

Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

**Optimización de un modelo celular para la
evaluación de diferencias sexo-específicas en
condiciones normales y de daño al sistema
nervioso central**

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología

Matilde Cabrera (238131)

Valentina Rosselló (254743)

Tutora: Dra. Silvia Olivera-Bravo

2025

Declaración de Autoría

Nosotras, Matilde Cabrera y Valentina Rosselló, declaramos que el trabajo que se presenta en esta obra es de nuestra propia mano. Podemos asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizábamos el trabajo final de carrera de Ingeniería en Biotecnología;
- Cuando hemos consultado el trabajo publicado por otros, lo hemos atribuido con claridad;
- Cuando hemos citado obras de otros, hemos indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente nuestra;
- En la obra, hemos acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, hemos explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por nosotros;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Matilde Cabrera Vila



Valentina Rosselló Zapata

10 de marzo de 2025

Agradecimientos

En primer lugar, queremos agradecer a nuestra tutora Silvia Olivera, su pasión incansable por encontrar respuestas y su atención al detalle nos determinó cada paso de la investigación. Su disposición para buscar nuevas avenidas de enriquecer nuestra formación académica fue una guía fundamental para introducirnos a un área de la ciencia que nos define como humanos: la neurociencia.

Por otra parte, queríamos agradecer a todos nuestros amigos de la facultad, empezamos la carrera siendo cuadrados en una llamada de Zoom y terminamos encontrando amistades hermosas, las risas nos acompañaron en cada laboratorio.

A todo el departamento de NBNP del IIBCE, que estuvieron abiertos a todas nuestras preguntas dando el consejo correcto.

A nuestras correctoras, Sofía Ibarburu y Josefina Louge, que han aceptado ser parte de este proceso de corrección, y dedicarle su tiempo. Aportaron su conocimiento, ideas y comentarios, lo necesario para colaborar con nuestro trabajo.

Yo Matilde, quería agradecer a toda mi familia desde Montevideo a Melo, que fueron un aliento constante estos últimos cinco años, su amor y contención me llenan de confianza para los próximos pasos en la carrera profesional y la vida. A mis amigas de toda la vida, gracias por su amor incondicional, por acompañar en las subidas y las bajadas, todo con una sonrisa. El mundo cambia pero nuestra amistad está siempre, las adoro.

Yo Valentina, quería agradecer a mis padres y mi hermano que fueron mi gran apoyo toda la vida, y que con su amor, me han acompañado siempre en este largo camino y en todo lo que me proponga. A mis abuelos, que han estado en cada alegría y tristeza, bancando y apoyándome siempre. A Gonza, por acompañarme, escucharme y aconsejarme, siempre demostrándome su orgullo e impulsándome a lograr mis objetivos. Y por último a mis amigas, por su incondicionalidad, por apoyarme siempre en todas y estar ahí en cada momento.

Gracias a todos, sin ustedes no hubiese sido posible.

Resumen

Las enfermedades neurodegenerativas son enfermedades incurables caracterizadas por la muerte de poblaciones neuronales específicas que presentan diferencias sexo-específicas en su incidencia, prevalencia y progresión. Sin embargo, la mayoría de los modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas no incluyen el sexo como variable, lo que limita el estudio y desarrollo de estrategias terapéuticas eficientes. En este trabajo se optimizaron modelos celulares para identificar diferencias sexo-específicas en condiciones normales y patológicas.

Las probables respuestas sexo-específicas se analizaron en cultivos primarios de astrocitos corticales y de médula espinal de ratas neonatas machos y hembras wild-type (WT), y de ratas del modelo preclínico de esclerosis lateral amiotrófica SOD1G93A. Se evaluó viabilidad celular, funcionalidad mitocondrial y niveles de glutatión mediante técnicas bioquímicas, inmunocitoquímica y microscopía de campo claro y confocal, en condiciones basales y luego de inducir estrés oxidativo (H_2O_2 y/o D-galactosa) con/sin daño mecánico. Como resultados preliminares se comenzó a analizar el efecto de la disfunción astrocitaria en la supervivencia neuronal mediante co-cultivos de astrocitos aberrantes de animales SOD1G93A terminales con la línea de motoneuronas espinales NSC-34.

Frente a los resultados obtenidos en ratas macho hermanos de igual condición experimental, los datos de los astrocitos corticales de ratas hembra WT presentaron mayor viabilidad basal y hasta 50 mM de H_2O_2 , una mayor tendencia a mantener la viabilidad ante galactosa 10 mM y mejor respuesta frente al daño mecánico/galactosa. Los astrocitos de la médula espinal de ratas hembra WT fueron más vulnerables al estrés oxidativo agudo inducido por H_2O_2 y se dañaron significativamente frente a galactosa 10 mM respecto al macho, lo que pareció relacionarse con los niveles menores de glutatión y de potencial mitocondrial. Los astrocitos SOD1G93A espinales de ratas hembra presentaron menor viabilidad basal y frente a galactosa 10 mM, menores niveles de glutatión y de potencial mitocondrial, y mejor respuesta frente al daño mecánico/galactosa respecto al macho.

Estos resultados permiten proponer a los astrocitos WT corticales y espinales como modelos celulares adecuados para evaluar respuestas sexo-específicas en la corteza y la médula espinal lumbar ante daño oxidativo agudo. Los astrocitos SOD1G93A parecen ser más adecuados para

evaluar respuestas sexo-específicas en condiciones basales y ante daño mecánico y oxidativo moderado. Los resultados preliminares del modelo astrocitos aberrantes adultos/NSC-34 sugieren que puede ser adecuado para evaluar los efectos de las diferencias sexo-específicas de los astrocitos sobre las neuronas, así como para incluir la edad como variable, dada su importancia en las enfermedades neurodegenerativas.

Como perspectiva general, se propone profundizar en el conocimiento de estos modelos y optimizarlos para evaluar las respuestas sexo-específicas y región-específicas de diferentes neuroprotectores potenciales con acción antioxidante o como eventuales moderadores de la reactividad astrocitaria aguda inducida por daño mecánico, lo que es una alternativa terapéutica relevante.

Palabras clave

Sistema nervioso central, astrocitos, corteza, médula espinal, reactividad glial, reactividad astrocitaria, daño oxidativo, modelo experimental.

Abreviaturas

WT: Wild-type

ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica

NSC-34: Línea celular Neuroblastome Spinal Cord Cells

SNC: Sistema Nervioso Central

LPS: Lipopolisacáridos

TNF- α : Factor de necrosis tumoral de tipo alfa (citoquina proinflamatoria)

IL-10: Interleuquina 10 (citoquina antiinflamatoria)

IL-1: Interleuquina 1 (citoquina proinflamatoria)

IL-6: Interleuquina 6 (citoquina proinflamatoria)

ARC: núcleo arqueado

ER α : receptor de estrógeno α

GFAP: proteína ácida fibrilar glial

HFD: dieta rica en grasas

HYP: hipotálamo

POA: área preóptica

PVN: núcleo paraventricular

C1q: citoquina proinflamatoria

A1: astrocitos

USD: dólares americanos

ROS: Especies reactivas de oxígeno

fALS: ELA familiar

SOD1: enzima superóxido dismutasa 1

ARN: ácidos rribonucleicos

ADN: ácidos deoxinucleicos

Nrf2: factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2

TDP-43: agregación citoplasmática de la proteína TAR 43 de unión al ADN

SOD1G93A: mutación del gen que codifica para la enzima superóxido dismutasa 1

S100 β : isoforma β de la proteína S100

GFAP: proteína ácida fibrilar glial

GALT: gen de la enzima galactosa-1-fosfato uridiltransferasa

DAPI: diaminofenilindol

CHEA: Comisión Honoraria de Experimentación Animal

IIBCE: Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

URBE: Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación

FMED: Facultad de Medicina

mm: milímetro

mM: milimolar

KCl: Cloruro de Potasio

MgCl₂: Cloruro de Magnesio

°C: Celsius

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PBS: Solución salina buffer fosfato

DMEM: medio Eagle modificado de Dulbecco

FBS: Suero fetal bovino

min: minutos

CO₂: Dióxido de carbono

rpm: revoluciones por minuto

DMEM HG: Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose

cm²: centímetros cuadrados

NaN₃: azida de sodio

TN: tunicamicina

Gal: D-galactosa

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

DMSO: dimetilsulfóxido

nm: nanómetros

SRB: sulforrodamina B

TCA: ácido tricloroacético

MCB: monoclorobimano

GSH: glutatión

MT: MitoTracker

BSA: Seroalbúmina bovina

Faloidina-488: sonda de Faloidina conjugada a Alexa Fluor 488

MGV: Mean Gray Value

CX: Corteza cerebral

SC: Médula espinal

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

ATP: adenosín trifosfato

COX IV-2: isoforma 2 de la subunidad 4 de la citocromo c oxidasa

AGEs: productos finales de glicación avanzada

RAGEs: receptores de productos finales de glicación avanzada

ESID: Electronically switchable illumination and detection module, luz transmitida

AbAs: astrocitos aberrantes aislados de ratas SOD1G93A +

Fw: Primer directo (del inglés *Forward*)

Rv: Primer reverso (del inglés *Reverse*)

SBN: Sobrenadante

Índice

1. Introducción	14
1.1. <i>El Sistema Nervioso Central (SNC): Generalidades y componentes celulares</i>	14
1.2. <i>Diferencias sexo-específicas en el SNC: posible participación de las células gliales ..</i>	16
1.2.1. <i>Daño asociado a Cromosoma X.....</i>	18
1.3. <i>Respuesta de la glía al daño</i>	21
1.4. <i>Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).....</i>	24
1.4.1. <i>Mecanismos de daño al SNC en la ELA.....</i>	26
1.4.2. <i>Modelos de ELA</i>	32
1.4.2.1. <i>Modelo de ELA dependiente de SOD1</i>	34
1.5. <i>Galactosemia (asociado a sistema nervioso, diferencial por sexo).....</i>	37
2. Fundamentación del trabajo realizado	39
3. Hipótesis.....	42
4. Objetivos	43
4.1. <i>Objetivo general</i>	43
4.2. <i>Objetivos específicos</i>	43
5. Ética.....	44
6. Metodología	45
6.1. <i>Modelo experimental animal</i>	45
6.2. <i>Genotipado de ratas</i>	46
6.3. <i>Procesamiento de animales y obtención de muestras</i>	47
6.4. <i>Generación de cultivos primarios de astrocitos corticales y de médula espinal</i>	48
6.5. <i>Mantenimiento de células de línea NSC-34</i>	49
6.6. <i>Estímulo/Tratamiento de daño a cultivos primarios (daño oxidativo, y daño oxidativo mediado por galactosa).....</i>	49
6.7. <i>Análisis de funcionalidad mitocondrial: Ensayo de MTT</i>	50
6.8. <i>Análisis de Citotoxicidad mediante Sulforodamina B (SRB)</i>	51
6.9. <i>Análisis de los niveles de Glutación.....</i>	52
6.10. <i>Análisis de potencial e integridad de la membrana mitocondrial.....</i>	52

6.11.	<i>Inmunocitoquímica para GFAP y S100β.....</i>	53
6.12.	<i>Evaluación de respuesta al daño mecánico “scratch”</i>	54
6.13.	<i>Análisis estadístico</i>	55
7.	Resultados y Discusión	57
7.1.	<i>Optimización de los cultivos primarios de astrocitos corticales de ratas WT neonatas, machos y hembras, en condiciones basales y evaluación de su respuesta a distintos estresores, para identificación de posibles respuestas sexo-específicas.....</i>	57
7.1.1.	<i>Optimización y caracterización de los cultivos de astrocitos corticales.....</i>	57
7.1.2.	<i>Análisis de la respuesta sexo-específica de astrocitos corticales frente a distintos estímulos de daño</i>	60
7.1.2.1.	<i>Respuesta al estrés oxidativo mediado por H₂O₂.....</i>	60
7.1.2.2.	<i>Respuesta al estrés oxidativo mediado por H₂O₂ en co-exposición con azida de sodio</i>	65
7.1.2.3.	<i>Respuesta al estrés oxidativo inducido por galactosa.....</i>	69
7.1.2.4.	<i>Respuesta al estrés oxidativo inducido por galactosa en co-exposición con H₂O₂</i>	79
7.1.2.5.	<i>Evaluación de respuesta al daño mecánico “scratch” en cultivos astrocitarios de corteza WT</i>	81
7.2.	<i>Optimización de los cultivos primarios de astrocitos espinales de ratas WT y SOD1G93A neonatas, machos y hembras, en condiciones basales y evaluación de su respuesta a distintos estresores, para identificación de posibles respuestas sexo-específicas.....</i>	87
7.2.1.	<i>Optimización y caracterización de los cultivos de astrocitos espinales WT</i>	87
7.2.2.	<i>Análisis de la respuesta sexo-específica de astrocitos espinales WT frente a distintos estímulos de daño</i>	91
7.2.2.1.	<i>Respuesta al estrés oxidativo mediado por H₂O₂.....</i>	91
7.2.2.2.	<i>Respuesta al estrés oxidativo mediado por galactosa.....</i>	94
7.2.3.	<i>Análisis de la respuesta sexo-específica de astrocitos espinales SOD1G93A frente a distintos estímulos de daño</i>	96
7.2.3.1.	<i>Respuesta al estrés oxidativo mediado por galactosa.....</i>	96
7.2.3.2.	<i>Niveles de glutatión en cultivos de astrocitos de médula espinal WT vs SOD1G93A.....</i>	99
7.2.3.3.	<i>Análisis del potencial mitocondrial en cultivos WT y SOD1G93A+ tratados con galactosa.....</i>	104
7.2.3.4.	<i>Respuesta al daño mecánico “scratch” en cultivos de médula espinal SOD1G93A.....</i>	108

8. Conclusiones	116
9. Perspectivas.	118
10. Referencias Bibliográficas.....	120
11. Anexo 1	129
<i>11. 1. Optimización del cultivo de células NSC-34 y evaluación de su respuesta frente al daño oxidativo</i>	<i>129</i>
<i>11. 2. Optimización del co-cultivo de células NSC-34 y evaluación de su respuesta frente al daño oxidativo</i>	<i>132</i>

1. Introducción

1.1. El Sistema Nervioso Central (SNC): Generalidades y componentes celulares

El Sistema Nervioso Central (SNC), compuesto por el cerebro y la médula espinal (continuación del cerebro que está protegida por la columna vertebral), recibe y envía información de todo el cuerpo y la utiliza para controlar las emociones, el aprendizaje, la memoria y las funciones de todo el organismo. Esta información es integrada y transportada por unidades celulares individuales llamadas neuronas. El cerebro de un mamífero contiene entre 100 millones y 100 billones de neuronas, dependiendo de la especie, lo que le otorga una gran capacidad de comunicación [1]. Además, los patrones específicos de comunicación son influenciados por la interacción variable entre los genes de una persona y su entorno. Esta capacidad del cerebro de adaptarse a su entorno es denominada plasticidad, y constituye una de las bases del aprendizaje y la memoria [1].

Se identifican dos clases principales de células neurales en el SNC de mamíferos, las neuronas y la glía. Dentro de las neuronas se encuentran distintos tipos que son clasificados fundamentalmente de acuerdo con la función principal:

- **Motoras o motoneuronas:** transportan comandos desde el cerebro o la médula espinal, hasta los músculos y las glándulas.
- **Sensoriales:** transportan la información que adopta el cuerpo mediante los sensores ubicados en su periferia hacia el sistema nervioso, tanto para la percepción del entorno como para la coordinación motora.
- **Interneuronas:** son neuronas cuyos axones permanecen dentro de una región y median la comunicación entre circuitos locales a diferencia de las neuronas de proyección como las motoneuronas, por ejemplo.

La glía o las células gliales apoyan a las neuronas y se encuentran en sus alrededores o cercanas a sus prolongaciones o contactos sinápticos. Las células gliales presentan diferencias a nivel morfológico y funcional entre sí mismas y con las neuronas. En un vertebrado, se puede clasificar a la glía en dos tipos diferenciables por origen y por tamaño: microglía y macroglía.

El 10% de la glía del SNC se compone por la microglía (compuesta por las células gliales más pequeñas) y que es de origen mesodérmico y se encuentra en el parénquima cerebral. En condiciones normales, estas células actúan como sensores del ambiente extracelular, respondiendo de manera rápida y comunicando cambios (por ejemplo, en condiciones de daño) a las células neurales circundantes o células inmunológicas que no pertenecen al SNC [2, 3]. La microglía es parte del sistema inmune, por lo que son células especializadas en la defensa, para lo cual actúan como presentadoras de antígenos, y en el caso de una lesión, infección o enfermedad degenerativa, se vuelven fagocitos, cuya función es clave para mantener la salud cerebral.

La macroglía del SNC está compuesta principalmente por dos tipos celulares: los oligodendrocitos y los astrocitos. En un cerebro humano adulto, la macroglía representa alrededor del 80% del total de células [4].

Los oligodendrocitos son células de cuerpo pequeño con pocos procesos, que poseen la función de sintetizar la vaina de mielina la cual se enrolla como un espiral alrededor de decenas de segmentos axonales. Esta vaina de mielina que recubre segmentos del axón actuando como un aislante, permite la rápida conducción de las señales eléctricas a través del mismo, ya que cada señal se transmite sin decremento entre los espacios sin mielina (nodos de Ranvier) [4]. Los oligodendrocitos también participan en la coordinación de señales y en el aporte de glucosa a las neuronas [5].

Los astrocitos poseen cuerpos celulares irregulares, presentan formas variables, aunque toman su nombre de la forma estrellada de sus procesos más prominentes y de su cuerpo celular surge un alto número de procesos, siendo los más ramificados, los astrocitos que están presentes en la sustancia gris. Estas células son polarizadas, se encuentran en contacto no solo con las neuronas (a nivel de las sinapsis y de los nodos de Ranvier), sino también con los capilares sanguíneos. Se ha descrito que los astrocitos cumplen muchas funciones que tienen como objetivo apoyar a las neuronas, entre las que se incluyen: mantenimiento de la homeostasis del SNC a todos los niveles, mantener separados grupos de neuronas y distintos circuitos, colaborar en la regulación de la concentración de iones extracelulares, llevar a cabo tareas cruciales para la señalización eficiente como la regulación de la concentración de neurotransmisores, favorecer la nutrición de neuronas circundantes liberando factores de crecimiento, ser la fuente principal de glutatión (que es la defensa celular antioxidante más importante), participar en la unidad neurovascular, tapizando más

del 95% de los capilares del SNC y jugar un rol importante en el mantenimiento de la barrera hematoencefálica [4, 6].

1.2. Diferencias sexo-específicas en el SNC: posible participación de las células gliales

El sexo de un organismo tiene una influencia crucial en varios aspectos de un individuo incluyendo la función del sistema nervioso e inmunológico, la fisiología, el comportamiento, la salud mental, el desarrollo de enfermedades y probablemente la respuesta a las alternativas terapéuticas disponibles. La prevalencia, los síntomas o la resolución de distintas enfermedades del SNC suelen ser diferentes entre los sexos, por lo que se entiende que la sensibilidad de los humanos a distintas enfermedades sea sexo-específica [7]. Sin embargo, el sexo es uno de los factores que recién en los últimos años está siendo tenido en cuenta en las enfermedades neurológicas y neurodegenerativas, tanto en los estudios clínicos como en los experimentales.

Tomando en consideración que la glía juega un rol crítico en la plasticidad sináptica normal y en la homeostasis cerebral, y que la misma juega un rol fundamental en el desarrollo de las patologías del SNC, es posible que (como diversos estudios proponen) las diferencias sexuales en la función glial puedan influenciar los mecanismos presentes en diversas patologías del SNC, y explicar al menos en parte las evidentes diferencias que se presentan entre ambos sexos [8–10].

Como fue previamente mencionado, las células gliales desempeñan un papel importante en la respuesta homeostática endógena del tejido nervioso y se han descrito diferencias sexo-específicas en el transcriptoma y la función gliales [7–11]. Por lo tanto, resulta necesario estudiar el posible papel de las células gliales en la generación de diferencias sexuales en alteraciones patológicas del sistema nervioso.

Tomando como base que los astrocitos y la microglía juegan un rol crítico en el desarrollo de ciertos procesos neurales, Schwarz y Bilbo et al. (2012) [9] decidieron estudiar las posibles diferencias (morfológicas, funcionales o en cantidad) de estas células en el cerebro en desarrollo y una vez desarrollado. Los resultados obtenidos mostraron que en el cerebro en desarrollo previo a la adolescencia, los hombres poseen un número mayor de células de la microglía. Luego de la adolescencia los resultados se revierten ya que las mujeres presentan mayor cantidad de

microglías, la cual presenta una morfología más activada (con procesos más anchos y más ramificados). Este estudio también reporta mayor número de astrocitos en ratones hembra a medida que aumenta la edad y atribuye a factores genéticos, aún no identificados completamente, como los capaces de generar una potencial diferencia entre el número y la morfología de las células gliales entre ambos sexos.

Por su parte, Chistyakov et al. (2018) [8] se propusieron estudiar las diferencias sexo-específicas que pudiesen surgir en un modelo de inflamación en astrocitos de ratas, machos y hembras, y compararlos con los controles respectivos. Estos autores observaron que al exponer astrocitos de ratas macho o de ratas hembra a estímulos inflamatorios había distintas respuestas y morfología según el sexo. En caso de inflamación generada por lipopolisacáridos (LPS), los astrocitos de las ratas hembra mostraron una mayor regulación positiva de la citoquina proinflamatoria factor de necrosis tumoral de tipo alfa ($TNF-\alpha$) y una menor expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10, lo que es consecuente con la mayor sensibilidad presentada por las mujeres a las enfermedades con un componente inflamatorio. Otros estudios apoyan la importancia del estudio de las diferencias sexo-específicas de la glía en enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, al estudiar la respuesta de astrocitos de ratas macho y ratas hembra al fragmento 1-40 del beta amiloide, Lennol et al. (2021) [12] encontraron que los astrocitos de ratas macho respondían con un mayor número de células y menor muerte celular. Además, los astrocitos de ratas hembras presentaron una mayor respuesta inflamatoria, sugiriendo que las respuestas astrocitarias al principal componente de las placas amiloides en condiciones proinflamatorias podrían estar implicadas en la mayor incidencia de Enfermedad de Alzheimer en las mujeres. Estos estudios han demostrado que la glía reacciona a las agresiones patológicas con efectos neuroprotectores y regenerativos específicos del sexo. Un resumen de algunos de los resultados obtenidos se puede observar en la Figura 1.

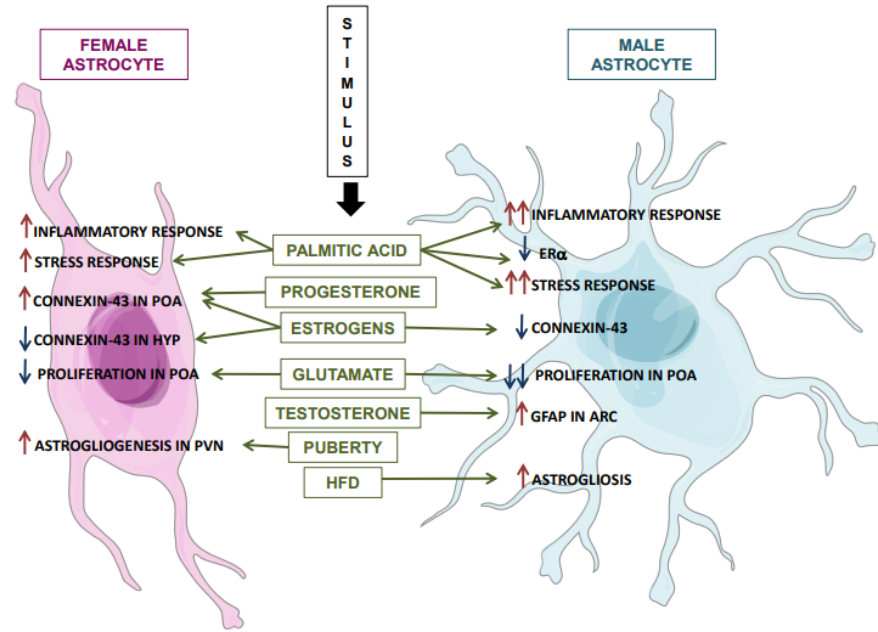


Figura 1. Representación esquemática de algunas de las diferencias observadas entre los astrocitos masculinos y femeninos, asociados fundamentalmente a diferentes niveles de respuesta al daño del SNC. Abreviaturas: ARC: núcleo arqueado; ER α : receptor de estrógeno α ; GFAP: proteína ácida fibrilar glial; HFD: dieta rica en grasas; HYP: hipotálamo. POA: área preóptica; PVN: núcleo paraventricular. Extraído de Chowen et al. (2018) [11].

1.2.1. Daño asociado a cromosoma X

Los autores también proponen que al menos tres factores determinan la respuesta sexo-específica de la glía: los genes de los cromosomas sexuales, las hormonas gonadales y los metabolitos de las hormonas esteroides neuroactivas, como se puede observar en la Figura 2. Los cromosomas sexuales determinan las diferencias en las respuestas transcripcionales en la glía después de una lesión cerebral, mientras que las hormonas gonadales y sus metabolitos activan mecanismos neuroprotectores específicos del sexo en estas células [11]. Considerando que existen diferencias innatas entre machos y hembras que están relacionadas con genes ubicados en los cromosomas sexuales [11, 13], entre los aspectos que restan estudiar se incluye el efecto de los cromosomas sexuales en la respuesta de las células gliales a las alteraciones patológicas del sistema nervioso.

Por otra parte, las diferencias entre machos y hembras en la morfología, fenotipo celular y funcionamiento de los circuitos metabólicos están influenciadas fuertemente por diferencias genéticas fundamentales como la expresión de genes en los cromosomas sexuales [7, 11, 13, 14]. Estos genes tienen un papel crítico en la regulación metabólica y en la respuesta a alteraciones patológicas en el sistema nervioso. En particular, los efectos de los cromosomas sexuales sobre las células gliales pueden contribuir a la manifestación diferencial de enfermedades del SNC entre sexos.

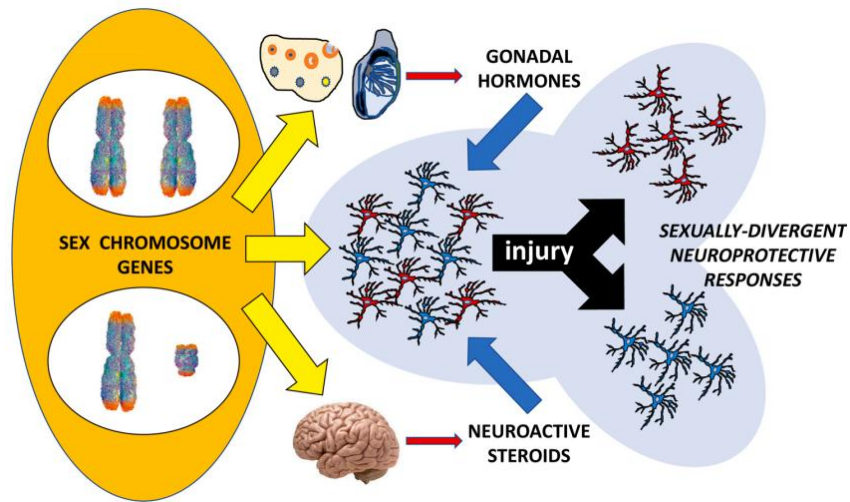


Figura 2. Representación esquemática de cómo los genes de los cromosomas sexuales determinan las diferencias sexuales en las células gliales, tanto dependientes como independientes de las hormonas. Además, los genes de los cromosomas sexuales interactúan con las hormonas gonadales y los esteroides neuroactivos para provocar respuestas neuroprotectoras y neuroreparadoras específicas del sexo en las células gliales después de una lesión del sistema nervioso. Extraído de Chowen et al. (2021) [7].

La mayoría de los efectos de los cromosomas XY y XX pueden atribuirse a genes localizados en el cromosoma X [7]. Aunque en los mamíferos se compensa el grado de expresión de genes del cromosoma X mediante la inactivación de uno de los dos cromosomas X en hembras, esta inactivación es incompleta. En los seres humanos se ha estimado que la inactivación incompleta

afecta al menos al 23% de los genes del cromosoma X [15] y varía entre células, tejidos e individuos. En el cerebro ocurre de igual manera y múltiples genes del cromosoma X escapan a la inactivación, lo que da lugar a sesgos sexuales en la expresión génica de las neuronas y las células gliales [7] como se muestra en la Figura 2. Los genes del cromosoma Y también pueden contribuir a los efectos sexo-específicos ya que, por ejemplo, la regulación negativa del cromosoma Y en el cerebro humano aumenta el riesgo de Enfermedad de Alzheimer [16], lo que sugiere que el cromosoma Y ofrece resiliencia a la enfermedad.

Todos estos estudios sugieren que los genes de los cromosomas sexuales pueden contribuir a generar diferencias sexuales en la patología cerebral. Aunque se necesitan más investigaciones para aclarar el papel preciso de las células gliales en muchos los efectos atribuibles a la expresión de genes presentes en los cromosomas sexuales, es interesante observar que los cromosomas XX dan como resultado un mayor nivel de activación de la microglía después de un accidente cerebrovascular en ratones de edad avanzada en comparación con los cromosomas XY [17]. Este hallazgo sugiere que los cromosomas sexuales pueden contribuir a la generación de una respuesta inmunitaria sexualmente dimórfica mediada por la microglía. Además, las células gliales están involucradas o juegan un papel importante en el fenotipo neurológico de numerosas enfermedades ligadas al cromosoma X, como se reporta en los astrocitos en la discapacidad intelectual ligada al cromosoma X [18] y los astrocitos y la microglía en el síndrome de Rett [19, 20].

Además, las diferencias sexuales en los astrocitos pueden resultar de diferencias directas en los cromosomas sexuales de estas células o también de una exposición diferente a los esteroides sexuales durante el desarrollo [21]. La exposición hormonal temprana, las hormonas endógenas y la organización cromosómica influyen en las diferencias sexuales en el cerebro [22], particularmente en los astrocitos [22]. Debido a que las células cultivadas no están expuestas a los mismos niveles de hormonas sexuales que circulan en el cerebro, cualquier diferencia sexual observada in vitro probablemente sería causada por modificaciones organizacionales que ocurren en el útero o diferencias intrínsecas en la expresión génica entre las células que contienen cromosomas XX y XY [23]. Aunque en las evidencias experimentales existentes los astrocitos sanos muestran relativamente pocas diferencias sexuales, los estudios adicionales deberían investigar si las diferencias subyacentes en el estado epigenético podrían contribuir a las respuestas

específicas del sexo a insulto o lesión y, en última instancia, conocer si subyacen a las diferencias sexuales en las enfermedades neurológicas [24].

En resumen, conocer la implicación de la glía en las respuestas sexo-específicas cerebrales representa un indudable avance para las neurociencias y también para el desarrollo de terapias sexo-específicas que puedan ser más eficaces que las actuales disponibles, que básicamente atienden al control de los síntomas de cada enfermedad.

1.3. Respuesta de la glía al daño

El SNC está expuesto a un gran número de insultos heterogéneos de diversos orígenes y que generan respuestas variables. Dentro de las enfermedades más comunes del SNC se encuentran la lesión cerebral traumática, el accidente cerebrovascular, la lesión de la médula espinal, la epilepsia, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Junto con el daño neuronal, las células gliales son actores principales en estas enfermedades [2, 25].

Las células gliales del SNC proporcionan apoyo estructural y fisiológico crucial para el correcto funcionamiento de las neuronas. En casos de insulto al SNC, la glía (fundamentalmente la microglía y los astrocitos) es capaz de responder involucrando gran cantidad de interacciones complejas que se dan entre células con diferentes linajes y funciones, de grado y manera tales que generan un gran impacto en las interacciones neuronales y en las funciones del SNC [3, 25].

En respuesta al insulto, en forma dependiente del origen, tipo y localización del mismo, la glía adopta un estado de reactividad denominado gliosis donde dichas células en un intento de reparar el daño al SNC pueden alterar su número, perder funciones protectoras y paradójicamente, ganar funciones neurotóxicas. La preservación de las funciones protectoras o beneficiosas de las células gliales también depende del estado de activación de las mismas, del progreso de la enfermedad y del tamaño del insulto generado [3].

Es más, los múltiples cambios que sufren las células gliales llevan a que la glía reactiva (en comparación con la glía en condiciones basales) altere la expresión génica, estructura y funciones en forma permanente. Esta reactividad glial tiene entonces un impacto en la comunicación con las neuronas y en la interacción entre los distintos tipos celulares que componen la glía, retroalimentando las señales negativas fundamentalmente y contribuyendo al establecimiento de una situación de daño crónica y progresiva [6, 25, 26].

En cuanto al papel de los distintos linajes celulares, las células de la microglía actúan como sensores del ambiente extracelular respondiendo de manera rápida y comunicando cambios (por ejemplo, en condiciones de daño) a células neurales circundantes o células inmunológicas que no pertenecen al SNC. Cuando la microglía se encuentra reactiva secreta altos niveles de citoquinas, dentro de las cuales se encuentra TNF- α . Esta citoquina pro-inflamatoria que contribuye a debilitar la integridad de la barrera hematoencefálica en condiciones de inflamación cerebral también juega un rol importante en la promoción de la diferenciación de células precursoras de oligodendrocitos en casos de desmielinización, y en condiciones normales contribuye con el control de la función y plasticidad de distintos circuitos neurales. TNF- α y otras moléculas pro-inflamatorias, son capaces de activar no sólo la microglía (microgliosis o microglía reactiva) sino también a los astrocitos y a los macrófagos de la periferia, siendo capaces de causar un segundo insulto que puede ser de mayor grado y duración que el primero [2, 3].

Se conoce que la microglía y los astrocitos suelen estar muy relacionados e influirse mutuamente, los astrocitos liberan señales moleculares captadas por la microglía desencadenando respuestas fisiológicamente relevantes y viceversa. Un claro ejemplo de la influencia de la microglía reactiva sobre los astrocitos fue proporcionado por Liddel et al. (2017) [27], que demostraron que la microglía activada secreta citoquinas (IL-1 α , TNF- α y C1q) que son capaces de inducir un tipo de astrocitos (A1) que pierde la capacidad de promover la supervivencia neuronal, el crecimiento, la sinaptogénesis y la fagocitosis, e inducen la muerte de neuronas y oligodendrocitos. Los autores también demostraron que la inhibición de la formación de astrocitos A1 previene la muerte de neuronas del SNC axotomizadas. También demostraron que los astrocitos A1 son abundantes en las enfermedades de Alzheimer, Huntington, Parkinson y la ELA [27].

Los astrocitos, en condiciones de enfermedad o daño a nivel del SNC adoptan un fenotipo reactivo denominado reactividad astrocitaria, astrocitosis o astrogliosis. La astrogliosis reactiva es una

respuesta conservada evolutivamente que puede ser tanto beneficiosa como perjudicial para la función neuronal. La reactividad astrocitaria es una respuesta crucial para el SNC, ya que además de intentar ser neuroprotectora, es capaz de influenciar el desarrollo de numerosos casos de enfermedad o daño [28].

La reactividad astrocitaria puede generar cambios a nivel de la morfología, la expresión molecular y las funciones. Estos cambios pueden ir evolucionando con el transcurso de la enfermedad, incluso pueden resolverse en algunos casos o agravarse en la mayoría. Un ejemplo de ello es cuando se produce una lesión en el tejido cerebral. En la misma, los astrocitos que bordean la herida intentan aislar y separar este tejido inflamado, dañado y fibroso del tejido neural sano. La respuesta desencadenada en los astrocitos puede llegar a establecer una barrera fibrótica que contiene la lesión pero que es irreversible e impide la regeneración [28].

Por otra parte, si bien se sabe que los astrocitos poseen funciones beneficiosas en situaciones de insultos al SNC, como la contribución a la remodelación de las sinapsis nerviosas y la reorganización de los circuitos; también poseen el potencial de volverse perjudiciales debido a una exposición crónica a aquellos factores inductores de reactividad, fomentando una inflamación exacerbada y crónica. En circunstancias de inflamación crónica, la reactividad astrocitaria también se vuelve crónica lo que lleva a la pérdida de las actividades protectoras, proliferando y ganando funciones con efectos negativos tales como mantener o propagar la inflamación exacerbada, favorecer el estrés de retículo o la disfunción mitocondrial, no solo entre los astrocitos sino también a las demás células neurales [28].

En cuanto a los oligodendrocitos, en muchas de las enfermedades del SNC la mielina se afecta y puede haber depleción de oligodendrocitos asociados a daño o degeneración axonal ya que las señales axonales son requeridas para la supervivencia de los oligodendrocitos. En regiones dañadas, los oligodendrocitos recientemente diferenciados pueden remielinizar axones desnudos, pero esta capacidad es limitada y no persiste en el tiempo [2, 3]. Si la remielinización falla, los axones se dañan y las neuronas mueren paulatinamente.

En conjunto, estos antecedentes evidencian la importancia de la glía en el contexto de daño al SNC y como esta a su vez interacciona con las neuronas y repercute en su supervivencia, ya que si la glía que apoya a las neuronas se encuentra dañada estas últimas tendrán menos probabilidades de sobrevivir. Por lo tanto, el estudio en conjunto de todas las células neurales es de suma importancia

no solo para profundizar en el conocimiento de los mecanismos patológicos en casos de daño al SNC, sino también para promover la identificación y generación de nuevos fármacos potencialmente neuroprotectores. Por otra parte, focalizar las nuevas alternativas terapéuticas a aplicarse en insultos del SNC hacia la glía en vez de dirigirlas a las neuronas puede ser una estrategia protectora mucho más efectiva que las actuales focalizadas en las neuronas [2].

1.4. Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la degeneración progresiva de las motoneuronas superiores e inferiores (corticales, en el tronco encefálico o en la médula espinal) [29]. La degeneración de las motoneuronas provoca la denervación progresiva de los músculos voluntarios, llevando a una atrofia muscular y parálisis ascendente que finalmente resulta en insuficiencia respiratoria y muerte a los 2-3 años desde el inicio de los síntomas [30, 31]. La ELA ocurre globalmente con una incidencia aproximada de 2 casos por cada 100,000 personas [30] y en Uruguay se estima que hay 1,92 casos por cada 100,000 habitantes [32]. Los escasos datos disponibles indican que los costos totales durante el transcurso de la enfermedad (atención médica, tratamientos y cuidados) se aproximan a los USD 1.500.000 por paciente en Estados Unidos de América [33].

