

Tesis Doctoral

Investigación del rol de los ácidos disiálicos en el sistema nervioso central

Rinflerch, Adriana Raquel

2013

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rinflerch, Adriana Raquel. (2013). Investigación del rol de los ácidos disiálicos en el sistema nervioso central. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Rinflerch, Adriana Raquel. "Investigación del rol de los ácidos disiálicos en el sistema nervioso central". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Investigación del rol de los ácidos disiálicos en el sistema nervioso central.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas.

Adriana Raquel Rinflerch

Directores de tesis

Pablo F. Argibay

Rosa Muchnik de Lederkremer

Consejero de Estudios

Norberto D. Iusem

Lugar de Trabajo

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental (ICBME), Hospital Italiano de Buenos Aires

Buenos Aires, Agosto de 2013

A mi familia y a los amigos que
siempre estuvieron, que siguen
estando, y a los que encontré en el
camino.

A mis directores, Pablo
Argibay, por la confianza, guía y
apoyo tanto en lo científico como
en lo humano.

A Rosa Muchnik de
Lederkremer, por el seguimiento y
apoyo incondicional.

Investigación del rol de los ácidos disiálicos en el sistema nervioso central.

La neuroglicobiología es la disciplina que se ocupa de elucidar el rol de los glicanos en el sistema nervioso central (SNC). El ácido siálico o ácido N-acetilneuramínico es un monosacárido cargado negativamente con funciones importantes en el SNC. Fundamentalmente han sido estudiados los ácidos polisíálicos, a los que se ha atribuido un rol importante en la señalización y migración celular durante el desarrollo del SNC. Poco se ha investigado acerca de la ubicación y rol de los ácidos disiálicos (DiSia) en el SNC.

Por este motivo, elegimos como objetivo de esta Tesis por un lado identificar la localización de los DiSia en el SNC en diferentes etapas del desarrollo postnatal de ratones y, por otra parte, elucidar la potencial función de estas moléculas en relación a la conducta.

Inicialmente se determinaron la intensidad de expresión del epítipo DiSia y la expresión de los genes de las sialiltransferasas en distintas estructuras cerebrales de ratones C57BL/6, durante los estadios del desarrollo (neonato, adulto y senil). Si bien, los niveles del epítipo DiSia y de ARNm de ST8SiaIII se mantienen constantes en el hipocampo, bulbo olfatorio y corteza, es interesante destacar que disminuyen en cerebelo gradualmente desde los estadios neonatales hasta los seniles.

En una segunda etapa, con el fin de elucidar preliminarmente el potencial rol de la enzima ST8SiaIII en el cerebelo (donde se comporta diferencialmente), se inhibieron sus niveles postranscripcionalmente, mediante inyección estereotáxica de ARN de interferencia (ARNi). Se evaluó la conducta en la prueba de laberinto en T, relacionada con la correcta actividad cerebelosa. Los ratones en los que efectivamente se inhibió la transcripción de ST8Sia III durante los primeros días después del tratamiento mostraron bajo rendimiento en el laberinto en T (disminución de la alternancia entre brazos), sobre todo en edades más avanzadas. Estos resultados se corresponden con los cambios morfológicos observados histológicamente (degeneración del neuropilo), en el cerebelo de los animales transfectados.

En esta tesis se presentan varios resultados originales:

- Si bien los DiSia se hallan distribuidos en forma equivalente en las diferentes estructuras estudiadas y en diferentes etapas de la vida, el cerebelo presenta una

expresión diferencial tanto de ST8SiaIII como del epítopo disialilado, siendo dicha expresión menor en los animales seniles.

- En el cerebelo la inhibición transitoria de ST8SiaIII y del epítope DiSia, en etapas tempranas del desarrollo, parecen corresponder con alteraciones morfológicas y conductuales.

Estos resultados abren el camino a futuras líneas de investigación tanto de interés en ciencias básicas como en neurología clínica.

Palabras claves: ácidos disialílicos, sialiltransferasas, sistema nervioso central, ST8SiaIII, cerebelo.

Study of the disialic acid role in the central nervous system.

Neuroglycobiology is the field that aims to elucidate the role of the glycans in the central nervous system (CNS). The sialic acid or N-acetylneuraminic acid is a negatively charged monosaccharide with important functions in the CNS. Mainly, polysialic acids have been studied and an important role in cellular signaling and migration during the development of the CNS has been found. But, little is known about the location and function of disialic acids (DiSia) in the CNS.

Taking this in consideration, the goals of this dissertation are, in one hand, to identify the location of the DiSia in the CNS during different stages of the postnatal development in mice, and on the other hand, elucidate the potential function of these molecules in relation to behavior.

In the first place, the intensity of DiSia epitope expression and sialyltransferases gene expression in different brain regions of C57BL/6 mice, during different developmental stages (newborn, adult and senile) were determined. Even though, DiSia epitope and ST8SiaIII levels remain constant in the hippocampus, olfactory bulb and cortex, it is interesting to note that these levels gradually decrease in the cerebellum, from newborn to senile mice.

In the second place, the aim was to elucidate the potential role of the ST8SiaIII enzyme in the cerebellum (where a differential expression was found). In this direction, ST8SiaIII levels were post-transcriptionally inhibited through a stereotaxic injection of interference RNA (RNAi). Behavior related to the cerebellum activity was evaluated in the T-maze. Mice, in which the transcription of ST8SiaIII was effectively inhibited, showed a reduced performance in the T-maze (decreased arms alternation) during the first days after treatment, but especially in advanced age. These results correlate with the morphological changes (neurophil degeneration) observed by histological techniques, in the cerebellum of transfected animals.

The present dissertation has several new results:

- Even though DiSia have a constant distribution in the different brain regions and developmental stages, a differential expression of ST8SiaIII and of the disialidated epitope is present in the cerebellum, being that expression lower in senile animals.

- Temporal inhibition of ST8SiaIII and DiSia epitope in the cerebellum, in early developmental stages, seems to correlate with morphological and behavioral alterations.

These results open the way to future lines of research in basic science as well as in clinical neurobiology.

Keywords: disialic acid, sialyltransferases, central nervous system, ST8SiaIII, cerebellum.

Abreviaturas

ADN: ácido desoxiribonucleico

AR: ácido retinoico

ARN: ácido ribonucleico

BSA: bovine serum albumin (albúmina serica bobina)

cDNA: ADN copia

DiSia: ácido disiálico

DTT: ditionitroto

LTD: Long time depresión (depresión a largo plazo)

LTP: Long time potentiation (potenciación a largo plazo)

NANA: ácido N-Acetilneuraminico

NCAM: neural cell adhesion molecule (molécula de adhesión neural)

NB-DGJ: N-Butyldeoxygalactonojirimycin

Neu5Ac: ácido N-Acetilneuraminico

NGF: neural growth factor (factor de crecimiento neural)

ON: Over night (toda la noche)

PAF: paraformaldehido

PBS: Phosphate buffer salino (solución salina con fosfato)

poliSia: ácidos polisiálicos

PST: polisialiltransferasas ST8Sia

pST8: plásmido con secuencia RNAi para ST8SiaIII

RE: retículo endoplasmático

RNAi: interferencia mediada por ARN

SDS: dodecil sulfato sodico

SNC: sistema nervioso central

STX: polisialiltransferasas ST8SiaII

ST8Sia: α 2,8 sialiltransferasa

TBS: Tris buffered saline (solución Tris salino)

TTB: Tris buffered saline con Tween 20 (solución salina con Tris)

Contenido

| | |
|--|-----------|
| Capítulo 1 | 12 |
| Introducción | 12 |
| 1.1. Glicobiología | 13 |
| 1.2 Neuroglicobiología | 18 |
| 1.3. Ácidos siálicos..... | 20 |
| 1.3.1. Ácidos monosíálicos | 20 |
| 1.3.2. Ácidos polisiálicos | 22 |
| 1.3.3. Ácidos disíálicos | 23 |
| 1.3.4. Sialiltransferasas | 24 |
| 1.4. Hipótesis y Objetivos..... | 26 |
| Capítulo 2 | 27 |
| Resultados y Discusión | 27 |
| 2.1. Localización de DiSia, y de la enzima ST8SiaIII mediante técnicas histológicas, en estructuras del SNC de ratones neonatos, adultos y seniles. | 28 |
| 2.1.1. Control en cultivo..... | 28 |
| 2.1.1.1. Inmunomarcación de DiSia y ST8SiaIII en Neuro2A. | 28 |
| 2.1.1.2. Inmunomarcación de DiSia en cultivo primario de cerebro de ratón neonato. | 30 |
| 2.1.2. Análisis de la efectividad del inhibidor de la síntesis de gangliósidos NB-DGJ, en cultivo de células PC12 (Feocromocitoma de rata). | 31 |
| 2.1.3. Inmunomarcación de cortes de cerebro de ratón..... | 33 |
| 2.1.3.1. Inmunomarcación y análisis de la efectividad del inhibidor de la síntesis de gangliósidos NB-DGJ en cortes de cerebro de ratón neonato. | 35 |
| 2.1.3.2. Tratamiento de criosecciones de cerebro de ratón, para hidrólisis selectiva de epitopes glicosilados y sialilados. | 37 |
| 2.1.3.2.1. Hidrólisis ácida para hidrolizar los epitopes sialilados. | 37 |
| 2.1.3.2.2. N-glicanasa y a continuación β -eliminación. | 38 |
| 2.1.3.2.3. N-glicanasa (para hidrolizar los epitopes con enlaces del tipo N- glicosídico). | 38 |
| 2.1.3.2.4. β -eliminación (para eliminar los epitopes con enlaces del tipo O-glicosídico). | 39 |
| 2.2. Localización y cuantificación de ST8SiaIII, mediante técnicas de biología molecular, en las distintas estructuras del sistema nervioso de ratones neonatos, adultos y seniles. | 41 |
| 2.2.1. Semicuantificación relativa de ARN mensajero (ARNm) mediante Reaccion en Cadena de la Polimerasa, en Tiempo Real (RT-PCR). | 41 |
| 2.2.2. Evaluación de la expresión de proteínas (SDS-PAGE y Western blot). | 46 |
| 2.2.3. Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución (HPAEC). | 48 |

| | |
|--|----|
| 2.3. Potencial función de los DiSia en las glicoproteínas de membrana de células neurales in vitro. | 49 |
| 2.3.1. Análisis de la capacidad de las células de expresar un plásmido y silenciar su producto (GFP) mediante RNAi. | 49 |
| 2.3.2. Evaluación de la eficiencia de silenciamiento por parte de las secuencias RNAi en cultivo celular. | 50 |
| 2.3.3. Estimación de la eficiencia de transfección de los plásmidos RNAi. | 51 |
| 2.3.4. Estimación del tiempo requerido en células neurales para la transcripción del plásmido. | 53 |
| 2.3.5. Análisis de los efectos del tratamiento con RNAi para ST8SiaIII en ratones, mediante técnicas de biología molecular e histoquímica. | 54 |
| 2.3.5.1. Análisis de los niveles de ARNm de ST8SiaIII mediante RT-PCR en diferentes estructuras del cerebro de ratones. | 54 |
| 2.3.5.2. Western-blot. | 56 |
| 2.3.5.3. Inmunohistoquímica. | 58 |
| 2.3.5.4. Histoquímica: Tinción de Klüver-Barrera. | 58 |
| 2.3.6. Análisis de los efectos de RNAi para ST8SiaIII en el comportamiento de ratones. | 60 |

