relación a los μm de DPS. **C.** Caracterización morfológica de los sinaptosomas y VSs. Datos de 2 experimentos independientes, $N=2$ ratas por grupo, se analizaron 25-35 fotografías por muestra en modo doble ciego ($**p<0,01$). Flecha naranja: mitocondria. Flecha amarilla: vesícula densa o grande, contiene neuropéptidos. Flecha violeta: vesículas pequeñas o sinápticas del GLL. Flecha celeste: DPS.

Otros autores han mostrado con anterioridad que la liberación de neurotransmisores dependiente de actividad neuronal se correlaciona morfológicamente con cambios en la distribución de las VSs dentro del botón sináptico [123,124]. Las VSs se movilizan en un sentido definido, acercándose físicamente a la ZA. La ZA es una densa red de proteínas, entre las cuales se encuentran SNAREs, CCAVs, proteínas asociadas a VSs, proteínas de andamiaje, etc. Por esta razón, la probabilidad de liberación, el número de VSs ancladas y la amplitud del influjo de Ca^{2+} aumentan de manera lineal con el área de la ZA (esto se de-

nomina modelo modular de la ZA, ver [125,126]). En base a ello, en esta tesis se definió al GLL como aquellas vesículas que estuvieran dentro del largo de la ZA y a menos de 20 nm de distancia de la misma (el largo de la ZA se asumió idéntico y contrapuesto a la DPS). Utilizando esa definición, se midió el tamaño del GLL (expresado como número de VSs en relación al largo de la DPS) en condiciones basales y luego de la estimulación con 4-AP (Fig. 25B). En estado de reposo, sinaptosomas tanto del grupo EAE como del AFC mostraron el mismo número de vesículas ancladas a la ZA. Sin embargo, mientras que en el grupo control la despolarización provocó un incremento del GLL en aproximadamente el 25% (barras verde en Fig. 25B), el aumento no fue significativo en el grupo EAE (barras rosadas en Fig. 25B). Esta diferencia de comportamiento entre ambos grupos no se debe a una reducción en el contenido total de VSs, ya que, como se mencionó en el párrafo anterior, todos los sinaptosomas estudiados contenían un número similar de vesículas.

Estos resultados junto con los obtenidos en secciones anteriores, nos permiten concluir que en la corteza frontal de ratas en la etapa aguda de la EAE ocurrirían cambios en la maquinaria molecular que regula la disponibilidad de las VSs llevando a una menor movilidad de las mismas y una reducción en la liberación de neurotransmisor.

Con el fin de dilucidar las posibles causas de estas alteraciones, a continuación se analizará la presencia y distribución de marcadores inflamatorios en el cerebro de ratas de los grupos AFC y EAE.

DISTRIBUCIÓN EN EL CEREBRO DE ALTERACIONES HISTOLÓGICAS EN LA ETAPA AGUDA DE LA EAE

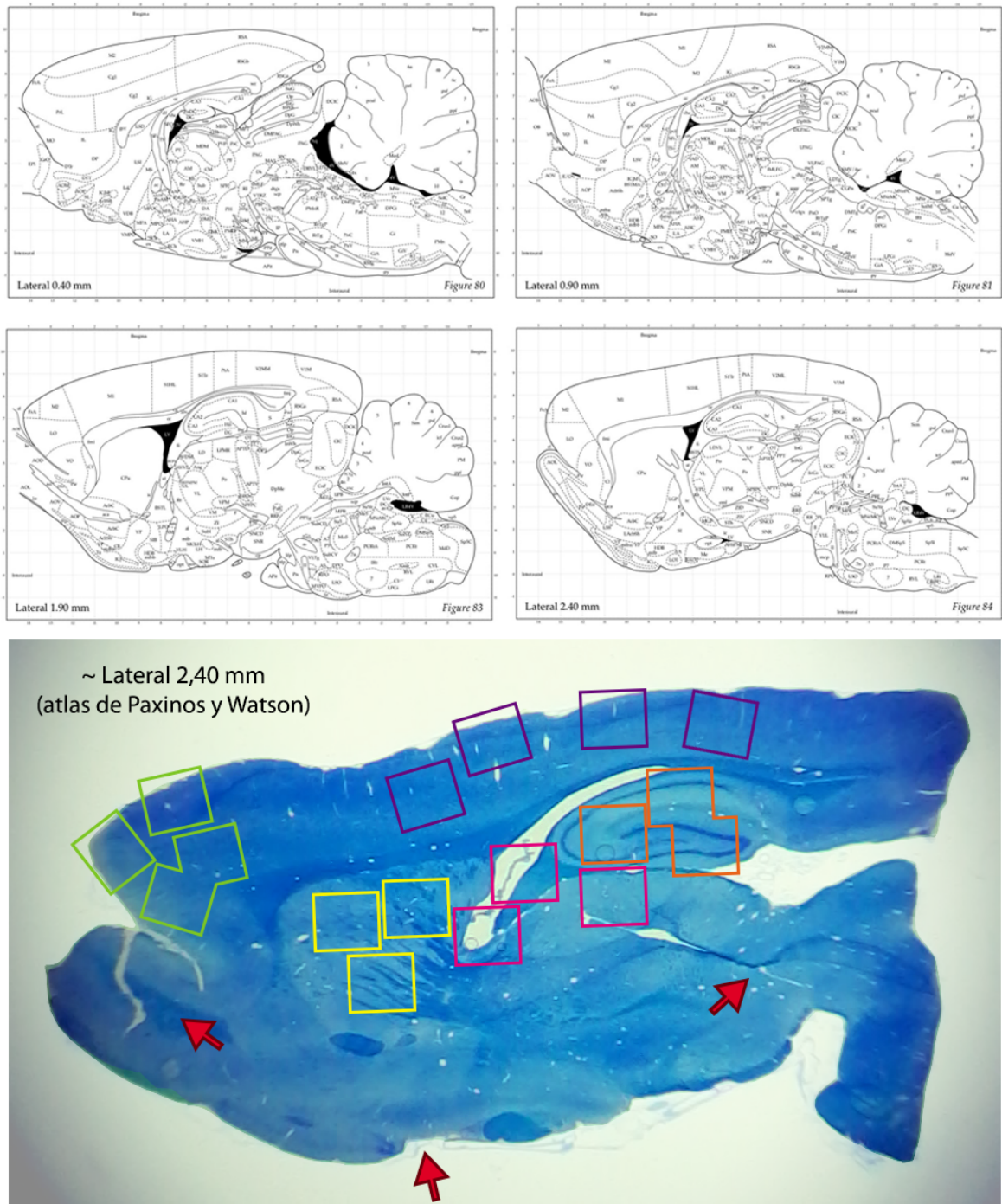


Figura 25. Esquema de las zonas analizadas. Por animal, se observaron 4 cortes a diferentes profundidades hacia el lateral, correspondientes a los diagramas del atlas de Paxinos y Watson mostrados en la parte superior de esta imagen [127]. Todas las regiones fueron fotografiadas en cortes a la altura de los laterales 0,40 – 0,90 mm, excepto el estriado dorsal, que fue fotografiado en cortes entre los laterales 1,90 y 2,40 mm. Se tomaron 3-4 imágenes por área. Verde: corteza frontal. Violeta: resto de la corteza. Amarillo: estriado dorsal. Rosado: ventrículo lateral, tercer ventrículo (no figura en esta imagen), parénquima adyacente, cisternas. Naranja: Hipocampo. Además, se analizaron otras regiones como el tracto que conecta con el bulbo olfatorio, el quiasma óptico y alrededores, el mesencéfalo (no se muestran los resultados, flechas rojas).

HISTOLOGÍA: ANÁLISIS DE LA INTEGRIDAD DEL TEJIDO Y LA MATERIA BLANCA MEDIANTE LAS TINCIONES DE AZUL DE TOLUIDINA Y AZUL DE LUXOL RÁPIDO

Como una primera aproximación, tratando de encontrar las causas de los cambios presinápticos descritos hasta aquí en esta tesis, se analizaron cortes sagitales de cerebro de los grupos AFC y EAE, empleando tinciones clásicas.

El azul de toluidina es un colorante metacromático que se une selectivamente a componentes ácidos del tejido. Su metacromacia es altamente selectiva y hace que cambie de color en función del grado de acidez de la estructura histológica, virando desde el azul hacia el violeta, marrón, rojo y amarillo [128]. En el caso de cortes de cerebro, el fondo (o matriz extracelular) se tiñe de azul claro, mientras los núcleos y la sustancia de Nissl toman un color azul intenso virando a morado en algunos casos. Las zonas ricas en gangliósidos y sulfátidos provocan un mayor viraje de color, por lo cual estructuras ricas en mielina toman un color de fondo violeta-rosado. Se analizó mediante esta coloración la apariencia e integridad de cortes sagitales de cerebros de ratas de los grupos AFC y EAE.

Como puede observarse en las figuras 26 y 27, la corteza cerebral (tanto la región frontal como el resto) y estructuras subcorticales como el hipocampo y el estriado, presentaron una apariencia normal, tanto en el grupo control como en los animales enfermos. No se observaron pérdida de coloración (indicativo de degradación o pérdida de tejido), cambio de coloración (posible indicativo de estrés oxidativo intenso o presencia de placas) ni cambios morfológicos marcados en las estructuras histológicas o en los cuerpos neuronales. Tampoco se observó entre los grupos experimentales una diferencia en el número de células de las áreas analizadas.

En regiones más externas del cerebro, como el tracto que conecta con el bulbo olfatorio, el quiasma óptico y sus estructuras adyacentes, y el mesencéfalo y tallo encefálico, se observó una considerable inflamación e infiltración, principalmente a través de meninges, en el grupo EAE. Esto ya había sido previamente observado en nuestro laboratorio y, debido a su falta de relevancia en relación a los estudios presinápticos realizados en esta tesis, no se tomaron imágenes ni se realizaron análisis más profundos.

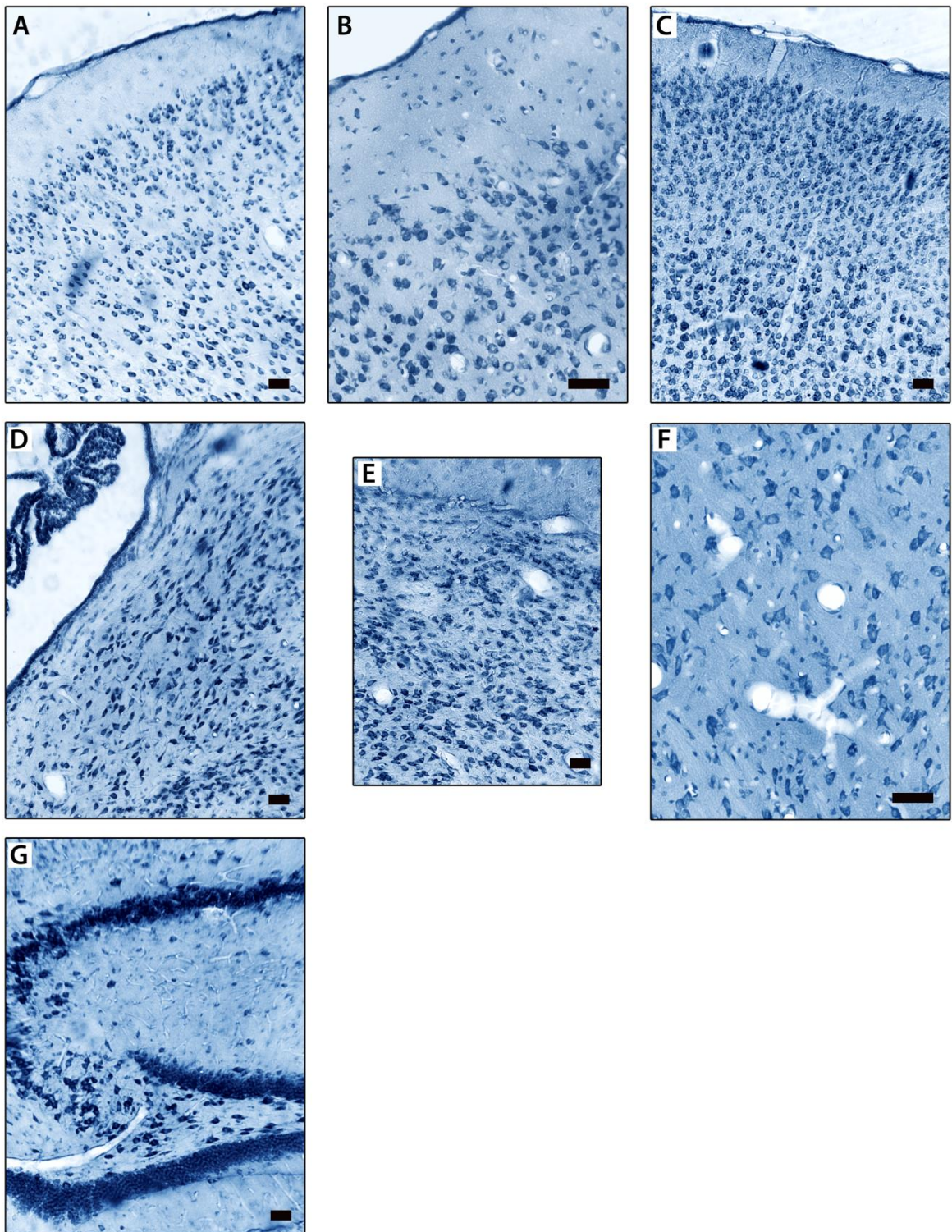


Figura 26. Tinción con azul de toluidina de cortes sagitales de cerebro del grupo AFC. **A.** Corteza frontal, capas I a IV. **B.** Acercamiento de la corteza frontal, donde se observan las neuronas de las capas I y II-III. **C.** Resto de la corteza. **D.** Borde del tercer ventrículo, se observa al plexo coroideo en su interior. **E.** Parénquima ventral al hipocampo y caudal al tercer ventrículo. **F.** Acercamiento de la misma región que la fotografía E, pueden observarse varios vasos sanguíneos. **G.** Hipocampo dorsal, mostrando el giro dentado y CA2-3. Barras = 25 μ m.

Todas las fotografías de tinciones fueron pseudo-coloreadas utilizando el programa Photoshop, ya que la cámara utilizada genera imágenes en escala de grises. Por esta razón, no se aprecia la metacromacia del azul de toluidina.

Para todos los experimentos de histología: N=4 ratas por grupo.

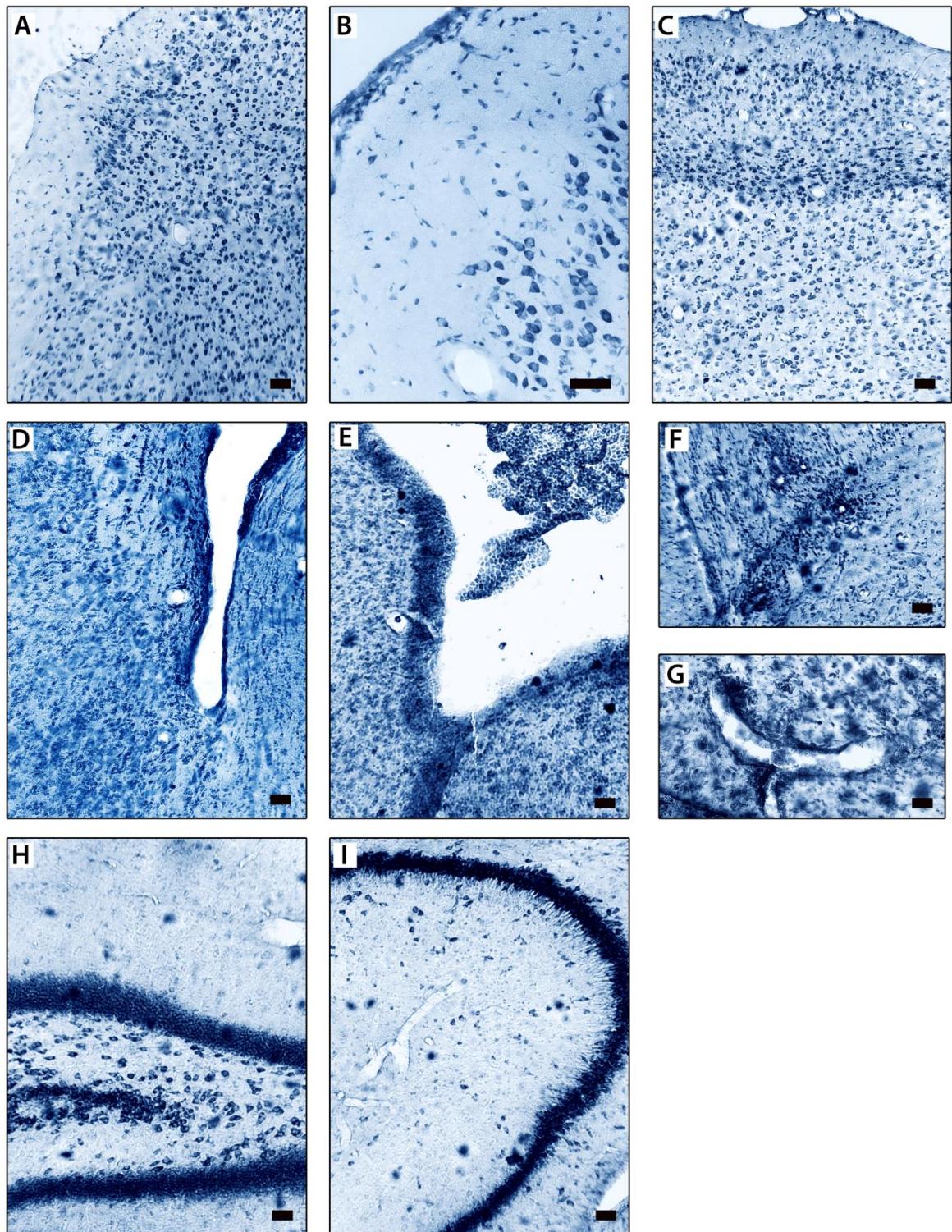


Figura 27. Tinción con azul de toluidina de cortes sagitales de cerebro del grupo EAE. **A.** Corteza frontal, capas I a IV. **B.** Acercamiento de la corteza frontal, donde se observan las neuronas de las capas I y II-III. **C.** Resto de la corteza. **D.** Extremo ventral del tercer ventrículo. **E.** Extremo ventral del ventrículo lateral, se observa también parte del plexo coroideo. **F-G.** Acercamiento del parénquima ventral al hipocampo y de la región entre los ventrículos tercero y lateral, mostrando vasos aparentemente inflamados e infiltración de células sanguíneas. **H-I.** Hipocampo dorsal, mostrando el giro dentado y CA1-2, respectivamente. Barras = 25 μ m.

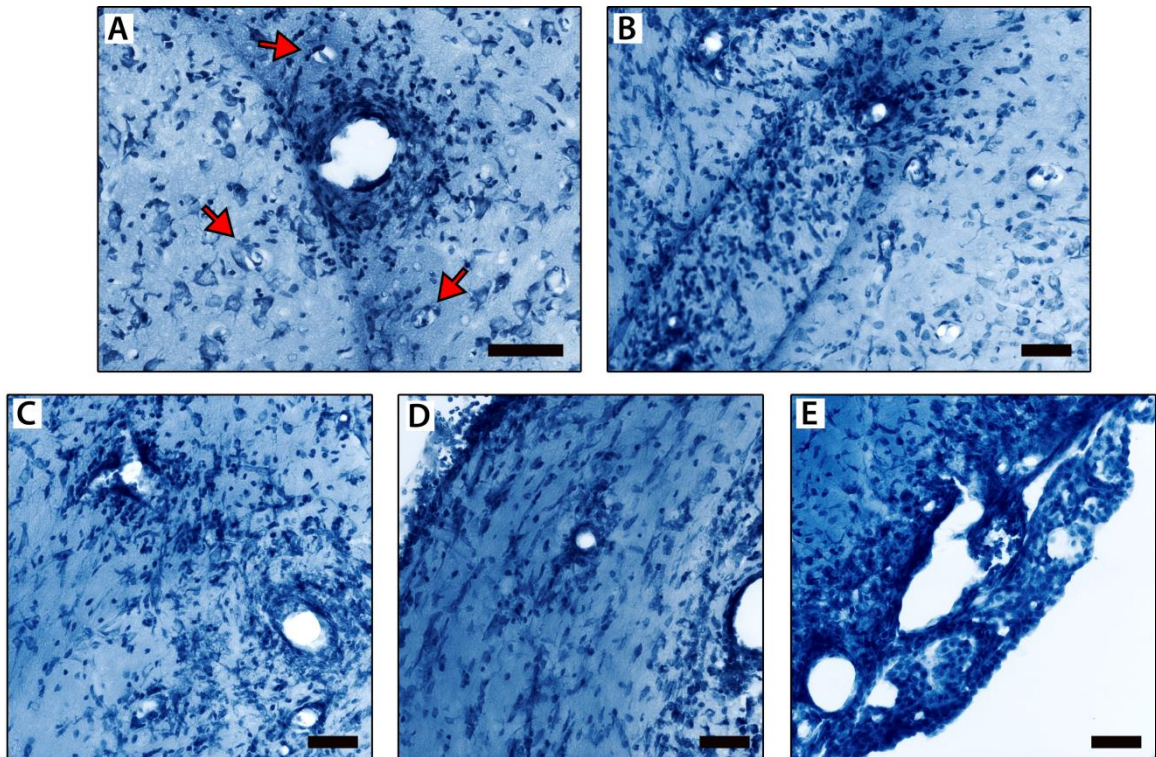


Figura 28. Tinción con azul de toluidina del parénquima cerebral, en el área comprendida entre las cisternas ventrales al hipocampo y el tercer ventrículo, de una rata del grupo EAE (animal EAE1). **A-C.** Vasos sanguíneos del parénquima. Observar lo que parecerían células en proceso de muerte (flechas rojas). **D-E.** Bordes dorsal y rostral, respectivamente, del tercer ventrículo. Barras = 25 μ m.