En cuanto al conocimiento de los mecanismos de daño, a pesar de los grandes avances en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas incluyendo la ELA, no se ha logrado identificar completamente sus mecanismos patogénicos subyacentes, ni disponer de terapias que detengan o reviertan la enfermedad [34, 35]. La pérdida progresiva de motoneuronas se asocia a muchos mecanismos patogénicos incluyendo neuroinflamación, estrés oxidativo (un proceso no fisiológico caracterizado por un desbalance entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las defensas biológicas antioxidantes), gliosis reactiva, estrés de retículo endoplasmático, disfunción mitocondrial, entre otros [36, 37]. La heterogeneidad clínica de la ELA sugiere que estos mecanismos pueden tener roles más o menos prominentes en diferentes individuos [30, 38].

La arquitectura genética de la ELA ha revelado una etiología compleja, donde entre el 10 y el 21% de los casos son familiares (fALS) y están vinculados a mutaciones monogénicas, como las del gen de la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1) [30]. Sin embargo, en la mayoría de los

pacientes, la ELA es de origen esporádico y parece resultar de interacciones complejas entre factores genéticos y ambientales [30]. La edad avanzada y el género masculino son los únicos factores epidemiológicos confirmados hasta la fecha, lo que sugiere un proceso multietapa en el cual los factores genéticos son penetrantes solo en combinación con factores ambientales o de estilo de vida, teniendo en cuenta que la heredabilidad incompleta de las mutaciones patogénicas de ELA conocidas implica una interacción con factores ambientales [30].

En estudios de población se ha encontrado que la incidencia y prevalencia de ELA varía según la edad y sexo, como se puede observar en la Figura 3.

(A)			
Incidence (per 100,000 population) (95% CI)			
Age group	Male	Female	Male:female ratio (95% CI)
25–34	0.37 (0.01–2.25)	0.10 (0.07–0.15)	3.7**
35–44	0.58 (0.01–2.22)	0.28 (0.21–0.35)	2.07**
45–54	2.13 (0.53–5.00)	0.94 (0.11–3.39)	2.26 (0.48–17.06)
55–64	4.65 (1.75–8.99)	2.58 (0.65–6.07)	1.80 (0.48–17.86)
65–74	3.83 (1.32–9.46)	3.08 (0.75–7.08)	1.24 (0.09–10.7)
>75	1.62 (0.25–7.57)	1.13 (0.14–4.29)	1.43 (0–4.06)

(B)			
Age group	Male prevalence (per 100,000 population) (95% CI)	Female prevalence (per 100,000 population) (95% CI)	Male:female ratio (95% CI)
15–24	0	1.41 (0.29 to 4.13)	–
25–34	4.45 (2.30 to 7.77)	1.78 (0.58 to 4.15)	2.5 (0.89–19.66)
35–44	7.81 (4.83 to 11.94)	3.27 (1.50 to 6.21)	2.4 (1.13–7.08)
45–54	29.59 (22.84 to 37.72)	12.27 (8.16 to 17.74)	2.4 (1.58–4.00)
55–64	56.22 (45.59 to 68.58)	33.51 (25.64 to 43.05)	1.67 (1.23–2.34)
65–74	47.33 (36.37 to 60.55)	37.95 (28.89 to 48.95)	1.24 (0.87–1.80)
75+	17.62 (10.44 to 27.85)	12.26 (7.68 to 18.56)	1.4 (0.71–2.77)

Figura 3. (A) Incidencia de ELA en cada grupo de edad según sexo. (B) Prevalencia de ELA en cada grupo de edad según sexo. Extraído de Manjaly et al. (2010) [39].

Como se puede observar en la Figura 3, se reporta que la ELA tiene aproximadamente el doble de incidencia y prevalencia en hombres que en mujeres [39] y esta brecha entre sexos va disminuyendo a edades mayores. Se puede observar que hay un punto de quiebre en la tendencia a aproximadamente los 54 años, lo que sería consistente con la teoría que los cambios hormonales asociados a la menopausia (la cual suele ocurrir en ese rango etario) están asociados a la

disminución de la relación entre la incidencia y prevalencia de la ELA. De todas maneras, de estos datos se evidencia la naturaleza sexo-específica de la ELA, por lo que se precisa estudiar los mecanismos patológicos subyacentes que actúan de manera diferencial en machos y hembras.

Por estas razones, la complejidad y heterogeneidad de la ELA subraya la necesidad urgente de modelos preclínicos más precisos para comprender mejor sus mecanismos y desarrollar estrategias terapéuticas más efectivas [30].

1.4.1. Mecanismos de daño al SNC en la ELA

Los mecanismos de daño al SNC en enfermedades neurodegenerativas, como la ELA, involucran múltiples procesos biológicos alterados. Entre estos mecanismos destacan el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la excitotoxicidad, la disrupción de la homeostasis proteica, la alteración en el procesamiento del ARN, el daño en el transporte axonal y nucleocitoplasmático, la neuroinflamación y el daño en el ADN [30]. El conocimiento obtenido también sugiere que ningún mecanismo patológico puede causar ELA por sí mismo, sino que se requiere la coexistencia de distintos procesos o eventos. Además, la interacción entre esos procesos genera un ciclo de retroalimentación que acelera la degeneración neuronal y contribuye a la progresión de la enfermedad (Figura 4).

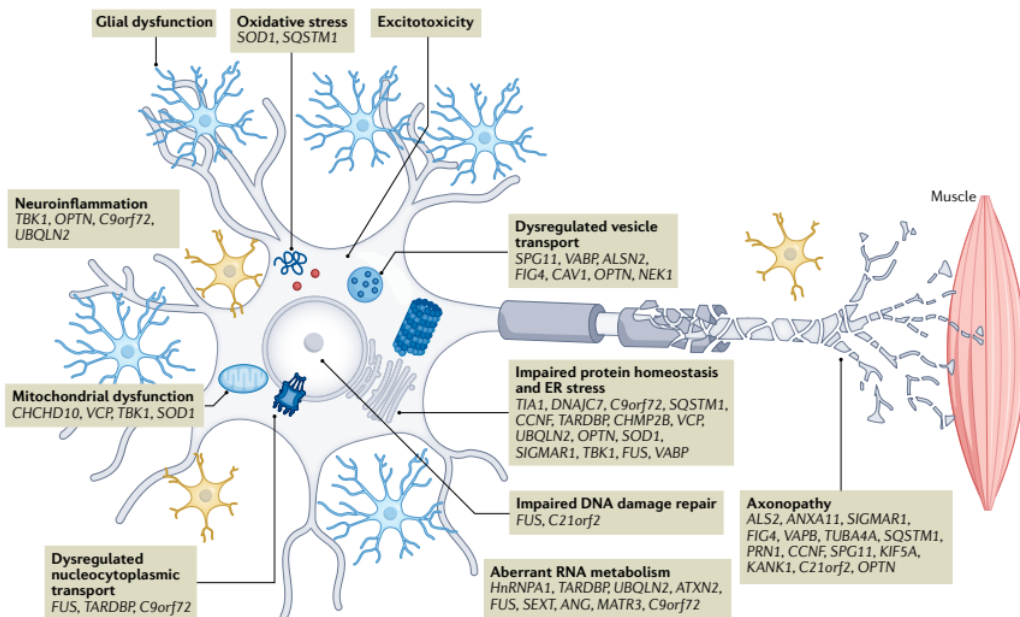


Figura 4. Representación esquemática de la fisiopatología, causas genéticas y factores de riesgo de la ELA. Los avances en el análisis genómico a gran escala han descubierto una variedad de genes causantes y factores de riesgo de la ELA. Estas variantes genéticas se asignan a mecanismos patogénicos claves relevantes para todos los compartimentos celulares de las motoneuronas, así como para las células vecinas, como la glía. Extraído de Mead et al. 2023 [30].

En cuanto a los mecanismos patológicos implicados en la ELA, el estrés oxidativo juega un papel clave en la patogénesis de esta enfermedad, ya que la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno puede alterar la estructura y función de biomoléculas esenciales como proteínas, lípidos, ADN y ARN. Se ha identificado un perfil alterado de biomarcadores de estrés oxidativo en modelos experimentales de ELA y en muestras de pacientes, lo que sugiere una falla en los mecanismos de defensas antioxidantes incluida la alteración de la homeostasis del glutatión [30]. Además, la disfunción en la homeostasis del glutatión y en el sistema citoprotector mediado por el factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2 (Nrf2) ha sido reportada como un factor contribuyente a la patología de la ELA.

La disfunción mitocondrial en las motoneuronas parece ser otro mecanismo central en la ELA, afectando la producción de energía celular, aumentando la generación de ROS y alterando el transporte mitocondrial a lo largo del axón [30]. Se ha observado que mutaciones en genes asociados con la ELA, como SOD1, afectan la función mitocondrial mediante la agregación de proteínas dentro del espacio intermembrana mitocondrial, lo que reduce la actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones [30]. Además, de alterar la capacidad de producción de energía, estos defectos pueden comprometer la homeostasis del calcio, desencadenando apoptosis en las motoneuronas.

Por otra parte, la excitotoxicidad mediada por glutamato es otro mecanismo de daño neuronal en la ELA. La estimulación excesiva de los receptores postsinápticos de glutamato genera un aumento sostenido en los niveles intracelulares de calcio, lo que conduce a estrés de retículo endoplasmático y sobrecarga mitocondrial [30]. Además, la exposición excesiva al glutamato inhibe la captación de cisteína, lo que disminuye los niveles intracelulares de glutatión y exacerba el estrés oxidativo, creando un círculo vicioso de neurodegeneración. También se ha reportado que la disminución de

la expresión de los transportadores de glutamato astrocitarios es suficiente para producir neurodegeneración por exceso de glutamato sináptico causando excitotoxicidad [6].

Además, se debe considerar que el equilibrio en la homeostasis proteica es fundamental para la función neuronal, y su alteración en la ELA conlleva la acumulación de proteínas mal plegadas y proteínas dañadas por estrés oxidativo. La respuesta celular a proteínas mal plegadas, mediada por el retículo endoplasmático y las mitocondrias, se ve comprometida en ELA, lo que facilita la formación posterior de nuevos agregados de proteínas [30], cuyo rol en la patología aún resta dilucidar completamente. En particular, la formación de gránulos de estrés puede contribuir a la acumulación aberrante de proteínas esenciales para la respuesta celular y la progresión de la patología dado su rol en la comunicación con otras células neurales.

Las alteraciones en el procesamiento del ARN representan otro mecanismo clave de daño en la ELA. Se ha descrito que la agregación citoplasmática de la proteína TAR 43 de unión al ADN (TDP-43) secuestra microARNs y proteínas esenciales para la función mitocondrial, lo que perpetúa la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo [30]. La acetilación de TDP-43 impide su unión normal al ARN y favorece la acumulación de especies insolubles y fosforiladas que forman inclusiones patológicas en el SNC de pacientes con ELA, tal como se menciona en el párrafo anterior.

A su vez, el transporte axonal y nucleocitoplasmático también se ve afectado en la ELA, lo que compromete la comunicación entre el soma y los procesos neuronales (dendritas y axón). Las mutaciones en genes como C9orf72, TARDBP y FUS han sido asociadas con alteraciones en estos procesos, afectando la dinámica del citoesqueleto y la localización subcelular de proteínas esenciales para la función neuronal [30]. Esto interfiere con la homeostasis de ARN y de proteínas en las motoneuronas, contribuyendo a su degeneración progresiva. El daño en el ADN es otro mecanismo que contribuye a la progresión de la enfermedad. La acumulación de mutaciones y la disfunción en los sistemas de reparación del ADN pueden comprometer la viabilidad celular y predisponer a la degeneración neuronal, aunque estos mecanismos son relativamente poco conocidos en ELA[30].

Por último, la neuroinflamación sostenida es un mecanismo de daño central de la ELA, evidenciado en modelos experimentales y en el SNC de pacientes mediante estudios histológicos y de imagen [30]. Se entiende por neuroinflamación a la reacción de las células gliales residentes

(astrocitos, microglía) y las células inmunitarias circulantes (monocitos, neutrófilos, linfocitos) que entran e interactúan con las células del SNC en el contexto de una infección, lesión o degeneración [40]. Los mismos autores describen que además de astrocitosis y microgliosis, en autopsias de pacientes con ELA se encontraron linfocitos T y células inmunitarias innatas no residentes y señales de inflamación sistémica, cuyo papel en la patogénesis de la enfermedad aún se conoce poco.

La neuroinflamación potencia todos los mecanismos patológicos previamente descritos incluyendo la inducción y perpetuación de la reactividad glial, la que a su vez, altera su señalización hacia una modalidad promotora del daño incluyendo la potenciación de la neuroinflamación. La neuroinflamación promueve además el estrés oxidativo, que contribuye a la comunicación aberrante entre motoneuronas, astrocitos y microglía, promoviendo la liberación de glutamato por astrocitos en respuesta al daño oxidativo, lo que amplifica la excitotoxicidad, el daño neuronal y la neuroinflamación. En conjunto, los mecanismos de daño interactúan entre sí a través de un círculo vicioso capaz de autosostenerse y potenciarse que, promueve un entorno celular desfavorable que culmina en la pérdida progresiva de las motoneuronas y la disfunción del SNC en la ELA.

Por otra parte, como fue mencionado previamente, la ELA es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida progresiva de motoneuronas en la corteza motora, el tronco encefálico o la médula espinal [29]. Tradicionalmente las motoneuronas han sido el foco de estudio de la ELA, pero estudios relativamente recientes indican que las células gliales tienen un rol crucial en su fisiopatología [34, 41], contribuyendo tanto a la neuroprotección como a la neurodegeneración. En la ELA, como en todas las enfermedades neurodegenerativas, los astrocitos cambian su morfología, funciones y patrón de expresión génica, volviéndose reactivos [41]. Esta reactividad astrocitaria, que en condiciones normales contribuye a la defensa del SNC ante lesiones, puede volverse disfuncional y ser parte de los mecanismos desencadenantes de dichas lesiones, exacerbando la degeneración neuronal [34], como se observa en la Figura 5. La respuesta de la glía ante el daño determina el posible resultado y la progresión de las enfermedades neurológicas [30].

A diferencia de las neuronas, que tienen capacidades limitadas de autoprotección y dependen de la glía para su mantenimiento, las células gliales activan mecanismos de defensa como la gliosis

reactiva ante el daño, el que, en caso de mantenerse en el tiempo, lleva a que las células gliales, principalmente astrocitos y microglía, se vuelven nocivas [31]. En este contexto, la activación de la microglía y los astrocitos puede representar un intento inicial de protección que, si no se resuelve bien y persiste en el tiempo, puede causar un ambiente proinflamatorio y neurotóxico que acelera la progresión de la ELA. La contribución de las células gliales en la fisiopatología de la ELA y el reconocimiento de que las mismas colaboran con el daño, ha llevado a proponer que la ELA es una enfermedad no-autónoma celular, donde al menos dos linajes celulares distintos deben estar alterados para producir la enfermedad [34]. Esta condición es necesaria y ha sido descrita en los modelos preclínicos de ELA dependientes de SOD1 en su gran mayoría.

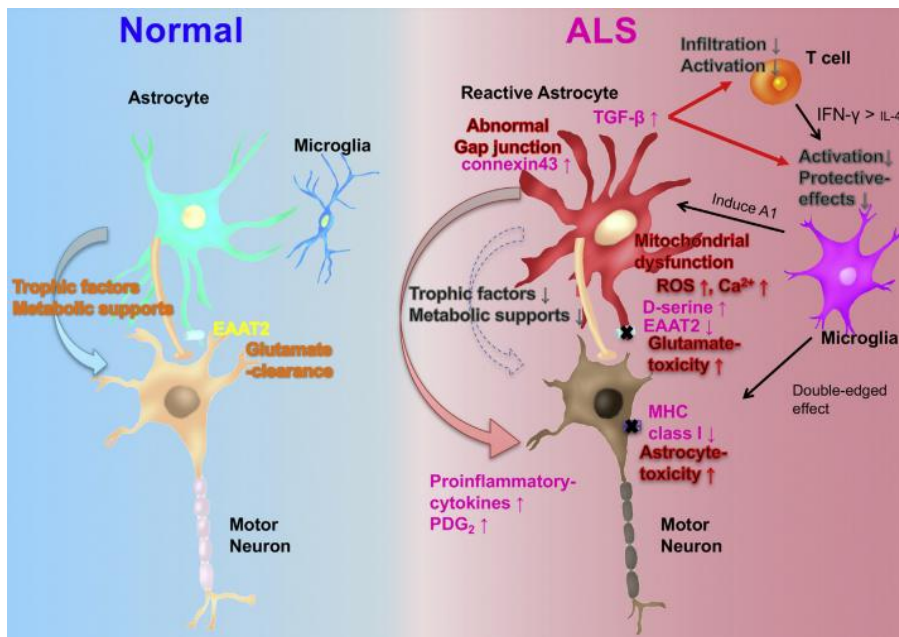


Figura 5. Representación esquemática del rol de los astrocitos en la neurodegeneración no autónoma celular en la ELA. En condiciones normales (izquierda), los astrocitos sanos apoyan a las motoneuronas al proporcionar factores neurotróficos y apoyo metabólico, y al controlar la concentración de glutamato en las sinapsis. En la ELA (derecha), los astrocitos pierden su función homeostática y no pueden apoyar la salud de las motoneuronas. Además, secretan numerosos factores tóxicos que afectan a las motoneuronas. Extraído de Yamanaka et al. 2018 [34].

Como se mencionó anteriormente, bajo condiciones fisiológicas, los astrocitos participan en la protección neuronal mediante la contención de la inflamación y el mantenimiento de la integridad de la barrera hematoencefálica [31].

En la ELA, la disfunción astrocitaria se manifiesta a través de la pérdida de funciones esenciales, como el mantenimiento de la homeostasis del glutamato, el soporte metabólico y la regulación de la inflamación. Los astrocitos derivados de fibroblastos de pacientes con ELA han demostrado ser tóxicos para las motoneuronas en cocultivos, lo que sugiere que la disfunción astrocitaria puede tener un papel clave en la muerte neuronal [30]. Además, los astrocitos reactivos pueden liberar citoquinas proinflamatorias, como IL-1, IL-6 y TNF- α , promoviendo la neuroinflamación y exacerbando el daño neuronal [30].

El estrés oxidativo también desempeña un papel importante en la comunicación entre motoneuronas, astrocitos y microglía. En modelos de ELA, los astrocitos pueden liberar glutamato en respuesta a un aumento del estrés oxidativo, exacerbando la excitotoxicidad y contribuyendo a la muerte neuronal [30]. A nivel funcional, los astrocitos en la ELA pierden su capacidad de eliminar el exceso de glutamato, lo que contribuye a la excitotoxicidad, un mecanismo clave en la degeneración de las motoneuronas [34]. Asimismo, los astrocitos presentan alteraciones en la producción y transporte de lactato, afectando el metabolismo neuronal y comprometiendo la supervivencia celular [34]. Además, la disfunción mitocondrial en astrocitos puede generar niveles elevados de ROS, lo que contribuye al daño oxidativo y a la degeneración de las motoneuronas [34].

En la ELA, la reactividad astrocitaria sostenida y el microambiente de daño en la médula espinal puede facilitar la generación de fenotipos gliales aberrantes que contribuyen a la degeneración de las motoneuronas. Ejemplo de ello es la identificación de una subpoblación de astrocitos aberrantes en modelos de ELA con mutaciones en SOD1, caracterizados por una alta proliferación, una expresión anormal de marcadores astrocitarios y una elevadísima neurotoxicidad. Como estas células altamente neurotóxicas solo pudieron obtenerse en la médula espinal lumbar de animales sintomáticos terminales de la enfermedad, se ha sugerido su participación en la neurodegeneración observada en la médula espinal [42].

Por su parte, las evidencias reportadas sugieren que las alteraciones en las funciones gliales no solo potencian la neurodegeneración en la ELA, sino que también pueden actuar como

desencadenantes de la enfermedad. Un claro ejemplo de esta posibilidad es que el trasplante de astrocitos mutantes SOD1 en la médula espinal de ratones *wild-type* (WT), fue capaz de desencadenar síntomas de degeneración en las motoneuronas [29, 34, 43]. Estos estudios subrayan la importancia de continuar investigando los mecanismos mediante los cuales los astrocitos contribuyen a la fisiopatología de la ELA, con el objetivo de identificar posibles dianas terapéuticas.

1.4.2. Modelos de ELA

El desarrollo de modelos experimentales animales para la ELA es fundamental para el estudio de su fisiopatología y para la identificación de posibles tratamientos. Sin embargo, la selección de modelos preclínicos adecuados es un desafío crítico en enfermedades neurodegenerativas, ya que más del 90% de los ensayos clínicos en estas patologías fallan por falta de eficacia [30]. En el caso de la ELA, como en el de las demás enfermedades neurodegenerativas más prevalentes, el desarrollo de modelos ha permitido avances en la comprensión de la enfermedad y en la predicción de la eficacia de nuevos tratamientos, aunque sigue existiendo una gran diferencia entre los resultados obtenidos en modelos animales y su aplicabilidad en pacientes. Por ello, aún resta perfeccionar y optimizar los modelos experimentales disponibles o diseñar otros alternativos que contemplen más variables y sus interacciones.

La complejidad fisiopatológica de la ELA resultante de la interacción de múltiples mecanismos patogénicos es una dificultad adicional al momento de seleccionar los modelos para estudiar la enfermedad. Por una parte, los cultivos primarios aislados directamente del tejido animal representan mejor la fisiología *in vivo* que las líneas celulares [44], pero su aislamiento y mantenimiento requiere de mayor trabajo en comparación a la facilidad de mantenimiento de las líneas celulares establecidas. Aunque para las líneas celulares se le suele considerar como ventaja su menor variabilidad, estudios que buscan analizar fisiopatologías complejas como la ELA requieren el uso de cultivos primarios ya que la variabilidad entre animales refleja la variabilidad en los casos humanos, lo cual es un factor clave para enfermedades de etiología compleja. La inmortalización de líneas celulares implica alteraciones en el metabolismo, en la respuesta a estímulos y la pérdida de características fisiológicas reales, por lo que el uso de cultivos primarios

es preferible por ser más representativos del funcionamiento de astrocitos in vivo. Por eso, si bien los mejores modelos animales preclínicos buscan reproducir los mecanismos clave observados en pacientes, tales como la degeneración de las motoneuronas, la neuroinflamación y la disfunción de las células gliales, las alteraciones en la comunicación e interacción entre los distintos mecanismos y entidades celulares participantes todavía es objeto de estudio. Por otra parte, la heterogeneidad de la enfermedad sugiere que distintos mecanismos pueden ser predominantes en diferentes pacientes, lo que resalta la importancia de desarrollar múltiples modelos experimentales para abordar esta diversidad [30]. Tradicionalmente, se han utilizado modelos celulares basados en cultivos de motoneuronas aisladas, pero estos modelos tienen la limitación de excluir la contribución de las células no neuronales, como los astrocitos y la microglía, que juegan un papel crítico en la progresión de la neurodegeneración y en la supervivencia neuronal [30]. Ejemplo de ello es la necesidad de adicionar sustratos y factores tróficos provenientes de la glía al cultivo de motoneuronas aisladas, lo que no ocurre cuando las motoneuronas son sembradas, por ejemplo, sobre monocapas de astrocitos [42].

También se suele realizar autopsias de los pacientes con ELA, lo que da información importante sobre la patología de la enfermedad, pero como estos resultados son limitados por representar solamente la fase terminal, no sirven para identificar los mecanismos iniciales de la progresión de la enfermedad ni sus fases tempranas de neurodegeneración [45]. Por esta razón los modelos animales de ELA tienen la ventaja de poder estudiar la enfermedad desde antes del inicio de los síntomas y hasta la fase terminal, por lo que se puede hacer el seguimiento a los mecanismos celulares subyacentes para identificar posibles terapias.

Por otra parte, considerando que existen claras diferencias fisiológicas entre los humanos y otros animales, se debe intentar validar que los mecanismos patológicos identificados en modelos animales tengan relevancia en la fisiopatología humana, justamente para el desarrollo de terapias eficaces dirigidas a enfermedades neurodegenerativas. Por esta razón una ventaja, a pesar de las diferencias entre especies animales, es que muchas funciones de los astrocitos, entre ellas el soporte trófico neuronal y la modulación sináptica, se conservan evolutivamente [46]. Por ejemplo, en astrocitos derivados de células madre pluripotentes humanas, se validó que existe un estado reactivo neurotóxico similar al que se había identificado previamente en roedores, y esta validación se realizó a niveles transcriptómico, proteómico y funcional [47, 48]. De esta manera, muchos

descubrimientos hechos en modelos de roedores se han corroborado en células humanas, lo que refuerza la utilidad de los modelos animales para confirmar, en un contexto *in vivo*, los descubrimientos que se realizan inicialmente en modelos basados en células en laboratorio [46].

Varios estudios sobre ELA sugieren que la ausencia de correlación entre los fenotipos observados en modelos experimentales y las manifestaciones clínicas de la enfermedad podría explicarse en parte por la complejidad de interacción de múltiples variantes genéticas y factores modificantes de la enfermedad [49]. Esto también contribuiría a la diversidad observada entre pacientes, incluso entre pacientes que presentan la misma mutación genética. Por esta razón, para representar mejor la complejidad de la enfermedad en humanos, podría ser necesario combinar múltiples genes causales en un solo organismo modelo, pero esto dificulta su modelización, especialmente en roedores. La falta de modelos que integren múltiples variantes genéticas podría ser una de las razones por las cuales muchos tratamientos que han mostrado eficacia en modelos murinos monogénicos no han logrado demostrar beneficios en estudios clínicos con pacientes [49]. De todas maneras, los estudios preclínicos en murinos siguen siendo esenciales para orientar los ensayos clínicos.

En resumen, a pesar de sus limitaciones, los modelos animales han sido fundamentales para el avance en la comprensión de la patogénesis molecular y celular de la ELA. Aunque ningún modelo experimental puede replicar completamente la enfermedad en humanos, la mayoría de los modelos de ELA más conocidos comparten un elemento clave con la enfermedad humana: la degeneración y muerte de las motoneuronas [45]. De esta manera se ha podido descubrir mecanismos patogénicos que no habrían sido identificados únicamente a partir del estudio de muestras de autopsia humanas. Por lo tanto, la combinación de modelos animales y estudios en humanos sigue siendo esencial para el desarrollo de terapias más eficaces [45].

1.4.2.1. Modelo de ELA dependiente de SOD1

Los modelos animales transgénicos basados en la expresión de SOD1 han sido fundamentales para el estudio de la ELA y la evaluación de estrategias terapéuticas. Los modelos murinos transgénicos que expresan variantes mutantes de SOD1 replican la degeneración de motoneuronas y la atrofia muscular observadas en la enfermedad humana [30]. El modelo SOD1G93A ha sido

particularmente útil para el estudio de la neurotoxicidad mediada por astrocitos. En esta línea, la literatura reporta que los astrocitos que portan la SOD1G93A humana inducen la degeneración de motoneuronas WT *in vivo* [42, 50], lo que sugiere que estos astrocitos contribuyen activamente a la progresión de la enfermedad. La reactividad astrocitaria que es una característica prominente en varias enfermedades neurodegenerativas, incluida la ELA, ha sido reportada en el modelo SOD1 de ratas transgénicas, donde la astrogliosis reactiva ocurre en torno a motoneuronas degenerantes y precede a su muerte, lo que resalta el papel de los astrocitos en la patogénesis de la enfermedad [51].

En cuanto a neurotoxicidad, Díaz-Amarilla et al. (2011) [42] reportaron el aislamiento de una subpoblación de astrocitos de la médula espinal lumbar de ratas del modelo SOD1G93A que están en el estado terminal de la enfermedad. Estos autores encontraron que estas células habían perdido no sólo los marcadores astrocitarios típicos, sino también la mayor parte de las propiedades homeostáticas de los astrocitos normales por lo que fueron identificadas como astrocitos aberrantes. Estas células aberrantes muestran la mayor neurotoxicidad en cultivo descrita en modelos animales de ELA, presentan una disminución en la expresión de marcadores gliales típicos como la isoforma β de la proteína S100 (S100 β) y proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y una serie de anomalías celulares asociadas directamente a su neurotoxicidad.

Sin embargo, algunos autores discuten las limitaciones de los modelos murinos de ELA dependientes de SOD1. Las principales críticas están fundamentalmente relacionadas con la alta carga proteica asociada a la sobreexpresión de la isoforma mutada y a que sus efectos tóxicos no se limitan necesariamente al SNC [52]. No obstante, a pesar de sus limitaciones, los modelos animales basados en SOD1 han sido esenciales en la evaluación de fármacos y en la validación de mecanismos patogénicos implicados en la ELA. Han permitido estudiar y validar terapias como Riluzole y Edaravone y se emplean para desarrollar biomarcadores que permiten no solo evaluar la transición desde los estudios preclínicos a los ensayos clínicos en humanos, sino también analizar la eficacia de estos últimos [30]. En cuanto a mecanismos patológicos, los modelos SOD1 también han permitido avanzar en el entendimiento del impacto de la disfunción mitocondrial en la patogénesis de la ELA. Se ha demostrado que la agregación de SOD1 mutante en el espacio intermembrana mitocondrial compromete la actividad de la cadena de transporte de electrones, lo que contribuye al estrés oxidativo y a la degeneración neuronal [30].

Por otra parte, los estudios con modelos SOD1 han proporcionado evidencia de que la expresión de SOD1 mutante en neuronas no es suficiente para inducir la enfermedad. En cambio, el silenciamiento del gen SOD1 mutante en astrocitos detuvo la progresión patológica en ratones SOD1, mientras que la implantación de astrocitos SOD1G93A en ratones sanos indujo síntomas similares a la ELA [29]. De manera similar, implantar astrocitos sanos en ratones SOD1G93A retrasó la progresión de la enfermedad [29]. Por estas razones, los modelos transgénicos murinos expresando el gen humano mutado de SOD1 han demostrado ser los más adecuados para modelar la ELA humana en animales de laboratorio [45]. Su capacidad para reproducir aspectos clave de la enfermedad, como la pérdida de motoneuronas y la disfunción astrocitaria, los convierte en herramientas esenciales para la investigación de la patogénesis y el desarrollo de estrategias terapéuticas [45].

Por lo tanto, aunque los modelos basados en SOD1 no replican completamente la heterogeneidad genética de la ELA, siguen siendo modelos esenciales para la investigación. Permiten evaluar hipótesis sobre diversos mecanismos fisiopatológicos, probar posibles terapias y generar datos fundamentales para la comprensión de la enfermedad [49].

En forma remarcable, algunos trabajos reportan que el ratón transgénico SOD1G93A también muestra diferencias específicas de sexo en la edad de aparición y progresión de la enfermedad McLeod et al. (2020) [53], reportaron que las motoneuronas espinales expresan en gran medida el receptor nuclear de andrógenos, los receptores de estrógenos α y β y el receptor de progesterona con variaciones en la expresión de las células gliales. En ratones macho SOD1G93A, la expresión del receptor de andrógenos mostró la diferencia específica de sexo más robusta y se reguló a la baja en la médula espinal, en asociación con el agotamiento de la isoforma tipo 2 de la 5 α -reductasa, que metaboliza principalmente la testosterona a 5 α -dihidrotestosterona. El receptor de estrógenos α se expresó fuertemente en los astrocitos reactivos de los ratones SOD1G93A y el β se reguló al alza fuertemente. En tanto, MacLean et al. (2021) [54], demostraron que silenciar la expresión de un receptor asociado a una cascada neuroinflamatoria universal como lo es la vía DAMPS/RAGE, ofrece neuroprotección a ratones macho SOD1G93A pero no a ratonas hembras. Por lo tanto, el modelo murino SOD1G93A parece ser también adecuado para estudiar diferencias sexo-específicas.

1.5. Galactosemia (asociado a sistema nervioso, diferencial por sexo)

Los niveles altos de galactosa en el cerebro, pueden inducir un daño oxidativo moderado. Tal como se ha mencionado anteriormente, el estrés oxidativo es uno de los principales mecanismos patológicos presentes en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, por lo que el uso de modelos que permitan el estudio de estos mecanismos resulta de gran interés.

Estos altos niveles de galactosa en el cerebro pueden ser asociados con un desorden metabólico denominado Galactosemia, un desorden provocado por una mutación autosómica recesiva en el gen de la enzima galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (GALT) que cataliza la conversión de galactosa en glucosa. Por lo tanto, si la presencia de la enzima GALT se ve disminuida, se genera una acumulación de metabolitos, especialmente D-galactosa. Los efectos negativos asociados a acumulación de galactosa incluyen una gran variedad de manifestaciones clínicas, con alteraciones cerebrales como deterioro cognitivo, degeneración neuronal cortical, atrofia de la sustancia blanca, degeneración a nivel del cerebelo y agrandamiento ventricular [55, 56]. Si bien se desconoce la fisiopatología exacta de la galactosemia, se presentan varios reportes que sugieren que el estrés oxidativo puede jugar un rol crítico en esta enfermedad. Si bien se desconoce la fisiopatología exacta de la galactosemia, se presentan varios reportes que sugieren que el estrés oxidativo puede jugar un rol crítico en esta enfermedad.

En el trabajo publicado por Rodrigues et al. (2016) [57], se investigaron los efectos de la administración de galactosa a nivel intracerebroventricular en la coordinación motora, estudiando a su vez, distintos parámetros bioquímicos e histológicos. Observaron que 24 horas posterior a la inyección de galactosa, ocurrió una disminución a nivel motor y pérdida de células neuronales y astrocitarias a nivel espinocerebelo.

Además, el trabajo liderado por Castro et al. (2016) [55], donde se realizó la evaluación de los efectos de la administración de D-galactosa a ratas en distintos parámetros de estrés oxidativo, en la corteza, el cerebelo y el hígado de ratas WT permitió reportar la disminución en las actividades de dos enzimas antioxidantes, la enzima SOD y la catalasa, que son capaces de contrarrestar el daño oxidativo observado en la galactosemia.

A su vez, Anand et al. (2012) [58], presentaron sus estudios donde se utilizó D-galactosa en animales como modelo de envejecimiento ya que es capaz de inducir el aumento de los radicales libres como ocurre durante el envejecimiento, lo cual además sugiere que la vejez puede ser un mecanismo relacionado con la presencia de enfermedades neurodegenerativas. Una de estas enzimas es la SOD, que actúa metabolizando los ROS para evitar el estrés oxidativo a nivel cerebral. Estos autores, al igual que Castro et al. (2016) [55], observaron que luego de la administración de D-galactosa, los niveles de la enzima SOD, disminuían significativamente, por lo que se deduce que aumenta el estrés oxidativo.

Adicionalmente, el estudio llevado a cabo por Adam et al. (2000) [56], evidencia la presencia de diferencias a nivel sexo-específico en pacientes con galactosemia. Se observan diferencias en la altura entre los 5 y 12 años, también se observan diferencias en puntajes de IQ donde las mujeres presentan menores puntajes a partir de los 10 años de edad. Si bien estos resultados dependen de un gran número de variables, resulta interesante estudiar los efectos que puede tener un alto nivel de galactosa en el SNC y sus posibles respuestas diferenciables por sexo, y además evaluar su efecto en el modelo de ELA donde se encuentra mutada la enzima SOD.

2. Fundamentación del trabajo realizado

El cerebro de hombres y mujeres es diferente en anatomía, función y respuesta al daño. Sin embargo, la importancia de las diferencias sexo-específicas en las enfermedades neurodegenerativas ha sido objeto de estudio recién en los últimos años [34]. Por otra parte, aunque existen evidencias sobre el papel de las células gliales en la generación de dimorfismos sexuales en las enfermedades del SNC y en el envejecimiento cerebral normal, se necesita profundizar en el conocimiento de la importancia del sexo en la función glial [7].

En primer lugar, la supervivencia y funcionalidad de las neuronas depende del entorno glial y de una gran variedad de señales neuromoduladoras liberadas por células gliales [7, 59]. Las células gliales, en especial los astrocitos y la microglía, son esenciales para la respuesta protectora y reparadora ante situaciones patológicas, y tienen un papel clave en el establecimiento y progresión de las enfermedades del SNC. Sin embargo, resta conocer si los dimorfismos sexuales pueden afectar las características estructurales y funcionales de estas células. También resta conocer si los cambios en la función glial asociados al sexo pueden tener un efecto diferencial en las patologías neurodegenerativas, que suelen involucrar alteraciones en la homeostasis y proteostasis, debido a aumento de las condiciones inflamatorias, estrés oxidativo y celular, entre algunos de los mecanismos patológicos que podrían considerarse más relevantes [41, 46].

Por otra parte, es necesario conocer y caracterizar las posibles respuestas sexo-específicas de las células gliales en condiciones basales y patológicas, ya que son un insumo imprescindible para el desarrollo de terapias que incluyan la variable sexo y, que por lo pronto sean más eficientes, y a largo plazo, faciliten el desarrollo de terapias personalizadas. Esta necesidad se acentúa al momento de considerar que los modelos preclínicos típicos en investigación emplean roedores machos en su gran mayoría, al igual que los participantes para los ensayos clínicos suelen ser hombres; lo cual resulta inadecuado a la hora de cumplir con las necesidades clínicas crecientes de la sociedad [60]. En otras palabras, en un contexto de necesidad creciente de terapias eficaces para las enfermedades neurodegenerativas, las cuales se prevé que alcancen a más de 11 millones de habitantes de Latinoamérica en pocos años, con prevalencias claras diferentes en ambos sexos, es necesario contar con modelos de investigación poderosos que permitan evaluar la influencia de variable sexo-específicas en condiciones controladas.

Dado estos antecedentes, el presente proyecto buscó optimizar un modelo celular para la evaluación de diferencias sexo-específicas en condiciones normales y de daño al SNC. El modelo celular empleado fue el cultivo primario de astrocitos corticales y de médula espinal obtenidos de ratas wild-type (WT) y de ratas del modelo preclínico de ELA, SOD1G93A.

Se optó por ELA porque es una enfermedad neurodegenerativa que en Uruguay tiene una incidencia de 1,92 casos cada 100.000 habitantes [32], con diferente prevalencia entre hombres y mujeres [9, 10]. A pesar de los grandes avances en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas incluyendo la ELA, no se ha logrado comprender totalmente sus mecanismos patológicos ni disponer de terapias que detengan o reviertan esas enfermedades, [34, 35]. En la ELA como en todas las enfermedades neurodegenerativas, los astrocitos se vuelven reactivos y cambian su morfología, funciones y patrón de expresión génica [41]. Estos astrocitos no solo son parte de la respuesta del SNC frente a lesiones, sino que también parecen ser parte de los mecanismos desencadenantes de dichas lesiones [34].

En esta línea, la literatura reporta que los astrocitos que portan la SOD1G93A inducen la degeneración de motoneuronas wild-type in vivo [34, 42] y si son obtenidos de animales terminales muestran la mayor neurotoxicidad en cultivo descrita en modelos animales de ELA. Por lo tanto, evaluar las respuestas celulares diferenciadas por sexo es un gran avance para el conocimiento, el que además es imprescindible para el desarrollo de terapias personalizadas y efectivas.