Capítulo 3..... 64

Materiales y Métodos 64

| | |
|---|----|
| 3.1. Localización de los DiSia, y de la enzima sialiltransferasa ST8SiaIII a través de técnicas inmunohistoquímica, en estructuras del sistema nervioso de ratones neonatos, adultos y seniles. | 65 |
| 3.1.1. Sujetos experimentales. | 65 |
| 3.1.2. Inmunomarcación para detectar DiSia y ST8SiaIII. | 66 |
| 3.1.2.1. Control positivo para DiSia y localización de ST8SiaIII en cultivo. | 66 |
| 3.1.2.2. Análisis de la efectividad del inhibidor de la síntesis de gangliosidos NB-DGJ en cultivo de células PC12 (Feocromocitoma de rata). | 67 |
| 3.1.2.3. Inmunomarcación de cortes de cerebro de ratón. | 68 |
| 3.1.2.3.1. Inmunomarcación y análisis de la efectividad del inhibidor de la síntesis de gangliosidos NB-DGJ en cortes de cerebro de ratón neonato. | 68 |
| 3.1.2.4. Tratamiento de criosecciones de cerebro de ratón, para hidrólisis selectiva de epitopes glicosilados y sialilados. | 69 |
| 3.1.2.4.1. N-glicanasa (para hidrolizar los epitopes en glicanos con enlaces del tipo N-glicosídico). | 69 |
| 3.1.2.4.2. β -eliminación (para hidrolizar los epitopes en glicanos con enlaces del tipo O-glicosídico). | 70 |
| 3.1.2.4.3. Hidrólisis ácida (para hidrolizar los epitopes sialilados). | 70 |
| 3.1.2.4.4. N-glicanasa y a continuación β -eliminación. | 70 |
| 3.1.2.5. Cultivo primario de cerebro de ratón neonato e inmunomarcación para identificar las células S2-566 positivas. | 70 |
| 3.1.2.6. Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución (HPAEC). | 71 |

| | |
|--|------------|
| 3.1.3. Localización y cuantificación de ST8Sia III, mediante técnicas de biología molecular, en las distintas estructuras del sistema nervioso de ratones neonatos, adultos y seniles. _____ | 71 |
| 3.1.3.1. Extracción de ARN total de estructuras del cerebro de ratón. _____ | 72 |
| 3.1.3.2. Preparación de cADN de hipocampo, bulbo olfatorio, cerebelo y corteza. _____ | 72 |
| 3.1.3.3. Diseño de primers de sialiltransferasas para “Real-Time PCR”. _____ | 72 |
| 3.1.3.4. Real-Time PCR. _____ | 73 |
| 3.1.4. Dot-blot, SDS-PAGE y Western blot _____ | 74 |
| 3.1.4.1. Extracción de glicoproteínas de hipocampo, bulbo olfatorio, cerebelo y corteza. _____ | 74 |
| 3.1.4.2. Dot blot. _____ | 74 |
| 3.1.4.3. SDS-PAGE. _____ | 75 |
| 3.1.5. Análisis estadístico y correlación de la presencia y los niveles de expresión de la enzima ST8Sia III a través de la técnica Real Time PCR, y la de los ácidos disiálicos por Inmunohistoquímica. _____ | 76 |
| 3.1.5.1. Análisis digital de marcaciones histoquímicas. _____ | 76 |
| 3.1.5.2. Análisis de Real-time PCR. Método de curvas estándar para cuantificación relativa. _____ | 76 |
| 3.1.6.1. Expresión de genes. _____ | 77 |
| 3.2. Análisis de la potencial función de los ácidos disiálicos en el Sistema Nervioso Central mediante técnicas de RNAi. _____ | 77 |
| 3.2.1. Evaluación de la eficiencia de silenciamiento de las secuencias ARNi en cultivo celular. _____ | 79 |
| 3.2.2. Estimación de la eficiencia de transfección de los distintos plásmidos. _____ | 80 |
| 3.2.3. Estimación del tiempo requerido en células neurales para la transcripción del plásmido. _____ | 81 |
| 3.2.4. Administración de plásmidos ARNi para ST8SiaIII a ratones neonatos mediante estereotaxia. _____ | 81 |
| 3.2.5. Análisis de los efectos del tratamiento con RNAi para ST8SiaIII, mediante técnicas de biología molecular e histología. _____ | 85 |
| 3.3. Análisis del comportamiento de ratones tratados con RNAi para ST8SiaIII. _____ | 87 |
| Capítulo 4..... | 89 |
| Resumen..... | 89 |
| Bibliografía..... | 100 |

Capítulo 1

Introducción

Introducción

1.1. Glicobiología

La glicobiología es la ciencia que estudia la estructura y función biológica de los factores que intervienen en el proceso co-traducciona l y post-traducciona l de modificación de las proteínas y lípidos mediante la adición de los denominados hidratos de carbono, sacáridos o glicanos. La glicobiología tiene sus orígenes como tal en 1988 cuando Rademacher, Parekh y Dwek combinaron las disciplinas tradicionales de la química y bioquímica de los carbohidratos con el estudio moderno de la biología celular y molecular de los glicanos (Varki et al., 2009).

En los últimos años se ha definido como glicómica a una nueva rama de la biología dedicada al estudio de la estructura y función de los glicoconjugados. Al igual que la genómica y la proteómica se encargan respectivamente, del análisis de los genes y las proteínas que componen un organismo, la glicómica, más compleja por la diversidad de monómeros y capacidad de ramificación de la estructura glicosídica, se encarga del análisis de la composición de azúcares en los organismos.

La variedad de monosacáridos que pueden encontrarse unidos a un glicoconjugado en particular, sumados a los tipos de enlaces posibles entre ellos y las modificaciones como la fosforilación, sulfatación, metilación y acilación, aumentan la variabilidad de los glicoconjugados en la naturaleza, lo cual sirve para mediar una gran diversidad de funciones biológicas específicas (Ej. Figura 1.1) (Fukuda et al., 2005).

Las uniones de carbohidratos a las glicoproteínas se agrupan en dos tipos principales, denominadas O-glicosilaciones o N-glicosilaciones, según se unan los carbohidratos a aminoácidos hidroxilados, principalmente serina o treonina, o bien al nitrógeno de la amina del aminoácido asparagina, respectivamente (Lodish et al., 2005).

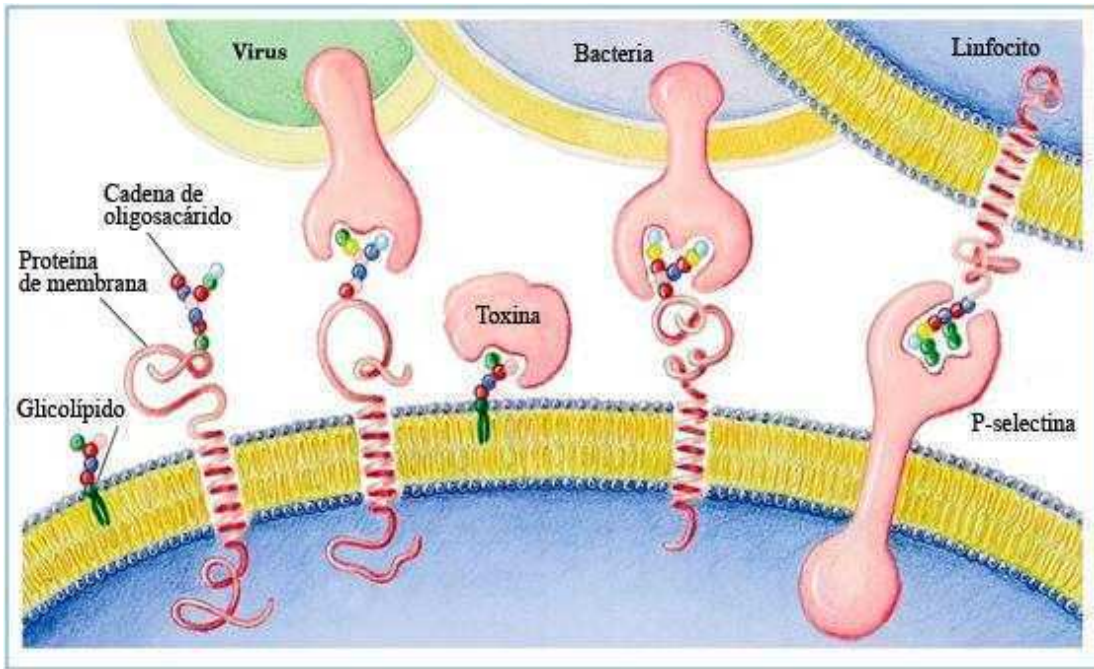


Figura 1.1. Glicanos unidos a glicoproteínas o glicolípidos de membrana participan en la señalización e interacción intra- e inter-celular. Imagen tomada y modificada de <http://bifi.es/~jsancho/estructuramacromoleculas/15polisacaridos/polisacaridos/glicoconjugados/glicomembrana.JPG>.

Los O-glicanos son sintetizados por una variedad de enzimas y presentan diferentes enlaces entre carbohidratos. Se puede distinguir una estructura base ligada a la proteína, designada “*core*”, que en los O-glicanos y, a diferencia de los N-glicanos varía de una glicoproteína a otra. En mamíferos los O-glicanos son menos frecuentes y menos complejos que los N-glicanos, a pesar de tener relevancia en funciones relacionadas con el sistema inmune y el sistema nervioso central (Lodish et al., 2005; Fukuda y Hindsgaul, 2000).

Los N-glicanos son sintetizados en el retículo endoplasmático (RE) y el complejo de Golgi, donde la síntesis comienza con un precursor de catorce azúcares, que le es transferido desde el dolicol y en forma de bloque a la proteína (Figura 1.2).

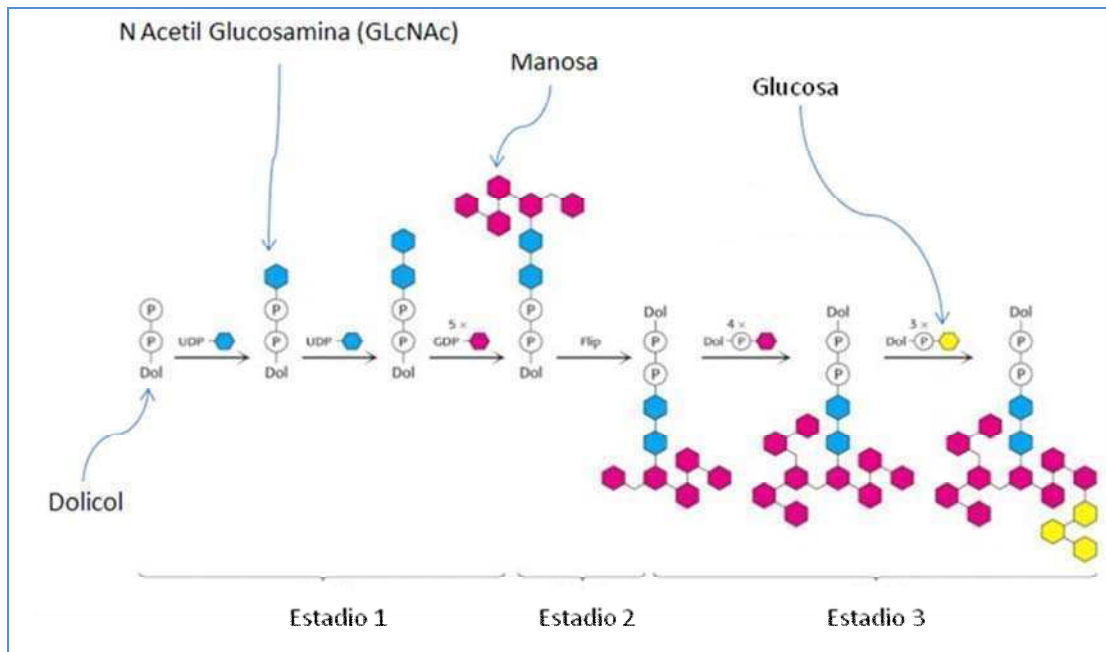


Figura 1.2. En la membrana del RE, el dolicol fosfato provee una estructura lipídica a través de la cual se anclan los oligosacáridos. Los monosacáridos constituyentes son transportados por UDP ó GDP para ser agregados a la cadena creciente. Imagen tomada y modificada de Varki et al., 2009.

Estas glicoproteínas sufren procesamientos secuenciales que consisten en la remoción de algunos azúcares y la adición de otros. De acuerdo a las variaciones que presentan, los N-glicanos se han clasificado en tres grupos diferentes: alta manosa, complejos e híbridos (Figura 1.3). Los tres tienen una estructura común, el “core”: $\text{Man}\alpha 1-6 (\text{Man}\alpha 1-3) \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-Ans}$, del que parten ramas, dando lugar a los distintos grupos (Fukuda et al., 2005).

Las ramas en algunos casos serán nuevamente modificadas en el complejo de Golgi por glicosidasas, glicosiltransferasas, fucosiltransferasas y sialiltransferasas (Figura 1.3) (Fukuda y Hindsgaul, 2000).