Solamente en una de las 4 ratas del grupo EAE que se estudiaron, el animal EAE1, se encontró inflamación dentro del cerebro propiamente dicho (Fig. 27 y 28). En la zona debajo del hipocampo, los vasos próximos a las cisternas y al tercer ventrículo aparecían levemente dilatados (en comparación al grupo AFC) y rodeados de un gran número de células pequeñas y redondeadas (característica clásica de células del linaje leucocitario). Esta aparente infiltración también se observó en los bordes del tercer ventrículo (sobre todo en su parte más dorsal) y en las cisternas. Las alteraciones fueron máximas en los cortes más mediales (0,40 a 0,90 mm) disminuyendo hacia el lateral, hasta desaparecer en las regiones más laterales (2,40 mm o posterior). Cercanas a los vasos inflamados, se observaron posibles células en proceso de degeneración o muerte, con los núcleos encogidos y vacuolas (flechas rojas en Fig. 28A; para el análisis detallado de los cortes histológicos nos basamos en la revisión realizada sobre histología del SNC por el patólogo Robert H. Garman, [129]).

A partir de estos resultados, se decidió realizar la marcación de Fluoro-Jade. Éste es un fluorocromo aniónico, derivado de fluoresceína, que tiñe con una alta selectividad a las

neuronas en degeneración (tanto los cuerpos celulares como sus procesos; [130]). No hubo marcación positiva en los animales analizados, ya sean del grupo AFC o EAE (incluso el animal de la Fig. 28, que presentó inflamación, dio negativo para esta prueba; no se muestran las imágenes). Por lo tanto, podemos decir que no habría muerte neural, al menos del tipo que detecta esta técnica, en el cerebro de ratas con EAE en la etapa aguda.

Para estudiar la ocurrencia de desmielinización, se realizó la coloración de azul de luxol rápido. Esta técnica, creada por Klüver y Barrera [131], se basa en la alta afinidad de la ftalocianina de cobre (de color azul) por las lipoproteínas de la mielina de SNC.

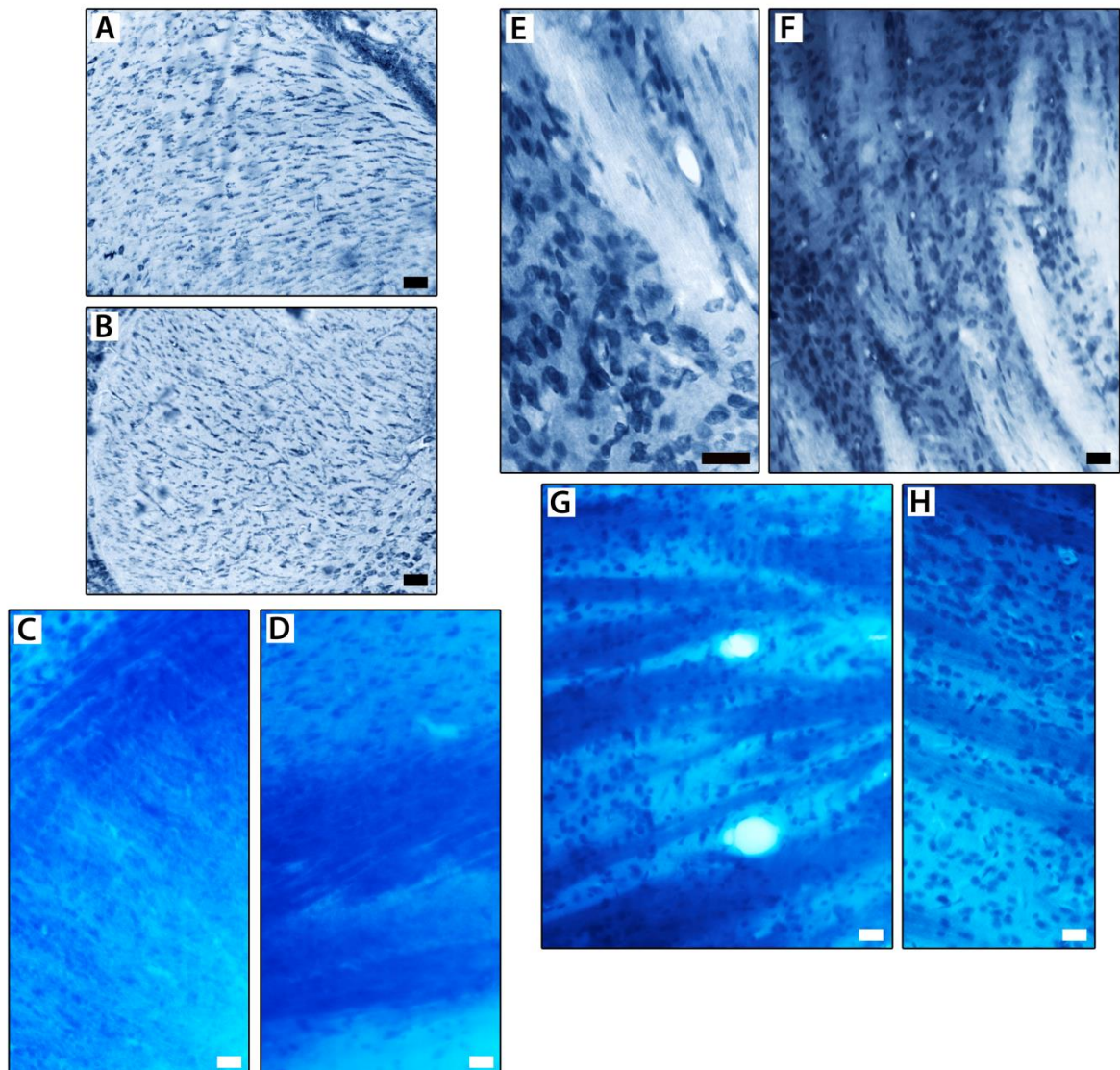


Figura 29. Grupo AFC: Cuerpo calloso visto con azul de toluidina (A-B) y con azul de luxol rápido (C-D), regiones frontal y medial (dorsal al hipocampo), respectivamente. Estriado dorsal marcado con azul de toluidina (E: aumento 40x; F: aumento 20x) y con azul de luxol rápido (G-H). Barras = 25 μ m.

Cuando se tiñeron cortes sagitales de cerebro de los grupos EAE y AFC, se observó la marcación clásica esperada (tanto en cuanto al color como a la distribución; el corte de la Fig. 25 fue teñido de esta manera y corresponde a un animal del grupo AFC). Se analizaron en detalle el cuerpo calloso y el estriado dorsal. Para ambos grupos experimentales se observó la morfología clásica de las estructuras y de las células. No se encontraron en el grupo EAE parches desmielinizados, afinamiento de tractos o fibras de MB, deformación de los cuerpos de los oligodendrocitos o menor celularidad de los mismos (al menos no de manera significativa para la sensibilidad de esta técnica). La intensidad de marcación fue similar en los dos grupos estudiados. Tampoco se encontraron vasos sanguíneos inflamados o infiltración leucocitaria.

Por lo tanto, hasta aquí podemos concluir que en la etapa aguda de la EAE, en el cerebro no ocurre una desmielinización masiva (evidenciable por esta técnica), particularmente en fibras del cuerpo calloso y el estriado dorsal.

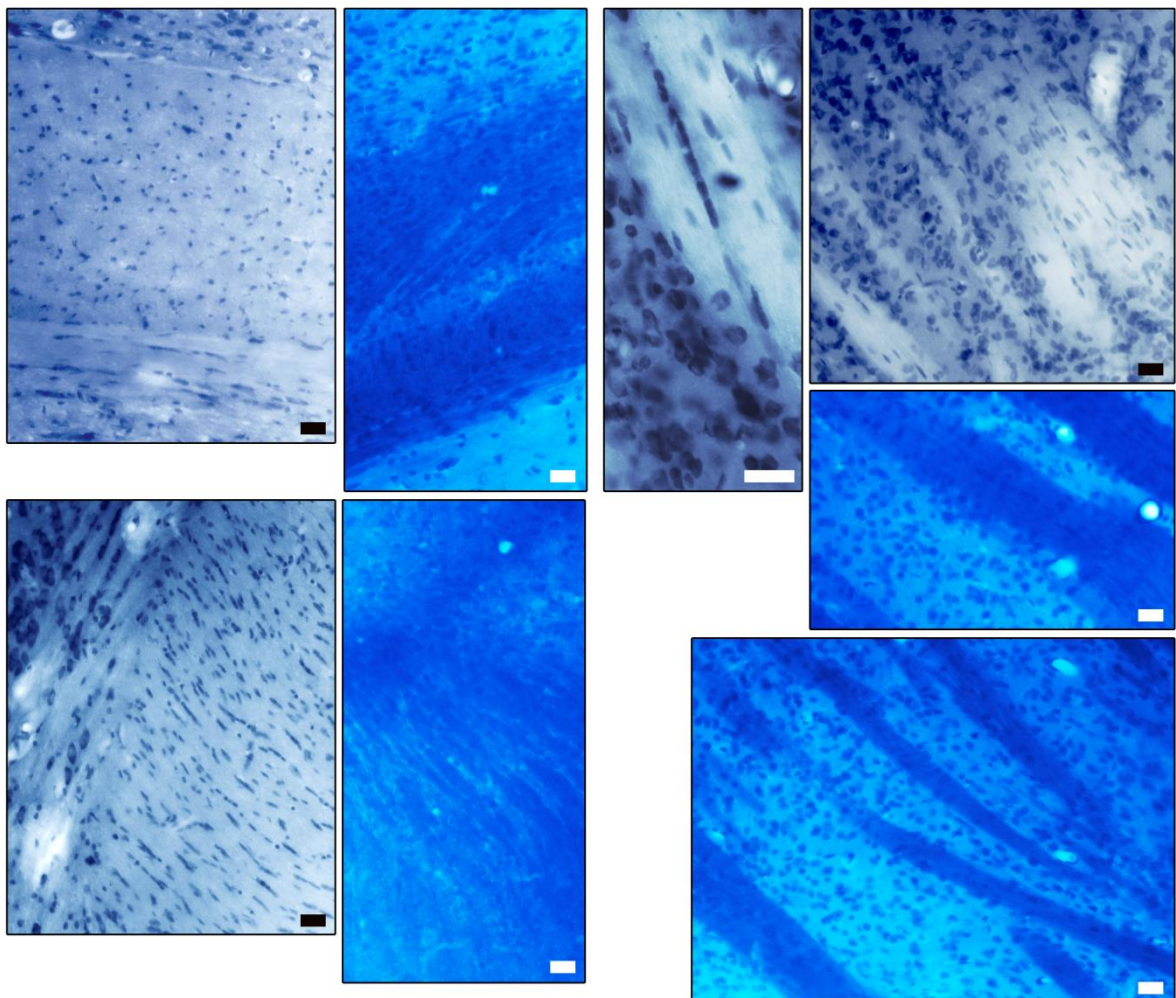


Figura 30. Grupo EAE: Cuerpo calloso visto con azul de toluidina (A, C) y con azul de luxol rápido (B, D), regiones medial (dorsal al hipocampo) y frontal, respectivamente. Estriado dorsal marcado con azul de toluidina (E: aumento 40x; F: aumento 20x) y con azul de luxol rápido (G-H). Barras = 25 μ m.

INMUNOHISTOQUÍMICA: ACTIVACIÓN DE MICROGLÍA Y ASTROCITOS EN EL CEREBRO DE ANIMALES CON EAE

Mediante inmunofluorescencia se analizó la morfología y distribución de microglía y astrocitos en cortes sagitales de cerebro de los grupos AFC y EAE. Como marcador de microglía se utilizó Iba1, la cual es una proteína que interacciona con actina y se postula que tendría un rol en la activación de estas células fagocíticas. La microglía pertenece al linaje de células mieloides, por lo cual comparte la mayoría de los marcadores con ellas. Esto significa que Iba1 no sólo se expresa en microglía, sino también en otras células mieloides residentes de SNC, como macrófagos de meninges y plexo coroideo, y de la sangre, como monocitos y macrófagos perivasculares [132]. Para analizar la activación de la microglía, se clasificaron las células según su morfología siguiendo la regla del “efecto araña” [133]. De esta manera la microglía se divide en tipo I a VI, siendo I el estadio más ramificado (que corresponde a células en reposo y estado de vigilancia en el SNC), y el tipo VI es el de mayor activación (son células migratorias con somas amplios y redondeados, sin ramificaciones).

A pesar de la amplia variedad de patrones de lesión que se observan entre pacientes con EM y entre los distintos modelos de EAE, el sitio primario de ingreso de leucocitos en cerebro sería compartido (a través de los plexos coroideos y los reservorios de LCR) [33] así como el mecanismo de infiltración [3,4]. En base a estos descubrimientos se planteó el modelo de tres compartimientos para la patogénesis de ambas enfermedades, el cual fue discutido en la introducción de esta tesis. Tanto en los cerebros AFC como en los EAE se encontraron células positivas para Iba1 en los plexos coroideos de los ventrículos tercero y lateral (Fig. 31D-G), y en mayor cantidad a la presente en animales naïve (ver [33]). Probablemente se trate de macrófagos residentes del plexo más macrófagos sanguíneos, reclutados como consecuencia de la inflamación periférica sostenida provocada por el adyuvante (como han mostrado otros autores con anterioridad). Estas células presentaron la morfología clásica, en forma de huso, con dos o tres ramificaciones cortas (ver flecha celeste en la Fig. 31E). En el grupo EAE, también se observaron células con los somas deformados (no redondeados) y un mayor grado de ramificación (ver flechas verdes en Fig. 31F-G). En ambos grupos, AFC y EAE, se encontró un contenido similar de células Iba1 positivas en los plexos coroideos, de alrededor de 30-40 células cada 0,01 mm³ (lo cual corresponde a un campo de 210x210 µm y 20 µm de profundidad). La excepción fue el animal EAE1 (ver Fig.

28) el cual presentó poco más de 50 células cada $0,01 \text{ mm}^3$ en el plexo coroideo del tercer ventrículo (Fig. 31G). Además se estudiaron los ventrículos, donde se observó en los animales del grupo EAE microglía activada en los bordes del parénquima con el ventrículo (flechas blancas en la Fig. 31) y macrófagos del plexo asociados al epitelio del ventrículo, los cuales podrían estar en proceso de infiltración (flechas amarillas en la Fig. 31, en línea de puntos se remarcó el límite entre el parénquima y el ventrículo).

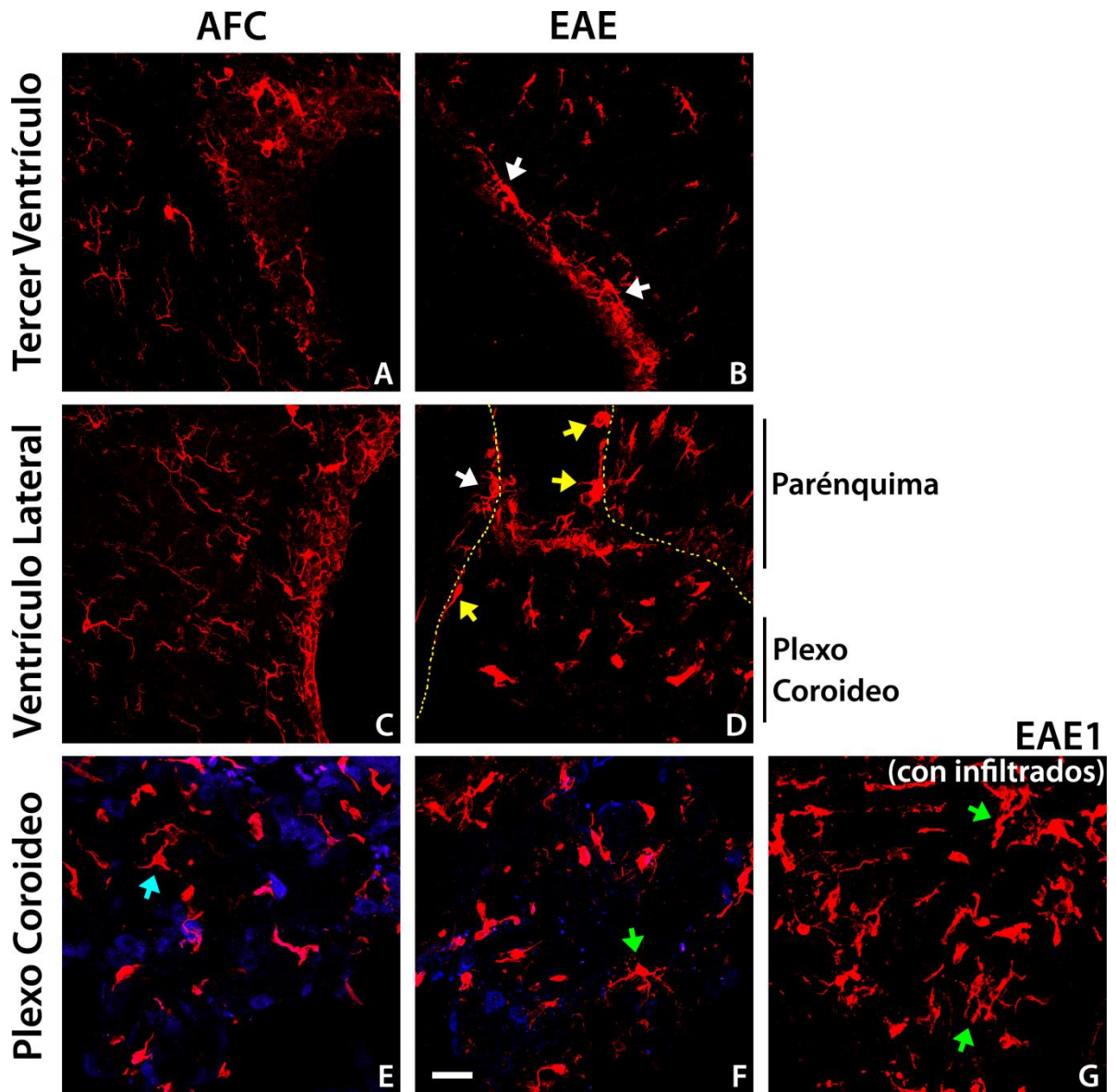


Figura 31. Marcación con *Iba1* en reservorios de LCR. Magnificación: 60x. Barra=25 μm . Se analizaron animales de dos experimentos independientes, N=4 ratas por grupo.

Para analizar a los astrocitos, se empleó como marcador específico la proteína ácida fibrilar de glía (GFAP), la cual constituye un filamento intermedio que se encuentra en el soma y los procesos de estas células nerviosas. El estado de activación de astrocitos tam-

bién se determinó a través de su morfología, clasificándose en tres estadios, donde I es el más basal (con somas pequeños y procesos largos y muy finos) y III es el de mayor activación (con somas amplios, mayor número de procesos y ramificaciones de gran grosor, y aumento en la expresión de GFAP) [134].

En comparación al grupo AFC, en los bordes de los ventrículos de los cerebros del grupo EAE se encontró una mayor activación de astrocitos, ya que estas células mostraron mayor intensidad de fluorescencia y procesos de mayor grosor (Fig. 32). Hacia el interior del parénquima, tanto en el tejido circundante como en los vasos sanguíneos, no se observaron diferencias entre ambos grupos experimentales.