El trabajo constó de varios objetivos específicos, siendo el primero y segundo, la optimización de cultivos primarios de astrocitos corticales y de médula espinal de ratas neonatas Sprague Dawley sin mutación (WT) y portadoras de la mutación SOD1G93A machos y hembras, en condiciones estandarizadas y reproducibles, para luego evaluar las respuestas celulares específicas según el sexo. Se buscó determinar la viabilidad celular, el crecimiento y la funcionalidad mitocondrial utilizando técnicas bioquímicas, microscopía de campo claro y confocal, conteo de núcleos e inmunocitoquímica. Se emplearon marcadores de linaje celular y sondas fluorescentes para reconocer núcleos (diaminofenilindol (DAPI) o su homólogo, Hoechst 33342). Además, los estudios se complementaron con el uso de faloidina para analizar el citoesqueleto de actina fibrilar. Se analizó además la respuesta de los distintos cultivos celulares luego de inducir un daño mecánico (“scratch”) en condiciones basales y en presencia de inductores de daño oxidativo.

En el segundo objetivo, también se analizó el potencial e integridad de membrana mitocondrial, y los niveles de glutatión. En este objetivo, se evaluó la posible existencia de un dimorfismo sexual en astrocitos de médula espinal del modelo de ratas SOD1G93A macho y hembra y de sus hermanos no transgénicos (controles), empleando las técnicas mencionadas anteriormente. Como tercer objetivo, se buscó obtener resultados preliminares que luego permitan desarrollar y optimizar un modelo experimental para estudiar la interacción astrocitos y motoneuronas en un modelo más asimilable a lo que ocurre in vivo. Para ello se utilizaron cultivos de células gliales obtenidas de ratas SOD1G93A en estado terminal, y se co-cultivaron células de la línea celular NSC-34 comercial desarrolladas por Cashman et al. (1992) [61] que fueron obtenidas mediante la fusión entre motoneuronas de médula espinal y células de neuroblastoma. Este co-cultivo permitió obtener resultados preliminares para analizar diferentes mecanismos patológicos en condiciones de daño al SNC, y en particular estudiar la repercusión que tiene el daño de los astrocitos aberrantes del modelo SOD1G93A en las motoneuronas de médula espinal.

3.Hipótesis

Es posible establecer un modelo celular de ELA de forma estandarizada y reproducible en astrocitos primarios en cultivo, que permita tener en cuenta el sexo al momento de conocer la respuesta al daño y su incidencia en la sobrevida neuronal.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Optimizar modelos celulares que permitan la evaluación de respuestas celulares diferenciables por sexo en condiciones normales y patológicas.

4.2. Objetivos específicos

- 1- Optimizar un modelo experimental que permita identificar y cuantificar diferencias sexo-específicas en cultivos primarios de astrocitos corticales.
- 2- Optimizar un modelo experimental que permita identificar y cuantificar diferencias sexo-específicas en cultivos primarios de astrocitos espinales obtenidos de ratas WT o SOD1G93A

5.Ética

Se cumplieron con los estándares de conducta y buenas prácticas. Hemos obtenido la acreditación pertinente para el manejo de animales, otorgado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA). Los procedimientos experimentales que involucran el manejo de animales han sido aprobados por el Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) y cumplen con las normas nacionales, de acuerdo a la Ley 18.611 “Procedimientos para la utilización de animales en actividades de experimentación, docencia e investigación científica” y las normas internacionales de buenas prácticas.

6. Metodología

6.1. Modelo experimental animal

La cepa utilizada en esta tesis como modelo experimental animal es Sprague Dawley, ya que se caracterizan por su facilidad para manipulación, gran reproducibilidad de resultados, y aceptación como modelo en neurociencias [62]. Para llevar a cabo los experimentos planteados de optimización y caracterización de cultivos primarios de astrocitos corticales y de médula espinal, se utilizaron ratas neonatas hermanas (1 a 3 días de vida) machos y hembras de la cepa Sprague Dawley obtenidas del bioterio de la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación (URBE) de Facultad de Medicina (FMED, Universidad de la República). En cada experimento se utilizaron ratas hermanas macho y hembra para tener la mayor similitud de factores ambientales y genéticos posibles, así las diferencias observadas pueden ser atribuidas a su sexo, en lo posible. Toda la camada se mantuvo con la madre hasta su utilización, en cajas con acceso a agua y alimento a demanda, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, siguiendo el protocolo descrito por Díaz-Amarilla (2011) [42, 63].

Por otra parte, para el objetivo planteado de evaluación de la existencia de respuestas sexo-específicas en astrocitos obtenidos del modelo de ratas SOD1G93A durante el desarrollo, las ratas macho hemicigotas NTac:SD-TgN(SOD1G93A)L26H (Taconic), desarrolladas originalmente por Howland et al. (2002) [51], se criaron en la URBE de Facultad de Medicina y en el bioterio del IIBCE. Los animales a ser procesados se obtuvieron mediante cruce de los machos transgénicos con ratas hembras Sprague-Dawley WT. La preñez resultante del cruce fue determinada por la revisión de la presencia de espermatozoides en el fluido vaginal [42]. Las progenies SOD1G93A machos se utilizaron para la reproducción posterior para mantener la colonia. La aparición de la etapa sintomática de la enfermedad se determinó mediante un examen clínico periódico para detectar la ocurrencia de marcha anormal, que generalmente se expresaba como arrastre de una extremidad trasera y por control periódico de peso. Las ratas se sacrificaron de acuerdo a las necesidades de uso: neonatas para cultivos estándares y cuando alcanzaron la etapa final de la enfermedad cuando se realizaron cultivos para obtener fenotipos aberrantes. Todos los

procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético Institucional del IIBCE que sigue las Leyes Nacionales (Ley 19861) e Internacionales para la protección de animales para uso experimental.

6.2. Genotipado de ratas

Se procedió a genotipar las ratas de toda una camada con el fin de establecer cuáles animales expresan la mutación SOD1G93A y cuales son no transgénicas. El procedimiento llevado a cabo se basó en el propuesto por Herbik et al. (2006) [64] con modificaciones.

Previo al genotipado, al nacer, las ratas se identifican mediante un proceso de marcado con tinta china en forma de tatuaje debajo de la piel, y cuando ya completaron el desarrollo de sus orejas, el marcado se realiza mediante agujereado de la zona siguiendo el método de Dahlborn et al. (2013) [65].

Para el proceso de genotipado, se utilizan las colas, procediéndose de la siguiente manera: Se limpia la zona del extremo final de la cola con etanol 70% y se extraen 2-3 mm del extremo mediante el uso de un bisturí estéril. Se extrae el ADN de las colas poniendo los cortes en una solución de digestión que se compone de: 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, Tris-clorhídrico 10 mM, pH 8,5, 0,01% Gelatina, 0,45% Nonidet P-40, 0,45% TWEEN-20 y 100 µg/mL Proteínasa K. La solución de digestión conteniendo la cola se incuba en termoblock a 56°C durante 6 horas y luego se inactiva la Proteínasa K incubando durante 15 min a 95 °C. Una vez extraído el ADN del tejido, se procede a realizar una PCR, siendo la solución utilizada Mango Mix 2X (Meridian Bioscience, BIO-25033), Primer Mix 10 µM (ver Tabla 1 de primers, Macrogen) y ADN muestra (se utiliza 1 µl de la digestión de cada cola). Mediante el uso de un termociclador, se lleva a cabo la PCR con los detalles de la Tabla 2. Para evidenciar la presencia del transgen humano, se siembra una electroforesis en gel de agarosa 1%, la cual se corre a 100V por 30 minutos y luego se revela en lector Ibright (Thermo). Los pasos de desnaturalización, hibridación y elongación se repitieron 35 veces.

Tabla 1. Primers diseñados para evidenciar la presencia del transgen SOD1.

Reverse	5'-CACCAGTGTGCGGCCAATGA-3
Forward	5'-GTGGCATCAGCCCTAATCCA-3'

Tabla 2. Configuración de temperaturas y tiempos para la amplificación

Temperatura	Tiempo (min)	Finalidad
95	2	Activación de Taq polimerasa
95	0,5	Desnaturalización del ADN
60	0,5	Unión del cebador
72	0,5	Elongación
72	5	Completar amplicones de ADN de hebra simple

Este procedimiento es crucial para el desarrollo del resto de los experimentos, y fue llevado a cabo por integrantes del departamento de Neurobiología y Neuropatología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

6.3. Procesamiento de animales y obtención de muestras

Las ratas Sprague Dawley de 1 a 3 días de vida se clasifican por sexo mediante la evaluación individual de la distancia anogenital. Para proceder al cultivo, una persona certificada en el uso de animales de experimentación sanitiza a cada animal con agua destilada y luego con alcohol 70%, extrae el cráneo y retira el cerebro bajo solución de PBS 10 mM, pH 7.4, estéril (PBS 1X). La disección del cerebro se realiza mediante el uso de pinzas y lupa bajo cabina de flujo laminar, se retiran las meninges y se obtienen las hemi-cortezas o las médulas espinales, las cuales se depositan en otra placa de Petri conteniendo PBS 1X estéril.

6.4. Generación de cultivos primarios de astrocitos corticales y de médula espinal

Una vez procesados los animales y obtenidas las muestras, se siguió el protocolo de cultivo primario descrito previamente Díaz-Amarilla et al. (2011) [42]. Se toman las muestras de tejido, que se encuentran en una placa Petri con PBS 1X, utilizando una micropipeta y se colocan en un tubo Falcon. Se espera un tiempo breve hasta que el tejido decante y se retira el sobrenadante de PBS 1X. Luego se adiciona tripsina-EDTA al 0,05% y se incuba en estufa a 37°C por 25 minutos para disgregar el tejido químicamente. Pasado el tiempo establecido, se retira el sobrenadante y se agregan 2 ml de medio DMEM Alta Glucosa (Capricorn) con 10% de FBS (Capricorn) y 1% Antibiótico/Antimicótico (Capricorn), con el fin de bloquear la actividad de la tripsina. Luego se procede a realizar una disgregación mecánica del tejido mediante la homogeneización con varios pasajes de micropipeta. La suspensión obtenida es pasada por un tamiz de 80 μm y es recogida en un nuevo tubo Falcon estéril y se centrifuga durante 10 min a 1000 rpm. Luego se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet en medio DMEM HG + 10% FBS + 1% Antibiótico/Antimicótico (Capricorn); se cuenta y se siembra en botella de cultivo de 25cm², la cual se mantiene en estufa a 37°C, 5% CO₂. Los cultivos primarios generados de corteza y médula espinal se mantienen en botellas de cultivo, cambiando el medio de cultivo cada 48 h, hasta llegar a confluencia. Al llegar a confluencia, los oligodendrocitos y microglía se retiran de los cultivos mixtos mediante agitación en un shaker orbital durante 48 horas a 250 rpm a temperatura ambiente. Luego de ese tiempo, se retira el medio de cultivo con las células despegadas, se procede al cambio de medio de cultivo hasta llegar a confluencia nuevamente. Cuando los astrocitos llegan a confluencia, se lava con PBS 1X y se tripsinizan agregando a cada botella 800 μL de PBS 1X + 200 μL de Tripsina-EDTA 0.5% y se mantienen 7-10 minutos en estufa a 37°C. Pasado ese tiempo, las botellas se golpean y se verifica que las células se han desprendido. Luego la tripsina se bloquea con la adición de medio DMEM HG + 10% FBS + 1% Antibiótico, se homogeniza el contenido celular y se centrifuga durante 10 minutos a 1000 rpm. Se descarta el sobrenadante, el pellet celular se resuspende en 1 ml de medio de cultivo completo y se realiza una dilución 1:10 para conteo en cámara de Neubauer o en contador celular (Automatic Cell Counter, Celldrop). Luego de obtener el número total de células, se calculan las diluciones necesarias para el diseño de siembra de células que permita tener la misma densidad celular para macho que para hembra al momento de plaquear

en placas de 48 o 96 pocillos, tomando como criterio el sembrado de 40.000 células/cm². Los cultivos se mantienen en estufa a 37°C con el mismo régimen de cambio de medio al mencionado hasta llegar a confluencia. Una vez que se llega a confluencia, se cambia el medio a DMEM HG + 2% FBS + 1% Antibiótico para disminuir el estímulo mitogénico durante las 24 horas previas al tratamiento de daño.

6.5. Mantenimiento de células de línea NSC-34

Las células NSC-34 donadas por el Dr. E. Trías del Instituto Pasteur de Montevideo fueron mantenidas en medio DMEM HG + 10% FBS + 1% Antibiótico hasta confluencia. En ese punto, se levantaron por pipeteo repetido, se centrifugó la suspensión a 1000 rpm durante 10 min y se procedió a replicar la mitad de cada botella de cultivo de 25 cm² en dos viales a congelar y mantener en nitrógeno líquido, la cuarta parte de las células se sembró en placas multipocillos a una densidad de 2000 células/cm² y la restante cuarta parte se sembró en botella de cultivo. Luego del primer día de cultivo, las células sembradas en placas fueron diferenciadas reemplazando el medio de cultivo estándar por uno conteniendo 1% FBS.

6.6. Estímulo/Tratamiento de daño a cultivos primarios (daño oxidativo agudo y moderado)

Los cultivos primarios de astrocitos fueron sometidos a distintos compuestos para evaluar su efecto y determinar la existencia de posibles diferencias entre astrocitos de machos y de hembras en las distintas condiciones experimentales. Para la inducción de estrés oxidativo en los cultivos, se realizó el procedimiento propuesto por Echeverry et al. (2015) [66] con modificaciones. Los cultivos se trataron con Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂), en las concentraciones: 0, 1, 10, 50, 100 y 200 mM para generar un daño agudo. Luego de la adición de este compuesto, el cultivo se incubó en estufa a 37°C, 5% CO₂ por 1 hora. Adicionalmente, para la inducción de estrés oxidativo se utilizó el compuesto Azida de Sodio (NaN₃) según el procedimiento descrito por Korenic et al. (2014) [67], con modificaciones. Se utilizó una concentración de 10 mM de NaN₃, previamente demostrada con acción sobre los astrocitos, la cual se incubó durante 24 horas. Para la inducción

de estrés de retículo con Tunicamicina (TN), se siguió el procedimiento propuesto por Otero et al. (2024) [68], con modificaciones. Se utilizó una concentración de 2 μ M, previamente probada con acción sobre astrocitos, incubando los cultivos por 24 horas a 37°C, 5% CO₂. Para el tratamiento de daño utilizando galactosa (Gal) basados en concentraciones empleadas por Castro et al. (2016) [55], se adicionó este compuesto a los cultivos en las siguientes concentraciones: 1, 5, 10, 15, 25 mM. Se incubó por 24 horas a 37°C y 5% CO₂. Una vez finalizados los tiempos de incubación propuestos, se procedió con los ensayos que se describen a continuación.

6.7. Análisis de funcionalidad mitocondrial: Ensayo de MTT

Existe un amplio espectro de diferentes ensayos biológicos disponibles para cuantificar la proliferación celular y citotoxicidad. Una de las técnicas utilizadas para evaluar los efectos de los tratamientos de daño en los cultivos astrocitarios es el ensayo del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Este ensayo evalúa la funcionalidad mitocondrial al medir la actividad de NAD(P)H mitocondrial mediante la reducción del MTT a través de la acción de la enzima succinato deshidrogenasa, una enzima mitocondrial. MTT es un sustrato de color amarillo pálido que cuando actúa la enzima succinato deshidrogenasa, se escinde el anillo de tetrazolio en mitocondrias activas, dando lugar a cristales violetas (formazán), siendo un marcador de estado metabólico celular. Se ha demostrado que la cantidad de formazán generada por célula depende del nivel de metabolismo energético mitocondrial, y que las células activadas producen más formazán que las que están en reposo, lo que apoya la idea de que las mitocondrias activas son necesarias para generar una señal fuerte [69, 70]. Siguiendo el protocolo descrito en Olivera et al. (2022) [71], se procedió de la siguiente manera: Después de los tratamientos con los distintos estímulos, las células se incubaron con MTT a una concentración de 5 μ g/mL (en PBS 1X) en estufa a 37°C durante 15 minutos. En ese momento, se observa en el microscopio la presencia o ausencia de espículas extracelulares que indican que es momento de finalizar la reacción. Se retira el medio de incubación de las células y se agregan 100 μ L en cada well de placas 48 wells, o 50 μ L en placas de 96 wells de DMSO, agitándose durante 5 minutos. Se mide la absorbancia a las longitudes de onda 570 y 630 nm en espectrofotómetro Varioskan (Thermo Scientific Varioskan® Flash). Los datos obtenidos se normalizaron con respecto al control (sin tratamiento de daño) de macho y se expresaron como porcentaje del control para su análisis estadístico.

6.8. Análisis de Citotoxicidad mediante Sulforodamina B (SRB)

Otra de las técnicas utilizadas para evaluar los efectos de los tratamientos de daño en los cultivos celulares es el ensayo de sulforodamina B (SRB). Este ensayo es un método ampliamente utilizado para evaluar la viabilidad celular y la citotoxicidad de diferentes compuestos, basándose en la cuantificación de la masa proteica celular que permanece adherida a un sustrato mediante la fijación y posterior tinción con el colorante SRB, el cual se une a los residuos básicos de las proteínas celulares [72]. Esta técnica permite obtener una medida indirecta de la cantidad de células viables, ya que la cantidad de proteína celular es proporcional a la densidad de las células que permanecen adheridas al sustrato [72]. Dado que el ensayo no depende de la actividad metabólica celular, elimina las variaciones en los resultados asociadas a variaciones en la actividad mitocondrial, lo que lo hace ideal para estudios de citotoxicidad [72]. Sus principales ventajas son la alta sensibilidad, estabilidad y bajo costo que tiene esta técnica en comparación con otros ensayos de viabilidad celular.

Siguiendo el protocolo descrito por Olivera et al. (2022) [71] y Carreira R. (2019) [73], posteriormente al tratamiento de daño realizado, las células se fijan con ácido tricloroacético (TCA) al 10% agregando un volumen equivalente a 1/4 del medio de cultivo presente en los pocillos de la placa. Es decir, se añaden (25 μ L de TCA al 10% a cada pocillo de una placa de 96 wells que contiene 100 μ l). Para este paso de fijación se incuba durante 1 hora a 4°C en el cual las células se fijan por precipitación, y luego de este período se descarta el líquido cuidadosamente. Posteriormente se realiza un lavado con agua destilada, evitando impactar directamente sobre las células. Se deja secar a temperatura ambiente, boca abajo y en oscuridad durante 48 horas, o en estufa a 37°C durante un mínimo de 24 horas. Luego a las células fijadas se agregan 35 μ L de solución SRB al 0,05% (preparada diluyendo 1 mL de SRB (Sigma, catálogo 230162) al 0,4% en 7 mL de ácido acético al 1%), y se coloca la placa en un agitador de balanceo (rocker) durante 5 minutos para asegurar que la SRB cubre completamente el fondo de cada well. Luego se incuba en estufa a 37°C durante 1 hora, se descarta el sobrenadante, y se realizan 5 lavados con ácido acético al 1%, utilizando pipetas de vidrio para mayor facilidad. A continuación, se deja secar a temperatura ambiente durante un mínimo de 24 horas, o 12 horas en estufa a 37°C. Dado que la SRB tiene una coloración visible que además fluoresce en el espectro del rojo lejano, además de

las medidas espectrofotométricas, adicionalmente se pueden tomar imágenes de la morfología celular evidenciada por el marcado con SRB en un microscopio confocal (Zeiss 800), tomándose de 3 a 5 campos para cada tratamiento. Luego de obtener las imágenes, la SRB se disuelve agregando 100 μ L de buffer Tris (pH 10) a cada well, y se agita hasta que la disolución sea completa. Se mide la absorbancia a la longitud de onda 510 nm, con una corrección de fondo a 490 nm en espectrofotómetro Varioskan (Thermo Scientific Varioskan® Flash). Los datos obtenidos relacionan altos valores de absorbancia con mayores niveles de viabilidad celular, ya que la cantidad de proteína celular es proporcional a la densidad celular. Estos datos se normalizaron con respecto al control (sin tratamiento de daño) de macho y se expresaron como porcentaje del control para su análisis.

6.9. Análisis de los niveles de Glutación

Se utiliza el monoclorobimano (MCB, Sigma 69899) para medir los niveles de glutatión (GSH) en las células en cultivo, siguiendo un protocolo descrito con modificaciones menores [71]. El MCB es un compuesto heterocíclico no fluorescente que cuando se conjuga con tioles, como lo es el glutatión, fluoresce a las longitudes de onda entre 460 y 490 nm. Para determinar los niveles de glutatión: las células se incuban con 40 μ M de MCB en PBS glucosado (Glucosa 20 mM diluida en PBS 1X), por 20 minutos en oscuridad a 37°C en estufa con 5% CO₂. Finalizado el tiempo de incubación, se retira el sobrenadante y se deposita en pocillos limpios para su posterior medida. Las células se mantienen en PBS glucosado + 0,1% Tween 20, solución que debe encontrarse tibia para determinar los niveles de glutatión celulares. La emisión a 460-490 nm posterior a una excitación a 390 nm se mide en espectrofotómetro (Varioskan o Clariostar), en los cultivos y en el sobrenadante.

6.10. Análisis de potencial e integridad de la membrana mitocondrial

El compuesto MitoTracker red (M22425, Invitrogen), se utiliza para la evaluación del potencial y la integridad de la membrana mitocondrial en células vivas [74]. MitoTracker es una sonda fluorescente capaz de permear la membrana celular y acumularse en la mitocondria,

independientemente del potencial mitocondrial. Para determinar el potencial mitocondrial en cultivos celulares, se lleva a cabo el protocolo propuesto por el fabricante (Invitrogen) el que consiste en adicionar 100 nM de MitoTracker (MT) diluido en PBS glucosado (Glucosa 20 mM en PBS 1X) a las células en cultivo. Se incuba por 15 minutos a 37°C en estufa con 5% CO₂ y luego se retira la solución. Se mantienen las células en PBS glucosado tibio y se mide en un espectrofotómetro (Varioskan o Clariostar), a 590 nm.

6.11. Inmunocitoquímica para GFAP y S100β

Los marcadores astrocitarios proteína acídica glial fibrilar (GFAP) e isoforma beta de la proteína S100 (S100β) se deben reconocer mediante inmunocitoquímica. Para realizar esta técnica se debe realizar la permeabilización de las células mediante el uso de Tritón X-100 0,1% y se deja en agitación suave por 20 minutos. Luego se adiciona BSA 5% en Tritón X-100 0,1% y se incuba por 30 minutos en agitación suave para realizar el bloqueo que consiste en utilizar alta carga proteica para bloquear las uniones inespecíficas antígeno-anticuerpo. Una vez realizado el bloqueo, se lleva a cabo la incubación con los anticuerpos primarios que reconocen el antígeno de interés. Los anticuerpos primarios utilizados son anti-S100β (Anticuerpo Sigma, S2562) o anti-GFAP (Sigma, G9269), empleados en una dilución 1:400 en solución BSA 5% - Tritón X-100 0.1%. Se adiciona la dilución conteniendo los anticuerpos primarios a las células fijadas y permeabilizadas, se recubre el pocillo con parafilm para que la solución se encuentre siempre en contacto con las células y cada placa se incuba en una cámara húmeda a 4°C por 48 horas. Se recupera la solución de anticuerpos primarios, se retira el parafilm y se realizan 3 lavados de PBS 1X por 10 minutos. Luego se procede a incubar con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados a probes fluorescentes. Se realiza una dilución 1/600, la cual es agregada a las células y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se llevan a cabo 3 lavados con PBS 1X, se retira el PBS y se procede al montaje con glicerol 50% conteniendo 1 µg/mL de DAPI o Hoescht 33342 [75]. Se toman imágenes en el microscopio confocal, procediéndose a tomar de 3 a 5 campos por well, a 1024x1024 de resolución, tiempo de escaneado medio y manteniendo las condiciones de adquisición de imágenes en todas las condiciones de un mismo experimento.

6.12. Evaluación de respuesta al daño mecánico “scratch”

Para evaluar la respuesta de los astrocitos al daño mecánico y su capacidad de respuesta a tratamientos de daño (como exposición a galactosa), se realiza un ensayo de scratch empleando una punta estéril de una micropipeta de 200 μ L. Esta técnica permite analizar la cicatrización celular midiendo la tasa de cierre de una herida artificial (“scratch”) en un cultivo celular [63, 76].

Siguiendo el protocolo descrito en Isasi E. (2013) y Isasi et al. (2019) [63, 76], primero se retira el medio de cultivo de cada well, se da vuelta la placa manteniéndola cerrada, y rápidamente se marca una línea en la mitad de cada well usando una regla y marcador negro, que servirá como guía. Luego, se agrega 200 μ L de PBS 1X a cada well, y se realiza el “scratch” manualmente usando la punta de un tip amarillo de micropipeta p200 siguiendo la línea del marcador de manera longitudinal en el well. Se borra la línea del marcador afuera de la placa con alcohol 70%, y se realiza un lavado con PBS 1X para eliminar las células despegadas durante el scratch. Luego se agrega el medio de cultivo DMEM en los pocillos control, y medio de cultivo con tratamiento de daño (por ejemplo, 10 mM de galactosa) a los wells correspondientes. De esta manera, se obtienen diferentes combinaciones de condiciones experimentales: células control o células con scratch, combinado a la presencia o ausencia de tratamiento de daño (como diferentes concentraciones de galactosa).

Para evaluar el citoesqueleto y la migración y proliferación celular en la zona del scratch, las células se marcan con Faloidina conjugada a Alexa-488 (A12379, Invitrogen) y DAPI o Hoechst 33342 de acuerdo con el protocolo descrito previamente [71, 76] o con SRB. La Faloidina-488 se une a la actina fibrilar lo que permite observar la organización del citoesqueleto en los astrocitos y facilita su visualización, mientras que el DAPI se intercala en el ADN de los núcleos como marcador fluorescente, por lo que permite cuantificar el número total de células y evaluar su presencia en la zona del scratch. Para realizar el marcado con faloidina, en primer lugar, se retira el medio de los wells, se agregan 30 μ L de faloidina 488 en dilución 1:300 (750 μ L de PBS 1X + 2,5 μ L de faloidina) y se incuba en oscuridad en un rocker durante 20 minutos. Luego se recupera faloidina en un tubo Eppendorf envuelto en aluminio para su reutilización. Se agregan 60 μ L de DAPI en dilución 1:1000 (1040 μ L de PBS 1X + 1 μ L de DAPI 1 μ g/mL) y se incuba en rocker por 10 minutos. Se realizan dos lavados con PBS 1X, y se agrega glicerol al 50% para cubrir el fondo de cada well. Por último, se toman imágenes en el microscopio confocal Zeiss 800 a 5X con

excitación a 488 nm y captura a 522 nm, capturando aproximadamente 10 imágenes adyacentes de cada sección del scratch para obtener en conjunto su área total, y este procedimiento se realiza en triplicado para cada condición experimental (según sexo, concentración de tratamiento de daño, etc.).

Cada imagen obtenida para todas las secciones de cada scratch se analiza en el software ImageJ FIJI para obtener el área total de cada scratch, la cantidad de células (determinadas por el conteo de núcleos marcados con DAPI) que migraron para cicatrizar el scratch, y se realizan los cálculos utilizando la cuantificación de la intensidad de la señal por unidad de área (*mean gray value*, MGV). De esta manera se determina la tasa de proliferación y migración en respuesta al daño mecánico, y se evalúa si esta tasa presenta diferencias sexo específicas en condiciones control o en diferentes concentraciones de daño. Los datos cuantificados se parametrizaron respecto al macho control.

6.13. Análisis estadístico

Todos los experimentos y determinaciones se realizaron por triplicado como mínimo, y para cada determinación se calcularon los promedios y las dispersiones de cada condición experimental según el sexo de la muestra de rata, su identidad wild-type o SOD1, si era proveniente de corteza o médula espinal, y el tipo de daño al que fue expuesto. Los valores se parametrizaron respecto al control de macho para poder analizar la presencia o ausencia de diferencias sexo específicas. Este criterio de parametrización es acorde a estudios similares que parametrizan al macho control como 100% [77] o a la hembra control como 100% [21]. El criterio de parametrización pretende facilitar la visualización y comprensión de los datos en las respuestas sexo-específicas, lo que es justificado al determinar que el análisis de los datos en valores absolutos refleja la misma tendencia sexo-específica que los datos parametrizados. Además, para asegurar que esa parametrización no resulta en un sesgo, se realizaron estudios estadísticos independientes evaluando la magnitud de la respuesta al daño en hembra o macho utilizando su propio control.

Las comparaciones entre condiciones experimentales se realizaron utilizando las herramientas estadísticas del software GraphPad Prism 8, utilizando el test Grouped Analysis Two-way ANOVA (los datos presentan normalidad según el test Shapiro-Wilk) y Multiple t test para

comparar según sexo, y el Welch t test o One sample t test para evaluar la diferencia de respuesta en un solo tipo celular ante diferentes concentraciones de daño. La significación estadística se definió a $p < 0,05$.

7. Resultados y Discusión

7.1. Optimización de cultivos primarios de astrocitos corticales de ratas WT neonatas, machos y hembras, en condiciones basales y evaluación de su respuesta a distintos estresores, para identificación de posibles respuestas sexo-específicas

7.1.1. Optimización y caracterización de los cultivos de astrocitos corticales

Como primer objetivo, se optimizó la obtención de cultivos primarios de astrocitos corticales de ratas WT neonatas, machos y hembras, en condiciones estandarizadas y reproducibles, para luego evaluar las respuestas celulares específicas según el sexo. Durante el establecimiento del cultivo se tomaron imágenes para determinar los patrones de crecimiento de las células de machos y de hembras. Se observó que los astrocitos corticales de hembras y machos suelen tener un crecimiento a la par al pasar los días en cultivo en la fase inicial de crecimiento en botella, y una cantidad similar de oligodendrocitos y astrocitos, como se observa en Figura 6, lo cual es concordante con lo reportado por Roemgens et al. (2011) [78] para cultivos corticales. En la Figura 7 se observa que los astrocitos presentan una morfología poliédrica con pocos procesos celulares, y dominios ordenados y definidos. Luego de la separación de los astrocitos del resto de la glía por agitación mecánica durante 48 horas, se confirmó mediante observación en microscopio de luz la presencia de células con la morfología de astrocitos en cultivo y mediante inmunocitoquímica que los cultivos primarios de astrocitos consisten principalmente en células inmunorreactivas a GFAP (95%) y estaban prácticamente libres de neuronas, oligodendrocitos y células microgliales [78]. Para todos los experimentos se utilizaron animales hermanos que crecieron en las mismas condiciones ambientales para reducir la variable de diferencias atribuibles a la genética o factores ambientales externos. Además, se aseguró que los hermanos tenían pesos similares, con una cantidad similar de tejido cerebral y médula espinal a diseccionar. Sumado a que el rendimiento celular fue similar entre machos y hembras, y que se siembra la misma densidad celular para ambos sexos, se disminuye la posibilidad que las diferencias sean atribuibles a estas variables, asegurando condiciones lo más similares entre células de machos y hembras en cada condición experimental.

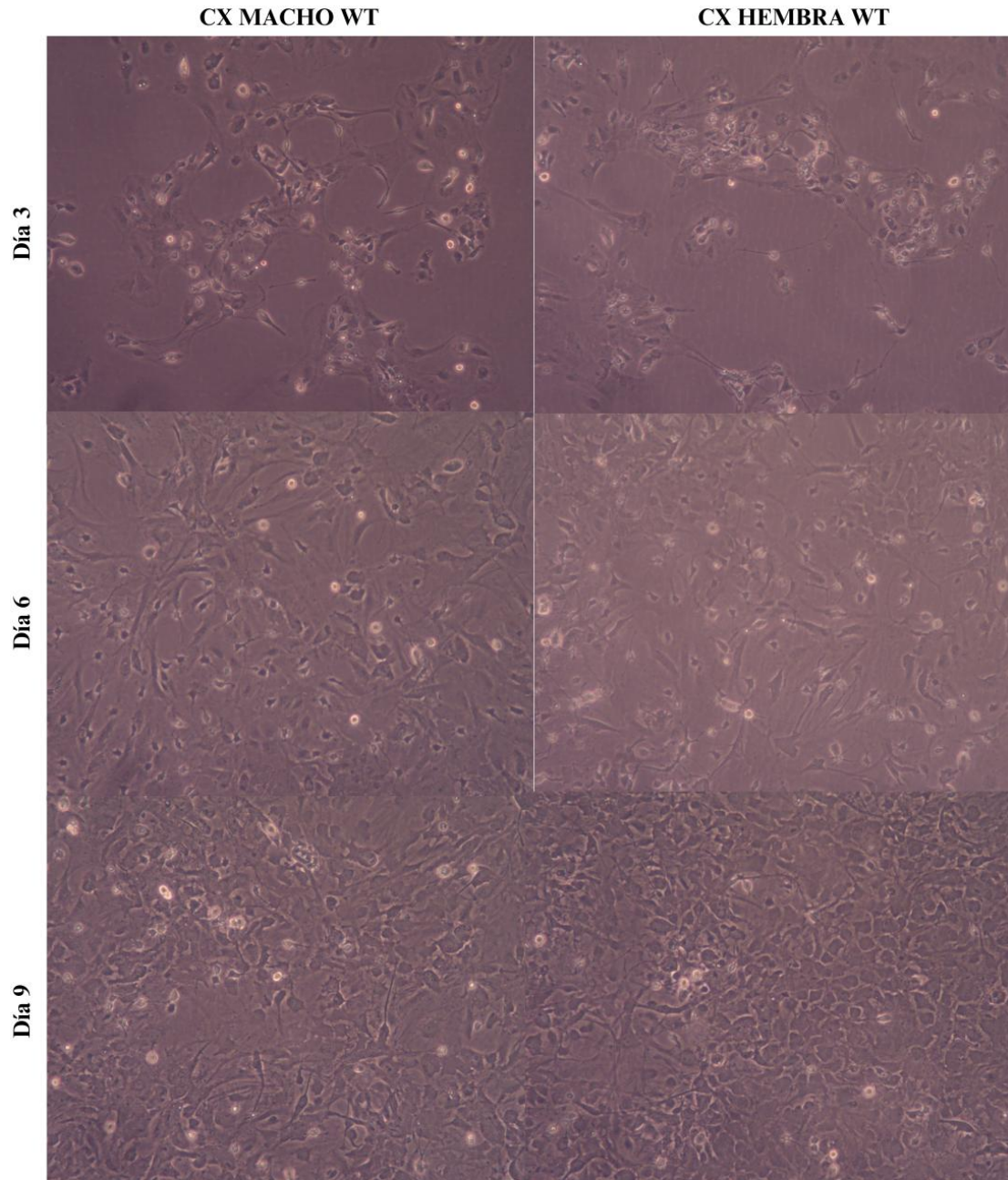


Figura 6. Establecimiento de los cultivos de astrocitos provenientes de machos y hembras neonatas. Imágenes de campo claro de los cultivos primarios de astrocitos de corteza a los 3, 6 y 9 días en cultivo, captadas por cámara monocolor empleando el programa Pixelink. La magnificación empleada fue 10x (Microscopio invertido Olympus). Las fotos muestran como las células en cultivo presentan una apariencia y densidad celular similar, adoptando mayoritariamente la morfología poliédrica de los astrocitos en cultivo y por encima la presencia de otras células gliales, presumiblemente de diferentes linajes (microglías y oligodendrocitos).

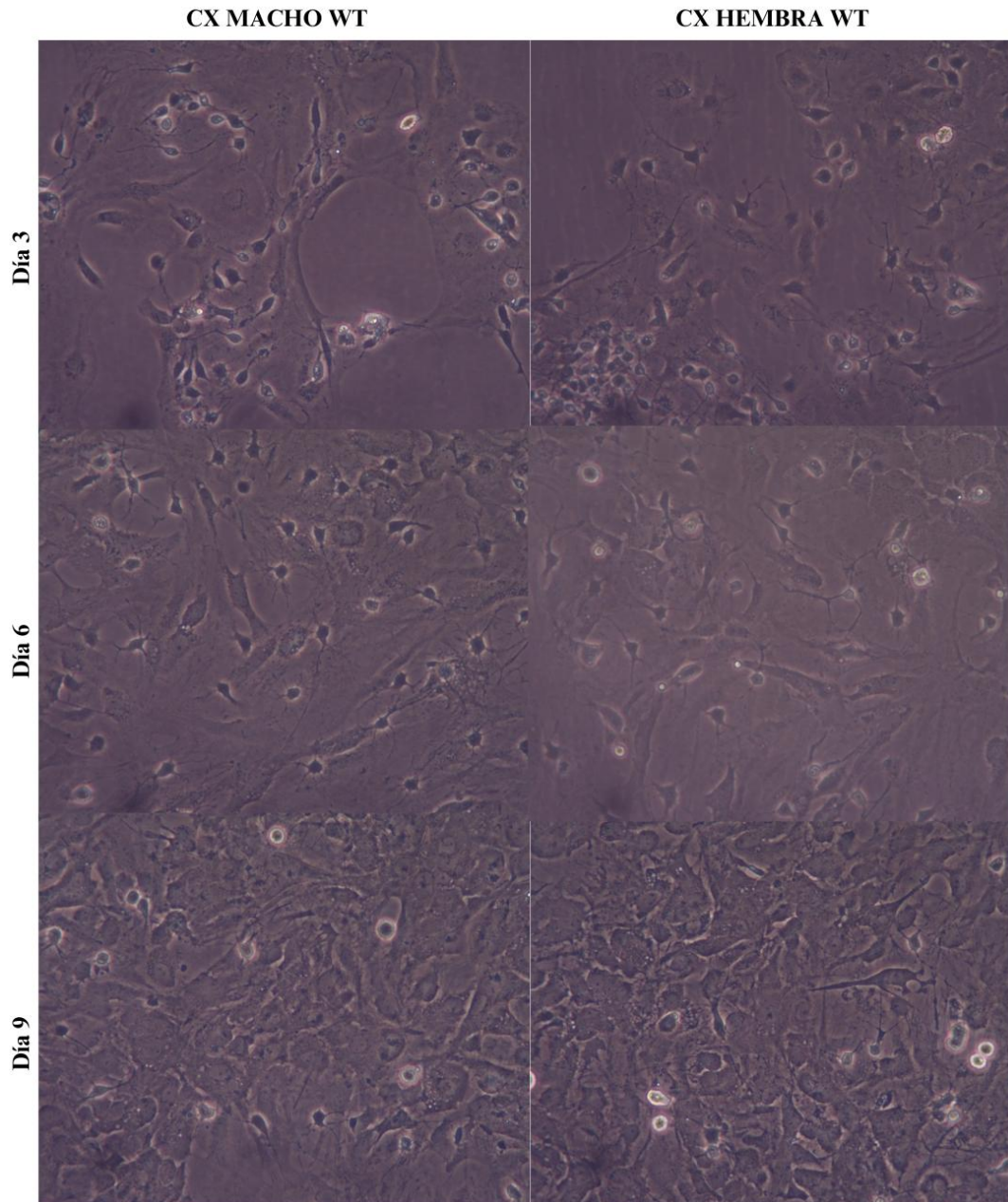


Figura 7. Imágenes de campo claro de los cultivos de machos y hembras a mayor aumento. Las fotos fueron tomadas 3, 6 y 9 días en cultivo a 20x, y evidencian mejor la presencia de distintas morfologías celulares que sugieren diferentes linajes y como al pasar los días los astrocitos van adoptando la forma de monocapa con los dominios celulares ordenados y sin solapamiento.