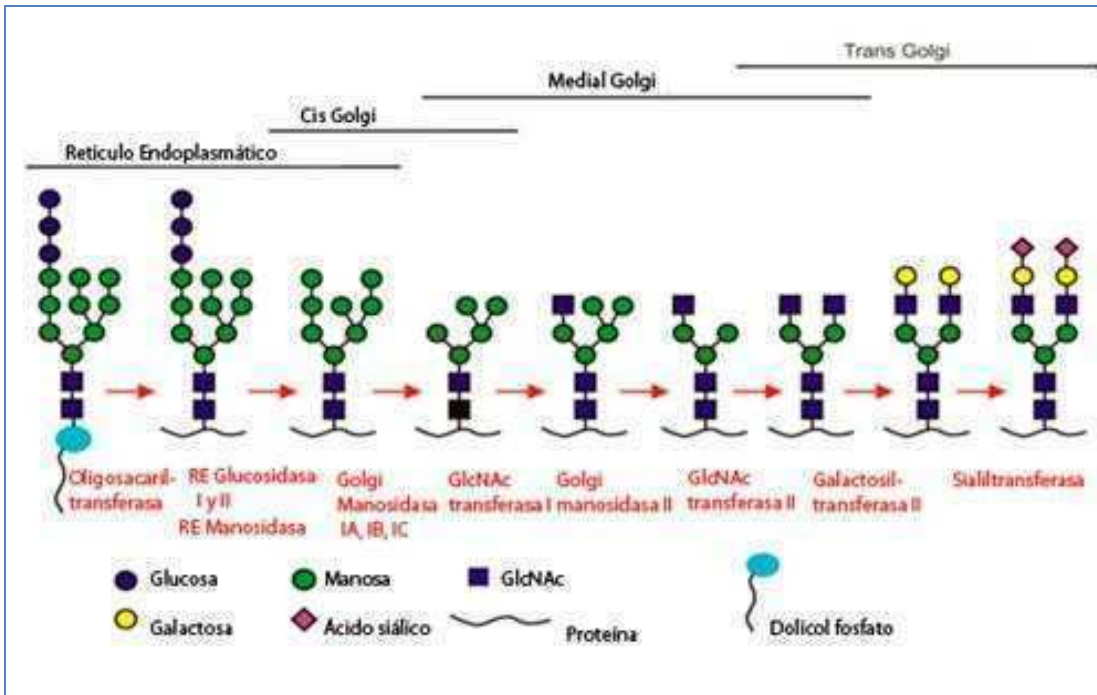


Figura 1.3. Procesamiento de N-glicano alta manosa (en el RE) hasta generar un glicano complejo (complejo de Golgi). Imagen tomada y modificada de Taylor y Drickamer, 2012.

Los ácidos siálicos, particularmente tratados en esta tesis, se encuentran en las terminaciones de N-glicanos, O-glicanos y también de gangliósidos (Figuras 1.4 y 1.5).

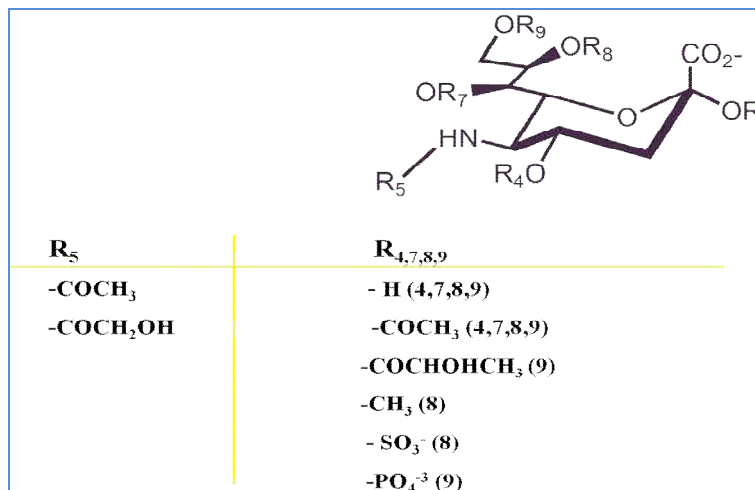


Figura 1.4. Estructura de la molécula de ácido siálico y sus posibles modificaciones (R). Imagen tomada y modificada de Varki et al., 2009.

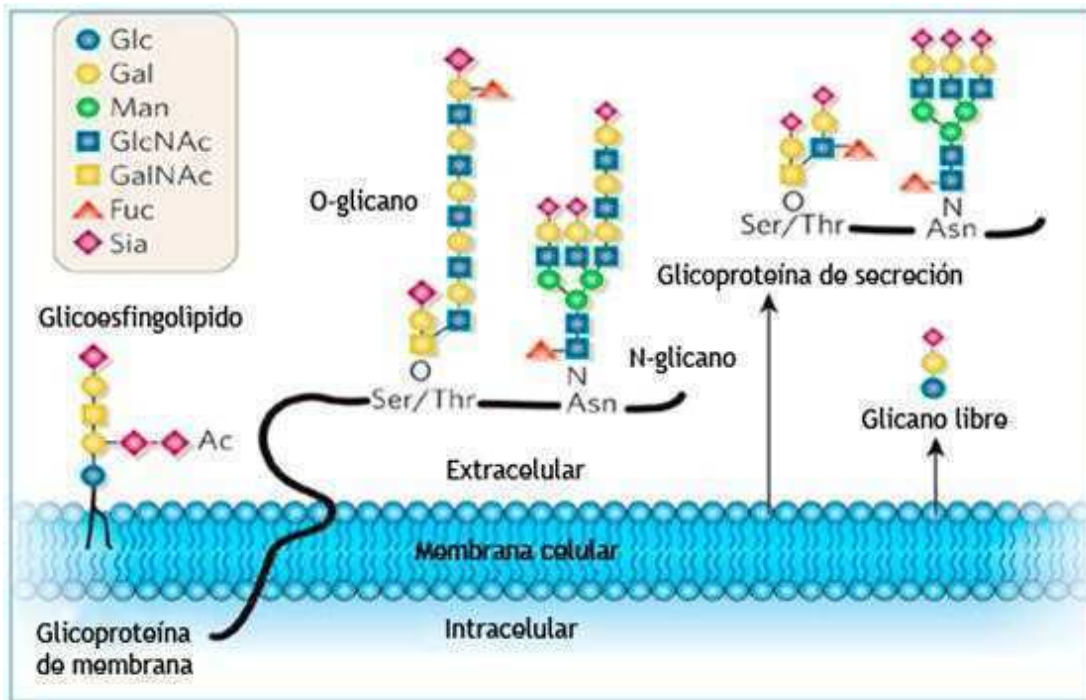


Figura 1.5. Glicosfingolípidos, glicoproteínas (O- glicanos y N-glicanos) unidos a membrana o liberadas al espacio extracelular. Gráfico tomado y modificado de Varki et al., 2007.

Los glicosfingolípidos se clasifican en tres grupos: cerebrósidos, globósidos y gangliósidos. Están formados por un glicano unido a una ceramida (esfingosina y ácido graso) (Varki et al., 2009).

Los cerebrósidos tienen un azúcar unido mediante enlace β -glicosídico al grupo hidroxilo de la ceramida; los que tienen galactosa se denominan galactocerebrósidos y se encuentran anclados de manera característica a las membranas plasmáticas de células del tejido nervioso, al igual que los que contienen glucosa (glucocerebrósidos). Los sulfátidos poseen una galactosa esterificada con sulfato en el carbono 3 (Varki et al., 2009).

Los globósidos son glicosfingolípidos con oligosacáridos neutros unidos a la ceramida (Varki et al., 2009).

Por último, los gangliósidos, son los esfingolípidos más complejos debido a que tienen cabezas polares muy grandes formadas por unidades de oligosacáridos cargadas negativamente. Esta característica deriva de que poseen una o más unidades de ácido N-acetilneuramínico o ácido siálico que tiene una carga negativa a pH fisiológico (Varki et al., 2009).

1.2 Neuroglicobiología

Al igual que en muchos otros tejidos, las células del tejido nervioso se encuentran “decoradas” con carbohidratos. Esta característica, propia de los eucariotas, permite a las células comunicarse y hacer contacto con sus vecinas o con la matriz en procesos tan relevantes como la sinapsis, la migración, proliferación y crecimiento de los axones, regeneración y también plasticidad sináptica (Fukuda et al., 2005; Martin, 2002).

En el sistema nervioso, los carbohidratos tienen un rol en el desarrollo celular y establecimiento de conexiones neurales. El rol específico de la mayoría de los glicoconjugados está siendo investigado. Sin embargo, de los que ya se conoce la función, se infiere que son indispensables para el desarrollo (Fukuda et al., 2005). Su ausencia es causa de enfermedades graves que desencadenan retardo mental y del desarrollo, y en algunos casos es letal (Butler et al., 2003).

Algunas enfermedades que resultan de la falla en el metabolismo de síntesis o degradación de los glicanos son bien conocidas, en especial las enfermedades congénitas que afectan el procesamiento y almacenamiento normal de los esfingolípidos (Tabla I) (Cox y Cachon-Gonzalez, 2012).

Los glicanos, además de intervenir en procesos durante el desarrollo, tienen funciones importantes en las conexiones pre- y post- sinápticas (Martin, 2002).

En 1998, Rutishauser y colaboradores publicaron los resultados de su trabajo en el que demostraban la importancia de los azúcares en los glicococonjugados durante el desarrollo del sistema nervioso. La migración de las fibras musgosas del hipocampo se veía alterada cuando se cortaban, mediante tratamiento enzimático, los ácidos polisiálicos que se encuentran unidos a la molécula de adhesión celular N-CAM (Seki y Rutishauser, 1998).

Tabla I: Desordenes asociados con el metabolismo anormal de los glicosfingolípidos.

| Desorden | Deficiencia Enzimática | Sustancia que se acumula | Síntomas |
|--|--|--|---|
| <u>Enfermedad de Tay-Sachs</u> | Hex A* | Gangliósido G _{M2} | Forma infantil: retardo mental rápidamente progresivo, ceguera, mortalidad temprana. |
| <u>Enfermedad de Sandhoff</u> | Hex A y Hex B* | Globósido; Gangliósido G _{M2} | Forma infantil: los mismos síntomas que en Tay-Sachs, progreso más rápido. |
| <u>Enfermedad de Gaucher</u> | β-glucosidasa ácida (glucocerebrosido) | Glucocerebrosido | Hepatoesplenomegalia, retardo mental en la forma infantil, degeneración de huesos largos. |
| <u>Enfermedad de Fabry</u> | α-galactosidasa A | Globotriasilceramida; también llamada trihexosido ceramida (CTH) | Insuficiencia renal, erupciones de la piel. |
| <u>Enfermedad de Niemann-Pick</u> Tipos A y B Tipo C | Esfingomielinasa proteína NPC1 | Esfingomielinas Colesterol derivado de LDL | El tipo A es una alteración severa con hepatoesplenomegalia, daño neuronal severo que lleva a la muerte temprana, el tipo B solamente involucra a las vísceras. |
| <u>Enfermedad de Krabbe</u> | Galactocerebrosidasa | Galactocerebrosidos | Retardo mental, deficiencia de mielina. |
| <u>Gangliosidosis G_{M1}</u> | β-galactosidasa 1 | Gangliósidos G _{M1} | Retardo mental, deficiencia de mielina. |
| <u>Leucodistrofia Metacromática</u> | Arilsulfatasa A | Sulfátidos | Retardo mental, metacromasia de nervios |
| <u>Fucosidosis</u> | α-fucosidasa | Pentahexosilfucoglicolípido | Degeneración cerebral, piel gruesa, espasticidad muscular. |
| <u>Lipogranulomatosis de Farber</u> | Ceramidasa acida | Ceramidas | Hepatoesplenomegalia articulaciones dolorosas. |

*HexA y HexB son subunidades α y β, respectivamente, de la enzima hexosaminidasaA.

A nivel molecular, otras glicoproteínas que evidencian la importancia de la glicosidación en el sistema nervioso central son, por ejemplo, la subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje en células del sistema nervioso central de

roedores, y CD166, una glicoproteína con función de adhesión celular que fue identificada en Neuro2A, una línea celular proveniente de Neuroblastoma de ratón (Sato et al., 2002).

También, en el sistema nervioso se describen otros glicoconjugados, los gangliósidos, que están concentrados en las células del sistema nervioso central, especialmente en las terminaciones nerviosas. Los gangliósidos constituyen el 6% de los lípidos de membrana de la materia gris del cerebro humano y se hallan en menor cantidad en las membranas de la mayoría de los tejidos animales no nerviosos (Varki et al., 2009; Liu et al., 1997).

1.3. Ácidos siálicos

Aparentemente los ácidos siálicos aparecieron tarde en la evolución; han sido identificados en cápsulas de bacterias (la mayoría patógenas), en embriones de *Drosóphila* y desde invertebrados mayores (Deuterostomados) hasta eucariotas, exceptuando a las plantas (Varki et al., 2009; Schauer, 2009).

1.3.1. Ácidos monosiálicos

El ácido siálico o ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac, NANA) como se muestra en la figura 1.4, es una molécula de 9 carbonos cuyo grupo carboxílico ubicado en el Carbono 1 se encuentra generalmente ionizado a pH fisiológico, aunque ocasionalmente puede estar lactonizado con un hidroxilo de la molécula. Su biosíntesis se muestra en la Figura 1.6.

El grupo N-acetilo de C-5 puede estar hidroxilado para dar N-glicolilneuramínico (Neu5Gc). La hidroxilasa que realiza esta transformación no se encuentra en el humano pero está presente en otros mamíferos. En estos el Neu5Gc se encontró en cantidades variables en diferentes especies y tejidos con excepción del cerebro donde se expresa en muy bajos niveles (Davies et al, 2012).