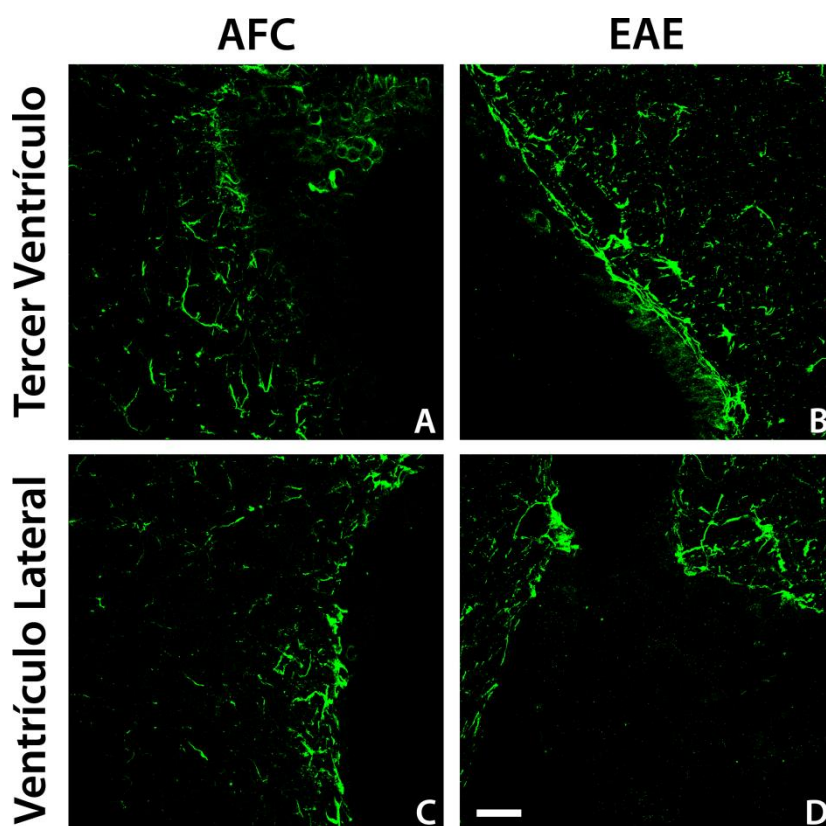


Figura 32.
 Marcación de astrocitos con GFAP en reservorios de LCR en cerebro. Magnificación: 60x. Barra=25 μ m. Se analizaron animales de dos experimentos independientes, N=4 ratas por grupo.

Los resultados de estos primeros estudios, junto con las tinciones discutidas anteriormente, muestran que el modelo agudo de EAE en ratas de nuestro laboratorio tiene características histológicas comparables a las descritas en otros modelos, en cuanto a su distribución anatómica, aunque la inflamación sería más moderada y contenida.

El objetivo de esta sección es dilucidar las posibles causas de las alteraciones presinápticas descritas a principios de este capítulo. Por esta razón, a continuación profundizaremos en el estudio del estado de activación de microglía y astrocitos en la corteza cerebral de animales de los grupos AFC y EAE, con énfasis en las diferencias, si existieran, entre la región frontal y el resto.

A diferencia del grupo AFC, en la corteza frontal del grupo EAE se encontró activación de microglía así como también de astrocitos, siendo en algunos animales más evidente que en otros, pero siempre mayor al animal AFC correspondiente. En la Fig. 33 se muestran imágenes representativas de dos animales del grupo EAE, de experimentos independientes, para ejemplificar los casos de mayor y menor activación encontrados dentro de este grupo experimental, con su correspondiente animal AFC hacia la parte inferior de la figura. Esta activación de astrocitos y microglía fue más evidente en las capas corticales más externas (I a III), es decir, más cercanas a las meninges. Allí, en las meninges, se observó marcación con Iba1 de células mieloides redondeadas, muy posiblemente macrófagos, tanto en el grupo AFC como en el EAE (ver flecha amarilla en la Fig. 33E), así como también activación de astrocitos parameningeos (ver flechas blancas en la Fig. 33A-B). Esto, como se discutió para el caso de los ventrículos y los plexos, podría ser producto de la inflamación periférica que provoca el adyuvante, cuyas señales y/o células se filtrarían al LCR.

En el resto de la corteza de ambos grupos experimentales también se observaron macrófagos en las meninges (flecha amarilla en la Fig. 34E) y activación moderada de microglía y astrocitos parameningeos (flechas blancas en la Fig. 34A-B). En el grupo EAE hubo activación de microglía en las capas corticales más externas pero, en comparación con la región frontal, la activación de astrocitos fue menor y comparable al grupo AFC.

Por lo tanto, estos resultados indicarían que las alteraciones presinápticas discutidas anteriormente podrían ser causadas, al menos en parte, por activación de la glía en la corteza frontal. Sin embargo, con estos estudios no podemos explicar cuál es el fundamento del comportamiento diferencial entre estas dos regiones de la corteza cerebral de ratas.

Por otra parte, debido a la localización de los infiltrados observados mediante coloraciones en el animal EAE1 (Fig. 28), y teniendo en cuenta estudios en otros modelos crónicos de EAE donde describen alteraciones neuronales en estructuras subcorticales como el cuerpo estriado y el hipocampo, decidimos analizar la activación de microglía y astrocitos también en esas áreas cerebrales. El análisis cualitativo de estos resultados, en conjunto con los de corteza, se muestran en la tabla 3. Resumidamente, no se encontró activación de glía en el hipocampo tanto del grupo AFC como del EAE, y en el estriado dorsal sólo se observó una leve tendencia a mayor activación de astrocitos en algunos vasos sanguíneos dispersos en el grupo EAE.

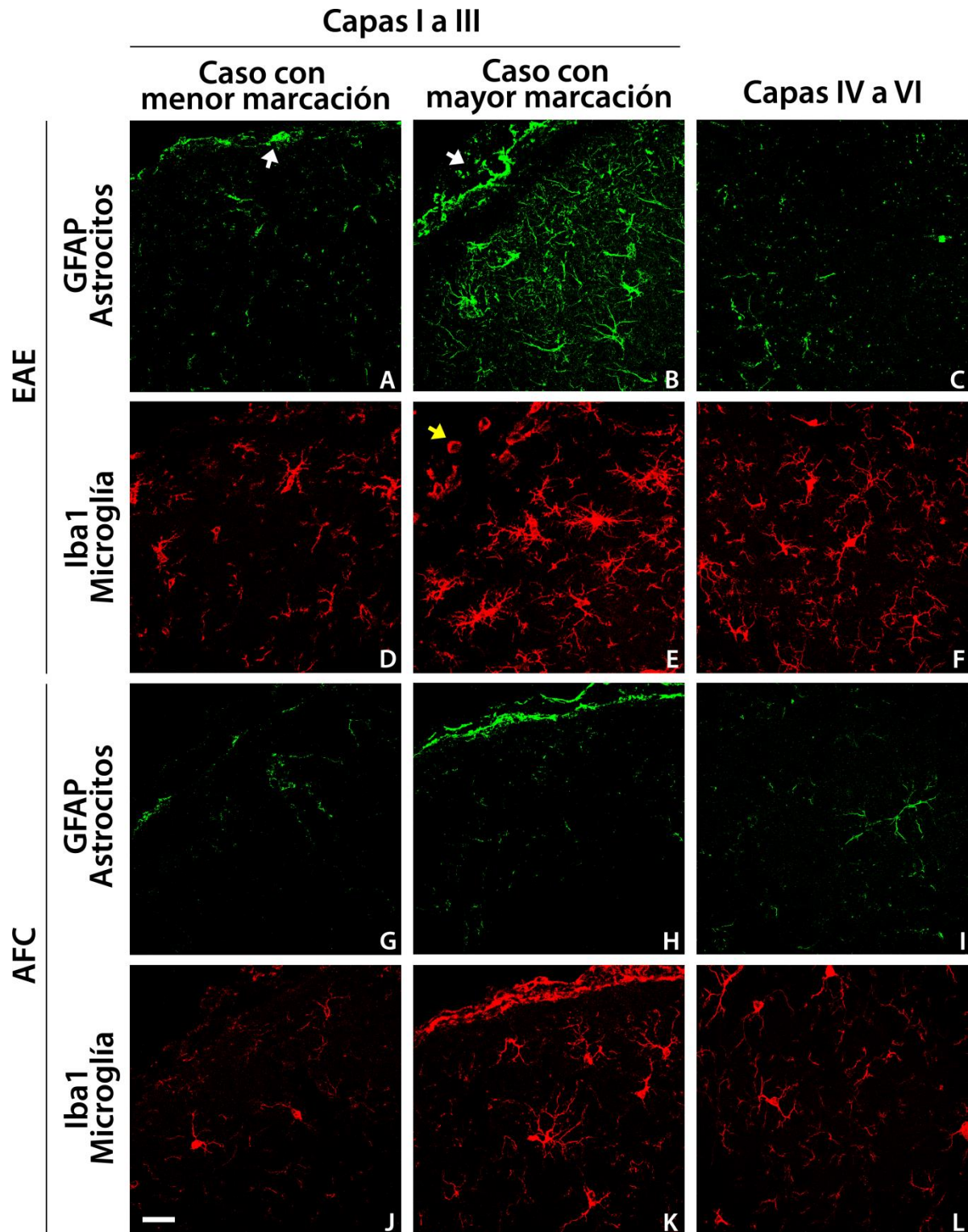


Figura 33. Imágenes representativas de las inmunofluorescencias de Iba1 (microglía, en color rojo) y de GFAP (astrocitos, en color verde) en la corteza frontal de los grupos AFC y EAE.

El animal EAE y AFC de cada caso (ya sea menor o mayor intensidad de marcación) pertenecen al mismo experimento (es decir, son de la misma cruce, y fueron perfundidos y marcados por inmunofluorescencia al mismo tiempo).

Magnificación: 60x. Barra=25 μ m.

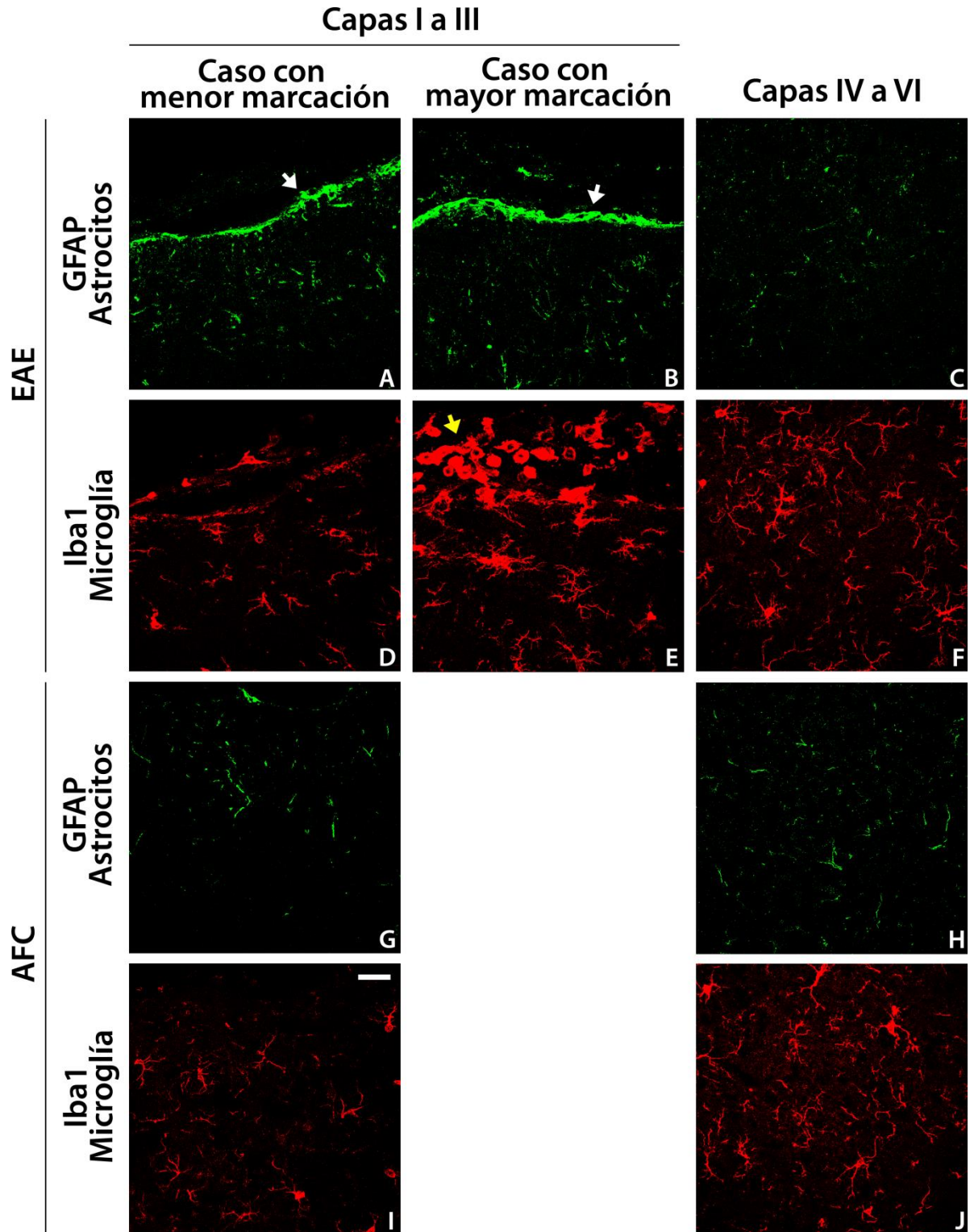


Figura 34. Imágenes representativas de las inmunofluorescencias de Iba1 (microglía, en color rojo) y de GFAP (astrocitos, en color verde) en el resto de la corteza de los grupos AFC y EAE.
Magnificación: 60x. Barra=25 μ m.

		Microglía		Astrocitos	
		AFC	EAE	AFC	EAE
CORTEZA FRONTAL	Capas I a III	I (mayoría) y II	I, mayoría II y III, IV	I en parénquima, II perimeníngeos	I y II (mayoría), III Proliferación
	Capas IV a VI	I (mayoría) y II	I y II	I	I (mayoría), II
RESTO DE LA CORTEZA	Capas I a III	I (mayoría) y II	I, II (mayoría), III perimeníngeos y perivasculares	I en parénquima, II perimeníngeos	I en parénquima, II perimeníngeos y perivasculares
	Capas IV a VI	I (mayoría) y II	I y II	I	I
RESERVORIOS DE LCR	Meninges corticales	Células mieloides redondeadas	Mayor número de células mieloides redondeadas que AFC	--	--
	Tercer Ventrículo	I y II en parénquima, III en bordes	I y II en parénquima, III y IV en bordes	I en parénquima, II en bordes	I en parénquima, II en bordes
	Ventrículo Lateral	I en parénquima, II en bordes	I en parénquima, II y III en bordes (plexo coroideo)	I en parénquima, II en bordes	I en parénquima, II en bordes
	Cisternas	I y II	I y II (mayoría), III	I	I (mayoría), II
ESTRUCTURAS SUB-CORTICALES	Estriado Dorsal	I (mayoría), II	I (mayoría) y II perivasculares	I, baja celularidad	I, posibles II perivasculares
	Hipocampo	I (mayoría), II	I (mayoría) y II	I, alta celularidad	I, alta celularidad

Tabla 3. Análisis cualitativo del grado de activación de la microglía y los astrocitos observados en las diferentes regiones cerebrales de los grupos experimentales. Animales de dos experimentos independientes, N=4 ratas por grupo.

Para finalizar, cabe destacar que se observó activación de microglía y astrocitos en el grupo EAE en áreas cerebrales ricas en mielina, tales como el quiasma óptico y el tejido circundante, el tracto que conecta con el bulbo olfatorio, el tálamo y el tallo encefálico (no se muestran imágenes). Estos resultados van de la mano con hallazgos previos de nuestro laboratorio, como así también de otros grupos de investigación.

PCR EN TIEMPO REAL: EXPRESIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS EN LA CORTEZA FRONTAL DE ANIMALES CON EAE

En un intento por relacionar las alteraciones histológicas encontradas en la corteza frontal de los animales con EAE y los defectos presinápticos, se analizaron los niveles de ARN mensajeros correspondientes a los principales mediadores y marcadores inflamatorios de esta patología.

La citoquina pro-inflamatoria IL-1 β es esencial para la generación de la EAE, ya que animales que no poseen el gen para esta citoquina o para su receptor principal (IL-1R1) no desarrollan la patología [135]. Otra citoquina pro-inflamatoria, TNF α , tendría un rol en la inducción de la EAE y la primera infiltración del SNC, a través de la regulación de la expresión de quemoquinas [136]. Ambas, IL-1 β y TNF α , son capaces de modular la transmisión sináptica [37] e inducen la producción de IL-23 [137], una citoquina esencial para la diferenciación de células T_H17 (quienes son indispensables para la infiltración en cerebro durante la EAE; [25]). Para que ocurra el proceso de infiltración y se desarrolle la EAE, es también necesaria la secreción de IL-6, una citoquina que participa en el direccionamiento de las células inflamatorias hacia el tejido blanco [138]. IL-6 también media la activación de microglía y astrocitos [139]. La conversión de los astrocitos en su forma activa se denomina astrogliosis reactiva, cuyo marcador más antiguo y mejor caracterizado es la acumulación de filamentos gliales, principalmente GFAP [140]. Otro marcador clásico de activación de astrocitos (y del resto de la glía) es el aumento en la expresión de proteína neurotrófica S100B [141].

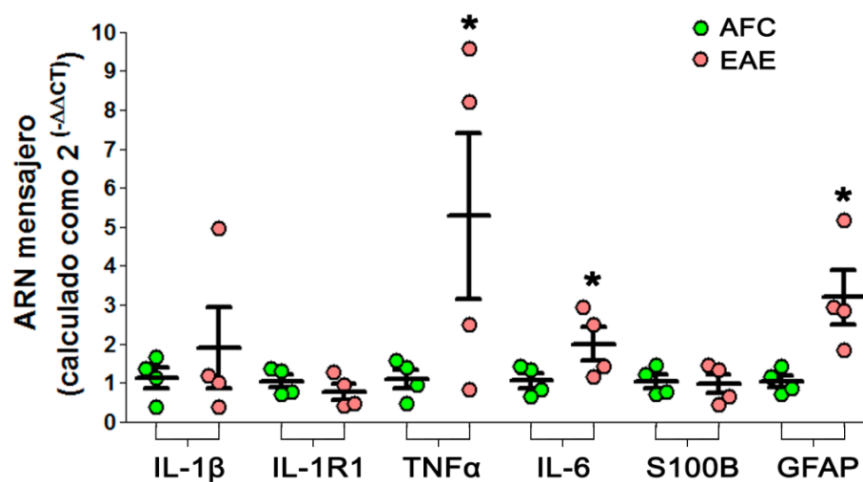


Figura 35. Niveles relativos de ARN mensajeros para citoquinas y otros marcadores inflamatorios, en la corteza frontal. Resultado de un solo experimento, N=4 ratas por grupo (* $p < 0,05$).

En base a estos antecedentes, se analizaron los niveles de ARN mensajero de IL-1 β y su receptor IL-1R1, TNF α , IL-6, GFAP y S100B en extractos de corteza frontal de animales de los grupo AFC y EAE (Fig. 35). Para nuestra sorpresa, no se encontraron diferencias en la expresión de IL-1 β e IL-1R1. Sólo un animal, de un total de cuatro, presentó un incremento considerable en los niveles de IL-1 β . Por el contrario, la expresión de TNF α se vio signifi-

tivamente elevada en el grupo EAE, hasta 8-10 veces en algunos animales. Este aumento se vio acompañado de mayores niveles en los ARN mensajeros de IL-6 y GFAP, corroborando la presencia de astrocitos reactivos en la corteza frontal observados por técnicas histológicas. La expresión del marcador de daño cerebral S100B no se encontró modificada en la etapa aguda de la EAE.

En conjunto, estos resultados preliminares indicarían que, a diferencia de lo que ocurre en médula espinal, no existiría infiltración leucocitaria en la corteza frontal en nuestro modelo agudo de EAE ni daño neuronal masivo. En esa región ocurre una activación moderada de microglía y astrocitos, acompañada del aumento en la expresión de los mediadores inflamatorios TNF α e IL-6, los cuales podrían contribuir de las alteraciones bioquímicas y funcionales encontradas en la transmisión sináptica excitatoria. Un análisis más detallado sería necesario para revelar en detalle los mediadores de las alteraciones observadas.