Luego de establecer los cultivos primarios, se buscó determinar la viabilidad celular, desarrollo y funcionalidad mitocondrial utilizando técnicas bioquímicas, microscopía de campo claro y confocal, y conteo de núcleos. Se complementaron los estudios con el uso de faloidina para analizar el citoesqueleto de actina fibrilar. Se analizaron, además, algunos parámetros de la respuesta ante el daño mecánico realizando ensayos de “scratch” en condiciones basales y frente a estímulos de daño.

7.1.2. Análisis de la respuesta sexo-específica de astrocitos corticales frente a distintos estímulos de daño

Como se mencionó previamente, la pérdida progresiva de motoneuronas en la ELA se asocia a muchos mecanismos patogénicos incluyendo neuroinflamación, estrés oxidativo, gliosis reactiva, estrés del retículo endoplasmático y disfunción mitocondrial, en los cuales la gliosis reactiva tiene una participación importante [36, 37]. Dada la heterogeneidad clínica de la ELA, estos mecanismos pueden tener roles más o menos prominentes en diferentes pacientes [30, 38], por lo que se exploraron diferentes estímulos de daño en varias concentraciones y combinaciones con otros estímulos, de manera de identificar un paradigma experimental que evidencie mejor las diferencias sexo-específicas en las enfermedades neurodegenerativas como ELA.

7.1.2.1. Respuesta al estrés oxidativo mediado por H₂O₂

Considerando que el daño oxidativo es uno de los mecanismos predominantes en las enfermedades neurodegenerativas, se evaluó la respuesta de los cultivos primarios de astrocitos corticales de ratas neonatas WT macho y hembra ante diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el cual actúa como agente inductor de daño oxidativo. Para evaluar los efectos de los tratamientos de daño en los cultivos astrocitarios, se usó el ensayo de sulforodamina B (SRB) para evaluar la viabilidad celular y la citotoxicidad ya que SRB se une a las proteínas que permanecen fijadas al sustrato, y la cantidad de proteína celular fijada es proporcional a la densidad de las

células que permanecieron adheridas al sustrato [72]. Además de viabilidad celular, se analizó la funcionalidad mitocondrial mediante el ensayo de MTT, como se observa en la Figura 8.

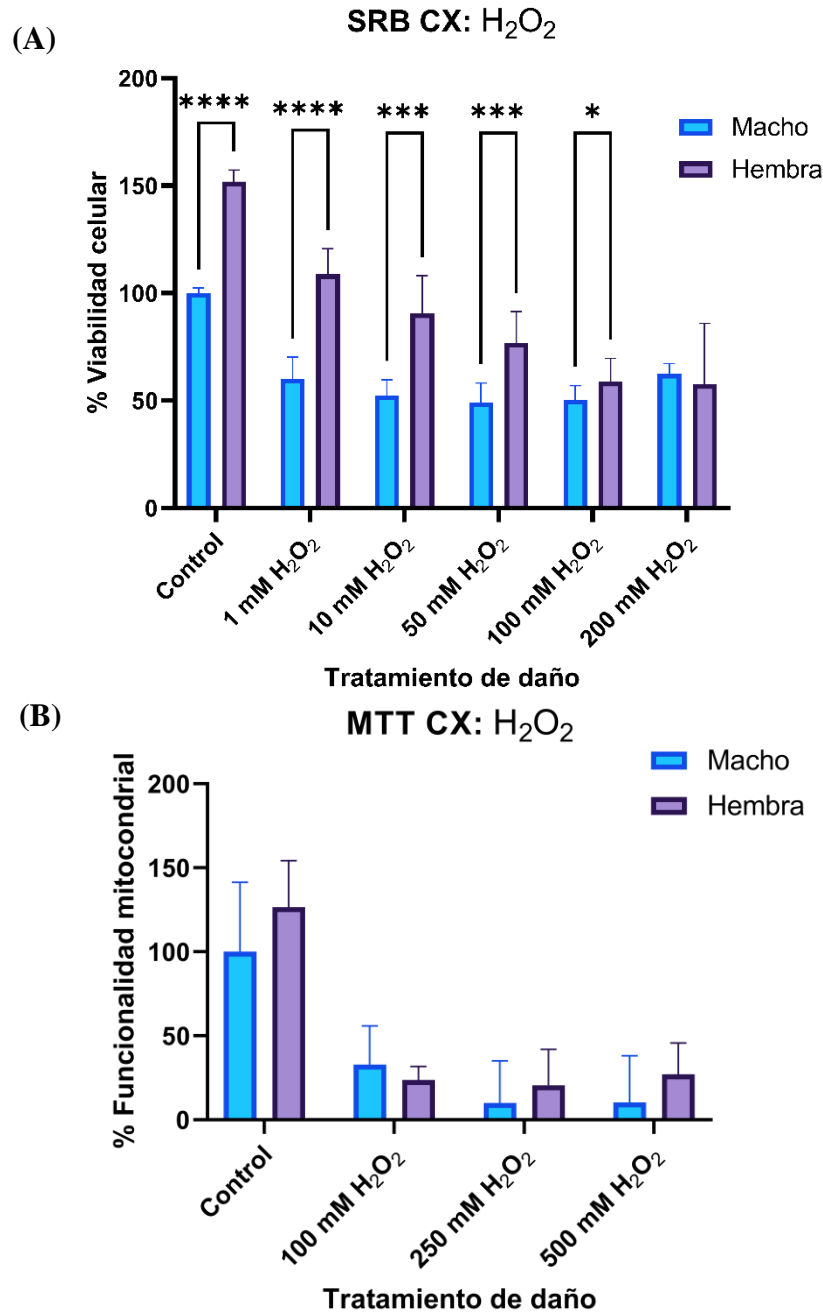


Figura 8. Respuesta de los astrocitos corticales de ratas macho y hembra al estrés oxidativo agudo causado por H₂O₂. (A) Cuantificación de viabilidad celular ante H₂O₂ como inductor de estrés oxidativo y evaluada por el ensayo de SRB. La gráfica muestra los valores de absorbancia a 510 nm normalizados al valor del macho control, y representados en función de la concentración de H₂O₂. Para cada condición de daño se presenta la media ± desviación estándar (n=8 por cada

condición experimental, 3 experimentos independientes) para astrocitos provenientes de corteza de ratas macho (azul) y ratas hembra (violeta). **(B)** Cuantificación de la funcionalidad mitocondrial ante H₂O₂ evaluada por el ensayo de MTT. La gráfica muestra los valores de absorbancia a 570 nm – 630 nm, normalizados al valor de absorbancia del macho control en función de la concentración de H₂O₂. Para cada condición de daño se presenta la media ± desviación estándar (n=4 por cada condición experimental, 3 experimentos independientes) para astrocitos corticales provenientes de ratas macho (azul) y ratas hembra (violeta). Los asteriscos indican significación estadística para p<0.05 (*), p<0.01 (**), p<0.001 (***) y p<0.0001 (****), respectivamente.

Como se puede observar en la Figura 8 (A), la viabilidad astrocitaria disminuye a medida que aumentan las concentraciones de peróxido, lo que es concordante con estudios previos que indican que en el SNC los agentes oxidantes como H₂O₂ inducen la formación de ROS y disminuyen la viabilidad de los astrocitos y las neuronas [79]. Esto podría deberse a que un exceso de ROS puede dañar los lípidos celulares, las proteínas y el ADN, inhibiendo sus funciones normales [58, 79]. Como se observa en las Figuras 8 (A) y (B), la viabilidad celular y la funcionalidad mitocondrial disminuyeron de manera dependiente de la dosis, de la misma manera que fue reportado en estudios previos que utilizaron H₂O₂ como control positivo para la toxicidad oxidativa [69]. Acorde al análisis estadístico de Two-way ANOVA, el efecto del tratamiento de daño fue significativo en la viabilidad astrocitaria (####, p= <0,0001) y en la funcionalidad mitocondrial (####, p= <0,0001) para ambos sexos. El efecto global de daño fue diferente según sexo solo para viabilidad astrocitaria (####, p= <0,0001 en hembra, ###, p= 0,0007 en macho), y no fue diferente para la funcionalidad mitocondrial. Además, para el parámetro de viabilidad astrocitaria la interacción del factor de sexo y el factor de daño fue significativo (####, p= <0,0001) lo que permite determinarlo como respuesta diferencial sexo-específica ante daño oxidativo.

Por otra parte, para analizar cuáles concentraciones de daño presentan diferencias sexo-específicas se realizó un *Grouped Analysis de Multiple Unpaired t-tests* en el que se compara para cada condición la respuesta del macho vs la respuesta de la hembra, y se determinó que la hembra presenta una mayor viabilidad astrocitaria en condiciones control y de daño hasta 100 mM de H₂O₂, como se observa en la Figura 8 (A). Teniendo en cuenta que se sembró la misma densidad

celular para ambos sexos, es destacable que la hembra presente mayor viabilidad astrocitaria que el macho en condiciones control, como se observa en la Figura 8 (A).

Una posible explicación para estos resultados es la dada por otros estudios que han hipotetizado que los astrocitos corticales de macho son menos resistentes ante la privación de oxígeno y glucosa que los de hembra [21, 80], lo que puede ocurrir en cultivo. Estos estudios indican que la diferencia sexual podría deberse a que la enzima aromatasa (que convierte la testosterona en estradiol) tiene funciones neuroprotectoras y presenta una actividad mayor en astrocitos de hembra que de macho [21], lo que podría explicar la mayor viabilidad celular en hembras. Esta actividad sexualmente dimórfica de la enzima en los astrocitos puede contribuir a proteger no solo a estas células sino también a otros tipos de células del SNC, incluidas las neuronas, y puede sugerir que los astrocitos de hembra tienen mecanismos intrínsecos que protegen mejor contra el daño celular, resultado en una mayor viabilidad basal.

De todas maneras, se puede observar en la Figura 8 (A) que aunque la viabilidad de hembra es mayor en control y en todas las condiciones de daño, el delta de disminución en hembra es mucho más drástico que en machos, ya que el peróxido disminuye un 90% de la viabilidad en hembra. Por otra parte, aunque la viabilidad del macho es menor que hembra en todas las condiciones y ya en 1 mM de H_2O_2 presenta una tendencia a disminución de viabilidad, mantiene un nivel estable de viabilidad ante un rango amplio de daño (1-100 mM H_2O_2), lo que no ocurre con las células de hembra. Como perspectiva a futuro se podrían disminuir la duración del daño (a 30 minutos por ejemplo, para simular un daño más agudo) y determinar si se mantiene esta tendencia de mayores valores basales en hembra pero también mayor susceptibilidad al daño, o alternativamente, retirar el daño al cabo de 1 hora y dejar vivir los astrocitos de machos y de hembra por 24 horas y analizar su viabilidad.

Un hallazgo importante que se observa en la Figura 8 (A) es que el efecto del daño causado por 100 mM de H_2O_2 es similar al causado por 200 mM de H_2O_2 cuando se mide espectrofotométricamente. Sin embargo, al observar en el microscopio óptico se determinó que efectivamente la muerte celular es mayor a 200 mM, por lo que se hipotetiza que se llegó al límite menor de detección de la técnica SRB por lo que no es capaz de diferenciar niveles mayores de muerte pasado el nivel donde la gran mayoría de las células están muertas y solo unas pocas se

mantiene vivas. Al determinar el límite inferior de detección de la técnica se decidió continuar con un daño máximo de 100 mM de H₂O₂ para una hora de tratamiento.

Por otra parte, si se toma la misma concentración de daño de 100 mM de peróxido, y se compara el efecto que tuvo esta misma concentración en la Figura 8 (A) y en la Figura 8 (B), se observa que el efecto en la funcionalidad mitocondrial fue mayor que en la viabilidad celular. En otras palabras, el mismo tratamiento provocó una disminución de aproximadamente un 40% de la viabilidad astrocitaria, mientras la disminución de funcionalidad mitocondrial fue de aproximadamente 60%, por lo que se sugiere que el efecto de H₂O₂ resulta en un daño mayor en funcionalidad mitocondrial que en viabilidad, lo que parece consistente con las evidencias que muestran que la disfunción mitocondrial es uno de los mecanismos que llevan a la muerte celular. Este mecanismo también ocurre en los astrocitos, aunque estas células tienen rutas alternativas para obtener energía, como la glucólisis y la ruta de las pentosas fosfato, por ejemplo. Estos resultados son concordantes con los de otros estudios realizados con peróxido en astrocitos provenientes de corteza de rata [69], en los que se utiliza la concentración de 100 mM de H₂O₂ como control positivo para daño oxidativo presentando una disminución en viabilidad celular y una disminución todavía más marcada en la funcionalidad mitocondrial. Otro factor a considerar es que el daño administrado en las Figuras 8 (A) y (B) tuvo una duración de una hora para simular un daño agudo en el SNC. Por esta razón es posible que, en este tiempo, el H₂O₂ es capaz de inducir un estrés oxidativo significativo llevando a una disminución de la funcionalidad mitocondrial como se observa en Figura 8 (B), sin que haya tiempo suficiente para activar las vías de muerte celular. Como perspectiva a futuro se podría probar a dañar los astrocitos corticales con concentraciones menores de H₂O₂ (en el orden de μ M en vez de mM) por un período mayor de tiempo, para observar si se mantiene esta tendencia, o más directamente, tratar los cultivos con H₂O₂ 100 mM durante una hora, retirar el estímulo cambiando el medio y determinar viabilidad a las 24 horas. Además, se podría agregar a los ensayos pocillos que actúen como blancos (con medio de cultivo y MTT sin células sembradas) y como control de muerte (con Tritón por ejemplo, para determinar el valor de absorbancia correspondiente a la muerte total de las células) para enriquecer el análisis.

7.1.2.2. Respuesta al estrés oxidativo mediado por H₂O₂ en co-exposición con azida de sodio

La disfunción mitocondrial es un mecanismo patológico reportado en el envejecimiento cerebral y en muchas enfermedades neurológicas, particularmente en la patogénesis de trastornos neurodegenerativos [30, 36, 37, 81]. La actividad disminuida del complejo IV o citocromo c oxidasa, que es el complejo final en la cadena de transporte de electrones, se ha detectado en los cerebros de pacientes con isquemia, epilepsia y enfermedades de Alzheimer y Huntington [81]. La disfunción del metabolismo energético mitocondrial reduce la producción de ATP, seguida por la generación de ROS, que pueden producir estrés oxidativo y dañar a los lípidos, proteínas e incluso al ADN. El buen funcionamiento mitocondrial también es esencial para algunas vías metabólicas como las de las purinas y pirimidinas, la homeostasis del calcio y la señalización de supervivencia y muerte. La azida de sodio (NaN₃) es un inhibidor rápido del complejo IV, inhibiendo la oxidación del citocromo c y por tanto la transferencia de sus electrones al oxígeno y la producción de energía [67]. La azida de sodio no solo induce la disfunción mitocondrial, sino que también afecta la homeostasis redox, provoca el aumento de las citoquinas proinflamatorias e interfiere en la capacidad de captar glutamato en los astrocitos [81], lo que es clave para la supervivencia neuronal y para la síntesis de glutatión.

Dado que la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo son mecanismos patológicos que coexisten en las enfermedades neurodegenerativas, se evaluó la respuesta de los astrocitos corticales de ratas neonatas macho y hembra a la co-exposición de H₂O₂ y NaN₃ empleando un paradigma de dieciocho horas de exposición a peróxido de hidrógeno y seis horas a azida de sodio, como se observa en la Figura 9.

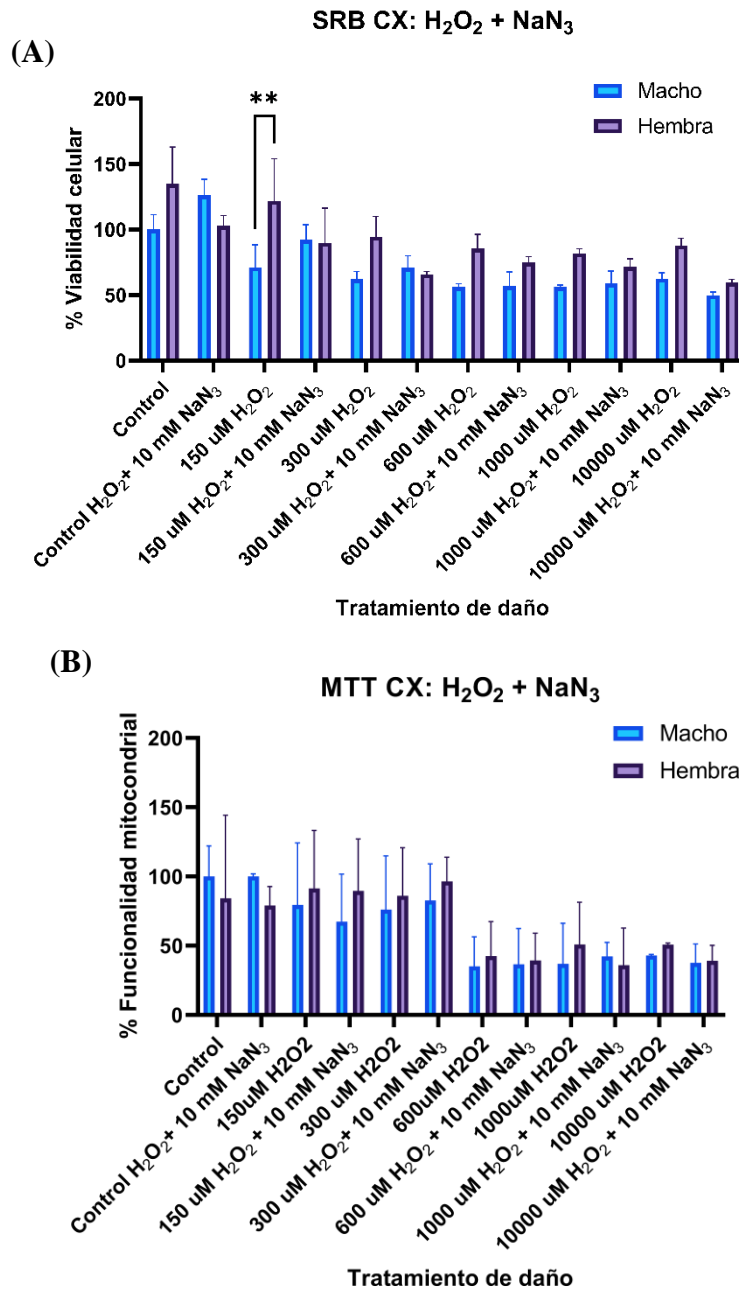


Figura 9. Viabilidad celular y funcionalidad mitocondrial en respuesta a H₂O₂ y NaN₃. (A) Cuantificación de la viabilidad celular mediante SRB. La gráfica muestra los valores de absorbancia a 510 nm (SRB) normalizados al valor del macho control. (B) Cuantificación de la funcionalidad mitocondrial ante H₂O₂ y NaN₃ evaluado por el ensayo de MTT. La gráfica muestra los valores de absorbancia a 570nm – 630 nm, normalizados al valor del macho control. Para cada condición de daño se presenta la media ± desviación estándar (n=4, 2 experimentos)

independientes) para astrocitos provenientes de ratas macho (azul) y ratas hembra (violeta). Los asteriscos indican significación estadística para $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****), respectivamente.

Como se observa en la Figura 9 (A), pese a la dispersión de los valores, la viabilidad astrocitaria presenta una tendencia de disminución al aumentar la concentración de peróxido (tal como ocurre en la Figura 8 (A)), y la tendencia a disminución de viabilidad es más pronunciada al complementar el daño oxidativo con azida de sodio, que actúa como toxina mitocondrial al inhibidor de la enzima citocromo c oxidasa (complejo IV) [67]. Otros estudios han usado NaN_3 en astrocitos observándose un efecto en la viabilidad a 5 mM durante tres horas [81], un daño menor que el utilizado en este trabajo en el que se empleó 10 mM durante seis horas. Por otra parte, la Figura 9 (B) confirma que a concentraciones de H_2O_2 mayores a 600 μM junto a NaN_3 , la funcionalidad mitocondrial disminuye más. De esta manera, se muestra que el estrés oxidativo inducido por el primero aumenta con la inhibición de la cadena de transporte de electrones efectuada por la azida, resultando en un desbalance donde los mecanismos antioxidantes celulares no son suficientes para controlar el daño, resultando en la disminución de viabilidad astrocitaria y la funcionalidad mitocondrial observada en las Figuras 9 (A) y (B).

Referente a las respuestas sexo-específicas, en la Figura 9 (A) se muestra que la viabilidad celular en hembras es mayor que en machos en condiciones control y en la mayoría de las condiciones de daño. El efecto global de respuesta al daño oxidativo junto a la toxina mitocondrial en hembras fue significativamente diferente (###, $p = 0,0001$ por Two way ANOVA) a la respuesta de los machos, con una respuesta sexo-específica incluso más pronunciada (**, $p = 0,000775$ por Multiple t test) ante el daño con 150 μM de peróxido sin azida, como se observa en Figura 9 (A). En la bibliografía disponible y aunque en la mayoría de los estudios sobre el daño en la funcionalidad mitocondrial se realizan solo en machos, en uno de los pocos estudios que analizaron las diferencias sexo-específicas se reportó que al tratar los cultivos primarios de astrocitos de machos y hembras con diferentes inhibidores de la citocromo c oxidasa (cobalto, cianuro y azida), los astrocitos de macho eran más vulnerables a la hipoxia química inducida por estos inhibidores que los astrocitos femeninos, y que existían diferencias específicas por sexo y región cerebral en la regulación de la citocromo c oxidasa [78].

El trabajo de Roemgens et al. (2011) [78] de astrocitos corticales, mostró que la apoptosis y la necrosis fueron más bajas en hembras tratadas con azida que en machos, lo que coincide con los niveles mayores de viabilidad celular de hembras mostrados en la Figura 9 (A) y confirman una diferencia sexo específica en la viabilidad astrocitaria (#, $p=0,0350$ para significación estadística por Two way ANOVA para la interacción de la respuesta al daño con el sexo de la muestra). Una posible explicación a esta respuesta sexo específica se puede encontrar en el mismo trabajo de Roemgens et al (2011) [78], quienes encontraron que en astrocitos corticales, el tratamiento con azida aumentó los niveles de transcripción de la isoforma 2 de la subunidad 4 de la citocromo c oxidasa (COX IV-2) en las hembras, pero no se observaron cambios en los machos [78]. Por lo tanto, las diferencias específicas por sexo en la regulación de la transcripción de la COX IV-2 en respuesta a la hipoxia química, es un posible mecanismo para compensar la función mitocondrial alterada en hembras, pero no en machos. Evaluar esta posibilidad es una perspectiva interesante, luego de aumentar el número de experimentos independientes para lograr datos menos dispersos.

Por otra parte, Korenic et al. (2014) [67] reportaron que el efecto de NaN_3 es transitorio y reversible 15 minutos después de quitar la azida. Además de considerar la vida media de la NaN_3 en cultivo (se estima que en sangre es de 2.5 horas aproximadamente [82], ese dato debe tenerse en cuenta a la hora de realizar nuestros experimentos, por lo que es posible que los efectos máximos de la exposición se produzcan a tiempos menores a las seis horas que empleamos.

Además, en la misma línea de análisis de la co-existencia de inductores de mecanismos patológicos que se reportan en las enfermedades neurodegenerativas, se estudió el efecto en la viabilidad de cultivos primarios de astrocitos de ratas neonatas WT macho y hembra ante tunicamicina, que es una inductora de estrés de retículo [68]. Se empleó tunicamicina $2 \mu\text{M}$ como único daño y en combinación con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (150, 300, 600, 1.000, $10.000 \mu\text{M}$ de H_2O_2) durante 24 horas para observar si el daño oxidativo del peróxido tenía un efecto acumulativo con el estrés de retículo inducido por la tunicamicina. Los resultados obtenidos muestran que no hubo diferencia significativa en la viabilidad astrocitaria en comparación con el control sin daño en ninguno de los sexos (Two way ANOVA ni Multiple t tests), por lo que se decidió no continuar con la línea de investigación de estrés de retículo como mecanismo sexo-específico.

7.1.2.3. Respuesta al estrés oxidativo inducido por galactosa

Considerando los resultados obtenidos en cuanto a diferencias sexo-específicas, se resolvió expandir el paradigma de respuesta al daño oxidativo incluyendo el uso de D-galactosa como inductor de estrés oxidativo de manera más gradual que el H₂O₂ [55].

En cuanto a mecanismos de daño, altas concentraciones de D-galactosa pueden ser oxidadas produciendo H₂O₂ y pueden iniciar reacciones de glicación formando productos finales de glicación avanzada (*AGEs* en inglés), que pueden reaccionar sus receptores (*RAGEs* en inglés) que activan otras oxidasas y potencian el estrés oxidativo por aumento de especies pro-oxidantes y disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes [83]

Además, se buscó explorar si la acumulación de daño durante períodos de tiempo mayores a 1 hora tiene un efecto significativo en la viabilidad celular, por lo que se tomó un tiempo de 24 horas de incubación con galactosa. Como el daño con galactosa en astrocitos está poco reportado en la literatura, y los estudios disponibles usan casi exclusivamente el modelo macho únicamente, se realizó una puesta a punto de concentraciones necesarias para afectar la viabilidad astrocitaria en hembras.

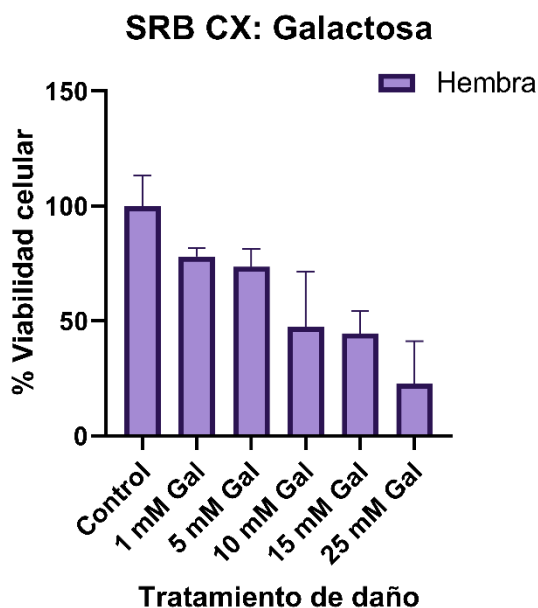


Figura 10. Efectos de la galactosa en la viabilidad de astrocitos corticales de hembra en cultivo. Los resultados fueron obtenidos empleando el ensayo de SRB con los datos normalizados

al 100% de la hembra control. Los datos muestran una tendencia a la disminución en la sobrevivencia. Para cada condición de daño se presenta la media \pm desviación estándar (n=8, 2 experimentos independientes).

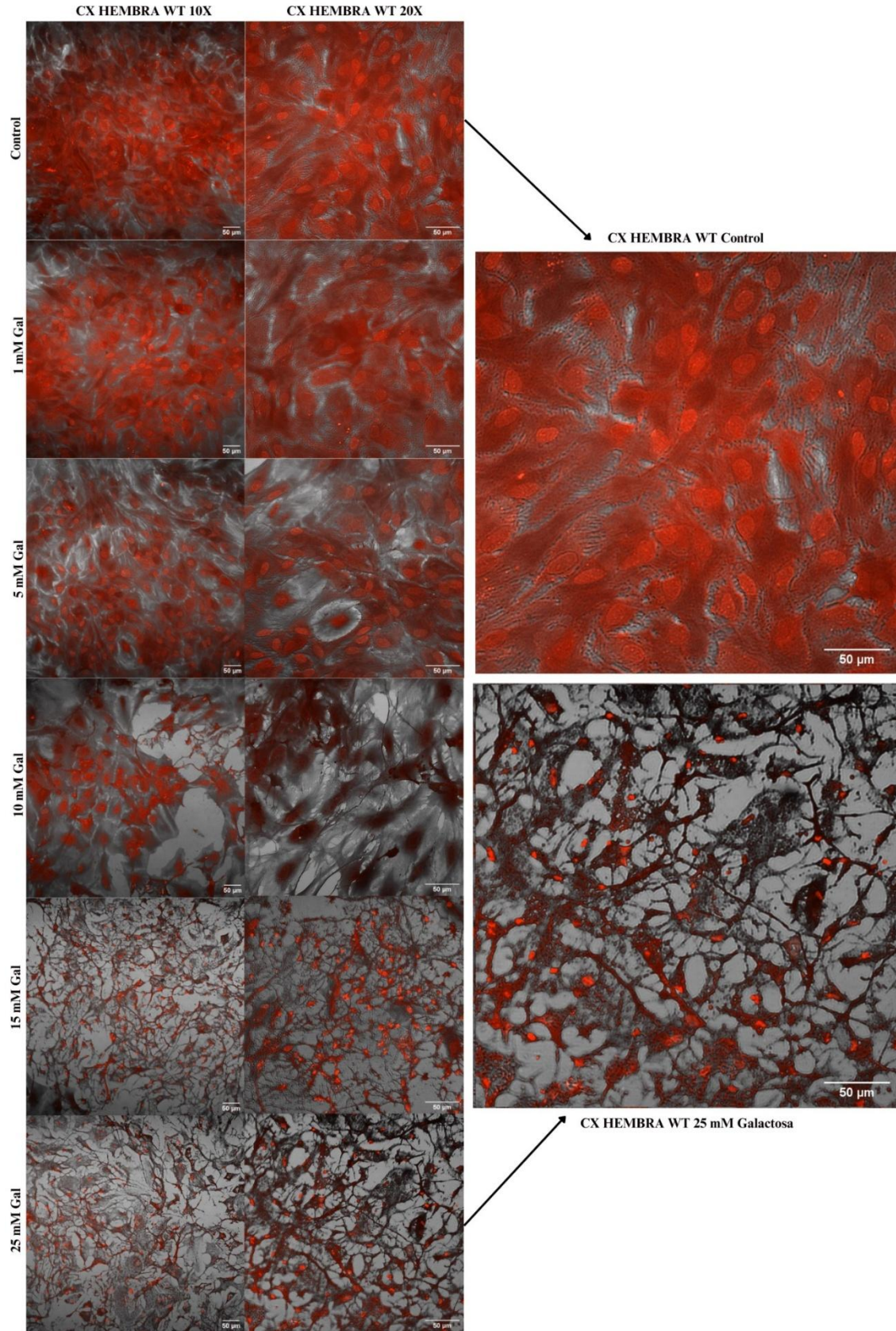


Figura 11. Viabilidad y morfología de astrocitos corticales de ratas hembra neonatas WT en condiciones control y ante diferentes concentraciones de galactosa. Las imágenes tomadas por microscopía confocal muestran la fluorescencia de SRB en el espectro del rojo lejano, superpuestas con imágenes de luz transmitida (ESID) para una mejor visualización de la morfología astrocitaria, tomando 10 campos de cada tratamiento. Las imágenes a la derecha son magnificaciones de la situación control y 25 mM galactosa, evidenciando la marca de la SRB más alta en el núcleo y la emisión de procesos celulares coincidentes con la retracción del soma y la pérdida del dominio celular observado en el control y a bajas concentraciones, indicando daño severo.

En las Figuras 10 y 11 se puede observar que a medida que aumenta la concentración de daño con galactosa, disminuye la viabilidad astrocitaria en hembras (###, $p=0.0007$ mediante One Sample t test). Estos resultados son concordantes con los reportes muestran que la administración de galactosa en roedores resulta en apoptosis y neurodegeneración, además de eventualmente deterioro cognitivo y motor [84]. El mecanismo involucrado podría ser la inducción de daño oxidativo mediante la acumulación de ROS y productos de glicación avanzada (AGEs) [85, 86]. La inyección crónica de galactosa en roedores se usa como modelo de envejecimiento acelerado [85], ya que induce neurotoxicidad y causa un aumento de los radicales libres [58], y disminuye la actividad de las enzimas SOD [87] y glutatión peroxidasa [88].

El daño con galactosa no solamente se observa en la viabilidad, sino también en la morfología astrocitaria, como se observa en la Figura 11. En cultivo y en condiciones control, los astrocitos presentan una morfología caracterizada por la ausencia de procesos celulares importantes y una forma poliédrica con un núcleo definido que se evidencia en la imagen aumentada del control. En las imágenes puede observarse como la SRB marcó el núcleo con la intensidad mayor y el cuerpo celular con una tinción más clara. En esta condición, tanto la SRB como el campo claro permite ver que las células están en contacto, que mantienen sus dominios separados a excepción de múltiples procesos finos que aparecen como microtubos que comunican las células. Los astrocitos de esta Figura 11 provienen de corteza, por lo que son del subtipo protoplasmático, con un soma definido y un crecimiento en monocapa no solapado como se observa [89]. En cuanto al tratamiento con galactosa, a concentraciones de 1 y 5 mM se observa que los astrocitos están respondiendo al daño, pero mantienen sus dominios sin solapamiento, lo que podría describirse

como astrogliosis no proliferativa [29]. A medida que aumenta la concentración de galactosa a 10 mM aumenta el daño, el soma de los astrocitos presenta una notoria hipertrofia sin emisión significativa de procesos celulares, lo que podría indicar alteraciones en la osmolaridad de las células produciendo estrés osmótico tal como ha sido reportado en concentraciones elevadas de galactosa [90]. Sin embargo, a concentraciones mayores como 15 y 25 mM se observa una retracción drástica del cuerpo celular y la emisión significativa de procesos celulares prominentes que se entrecruzan entre sí, solapándose los distintos dominios celulares. Este nivel de retracción de procesos es la evidencia morfológica de la astrogliosis severa ante un daño [6, 24, 29]. Adicionalmente, para 15 y 25 mM de galactosa, los astrocitos muestran núcleos pequeños de forma irregular y son fuertemente marcados con SRB lo que implica reordenamiento de las proteínas nucleares y del núcleo, todo lo cual es consistente con un daño severo [29].

Para determinar si esta repercusión en la morfología observada en astrocitos corticales de ratas hembra presenta una tendencia sexo-específica comparando machos con hembras, se tomaron imágenes por fluorescencia de SRB para todas las condiciones analizadas, las que se muestran en la Figura 12.

CX MACHO WT

CX HEMBRA WT

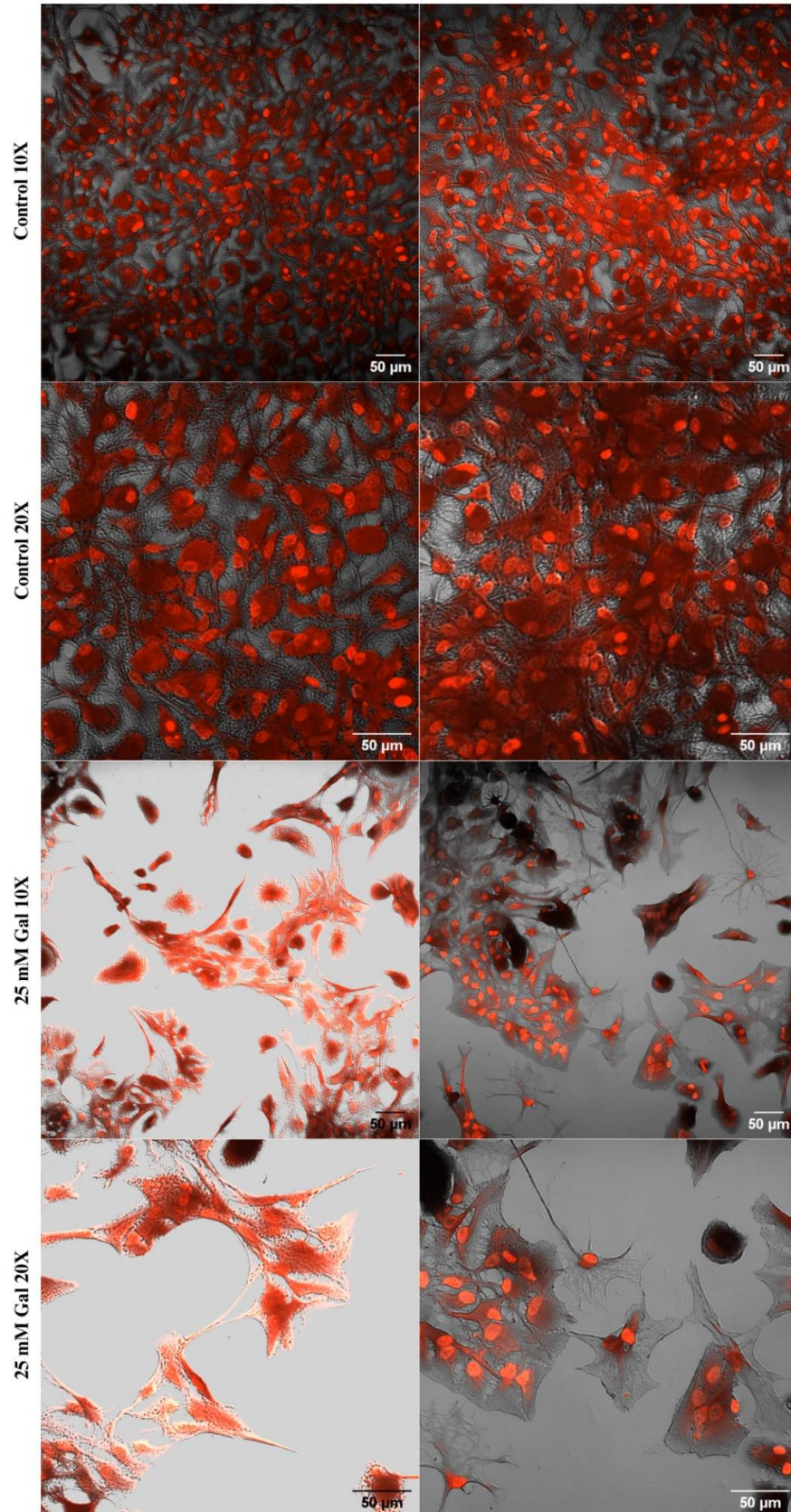


Figura 12. Viabilidad astrocitaria y morfología de astrocitos corticales (CX) de ratas neonatas WT control y ante diferentes concentraciones de Galactosa. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal Zeiss 800 con la fluorescencia de SRB en el espectro del rojo lejano e imágenes de claro para mostrar la apariencia general del cultivo. Se tomaron 10 campos de cada tratamiento y las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes. Las imágenes inferiores son magnificaciones de las mostradas para 25 mM de galactosa y permiten ver una disminución del número de células adheridas y en los cultivos de células de hembras, una mayor frecuencia de células con cambios morfológicos evidentes. En cambio, en las células de machos, la disminución del número de células es el efecto principal.