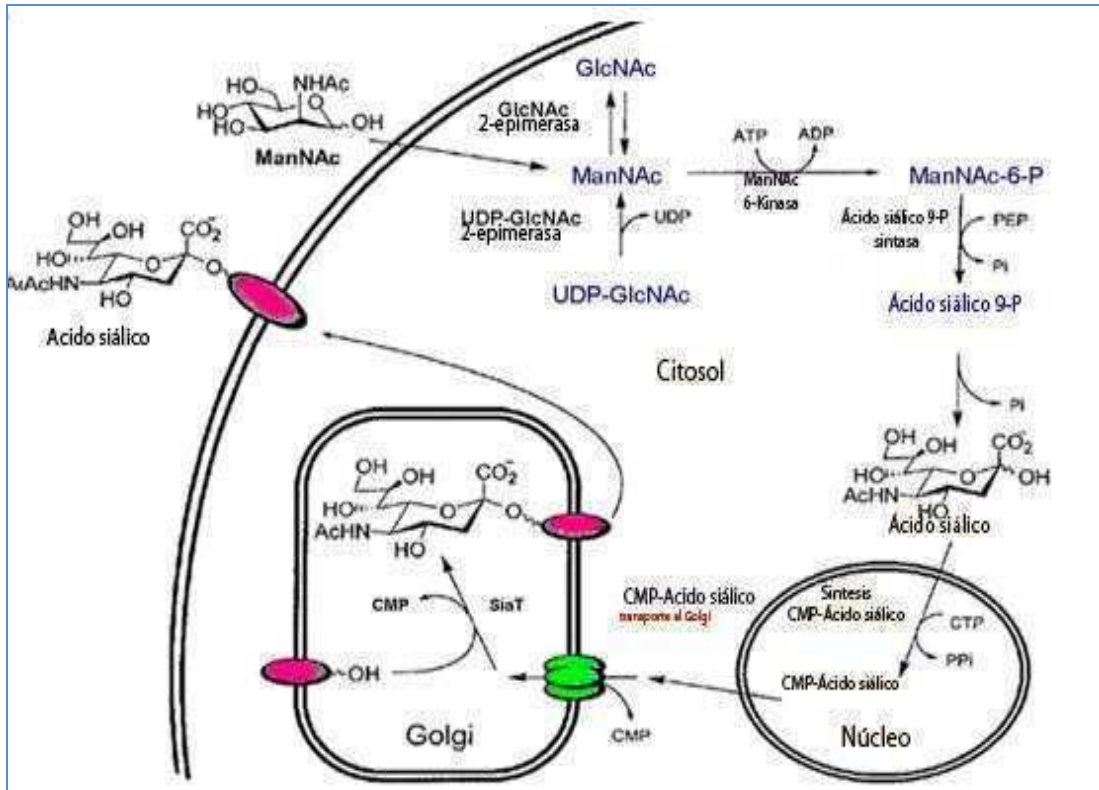


Figura 1.6. Diagrama ilustrativo de la biosíntesis de ácidos siálicos. Imagen tomada y modificada de Varki et al., 2009.

Los hidroxilos de Neu5Ac pueden estar sustituidos por acetilos, metilo, fosfato, sulfato u otros grupos dando lugar a más de 30 ácidos siálicos distintos (Figura 1.4). La diversidad estructural de los ácidos siálicos determina el reconocimiento específico por parte de anticuerpos y lectinas de origen exógeno o endógeno (Figura 1.1) (Varki et al, 2009; Fukuda y Hindsgaul, 2000; Fukuda et al, 2005).

También se ha descrito en glicoconjugados el ácido 2-ceto-3-desoxi-D-glicero-D-galacto-nonulosónico (KDN) en el cual el 5-N-acetilo está reemplazado por un hidroxilo (Varki et al., 2009; Fukuda et al., 2005). Particularmente, en humanos los KDN se encuentran en niveles muy bajos, y no forman oligómeros (Janas y Janas, 2011).

Los ácidos siálicos pueden formar distintos tipos de enlace α -glicosídicos con otros monosacáridos y se encuentran generalmente como extremos terminales en los glicanos. Las uniones más comunes en glicoconjugados son al C-3 o al C-6 de la galactosa. En algunos casos, puede ocupar una posición interna en el glicano como ocurre en los poliSia en los cuales los ácidos siálicos están unidos entre sí por uniones α -2,8.

En cuanto a la estructura y función de los ácidos monosíálicos, fueron identificados en diferentes estadios del desarrollo, y en diferentes tejidos, inclusive en células y en glicoconjugados específicos, sin embargo, en la mayoría de los casos no se correlacionó la estructura con una función determinada.

1.3.2. Ácidos polisiálicos

Particularmente los ácidos siálicos con enlaces $\alpha 2-8$ (Neu5Ac $\alpha 2-8$ Neu5Ac) fueron encontrados en forma de polímeros o ácidos poliSia (más de 8 Neu5Ac), oligosíálicos (entre 3 y 7 Neu5Ac) y dímeros o disíálicos (Janas y Janas, 2011).

Los poliSia son los más estudiados en cuanto a su expresión, y función. En el sistema nervioso central se encuentran unidos a la proteína de adhesión celular neural (NCAM). NCAM-poliSia actúan evitando la unión homodimérica o heterodimérica entre moléculas de adhesión en células diferentes, permitiendo de este modo la migración celular, diferenciación, extensión de neuritas y plasticidad sináptica (Figura 1.7) (Rutishauser et al., 1985; Rutishauser et al., 1996; Cremer et al., 2000).

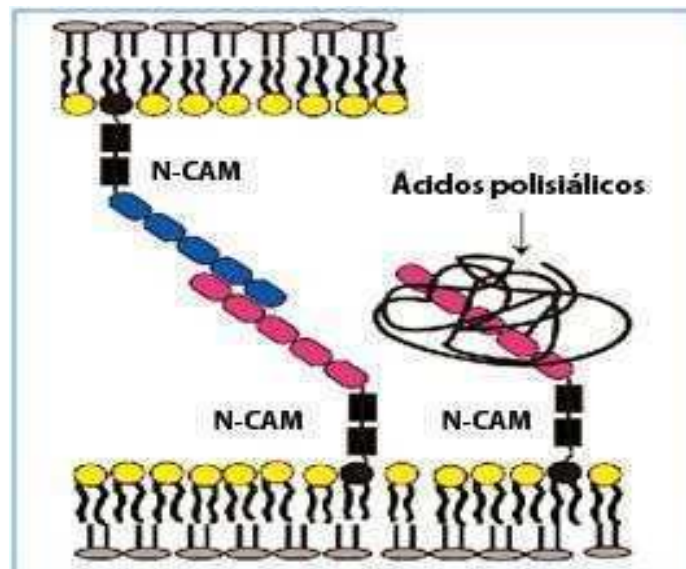


Figura 1.7. Unión heterodimérica entre moléculas N-CAM y N-CAM polisiálico.

Imagen tomada y modificada de

<http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Publications/Highlights/2005/SCM/SCM4>.

En estadios embrionarios del desarrollo del cerebro del ratón la longitud del polímero supera los 55 monómeros, pero a medida que el cerebro se organiza anatómicamente y estabiliza sus conexiones, la longitud del polímero va decreciendo gradualmente (Kanato et al., 2008).

Por otro lado se han descubierto en el cerebro de ratones recién nacidos poliSia en SynCAM, una proteína integral de membrana que induce a la diferenciación sináptica y organiza las sinapsis excitatorias (Galuska et al., 2010).

Así también en el cerebro, fue identificado poliSia en la subunidad alfa de canales de sodio sensible a voltaje (Zuber et al, 1992) y en ratones adultos en los canales de potasio (Cartwright y Schwalbe, 2009).

Los oligosíalicos fueron identificados en N-glicanos de ceruloplasmina (proteína sérica), en la subunidad $\alpha 5$ de integrinas, y en los O-glicanos de megalina (receptor de membrana de células epiteliales) (Sato et al., 2000; Ziak et al., 2002).

1.3.3. Ácidos disiálicos

Los ácidos disiálicos unidos a galactosa (Neu5Ac $\alpha 2-8$ Neu5Ac $\alpha 2-3$ Gal), motivo específico de esta tesis, fueron encontrados tanto en glicoproteínas séricas como de membrana celular. La expresión de los ácidos disiálicos (DiSia) es regulada a nivel de su biosíntesis (la cual se grafica en la figura 1.8), es específica de la glicoproteína, del tipo celular, etapa del desarrollo y está asociada a procesos de diferenciación (Sato et al., 2002).

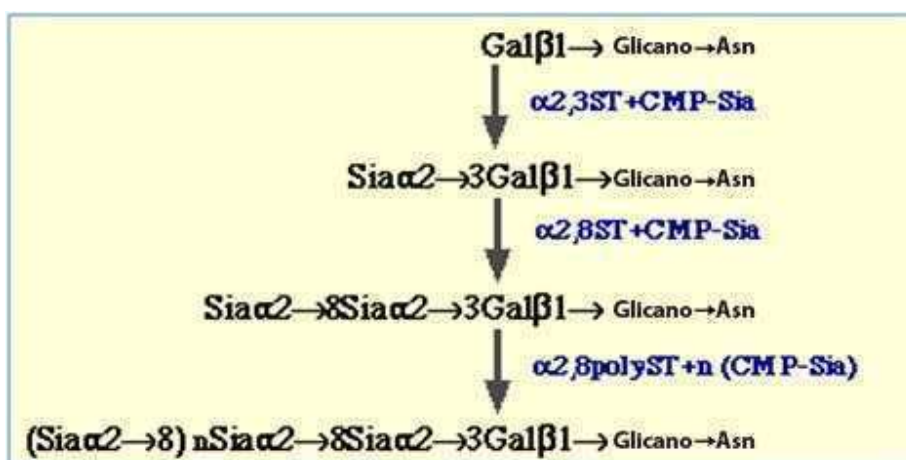


Figura 1.8. Etapas de la biosíntesis de ácidos polisiálicos en glicoproteínas
 Modificado de <http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/glycoprotein/GPB04E.html>.

Los DiSia fueron encontrados en N-glicanos de band3, una glicoproteína de membrana de eritrocitos del cordón umbilical humano. También en fetuina y en α 2-macroglobulina del suero de cabra (Kitajima et al., 1999), en la glicoporina humana O-glicosilada, adipo-Q bovina y de ratón (Sato et al., 2001), en CD166 de Neuro2A, una línea celular de neuroblastoma de ratón (Sato et al., 2002), y en cromograninas de la glándula adrenal de bovinos (Teinteiner-Lelièvre et al., 2005). También se ha demostrado la presencia de los residuos DiSia en glicoproteínas de cerebro de ratones y cerdos. En estos últimos se encontraron en cerebro de embriones, 8 glicoproteínas disialiladas diferentes, entre ellas fueron reconocidas las isoformas 120 y 140 de N-CAM. Estas mantenían su expresión en la etapa adulta, donde aparecían disialiladas otras 3 glicoproteínas más. Aquí observaron incrementados los niveles de DiSia en el cerebro de adulto comparado con el de embriones (Sato et al., 2000).

En cuanto al rol de los ácidos disiálicos en los diferentes sitios donde se expresan, solamente se sabe que participan en la extensión de las neuritas en una línea celular de neuroblastoma de ratón (Neu2A), y que su expresión es regulada durante el desarrollo al igual que los oligo y polisiálicos (Sato et al., 2002).

Conociendo el rol particular de los ácidos polisiálicos durante el desarrollo del sistema nervioso y sabiendo que los ácidos disiálicos también se encuentran en glicolípidos y glicoproteínas en condiciones particulares y no constitutivamente, podríamos, por extensión, asociarlos a un rol en las interacciones de reconocimiento y señalización celular durante los procesos de migración de los precursores neurales. Tales interacciones podrían estar mediadas por proteínas de adhesión celular, lectinas que reconocen ácidos siálicos (siglecs). Se ha sugerido que la expresión de los disiálicos estaría catalizada por la enzima ST8Sia III de acuerdo a resultados de experimentos *in vitro* (Sato et al., 2001; Sato et al., 2002).

1.3.4. Sialiltransferasas

La sialilación es catalizada por enzimas específicas llamadas sialiltransferasas, cada una es responsable por ligar uniones distintas y a sustratos específicos. Las sialiltransferasas son glicoproteínas con dominios transmembrana, generalmente se

encuentran en el complejo de Golgi y utilizan como sustrato donador de ácidos siálicos al CMP-Sia (Varki et al., 2009).

De las sialiltransferasas, seis miembros de la familia ST8Sia, o α 2,8-sialiltransferasa (ST8SiaI – ST8SiaVI), fueron descritos y clonados en varias especies animales, sin embargo en la actualidad el rol de cada enzima en la biosíntesis de DiSia, oligoSia y poliSia *in vivo* esta poco claro (Teinteiner-Lelièvre et al., 2005).