DISCUSIÓN



Quand on est enfin arrivé à la certitude, on éprouve l'une des plus grandes joies que puisse ressentir l'âme humaine.

Louis Pasteur.

I. MATERIA BLANCA Y MATERIA GRIS EN EM Y EAE

La EM es una patología compleja, que involucra a los sistemas inmune y nervioso, y afecta tanto a la MB como a la MG en todo el SNC. Mientras los ciclos de desmielinización/remielinización se asocian a la aparición de discapacidad física (principalmente motriz) y a ciertos síntomas psicológicos (depresión, ansiedad), la neurodegeneración sería la responsable de la acumulación irreversible de discapacidad cognitiva (fatiga cognitiva, problemas en el procesamiento de información y la memoria) [142,143]. A su vez, la localización de las lesiones en el SNC determina las diversas manifestaciones clínicas que caracterizan a esta enfermedad (muy variables entre pacientes) [13,45,144].

A diferencia de lo que sucede en la EM, en los modelos clásicos de EAE se encuentra comprometida predominantemente la médula espinal, con una menor participación del cerebro. Esto hace que el signo clínico típico sea el desarrollo de parálisis flácida ascendente [30,13]. Sin embargo, recientemente la participación de distintas regiones cerebrales ha comenzado a analizarse en diferentes modelos de EAE (ver las reseñas [145,146]). Particularmente, en modelos de EAE crónica se ha descrito una pérdida progresiva de mielina, axones, oligodendrocitos y neuronas, junto con activación de microglía y astrocitos e infiltración leucocitaria. Esto se observó tanto en la MB como en la MG del cerebelo y de diversas áreas del cerebro, como el hipocampo, el cuerpo estriado (caudado-putamen), el cuerpo calloso y la corteza cerebral [52,56,34,39,53]. Estas alteraciones, al igual a lo observado en EM, fueron correlacionadas con diferentes cambios comportamentales como ansiedad, depresión, déficit en el aprendizaje y pérdida de memoria [50,51]. En este sentido, en nuestro grupo se describieron alteraciones bioquímicas en regiones extramielínicas del cerebro de ratas con EAE [147]. Posteriormente, nuestro grupo también fue el primero en mostrar fallas en la liberación del neurotransmisor excitatorio glutamato en la corteza cerebral durante la etapa aguda de la EAE [95]. Estos hallazgos fueron corroborados por otro grupo, en un modelo crónico de EAE en ratones [27], indicando que podría tratarse de un mecanismo patológico conservado.

En esta tesis se exponen cambios bioquímicos en la maquinaria que regula la disponibilidad de las VSs para excitar, los cuales se encontrarían concentrados en la región frontal de la corteza. A pesar de las diferencias anatómicas, las cortezas frontales de murinos y primates comparten propiedades funcionales y de conectividad [148-150], las cuales implican principalmente procesos cognitivos superiores [151]. En pacientes con EM, el

grado de actividad de esta región así como la integridad de sus conexiones con los ganglios basales se ha asociado fuertemente con el desarrollo de fatiga central o cognitiva [46], uno de los síntomas más comunes e inhabilitantes de esta patología [152]. Sin embargo, se conoce muy poco acerca de las bases moleculares de estos cambios funcionales. En personas enfermas con EM se ha descrito acumulación de Na^+ y fallas mitocondriales como consecuencia de la desmielinización, tanto en corteza como en regiones subcorticales [48]. En la corteza frontal, se encontró disminución en el metabolismo de glucosa, pérdida de volumen de MG (en casos avanzados), perturbación de conexiones y cambios en los niveles de activación neuronal [45,153-155]. Alteraciones que correlacionan altamente con el grado de fatiga cognitiva y el deterioro en la memoria de trabajo^o. En modelos animales de EAE la corteza frontal en sí misma no ha sido explorada, sin embargo se ha informado inestabilidad en las conexiones sinápticas corticales en etapas tempranas y pérdida de volumen de MG cortical en etapas tardías, equivalentes a lo observado en humanos [53,50]. Teniendo en cuenta las similitudes entre la EAE y la EM, los mecanismos descritos en nuestro laboratorio podrían también ser responsables de las alteraciones en la corteza frontal de pacientes con EM y contribuir a la progresión del daño cognitivo.

II. DISFUNCIÓN NEURONAL EN EM Y EAE

Como se mencionó varias veces en esta tesis, las bases moleculares de la disfunción neuronal en EM no se conocen en detalle. Estudios recientes de metabolómica mostraron que existe una correlación entre los niveles de metabolitos en los lóbulos frontales de pacientes con EM y ciertas manifestaciones clínicas (estrés y deterioro cognitivo, pero no fatiga) [156]. Particularmente, describen una disminución en los niveles de N-acetil aspartato (lo cual es marcador de neurodegeneración), cambios en contenido de colina, inositoles y lípidos (indicadores de disrupción de mielina e inflamación), e informan un aumento de glutamato en la MB mientras sus niveles se encontraron disminuidos en las lesiones. En cuanto a la disfunción neuronal en la EAE, nuestro grupo ha reportado previamente una disminución en la liberación de glutamato dependiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en terminales nerviosas corticales [95]. Esto se vio acompañado de fallas en la fosforilación de Syn1 y disminución en la densidad de receptores GABA_A en la membrana sinaptosomal [41]. En sinaptosomas purificados de cerebro, otros investigadores informaron un aumento en receptores meta-

^o La **memoria de trabajo** es una memoria de tipo activa (no se almacena a largo plazo) y es el resultado de un proceso complejo que involucra el monitoreo, integración y manipulación de información para realizar una acción o tomar una decisión dirigida a un objetivo.

botrópicos e ionotrópicos excitatorios y proteínas transportadoras de glutamato, siendo esto último una posible respuesta adaptativa al insulto excitotóxico [157,158].

Continuando con los trabajos previos de nuestro laboratorio, durante esta tesis pudo demostrarse que las alteraciones sinaptosomales que ocurren a nivel de la corteza cerebral se encontrarían concentradas en la región frontal y aparecen conjuntamente con los signos clínicos clásicos de EAE, mostrando ambas manifestaciones patológicas un curso temporal coincidente y agudo. Profundizando en el análisis de la cinética de liberación de glutamato, se encontró que tanto la cantidad total de neurotransmisor liberado como la velocidad inicial de liberación se encuentran disminuidas en los primeros días de la etapa aguda de la enfermedad, retornando a valores similares al control cuando los animales se recuperan completamente de los signos clínicos (es decir, al recobrar una motricidad normal). Notablemente, el contenido total de glutamato de los sinaptosomas fue similar para todos los grupos experimentales estudiados. Además, coincidiendo con los hallazgos previos en sinaptosomas de corteza completa [95], se mostró de manera indirecta que solamente la liberación dependiente del influjo de Ca^{2+} a través de CCAV se encuentra reducida en terminales nerviosas de la corteza frontal. Cabe mencionar que estudios previos mostraron que la reducción en la liberación de glutamato se mantiene cuando es inducida con el ionóforo de Ca^{2+} ionomicina [95]. En ese trabajo también se analizó el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ utilizando la sonda Fura-2 AM y se concluyó que el influjo de dicho catión ocurre en la misma medida en animales controles (AFC) y EAE enfermos y recuperados. Todos estos datos nos llevaron a hipotetizar que la disfunción en las terminales nerviosas de la corteza frontal de ratas en la etapa aguda de la EAE se debería principalmente a problemas en la maquinaria molecular que regula la liberación de neurotransmisor, antes que a una disfunción de canales iónicos (aunque no podemos descartar que estos últimos estén contribuyendo).

En base a lo expuesto, el objetivo central de este trabajo fue explicar el mecanismo responsable de dicha falla en la liberación de glutamato. Para este estudio nos enfocamos en la vía de señalización que involucra a Syn1. Esta decisión se basó en dos hechos. En primer lugar, Syn1 es la fosfoproteína más abundante en terminales nerviosas y, a través de la interacción con otras syns, F-actina y VSs, controla la disponibilidad de las VSs para excitar [71,73]. En segundo lugar, en nuestro laboratorio se determinó que células T y anticuerpos anti-PBM reaccionan de manera cruzada con Syn1 [113], e híbridos de porciones

de SynI fusionados a la subunidad B de la toxina colérica, cuando son administrados vía oral, pueden reducir la inflamación y los signos clínicos de la EAE [26].

SynI posee nueve sitios de fosforilación, la combinación del estado de fosforilación en cada uno de ellos regula la afinidad de esta proteína por las moléculas con las que interacciona, tal como se describió en la introducción de esta tesis. Los sitios de fosforilación de SynI más estudiados son aquellos que son sustratos de las enzimas Erk1/2, PKA y CaMKII. Erk1/2 fosforila los sitios 4/5 (Ser 62/67) de SynI y tiene un efecto dual sobre la liberación de neurotransmisor. Tanto la sobreexpresión de la forma fosforilada constitutivamente como de la no fosforilable de SynI en los sitios de Erk1/2 tienen un efecto perjudicial sobre el ciclado de las VSs [81]. Es más, Erk1/2 regula negativamente la expresión en la membrana de CCAVs tipo L en neuronas, limitando la exocitosis e inhibiendo la potenciación post-tetánica de manera dependiente de la fosforilación de SynI en los sitios 4/5 [159,160]. Nuestros estudios muestran un incremento en los niveles totales de la proteína Erk1/2 así como en su estado de fosforilación (y por lo tanto de activación) luego de la estimulación con 4-AP en sinaptosomas del grupo EAE. Al mismo tiempo, SynI se encontró más fosforilada en los sitios 4/5 en estado basal, manteniéndose esta diferencia a tiempos cortos post-despolarización y tendiendo a los valores del control a tiempos largos. En cultivos primarios de neuronas, se ha descrito que SynI muestra una distribución difusa en las terminales y a lo largo de los axones (a diferencia de su clásica localización puntual en los botones sinápticos) cuando se encuentra pseudo-fosforilada constitutivamente en los sitios de Erk1/2 [161]. Considerando que la fosforilación de dichos sitios sólo afecta la interacción de SynI con F-actina, pero no con las VSs, nuestros resultados sugieren que los agregados de VSs podrían estar más dispersos en terminales en reposo de la corteza frontal durante la EAE, y por ende las VSs no estarían posicionadas correctamente para responder al estímulo despolarizante.

Por otro lado, la fosforilación de SynI en los sitios 2 y 3 por CaMKII produce un cambio conformacional muy dramático en la proteína, disminuyendo de esta manera su afinidad tanto por las membranas de las VSs como por los filamentos de actina [79,77]. En consecuencia, los agregados de vesículas se dispersan posibilitando la movilización y fusión de las VSs en la ZA. La fosforilación de SynI en el sitio 1 (sustrato de PKA y CaMKI) tiene el mismo efecto, aunque menos drástico [162]. Nuestro grupo ha informado previamente, en sinaptosomas corticales purificados durante la etapa aguda de la EAE, una bajada significa-

tiva en la cinética de fosforilación de SynI en el sitio 1 [95]. Ampliando estos estudios, aquí mostramos que, en la corteza frontal, los defectos en la liberación de glutamato se vieron acompañados de una reducción en los niveles basales de CaMKII α asociada a los agregados de VSs y una disminución en el curso temporal de fosforilación de SynI en el sitio 3 luego de la despolarización. Conjuntamente, la dispersión de SynI inducida por 4-AP se encontró impedida, permaneciendo unida a las VSs (tanto las de reserva como las ancladas a membrana). El mecanismo mediante el cual CaMKII α disgrega a las VSs, con SynI como intermediaria, fue demostrado hace pocos años [118]. La forma funcional de esta quinasa se compone de dos anillos hexaméricos, donde cada monómero tiene una masa de ≈ 50 KDa. Es decir, se trata de una enzima de gran tamaño, midiendo aproximadamente 12 nm de diámetro por 6 nm de grosor [163]. Esta característica hace que, en terminales en reposo, se ubique en la periferia de los agregados de VSs. Cuando CaMKII α se activa por unión de Ca²⁺-calmodulina, fosforila a SynI en las VSs de la periferia provocando su liberación de los agregados. De esta forma, a medida que las vesículas más externas se van dispersando, la quinasa va ganando acceso a regiones más internas de los agregados [118]. Basándonos en este mecanismo de acción, nuestras observaciones en los sinaptosomas del grupo EAE pueden explicarse según un modelo en el cual una menor cantidad de CaMKII α unida inicialmente a los agregados de VSs produce una menor fosforilación de SynI en el sitio 3 en las vesículas periféricas. Esto lleva a una menor dispersión de SynI y de VSs, con la consecuente menor penetración de la quinasa en los agregados, en un ciclo de retroalimentación negativa. Además, tanto los niveles basales como la redistribución hacia las membranas sinaptosomales de CaMKII α fueron similares para los grupos AFC y EAE, sugiriendo que solamente el reclutamiento de esta enzima hacia los agregados de VSs (pero no a la ZA) se encuentra afectado durante la enfermedad (probablemente debido a las diferencias en composición proteica entre ambas membranas). Apoyando dicho modelo, los estudios de microscopía electrónica mostraron una reducción en la movilización de las VSs hacia la ZA y la consecuente reposición del RRP ante estimulación sostenida (sin observarse alteraciones morfológicas significativas). Todo esto nos lleva a concluir que la disponibilidad de las VSs para exocitar se encuentra disminuida durante la EAE en la región frontal de la corteza.

Mientras PP2A (la fosfatasa que actúa sobre SynI en los sitios de CaMKII) tiene una actividad basal constante, CN (la enzima que desfosforila a SynI en los sitios de Erk1/2), es activada por el aumento de [Ca²⁺]_i [78]. CN, además, es la única fosfatasa que regula a las defosfinas, un grupo de proteínas esenciales para los diferentes pasos del proceso de en-

docitosis mediada por clatrina [70]. De esa forma controla el reciclado de las VSs luego de la exocitosis. Este reciclado también es dependiente del dinamismo de los filamentos de actina, lo cual a su vez es regulado por Erk1/2 [119]. Cuando analizamos a CN en sinaptosomas del grupo EAE, se la encontró elevada, tanto en el citoplasma como en las membranas sinápticas. Teniendo en cuenta lo discutido hasta aquí, podemos dividir las alteraciones en sinaptosomas del grupo EAE en dos etapas: En reposo y a tiempos cortos (cuando $[Ca^{2+}]_i$ es bajo) el incremento en los niveles y el estado de activación Erk1/2 llevaría al aumento en el estado basal de fosforilación de Syn1 y, posiblemente, en el dinamismo de actina, lo cual perturbaría la organización de la presinapsis. A tiempos largos (más de un minuto luego de la estimulación), la actividad de CN se volvería considerable llevando, por un lado, a la caída en los niveles de fosforilación de Syn1 en los sitios 4/5 hacia valores controles y, por otro lado, a posibles defectos en la endocitosis. La exocitosis y la endocitosis no ocurren independientemente, sino que se encuentran estrechamente acopladas e incluso comparten parte de la maquinaria molecular [164]. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que ambos procesos podrían estar impedidos en terminales nerviosas de la corteza frontal durante la EAE. Es más, ya que CN y Erk1/2 también afectan el dinamismo de actina, los pasos finales de endocitosis y el correcto reciclado de las vesículas podrían encontrarse limitados. Sería de sumo interés para el laboratorio probar esta hipótesis. Utilizando metodologías de imagen *in vivo* de rodajas de corteza frontal podrían medirse velocidades de exocitosis, endocitosis y reacidificación de VSs, así como el dinamismo de actina y la dispersión de Syn1. Este tipo de experimentos podrían, idealmente, acoplarse con técnicas electrofisiológicas y análisis por microscopía electrónica. De esta manera, no sólo podría describirse en detalle el mecanismo de la disfunción neuronal en la EAE, sino que también se tendría una noción de las alteraciones que ocurren en un contexto más completo y complejo que el de los sinaptosomas.

III. INFLAMACIÓN EN EM Y EAE

Otro objetivo de esta tesis fue indagar las posibles causas de los cambios bioquímicos en las terminales nerviosas de los animales con EAE. En este sentido, debemos recordar que esta patología experimental posee un importante componente inflamatorio, al igual que sucede en la enfermedad en humanos. Ocurre infiltración de leucocitos y gliosis a lo largo de todo el SNC, y estas células activadas secretan una variedad de mediadores proinflamatorios, entre ellos citoquinas y glutamato, lo cual produce daño neuronal y excito-

toxicidad [37,165]. En esta tesis se encontraron elevados los niveles de las enzimas Erk1/2 y CN, en sinaptosomas de la corteza frontal en el grupo EAE. La activación de Erk1/2 y su cascada se ha asociado a la aparición de infiltrados en la médula espinal en otros modelos de EAE aguda en ratas [166]. La vía de Erk1/2 a su vez se vio implicada en la generación de tolerancia a insultos excitotóxicos a través de la activación sub-letal de los receptores ionotrópicos de glutamato llamados NMDAR [167]. Por el contrario, la sobreactivación de dichos NMDAR se asocia a excitotoxicidad y neurodegeneración en numerosas patologías, entre ellas EAE y EM. En este contexto, la citoquina IL-6 y el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, por su sigla en inglés) demostraron ser neuroprotectores. Este efecto es dependiente de la activación de la vía de Erk1/2 y sus efectores corriente abajo [168,169]. Por otro lado, en las células gliales la fosfatasa CN es fuertemente inducida por citoquinas pro-inflamatorias. En neuronas, la citoquina pro-inflamatoria TNF α produce la liberación de Ca²⁺ desde reservorios intracelulares y la activación de CN, lo cual a su vez desencadena cascadas de apoptosis [170,171]. Inhibidores de CN poseen propiedades inmunosupresoras y se emplean en medicina para evitar o disminuir el rechazo de órganos en pacientes trasplantados [172]. Por estas razones, sospechamos que los aumentos observados en los niveles de Erk1/2 y de CN en terminales nerviosas del grupo EAE podrían ser el reflejo de una respuesta neuronal ante la excitotoxicidad y la presencia de citoquinas pro-inflamatorias en la corteza frontal, respectivamente.

Para analizar la presencia y distribución del daño y/o inflamación en el cerebro de las ratas con EAE, como primera aproximación se realizaron tinciones histológicas clásicas en cortes sagitales. El revelado con azul de toluidina mostró un tejido con apariencia normal en los dos grupos estudiados, AFC y EAE, tanto en cuanto a la organización como a la morfología y cantidad de células en las distintas regiones del cerebro. La tinción de luxol rápido también mostró una organización normal de las estructuras de MB en el cerebro de ambos grupos, sin observarse una desmielinización masiva. Además, no se encontraron leucocitos infiltrantes (detectables por estas técnicas) en el cerebro, a excepción de un animal (el EAE1), que presentó infiltrados en la región contenida entre el tercer ventrículo y el ventrículo lateral, acompañados de daño celular y pequeños puntos con desmielinización (datos no mostrados). Esta ausencia de cambios notorios en el cerebro probablemente es consecuencia de que se trata de un modelo agudo, de rápida remisión. En modelos crónicos, caracterizados por un mayor compromiso axonal, infiltración y desmielinización se han descrito en diferentes regiones del cerebro, entre ellas hipocampo, estriado, cuer-

po calloso y corteza [37,36,39,34]. Actualmente, nuestro grupo está ampliando sus estudios a estos modelos crónicos, ya que reflejan aspectos diferentes de la enfermedad humana, EM.

Sin embargo, cabe destacar que muchos de los estudios citados fueron realizados cuando la enfermedad se encontraba claramente establecida, varios días después del comienzo de las manifestaciones clínicas. Otros autores, han descrito una ausencia de infiltración, desmielinización y disrupción de la BHE en regiones cerebrales alejadas de los ventrículos, como es la corteza, en los primeros días de la enfermedad [54]. En el mismo contexto, encuentran estrés oxidativo, acumulación de $[Ca^{2+}]_i$, fallas en la remoción de metabolitos tóxicos por parte de los astrocitos y activación de la microglía, la cual sería responsable de reclutar a las células infiltrantes en estadíos más avanzados de la EAE [173,54]. En concordancia con ello, en nuestro modelo experimental hallamos tanto microglía como astrocitos activados en la corteza frontal, en las primeras 24 hs desde la aparición del primer signo clínico. Esta activación fue más intensa y marcada en la región frontal de la corteza, en comparación con el resto. Reforzando ese resultado, en la corteza frontal también se encontró significativamente elevada la expresión del filamento glial GFAP, un marcador clásico de astrogliosis [140], así como de la citoquina IL-6. Ésta es una molécula señal clave que secretan los astrocitos reactivos, ya que media la secreción de quemoquinas, con el consecuente reclutamiento de leucocitos, la activación de la microglía y la expresión de moléculas de adhesión en la BHE, llevando a su pérdida de integridad [174]. Para que se origine la EAE, la producción periférica de IL-6 no es esencial, sino su liberación dentro del SNC por parte de los astrocitos reactivos [138].