En cuanto a la morfología, en la Figura 12 se puede observar que la galactosa en astrocitos de ratas hembras provocó la clara retracción de los procesos celulares núcleos de forma irregular, y una menor interacción con los astrocitos cercanos. Sin embargo, los cambios en la reactividad fueron menores que los observados en la Figura 11, probablemente debido a la heterogeneidad de los cultivos. Estudios como el de Shen et al. (2014) [91] han descrito un efecto morfológico similar de la galactosa en los astrocitos, pero el tratamiento fue mediante inyecciones directas a la corteza durante una semana con 55 mM de galactosa, mientras que este estudio se realizó con concentraciones menores (5, 10, 15, 25 mM) y con una duración menor (24 horas), indicando que, al menos en astrocitos en cultivo, los cambios morfológicos inducidos por la exposición con galactosa surgen de manera más temprana a lo estudiado.

Como se puede observar, las imágenes de la Figura 12 sugieren que existe una tendencia que la disminución de viabilidad de astrocitos es mayor en macho que en hembras, acorde a los datos graficados en las figuras 8 (A) y 9 (A). Estos hallazgos deben ser validados en un futuro incluyendo otros factores como la edad, ya que en estos ensayos se trabajó con ratas neonatas, y en los estudios más similares a este, los tratamientos de daño con galactosa fueron mediante inyecciones directas al animal, encontrándose que el patrón de vulnerabilidad indica que el estrés oxidativo inducido por galactosa puede estar asociado también con una disminución de la función antioxidante con la edad además del sexo [92]. En este sentido, los datos de Hao et al. (2014) [92] sugieren que el cerebro femenino adulto es más sensible al daño oxidativo inducido por galactosa que el cerebro femenino adolescente [92], pero en las edades estudiadas las hembras fueron más resistentes que

los machos al estrés oxidativo. Una posible explicación a lo observado en las Figuras 8 y 12 es que las hormonas ováricas endógenas pueden contribuir a la resistencia de las hembras al daño oxidativo, ya que existen numerosas evidencias de que estas hormonas, especialmente el estrógeno, tienen capacidades antioxidantes distintivas [92].

En cuanto a los cambios morfológicos observados en los astrocitos corticales de hembra frente a galactosa, el análisis realizado podría enriquecerse con otras técnicas de análisis morfológico incluyendo la microscopía de barrido para analizar los cultivos a nivel ultraestructural para observar posibles cambios a nivel de organelos celulares. Por otra parte, sería interesante analizar los efectos de astrocitos de animales machos y hembras tratados con galactosa ya que Lei et al. (2008) [93] reportan que en ratas tratadas con galactosa, los astrocitos muestran signos de degeneración, especialmente en las áreas sinápticas y de los vasos cerebrales, con una reducción de los gránulos de glucógeno, retracción de la membrana nuclear, hinchazón mitocondrial y reducción en el número de mitocondrias [91]. La comparación a nivel ultraestructural podría aclarar los compartimentos celulares afectados de manera diferencial por sexo.

Por otra parte, considerando el efecto de la galactosa sobre la viabilidad de los astrocitos, se decidió continuar con un paradigma de exposición a 5 y 10 mM de galactosa durante 24 horas para inducir un daño oxidativo considerable sin llegar a una muerte masiva en el cultivo de astrocitos de machos y de hembras, y explorar si los efectos sobre la funcionalidad mitocondrial son sexo-específicos. Los resultados son presentados en la Figura 13.

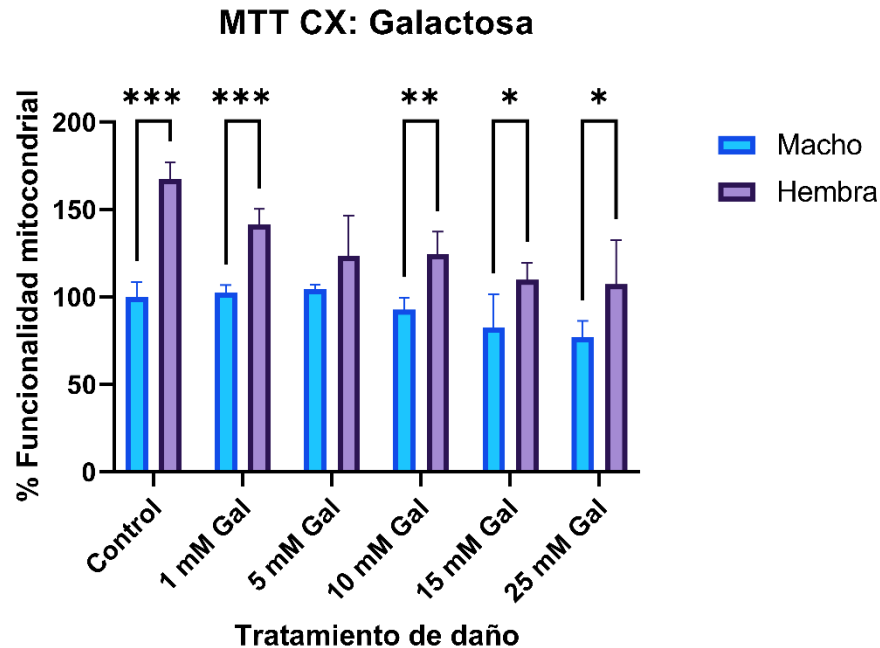


Figura 13. Efectos de la galactosa en la funcionalidad mitocondrial de astrocitos cultivados de cortezas de machos y de hembras. La cuantificación de funcionalidad mitocondrial de astrocitos corticales ante tratamientos de daño inducido por galactosa fue evaluada por el ensayo de MTT. La gráfica muestra los valores de absorbancia a 570 nm – 630 nm, normalizados tomando el valor de absorbancia del macho control como 100%, en función de la concentración de galactosa administrada. Para cada condición de daño se presenta la media \pm desviación estándar (n=4, 2 experimentos independientes) para astrocitos provenientes de ratas macho (azul) y ratas hembra (violeta). Los asteriscos indican significación estadística para $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****), respectivamente.

La Figura 13 muestra que el tratamiento con galactosa presenta una tendencia de disminución de funcionalidad mitocondrial en machos y hembras (####, $p = < 0.0001$ mediante Two way ANOVA y Multiple t tests). En concentraciones normales, la galactosa se metaboliza en glucosa por la d-galactoquinasa y la galactosa-1-fosfato uridiltransferasa [85], por lo que parece no causar daño (el valor de funcionalidad se mantiene cercano al 100%), al menos con las herramientas de análisis que empleamos, como se puede observar en el macho en condiciones control, a 1 mM y 5 mM de

galactosa. Sin embargo, la sobredosis de galactosa más allá de la capacidad de metabolización de esas dos enzimas (lo que parece ser concentraciones de 10 mM o mayores) permite que la aldosa reductasa catalice la galactosa acumulada en galactitol, el que no se puede metabolizar y se acumula en las células, lo que genera estrés osmótico y ROS en niveles altos [85]. La galactosa también se puede convertir en H₂O₂ [58] lo que también resulta en aumento de ROS. Parte de las respuestas obtenidas en presencia de galactosa pueden deberse al área desde donde provienen los astrocitos, ya que la corteza es un área con alta sensibilidad al estrés oxidativo [85]. Por esta razón, sería bueno analizar los efectos de este compuesto en astrocitos de otras regiones del SNC. También es importante tener en cuenta, que la galactosa acumulada en los tejidos animales puede reaccionar con grupos amino libres de proteínas y péptidos para formar productos finales de glicación avanzada que desencadenan respuestas inflamatorias que son importantes en el inicio y progresión de las enfermedades neurodegenerativas [83, 85, 86]. Tanto en cultivos como en animales, también sería bueno estudiar si la galactosa facilita el cambio de los astrocitos hacia astrocitos senescentes presenten una disminución en la actividad del metabolismo mitocondrial y una reducción del potencial de membrana mitocondrial [91].

En cuanto a las diferencias sexo-específicas, la Figura 13 muestra que la funcionalidad mitocondrial global de hembra es significativamente mayor a la del macho en condiciones basales (####, $p < 0.0001$ mediante Two way ANOVA), y la interacción entre el factor de daño con el factor de sexo es significativa (#, $p = 0,0203$ mediante Two way ANOVA). Estos resultados sugieren que, en condiciones basales, la funcionalidad mitocondrial podría ser una variable sexo-específica, ya que otras variables como el genotipo y la densidad celular al momento de la siembra fue la misma para ambos sexos. Para confirmar estos resultados preliminares y profundizar en los mismos, además de aumentar el número de experimentos es necesario emplear otras técnicas más específicas como la respirometría y el empleo de inhibidores específicos de cada complejo mitocondrial.

No hemos encontrado reportes publicados que analicen los efectos de la galactosa en astrocitos en cultivo para analizar las posibles respuestas sexo-específicas. Sin embargo, Xu et al. (2021) [94], usaron D-galactosa en astrocitos obtenidos de un modelo animal de enfermedad de Alzheimer y demostraron que la D-galactosa es inductor de senescencia a través de la vía de la kinasa 6 dependiente de ciclina. Como la Enfermedad de Alzheimer afecta diferente a pacientes hombres y

mujeres, podría estudiarse si esta vía está involucrada en los resultados que se obtuvieron en esta tesis. En línea con los resultados de Xu et al. (2021) [94], los estudios que realizaron el tratamiento de daño con galactosa mediante inyecciones al animal durante semanas [85, 92, 95, 96], encontraron que este compuesto está asociado a reactividad glial y a la inducción de senescencia celular, lo que podría analizarse en estudios futuros.

7.1.2.4. Respuesta al estrés oxidativo inducido por galactosa en co-exposición con H₂O₂

Dada la multiplicidad de mecanismos patológicos simultáneos en las enfermedades neurodegenerativas, se estudió si el daño oxidativo inducido por galactosa es acumulativo con el daño producido por peróxido, y si el daño simultáneo resulta en una respuesta diferencial por sexo. Los resultados son presentados en la Figura 14.

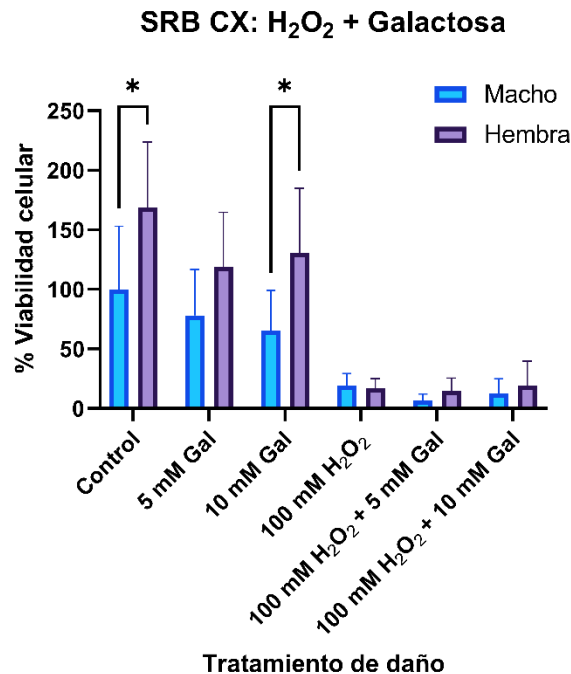


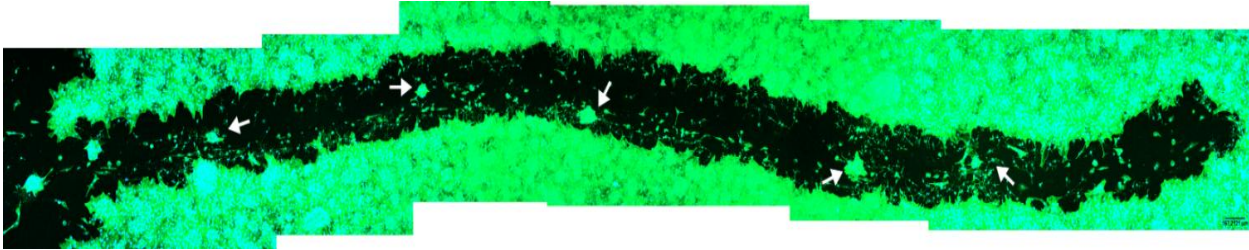
Figura 14. Cuantificación de la viabilidad de astrocitos corticales de ratas neonata ante la exposición a galactosa y 100 mM H₂O₂ evaluada por el ensayo de SRB. La gráfica muestra los valores de absorbancia a 510 nm normalizados al valor de absorbancia de macho control como 100% y en función de la concentración de galactosa administrada. Para cada condición de daño se presenta la media \pm desviación estándar (n=8, 3 experimentos independientes). Los asteriscos indican significación estadística para p<0.05 (*), p<0.01 (**), p<0.001 (***) y p<0.0001 (****), respectivamente.

En primer lugar, la Figura 14 confirma lo previamente descrito sobre que la exposición a estrés oxidativo mediante peróxido (Figuras 8) y galactosa (Figura 10) induce a la disminución de viabilidad de astrocitos corticales (####, p= <0.0001 mediante Two way ANOVA). También se puede observar que aunque el daño con galactosa tiene una leve tendencia a afectar la viabilidad en machos y hembras, el peróxido por sí solo a 100 mM resulta en una disminución de viabilidad drásticamente mayor (##, p= 0,0065 en machos; ###, p= 0,0002 en hembras), así como el daño simultáneo de peróxido con galactosa. Esto se puede explicar porque que el peróxido induce directamente el daño oxidativo, mientras que la galactosa es un proceso más gradual [55] que puede requerir un mayor tiempo de exposición para alcanzar el mismo nivel de daño que el peróxido. Adicionalmente se observa una tendencia a una menor viabilidad astrocitaria en machos (comparado con viabilidad de hembras) en condiciones control y en todas las concentraciones de daño ya sea solo peróxido, solo galactosa, o el daño simultáneo. Aunque el efecto en hembra es significativamente diferente del efecto global en macho (##, p= 0,0034 mediante Two way ANOVA), se observa que para el control y 10 mM de galactosa (*, p= <0.05) la viabilidad es menor en corteza de las células de corteza macho que en las de hembra, concordante a los datos graficados en Figura 8 y 9.

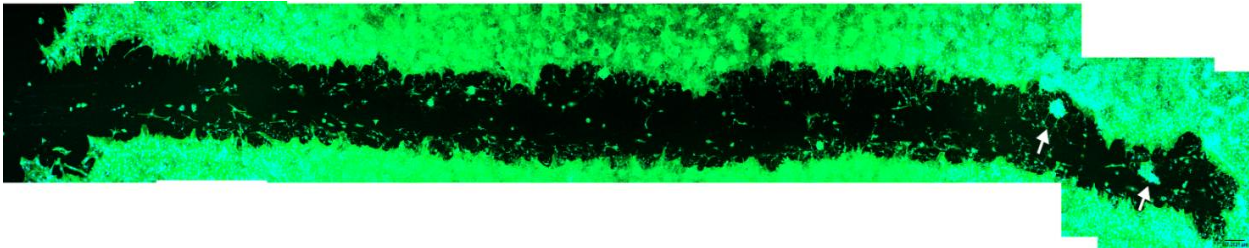
7.1.2.5. Evaluación de respuesta al daño mecánico “scratch” en cultivos astrocitarios de corteza WT

Para completar el paradigma de respuesta al daño de astrocitos corticales, se realizó el ensayo de “scratch” en los cultivos para simular una lesión mecánica en la corteza, y evaluar la respuesta astrocitaria. Está reportado que la proliferación astrocitaria contribuye a la formación de la cicatriz glial después de una lesión [3, 28] y está relacionado a la reactividad astrogliar. Considerando que los astrocitos de machos y hembras muestran respuestas reactivas divergentes ante diversos insultos patológicos, se analizó la capacidad proliferativa o migratoria astrocitaria ante una lesión mecánica en condiciones control y de daño oxidativo inducido por 10 mM de galactosa. Se pueden observar la diferencia en respuesta a gran escala en las imágenes tomadas del scratch en cada condición de sexo y daño mostradas en la Figura 15. La cuantificación de esta respuesta fue parametrizada y los resultados se pueden observar en la Figura 16.

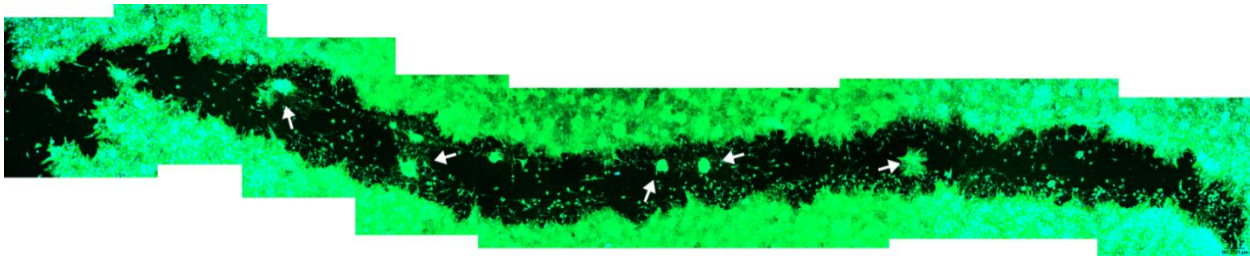
(A) CX Macho WT: control



(B) CX Macho WT: 10 mM galactosa



(C) CX Hembra WT: control



(D) CX Hembra WT: 10 mM galactosa

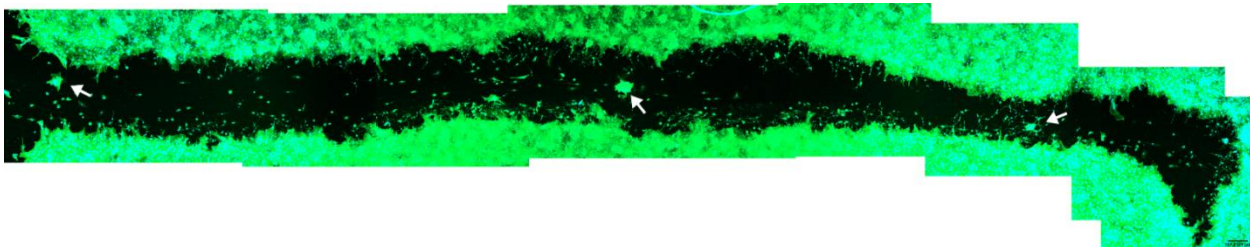


Figura 15. Ensayo de scratch en astrocitos corticales de macho y hembra WT en condiciones control y de daño oxidativo inducido por 10 mM de galactosa. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal (Zeiss 800) con la fluorescencia de Faloidina-488 para analizar el citoesqueleto de actina fibrilar, y DAPI para reconocer núcleos. Se tomaron 10 campos de cada tratamiento para obtener la imagen completa de cada scratch. Las imágenes mostradas son

representativas de 3 experimentos independientes. Las flechas blancas indican acúmulos de astrocitos que migraron o proliferaron hacia la lesión. (A) Ensayo de scratch en astrocitos corticales de macho WT en condiciones control y (B) en condiciones de estrés oxidativo inducido por 10 mM de galactosa. (C) Ensayo de scratch en astrocitos corticales de hembra WT en condiciones control y (D) en condiciones de estrés oxidativo inducido por 10 mM de galactosa.

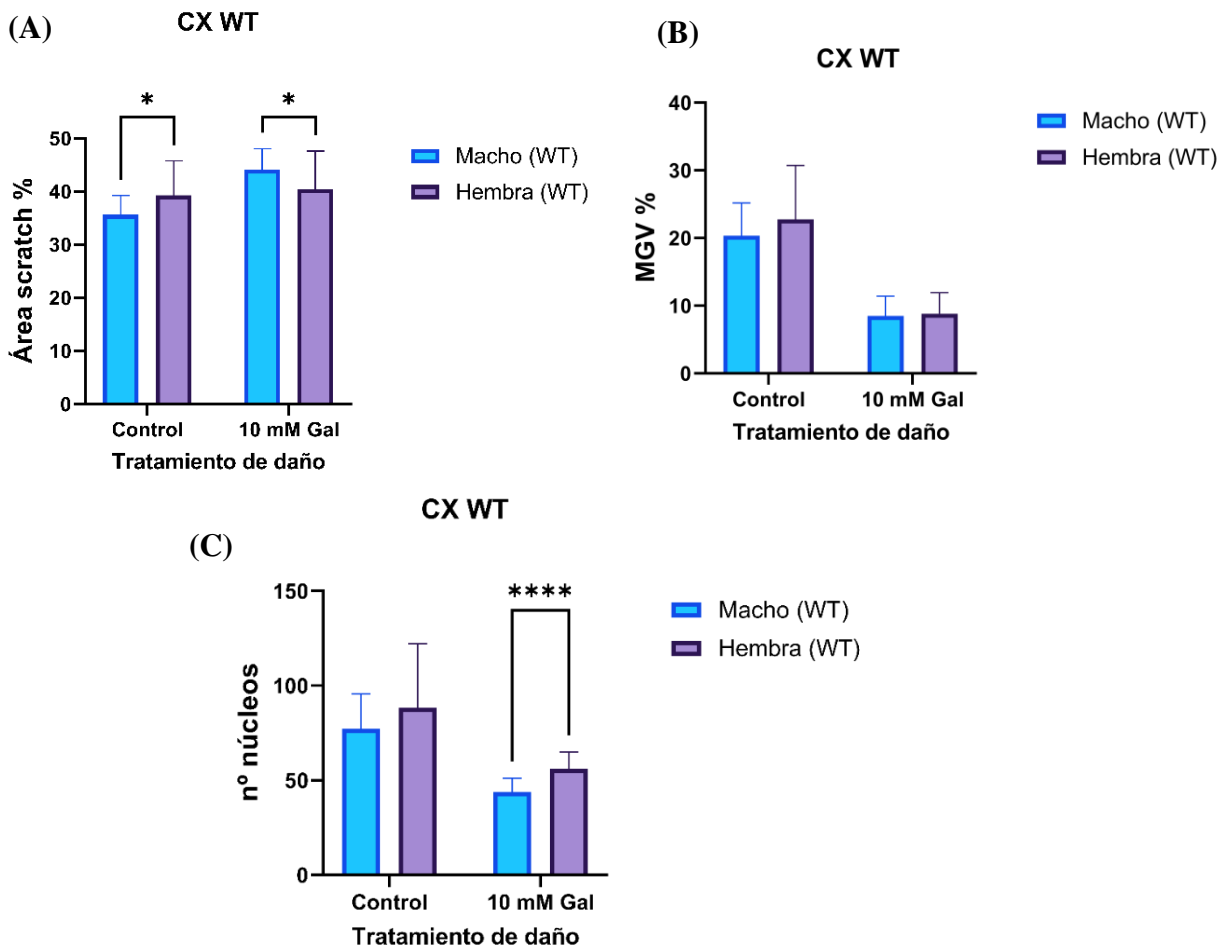


Figura 16. Evaluación de la respuesta al daño mecánico “scratch” en cultivos astrocitarios de corteza WT de ratas neonatas. (A) Cuantificación del área de scratch libre de células luego de la lesión, medida por ImageJ FIJI. (B) Cuantificación de la intensidad de la fluorescencia (*mean gray value* (MGV) como porcentaje de la fluorescencia del área con células) luego de la lesión. Este parámetro fue calculado tomando 3 campos para cada sección del scratch en cada condición de daño para evaluar estado celular por señal de Faloidina-488 y DAPI, medida por ImageJ FIJI. (C) Cuantificación del número de núcleos marcados por DAPI que indican migración o

proliferación astrocitaria hacia la lesión, medido por ImageJ. Para cada condición de daño se presenta la media \pm desviación estándar (n=10, 3 experimentos independientes) para astrocitos provenientes de ratas macho (azul) y ratas hembra (violeta). Los asteriscos indican significación estadística para $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****), respectivamente.

Como se observa en las Figuras 15 y 16, los resultados obtenidos en la evaluación de la respuesta astrocitaria al daño mecánico mediante el ensayo de scratch evidencian una tendencia de diferencia sexual en la capacidad de migración y proliferación de astrocitos bajo condiciones control y de estrés oxidativo inducido por 10 mM de galactosa. En condiciones control, el área de scratch libre de células fue menor en cultivos de astrocitos de machos (Figura 16 (A)), lo que sugiere una mayor proliferación o migración de estas células en ausencia de estrés. Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo, el fenómeno se invirtió, observándose una menor área de scratch en cultivos de astrocitos de hembras (Figura 16 (A)), indicando una mayor capacidad de migración o proliferación en respuesta al daño oxidativo. Como se observa en la Figura 16 (B), dado que el porcentaje de MGv de Faloidina-488 y DAPI fue similar entre ambos sexos en condiciones control y bajo estrés oxidativo como se observa en la Figura 17, se puede descartar que estas diferencias en el cierre del scratch se deban a diferencias en el citoesqueleto de actina de los astrocitos.

Por otra parte, la Figura 16 (C) indica que en condiciones control, el conteo de núcleos de astrocitos que migraron o proliferaron hacia la zona de lesión no es significativamente diferente entre machos y hembras, como también se puede observar comparando las Figuras 15 (A) y (C). Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo inducido por 10 mM de galactosa, las hembras presentaron un mayor número de núcleos en la zona lesionada, lo que refuerza la hipótesis de que en situaciones de daño oxidativo los astrocitos de hembras tienen una mayor capacidad proliferativa o migratoria para favorecer la reparación tisular. Además, comparando la condición control con la condición de daño en la Figura 16 (C), se puede observar una tendencia a que la galactosa afecte la cicatrización astrocitaria, lo que se ve reflejado en una disminución en el conteo de núcleos de astrocitos que migraron o proliferaron en condiciones de daño para ambos sexos, como se observa en la Figura 17. Estos hallazgos pueden estar relacionados con diferencias en la expresión de factores moleculares que regulan la respuesta glial al daño. La proliferación astrocitaria contribuye a la formación de la cicatriz glial ante lesiones mecánicas [3, 28], la cual puede dificultar la regeneración axonal. Estudios previos han demostrado que la inhibición de la astrogliosis puede

favorecer la regeneración neuronal al evitar tanto la barrera física como la acumulación de moléculas inhibitorias en la matriz extracelular [97, 98]. Las diferencias observadas entre machos y hembras en la respuesta al daño oxidativo podrían estar mediadas por la acción del estradiol. Se ha reportado que tras una lesión cerebral, los astrocitos pueden expresar aromatasa, lo que sugiere un mecanismo neuroprotector mediante la síntesis local de estradiol [97, 98]. El estradiol posee propiedades antioxidantes [97, 98], y aunque en estudios in vitro se requieren concentraciones mayores a las normales para evidenciar su efecto neuroprotector [97, 98], in vivo su activación local tras una lesión podría generar concentraciones suficientes para modular la respuesta astrocitaria.

Como perspectiva a futuro se debe considerar tomar las imágenes del scratch y cuantificar el área libre inmediatamente después de hacer el scratch, para poder comparar con los datos actuales que corresponden a la situación luego de 24 h de daño con galactosa o sin daño en condiciones control.

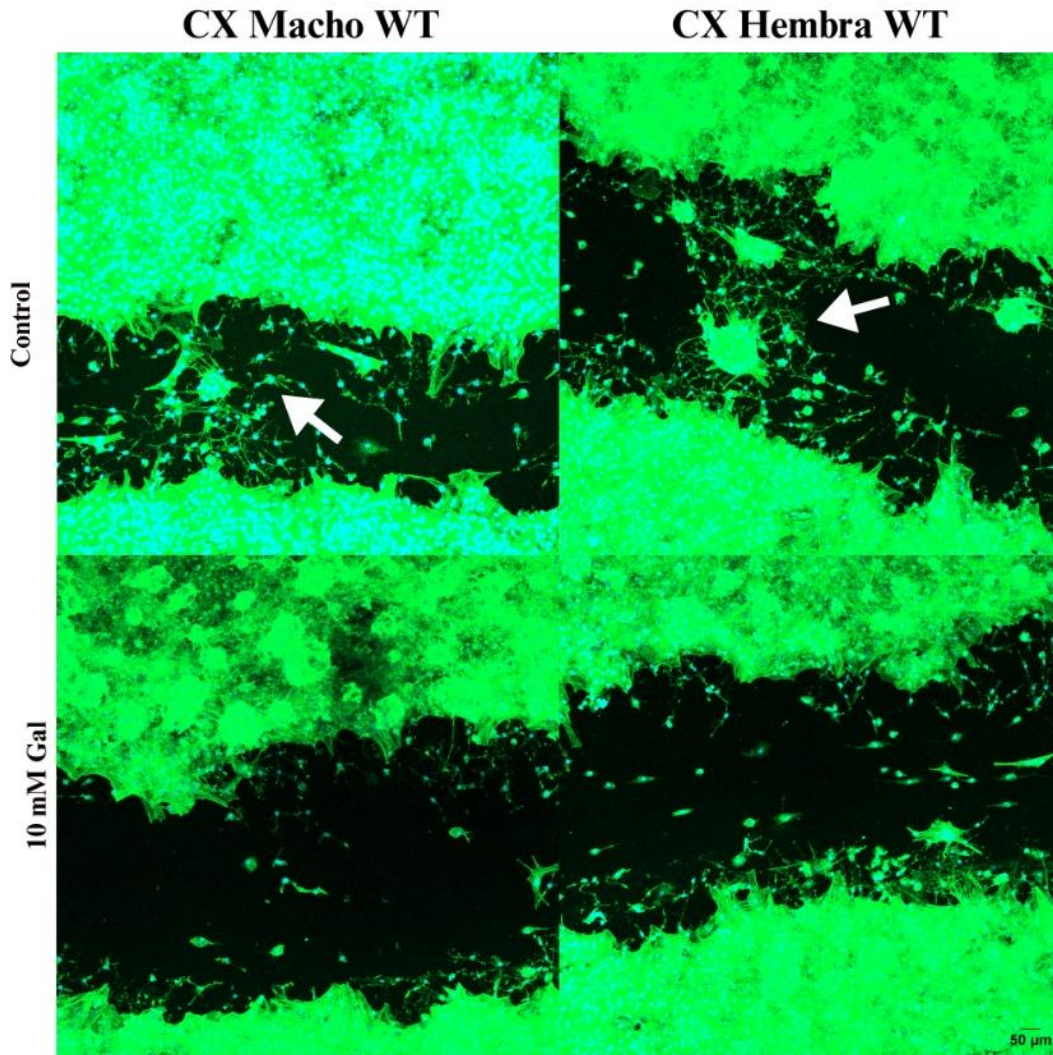


Figura 17. Ensayo de scratch en astrocitos corticales de macho y hembra WT en condiciones control y de daño oxidativo inducido por 10 mM de galactosa. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal Zeiss 800 y muestran la fluorescencia de la Faloidina conjugada a Alexa-488 para analizar el citoesqueleto de actina fibrilar y DAPI para reconocer los núcleos. Se tomaron 10 campos de cada tratamiento para obtener la imagen completa de cada scratch, y las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes. Las flechas blancas indican acúmulos de astrocitos que migraron o proliferaron hacia la lesión.

7.2. Optimización de cultivos primarios de astrocitos de médula espinal de ratas WT y SOD1G93A neonatas, machos y hembras, en condiciones basales y evaluación de su respuesta a distintos estresores, para identificación de posibles respuestas sexo-específicas

Por el momento, los desórdenes asociados al SNC no tienen una cura a nivel de su fisiopatología, por lo que los tratamientos son basados en los síntomas de estas enfermedades, lo que refleja la complejidad del cerebro humano y la médula espinal por un lado y por otro, la falta de conocimiento de los mecanismos patológicos responsables de los desórdenes asociados del SNC, [29].

Los astrocitos son los responsables del mantenimiento de la homeostasis y la defensa del SNC y frente a desórdenes del sistema, sufren cambios a nivel fisiopatológicos que pueden resultar en la pérdida de funciones protectoras o ganancia de funciones tróficas, cambios a niveles de estructura y de expresión molecular. Los distintos fenotipos adoptados por los astrocitos en respuesta al daño son contexto-específicos y pueden variar con el tipo de desorden, el nivel de avance de la enfermedad, la presencia de comorbilidades, la edad y el sexo [29].

El SNC es compuesto por el cerebro y la médula espinal, siendo la última la continuación del cerebro protegida por la columna vertebral. La médula espinal se conecta con nervios periféricos, enviándoles señales utilizadas para el control de músculo y órganos. Por ende, es crucial su relación estrecha con las motoneuronas, [1]. En enfermedades neurodegenerativas, como lo es la ELA, se da una muerte progresiva de las motoneuronas, donde se presentan glías defectivas que juegan un rol fundamental en estas enfermedades [71].

7.2.1. Optimización y caracterización de los cultivos de astrocitos espinales WT

Por estas razones resulta interesante estudiar la respuesta sexo-específica en los astrocitos provenientes de la médula espinal. Con este propósito, se optimizó y caracterizó los cultivos primarios de astrocitos de médula espinal de ratas neonatas WT y SOD1G93A (machos y

hembras), de manera estandarizada y reproducible, para evaluar la existencia de diferencias sexo-específicas en condiciones basales. Además, se analizaron en los cultivos primarios espinales, los paradigmas de tratamiento de daño determinados previamente en astrocitos corticales para evaluar la posible existencia de una respuesta sexo-específica.

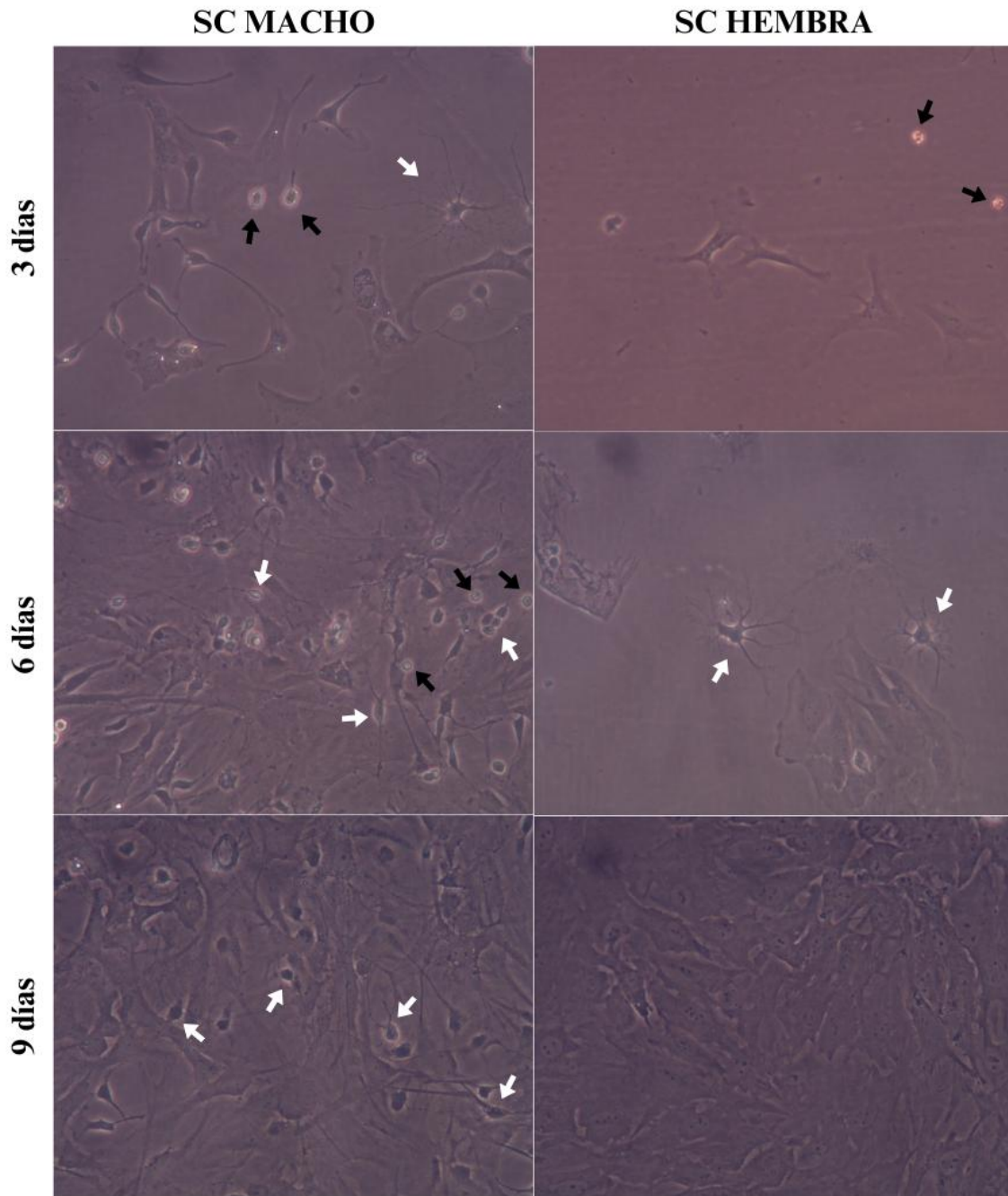


Figura 18. Imágenes de cultivos primarios de astrocitos procedentes de la médula espinal de ratas neonatas WT (macho y hembra), a los 3, 6 y 9 días de crecimiento. Las imágenes de campo claro fueron captadas por una cámara monocolor asociada a un microscopio óptico Olympus invertido empleando el programa Pixelink y el uso del objetivo 20x. Las flechas negras muestran células con apariencia de microglía, mientras que las flechas blancas señalan a las células

que tienen la morfología de oligodendrocitos. Los astrocitos aparecen como células mucho más delgadas en forma de monocapa inferior.

La evaluación del crecimiento de los cultivos de astrocitos de médula espinal de machos y de hembras presentaron un crecimiento heterogéneo, a diferencia de lo reportado por Roemgens et al. (2011) [78] para los cultivos procedentes de corteza y de los resultados obtenidos en el objetivo 1 de esta tesis. La Figura 18 muestra que las células de machos presentaron un crecimiento inicial más rápido que las hembras hasta el día 3 de cultivo. Sin embargo, a medida que los días de cultivo pasaron, las hembras parecen tener un gran crecimiento, llegando a confluencia al mismo tiempo que los machos. Por lo tanto, se presenta un crecimiento gradual y más homogéneo en los machos, aproximadamente al día 9.