Particularmente, la expresión génica de las enzimas ST8Sia varía de acuerdo al tejido y estadio, coincidentemente con la expresión de la estructura del glicano que produce. Esto nos permite generalizar respecto a que la expresión de ácidos siálicos está regulada a nivel de la transcripción de los genes de las sialiltransferasas (Yoshida et al., 1996).

Los cDNAs que codifican las polisialiltransferasas ST8SiaII (STX) y ST8SiaIV (PST) que catalizan uniones α 2-8 fueron clonados, y se observó que los niveles de STX están incrementados en el cerebro de los embriones, mientras que los niveles de PST son constantes en diversos tejidos durante todo el desarrollo (Kitazume-Kawaguchi et al., 2001), y la ausencia de esta última causa trastornos del tipo deterioro de la potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a largo plazo (LTD) por ausencia de ácidos siálicos en la región CA1 del hipocampo (Eckhardt et al., 2000).

La secuencia nucleotídica de la sialiltransferasa ST8SiaIII (estudiada en esta tesis) de Homo sapiens, Pan troglodytes, Mus musculus y Gallus gallus fue clonada (Teinteiner-Lelièvre et al., 2005). El gen que codifica para ST8SiaIII, es el más corto de la familia ST8Sia, con solo cuatro exones, y su expresión es regulada durante el desarrollo del cerebro de ratón, generando tres productos transcripcionales de diferente tamaño debido a diferentes sitios de poliadenilación (Yoshida et al., 1996).

A las sialiltransferasas ST8SiaI y ST8SiaV se les ha atribuido la α 2,8 sialilación de gangliósidos, mientras que ST8SiaII y ST8SiaIV son polisialiltransferasas que catalizan la polimerización α 2,8 de residuos de ácido siálico en estructuras de Neu5Ac α 2-3(6)Gal β 1-4GlcNAc presentes en los N-glicanos de NCAM (Rutishauser et al., 1985; Eckhardt et al., 2000).

ST8SiaVI, sintetiza ácidos disiálicos al igual que ST8SiaIII, pero en O-glicanos de glicoproteínas. ST8Sia VI de humanos a diferencia de la de ratones no cataliza uniones de siálicos a gangliósidos o N-glicanos (Takashima et al., 2002).

ST8Sia III, transfiere ácido siálico a un ácido siálico terminal unido α -2,3-Gal en glicoproteínas y glicolípidos (Yoshida et al., 1995, Sato et al., 2000). Se asoció también

a la síntesis de trisiálicos (Inoko et al., 2010) y de disiálicos en el cerebro de ratón (Rinflerch et al., 2012).

Es interesante que hST8SiaIII (humano), así como ST8SiaII and ST8SiaIV son capaces de autopolisialilación en cadenas N-glicosídicas (Muhlenhoff et al., 2001). La autopolisialilación estaría involucrada en la activación de polisialiltransferasas in vivo e in vitro.

1.4. Hipótesis y Objetivos

Dada la evidencia previa de la presencia de ácidos disiálicos en el sistema nervioso central, y en analogía con los ácidos polisiálicos, se planteó como hipótesis inicial de trabajo una distribución ubicua de los DiSia y un funcionamiento diferencial de estos últimos durante las sucesivas etapas del desarrollo.

Los objetivos específicos son:

- 1) Estudiar la distribución de los ácidos disiálicos, y de la enzima sialiltransferasa ST8SiaIII utilizando técnicas inmunohistoquímicas, en estructuras del sistema nervioso de ratones neonatos, adultos y seniles.
- 2) Localizar y cuantificar ST8SiaIII, mediante Real Time PCR y otras técnicas de biología molecular, en las distintas estructuras del sistema nervioso de ratones neonatos, adultos y seniles.
- 3) Analizar estadísticamente la presencia y los niveles de expresión de la enzima ST8SiaIII a través de la técnica Real Time PCR, y la de los ácidos disiálicos por Inmunohistoquímica.
- 4) Determinar la potencial función de los ácidos disiálicos en células del SNC, inhibiendo la expresión de la enzima responsable de su síntesis mediante técnicas de RNA de Interferencia.

Capítulo 2

Resultados y Discusión

2. Resultados y Discusión

2.1. Localización de DiSia, y de la enzima ST8SiaIII mediante técnicas histológicas, en estructuras del SNC de ratones neonatos, adultos y seniles.

El primer objetivo fue localizar los ácidos disialícos (DiSia) en el SNC de ratones de diferentes edades. Se procedió a la identificación de dicho epítopo a través de un anticuerpo específico para DiSia. S2-566, que reconoce específicamente la estructura Neu5Ac- α -(2-8)Neu5Ac- α -(2-3)Gal, en células de linaje neural Neuro2A (neuroblastoma de ratón) cuando son inducidas a diferenciación neural con agentes neurotrópicos como el ácido retinoico (AR) (Sato et al., 2002). De acuerdo a este precedente, utilizamos Neuro2A en proceso de diferenciación como referente de marcación positiva para DiSia.

2.1.1. Control en cultivo.

2.1.1.1. Inmunomarcación de DiSia y ST8SiaIII en Neuro2A.

Las células Neuro2A fueron inmunomarcadas con el anticuerpo S2-566 y anti-ST8SiaIII. En relación a S2-566 (epítopo DiSia), obtuvimos marca en la membrana celular (Figura 2.1). Por otra parte, la permeabilización de la membrana no modificó la marca, por lo que concluimos que las marcas observadas para DiSia son de membrana celular.

En la figura 2.1, algunas células se observan más inmunomarcadas (rojo) que otras (núcleos celestes), lo cual podría deberse a diferentes estadios de diferenciación celular, lo cual se corresponde con la expresión diferencial de DiSia.

En relación a la detección de ST8SiaIII, la marcación indicó la localización intracelular de la proteína (Figura 2.2). La doble marcación con anti-ST8SiaIII (Figura 2.2 A) y anti-A2B5 (Figura 2.2 B), que reconoce un epítopo de la membrana celular

(común a sialogangliosidos y sulfatidos) de neuronas, células neuroendocrinas y glia, indica que ST8SiaIII es una proteína intracelular. Esto coincide con lo previamente publicado respecto a la localización de las enzimas sialiltransferasas en las membranas del complejo de Golgi (Paulson y Colley, 1989).

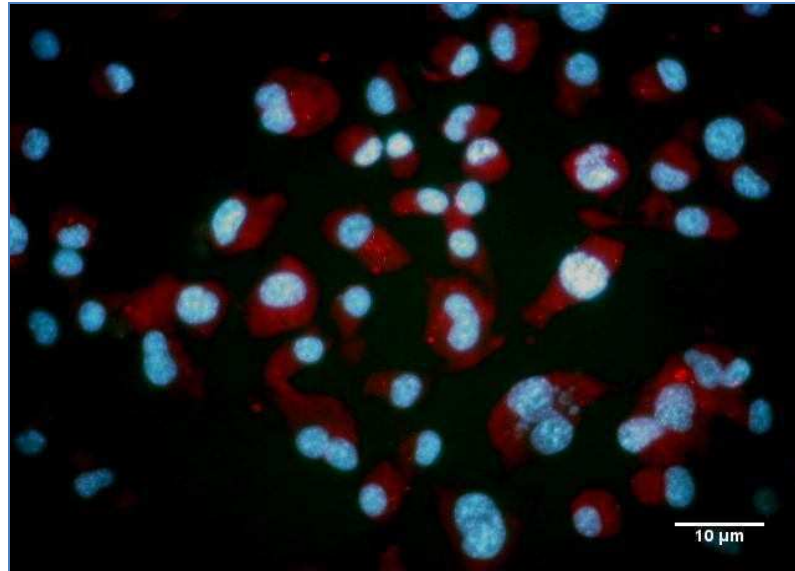


Figura 2.1: Foto de cultivo de células Neuro2A tratadas por 4 días con AR, fijadas e inmunomarcadas con S2-566 que reconoce DiSia (rojo). Los núcleos celulares están marcados con Hoestch (celestes). Barras 10 μm.

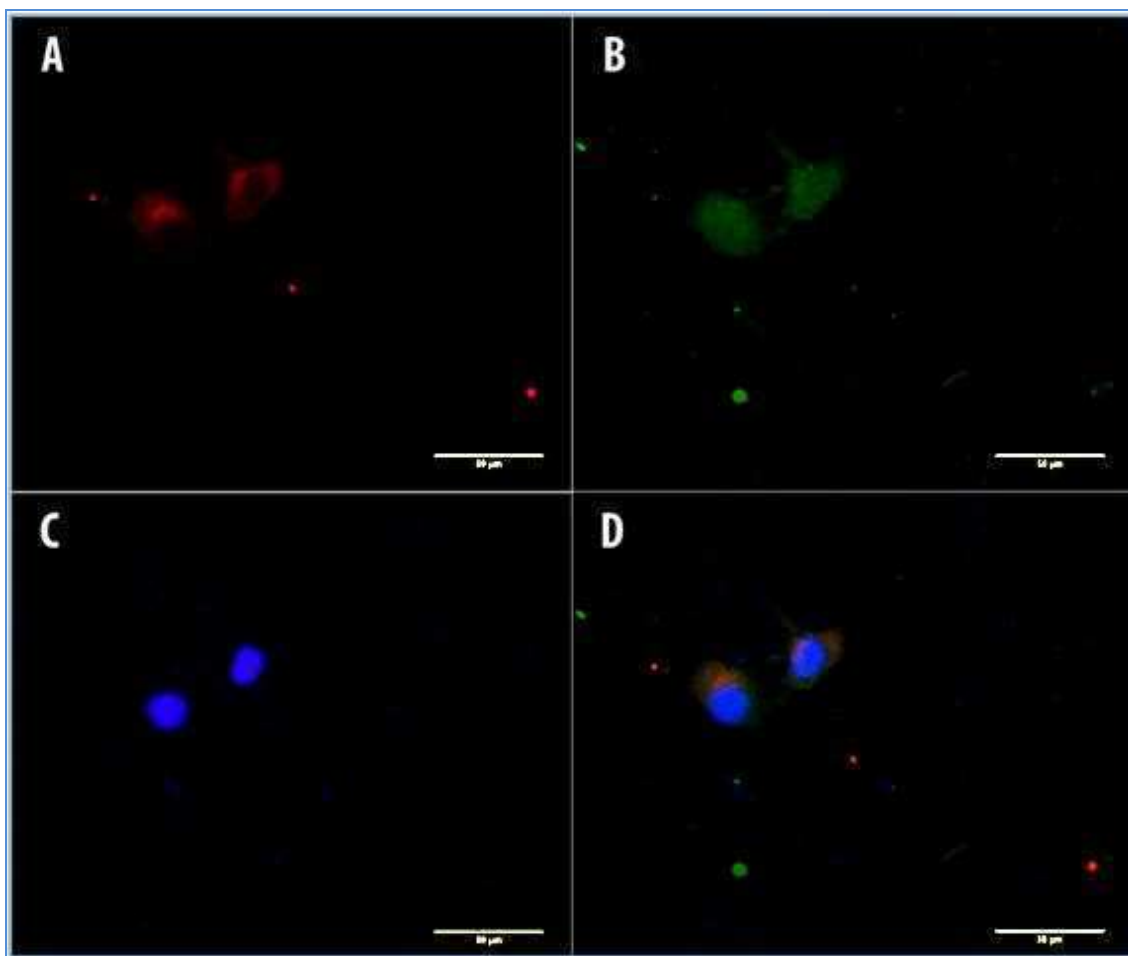


Figura 2.2. Fotos de células Neuro2A tratadas por 4 días con AR, fijadas e inmunomarcadas para localizar ST8SiaIII. En **A**: con anti-ST8SiaIII (rojo); **B** con anti-A2B5 (verde); en **C**: los núcleos fueron marcados con Hoestch (celeste) y en **D**: A, B y C superpuestos. Barras 50 µm.

2.1.1.2. Inmunomarcación de DiSia en cultivo primario de cerebro de ratón neonato.

En el cultivo primario de cerebro de ratón se observó que las marcas con S2-566 corresponden a epitopes que se encuentran en la membrana plasmática celular (Fig. 2.3).