Todos los cambios descritos en esta tesis ocurren en la corteza frontal en ausencia de infiltración evidente, muerte neuronal y/o desmielinización. Esto nos lleva a pensar que la causa de la activación de la glía serían señales periféricas que llegan a esta región. En este sentido, diversos autores demostraron que la inflamación periférica sostenida, causada por inyección de lipopolisacárido o de AFC, provoca un aumento en el número de células inmunes que patrullan el LCR e incrementa la expresión de citoquinas en el SNC, principalmente TNF α , IL-6 e IL-1 β [175,33]. En el período pre-sintomático de modelos de EAE crónica, se ha descrito un aumento en IL-1 β y TNF α en hipotálamo, en ausencia de infiltración, activación de glía o desmielinización [51]. En la misma etapa, TNF α producido en la periferia causa inestabilidad en las conexiones sinápticas en la corteza somatosensorial

[50] (la cual no está incluida en la corteza frontal, con el método de disección aplicado en esta tesis). Estas alteraciones serían responsables de conductas tipo depresivas y otros comportamientos anormales, previos a las manifestaciones clínicas en la EAE, que también son comunes en pacientes con EM. TNF α puede atravesar la BHE y, una vez en el cerebro, afecta diversos procesos: Regula la transmisión sináptica glutamatérgica, aumentando la inserción en membrana de receptores de glutamato, lo cual lleva a acumulación de $[Ca^{2+}]_i$ en las neuronas. Reprime la expresión de transportadores de glutamato en astrocitos, impidiendo la remoción de este neurotransmisor excitatorio del medio. De esta manera actúa sinérgicamente con el glutamato amplificando la excitotoxicidad. Además, el exceso de glutamato activa mGluRs en la microglía, llevando a su activación y la secreción de mayores cantidades de glutamato, TNF α y otros mediadores inflamatorios, exacerbando el daño [176,177]. En nuestro modelo agudo de EAE, detectamos un notable incremento en la expresión de TNF α en la corteza frontal, en las primeras horas del período sintomático de la patología. Teniendo en cuenta los antecedentes presentados y nuestros resultados, es muy probable que este aumento en TNF α contribuya a la activación de la glía y de la disfunción presináptica en la región frontal de la corteza.

Aquí cabe destacar que, mientras la liberación de glutamato también se encontró significativamente reducida en el estriado dorsal, no se halló una activación significativa de glía o infiltración ni se vio afectada la vía de señalización de Syn1 y de Erk1/2 en esa región (ver Anexo II). Estos indicios nos llevan a pensar que las causas de la disfunción presináptica en el estriado dorsal diferirían de las descritas para la corteza frontal, así como también el mecanismo molecular responsable de estos cambios. Este hallazgo es interesante, ya que apunta a que el daño en diferentes regiones del SNC podría desarrollarse de manera diferente, agregando complejidad al estudio de este tipo de patologías neuroinflamatorias e induciendo cautela en la tendencia a generalizar mecanismos.

Para finalizar, queda sin responder la causa de la segregación de las alteraciones a nivel de la corteza. Si bien no poseemos base experimental para esta argumentación, es interesante comparar el sentido y alcance del flujo del sistema glinfático y la distribución de la inflamación en cerebro durante la EAE. El sistema glinfático fue descubierto y descrito hace pocos años por el grupo de la Dra. Nedergaard. Se trata de una vía anatómica que permite el intercambio entre el LCR y el líquido intersticial el cerebro, facilitando la remoción de sustancias tóxicas [178]. El drenaje de estas corrientes globales de líquido

intersticial ocurre a lo largo de las arterias y venas de mayor calibre en el cerebro. La mayor y más rápida entrada de moléculas sanguíneas se da a lo largo de las arterias basilar y olfatoria [179], las cuales atraviesan coincidentemente las regiones donde encontramos mayor inflamación en la EAE (es decir, cerebelo y tálamo, zona ventral o basal del cerebro, capas externas de los lóbulos frontales y bulbo olfatorio). Componentes centrales de este sistema son los astrocitos, quienes transportan los solutos a través del parénquima cerebral gracias a canales de la familia de las acuaporinas. Estos canales tienen una distribución polarizada, concentrándose en los extremos de los procesos astrocíticos que rodean a vasos sanguíneos y forman parte de la BHE. El grupo de la Dra. Nedergaard postula que en caso de patologías neurodegenerativas y/o neuroinflamatorias, los astrocitos reactivos pierden esta polaridad de canales imposibilitándose el flujo del líquido intersticial y la remoción de metabolitos tóxicos, agravando así el daño [178]. Sería de interés poner a prueba esta hipótesis en la EAE y analizar si efectivamente tiene algún tipo de relación con la distribución de las alteraciones en el cerebro.

IV. CONCLUSIONES

En base a los experimentos realizados en esta tesis y teniendo en cuenta trabajos previos de nuestro grupo así como de otros investigadores, podemos concluir:

- ☞ Con el comienzo de las manifestaciones clínicas ocurre en la región frontal de la corteza activación de microglía y astrocitos, posiblemente causada por la llegada de factores inflamatorios a través de la sangre. Estas células reactivas secretan TNF α e IL-6, contribuyendo a la inflamación local. La secreción de citoquinas probablemente esté acompañada de especies reactivas y glutamato, provocando además estrés oxidativo y excitotoxicidad, como se ha mostrado en otros modelos.
- ☞ TNF α e IL-6, posiblemente en conjunto con el exceso de glutamato, actuarían sobre las neuronas incrementando la expresión de las enzimas Erk1/2 y CN, y alterarían sus cascadas de señalización, entre ellas la de maquinaria presináptica. Esto conduciría a defectos en la fosforilación y redistribución de Syn1 y en la dispersión de los agregados de VSs, disminuyendo la disponibilidad de las VSs para exocitar y la liberación de neurotransmisor.
- ☞ Todos estos cambios se revierten espontáneamente cuando los animales entran en el período de recuperación de la patología, y podrían estar implicados en la aparición del

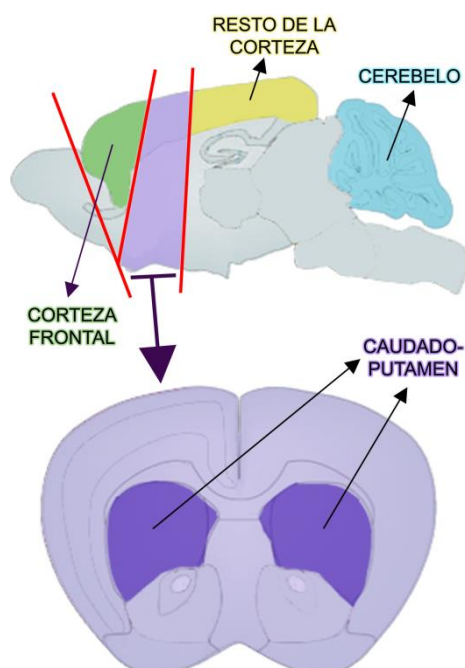
deterioro cognitivo (más que en el desarrollo de la parálisis). La comprensión de los mecanismos de reversión y de la contribución a la patología de las alteraciones en la corteza frontal podrían ayudar a entender el funcionamiento de la enfermedad en humanos y, quizás, generar nuevos blancos terapéuticos.

ANEXO I

MAPA DE DISECCIÓN DEL CEREBRO DE RATAS Y DEFINICIÓN DE LA CORTEZA FRONTAL

Luego de la decapitación del animal, el cerebro fue removido rápidamente y ubicado en una cápsula de Petri previamente llena con 2-3 mL de GB a 4 °C. Para realizar la disección, el cerebro se posicionó con su parte ventral hacia arriba y los bulbos olfatorios fueron removidos. Tomando como guía el quiasma óptico, primeramente se disectó la corteza frontal mediante un corte diagonal (área en verde en la Fig. 36, y ver líneas rojas en las Figs. 37 a 41). Luego, mediante otro corte aproximadamente a 2 mm del primero, se obtuvo el estriado dorsal (caudado-putamen), previa eliminación del cuerpo caloso, la corteza cerebral y el estriado ventral (área en violeta en la Fig. 36, y ver líneas rojas en las Figs. 37 a 41). De la porción restante de cerebro se separó el resto de la corteza (área en amarillo en la Fig. 36). Asimismo, se diseccionó el cerebelo completo (área en celeste en la Fig. 36). Todo el proceso mencionado fue realizado rápidamente (en menos de 2 min) para evitar la degradación del tejido, y las estructuras obtenidas fueron simultáneamente homogeneizadas en GB a 4 °C.

Figura 36.
Esquema del cerebro de rata y las estructuras estudiadas en esta tesis. Las líneas rojas demarcan la dirección del corte realizado para extraer cada área.



I. Definición de la Corteza Frontal

Esta área de la corteza posee una definición difusa y variable en la bibliografía, en cuanto a su tamaño y las estructuras que incluye. Se decidió definirla de forma tal que abarque tanto lo publicado por otros grupos de investigación [180] como también lo establecido en el principal libro de consulta en cuanto a la estructura del SNC de rata, "The rat nervous system" (editado por George Paxinos) [181]. De esta forma, la corteza frontal utilizada para los experimentos de esta tesis incluye las siguientes áreas: gran parte de Fr1, Fr2 y Fr3 (correspondientes a las cortezas motoras primaria o M1, secundaria o M2 y áreas accesorias), una pequeña porción de la región más frontal de la corteza parietal (o Par1, que incluye parte de la corteza somatosensorial primaria o S1), y la denominada corteza prefrontal (que incluye a las cortezas orbitofrontal, cingulada, prelímbica e infralímbica; [182]).

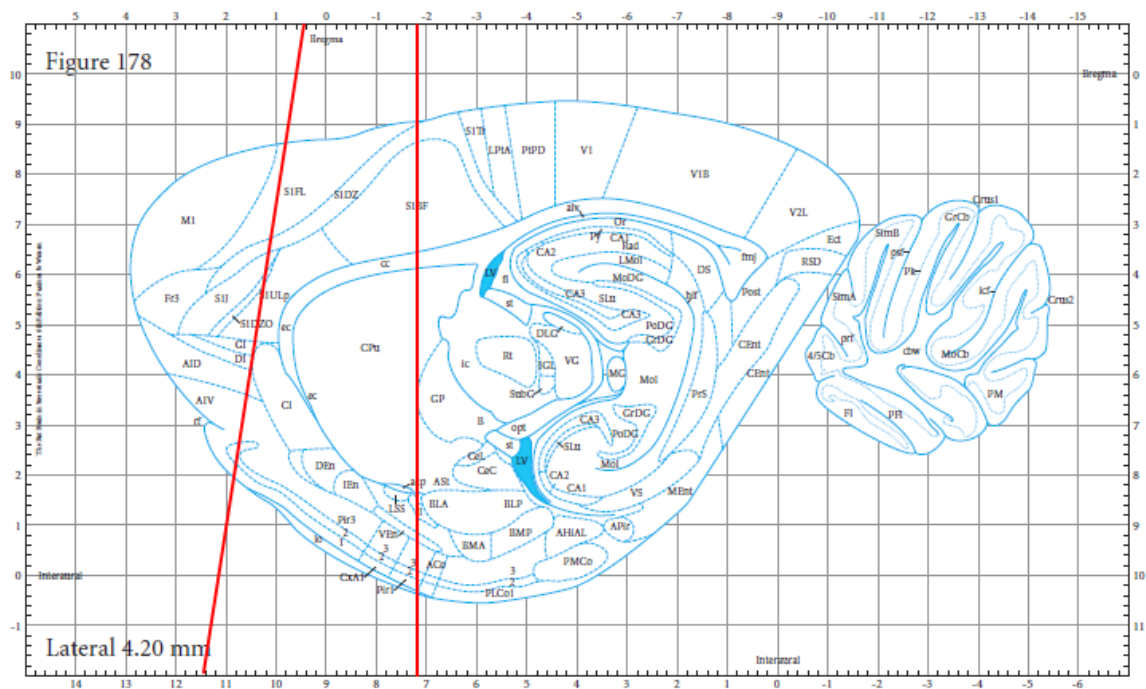


Figura 37. Imagen sagital del atlas de Paxinos y Watson, 6ta. Edición [127]. Las líneas rojas denotan los cortes realizados con bisturí para seccionar las diferentes áreas del cerebro de rata. En la región frontal del corte quedan incluidas: M1, Fr3 y parte de las cortezas somatosensorial (S1) e insular (AID, AIV).

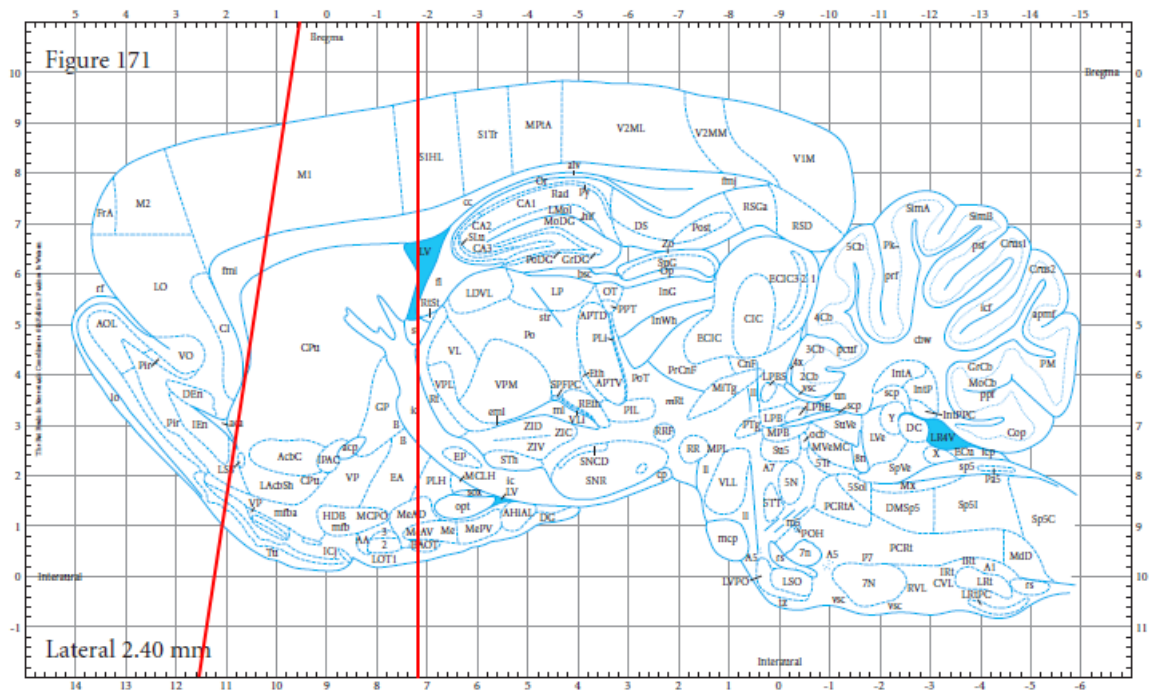


Figura 38. Imagen sagital del atlas de Paxinos y Watson, 6ta. Edición [127]. Las líneas rojas denotan los cortes realizados con bistrifluoroacético para seccionar las diferentes áreas del cerebro de rata. En la región frontal del corte quedan incluidas: M2, M1, la corteza orbitofrontal (LO, VO) y la corteza frontal de asociación (Fra).

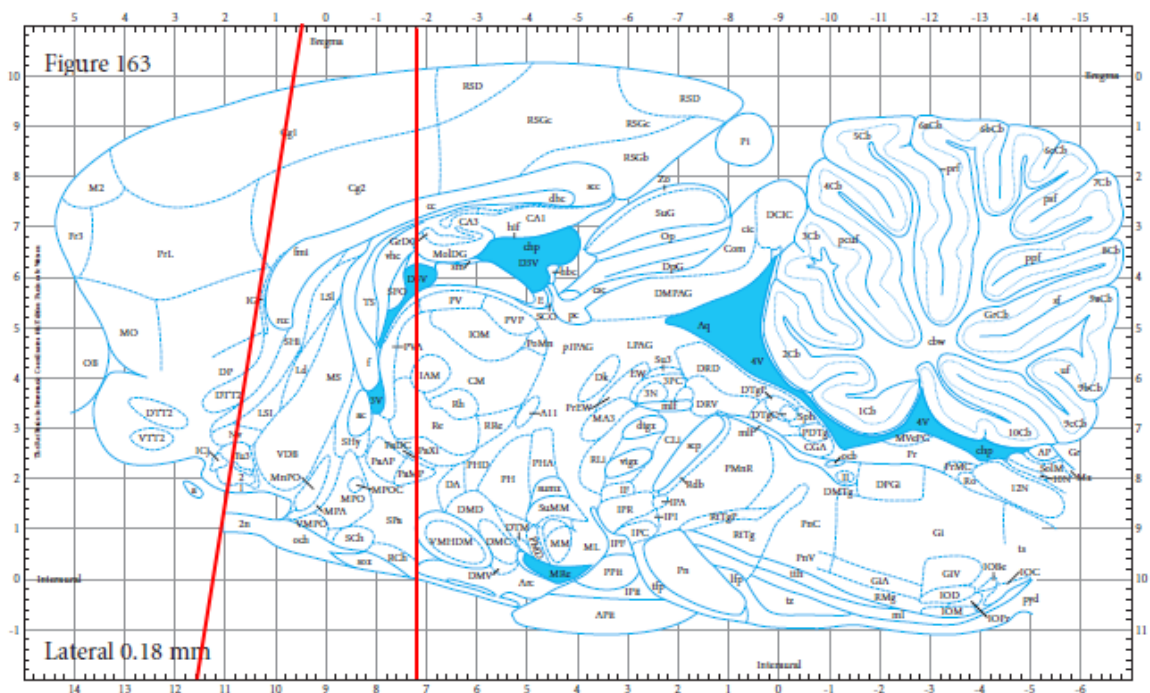


Figura 39. Imagen sagital del atlas de Paxinos y Watson, 6ta. Edición [127]. Las líneas rojas denotan los cortes realizados con bistrifluoroacético para seccionar las diferentes áreas del cerebro de rata. En la región frontal del corte quedan incluidas: M2, Fr3, las cortezas prelímbica e infralímbica (PrL a IL), y parte de la corteza cingulada (Cg1).

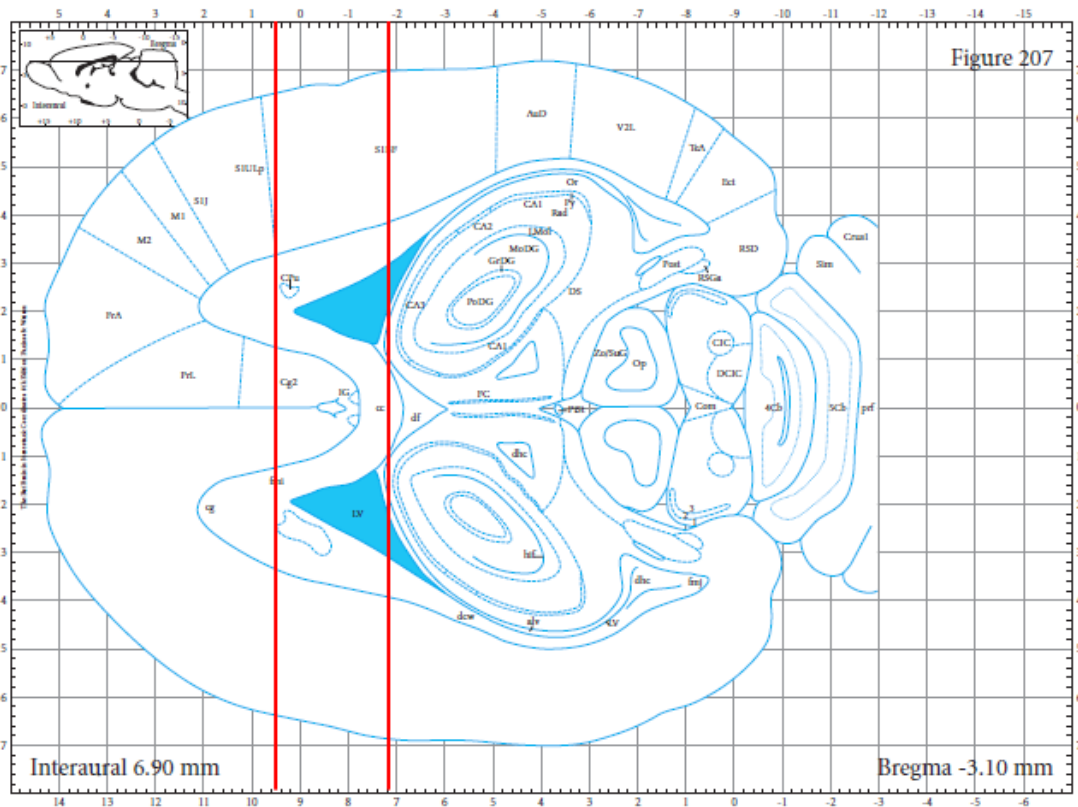


Figura 40. Imagen horizontal del atlas de Paxinos y Watson, 6ta. Edición [127]. Las líneas rojas denotan los cortes realizados con bisturí para seccionar las diferentes áreas del cerebro de rata. En la región frontal del corte quedan incluidas: M1, M2, S1J, FrA, PrL, Cg2.