Adicionalmente, se observa como los cultivos de astrocitos de macho presentan mayor heterogeneidad en el tipo de células presentes, en comparación con las células de las hembras, donde los astrocitos son claramente el fenotipo predominante. Es así que la Figura 18 muestra como los cultivos de machos presentan mayor cantidad de microglía (señalizado por flechas negras) y de oligodendrocitos (señalizado por flechas blancas), identificando a la microglía por su morfología pequeña y redondeada, mientras que los oligodendrocitos se observan como células de cuerpo pequeño con pocos procesos [4]. Sin embargo, ambos cultivos luego de ser agitados, presentan una morfología astrocitaria predominante, tal como se ha reportado en la literatura [78].

Las imágenes de luz (Figura 18) también muestran que la morfología presente en los astrocitos de médula espinal en cultivo, difiere de los astrocitos procedentes de la corteza observados en Figura 7. Los astrocitos de médula espinal poseen cuerpos celulares más reducidos, con ramificaciones más estrechas y alargadas, en lugar de la forma más o menos regular y poliédrica de los astrocitos corticales [31, 89].

7.2.2. Análisis de la respuesta sexo-específica de astrocitos espinales WT frente a distintos estímulos de daño

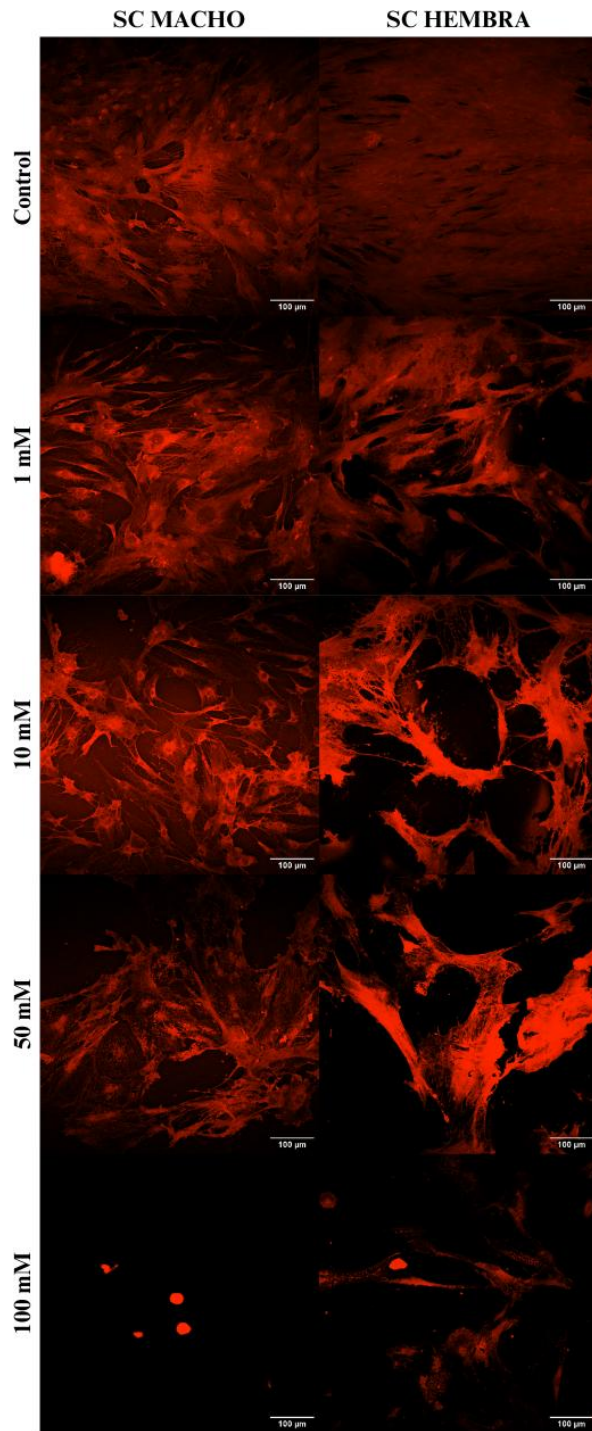
Uno de los insultos más frecuentes a nivel del SNC, es el daño producido por estrés oxidativo, el cual se da debido a la sobreproducción de radicales libres (generación de ROS) que pueden provocar un daño a biomoléculas como los lípidos, proteínas y ADN, derivando en numerosas enfermedades crónicas [58, 79, 99].

Se reconocen cuatro fuentes endógenas capaces de generar la mayoría de los oxidantes generados por las células. Tres de estos procesos, la respiración aeróbica normal, el estallido oxidativo por fagocitos debido a una infección, los subproductos de los peroxisomas- son capaces de producir H_2O_2 . Por esta razón, se evaluaron los efectos de este compuesto en las células obtenidas de la médula espinal lumbar buscando si es posible evidenciar la existencia de diferencias sexo-específicas, [99].

7.2.2.1. Respuesta al estrés oxidativo mediado por H_2O_2 .

Una vez caracterizada la morfología y crecimiento de los cultivos primarios de médula espinal, se procedió al estudio de los paradigmas de daño empleados previamente en astrocitos corticales. Por lo que se trataron los cultivos de astrocitos de médula espinal con H_2O_2 y se procedió a la evaluación de sus resultados.

(A)



(B)

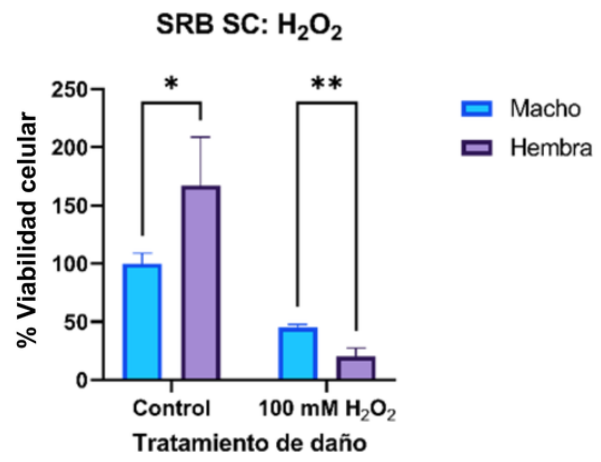


Figura 19. Cultivos primarios de astrocitos provenientes de la médula espinal de ratas, expuestos a distintas concentraciones de H₂O₂ durante 1 hora. (A). Imágenes de la fluorescencia de SRB obtenidas mediante microscopio confocal con objetivo 10X. Se observa como la exposición a H₂O₂ causa la disminución significativa de la viabilidad celular, y evidencian algunas diferencias morfológicas al comparar las células de los machos y hembras, sobre todo a 10 y 50 mM, donde la señal de SRB en machos parece concentrarse alrededor del núcleo, mientras que en hembras la señal es más homogénea en todo el cuerpo celular. Además, las células de hembras tratadas parecen agregarse mientras que la de los machos mantienen su disposición espacial (dominios) a pesar de los cambios morfológicos observados. **(B).** Evaluación de la viabilidad mediante ensayo de SRB, de los cultivos de astrocitos de médula espinal frente a 100 mM de H₂O₂ (1 hora). La gráfica muestra los valores de absorbancia a 510 nm normalizados al valor del macho control, para astrocitos provenientes de médula de ratas macho (azul) y ratas hembra (violeta). La gráfica muestra como los cultivos se vieron afectados por el H₂O₂, donde se observa un efecto más pronunciado de daño en las hembras.

Tal como se observa en la Figura 19, el efecto del estrés oxidativo mediado por el H₂O₂, en la morfología de los cultivos de médula espinal muestran que a medida que va aumentando la concentración de agente oxidante, las células disminuyen su número y muestran señales morfológicas de reactividad evidenciada por la retracción de los procesos astrocitarios [6, 24, 31] sobre todo en las células de los machos y la concentración de la señal de SRB alrededor de los núcleos sobre todo a 1 y 10 mM de H₂O₂. A concentraciones mayores, la señal cambia extendiéndose al núcleo y frente al daño más alto, la señal remanente solo se observa en células que se están despegando (aparecen redondeadas) donde el núcleo no se distingue. La retracción del cuerpo celular da una apariencia de una menor interacción con los astrocitos vecinos en las células de los machos. Las células de las hembras en lugar de emitir procesos prominentes, lo que lleva a una mayor distancia aparente entre las células, parecen agregarse más, sugiriendo que podría haber una alteración en la capacidad de adhesión al sustrato. Estas diferencias podrían reflejar una tendencia diferente al comportamiento frente a este compuesto, lo que podría estudiarse con otras técnicas morfológicas. Dentro de estas técnicas, se debe considerar el uso de Faloidina-488 para el marcado del citoesqueleto de actina fibrilar, DAPI para un mejor

reconocimiento de los núcleos y otros marcadores como S100 β y GFAP para evaluar el estado de reactividad astrocitaria.

Tal como se observó en astrocitos corticales, la Figura 19 (B) muestra que la viabilidad de los cultivos de hembra en las condiciones control es más elevada que la de machos al momento de la medida, a pesar de haber sembrado la misma densidad celular para las células de ambos sexos.

7.2.2.2. Respuesta al estrés oxidativo mediado por galactosa

Por otra parte, los astrocitos de médula espinal se trataron con galactosa para la inducción de daño oxidativo inducido por este compuesto.

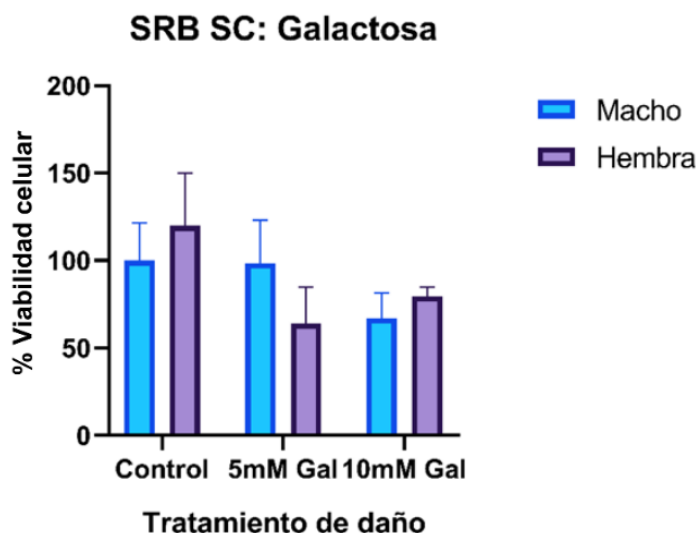


Figura 20. Respuesta de los astrocitos de médula espinal de ratas macho y hembra WT al estrés oxidativo mediado por galactosa. Evaluación de la viabilidad celular mediante ensayo de SRB. La gráfica muestra los valores de absorbancia a 510 nm normalizados al valor del macho control, y representados en función de la concentración de galactosa. Para cada condición de daño se presenta la media \pm desviación estándar (n=5 por cada condición experimental, 2 experimentos)

independientes) para astrocitos provenientes de corteza de ratas macho (azul) y ratas hembra (violeta).

Concordante con los resultados procedentes de los cultivos corticales, el número de células viables en el control de hembra tendió a ser más elevado que en el control de macho (Figura 20). Esto puede ser concordante con lo observado en el crecimiento (Figura 18), ya que, si bien el macho parece tener un mayor crecimiento inicial de células, suele ser un cultivo más heterogéneo, a diferencia del de hembra donde predominan los astrocitos. Es decir, el cultivo de médula espinal de macho podría dar un rendimiento menor inicialmente, ya que la agitación para enriquecer los cultivos en astrocitos pudo desprender la mayor cantidad aparente de las otras células. Sin embargo, al momento de plaquear las células, se realizó el conteo de las mismas y se plaqueó la misma densidad celular, por lo que la diferencia de viabilidad celular en condiciones control no puede ser atribuido a una mayor densidad celular inicial. De esta manera, se puede hipotetizar que la diferencia sexo-específica observable en el crecimiento se puede deber a que los astrocitos de macho son menos resistentes ante la privación de oxígeno y glucosa (que ocurre en condiciones de cultivo *in vitro*) que los astrocitos de hembra [21, 80], como se observó en los cultivos primarios de astrocitos corticales (Figura 8 (A)).

Ante el tratamiento con galactosa, como se observa en la Figura 20, la viabilidad de células tiende a disminuir a medida que aumenta la concentración de galactosa a la que se exponen los cultivos. Se alcanzó significación estadística a la concentración de 10 mM de galactosa para el cultivo de macho, frente a su respectivo control (#, $p=0,0486$). En cuanto a la viabilidad del cultivo de hembra, la diferencia frente a su control es significativa para todos los tratamientos con galactosa (5 mM (###, $p=0,025$) y 10 mM (#, $p=0,0210$)). Por lo tanto, la galactosa parece tener un efecto oxidante más elevado en las células procedentes de la médula espinal de ratas hembra, que en las de macho. Estos resultados son diferentes a los mostrados en los astrocitos corticales, por lo que, en principio, podría decirse, que el efecto de la región parece ser muy importante al momento de evaluar los efectos de daño. Estos datos no pueden ser explicados por la aparente capacidad de resistencia al daño oxidativo, otorgado a las hembras por sus hormonas ováricas como el estrógeno [92], lo que si fue obtenido con células corticales.

7.2.3. Análisis de la respuesta sexo-específica de astrocitos espinales SOD1G93A frente a distintos estímulos de daño

7.2.3.1. Respuesta al estrés oxidativo mediado por galactosa

Como mencionamos anteriormente, los astrocitos obtenidos de ratones y ratas SOD1G93A han mostrado ser neurotóxicos in vivo e in vitro y además de ratas SOD1G93A+ fue posible aislar una población de astrocitos de la médula espinal lumbar, que presenta mayor neurotoxicidad para las motoneuronas próximas [42, 75]. Estas células neurotóxicas parecen generarse en un ambiente de daño donde el estrés oxidativo es uno de los mecanismos patológicos presentes, por lo que el mismo podría contribuir a la generación de este subtipo neurotóxico [42, 68, 75].

Como se propone que el estrés oxidativo va aumentando progresivamente en el ambiente degenerativo que lleva a la muerte de las motoneuronas y la galactosa ha sido el inductor de estrés más moderado de acuerdo a los resultados anteriores de esta tesis, se decidió analizar si la galactosa, podría dañar los cultivos de astrocitos SOD1G93A obtenidos de la médula espinal lumbar de ratas neonatas. Las concentraciones empleadas de galactosa fueron 5 y 10 mM.

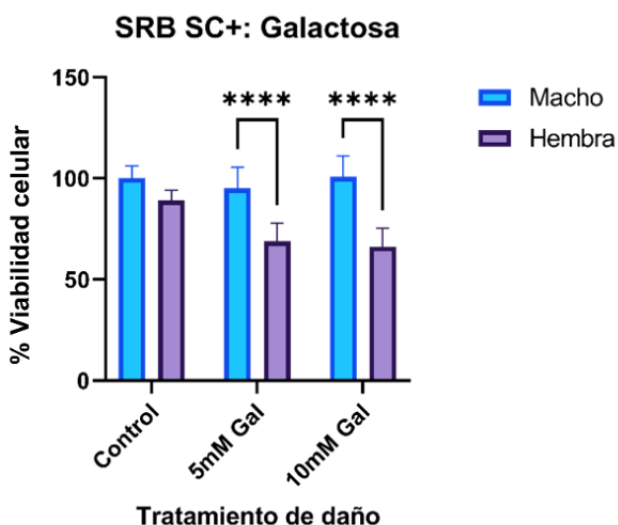


Figura 21. Respuesta de los astrocitos de médula espinal de ratas macho y hembra SOD1G93A+ a la galactosa. La evaluación de la viabilidad celular mediante ensayo de SRB

parametrizada al valor del macho control, y representados en función de la concentración de galactosa, mostró una disminución de la viabilidad de los astrocitos de las hembras, pero no de los machos. Para cada condición de daño se presenta la media \pm desviación estándar (n=5 por cada condición experimental, 2 experimentos independientes) para astrocitos obtenidos de médula espinal lumbar de ratas macho (azul) y ratas hembra (violeta). El grado de significación estadística fue de $p < 0.0001$.

Según la Figura 21, se observa una tendencia a que los cultivos de astrocitos de macho presenten una mayor viabilidad en el control que los cultivos de hembra, a pesar de que fueron sembrados con la misma densidad celular inicial, lo que descarta en principio diferencias asociadas al mayor número de células inicial.

Además, la viabilidad de las células de los machos no parece verse afectada a medida que se aumenta la concentración de galactosa, ya que no presenta diferencias con significación estadística. En cambio, la viabilidad de las células de las hembras disminuye significativamente (5 mM (###, $p=0,0032$) y 10 mM (###, $p=0,0013$)). Estos resultados son contrarios a los que se evidencian en los cultivos de corteza y médula espinal para ratas WT y podrían deberse a diversas razones, entre ellas, posiblemente a la falta de la neuroprotección ejercida por las hormonas sexuales a los astrocitos de las hembras que fue reportada por Hao et al. (2014) [92].

Estas diferencias podrían atribuirse a la presencia de la mutación SOD1G93A y no ser región-específicas, lo que podría analizarse evaluando al mismo tiempo el comportamiento de astrocitos SOD1G93A de corteza y médula espinal lumbar. A este respecto, varios autores han mostrado que los astrocitos SOD1G93A han perdido funciones neuroprotectoras y ganado otras neurotóxicas [51], pero se conoce poco, si los mismos presentan una mayor vulnerabilidad al daño oxidativo mayor que los astrocitos WT y si estas diferencias son sexo-específicas.

Esta posibilidad, no puede ser descartada, ya que podría ocurrir que la presencia de la mutación no solo altere diversas funciones homeostáticas sino también, algunos de los mecanismos de defensa sexo-específicos, afectando a las hembras y no en los machos. MacLean et al. (2021) [54], por ejemplo, demostraron la neuroprotección a los ratones machos SOD1G93A, cuando se silencia la expresión de un receptor asociado a la vía DAMPS/RAGE. Sin embargo, esta neuroprotección no se evidenció en las ratonas hembras.

También debe considerarse que las respuestas sexo-específicas de los astrocitos de la médula espinal lumbar no tienen que ser necesariamente las mismas que las respuestas de los astrocitos corticales, por lo que habría que analizar las características funcionales y anatómicas diferentes entre cerebro y médula pueden explicar, al menos en parte, la respuesta diferente entre astrocitos corticales negativos y SOD1G93A de la médula.

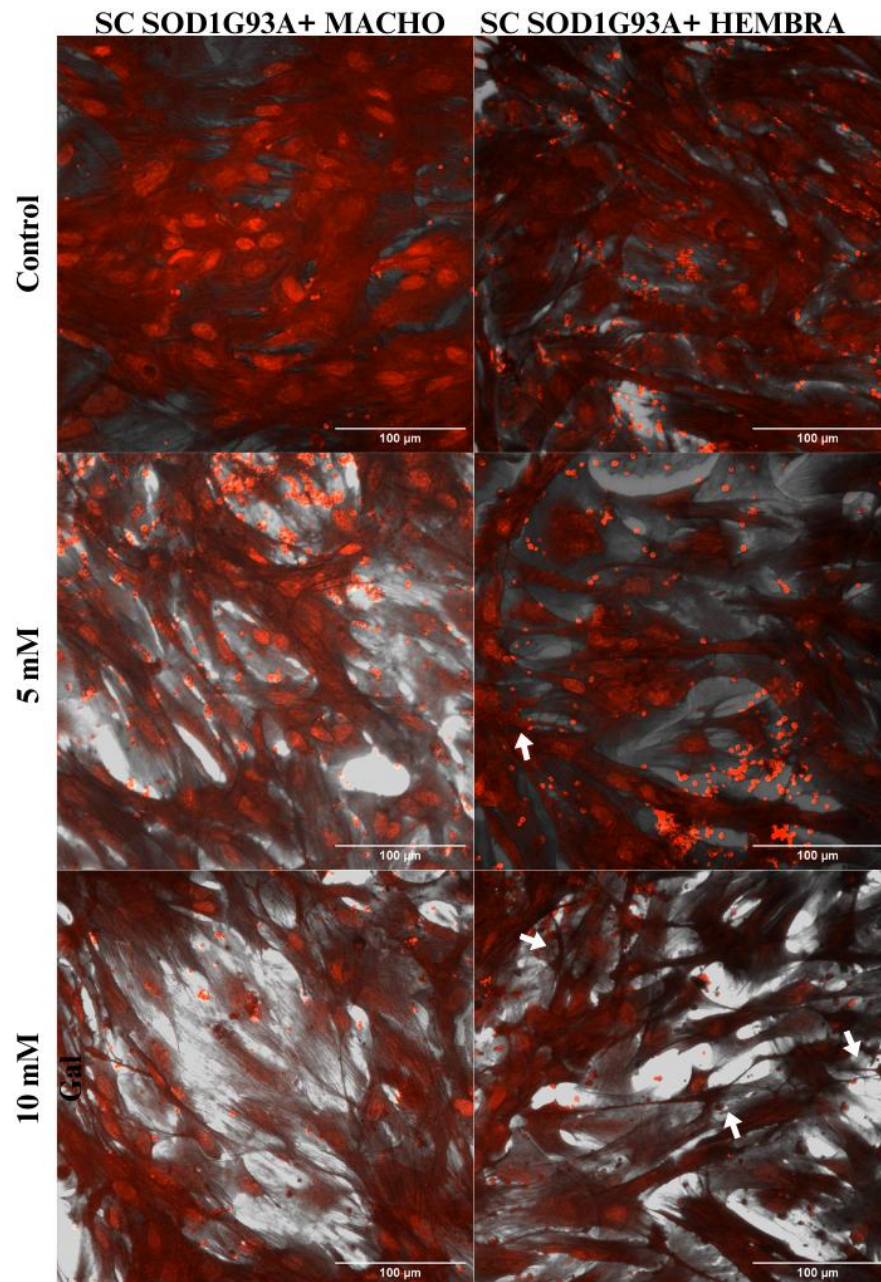


Figura 22. Viabilidad astrocitaria y morfología de astrocitos de médula espinal (SC) de ratas neonatas SOD1G93A+ controles y ante diferentes concentraciones de galactosa. Las imágenes fueron tomadas por microscopía confocal para obtener la fluorescencia de SRB en el rojo lejano y el campo claro con la herramienta ESID. Se tomaron 4 campos de cada condición experimental. Las imágenes son representativas de tres experimentos diferentes. Las flechas blancas muestran astrocitos con morfología reactiva en los cultivos de hembras, pero no en los de machos, lo que parece consistente con el resultado referente a cambios en la viabilidad de los astrocitos hembras y no de machos.

En otras palabras, los resultados observados en la Figura 21, concuerdan con los cambios en la morfología celular de los astrocitos presentada en la Figura 22. No parece haber diferencias en la morfología de las células de los cultivos de macho, para ninguna de las condiciones (control o tratamiento). En los cultivos de hembra, a medida que aumenta la concentración de tratamiento de galactosa, se ven células con morfologías que parecen ser reactivas (flecha blanca). En todas las condiciones se observan núcleos marcados, pero estos parecen más brillantes en los astrocitos de hembras donde hubo un reordenamiento de los procesos, donde los mismos se vuelven más finos, [24, 31].

7.2.3.2. Niveles de glutatión en cultivos de astrocitos de médula espinal WT vs SOD1G93A +

Empleando el ensayo de MCB [100], se evaluaron los niveles de glutatión intracelular y liberado en astrocitos de médula espinal WT y SOD1G93A expuestos a galactosa.

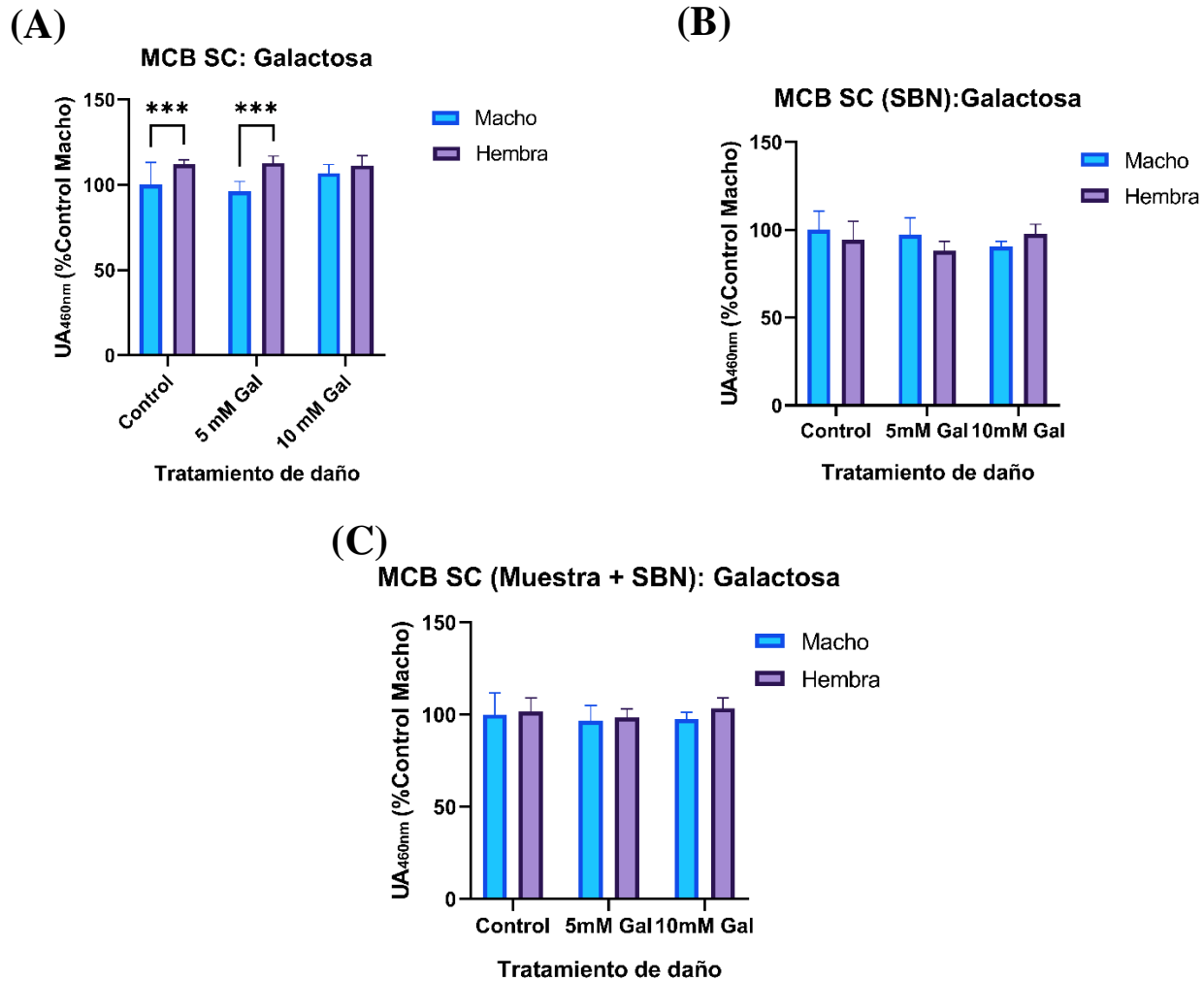


Figura 23. Niveles de glutatión en cultivos de astrocitos de médula espinal WT. Cuantificación de los niveles de glutatión mediante ensayo de MCB en cultivos primarios de astrocitos de médula espinal de ratones WT tratados con galactosa 5 y 10 mM durante 24 horas. **(A).** La cuantificación de los niveles de glutatión intracelular, para cada condición de tratamiento (n=12 para el Control y n=6 para 5 y 10 mM de galactosa) muestra niveles significativos más altos en las células de las hembras control y expuestas a 5 mM de galactosa. **(B).** La cuantificación del glutatión extracelular liberado al medio para cada condición de tratamiento. Aunque no se alcanzó significación estadística, las células de macho tienden a liberar más glutatión al medio que las hembras. **(C).** Gráfico de los niveles de glutatión total (intracelular + extracelular), para cada condición de

tratamiento, mostrando que no hay diferencias en los niveles asociados al sexo ni resultado de las condiciones experimentales diferentes. Los asteriscos indican significación estadística para $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****), respectivamente.

En los cultivos procedentes de ratas WT, con la inducción de estrés oxidativo mediante la adición de galactosa a concentraciones de 5 y 10 mM, hay una diferencia significativa que se da en el control y en el tratamiento de 5 mM de galactosa para la medición de glutatión intracelular en las células de las hembras comparadas con las de los machos (Figura 23 (A)). Sin embargo, los machos tienden a liberar mayor glutatión al medio extracelular, siendo este una de las defensas antioxidantes más importantes del SNC, por lo que el efecto que podría tener en las células circundantes, es protector [6]. En este sentido, tal vez, la tendencia a la mayor liberación de glutatión observado en los astrocitos machos, pero no en hembras, pueda explicar, al menos en parte, la falta de efecto de la galactosa en la sobrevivencia de los astrocitos machos provenientes de la médula espinal de ratas WT.

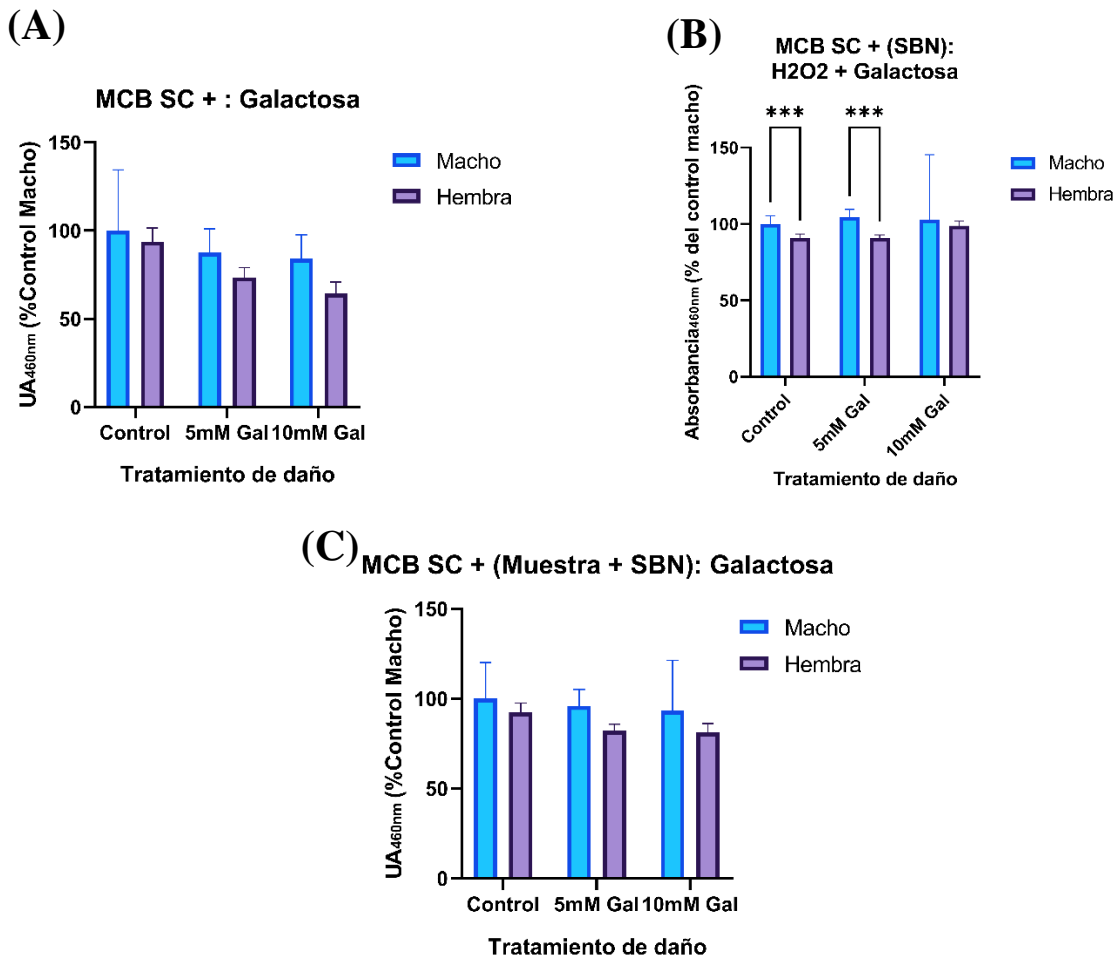


Figura 24. Niveles de glutatión en cultivos primarios de astrocitos de médula espinal de ratas SOD1G93A+, tratados con galactosa (5 y 10 mM). Los niveles de glutatión intracelular (A), liberado al medio (B) y totales (C) medidos por ensayo de MCB muestran una tendencia donde las hembras tienen menores valores basales y en respuesta a galactosa de los niveles de glutatión intracelular y total. Las diferencias alcanzan significación estadística en el glutatión liberado. Los asteriscos indican significación estadística para $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****), respectivamente.

En cuanto a los cultivos procedentes de ratas que poseen la mutación SOD1G93A, la Figura 24 (A) muestra que a medida que aumenta la concentración de galactosa, la concentración de glutatión en los mismos parece disminuir. También sugiere que los cambios parecen más pronunciados en las células provenientes de ratas hembras que en las obtenidas de ratas macho. Estos resultados

son consistentes con los resultados de viabilidad frente a galactosa y podrían explicar en parte porque los astrocitos obtenidos de la medula espinal lumbar de ratas hembra SOD1G93A son más vulnerables que los astrocitos obtenidos de las ratas macho positivas y que los obtenidos de hembras WT.

Además, como los niveles altos de galactosa en el cerebro, generan estrés oxidativo [57], los cultivos que presentan la mutación SOD1G93A pueden ser más susceptibles al estrés oxidativo que los astrocitos WT, debido a la pérdida en la función de la enzima antioxidante SOD1, lo que puede explicar, al menos en parte, la susceptibilidad de los cultivos de células de hembras a la galactosa, tal como se observa en la Figura 24 (A).

El estrés oxidativo en la ELA se puede deber a los niveles elevados de ROS o al incorrecto funcionamiento del sistema de defensa antioxidante. Hay evidencia de que en esta enfermedad hay un funcionamiento impedido del sistema de defensa antioxidante frente al estrés oxidativo, debido a la desregulación del glutatión [30]. La ELA puede estar asociada a varias mutaciones, dentro de las cuales se encuentran alrededor de 100 mutaciones en la enzima, siendo esta enzima parte del sistema de defensa antioxidante que presenta el organismo y estando directamente relacionada con la desactivación del radical superóxido [101]. Cuando se da una mutación en esta enzima, el estrés oxidativo dado por la generación de ROS puede tener un impacto mayor llevando a la acumulación de radicales altamente tóxicos y consecuentemente a la degradación del ADN nuclear y mitocondrial, así como al pegamiento incorrecto de proteínas, características que pueden utilizarse como indicadores patológicos en la ELA [102].

Además, frente a las células de los machos, las células de hembras SOD1G93A control y tratadas con 5 mM de galactosa, muestran una menor concentración de glutatión en todas las condiciones (Figura 24), por lo que el sistema antioxidante de las hembras parece verse más afectado en cultivos SOD1G93A+, que el de los machos.

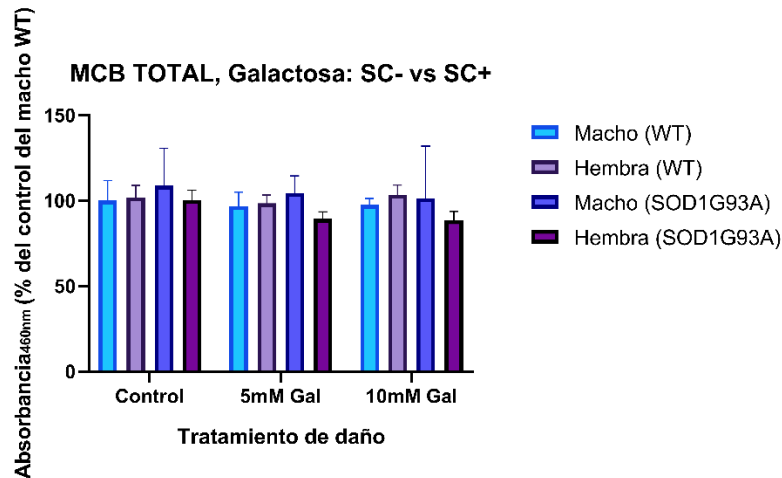


Figura 25. Cuantificación de los niveles de glutatión total en cultivos primarios de astrocitos de médula espinal de ratones WT vs SOD1G93A+ controles y tratados con 5 y 10 mM galactosa, evidenciando la ausencia de efectos significativos atribuidos a la galactosa. Los datos son obtenidos con n=12 para los controles de Macho WT, Macho SOD1G93A + y Hembra WT, n=9 para el Control de Hembra SOD1G93A, n=6 para 5 y 10mM de Galactosa en Macho WT, Macho SOD1G93A + y Hembra WT y n=4 para 5 y 10 mM de Galactosa en Hembra SOD1G93A).

Como se observa en la Figura 25, los niveles de glutatión totales (intracelular más liberados) en los cultivos WT y los SOD1G93A+ no presentan diferencias significativas a pesar de una leve tendencia a mayores valores en el macho que porta la mutación y de una tendencia pequeña a menores valores en las hembras positivas. Aunque las diferencias son muy modestas, la relevancia de estos cambios deberá ser analizada con otras herramientas más específicas, ya que los niveles más reducidos en hembras podrían estar relacionados con la mayor vulnerabilidad al daño debido a fallas en su sistema de defensa antioxidante.

7.2.3.3. Análisis del potencial mitocondrial en cultivos WT y SOD1G93A+ tratados con galactosa

La mitocondria es un organelo involucrado en la regulación de muchas funciones celulares como la producción de ATP, la señalización del calcio, el mantenimiento de la homeostasis celular y la apoptosis. La desregulación de las funciones mitocondriales, pueden derivar en el desarrollo de enfermedades y es un mecanismo patológico descrito en la mayoría, sino en todas las

enfermedades del SNC. Además, este organelo es capaz de producir ROS, incluso bajo demandas energéticas basales, lo que implica que puede provocar estrés oxidativo en las células como se ha descrito en la patogénesis de la ELA [28, 30, 103].

Para que las mitocondrias funcionen apropiadamente, la membrana mitocondrial debe tener una diferencia de voltaje muy importante entre el interior negativo y el exterior positivo. Se ha reconocido que la pérdida de ese potencial de membrana, además de impedir la generación de energía, es un evento temprano en la apoptosis [104], principalmente en las células dependientes de la fosforilación oxidativa como las neuronas. A su vez, la pérdida del potencial mitocondrial, puede ser un indicador temprano de disfunción mitocondrial en astrocitos [105], lo que tiene repercusión directa sobre el soporte trófico que estas células brindan a las neuronas y demás células neurales. En cambio, la supervivencia y función de los astrocitos es menos vulnerable a la despolarización mitocondrial, ya que estas células tienen vías alternativas metabólicas que permiten obtener energía asegurando su supervivencia y función.