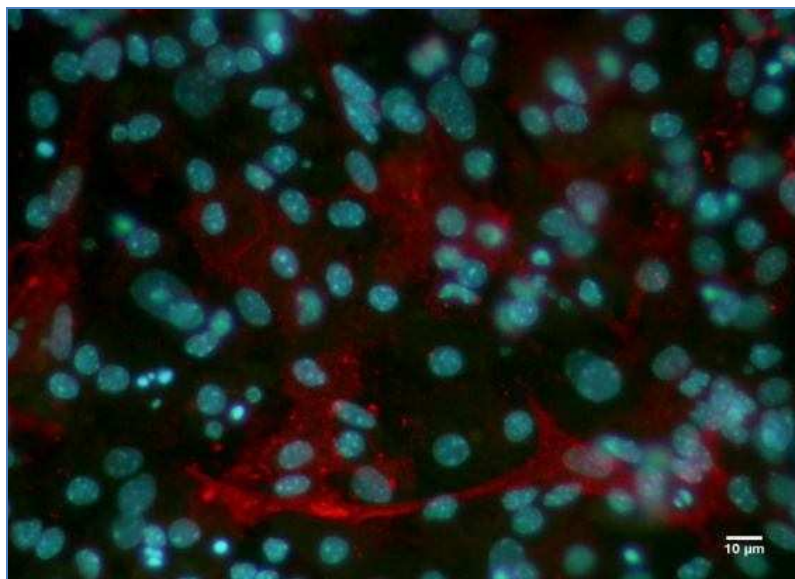


Figura 2.3. Cultivo primario de cerebro de ratón inmunomarcado con S2-566 (rojo) y los núcleos marcados con Hoestch (celeste). Barras 10 μm .

2.1.2. Análisis de la efectividad del inhibidor de la síntesis de gangliósidos NB-DGJ, en cultivo de células PC12 (Feocromocitoma de rata).

Con el objetivo de especificar la inmunomarcación del anticuerpo S2-566 sobre glicoproteínas o sobre glicolípidos, se administró un inhibidor de la síntesis de gangliósidos, N-Butyldeoxygalactonojirimycin (NB-DGJ), en el cultivo de la línea celular PC12, derivada de un feocromocitoma de rata (Kasperzyk et al., 2004; Baek et al., 2008).

Utilizamos la línea PC12 porque de acuerdo a la referencia bibliográfica, la extensión de sus neuritas es dependiente de la expresión de gangliósidos, cuando se induce la diferenciación mediante Factor de Crecimiento Neural (NGF) (Kimura et al., 2001).

Observamos que cuando inducíamos el cultivo a diferenciación neural (con NGF) las células extendían neuritas, pero cuando administrábamos NB-DGJ al mismo cultivo, la extensión se detenía, correspondiendo con la bibliografía previa.

El iminoazúcar derivado NB-DGJ es un inhibidor competitivo de la síntesis de gangliósidos. Actúa bloqueando la glucosiltransferasa específica de ceramida, que cataliza el primer paso en la biosíntesis de los gangliósidos (Figura 2.4).

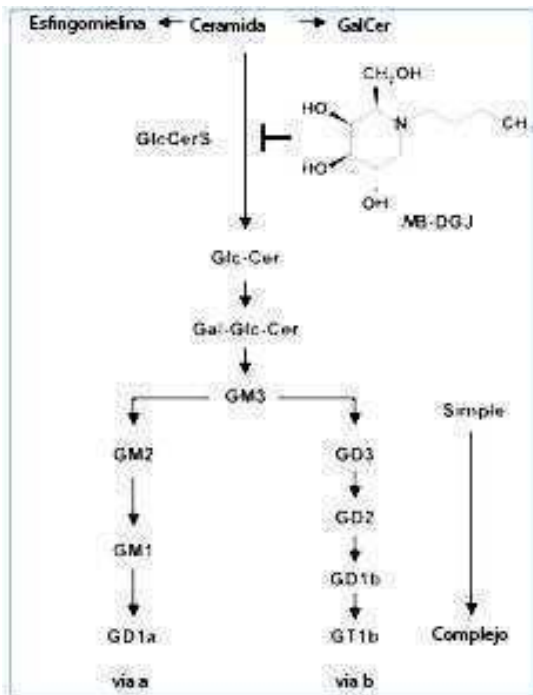


Figura 2.4. N-Butyldeoxygalactonojirimycin (NB-DGJ)

GalCer: galactosilceramida; GlcCerS: glucosilceramida sintasa; GlcCer: glucosilceramida; Las vías 'a' y 'b' son de biosíntesis de gangliósidos. Gráfico tomado y modificado de Baek et al., 2007.

En contraste de fase se evidenció que las células sin tratamiento se mantienen redondeadas (Figura 2.5 A). Lo mismo se observó en las células tratadas con NGF + NB-DGJ a diferencia de las tratadas con NGF solamente, en cuyos casos las células extendían las neuritas (Figura 2.5 B). Además, las células tratadas con ambos inductores neurotróficos muestran una marcada reducción de la tasa de división celular.

El anticuerpo específico para DiSia (S2-566) marcó positivamente todas las células en su primer día post-inhibición y en los siguientes días (2, 3 o 4) no se vio reducida la intensidad de inmunomarcación en los cultivos controles, como en los inhibidos con NB-DGJ (Figura 2.5 C y D). Esto nos sugería que las marcas obtenidas con S2-566 podrían ser glicoproteínas, dado que la síntesis de gangliósidos se encontraba bloqueada.

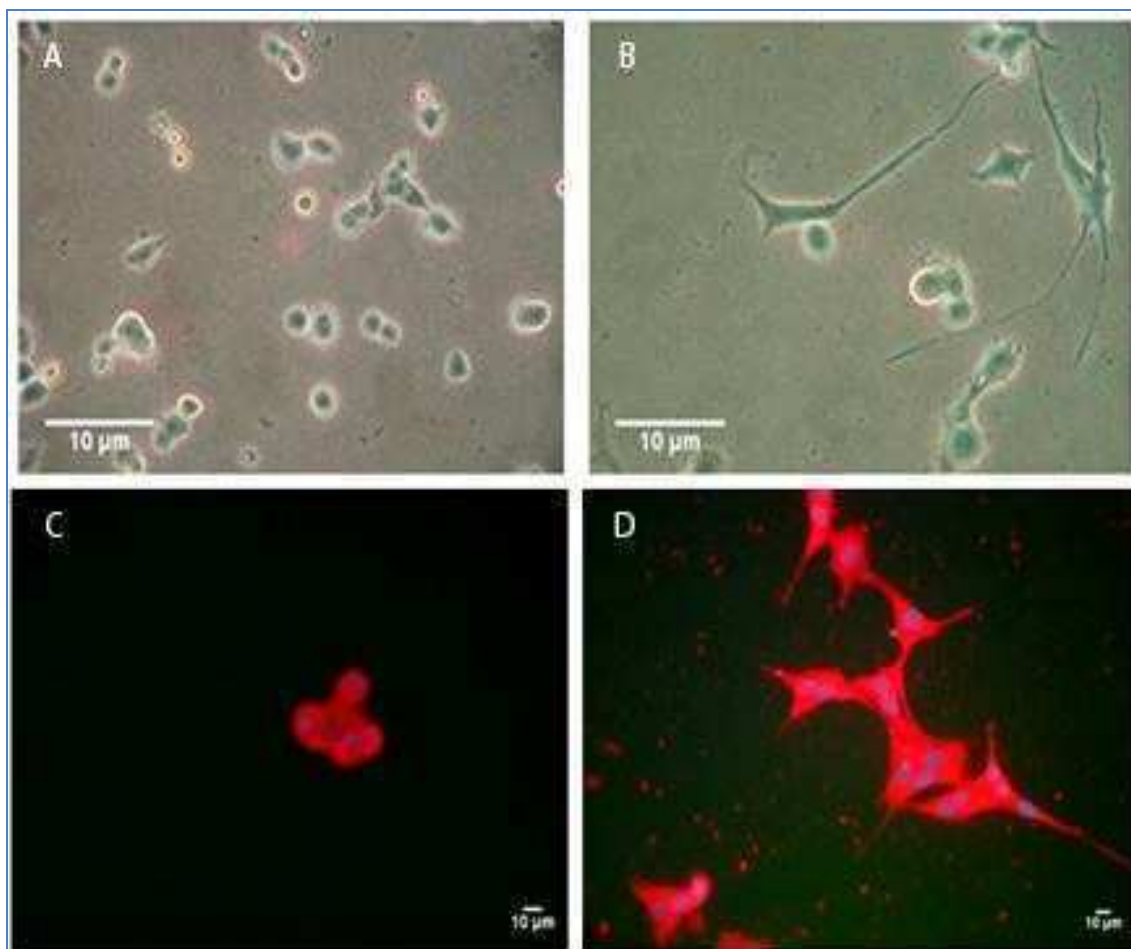


Figura 2.5. Cultivo de células PC12, **A** y **C**: tratadas con NGF + NB-DGJ; **B** y **D**: tratadas con NGF. En las fotos superiores se utilizó microscopio de contraste de fase y en las fotos de la fila inferior las células fueron inmunomarcadas con S2-566 (rojo), y vistas al microscopio de fluorescencia.

2.1.3. Inmunomarcación de cortes de cerebro de ratón.

Se inmunomarcaron con los anticuerpos S2-566 y con anti ST8SiaIII cortes sagitales del cerebro de ratón, para tener una vista panorámica de todas las estructuras analizadas (hipocampo, bulbo olfatorio, cerebelo y corteza).

Se observó mediante esta técnica, una correspondencia entre la expresión de la enzima ST8SiaIII y de su producto DiSia. Analizamos los niveles de fluorescencia en las diferentes estructuras del cerebro a diferentes edades del ratón (neonatos, adultos y seniles), y encontramos un patrón similar de expresión para el epítopo DiSia (Neu5Aca2

→ 8Neu5Aα2 → 3Gal) reconocido por el anticuerpo S2-566. Si bien, no se encontraron diferencias de tinción en el hipocampo, bulbo olfatorio o la corteza, observamos una disminución gradual en la inmunomarcación de DiSia en el cerebelo en adultos respecto a los neonatos, y también de seniles respecto a los adultos como podemos ver en las fotos A, B y C de la Figura 2.6.

Se observó específicamente que los epitopes inmunomarcados en el cerebelo correspondían a células granulares en los neonatos, como se observa en la figura 2.6C, y con el transcurso de la vida esta marca solamente prevalecía en las células piramidales del cerebelo (2.6 A y B). Mientras que en las otras estructuras (bulbo olfatorio, hipocampo y corteza) los epitopes estarían más generalmente distribuidos en células neuronales, sin posibilidad de identificar una estirpe preferencial.

En la tabla II se presentan los resultados obtenidos de cuantificar mediante el programa ImageJ los pixeles positivos para S2-566 (Media+) en 10 campos diferentes, al que se resta los pixeles obtenidos de 10 campos controles (Media-), en los que en vez del anticuerpo primario se utilizó PBS. Como control positivo se utilizó cultivo de células Neuro2A (N2A) tratadas con ácido retinoico. De acuerdo a estos valores la diferencia más marcada en el decrecimiento de la marca es de neonatos a adultos, aunque continua disminuyendo en seniles respecto a los anteriores grupos (Tabla II). Sin embargo por el análisis estadístico mediante un test de ANOVA, se constató que en cerebelo, los tres grupos presentan una media significativamente diferente entre grupos (*P < 0,001) (Ver gráfico representativo a continuación de la Tabla II).

Tabla II: Resultados de análisis de la densidad de marcas positivas para S2-566 en el cerebelo de ratones en diferentes etapas del desarrollo.

| | Positivo(N2A) | Neonatos | Adultos | Seniles |
|-----------|---------------|----------|---------|---------|
| Media (+) | 124,7 | 220,8 | 102,2 | 84,8 |
| Media (-) | 53,0 | 79,9 | 35,7 | 35,7 |
| Total: | 71,7 | 140,9 | 66,5 | 49,1 |

El valor Total se obtuvo de (Media +) - (Media -). Donde “Media +” es el total de pixeles correspondientes a la marcaciones obtenidas con el anticuerpo primario anti DiSia (S2-566) y “Media -“ los pixeles en el control de inmunomarcación (PBS en vez de anticuerpo primario-S2-566).

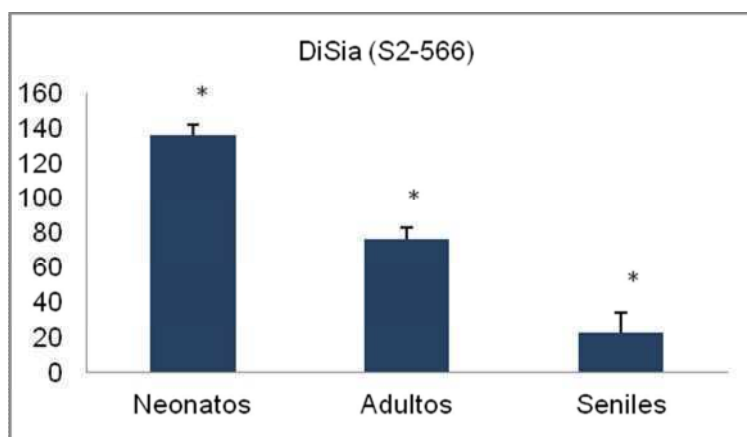


Gráfico representativo de la tabla II: Representación en barras de los niveles de densidad de marcas positivas para S2-566 (con el programa *ImageJ*), en el cerebelo de ratones en diferentes etapas del desarrollo. Mediante un test de ANOVA de un factor se constató que en cerebelo, los tres grupos poseen una media significativamente diferente entre grupos (* $P < 0,001$). Las comparaciones post hoc fueron realizadas mediante LSD Fisher.