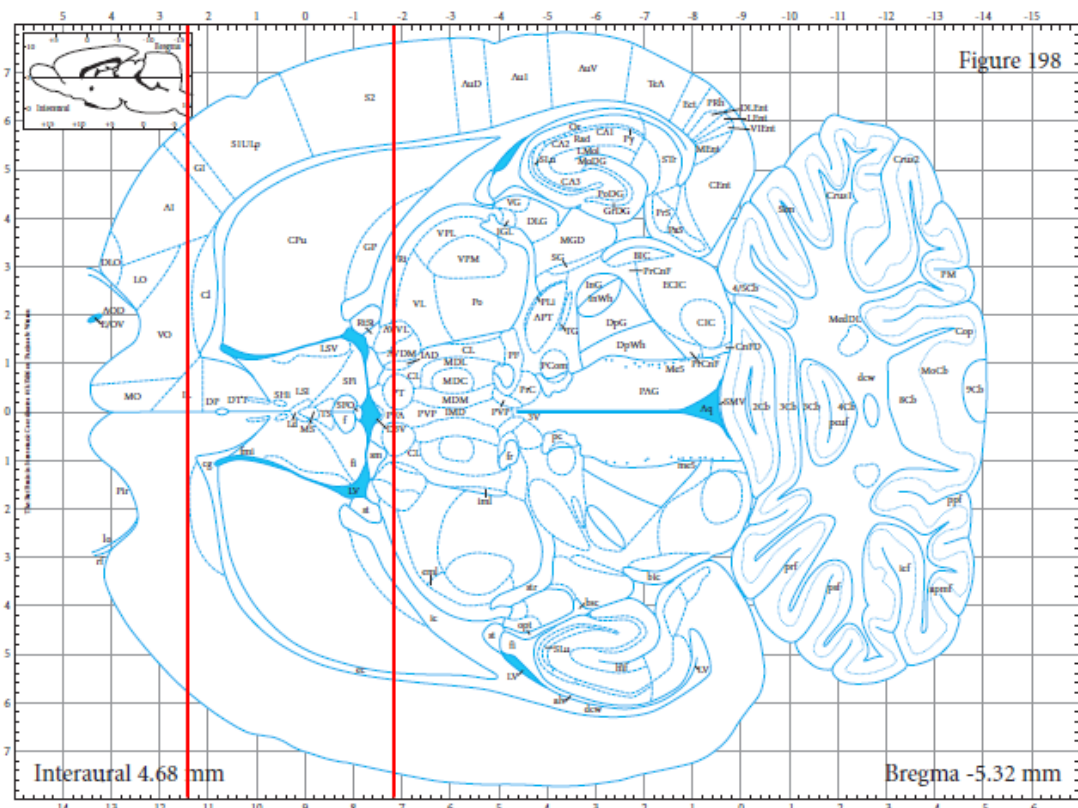


Figura 41. Imagen horizontal del atlas de Paxinos y Watson, 6ta. Edición [127]. Las líneas rojas denotan los cortes realizados con bisturí para seccionar las diferentes áreas del cerebro de rata. En la región frontal del corte quedan incluidas las distintas áreas de la corteza orbitofrontal (LO, VO, MO).

ANEXO II

ALTERACIONES GLUTAMATÉRGICAS EN EL ESTRIADO DORSAL (CAUDADO-PUTAMEN) EN LA ETAPA AGUDA DE LA EAE

Adicionalmente a la corteza frontal, en esta tesis se exploró la liberación de glutamato en otras regiones relacionadas con el control y aprendizaje motriz, como son el estriado dorsal (caudado-putamen) y el cerebelo. En ambas estructuras se encontró una disminución estadísticamente significativa tanto en la cantidad total de glutamato liberado como en la velocidad inicial de liberación. Debido a la complejidad del cerebelo, nos centraremos en los resultados preliminares obtenidos en el cuerpo estriado.

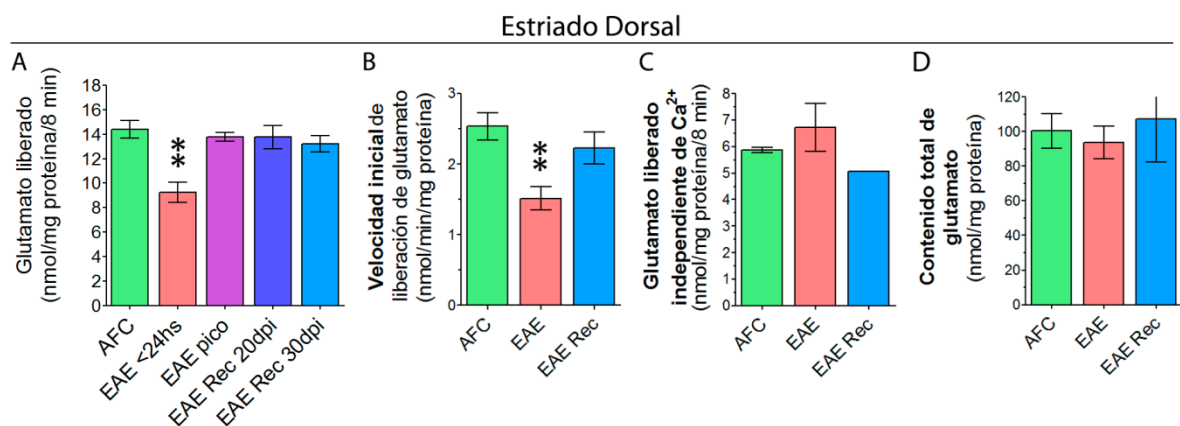


Figura 37. **A.** Glutamato total liberado durante 8 min (relativizado a los mg de proteínas sinaptosomales) en diferentes etapas de la patología ($F=5,655$). **B.** Velocidad de liberación a tiempos cortos ($F=3,224$). **C.** Liberación de glutamato independiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($F=0,6673$). **D.** Contenido total de glutamato intrasinosomal ($F=0,2196$). Sinaptosomas purificados de estriado dorsal, datos de 3 experimentos independientes, $N=4-6$ animales por grupo (** $p<0,01$).

En la figura 37 puede observarse que, al igual a lo descrito para la corteza frontal, el curso temporal de los defectos en la liberación de glutamato es coincidente con el desarrollo de la EAE. La disminución máxima en la cantidad de glutamato liberado se observa en las primeras horas de la etapa sintomática, desapareciendo rápidamente cuando los animales comienzan a recuperarse (Fig. 37A). La velocidad inicial de liberación también se

vio significativamente disminuida (Fig. 37B). Por el contrario, la liberación de glutamato independiente de $[Ca^{2+}]_i$ y el contenido intrasinaptosomal de glutamato fueron similares para todos los grupos experimentales (Fig. 37C-D). Indicando nuevamente posibles alteraciones en la maquinaria molecular presináptica.

Sin embargo, para el caso del estriado no se encontraron diferencias entre los grupos AFC y EAE en el curso temporal de fosforilación de SynI y de Erk1/2, ni tampoco en los niveles totales de ambas proteínas (Fig. 38). Esto es un claro indicio de que el mecanismo por el cual se altera la transmisión sináptica no es necesariamente el mismo en todas las regiones del cerebro, agregando complejidad al estudio de esta patología. Este resultado va de la mano con la falta de activación de la glía observada en caudado-putamen por histología (ver Tabla 3).

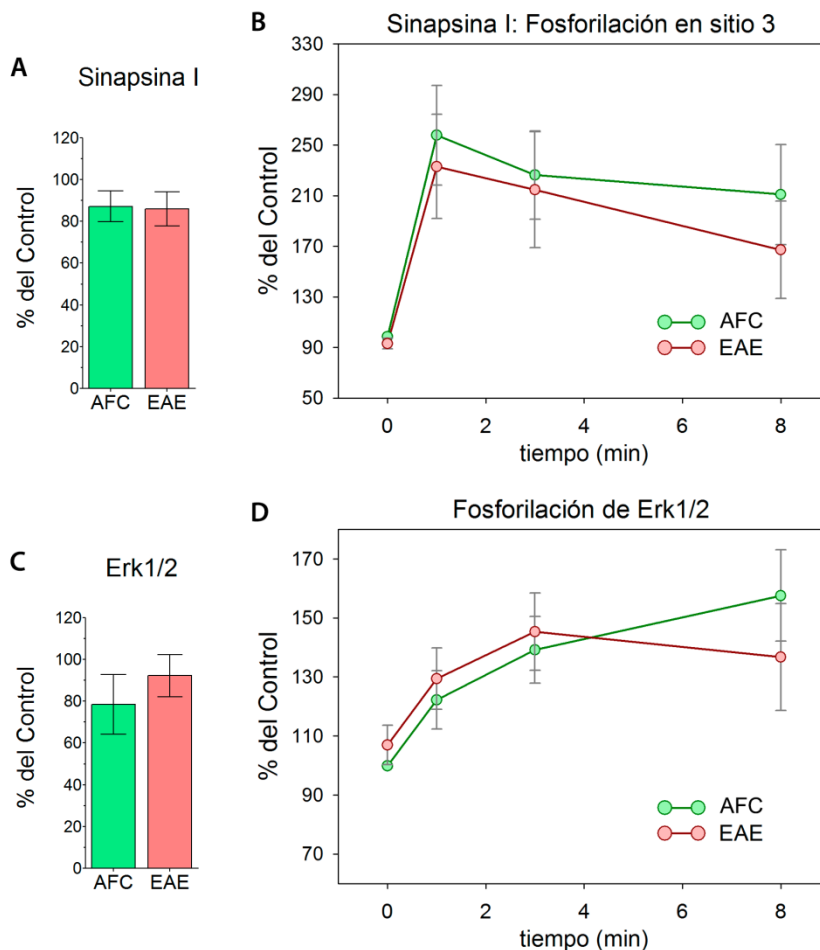


Figura 38.

A. Niveles totales de la proteína SynI.
B. Curso temporal de fosforilación de SynI luego de estimulación con 4-AP.
C. Niveles totales de la quinasa Erk1/2.
D. Curso temporal de fosforilación de Erk1/2 luego del agregado de 4-AP. Sinaptosomas purificados de estriado dorsal (caudado-putamen). Datos de 3 experimentos independientes, N=6 ratas por grupo.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS REALIZADAS DURANTE ESTA TESIS

☞ *GLUTAMATE RELEASE MACHINERY IS ALTERED IN THE FRONTAL CORTEX OF RATS WITH EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS.*

Chanaday N.L., Vilcaes A.A., De Paul A.L., Torres A.I., Degano A.L., Roth G.A.
Molecular Neurobiology (2014), PMID: 25037702.

☞ *INHIBITORY ROLE OF DIAZEPAM ON AUTOIMMUNE INFLAMMATION IN RATS WITH EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS.*

Bibolini M.J.*, **Chanaday N.L.***, Báez N.S., Degano A.L., Monferrán C.G., Roth G.A.
Neuroscience (2011), 199: 421-428, PMID: 21964471.

*(Ambos autores contribuyeron igualmente a este trabajo).

☞ *EFFECT OF DIPHENYL DISELENIDE ON THE DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS.*

Chanaday N.L., de Bem A.F., Roth G.A.

Neurochemistry International (2011), 59(8): 1155-1162, PMID: 22032971.

REFERENCIAS

- [1] D. S. Goodin, "The epidemiology of multiple sclerosis: insights to disease pathogenesis," *Handb. Clin. Neurol.*, vol. 122, pp. 231–266, 2014.
- [2] M. Melcon, C. Melcon, L. Bartoloni, E. Cristiano, J. Duran, A. Grzesiuk, Y. Fragoso, J. B. Brooks, V. Diaz, K. Romero Garcia, J. Cabrera Gomez, P. Abad, M. M. Islas, F. Gracia, V. H. Diaz de Bedoya, M. C. Ruiz, J. Hackembruch, C. Oehninger, C. Ketzoian, A. Soto, and the "Grupo Colaborativo Multicentrico para el Estudio de la Esclerosis Multiple en America Latina y el Caribe" (GEEMAL), "Towards establishing MS prevalence in Latin America and the Caribbean," *Mult. Scler. J.*, vol. 19, no. 2, pp. 145–152, Feb. 2013.
- [3] B. A. 't Hart, R. Q. Hintzen, and J. D. Laman, "Multiple sclerosis – a response-to-damage model," *Trends Mol. Med.*, vol. 15, no. 6, pp. 235–244, Jun. 2009.
- [4] C. S. Constantinescu, N. Farooqi, K. O'Brien, and B. Gran, "Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS): EAE as model for MS," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 164, no. 4, pp. 1079–1106, Oct. 2011.
- [5] J. Losy, "Is MS an inflammatory or primary degenerative disease?," *J. Neural Transm.*, vol. 120, no. 10, pp. 1459–1462, Oct. 2013.
- [6] B. D. Trapp and K.-A. Nave, "Multiple Sclerosis: An Immune or Neurodegenerative Disorder?," *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 31, no. 1, pp. 247–269, Jul. 2008.
- [7] P. K. Stys, "Multiple sclerosis: autoimmune disease or autoimmune reaction?," *Can. J. Neurol. Sci. J. Can. Sci. Neurol.*, vol. 37 Suppl 2, pp. S16–23, Sep. 2010.
- [8] A. Goris, I. Pauwels, and B. Dubois, "Progress in multiple sclerosis genetics," *Curr. Genomics*, vol. 13, no. 8, pp. 646–663, Dec. 2012.
- [9] I. M. Stromnes, L. M. Cerretti, D. Liggitt, R. A. Harris, and J. M. Goverman, "Differential regulation of central nervous system autoimmunity by TH1 and TH17 cells," *Nat. Med.*, vol. 14, no. 3, pp. 337–342, Mar. 2008.
- [10] S. E. Baranzini, N. W. Galwey, J. Wang, P. Khankhanian, R. Lindberg, D. Pelletier, W. Wu, B. M. J. Uitdehaag, L. Kappos, GeneMSA Consortium, C. H. Polman, P. M. Matthews, S. L. Hauser, R. A. Gibson, J. R. Oksenberg, and M. R. Barnes, "Pathway and network-based analysis of genome-wide association studies in multiple sclerosis," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 18, no. 11, pp. 2078–2090, Jun. 2009.
- [11] J. D. Lutton, R. Winston, and T. C. Rodman, "Multiple sclerosis: etiological mechanisms and future directions," *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ, vol. 229, no. 1, pp. 12–20, Jan. 2004.
- [12] J. M. Gelfand, "Multiple sclerosis: diagnosis, differential diagnosis, and clinical presentation," *Handb. Clin. Neurol.*, vol. 122, pp. 269–290, 2014.
-

- [13] S. B. Simmons, E. R. Pierson, S. Y. Lee, and J. M. Goverman, "Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals," *Trends Immunol.*, vol. 34, no. 8, pp. 410–422, Aug. 2013.
- [14] A. M. Stern and H. Markel, "The History Of Vaccines And Immunization: Familiar Patterns, New Challenges," *Health Aff. (Millwood)*, vol. 24, no. 3, pp. 611–621, May 2005.
- [15] M. Lombard, P. P. Pastoret, and A. M. Moulin, "A brief history of vaccines and vaccination," *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.*, vol. 26, no. 1, pp. 29–48, Apr. 2007.
- [16] T. M. Rivers, D. H. Sprunt, and G. P. Berry, "OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS," *J. Exp. Med.*, vol. 58, no. 1, pp. 39–53, Jun. 1933.
- [17] J. Freund and K. J. Thomson, "A SIMPLE, RAPID TECHNIC OF PREPARING WATER-IN-OIL EMULSIONS OF PENICILLIN, DRUGS AND BIOLOGICS," *Science*, vol. 101, no. 2627, pp. 468–469, May 1945.
- [18] E. A. Kabat, A. Wolf, and A. E. Bezer, "Rapid Production of Acute Disseminated Encephalomyelitis in Rhesus Monkeys by Injection of Brain Tissue With Adjuvants," *Science*, vol. 104, no. 2703, pp. 362–363, Oct. 1946.
- [19] A. WOLF, E. A. KABAT, and A. E. BEZER, "The pathology of acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in the rhesus monkey and its resemblance to human demyelinating disease," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 6, no. 4, pp. 333–357, Oct. 1947.
- [20] I. UCHIMURA and H. SHIRAKI, "A contribution to the classification and the pathogenesis of demyelinating encephalomyelitis; with special reference to the central nervous system lesions caused by preventive inoculation against rabies," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 16, no. 2, pp. 139–203; discussion, 203–208, Apr. 1957.
- [21] E. ROBOZ-EINSTEIN, "Allergic encephalomyelitis as an experimental model for multiple sclerosis," *Calif. Med.*, vol. 91, pp. 204–206, Oct. 1959.
- [22] E. Mix, H. Meyer-Rienecker, and U. K. Zettl, "Animal models of multiple sclerosis for the development and validation of novel therapies – potential and limitations," *J. Neurol.*, vol. 255, no. S6, pp. 7–14, Dec. 2008.
- [23] C. E. LUMSDEN, "Consideration of multiple sclerosis in relation to the auto-immunity process," *Proc. R. Soc. Med.*, vol. 54, pp. 11–15, Jan. 1961.
- [24] N. Kawakami, I. Bartholomäus, M. Pesic, and M. Mues, "An autoimmunity odyssey: how autoreactive T cells infiltrate into the CNS," *Immunol. Rev.*, vol. 248, no. 1, pp. 140–155, Jul. 2012.
- [25] A. Reboldi, C. Coisne, D. Baumjohann, F. Benvenuto, D. Bottinelli, S. Lira, A. Uccelli, A. Lanzavecchia, B. Engelhardt, and F. Sallusto, "C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE," *Nat. Immunol.*, vol. 10, no. 5, pp. 514–523, May 2009.
- [26] M. J. Bibolini and C. G. Monferran, "Actividad del híbrido entre los dominios ABC de la toxina lábil al calor de *E. coli* en la encefalomielitis autoinmune experimental.," Tesis doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Biológica, 2013.