El compuesto MitoTracker Red (MT, Invitrogen) es una sonda mitocondrial que permite evaluar el potencial y la integridad de la membrana mitocondrial en células vivas. En las células correctamente polarizadas, el MT es capaz de permear la membrana celular y acumularse en las mitocondrias de forma dependiente del potencial mitocondrial (es un compuesto cargado positivamente, que ingresa a la mitocondria que posee un interior con carga negativa), formando en la matriz mitocondrial agregados que fluorescen en el rojo [106].

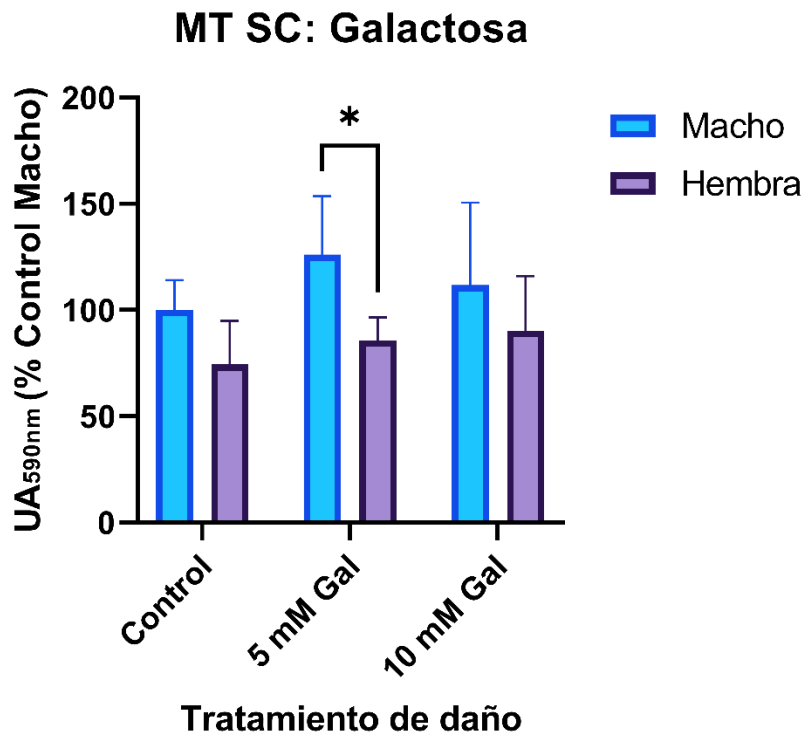


Figura 26. Análisis del potencial mitocondrial en cultivos primarios de astrocitos de médula espinal de ratas WT tratados con galactosa (5 y 10 mM). La medida de la absorbancia del MitoTracker (MT) a 590nm, mostró una tendencia a mayores valores en las células de ratas macho frente a las de hembras en todas las condiciones y en ausencia de cambios significativos debido a la presencia de galactosa. Los resultados fueron obtenidos de n=12 para el Control, n=6 para 5 y 10 mM de galactosa, de 2 experimentos independientes. Los asteriscos indican significación estadística para p<0.05 (*), p<0.01 (**), p<0.001 (***) y p<0.0001 (****), respectivamente.

Tal como se puede observar en la Figura 26 y en la Figura 27, no se evidencian diferencias significativas entre los potenciales mitocondriales de los cultivos tratados con diferentes concentraciones de galactosa y los controles, lo que sugiere que la depolarización mitocondrial no es un mecanismo relevante en las condiciones de cultivo empleadas en este trabajo.

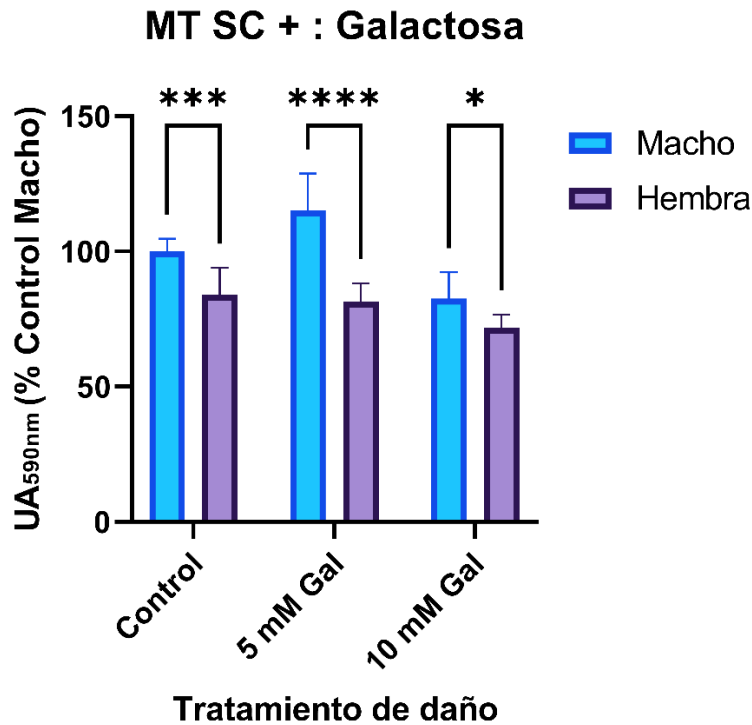


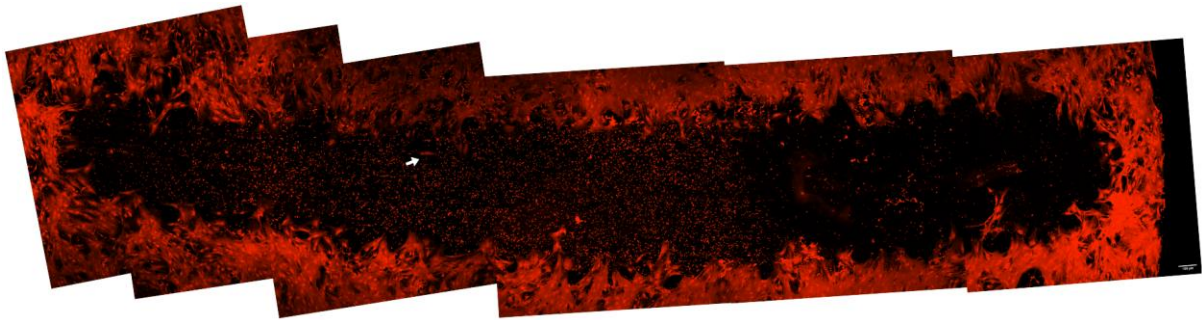
Figura 27. Análisis del potencial mitocondrial en cultivos primarios de astrocitos de médula espinal de ratas SOD1G93A+ tratadas con galactosa (5 y 10 mM). La absorbancia del MT muestra que, frente a las células de las hembras, las células de las ratas macho muestran mayores valores de potencial mitocondrial en todas las condiciones experimentales, con una leve tendencia a la baja, a medida que aumenta la concentración de galactosa. Los resultados fueron obtenidos analizando las siguientes muestras: n=12 para el Control, n=6 para 5 y 10 mM de galactosa. Los asteriscos indican significación estadística para $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****), respectivamente.

Para todas las condiciones tratadas con galactosa, no se observan diferencias significativas en el potencial mitocondrial, por lo que el tratamiento con galactosa no parece tener un efecto en esta variable de estudio. Sin embargo, si se observa una diferencia significativa sexo-específica, principalmente en los cultivos de astrocitos provenientes de ratas hembras que presentan la mutación SOD1G93A.

7.2.3.4. Respuesta al daño mecánico “scratch” en cultivos de médula espinal SOD1G93A+

Dado que en las enfermedades neurodegenerativas coexisten distintos mecanismos patológicos y los daños mecánicos o traumáticos también participan, se decidió llevar a cabo el ensayo de scratch (rayar el cultivo), tomando imágenes a las 24 horas del rayado para evaluar la respuesta del cultivo ante ese daño tan significativo.

(A)



(B)

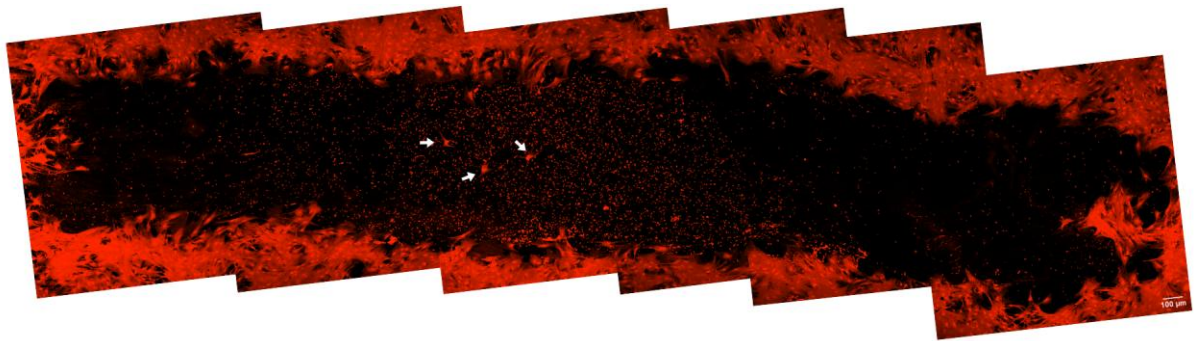
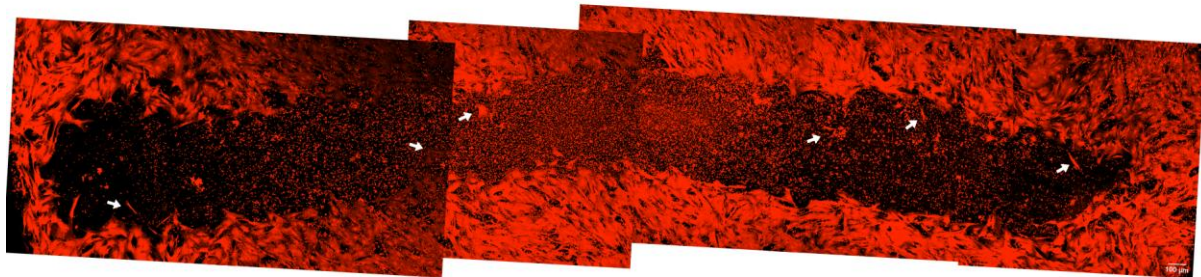


Figura 28. Imágenes representativas del ensayo de “scratch” en cultivo primario de médula espinal proveniente de ratas macho SOD193A+, sin tratamiento (control (A)) y frente a 10 mM de galactosa (B) y posterior tinción con SRB a las 24 horas luego del scratch. Se muestra una composición de imágenes captadas mediante microscopio confocal a un aumento de 5X para ver

toda el área del scratch, así como la presencia de células en medio del mismo (flechas blancas) que podrían ser proliferantes o migrantes.

(A)



(B)

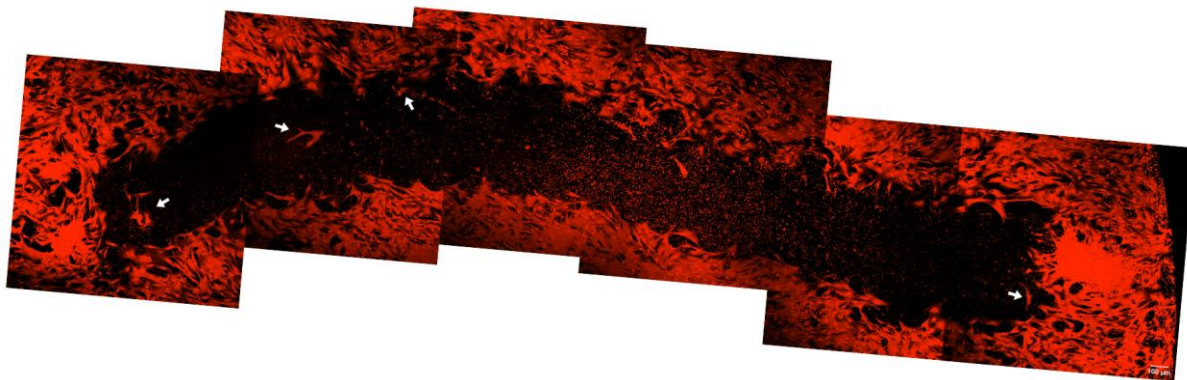


Figura 29. Imágenes representativas del ensayo de “scratch” en cultivo primario de médula espinal proveniente de ratas hembra SOD193A+, sin tratamiento (control (A)) y frente a 10 mM de galactosa (B) y posterior tinción con SRB a las 24 horas luego del scratch. Se muestra una composición de imágenes captadas mediante microscopio confocal a un aumento de 5X para ver toda el área del scratch, así como la presencia de células en medio del mismo (flechas blancas) que podrían ser proliferantes o migrantes.

Veinticuatro horas después de realizar el scratch con una punta de pipeta de 200 μ L, retirar el medio de daño y sustituirlo por otro en condiciones control o expuesto a galactosa, las células se

fijaron y se llevaron al microscopio. Los resultados se evidencian en las Figura 28 y 29 muestran claramente que hubo una mayor migración de células en los cultivos de hembra frente a los cultivos de macho, frente a un daño inicial muy similar. Las diferencias son estadísticamente significativas en lo referente al área del scratch y al mayor número de células presente en la zona lesionada. Las células evaluadas se indican con las flechas blancas en las Figuras 28 y 29.

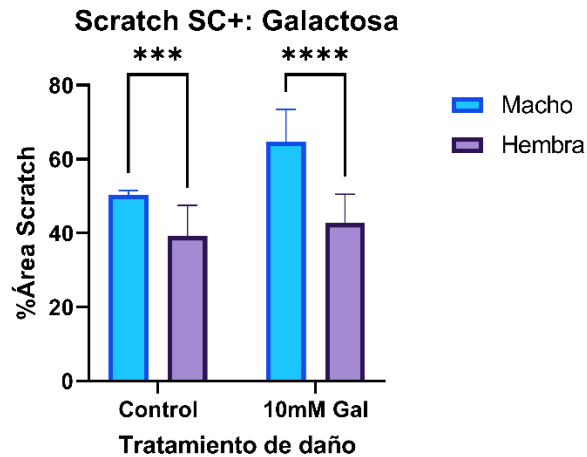


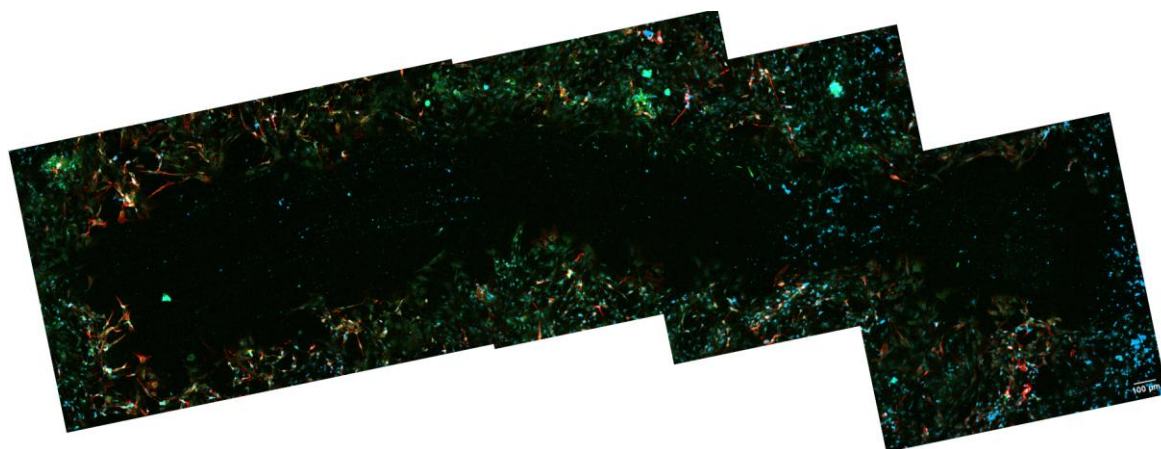
Figura 30. Área libre de células en el ensayo de “scratch” en cultivos de médula espinal de ratas SOD1G93A+ machos y hembras, en condiciones de control y 10 mM de galactosa. El área de scratch se parametrizó al área total en cada una de las imágenes de cada condición (n=3, 3 experimentos independientes). Se observa que en ambas condiciones experimentales de las células de los machos, presentan mayores áreas libres de células y que la galactosa aumentó el área dañada, sin afectar la respuesta de las células de las hembras. Los asteriscos indican significación estadística para $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****), respectivamente.

Se observa en la Figura 30, como el área del scratch parece tener una diferencia significativa entre las células obtenidas de la médula espinal de machos y hembras positivos. En ambos casos (en control y tratamiento con 10 mM de galactosa), el porcentaje del área de scratch es mayor en los machos que en las hembras, lo cual también se evidencia en las imágenes de microscopía confocal. Adicionalmente los resultados indican, que, en las condiciones de tratamiento con galactosa, tanto para machos como para hembras, el área del scratch resulta ser mayor que en el control. Esto puede indicar el efecto que tiene la galactosa en la migración de los astrocitos en caso de una lesión, en condiciones de estrés oxidativo, podría ser inhibitorio. No se ha analizado, pero una perspectiva interesante a futuro es evaluar los efectos de la galactosa sobre la proliferación astrocitaria en

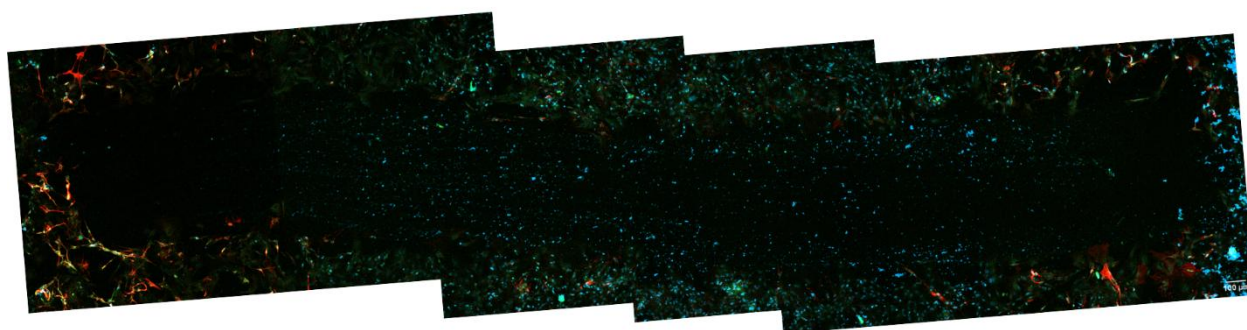
condiciones de scratch. En este contexto es importante tener en cuenta que parte de la respuesta protectora de los astrocitos implica limitar el sitio de lesión y promover la reparación de una lesión en el tejido nervioso. Aunque esta respuesta también puede inhibir la regeneración de axones de las neuronas del SNC [2], parte de la función protectora de los astrocitos, es tender a generar una “barrera” en el borde de la herida con el fin de proteger el tejido nervioso dañado que se encuentra debilitado e impedir la propagación del daño. Así, los astrocitos, junto con el tejido conectivo circundante a la cicatriz, generan una barrera que no sólo cumple funciones físicas, sino que se ve implicada en interacciones celulares y moleculares complejas, que promueven la reparación del SNC, al menos inicialmente [3].

Por otra parte, como se ha descrito que los astrocitos reactivos que están en el núcleo y en la proximidad mayor del daño, son reactivos y altamente positivos para GFAP, se exploró la señal de GFAP y S100 β en los ensayos de scratch en células de animales SOD1G93A en condiciones control y frente a 10 mM de galactosa.

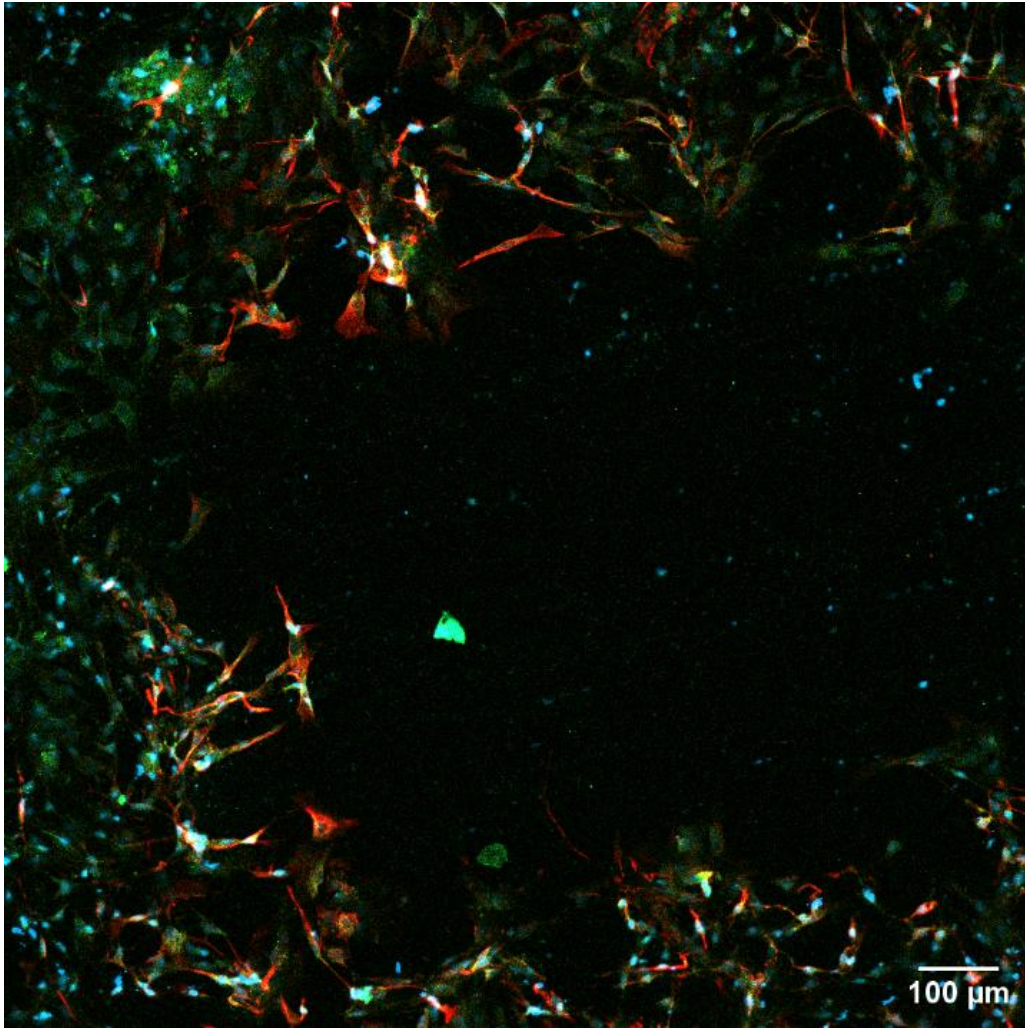
(A)



(B)



(A1)



(B1)

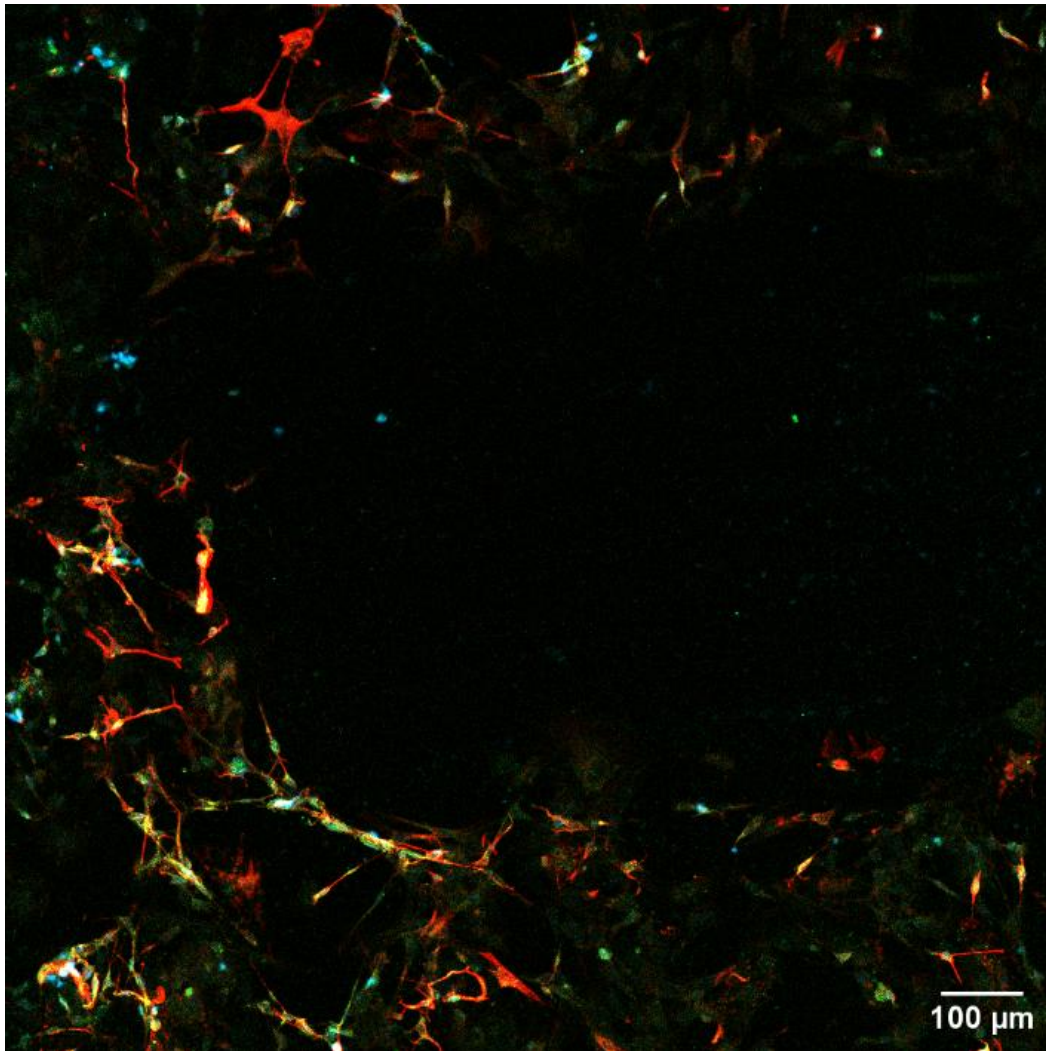


Figura 31. Reactividad astrocitaria en los bordes del scratch en condiciones control (A y A1) y tratados con 10 mM de galactosa (B y B1). Las imágenes mediante microscopía confocal muestran la inmunoreactividad para GFAP en rojo, para S100 β en verde y en azul los núcleos marcados con DAPI. El aumento en la intensidad de la señal de GFAP en los bordes de la herida es significativo en ambas condiciones experimentales.

En la Figura 31, se evidencia como en los bordes que rodean la herida se agrupan astrocitos reactivos tal como se reporta en la literatura [3]. Las imágenes reconstruidas y las mostradas a

mayor aumento, muestran un aumento significativo en la intensidad de la señal en el borde de ambas heridas. Sin embargo, ambas condiciones experimentales, no muestran una diferencia significativa en la intensidad de señal de GFAP, ni en el área positiva para este marcador astrocitario, sugiriendo que el daño mecánico es más importante que el desafío con la galactosa, al menos en el paradigma experimental empleado. Sin embargo, aunque en este caso no se evaluaron las áreas libres de células, se puede observar una cicatrización menor, en el cultivo dañado con galactosa lo que podría estar asociado con la coexistencia de daño oxidativo y daño mecánico [3].

8. Conclusiones

En este trabajo se optimizaron diversos modelos celulares basados en cultivos primarios de astrocitos corticales y de médula espinal de ratas neonatas WT y SOD1G93A para evaluar diferencias sexo-específicas en condiciones normales y de daño al SNC. Se establecieron condiciones experimentales estandarizadas que permitieron analizar la viabilidad celular, el crecimiento y la funcionalidad mitocondrial mediante microscopía de campo claro y confocal, inmunocitoquímica y técnicas bioquímicas espectrofotométricas.

Se encontraron respuestas sexo-específicas relativas a la viabilidad celular en todos los paradigmas empleados en este trabajo, sin embargo, los datos de funcionalidad mitocondrial no fueron concluyentes. Los principales resultados pueden resumirse de la siguiente manera:

En los animales WT, los astrocitos corticales de ratas hembras presentaron mayor viabilidad en condiciones basales y frente a exposiciones de hasta 50 mM de H₂O₂, así como una mayor tendencia a mantener la viabilidad ante D-galactosa 10 mM y una respuesta significativamente mejor frente a la coexistencia de daño mecánico y exposición con galactosa. Estos resultados llevan a proponer al modelo de daño mecánico en presencia de daño oxidativo como un buen modelo para evaluar respuestas sexo-específicas ante daño agudo cortical.

En cuanto a los astrocitos WT espinales, respecto de los cultivos de ratas machos, las células obtenidas de ratas hembras presentaron mayor viabilidad en condiciones basales, pero fueron extremadamente vulnerables al estrés oxidativo agudo inducido por H₂O₂ y se dañaron significativamente luego de la exposición a galactosa 10 mM, lo que puede relacionarse con menores niveles relativos de glutatión y de potencial mitocondrial.

En lo referente a los astrocitos SOD1G93A espinales, las células de ratas hembras presentaron menor viabilidad en condiciones basales y disminución significativa de la misma frente a galactosa 10 mM así como menores niveles relativos de glutatión y potencial mitocondrial. Sin embargo, frente a daño mecánico y exposición a galactosa, los astrocitos espinales de ratas hembra respondieron mejor que las células obtenidas de las ratas macho.

Estos resultados permiten proponer a los astrocitos WT espinales como un modelo adecuado para evaluar respuestas sexo-específicas en la médula espinal lumbar ante daño oxidativo agudo,

mientras que el modelo de astrocitos SOD1G93A parece ser más adecuado para evaluar respuestas sexo-específicas antes daño mecánico en presencia de daño oxidativo moderado.

Estos modelos pueden ser optimizados para evaluar la respuesta de diferentes compuestos con potencial neuroprotector fundamentalmente dirigidos al control del estrés oxidativo o de la reparación frente a daño mecánico.

Dado que algunas diferencias sexo-específicas en la ELA parecen depender de la edad, se implementó un modelo de interacción astrocitos-motoneuronas mediante co-cultivo de astrocitos aberrantes obtenidos de ratas SOD1G93A terminales con células NSC-34, cuyos datos serán empleados para optimizar los modelos empleados en este trabajo para evaluar la repercusión de la respuesta astrocitaria en la sobrevida neuronal teniendo en cuenta la edad.

9. Perspectivas

Los modelos empleados en este trabajo fueron optimizados para identificar y evaluar respuestas sexo-específicas frente a condiciones de daño que activan mecanismos patológicos relevantes en la mayoría de las enfermedades del SNC, agudas y crónicas como las neurodegenerativas. Como perspectiva general, los mismos pueden optimizarse para evaluar las respuestas sexo-específicas y región-específicas de diferentes neuroprotectores potenciales con acción antioxidante o como eventuales moderadores de la reactividad astrocitaria aguda inducida por daño mecánico. En este sentido, la identificación de fármacos con acción preferente sobre los astrocitos es una alternativa terapéutica promisoriosa propuesta por diversos autores.

A su vez, una vez optimizados, los mismos modelos, podrán ser empleados para analizar la influencia de la respuesta astrocitaria sobre la viabilidad neuronal teniendo en cuenta las diferencias específicas referentes al sexo y a la región. Como un avance a esta alternativa, se optimizó un modelo de interacción astrocitos adultos-motoneuronas para evaluar diferencias sexo-específicas de los astrocitos teniendo en cuenta además la edad avanzada, la que es una variable prevalente en las enfermedades neurodegenerativas.

Otra perspectiva general refiere a realizar modelos de glía mixta para analizar la respuesta conjunta sexo-específica de astrocitos y microglía en condiciones basales y frente a condiciones de daño, ya que son los principales linajes celulares neurales involucrados en la progresión de las enfermedades neurodegenerativas.

En cuanto a perspectivas específicas para continuar con este trabajo se propone:

- explorar los efectos de la duración del daño agudo masivo ocasionado por H_2O_2 ya sea disminuyendo o aumentando los tiempos de tratamiento para aumentar las diferencias sexo-específicas encontradas;
- confirmar la existencia de posibles diferencias sexo-específicas y región-específicas comparando los efectos de galactosa como inductor de estrés oxidativo moderado en astrocitos corticales y espinales de ratas SOD1G93A en comparación con ratas WT;
- comparar las respuestas sexo-específicas frente al daño mecánico en astrocitos espinales de ratas WT y SOD1G93A en condiciones basales;

- evaluar las respuestas astrocitarias sexo-específicas en términos de migración o proliferación celular en todos los paradigmas experimentales que implican daño mecánico;
- ante la falta de datos concluyentes sobre la funcionalidad mitocondrial empleando MTT y MT, explorar otros métodos analíticos para identificar posibles respuestas sexo-específicas en la disfunción mitocondrial; -explorar diferencias sexo-específicas en astrocitos/células gliales provenientes de ratas SOD1G93A terminales y en los controles respectivos de la misma edad;
- optimizar los co-cultivos de astrocitos aberrantes adultos provenientes de hembras terminales SOD1G93A y células NSC-34 para identificar diferencias sexo-específicas en los astrocitos y su repercusión en la sobrevivencia neuronal;
- implementar co-cultivos de astrocitos neonatales y de neuronas corticales o motoneuronas primarias para tener un mejor acercamiento a la respuesta neuronal específica.