2.1.3.1. Inmunomarcación y análisis de la efectividad del inhibidor de la síntesis de gangliósidos NB-DGJ en cortes de cerebro de ratón neonato.

En la etapa anterior se observó en la línea celular PC12 que los cultivos tratados con NB-DGJ mostraban el mismo patrón de inmunomarcación que los que no recibieron el tratamiento. Para estudiar qué ocurre in vivo, tratamos ratones neonatos con el inhibidor. Los ratones tratados con NB-DGJ mostraron el mismo patrón de inmunomarcación (con S2-566) que los ratones no tratados, lo que sugiere que estas marcas corresponden a las glicoproteínas (Fig. 2.6 C y D).

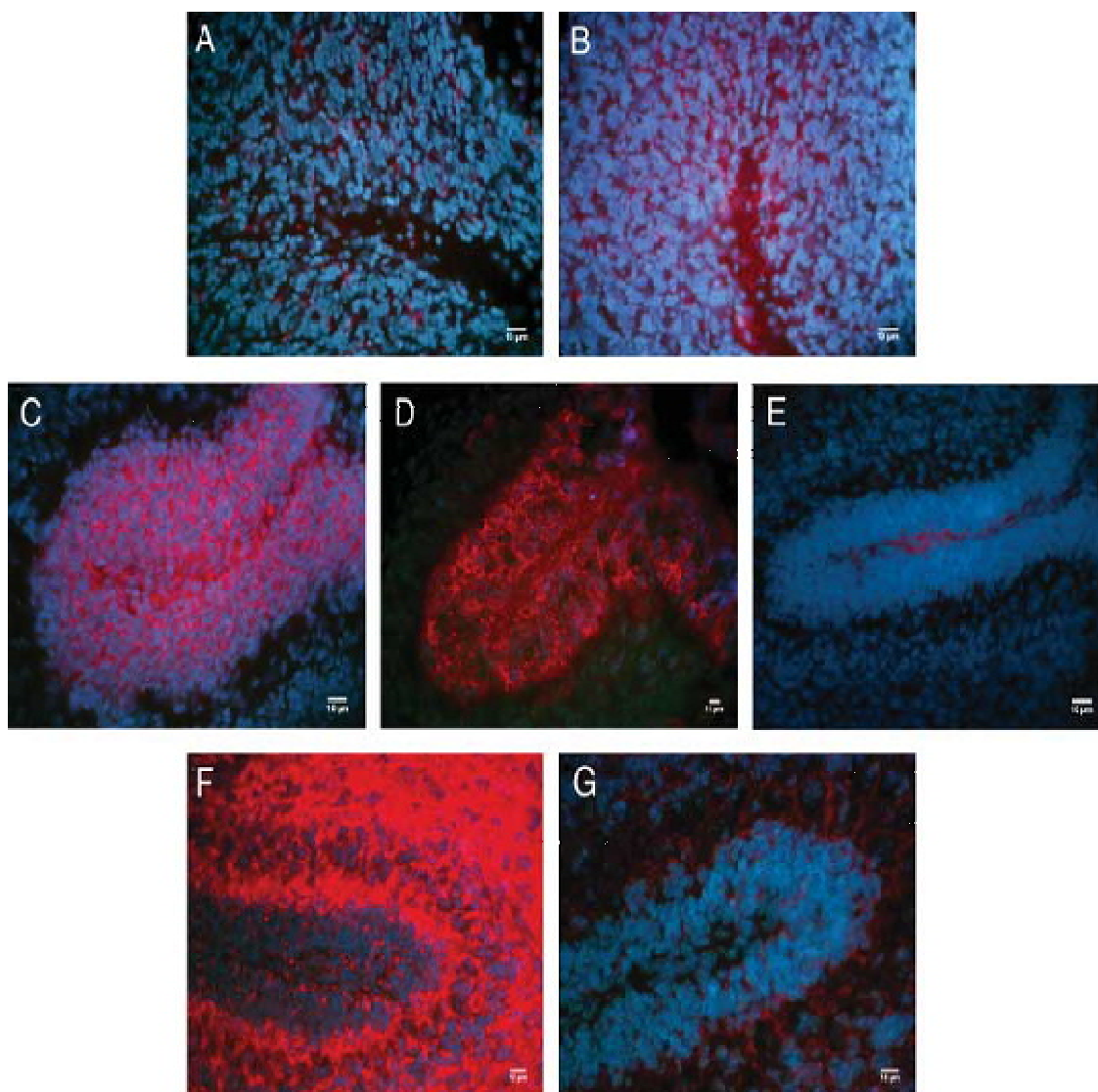


Figura 2.6. Cerebelo de ratón inmunomarcado con S2-566, **A:** Ratón senil, **B:** Adulto, **C:** Neonato, **D:** Neonato tratado con NB-DGJ. **E:** Neonato control, **F:** Cerebelo de Neonato inmunomarcado con anti -GM1, **G:** Neonato tratado con NB-DGJ.

En la tabla III se presentan los resultados obtenidos de cuantificar mediante el programa ImageJ los pixeles positivos para GM1 (Media+) en 10 campos diferentes, al que se resta los pixeles obtenidos de 10 campos controles (Media-), en los que en vez del anticuerpo primario se utilizó PBS.

La marcada disminución de GM1 observada en todo el cerebro de ratones tratados con NB-DGJ (aproximadamente 100 veces) en comparación con los animales no tratados indica que el tratamiento fue efectivo.

Tabla III: Resultados de análisis de la densidad de marcas positivas para GM1 en el cerebelo de ratones neonatos.

| | Neonatos Tratados (NB-DGJ) | Neonatos Control |
|-----------|-------------------------------|---------------------|
| Media (+) | 77,7 | 114,4 |
| Media (-) | 30,0 | 25,2 |
| Total: | 47,7 | 89,2 |

El valor total se obtuvo de (Media+) - (Media-). Donde “Media+” es el total de píxeles correspondientes a la marcaciones obtenidas con el anticuerpo primario anti GM1 (Choleric Toxin Alexa 555) y “Media-“ píxeles en el control de inmunomarcación (PBS en vez de anticuerpo primario).

2.1.3.2. Tratamiento de criosecciones de cerebro de ratón, para hidrólisis selectiva de epítopes glicosilados y sialilados.

Con el objetivo de obtener información respecto a los glicoconjugados que contienen DiSia desarrollamos técnicas de análisis *in situ* de los componentes disialilados en el tejido.

2.1.3.2.1. Hidrólisis ácida para hidrolizar los epítopes sialilados.

La hidrólisis ácida en condiciones suaves es un tratamiento químico que corta todos los ácidos siálicos del tejido. Logramos nuestro objetivo con el tratamiento durante 2 horas a 80°C.

El tratamiento “hidrólisis ácida” no dejó epítope en el tejido donde pudiera unirse el anticuerpo S2-566, por lo que confirmamos que el anticuerpo es específico de ácidos siálicos (Fig. 2.7).

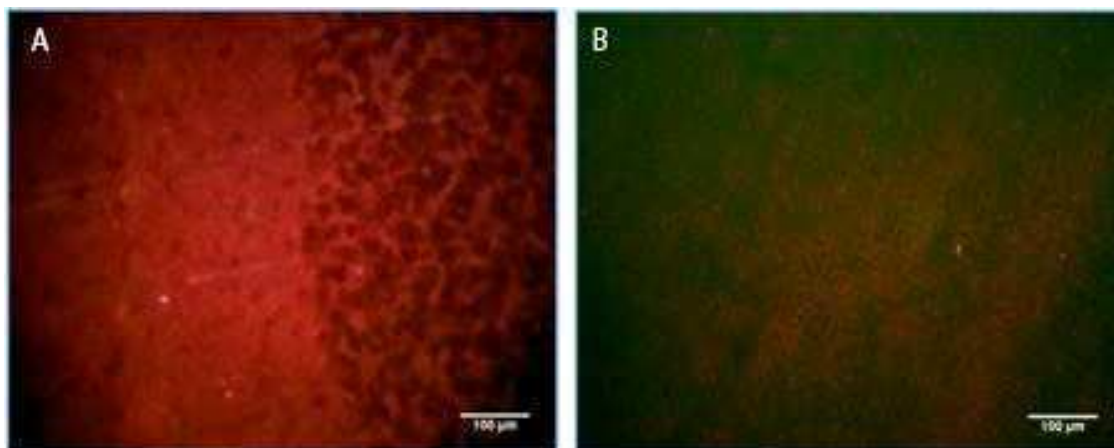


Figura 2.7. Cerebelo de ratón neonato tratado con hidrólisis ácida, e inmunomarcado con S2-566. Visto al microscopio de fluorescencia a **A:** Sin tratar y **B:** Tratado.

2.1.3.2.2. N-glicanasa y a continuación β -eliminación.

A modo de control, tratamos con N-glicanasa + β -eliminación y al igual que el tratamiento de hidrólisis ácida eliminó a todos los DiSia. Dado que no se obtuvo marcas con S2-566 podemos sugerir que todos los residuos DiSia fueron hidrolizados por estos métodos. El resultado obtenido fue similar al observado con hidrólisis ácida, mediante el cual se cortan todas las uniones de ácidos siálicos sin discriminar uniones.

2.1.3.2.3. N-glicanasa (para hidrolizar los epitopes con enlaces del tipo N-glicosídico).

El tratamiento con la enzima N-glicanasa elimina del tejido todos los epitopes N-glicanos y en consecuencia, al inmunomarcarse con S2-566, las marcas positivas corresponden a O-glicanos.

El tiempo de tratamiento fue determinado mediante varias pruebas y se concluyó que 24 horas de tratamiento a 37°C es suficiente y efectivo para el objetivo deseado. Cuando inmunomarcamos con S2-566 las marcas positivas eran difusas en todas las estructuras (Fig. 2.8).

De acuerdo a estos resultados, la marcación se redujo respecto al control (43, 24%), pero no completamente, sugiriendo que un grupo de glicoproteínas N-glicosiladas presentan el epitope DiSia.

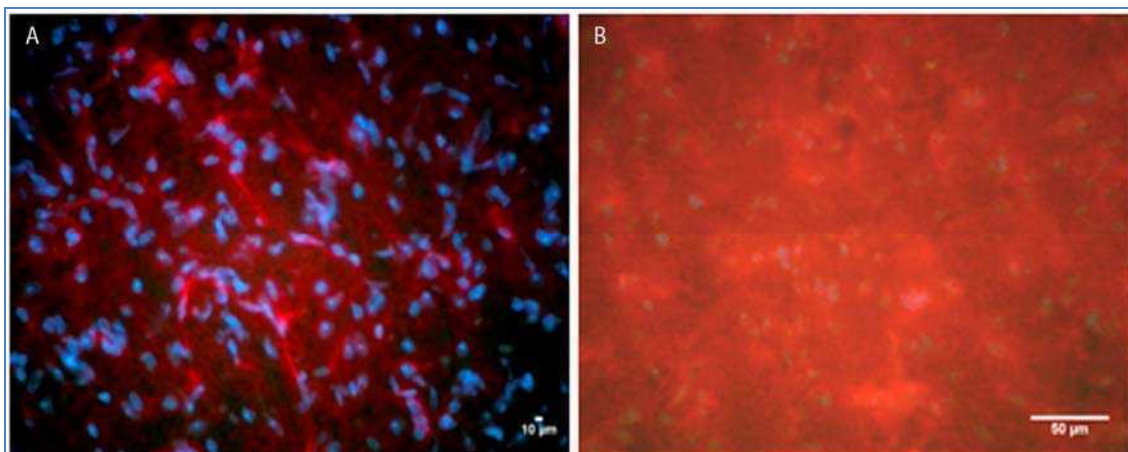


Figura 2.8. Cerebelo de ratón neonato tratado con N-glicanasa y luego inmunomarcado con S2-566. Visto al microscopio de fluorescencia a **A:** Tratado y **B:** sin tratamiento.

2.1.3.2.4. β -eliminación (para eliminar los epitopes con enlaces del tipo O-glicosídico).

β -eliminación se denomina el tratamiento con NaOH para hidrolizar los epitopes con uniones O-glicosídicas. Luego de varias pruebas determinamos que el tratamiento adecuado consiste en la incubación durante 4 días, a 4°C.

Cuando despues tratamos con S2-566, las marcas positivas (N-glicanos) se restringieron al cuerpo calloso y fibras en el cerebelo (Fig. 2.9). Esto nos sugería que hay glicoproteínas con uniones N-glicano en estas estructuras.