- [27] S. Di Prisco, E. Merega, M. Milanese, M. Summa, S. Casazza, L. Raffaghello, V. Pistoia, A. Uccelli, and A. Pittaluga, "CCL5-glutamate interaction in central nervous system: Early and acute pre-synaptic defects in EAE mice," *Neuropharmacology*, vol. 75, pp. 337–346, Dec. 2013.
- [28] Y. Ditamo and G. A. Roth, "Influencia del envejecimiento sobre el desarrollo de la encefalomiélitis autoinmune experimental.," Tesis doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Biológica, 2005.
- [29] A. L. Degano and G. A. Roth, "Passive transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis in Wistar rats: dissociation of clinical symptoms and biochemical alterations," *J. Neurosci. Res.*, vol. 59, no. 2, pp. 283–290, Jan. 2000.
- [30] D. A. Slavin, A. E. Bucher, A. L. Degano, N. W. Soria, and G. A. Roth, "Time course of biochemical and immunohistological alterations during experimental allergic encephalomyelitis," *Neurochem. Int.*, vol. 29, no. 6, pp. 597–605, Dec. 1996.
- [31] J. Vogt, F. Paul, O. Aktas, K. Müller-Wielsch, J. Dörr, S. Dörr, B. S. Bharathi, R. Glumm, C. Schmitz, H. Steinbusch, C. S. Raine, M. Tsokos, R. Nitsch, and F. Zipp, "Lower motor neuron loss in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis," *Ann. Neurol.*, vol. 66, no. 3, pp. 310–322, Sep. 2009.
- [32] A. MacKenzie-Graham, G. A. Rinek, A. Avedisian, S. M. Gold, A. J. Frew, C. Aguilar, D. R. Lin, E. Umeda, R. R. Voskuhl, and J. R. Alger, "Cortical atrophy in experimental autoimmune encephalomyelitis: In vivo imaging," *NeuroImage*, vol. 60, no. 1, pp. 95–104, Mar. 2012.
- [33] C. Schmitt, N. Strazielle, and J.-F. Gherzi-Egea, "Brain leukocyte infiltration initiated by peripheral inflammation or experimental autoimmune encephalomyelitis occurs through pathways connected to the CSF-filled compartments of the forebrain and midbrain," *J. Neuroinflammation*, vol. 9, p. 187, 2012.
- [34] M. Mangiardi, D. K. Crawford, X. Xia, S. Du, R. Simon-Freeman, R. R. Voskuhl, and S. K. Tiwari-Woodruff, "An Animal Model of Cortical and Callosal Pathology in Multiple Sclerosis: Multiple Sclerosis Model of Cortical and Callosal Pathology," *Brain Pathol.*, vol. 21, no. 3, pp. 263–278, May 2011.
- [35] X. Dong, Y. Wang, and Z. Qin, "Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases," *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 30, no. 4, pp. 379–387, Apr. 2009.
- [36] M. O. Ziehn, A. A. Avedisian, S. Tiwari-Woodruff, and R. R. Voskuhl, "Hippocampal CA1 atrophy and synaptic loss during experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE," *Lab. Invest.*, vol. 90, no. 5, pp. 774–786, May 2010.
- [37] D. Centonze, L. Muzio, S. Rossi, R. Furlan, G. Bernardi, and G. Martino, "The link between inflammation, synaptic transmission and neurodegeneration in multiple sclerosis," *Cell Death Differ.*, vol. 17, no. 7, pp. 1083–1091, Jul. 2010.
- [38] S. Rossi, L. Muzio, V. De Chiara, G. Grasselli, A. Musella, G. Musumeci, G. Mandolesi, R. De Ceglia, S. Maida, E. Biffi, A. Pedrocchi, A. Menegon, G. Bernardi, R. Furlan, G. Martino, and D. Centonze, "Impaired striatal GABA transmission in experimental autoimmune encephalomyelitis," *Brain. Behav. Immun.*, vol. 25, no. 5, pp. 947–956, Jul. 2011.
- [39] F. Girolamo, G. Ferrara, M. Strippoli, M. Rizzi, M. Errede, M. Trojano, R. Perris, L. Roncali, M. Svelto, T. Mennini, and D. Virgintino, "Cerebral cortex demyelination and oligodendrocyte precu-

response to experimental autoimmune encephalomyelitis," *Neurobiol. Dis.*, vol. 43, no. 3, pp. 678–689, Sep. 2011.

[40] G. Sulkowski, B. Dabrowska-Bouta, B. Kwiatkowska-Patzer, and L. Struzyńska, "Alterations in glutamate transport and group I metabotropic glutamate receptors in the rat brain during acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis," *Folia Neuropathol. Assoc. Pol. Neuropathol. Med. Res. Cent. Pol. Acad. Sci.*, vol. 47, no. 4, pp. 329–337, 2009.

[41] M. P. Cid, A. A. Vilcaes, L. L. Rupil, N. A. Salvatierra, and G. A. Roth, "Participation of the GABAergic system on the glutamate release of frontal cortex synaptosomes from Wistar rats with experimental autoimmune encephalomyelitis," *Neuroscience*, vol. 189, pp. 337–344, Aug. 2011.

[42] H. Hardin-Pouzet, M. Krakowski, L. Bourbonnière, M. Didier-Bazes, E. Tran, and T. Owens, "Glutamate metabolism is down-regulated in astrocytes during experimental allergic encephalomyelitis," *Glia*, vol. 20, no. 1, pp. 79–85, May 1997.

[43] Charcot, Jean-Martin, "Histologie de la sclérose en plaques. (Leçon faite à l'hospice de la Salpêtrière par M. Charcot et recueillie par M. Bourneville).," Impr. de L. Poupart-Davy (Paris), Monografía, 1869.

[44] B. Grassiot, B. Desgranges, F. Eustache, and G. Defer, "Quantification and clinical relevance of brain atrophy in multiple sclerosis: a review," *J. Neurol.*, vol. 256, no. 9, pp. 1397–1412, Sep. 2009.

[45] E. Sbardella, N. Petsas, F. Tona, L. Prosperini, E. Raz, G. Pace, C. Pozzilli, and P. Pantano, "Assessing the Correlation between Grey and White Matter Damage with Motor and Cognitive Impairment in Multiple Sclerosis Patients," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 5, p. e63250, May 2013.

[46] E. Dobryakova, J. DeLuca, H. M. Genova, and G. R. Wylie, "Neural Correlates of Cognitive Fatigue: Cortico-Striatal Circuitry and Effort–Reward Imbalance," *J. Int. Neuropsychol. Soc.*, vol. 19, no. 08, pp. 849–853, Sep. 2013.

[47] A. S. Nielsen, R. P. Kinkel, N. Madigan, E. Tinelli, T. Benner, and C. Mainero, "Contribution of cortical lesion subtypes at 7T MRI to physical and cognitive performance in MS," *Neurology*, vol. 81, no. 7, pp. 641–649, Aug. 2013.

[48] A. Maarouf, B. Audoin, S. Konstantin, A. Rico, E. Soulier, F. Reuter, A. Troter, S. Confort-Gouny, P. J. Cozzone, M. Guye, L. R. Schad, J. Pelletier, J.-P. Ranjeva, and W. Zaaraoui, "Topography of brain sodium accumulation in progressive multiple sclerosis," *Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med.*, vol. 27, no. 1, pp. 53–62, Feb. 2014.

[49] V. Popescu, F. Agosta, H. E. Hulst, I. C. Sluimer, D. L. Knol, M. P. Sormani, C. Enzinger, S. Ropele, J. Alonso, J. Sastre-Garriga, A. Rovira, X. Montalban, B. Bodini, O. Ciccarelli, Z. Khaleeli, D. T. Chard, L. Matthews, J. Palace, A. Giorgio, N. De Stefano, P. Eisele, A. Gass, C. H. Polman, B. M. J. Uitdehaag, M. J. Messina, G. Comi, M. Filippi, F. Barkhof, H. Vrenken, and on behalf of the MAGNIMS Study Group, "Brain atrophy and lesion load predict long term disability in multiple sclerosis," *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 84, no. 10, pp. 1082–1091, Oct. 2013.

[50] G. Yang, C. N. Parkhurst, S. Hayes, and W.-B. Gan, "Peripheral elevation of TNF- leads to early synaptic abnormalities in the mouse somatosensory cortex in experimental autoimmune encephalomyelitis," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 25, pp. 10306–10311, Jun. 2013.

[51] S. Acharjee, N. Nayani, M. Tsutsui, M. N. Hill, S. S. Ousman, and Q. J. Pittman, "Altered cognitive-emotional behavior in early experimental autoimmune encephalitis – Cytokine and hormonal correlates," *Brain. Behav. Immun.*, vol. 33, pp. 164–172, Oct. 2013.

- [52] A. MacKenzie-Graham, S. K. Tiwari-Woodruff, G. Sharma, C. Aguilar, K. T. Vo, L. V. Strickland, L. Morales, B. Fubara, M. Martin, R. E. Jacobs, G. A. Johnson, A. W. Toga, and R. R. Voskuhl, "Purkinje cell loss in experimental autoimmune encephalomyelitis," *NeuroImage*, vol. 48, no. 4, pp. 637–651, Dec. 2009.
- [53] A. MacKenzie-Graham, G. A. Rinek, A. Avedisian, S. M. Gold, A. J. Frew, C. Aguilar, D. R. Lin, E. Umeda, R. R. Voskuhl, and J. R. Alger, "Cortical atrophy in experimental autoimmune encephalomyelitis: In vivo imaging," *NeuroImage*, vol. 60, no. 1, pp. 95–104, Mar. 2012.
- [54] A. Castegna, L. Palmieri, I. Spera, V. Porcelli, F. Palmieri, M. J. Fabis-Pedrini, R. B. Kean, D. A. Barkhouse, M. T. Curtis, and D. C. Hooper, "Oxidative stress and reduced glutamine synthetase activity in the absence of inflammation in the cortex of mice with experimental allergic encephalomyelitis," *Neuroscience*, vol. 185, pp. 97–105, Jun. 2011.
- [55] S. Rossi, V. De Chiara, R. Furlan, A. Musella, F. Cavasinni, L. Muzio, G. Bernardi, G. Martino, and D. Centonze, "Abnormal activity of the Na/Ca exchanger enhances glutamate transmission in experimental autoimmune encephalomyelitis," *Brain. Behav. Immun.*, vol. 24, no. 8, pp. 1379–1385, Nov. 2010.
- [56] M. O. Ziehn, A. A. Avedisian, S. Tiwari-Woodruff, and R. R. Voskuhl, "Hippocampal CA1 atrophy and synaptic loss during experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE," *Lab. Invest.*, vol. 90, no. 5, pp. 774–786, May 2010.
- [57] C. Lucchinetti, W. Brück, J. Parisi, B. Scheithauer, M. Rodriguez, and H. Lassmann, "Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination," *Ann. Neurol.*, vol. 47, no. 6, pp. 707–717, Jun. 2000.
- [58] Y. Gilgun-Sherki, E. Melamed, and D. Offen, "The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy," *J. Neurol.*, vol. 251, no. 3, pp. 261–268, Mar. 2004.
- [59] M. H. Barnett and J. W. Prineas, "Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion," *Ann. Neurol.*, vol. 55, no. 4, pp. 458–468, Apr. 2004.
- [60] A. Mirshafiey and M. Mohsenzadegan, "Antioxidant therapy in multiple sclerosis," *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, vol. 31, no. 1, pp. 13–29, 2009.
- [61] E. Ellwardt and F. Zipp, "Molecular mechanisms linking neuroinflammation and neurodegeneration in MS," *Exp. Neurol.*, Feb. 2014.
- [62] Garner, Craig and Nash, Joanne, "Chemical Synapses," in *Encyclopedia of life sciences*. Artículo 37., eLS, 2001.
- [63] G. Perea, M. Navarrete, and A. Araque, "Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information," *Trends Neurosci.*, vol. 32, no. 8, pp. 421–431, Aug. 2009.
- [64] S. O. Rizzoli and W. J. Betz, "Synaptic vesicle pools," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 6, no. 1, pp. 57–69, Jan. 2005.
- [65] E. L. Clayton and M. A. Cousin, "The molecular physiology of activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles," *J. Neurochem.*, vol. 111, no. 4, pp. 901–914, Nov. 2009.
- [66] F. Valtorta, J. Meldolesi, and R. Fesce, "Synaptic vesicles: is kissing a matter of competence?," *Trends Cell Biol.*, vol. 11, no. 8, pp. 324–328, Aug. 2001.

- [67] D. C. Crawford and E. T. Kavalali, "Molecular Underpinnings of Synaptic Vesicle Pool Heterogeneity: Molecularly Distinct Synaptic Vesicle Pools," *Traffic*, p. n/a–n/a, Jan. 2015.
- [68] E. Neher and T. Sakaba, "Multiple Roles of Calcium Ions in the Regulation of Neurotransmitter Release," *Neuron*, vol. 59, no. 6, pp. 861–872, Sep. 2008.
- [69] J. Rizo and T. C. Südhof, "The Membrane Fusion Enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 Proteins, and Their Accomplices—Guilty as Charged?," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 28, no. 1, pp. 279–308, Nov. 2012.
- [70] M. A. Cousin and P. J. Robinson, "The dephosphins: dephosphorylation by calcineurin triggers synaptic vesicle endocytosis," *Trends Neurosci.*, vol. 24, no. 11, pp. 659–665, Nov. 2001.
- [71] F. Cesca, P. Baldelli, F. Valtorta, and F. Benfenati, "The synapsins: Key actors of synapse function and plasticity," *Prog. Neurobiol.*, vol. 91, no. 4, pp. 313–348, Aug. 2010.
- [72] F. Valtorta, D. Pozzi, F. Benfenati, and E. F. Fornasiero, "The synapsins: Multitask modulators of neuronal development," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 22, no. 4, pp. 378–386, Jun. 2011.
- [73] O. Shupliakov, V. Haucke, and A. Pechstein, "How synapsin I may cluster synaptic vesicles," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 22, no. 4, pp. 393–399, Jun. 2011.
- [74] E. F. Fornasiero, A. Raimondi, F. C. Guarnieri, M. Orlando, R. Fesce, F. Benfenati, and F. Valtorta, "Synapsins Contribute to the Dynamic Spatial Organization of Synaptic Vesicles in an Activity-Dependent Manner," *J. Neurosci.*, vol. 32, no. 35, pp. 12214–12227, Aug. 2012.
- [75] S. Hilfiker, "Structural Domains Involved in the Regulation of Transmitter Release by Synapsins," *J. Neurosci.*, vol. 25, no. 10, pp. 2658–2669, Mar. 2005.
- [76] M. Messa, S. Congia, E. Defranchi, F. Valtorta, A. Fassio, F. Onofri, and F. Benfenati, "Tyrosine phosphorylation of synapsin I by Src regulates synaptic-vesicle trafficking," *J. Cell Sci.*, vol. 123, no. 13, pp. 2256–2265, Jul. 2010.
- [77] P. Chi, P. Greengard, and T. A. Ryan, "Synapsin dispersion and recluster during synaptic activity," *Nat. Neurosci.*, vol. 4, no. 12, pp. 1187–1193, Dec. 2001.
- [78] J. N. Jovanovic, T. S. Sihra, A. C. Nairn, H. C. Hemmings, P. Greengard, and A. J. Czernik, "Opposing changes in phosphorylation of specific sites in synapsin I during Ca²⁺-dependent glutamate release in isolated nerve terminals," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 21, no. 20, pp. 7944–7953, Oct. 2001.
- [79] F. Benfenati, P. Neyroz, M. Bähler, L. Masotti, and P. Greengard, "Time-resolved fluorescence study of the neuron-specific phosphoprotein synapsin I. Evidence for phosphorylation-dependent conformational changes," *J. Biol. Chem.*, vol. 265, no. 21, pp. 12584–12595, Jul. 1990.
- [80] F. Shibasaki, U. Hallin, and H. Uchino, "Calcineurin as a multifunctional regulator," *J. Biochem. (Tokyo)*, vol. 131, no. 1, pp. 1–15, Jan. 2002.
- [81] P. Chi, P. Greengard, and T. A. Ryan, "Synaptic vesicle mobilization is regulated by distinct synapsin I phosphorylation pathways at different frequencies," *Neuron*, vol. 38, no. 1, pp. 69–78, Apr. 2003.
- [82] J. N. Jovanovic, F. Benfenati, Y. L. Siow, T. S. Sihra, J. S. Sanghera, S. L. Pelech, P. Greengard, and A. J. Czernik, "Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 8, pp. 3679–3683, Apr. 1996.

- [83] O. Bloom, E. Evergren, N. Tomilin, O. Kjaerulff, P. Löw, L. Brodin, V. A. Pieribone, P. Greengard, and O. Shupliakov, "Colocalization of synapsin and actin during synaptic vesicle recycling," *J. Cell Biol.*, vol. 161, no. 4, pp. 737–747, May 2003.
- [84] D. G. Nicholls, "Stochastic aspects of transmitter release and bioenergetic dysfunction in isolated nerve terminals," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 38, no. 2, p. 457, Apr. 2010.
- [85] I. G. Morgan, "Synaptosomes and cell separation," *Neuroscience*, vol. 1, no. 3, pp. 159–165, Jun. 1976.
- [86] V. P. Whittaker, "Thirty years of synaptosome research," *J. Neurocytol.*, vol. 22, no. 9, pp. 735–742, Sep. 1993.
- [87] P. R. Dodd, J. A. Hardy, A. E. Oakley, J. A. Edwardson, E. K. Perry, and J. P. Delaunoy, "A rapid method for preparing synaptosomes: comparison, with alternative procedures," *Brain Res.*, vol. 226, no. 1–2, pp. 107–118, Dec. 1981.
- [88] P. R. Dunkley, P. E. Jarvie, and P. J. Robinson, "A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes," *Nat. Protoc.*, vol. 3, no. 11, pp. 1718–1728, Oct. 2008.
- [89] C. Biesemann, M. Grønborg, E. Luquet, S. P. Wichert, V. Bernard, S. R. Bungers, B. Cooper, F. Varoqueaux, L. Li, J. A. Byrne, H. Urlaub, O. Jahn, N. Brose, and E. Herzog, "Proteomic screening of glutamatergic mouse brain synaptosomes isolated by fluorescence activated sorting," *EMBO J.*, vol. 33, no. 2, pp. 157–170, Jan. 2014.
- [90] D. G. Nicholls, "Bioenergetics and transmitter release in the isolated nerve terminal," *Neurochem. Res.*, vol. 28, no. 10, pp. 1433–1441, Oct. 2003.
- [91] M. Erecińska, D. Nelson, and I. A. Silver, "Metabolic and energetic properties of isolated nerve ending particles (synaptosomes)," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1277, no. 1–2, pp. 13–34, Nov. 1996.
- [92] S. Takamori, M. Holt, K. Stenius, E. A. Lemke, M. Grønborg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brügger, and P. Ringler, "Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle," *Cell*, vol. 127, no. 4, pp. 831–846, Nov. 2006.
- [93] B. G. Wilhelm, S. Mandad, S. Truckenbrodt, K. Krohnert, C. Schafer, B. Rammner, S. J. Koo, G. A. Classen, M. Krauss, V. Haucke, H. Urlaub, and S. O. Rizzoli, "Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins," *Science*, vol. 344, no. 6187, pp. 1023–1028, May 2014.
- [94] S. Przedborski, M. Vila, and V. Jackson-Lewis, "Series Introduction: Neurodegeneration: What is it and where are we?," *J. Clin. Invest.*, vol. 111, no. 1, pp. 3–10, Jan. 2003.
- [95] A. A. Vilcaes, G. Furlan, and G. A. Roth, "Inhibition of Ca(2+)-dependent glutamate release from cerebral cortex synaptosomes of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis," *J. Neurochem.*, vol. 108, no. 4, pp. 881–890, Feb. 2009.
- [96] J. E. Haley, F. G. Samuels, and R. W. Ledeen, "Study of myelin purity in relation to axonal contaminants," *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 1, no. 2, pp. 175–187, Jun. 1981.
- [97] P. R. Dunkley, P. E. Jarvie, and P. J. Robinson, "A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes," *Nat. Protoc.*, vol. 3, no. 11, pp. 1718–1728, 2008.

- [98] W. B. Huttner, W. Schiebler, P. Greengard, and P. De Camilli, "Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation," *J. Cell Biol.*, vol. 96, no. 5, pp. 1374–1388, May 1983.
- [99] D. G. Nicholls and T. S. Sihra, "Synaptosomes possess an exocytotic pool of glutamate," *Nature*, vol. 321, no. 6072, pp. 772–773, Jun. 1986.
- [100] G. R. Tibbs, A. P. Barrie, F. J. Van Miegheem, H. T. McMahon, and D. G. Nicholls, "Repetitive action potentials in isolated nerve terminals in the presence of 4-aminopyridine: effects on cytosolic free Ca²⁺ and glutamate release," *J. Neurochem.*, vol. 53, no. 6, pp. 1693–1699, Dec. 1989.
- [101] C. Millan, "Subtype-specific Expression of Group III Metabotropic Glutamate Receptors and Ca²⁺ Channels in Single Nerve Terminals," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 49, pp. 47796–47803, Nov. 2002.
- [102] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, Aug. 1970.
- [103] A. Peinnequin, C. Mouret, O. Birot, A. Alonso, J. Mathieu, D. Clarençon, D. Agay, Y. Chancerelle, and E. Multon, "Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green," *BMC Immunol.*, vol. 5, p. 3, Feb. 2004.
- [104] H. Xu, G. Tan, S. Zhang, H. Zhu, F. Liu, C. Huang, F. Zhang, and Z. Wang, "Minocycline reduces reactive gliosis in the rat model of hydrocephalus," *BMC Neurosci.*, vol. 13, no. 1, p. 148, 2012.
- [105] N. Bock, E. Koc, H. Alter, V. Roessner, A. Becker, A. Rothenberger, and T. Manzke, "Chronic Fluoxetine Treatment Changes S100B Expression During Postnatal Rat Brain Development," *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.*, vol. 23, no. 7, pp. 481–489, Sep. 2013.
- [106] D. G. Nicholls and T. S. Sihra, "Synaptosomes possess an exocytotic pool of glutamate," *Nature*, vol. 321, no. 6072, pp. 772–773, Jun. 1986.
- [107] H. Monnerie and P. D. Le Roux, "Reduced dendrite growth and altered glutamic acid decarboxylase (GAD) 65- and 67-kDa isoform protein expression from mouse cortical GABAergic neurons following excitotoxic injury in vitro," *Exp. Neurol.*, vol. 205, no. 2, pp. 367–382, Jun. 2007.
- [108] C. Buddhala, C.-C. Hsu, and J.-Y. Wu, "A novel mechanism for GABA synthesis and packaging into synaptic vesicles," *Neurochem. Int.*, vol. 55, no. 1–3, pp. 9–12, Jan. 2009.
- [109] M. Liguz-Leczna and J. Skangiel-Kramska, "Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system," *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)*, vol. 67, no. 3, pp. 207–218, 2007.
- [110] P. J. Conn and J. P. Pin, "Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 37, pp. 205–237, 1997.
- [111] C. M. Niswender and P. J. Conn, "Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 50, no. 1, pp. 295–322, Feb. 2010.
- [112] P. J. Conn and C. M. Niswender, "mGluR7's lucky number," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 2, pp. 251–252, Jan. 2006.
- [113] A. L. Degano and G. A. Roth, "Synapsin-induced proliferation of T-cell lines against myelin basic protein obtained from rats with experimental autoimmune encephalomyelitis," *Autoimmunity*, vol. 42, no. 8, pp. 661–666, 2009.