10. Referencias Bibliográficas

- [1] Carey J, Society for Neuroscience. Brain Facts: A primer on the brain and the nervous system. 1990.
- [2] Barres BA. The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. *Neuron*. 2008;60(3):430–440. doi:10.1016/j.neuron.2008.10.013
- [3] Fitch MT, Silver J. CNS Injury, Glial Scars, and Inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. 2008.
- [4] Kandel E, Schwartz J, Jessell T, Siegelbaum S, Hudspeth A. Principles of neural science. Fifth Edition. The Mc Graw Hill; 2013.
- [5] Saab AS, Tzvetavona ID, Trevisiol A, Baltan S, Dibaj P, Kusch K, Möbius W, Goetze B, Jahn HM, Huang W, et al. Oligodendroglial NMDA Receptors Regulate Glucose Import and Axonal Energy Metabolism. *Neuron*. 2016;91(1):119–132. doi:10.1016/j.neuron.2016.05.016
- [6] Maragakis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of Disease: Astrocytes in neurodegenerative disease. *Nature Clinical Practice Neurology*. 2006;2(12):679–689. doi:10.1038/ncpneuro0355
- [7] Chowen JA, Garcia-Segura LM. Role of glial cells in the generation of sex differences in neurodegenerative diseases and brain aging. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2021;196. doi:10.1016/j.mad.2021.111473
- [8] Chistyakov D V., Azbukina N V., Astakhova AA, Goriainov S V., Chistyakov V V., Sergeeva MG. Sex-mediated differences in Ips induced alterations of TNF α , IL-10 expression, and prostaglandin synthesis in primary astrocytes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(9). doi:10.3390/ijms19092793
- [9] Schwarz JM, Bilbo SD. Sex, glia, and development: Interactions in health and disease. *Hormones and Behavior*. 2012;62(3):243–253. doi:10.1016/j.yhbeh.2012.02.018
- [10] Tassoni A, Farkhondeh V, Itoh Y, Itoh N, Sofroniew M V., Voskuhl RR. The astrocyte transcriptome in EAE optic neuritis shows complement activation and reveals a sex difference in astrocytic C3 expression. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1–12. doi:10.1038/s41598-019-46232-6
- [11] Chowen JA, Argente-Arizón P, Freire-Regatillo A, Argente J. Sex differences in the neuroendocrine control of metabolism and the implication of astrocytes. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2018;48:3–12. doi:10.1016/j.yfrne.2017.05.003
- [12] Lennol MP, Canelles S, Guerra-Cantera S, Argente J, García-Segura LM, de Ceballos ML, Chowen JA, Frago LM. Amyloid- β 1-40 differentially stimulates proliferation, activation of oxidative stress and inflammatory responses in male and female hippocampal astrocyte cultures. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2021;195. doi:10.1016/j.mad.2021.111462

- [13] Chen X, McClusky R, Chen J, Beaven SW, Tontonoz P, Arnold AP, Reue K. The number of X chromosomes causes sex differences in adiposity in mice. *PLoS Genetics*. 2012;8(5). doi:10.1371/journal.pgen.1002709
- [14] Arnold AP. Four Core Genotypes and XY* mouse models: Update on impact on SABV research. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2020;119(February):1–8. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.09.021>. doi:10.1016/j.neubiorev.2020.09.021
- [15] Tukiainen T, Villani AC, Yen A, Rivas MA, Marshall JL, Satija R, Aguirre M, Gauthier L, Fleharty M, Kirby A, et al. Landscape of X chromosome inactivation across human tissues. *Nature*. 2017;550(7675):244–248. <http://dx.doi.org/10.1038/nature24265>. doi:10.1038/nature24265
- [16] Caceres A, Jene A, Esko T, Perez-Jurado LA, Gonzalez JR. Extreme downregulation of chromosome Y and Alzheimer’s disease in men. *Neurobiology of Aging*. 2020;90:150.e1-150.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2020.02.003>. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2020.02.003
- [17] McCullough LD, Mirza MA, Xu Y, Bentivegna K, Steffens EB, Ritzel R, Liu F. Stroke sensitivity in the aged: Sex chromosome complement vs. gonadal hormones. *Aging*. 2016;8(7):1432–1441. doi:10.18632/aging.100997
- [18] Pillet LE, Cresto N, Saillour Y, Ghézali G, Bemelmans AP, Livet J, Bienvenu T, Rouach N, Billuart P. The intellectual disability protein Oligophrenin-1 controls astrocyte morphology and migration. *Glia*. 2020;68(9):1729–1742. doi:10.1002/glia.23801
- [19] Zhao D, Mokhtari R, Pedrosa E, Birnbaum R, Zheng D, Lachman HM. Transcriptome analysis of microglia in a mouse model of Rett syndrome: differential expression of genes associated with microglia/macrophage activation and cellular stress. *Molecular Autism*. 2017;8(1):1–12. doi:10.1186/s13229-017-0134-z
- [20] Kahanovitch U, Patterson KC, Hernandez R, Olsen ML. Glial dysfunction in meCP2 deficiency models: Implications for rett syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(15). doi:10.3390/ijms20153813
- [21] Santos-Galindo M, Acáz-Fonseca E, Bellini MJ, Garcia-Segura LM. Sex differences in the inflammatory response of primary astrocytes to lipopolysaccharide. *Biology of Sex Differences*. 2011;2(1). doi:10.1186/2042-6410-2-7
- [22] Hidalgo-Lanussa O, González Santos J, Barreto GE. Sex-specific vulnerabilities in human astrocytes underpin the differential impact of palmitic acid. *Neurobiology of Disease*. 2024;195(March). doi:10.1016/j.nbd.2024.106489
- [23] Jaber SM, Bordt EA, Bhatt NM, Lewis DM, Gerecht S, Fiskum G, Polster BM. Sex differences in the mitochondrial bioenergetics of astrocytes but not microglia at a physiologically relevant brain oxygen tension. *Neurochemistry International*. 2018;117:82–90. doi:10.1016/j.neuint.2017.09.003
- [24] Krawczyk MC, Haney JR, Pan L, Caneda C, Khankan RR, Reyes SD, Chang JW, Morselli M, Vinters H V., Wang AC, et al. Human Astrocytes Exhibit Tumor Microenvironment-, Age-, and Sex-Related Transcriptomic Signatures. *Journal of Neuroscience*. 2022;42(8):1587–1603. doi:10.1523/JNEUROSCI.0407-21.2021

- [25] Burda JE, Sofroniew M V. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*. 2014;81(2):229–248. doi:10.1016/j.neuron.2013.12.034
- [26] Colonna M, Butovsky O. Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. *Annual Review of Immunology*. 2017;35:441–468. doi:10.1146/annurev-immunol-051116-052358
- [27] Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Münch AE, Chung WS, Peterson TC, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017;541(7638):481–487. doi:10.1038/nature21029
- [28] Sofroniew M V. Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. *Trends in Immunology*. 2020;41(9):758–770. doi:10.1016/j.it.2020.07.004
- [29] Verkhatsky A, Butt A, Li B, Illes P, Zorec R, Semyanov A, Tang Y, Sofroniew M V. Astrocytes in human central nervous system diseases: a frontier for new therapies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2023;8(1). doi:10.1038/s41392-023-01628-9
- [30] Mead RJ, Shan N, Reiser HJ, Marshall F, Shaw PJ. Amyotrophic lateral sclerosis: a neurodegenerative disorder poised for successful therapeutic translation. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2023;22(March 2023). doi:10.1038/s41573-022-00612-2
- [31] Verkhatsky A, Semyanov A. Astrocytes in Ageing. In: *Subcellular Biochemistry*. Vol. 103. Springer Science and Business Media B.V.; 2023. p. 253–277. doi:10.1007/978-3-031-26576-1_11
- [32] 21 de junio: Día Mundial de la Lucha contra la ELA | MSP. 2023 [accessed 2025 Mar 9]. <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/noticias/21-junio-dia-mundial-lucha-contra-ela>
- [33] Obermann M, Lyon M. Financial cost of amyotrophic lateral sclerosis: A case study. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*. 2015;16(1–2):54–57. doi:10.3109/21678421.2014.951946
- [34] Yamanaka K, Komine O. The multi-dimensional roles of astrocytes in ALS. *Neuroscience Research*. 2018;126:31–38. doi:10.1016/j.neures.2017.09.011
- [35] Gupta D, Vagha S, Dhingra H, Shirsath H. Advances in Understanding and Treating Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): A Comprehensive Review. *Cureus*. 2023 Nov 12. doi:10.7759/cureus.48691
- [36] Ferrer I. Diversity of astroglial responses across human neurodegenerative disorders and brain aging. *Brain Pathology*. 2017;27(5):645–674. doi:10.1111/bpa.12538
- [37] Chisholm NC, Sohrabji F. Astrocytic response to cerebral ischemia is influenced by sex differences and impaired by aging. *Neurobiology of Disease*. 2015;85:245–253. doi:10.1016/j.nbd.2015.03.028
- [38] Al-Chalabi A, Calvo A, Chio A, Colville S, Ellis CM, Hardiman O, Heverin M, Howard RS, Huisman MHB, Keren N, et al. Analysis of amyotrophic lateral sclerosis as a multistep process: a population-based modelling study. *The Lancet Neurology*. 2014;13(11):1108–1113. [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70219-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70219-4). doi:10.1016/S1474-4422(14)70219-4

- [39] Manjaly ZR, Scott KM, Abhinav K, Wijesekera L, Ganesalingam J, Goldstein LH, Janssen A, Dougherty A, Willey E, Stanton BR, et al. The sex ratio in amyotrophic lateral sclerosis: A population based study. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2010;11(5):439–442. doi:10.3109/17482961003610853
- [40] McCauley ME, Baloh RH. Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. *Acta Neuropathologica*. 2018;137(5):715–730. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1933-9>. doi:10.1007/s00401-018-1933-9
- [41] Izrael M, Slutsky SG, Revel M. Rising Stars: Astrocytes as a Therapeutic Target for ALS Disease. *Frontiers in Neuroscience*. 2020;14. doi:10.3389/fnins.2020.00824
- [42] Díaz-Amarilla P, Olivera-Bravo S, Trias E, Cragolini A, Martínez-Palma L, Cassina P, Beckman J, Barbeito L. Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(44):18126–18131. doi:10.1073/pnas.1110689108
- [43] Papadeas ST, Kraig SE, O'Banion C, Lepore AC, Maragakis NJ. Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1 G93A) mutation induce wild-type motor neuron degeneration in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(43):17803–17808. doi:10.1073/pnas.1103141108
- [44] Veyrat-Durebex C, Corcia P, Piver E, Devos D, Dangoumau A, Gouel F, Vourc'h P, Emond P, Laumonnier F, Nadal-Desbarats L, et al. Disruption of TCA Cycle and Glutamate Metabolism Identified by Metabolomics in an In Vitro Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Molecular Neurobiology*. 2016;53(10):6910–6924. doi:10.1007/s12035-015-9567-6
- [45] Kato S. Amyotrophic lateral sclerosis models and human neuropathology: similarities and differences. 2008:97–114. doi:10.1007/s00401-007-0308-4
- [46] Patani R, Hardingham GE, Liddelow SA. Functional roles of reactive astrocytes in neuroinflammation and neurodegeneration. *Nature Reviews Neurology*. 2023;19(7):395–409. doi:10.1038/s41582-023-00822-1
- [47] Labib D, Wang Z, Prakash P, Zimmer M, Smith MD, Frazel PW, Barbar L, Sapor ML, Calabresi PA, Peng J, et al. Proteomic Alterations and Novel Markers of Neurotoxic Reactive Astrocytes in Human Induced Pluripotent Stem Cell Models. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2022;15(May). doi:10.3389/fnmol.2022.870085
- [48] Barbar L, Jain T, Zimmer M, Kruglikov I, Sadick JS, Wang M, Kalpana K, Rose IVL, Burstein SR, Rusielewicz T, et al. CD49f Is a Novel Marker of Functional and Reactive Human iPSC-Derived Astrocytes. *Neuron*. 2020;107(3):436-453.e12. doi:10.1016/j.neuron.2020.05.014
- [49] Braems E, Tziortzouda P, Bosch L Van Den. Exploring the alternative: Fish, flies and worms as preclinical models for ALS. *Neuroscience Letters*. 2021;759(June):136041. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136041>. doi:10.1016/j.neulet.2021.136041
- [50] Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*. 1994;264(5166):1772–1775. doi:10.1126/science.8209258

- [51] Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, et al. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(3):1604–1609. doi:10.1073/pnas.032539299
- [52] Musarò A. State of the art and the dark side of amyotrophic lateral sclerosis. *World Journal of Biological Chemistry*. 2010;1(5):62. doi:10.4331/wjbc.v1.i5.62
- [53] Mcleod VM, Chiam MDF, Lau CL, Rupasinghe TW, Boon WC, Turner BJ. Dysregulation of steroid hormone receptors in motor neurons and glia associates with disease progression in ALS mice. 2020. <https://academic.oup.com/endo/article-abstract/doi/10.1210/endo/bqaa113/5867502>. doi:10.1210/endo/bqaa113/5867502
- [54] MacLean M, Juraneck J, Cuddapah S, López-Díez R, Ruiz HH, Hu J, Frye L, Li H, Gugger PF, Schmidt AM. Microglia RAGE exacerbates the progression of neurodegeneration within the SOD1 G93A murine model of amyotrophic lateral sclerosis in a sex-dependent manner. *Journal of Neuroinflammation*. 2021;18(1). doi:10.1186/s12974-021-02191-2
- [55] Castro MB, Ferreira BK, Cararo JH, Chipindo AE, Magenis ML, Michels M, Danielski LG, de Oliveira MR, Ferreira GC, Streck EL, et al. Evidence of oxidative stress in brain and liver of young rats submitted to experimental galactosemia. *Metabolic Brain Disease*. 2016;31(6):1381–1390. doi:10.1007/s11011-016-9865-3
- [56] Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM. Classic Galactosemia and Clinical Variant Galactosemia. 2000.
- [57] Rodrigues AF, Biasibetti H, Zanotto BS, Sanches EF, Schmitz F, Nunes VT, Pierozan P, Manfredini V, Magro DDD, Netto CA, et al. D-Galactose Causes Motor Coordination Impairment, and Histological and Biochemical Changes in the Cerebellum of Rats. *Molecular Neurobiology*. 2016;54(6):4127–4137. doi:10.1007/s12035-016-9981-4
- [58] Anand KV, Mohamed Jaabir MS, Thomas PA, Geraldine P. Protective role of chrysin against oxidative stress in d-galactose-induced aging in an experimental rat model. *Geriatrics and Gerontology International*. 2012;12(4):741–750. doi:10.1111/j.1447-0594.2012.00843.x
- [59] Augusto-Oliveira M, Arrifano GP, Takeda PY, Lopes-Araújo A, Santos-Sacramento L, Anthony DC, Verkhatsky A, Crespo-Lopez ME. Astroglia-specific contributions to the regulation of synapses, cognition and behaviour. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2020;118(May):331–357. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.07.039>. doi:10.1016/j.neubiorev.2020.07.039
- [60] Tang T, Hu L, Liu Y, Fu X, Li J, Yan F, Cao S, Chen G. Sex-Associated Differences in Neurovascular Dysfunction During Ischemic Stroke. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2022;15. doi:10.3389/fnmol.2022.860959
- [61] Cashman NR, Durham HD, Krzysztof Blusztajn J, Oda K, Tabira T, Shaw IT, Dahrouge S, Antel JP. Neuroblastoma x Spinal Cord (NSC) Hybrid Cell Lines Resemble Developing Motor Neurons. 1992.
- [62] Torres F. Optimización de un modelo preclínico para estudio de daño agudo al sistema nervioso por consumo de sustancias. Universidad ORT Uruguay Facultad de Ingeniería; 2024.

- [63] Isasi E. Alteraciones de la barrera hematoencefálica y de la sustancia blanca en un modelo experimental de Acidemia Glutárica tipo I [PEDECIBA Biología Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas Sub-área Neurociencias]. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable; 2013.
- [64] Herbig MA. Maintenance of the rat transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis expressing human SOD1 G93A mutation. 2006.
- [65] Dahlborn K, Bugnon P, Nevalainen T, Raspa M, Verboost P, Spangenberg E. Report of the federation of european laboratory animal science associations working group on animal identification. *Laboratory Animals*. 2013;47(1):2–11. doi:10.1177/002367712473290
- [66] Echeverry C, Arredondo F, Martínez M, Abin-Carriquiry JA, Midiwo J, Dajas F. Antioxidant Activity, Cellular Bioavailability, and Iron and Calcium Management of Neuroprotective and Nonneuroprotective Flavones. *Neurotoxicity Research*. 2015;27(1):31–42. doi:10.1007/s12640-014-9483-y
- [67] Korenic A, Boltze J, Deten A, Peters M, Andjus P, Radenovic L. Astrocytic mitochondrial membrane hyperpolarization following extended oxygen and glucose deprivation. *PLoS ONE*. 2014;9(2). doi:10.1371/journal.pone.0090697
- [68] Otero G, Bolatto C, Isasi E, Cerri S, Rodríguez P, Boragno D, Marco M, Parada C, Stancov M, Cuitinho MN, et al. Adult aberrant astrocytes submitted to late passage cultivation lost differentiation markers and decreased their pro-inflammatory profile. *Heliyon*. 2024;10(9). doi:10.1016/j.heliyon.2024.e30360
- [69] Alarcón-Aguilar A, González-Puertos VY, Luna-López A, López-Macay A, Morán J, Santamaría A, Königsberg M. Comparing the effects of two neurotoxins in cortical astrocytes obtained from rats of different ages: Involvement of oxidative damage. *Journal of Applied Toxicology*. 2014;34(2):127–138. doi:10.1002/jat.2841
- [70] Sánchez NS, Königsberg M. Using yeast to easily determine mitochondrial functionality with 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2006;34(3):209–212. doi:10.1002/bmb.2006.49403403209
- [71] Olivera-Bravo S, Bolatto C, Otero Damianovich G, Stancov M, Cerri S, Rodríguez P, Boragno D, Hernández Mir K, Cuitiño MN, Larrambere F, et al. Neuroprotective effects of violacein in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Scientific Reports*. 2022;12(1). doi:10.1038/s41598-022-06470-7
- [72] Silva FSG, Starostina IG, Ivanova V V., Rizvanov AA, Oliveira PJ, Pereira SP. Determination of metabolic viability and cell mass using a tandem resazurin/sulforhodamine B assay. *Current Protocols in Toxicology*. 2016;2016(January):1–15. doi:10.1002/cptx.1
- [73] Carreira RB. Evaluation of antioxidant effects of mitochondria-targeted polyphenolic agents in Human Skin Fibroblasts. 2019. <http://hdl.handle.net/10316/86587>
- [74] Neikirk K, Marshall AG, Kula B, Smith N, LeBlanc S, Hinton A. MitoTracker: A useful tool in need of better alternatives. *European Journal of Cell Biology*. 2023;102(4):151371. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2023.151371>. doi:10.1016/j.ejcb.2023.151371

- [75] Jiménez-Riani M, Díaz-Amarilla P, Isasi E, Casanova G, Barbeito L, Olivera-Bravo S. Ultrastructural features of aberrant glial cells isolated from the spinal cord of paralytic rats expressing the amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1G93A mutation. *Cell and Tissue Research*. 2017;370(3):391–401. doi:10.1007/s00441-017-2681-1
- [76] Isasi E, Korte N, Abudara V, Attwell D, Olivera-Bravo S. Glutaric Acid Affects Pericyte Contractility and Migration: Possible Implications for GA-I Pathogenesis. *Molecular Neurobiology*. 2019;56(11):7694–7707. doi:10.1007/s12035-019-1620-4
- [77] Kumar M, Keady J, Aryal SP, Hessing M, Richards CI, Turner JR. The Role of Microglia in Sex- and Region-Specific Blood-Brain Barrier Integrity During Nicotine Withdrawal. *Biological Psychiatry Global Open Science*. 2024;4(1):182–193. <https://doi.org/10.1016/j.bpsgos.2023.08.019>. doi:10.1016/j.bpsgos.2023.08.019
- [78] Roemgens A, Singh S, Beyer C, Arnold S. Inducers of chemical hypoxia act in a gender- and brain region-specific manner on primary astrocyte viability and cytochrome c oxidase. *Neurotoxicity Research*. 2011;20(1):1–14. doi:10.1007/s12640-010-9213-z
- [79] Giordano G, Tait L, Furlong CE, Cole TB, Kavanagh TJ, Costa LG. GENDER DIFFERENCES IN BRAIN SUSCEPTIBILITY TO OXIDATIVE STRESS ARE MEDIATED BY LEVELS OF PARAOXONASE-2 (PON2) EXPRESSION. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014;58:98–108. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.019.GENDER
- [80] Liu M, Oyarzabal EA, Yang R, Murphy SJ, Hurn PD. A novel method for assessing sex-specific and genotype-specific response to injury in astrocyte culture. *Journal of Neuroscience Methods*. 2008;171(2):214–217. doi:10.1016/j.jneumeth.2008.03.002
- [81] Bellaver B, Bobermin LD, Souza DG, Rodrigues MDN, de Assis AM, Wajner M, Gonçalves CA, Souza DO, Quincozes-Santos A. Signaling mechanisms underlying the glioprotective effects of resveratrol against mitochondrial dysfunction. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2016;1862(9):1827–1838. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.06.018>. doi:10.1016/j.bbadis.2016.06.018
- [82] Sodium Azide - PubChem. [accessed 2025 Feb 1]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-Azide>
- [83] Wang Z, Li DD, Liang YY, Wang DS, Cai NS. Activation of astrocytes by advanced glycation end products: Cytokines induction and nitric oxide release. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2002;23(11):974–980.
- [84] Zhou Y, Dong Y, Xu Q, He Y, Tian S, Zhu S, Zhu Y, Dong X. Mussel oligopeptides ameliorate cognition deficit and attenuate brain senescence in d-galactose-induced aging mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2013;59:412–420. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.009>. doi:10.1016/j.fct.2013.06.009
- [85] Baeta-Corral R, Castro-Fuentes R, Giménez-Llort L. Sexual Dimorphism in the Behavioral Responses and the Immunoendocrine Status in d-Galactose-Induced Aging. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*. 2018;73(9):1147–1157. doi:10.1093/gerona/gly031

- [86] Li J, Liu D, Sun L, Lu Y, Zhang Z. Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: Mechanisms and perspective. *Journal of the Neurological Sciences*. 2012;317(1–2):1–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2012.02.018>. doi:10.1016/j.jns.2012.02.018
- [87] Ho SC, Liu JH, Wu RY. Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose. *Biogerontology*. 2003;4(1):15–18. doi:10.1023/A:1022417102206
- [88] Sadigh-Eteghad S, Majdi A, McCann SK, Mahmoudi J, Vafaei MS, Macleod MR. D-galactose-induced brain ageing model: A systematic review and meta-analysis on cognitive outcomes and oxidative stress indices. *PLoS one*. 2017;12(12):e0190328. doi:10.1371/journal.pone.0190328
- [89] Baldwin KT, Murai KK, Khakh BS. Astrocyte morphology. *Trends in Cell Biology*. 2024;34(7):547–565. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.09.006>. doi:10.1016/j.tcb.2023.09.006
- [90] Zhang P, Xing K, Randazzo J, Blessing K, Lou MF, Kador PF. Osmotic stress, not aldose reductase activity, directly induces growth factors and MAPK signaling changes during sugar cataract formation. *Experimental Eye Research*. 2012;101:36–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2012.05.007>. doi:10.1016/j.exer.2012.05.007
- [91] Shen Y, Gao H, Shi X, Wang N, Ai D, Li J, Ouyang L, Yang J, Tian Y, Lu J. Glutamine synthetase plays a role in d-galactose-induced astrocyte aging in vitro and in vivo. *Experimental Gerontology*. 2014;58:166–173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2014.08.006>. doi:10.1016/j.exger.2014.08.006
- [92] Hao L, Huang H, Gao J, Marshall C, Chen Y, Xiao M. The influence of gender, age and treatment time on brain oxidative stress and memory impairment induced by D-galactose in mice. *Neuroscience Letters*. 2014;571:45–49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2014.04.038>. doi:10.1016/j.neulet.2014.04.038
- [93] Lei M, Hua X, Xiao M, Ding J, Han Q, Hu G. Impairments of astrocytes are involved in the d-galactose-induced brain aging. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008;369(4):1082–1087. doi:10.1016/j.bbrc.2008.02.151
- [94] Xu X, Shen X, Wang J, Feng W, Wang M, Miao X, Wu Q, Wu L, Wang X, Ma Y, et al. YAP prevents premature senescence of astrocytes and cognitive decline of Alzheimer’s disease through regulating CDK6 signaling. *Aging Cell*. 2021;20(9):1–16. doi:10.1111/ace.13465
- [95] Kumar A, Dogra S, Prakash A. Effect of carvedilol on behavioral, mitochondrial dysfunction, and oxidative damage against d-galactose induced senescence in mice. *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology*. 2009;380(5):431–441. doi:10.1007/s00210-009-0442-8
- [96] Parameshwaran K, Irwin MH, Steliou K, Pinkert CA. D-galactose effectiveness in modeling aging and therapeutic antioxidant treatment in mice. *Rejuvenation Research*. 2010;13(6):729–735. doi:10.1089/rej.2010.1020
- [97] Santos-Galindo M. LA RESPUESTA GLIAL A ESTÍMULOS INFLAMATORIOS: DIFERENCIAS SEXUALES Y REGULACIÓN POR MODULADORES DE LA ESTEROIDOGENESIS Y COMPUESTOS ESTROGÉNICOS. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID; 2012.
- [98] Acáz Fonseca E. Diferencias sexuales y regulación de la ruta de Notch durante la gliosis reactiva. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID; 2015.

- [99] Uttara B, Singh A V, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. 2009.
- [100] Chatterjee S, Noack H, Possel H, Keilhoff G, Wolf G. Glutathione Levels in Primary Glial Cultures: Monochlorobimane Provides Evidence of Cell Type-Specific Distribution. 1999.
- [101] Pérez-Sala D, Pajares MA. Appraising the Role of Astrocytes as Suppliers of Neuronal Glutathione Precursors. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(9). doi:10.3390/ijms24098059
- [102] Kaur SJ, McKeown SR, Rashid S. Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene*. 2016;577(2):109–118. doi:10.1016/j.gene.2015.11.049
- [103] Zhao J, Wang X, Huo Z, Chen Y, Liu J, Zhao Z, Meng F, Su Q, Bao W, Zhang L, et al. The Impact of Mitochondrial Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells*. 2022;11(13). doi:10.3390/cells11132049
- [104] Iijima T. Mitochondrial membrane potential and ischemic neuronal death. *Neuroscience Research*. 2006;55(3):234–243. doi:10.1016/j.neures.2006.04.005
- [105] Robb SJ, Robb-Gaspers LD, Scaduto RC, Thomas AP, Connor JR. Influence of Calcium and Iron on Cell Death and Mitochondrial Function in Oxidatively Stressed Astrocytes. 1999.
- [106] Buckman JF, Ne Hernández H, Kress GJ, Votyakova T V, Pal S, Reynolds IJ. MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: influence of mitochondrial membrane potential and oxidants. 2001. www.elsevier.com/locate/jneumeth
- [107] Cookson MR, Ince PG, Shaw PJ. Peroxynitrite and hydrogen peroxide induced cell death in the NSC34 neuroblastoma x spinal cord cell line: Role of poly (ADP-ribose) polymerase. *Journal of Neurochemistry*. 1998;70(2):501–508. doi:10.1046/j.1471-4159.1998.70020501.x
- [108] Hemendinger RA, Armstrong EJ, Radio N, Brooks BR. Neurotoxic injury pathways in differentiated mouse motor neuron-neuroblastoma hybrid (NSC-34D) cells in vitro-Limited effect of riluzole on thapsigargin, but not staurosporine, hydrogen peroxide and homocysteine neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2012;258(2):208–215. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2011.10.022>. doi:10.1016/j.taap.2011.10.022

11. Anexo 1

Optimización y caracterización de modelo experimental de interacción astrocitos-motoneuronas

11.1. Optimización del cultivo de células NSC-34 y evaluación de su respuesta frente al daño oxidativo

En último lugar, se buscó obtener resultados preliminares que luego permitan desarrollar y optimizar un modelo experimental para estudiar la interacción astrocitos y motoneuronas en un modelo más asimilable a lo que ocurre en la patología *in vivo*. Para alcanzar este propósito, se realizaron cultivos de células gliales obtenidas de una rata macho SOD1G93A en estado terminal, y se co-cultivaron células de la línea NSC-34 comercial que fueran desarrolladas por Cashman et al. (1992) [61], mediante la fusión entre motoneuronas de médula espinal y células de neuroblastoma. En primer lugar, se caracterizó la morfología y respuesta al daño oxidativo de la línea celular NSC-34, como se puede observar en las Figuras 32 y 33.

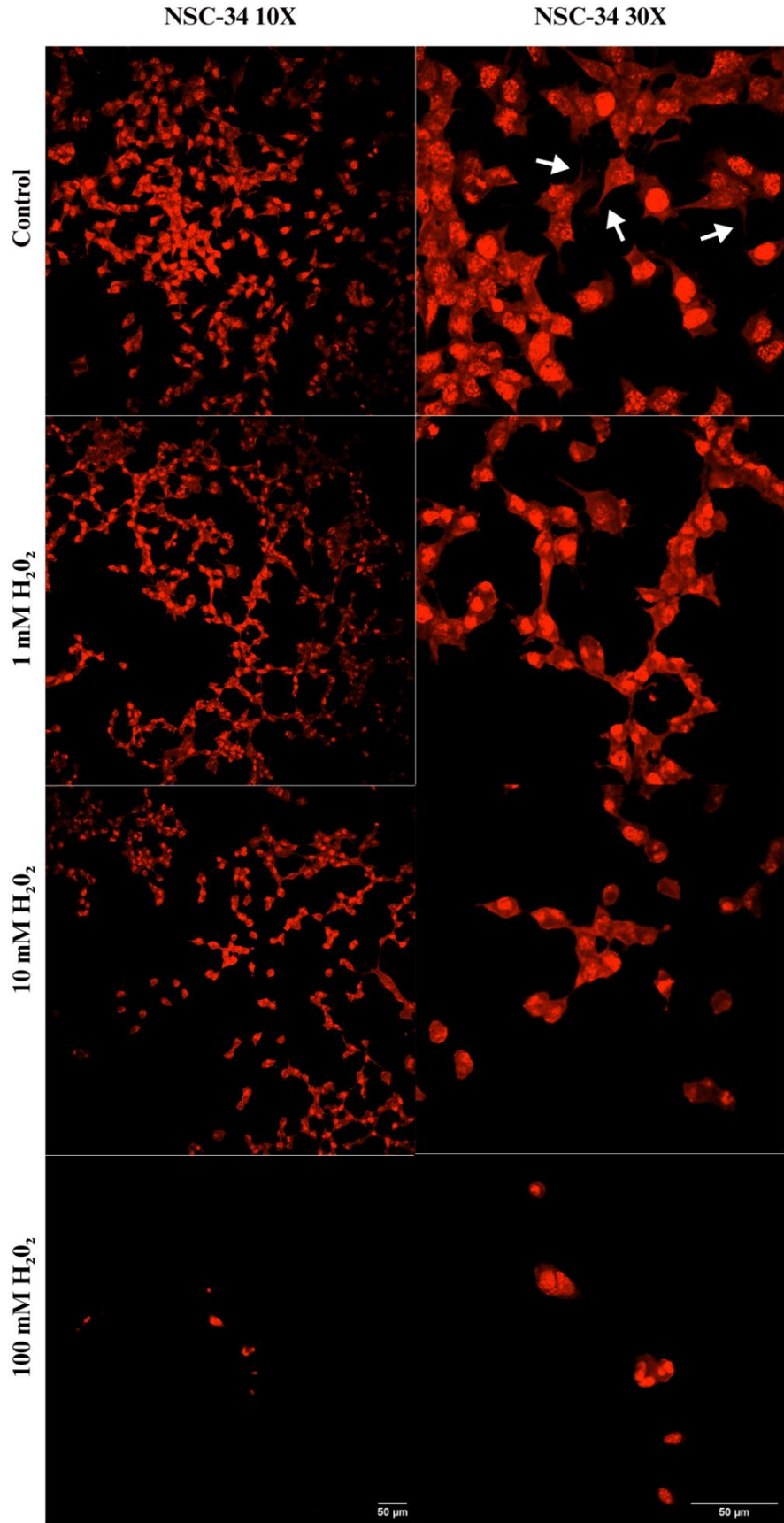


Figura 32. Viabilidad y morfología de motoneuronas NSC-34 control y ante diferentes concentraciones de H₂O₂. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal Zeiss 800 con la fluorescencia de SRB en el espectro del rojo lejano y evidencian la disminución significativa del número de células a medida que las concentraciones de H₂O₂ aumenta. También se muestra, aunque en menor medida, algunas diferencias funcionales, tales como la pérdida de procesos celulares observados en el control (señalizados por flechas blancas). Se tomaron 10 campos de cada tratamiento y las imágenes son representativas de 2 experimentos independientes.

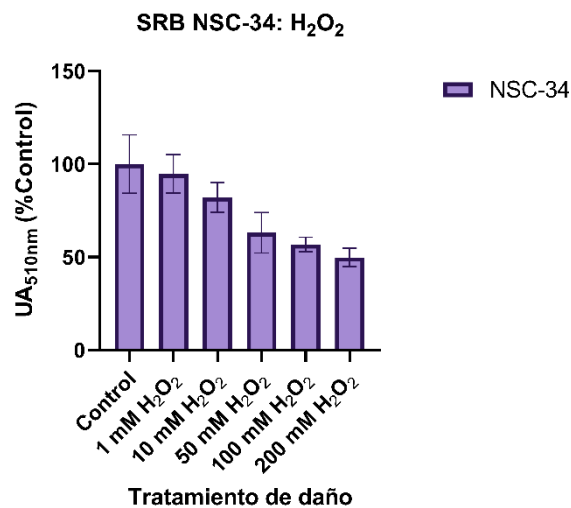


Figura 33. Efectos del peróxido de hidrógeno en la viabilidad de motoneuronas NSC-34. Los resultados fueron obtenidos empleando el ensayo de SRB con los datos normalizados al 100% del control. muestran una tendencia a la disminución en la sobrevivencia. Para cada condición de daño se presenta la media \pm desviación estándar (n=8, 2 experimentos independientes).

Como se observa en la Figura 32, las motoneuronas NSC-34 en condiciones control presentan una morfología y tamaño uniforme, con cuerpos celulares redondeados, y prolongaciones cortas (señalizadas por flechas blancas en Figura 32). En condiciones control las motoneuronas presentan cromatina condensada que aparece como un puntillado nuclear de señal intensa de SRB, lo que indica un estado de proliferación celular activo. A medida que aumenta el daño oxidativo inducido por el peróxido, se observa una disminución de la proliferación, una morfología más redondeada, y procesos retraídos. Este efecto morfológico es concordante con estudios previos [107] que

reportan una disminución de viabilidad dependiente de la dosis tal como fue observado en Figura 32, con morfología retraída y condensación nuclear. Este efecto va en aumento y en condiciones de daño de 100 mM de peróxido se observa una muerte masiva de las motoneuronas (Figura 32). Este resultado coincide con la viabilidad cuantificada en la Figura 33 hasta 10 mM, donde el daño disminuye la viabilidad pero no de manera drástica. Comparando la viabilidad entre condiciones control y condiciones de daño agudo severo como 100-200 mM de peróxido se determina que la muerte celular tiene significación estadística (####, $p = <0,0001$). Sin embargo, en Figura 33 se observa una disminución muy leve de viabilidad a partir de 100 mM de peróxido. En las concentraciones mayores a 100 mM de peróxido no coincide la señal de un 50% aproximadamente de viabilidad (Figura 33) con la cantidad de células viables marcadas por microscopía confocal que claramente muestra una muerte masiva a 100 mM (Figura 32), lo que confirma lo previamente discutido en cultivos astrocitarios que el límite inferior de detección de absorbancia de la técnica SRB el cual no logra diferenciar daños mayores a los correspondientes a 100 mM de peróxido.

La literatura reporta que la muerte en NSC-34 por peróxido sigue los mismos mecanismos que por astrocitos, el peróxido induce estrés oxidativo lo que resulta en un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad antioxidante celular. Hemendinger et al. (2012) [108] reportó una viabilidad de aproximadamente 50% con un tratamiento de 100 μ M durante 24 h, un efecto comparable a la exposición realizada de daño agudo por 1 h en concentraciones de 50 mM reportada en Figura 33. Una vez establecido el efecto del daño oxidativo en motoneuronas, se evaluó si su co-cultivo con astrocitos aberrantes provenientes de una rata SOD1G93A en estado terminal presentaba esta misma tendencia.

11.2. Optimización del co-cultivo de células NSC-34 y evaluación de su respuesta frente al daño oxidativo

El co-cultivo realizado permitió obtener resultados preliminares para estudiar la repercusión que tiene el daño de los astrocitos aberrantes del modelo SOD1G93A en las motoneuronas de médula espinal en condiciones de daño al SNC.

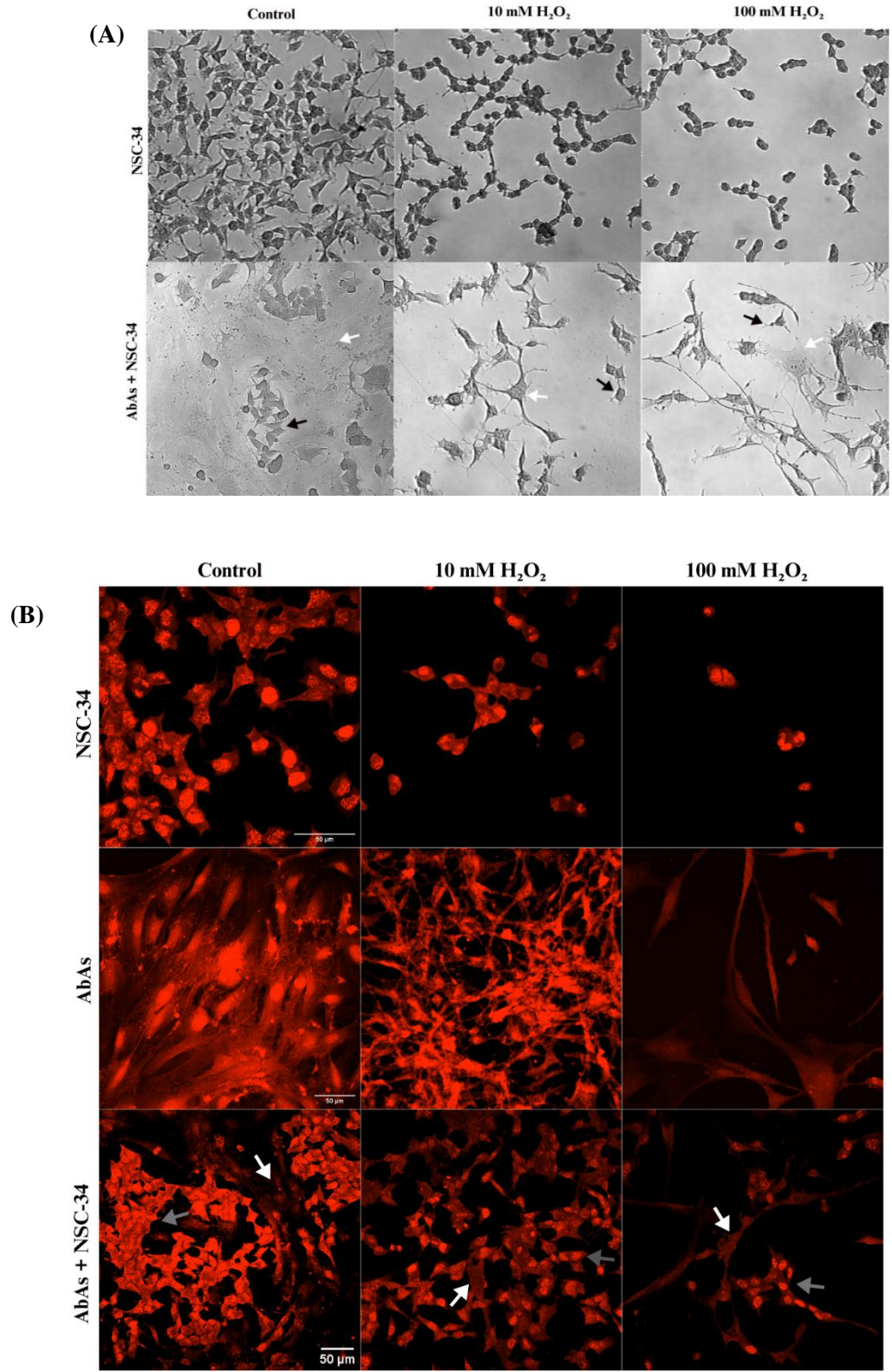


Figura 34. Viabilidad y morfología del co-cultivo NSC-34 y astrocitos aberrantes en condiciones control y ante diferentes concentraciones de H₂O₂. (A). Las imágenes de campo

claro muestran las células NSC-34 (señaladas por flechas negras) aisladas y en co-cultivo con los astrocitos aberrantes (AbAs, señaladas por flechas blancas) provenientes de rata SOD1G93A. Magnificación: 20X. **(B)**. El panel de imágenes fluorescentes muestra la señal de SRB de motoneuronas NSC-34 aisladas, AbAs aisladas, y co-cultivo de motoneuronas NSC-34 (señalizadas por flechas grises) junto a AbAs (señalizadas por flechas blancas) en las diferentes condiciones experimentales. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Zeiss 800. Se tomaron 10 campos de cada tratamiento y las imágenes son representativas de 2 experimentos independientes.

En cuanto a morfología, en la Figura 34 se observa una clara diferencia entre las motoneuronas NSC-34 (con sus cuerpos celulares redondeados y prolongaciones cortas) y los astrocitos aberrantes, los cuales tienen una morfología elongada y muy plana que tiende a estrellarse y emitir prolongaciones irregulares y ramificadas en respuesta al daño. Se evidencia que los astrocitos son aberrantes ya que los astrocitos sanos WT crecen en monocapa con dominios definidos, mientras que las AbAs SOD crecen con un patrón de múltiples capas aplanadas con dominios celulares solapados, con acúmulos y gránulos. En condiciones control, las AbAs presentan una hipertrofia marcada, y ante un daño oxidativo de 10-100 mM de peróxido comienzan a presentar procesos retraídos y una disminución de proliferación (Figura 34).

En condiciones control del co-cultivo se observa que las motoneuronas tienen un crecimiento limitado por los dominios de las AbAs en la matriz, lo que se caracteriza como una baja permisividad de las AbAs. En condiciones de daño oxidativo extremo (100 mM de peróxido), las AbAs presentan una muerte masiva pero las motoneuronas mantienen cierto nivel de viabilidad, lo que puede explicarse por una alteración de sobrevida mediada por AbAs. Otros estudios han reportado resultados concordantes sobre el rol de las AbAs en la promoción del daño a las motoneuronas en un modelo de ELA [42], donde los astrocitos aislados de la médula espinal de rata SOD1G93A sintomáticas (como las utilizadas en este experimento) promovían el daño a las motoneuronas. Como se puede observar en la Figura 34, este estudio determinó que las AbAs exhiben una pérdida permanente de inhibición por contacto [42]. Considerando que las AbAs presentan una toxicidad selectiva hacia las motoneuronas espinales, una alta tasa de proliferación, y un potencial mitocondrial alterado [42], como perspectiva a futuro sería relevante evaluar si ratas

hembras SOD1G93A sintomáticas en estado terminal como la macho utilizada en este experimento presentan esta tendencia neurotóxica frente a las mismas concentraciones de daño oxidativo.