- [114] B. B. Kaplan, A. N. Kar, A. E. Gioio, and A. Aschrafi, "MicroRNAs in the axon and presynaptic nerve terminal," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 7, 2013.
- [115] M. Crispino, J. T. Chun, C. Cefaliello, C. Perrone Capano, and A. Giuditta, "Local gene expression in nerve endings," *Dev. Neurobiol.*, vol. 74, no. 3, pp. 279–291, Mar. 2014.
- [116] C. L. Waites, S. A. Leal-Ortiz, N. Okerlund, H. Dalke, A. Fejtova, W. D. Altmann, E. D. Gundelfinger, and C. C. Garner, "Bassoon and Piccolo maintain synapse integrity by regulating protein ubiquitination and degradation," *EMBO J.*, vol. 32, no. 7, pp. 954–969, Apr. 2013.
- [117] L. C. Griffith, C. S. Lu, and X. X. Sun, "CaMKII, an enzyme on the move: regulation of temporospatial localization," *Mol. Interv.*, vol. 3, no. 7, pp. 386–403, Oct. 2003.
- [118] J.-H. Tao-Cheng, A. Dosemeci, C. A. Winters, and T. S. Reese, "Changes in the distribution of calcium calmodulin-dependent protein kinase II at the presynaptic bouton after depolarization," *Brain Cell Biol.*, vol. 35, no. 2–3, pp. 117–124, Oct. 2007.
- [119] V. Marra, J. J. Burden, J. R. Thorpe, I. T. Smith, S. L. Smith, M. Häusser, T. Branco, and K. Staras, "A preferentially segregated recycling vesicle pool of limited size supports neurotransmission in native central synapses," *Neuron*, vol. 76, no. 3, pp. 579–589, Nov. 2012.
- [120] S. H. Kim and T. A. Ryan, "Balance of Calcineurin A and CDK5 Activities Sets Release Probability at Nerve Terminals," *J. Neurosci.*, vol. 33, no. 21, pp. 8937–8950, May 2013.
- [121] P. J. Robinson, "The role of protein kinase C and its neuronal substrates dephosphin, B-50, and MARCKS in neurotransmitter release," *Mol. Neurobiol.*, vol. 5, no. 2–4, pp. 87–130, 1991.
- [122] P. R. Dodd, J. A. Hardy, A. E. Oakley, J. A. Edwardson, E. K. Perry, and J. P. Delaunoy, "A rapid method for preparing synaptosomes: comparison, with alternative procedures," *Brain Res.*, vol. 226, no. 1–2, pp. 107–118, Dec. 1981.
- [123] A. G. Leenders, G. Scholten, V. M. Wiegant, F. H. Da Silva, and W. E. Ghijsen, "Activity-dependent neurotransmitter release kinetics: correlation with changes in morphological distributions of small and large vesicles in central nerve terminals," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 11, no. 12, pp. 4269–4277, Dec. 1999.
- [124] D. Gitler, "Different Presynaptic Roles of Synapsins at Excitatory and Inhibitory Synapses," *J. Neurosci.*, vol. 24, no. 50, pp. 11368–11380, Dec. 2004.
- [125] J. A. Szule, M. L. Harlow, J. H. Jung, F. F. De-Miguel, R. M. Marshall, and U. J. McMahan, "Regulation of Synaptic Vesicle Docking by Different Classes of Macromolecules in Active Zone Material," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 3, p. e33333, Mar. 2012.
- [126] N. Holderith, A. Lorincz, G. Katona, B. Rózsa, A. Kulik, M. Watanabe, and Z. Nusser, "Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone," *Nat. Neurosci.*, vol. 15, no. 7, pp. 988–997, Jun. 2012.
- [127] G. Paxinos and C. Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Amsterdam; Boston: Elsevier, 2007.
- [128] G. Sridharan and A. Shankar, "Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility," *J. Oral Maxillofac. Pathol.*, vol. 16, no. 2, p. 251, 2012.
- [129] R. H. Garman, "Histology of the Central Nervous System," *Toxicol. Pathol.*, vol. 39, no. 1, pp. 22–35, Jan. 2011.

- [130] L. C. Schmued, C. Albertson, and W. Slikker, "Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration," *Brain Res.*, vol. 751, no. 1, pp. 37–46, Mar. 1997.
- [131] H. Kluver and E. Barrera, "A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 12, no. 4, pp. 400–403, Oct. 1953.
- [132] M. Prinz, J. Priller, S. S. Sisodia, and R. M. Ransohoff, "Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration," *Nat. Neurosci.*, vol. 13, no. 10, pp. 1227–1235, Sep. 2011.
- [133] R. A. Jonas, T.-F. Yuan, Y.-X. Liang, J. B. Jonas, D. K. C. Tay, and R. G. Ellis-Behnke, "The Spider Effect: Morphological and Orienting Classification of Microglia in Re-sponse to Stimuli in Vivo," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 2, p. e30763, Feb. 2012.
- [134] D.-C. Wagner, J. Scheibe, I. Glocke, G. Weise, A. Deten, J. Boltze, and A. Kranz, "Object-based analysis of astroglial reaction and astrocyte subtype morphology after ischemic brain injury," *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)*, vol. 73, no. 1, pp. 79–87, 2013.
- [135] T. Matsuki, S. Nakae, K. Sudo, R. Horai, and Y. Iwakura, "Abnormal T cell activation caused by the imbalance of the IL-1/IL-1R antagonist system is responsible for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis," *Int. Immunol.*, vol. 18, no. 2, pp. 399–407, Feb. 2006.
- [136] A. A. Kruglov, V. Lampropoulou, S. Fillatreau, and S. A. Nedospasov, "Pathogenic and protective functions of TNF in neuroinflammation are defined by its expression in T lymphocytes and myeloid cells," *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 187, no. 11, pp. 5660–5670, Dec. 2011.
- [137] C. Sutton, C. Brereton, B. Keogh, K. H. G. Mills, and E. C. Lavelle, "A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis," *J. Exp. Med.*, vol. 203, no. 7, pp. 1685–1691, Jul. 2006.
- [138] M. Giralto, R. Ramos, A. Quintana, B. Ferrer, M. Erta, M. Castro-Freire, G. Comes, E. Sanz, M. Unzeta, P. Pifarré, A. García, I. L. Campbell, and J. Hidalgo, "Induction of atypical EAE mediated by transgenic production of IL-6 in astrocytes in the absence of systemic IL-6," *Glia*, vol. 61, no. 4, pp. 587–600, Apr. 2013.
- [139] C. Woiciechowsky, B. Schöning, G. Stoltenburg-Didinger, F. Stockhammer, and H.-D. Volk, "Brain-IL-1 beta triggers astrogliosis through induction of IL-6: inhibition by pro-pranolol and IL-10," *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.*, vol. 10, no. 9, pp. BR325–330, Sep. 2004.
- [140] J. P. O'Callaghan and K. Sriram, "Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity," *Expert Opin. Drug Saf.*, vol. 4, no. 3, pp. 433–442, May 2005.
- [141] C.-W. Liao, C.-K. Fan, T.-C. Kao, D.-D. Ji, K.-E. Su, Y.-H. Lin, and W.-L. Cho, "Brain injury-associated biomarkers of TGF-beta1, S100B, GFAP, NF-L, tTG, AbetaPP, and tau were concomitantly enhanced and the UPS was impaired during acute brain injury caused by *Toxocara canis* in mice," *BMC Infect. Dis.*, vol. 8, p. 84, 2008.
- [142] M. P. Sanfilippo, R. H. B. Benedict, B. Weinstock-Guttman, and R. Bakshi, "Gray and white matter brain atrophy and neuropsychological impairment in multiple sclerosis," *Neurology*, vol. 66, no. 5, pp. 685–692, Mar. 2006.
- [143] M. Filippi, P. Valsasina, and M. Rocca, "Magnetic resonance imaging of grey matter damage in people with MS," *Int. MS J. MS Forum*, vol. 14, no. 1, pp. 12–21, Mar. 2007.

- [144] H. Kearney, M. A. Rocca, P. Valsasina, L. Balk, J. Sastre-Garriga, J. Reinhardt, S. Ruggieri, A. Rovira, C. Stippich, L. Kappos, T. Sprenger, P. Tortorella, M. Rovaris, C. Gasperini, X. Montalban, J. J. G. Geurts, C. H. Polman, F. Barkhof, M. Filippi, D. R. Alt-mann, O. Ciccarelli, D. H. Miller, and D. T. Chard, "Magnetic resonance imaging correlates of physical disability in relapse onset multiple sclerosis of long disease duration," *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.*, vol. 20, no. 1, pp. 72–80, Jan. 2014.
- [145] G. Mandolesi, G. Grasselli, G. Musumeci, and D. Centonze, "Cognitive deficits in experimental autoimmune encephalomyelitis: neuroinflammation and synaptic de-generation," *Neurol. Sci.*, vol. 31, no. S2, pp. 255–259, Nov. 2010.
- [146] S. Rossi, C. Motta, A. Musella, and D. Centonze, "The interplay between inflammatory cytokines and the endocannabinoid system in the regulation of synaptic transmission," *Neuropharmacology*, Sep. 2014.
- [147] B. Maggio, F. A. Cumar, and H. J. Maccioni, "Lipid content in brain and spinal cord during experimental allergic encephalomyelitis in rats," *J. Neurochem.*, vol. 19, no. 4, pp. 1031–1037, Apr. 1972.
- [148] P. H. Rudebeck, M. E. Walton, B. H. P. Millette, E. Shirley, M. F. S. Rushworth, and D. M. Bannerman, "Distinct contributions of frontal areas to emotion and social behaviour in the rat," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 26, no. 8, pp. 2315–2326, Oct. 2007.
- [149] J. K. Seamans, C. C. Lapish, and D. Durstewitz, "Comparing the prefrontal cortex of rats and primates: insights from electrophysiology," *Neurotox. Res.*, vol. 14, no. 2–3, pp. 249–262, Oct. 2008.
- [150] J. D. Wallis, "Cross-species studies of orbitofrontal cortex and value-based decision-making," *Nat. Neurosci.*, vol. 15, no. 1, pp. 13–19, Jan. 2012.
- [151] Y. Chudasama and T. W. Robbins, "Functions of frontostriatal systems in cognition: comparative neuropsychopharmacological studies in rats, monkeys and humans," *Bi-ol. Psychol.*, vol. 73, no. 1, pp. 19–38, Jul. 2006.
- [152] R. Bakshi, "Fatigue associated with multiple sclerosis: diagnosis, impact and management," *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.*, vol. 9, no. 3, pp. 219–227, Jun. 2003.
- [153] U. Roelcke, L. Kappos, J. Lechner-Scott, H. Brunnschweiler, S. Huber, W. Ammann, A. Plohmman, S. Dellas, R. P. Maguire, J. Missimer, E. W. Radü, A. Steck, and K. L. Leenders, "Reduced glucose metabolism in the frontal cortex and basal ganglia of multiple sclerosis patients with fatigue: a 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography study," *Neurology*, vol. 48, no. 6, pp. 1566–1571, Jun. 1997.
- [154] M. Jehna, C. Langkammer, M. Khalil, S. Fuchs, G. Reishofer, F. Fazekas, F. Ebner, and C. Enzinger, "An exploratory study on the spatial relationship between regional cortical volume changes and white matter integrity in multiple sclerosis," *Brain Connect.*, vol. 3, no. 3, pp. 255–264, 2013.
- [155] M. Pardini, L. Bonzano, L. Roccatagliata, G. L. Mancardi, and M. Bove, "The fatigue-motor performance paradox in multiple sclerosis," *Sci. Rep.*, vol. 3, p. 2001, 2013.
- [156] L. K. Vingara, H. J. Yu, M. E. Wagshul, D. Serafin, C. Christodoulou, I. Pelczer, L. B. Krupp, and M. Maletić-Savatić, "Metabolomic approach to human brain spectroscopy identifies associations between clinical features and the frontal lobe metabolome in multiple sclerosis," *NeuroImage*, vol. 82, pp. 586–594, Nov. 2013.

- [157] G. Sulkowski, B. Dabrowska-Bouta, B. Kwiatkowska-Patzer, and L. Struzyńska, "Al-terations in glutamate transport and group I metabotropic glutamate receptors in the rat brain during acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis," *Folia Neuropathol. Assoc. Pol. Neuropathol. Med. Res. Cent. Pol. Acad. Sci.*, vol. 47, no. 4, pp. 329–337, 2009.
- [158] G. Sulkowski, B. Dąbrowska-Bouta, E. Salińska, and L. Struzyńska, "Modulation of Glutamate Transport and Receptor Binding by Glutamate Receptor Antagonists in EAE Rat Brain," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 11, p. e113954, Nov. 2014.
- [159] H. Vara, F. Onofri, F. Benfenati, M. Sassoè-Pognetto, and M. Giustetto, "ERK activation in axonal varicosities modulates presynaptic plasticity in the CA3 region of the hippocampus through synapsin I," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 24, pp. 9872–9877, Jun. 2009.
- [160] J. Subramanian and A. Morozov, "Erk1/2 inhibit synaptic vesicle exocytosis through L-type calcium channels," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 31, no. 12, pp. 4755–4764, Mar. 2011.
- [161] C. N. G. Giachello, F. Fiumara, C. Giacomini, A. Corradi, C. Milanese, M. Ghirardi, F. Benfenati, and P. G. Montarolo, "MAPK/Erk-dependent phosphorylation of synapsin mediates formation of functional synapses and short-term homosynaptic plasticity," *J. Cell Sci.*, vol. 123, no. Pt 6, pp. 881–893, Mar. 2010.
- [162] Y. Yamagata, "New aspects of neurotransmitter release and exocytosis: dynamic and differential regulation of synapsin I phosphorylation by acute neuronal excitation in vivo," *J. Pharmacol. Sci.*, vol. 93, no. 1, pp. 22–29, Sep. 2003.
- [163] P. Rellos, A. C. W. Pike, F. H. Niesen, E. Salah, W. H. Lee, F. von Delft, and S. Knapp, "Structure of the CaMKII δ /Calmodulin Complex Reveals the Molecular Mechanism of CaMKII Kinase Activation," *PLoS Biol.*, vol. 8, no. 7, p. e1000426, Jul. 2010.
- [164] L.-G. Wu, E. Hamid, W. Shin, and H.-C. Chiang, "Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 76, pp. 301–331, 2014.
- [165] R. Dutta and B. D. Trapp, "Mechanisms of neuronal dysfunction and degeneration in multiple sclerosis," *Prog. Neurobiol.*, vol. 93, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2011.
- [166] T. Shin, M. Ahn, K. Jung, S. Heo, D. Kim, Y. Jee, Y.-K. Lim, and E.-J. Yeo, "Activation of mitogen-activated protein kinases in experimental autoimmune encephalomyelitis," *J. Neuroimmunol.*, vol. 140, no. 1–2, pp. 118–125, Jul. 2003.
- [167] D. Zhu, X. Wu, K. I. Strauss, R. H. Lipsky, Z. Qureshi, A. Terhakopian, A. Novelli, K. Banaudha, and A. M. Marini, "N-methyl-D-aspartate and TrkB receptors protect neurons against glutamate excitotoxicity through an extracellular signal-regulated kinase pathway," *J. Neurosci. Res.*, vol. 80, no. 1, pp. 104–113, Apr. 2005.
- [168] R. D. Almeida, B. J. Manadas, C. V. Melo, J. R. Gomes, C. S. Mendes, M. M. Grãos, R. F. Carvalho, A. P. Carvalho, and C. B. Duarte, "Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways," *Cell Death Differ.*, vol. 12, no. 10, pp. 1329–1343, Oct. 2005.
- [169] X.-X. Fang, X.-L. Jiang, X.-H. Han, Y.-P. Peng, and Y.-H. Qiu, "Neuroprotection of Interleukin-6 Against NMDA-induced Neurotoxicity is Mediated by JAK/STAT3, MAPK/ERK, and PI3K/AKT Signaling Pathways," *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 33, no. 2, pp. 241–251, Mar. 2013.

- [170] S. Álvarez, A. Blanco, M. Fresno, and M. Á. Muñoz-Fernández, "TNF- α Contributes to Caspase-3 Independent Apoptosis in Neuroblastoma Cells: Role of NFAT," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 1, p. e16100, Jan. 2011.
- [171] D. M. Sama and C. M. Norris, "Calcium dysregulation and neuroinflammation: Discrete and integrated mechanisms for age-related synaptic dysfunction," *Ageing Res. Rev.*, vol. 12, no. 4, pp. 982–995, Sep. 2013.
- [172] K. Potluri, D. Holt, and S. Hou, "Neurologic complications in renal transplantation," in *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 121, Elsevier, 2014, pp. 1245–1255.
- [173] D. A. Brown and P. E. Sawchenko, "Time course and distribution of inflammatory and neurodegenerative events suggest structural bases for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis," *J. Comp. Neurol.*, vol. 502, no. 2, pp. 236–260, May 2007.
- [174] R. A. Linker, F. Lühder, K.-J. Kallen, D.-H. Lee, B. Engelhardt, S. Rose-John, and R. Gold, "IL-6 transsignalling modulates the early effector phase of EAE and targets the blood-brain barrier," *J. Neuroimmunol.*, vol. 205, no. 1–2, pp. 64–72, Dec. 2008.
- [175] B. Moreno, J.-P. Jukes, N. Vergara-Irigaray, O. Errea, P. Villoslada, V. H. Perry, and T. A. Newman, "Systemic inflammation induces axon injury during brain inflammation," *Ann. Neurol.*, vol. 70, no. 6, pp. 932–942, Dec. 2011.
- [176] M. Pickering, D. Cumiskey, and J. J. O'Connor, "Actions of TNF-alpha on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system," *Exp. Physiol.*, vol. 90, no. 5, pp. 663–670, Sep. 2005.
- [177] S. L. Montgomery and W. J. Bowers, "Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system," *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. Neuroimmune Pharmacol.*, vol. 7, no. 1, pp. 42–59, Mar. 2012.
- [178] J. J. Iliff and M. Nedergaard, "Is there a cerebral lymphatic system?," *Stroke J. Cereb. Circ.*, vol. 44, no. 6 Suppl 1, pp. S93–95, Jun. 2013.
- [179] J. J. Iliff, H. Lee, M. Yu, T. Feng, J. Logan, M. Nedergaard, and H. Benveniste, "Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI," *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 3, pp. 1299–1309, Mar. 2013.
- [180] Y. Ueta, Y. Hirai, T. Otsuka, and Y. Kawaguchi, "Direction- and distance-dependent interareal connectivity of pyramidal cell subpopulations in the rat frontal cortex," *Front. Neural Circuits*, vol. 7, 2013.
- [181] G. Paxinos, Ed., *The rat nervous system*, 3rd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press, 2004.
- [182] B. Kolb and R. Gibb, "Plasticity in the prefrontal cortex of adult rats," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 9, Feb. 2015.