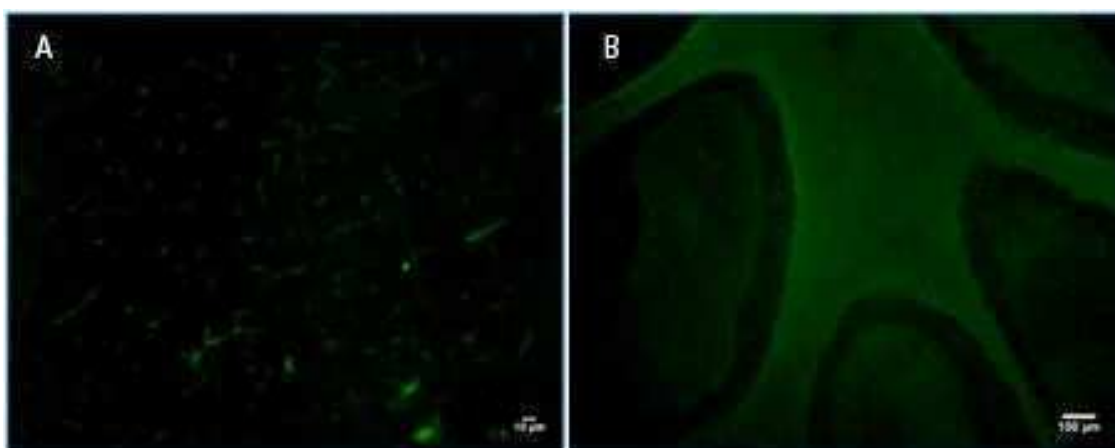


Figura 2.9. Cerebelo de ratón neonato tratado para β -eliminación e inmunomarcado con S2-566 . Visto al microscopio de fluorescencia a **A:** 10x y **B:** 100x.

El tratamiento para β -eliminación *in-situ* eliminó los epitopes O-glicosilados, con lo cual la inmunomarcación con S2-566 fue menor (32,64 %) que en las criosecciones control, significando que también cadenas O-glicosídicas de glicoproteínas en el tejido analizado eran portadoras de DiSia.

En síntesis, a partir de estos resultados, podemos concluir que en diferentes proporciones ambos tipos de uniones, tanto O-glicosídicas, como N-glicosídicas, se encuentran en las proteínas disialiladas.

La presencia de epitopes oligosialilados es de importancia en el SNC. En resultados publicados previamente por Bleckmann y colaboradores, se ha evidenciado una interacción en el SNC de moléculas CD24+ con la molécula de adhesión L1. Esta interacción estaría mediada por residuos de ácidos siálicos en cadenas O-glicosídicas, pero en este caso con enlaces α 2,3. Por otra parte, en las mismas moléculas CD24+, se atribuye a la N-glicosilación funciones de promoción del crecimiento de neuritas en neuronas cerebelares (Bleckmann et al., 2009). En relación con nuestro trabajo resta demostrar si CD24, es también portador de DiSia (con uniones α 2,8).

Los ácidos polisiálicos son importantes en la señalización del SNC y durante el desarrollo (Rutishauser y Landmesser, 1996). Según los resultados publicados por Kanato y colaboradores, en estadios embrionarios del desarrollo del cerebro del ratón la longitud del polímero supera los 55 monómeros, pero a medida que el cerebro se termina de organizar anatómicamente y estabiliza sus conexiones, la longitud del polímero va decreciendo gradualmente (Kanato et al., 2008). Sin embargo, en los ratones adultos, en las regiones del cerebro donde persiste la neurogénesis y sinaptogénesis como ocurre en el hipocampo, los poliSia persisten (Cremer et al., 2000).

2.2. Localización y cuantificación de ST8SiaIII, mediante técnicas de biología molecular, en las distintas estructuras del sistema nervioso de ratones neonatos, adultos y seniles.

Con el objetivo de corroborar la correspondencia entre niveles de expresión de las ST8Sia que pudieran biosintetizar DiSia en cada estructura del cerebro analizada se evaluaron los niveles de ARN mensajero de diferentes sialiltransferasas y también el patrón de proteínas disialiladas en el cerebro de ratón.

2.2.1. Semicuantificación relativa de ARN mensajero (ARNm) mediante Reaccion en Cadena de la Polimerasa, en Tiempo Real (RT-PCR).

La cuantificación relativa de la expresión de genes en el cerebro en diferentes regiones se determinó por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR).

La enzima ST8SiaIII fue sugerida en varias ocasiones como sialiltransferasa responsable de la síntesis de ácidos polisiálicos y oligosiálicos en glicolípidos y glicoproteínas en cerebro de mamíferos (Yoshida et al., 1996; Sato et al., 2000; Angata et al., 2000; Kitazume-Kawaguchi et al., 2001; Inoko et al., 2010) y en otros organismos y tejidos (Yoshida et al., 1996; Sato et al., 2001). Sin embargo, los resultados in vitro obtenidos por Sato y colaboradores sugirieron una posible correspondencia de esta enzima con la biosíntesis de DiSia (Sato et al., 2002).

Para el gen ST8SiaIII, no hubo diferencias significativas en el hipocampo, bulbo olfatorio o corteza, en cualquiera de los grupos. Sin embargo, se encontró una disminución significativa ($p = 0,01$, "t"-test) en el cerebelo de ratones seniles ($0,3480 \pm 0,1803$) en comparación con los recién nacidos ($1,000 \pm 0,1060$; Fig. 2.10 A).

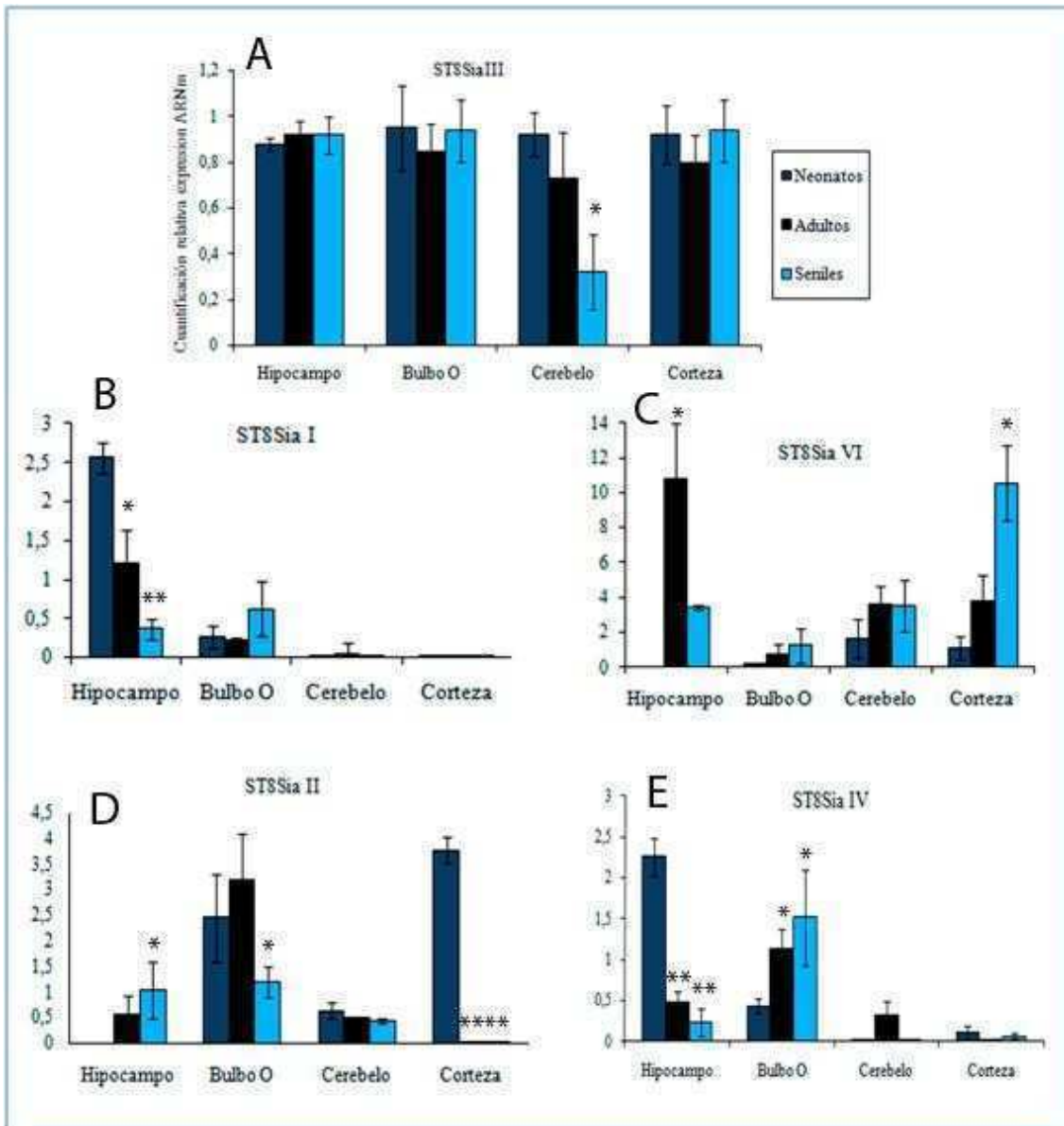


Figura 2.10. Real Time PCR: Cuantificación relativa de ARNm. Cuantificación relativa del ARNm de sialiltransferasas relativo a β -actina. Los tejidos analizados fueron: el hipocampo, bulbo olfatorio, cerebelo y corteza del cerebro de ratón a diferentes etapas del desarrollo postnatal, **A:** ST8SiaIII, * $P < 0,05$, prueba de “t”, entre el grupo neonato y senil. **B:** ST8SiaI, * $P < 0,05$, prueba de “t”, entre el grupo neonato y senil; ** $P < 0,01$, prueba de “t”, entre adultos y seniles. **C:** ST8SiaVI, * $P < 0,05$, prueba de “t”, comparado con el grupo neonato. **D:** ST8SiaII, * $P < 0,05$, prueba de “t”, entre el grupo neonato y senil; ** $P < 0,01$, prueba de “t” comparado con el grupo neonato. **E:** ST8SiaIV, * $P < 0,05$, prueba de “t”, comparado con el grupo neonato; ** $P < 0,01$, prueba de “t” comparado con el grupo neonato.

También se estudió la expresión génica de las disialiltransferasas ST8SiaI y ST8SiaVI en las mismas estructuras.

La sialiltransferasa ST8SiaI fue previamente descrita como sialiltransferasa responsable de catalizar la unión a gangliósidos (GD3) (Wantanabe et al., 1996). El ARN mensajero de ST8SiaI, presentó altos niveles de expresión en el hipocampo de los recién nacidos y disminuyó los niveles en los adultos y seniles. En contraste, en el bulbo olfatorio, la expresión del gen ST8SiaI fue mayor en el grupo senil, en comparación con los recién nacidos y los adultos. En la corteza y el cerebelo se observaron niveles muy bajos de expresión del gen ST8SiaI (Figura 2.10 B).

Con respecto a ST8SiaVI, sialiltransferasa que cataliza las uniones de ácidos siálicos a O-glicanos (Takashima et al., 2002), se observó la expresión de este gen en relativamente altos niveles en el hipocampo de adultos, disminuyendo significativamente en seniles, y no se detectó ARNm de ST8SiaVI en hipocampo de ratones neonatos. En el bulbo olfatorio, corteza y cerebelo, fue observado un aumento gradual en los niveles de ARNm de ST8SiaVI, con niveles bajos en los recién nacidos pero elevados en la corteza de los animales seniles (Figura 2.10 C).

Los genes de las polisialiltransferasas ST8SiaII y ST8SiaIV se analizaron también porque sintetizan los epitopes Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac en ácidos polisiálicos, y fueron previamente sugeridas por Sato et al., como las responsables de biosintetizar DiSia (Sato et al., 2002).

Se encontró que la expresión del gen ST8SiaII aumenta en hipocampo, durante el transcurso de la vida del ratón, en bulbo olfatorio aumenta desde etapas neonatales a adultos y disminuye hacia estadios seniles; se expresa en altos niveles en la corteza de neonatos, y luego decae a niveles indetectables en la adultez, y senilidad; mientras que su expresión es constante y baja en el cerebelo en todas las etapas del desarrollo del ratón (Figura 2.10 D). Respecto a los niveles del gen ST8SiaIV, en el hipocampo se observó que en recién nacidos se expresa en elevado niveles y decae luego durante las sucesivas etapas del desarrollo opuesto a lo que ocurre en el bulbo olfatorio, donde aumenta gradualmente los niveles de ARNm. En la corteza, los niveles de ARNm de ST8SiaIV disminuye desde neonatos a adultos y vuelve a incrementar los niveles en los seniles, contrariamente al cerebelo, donde aumentan los niveles de ARNm desde recién

nacidos a adultos y disminuye de nuevo en el grupo senil. En estas dos últimas estructuras los niveles son muy bajos (Figura 2.10 E).

En la figura 2.11 se representan los niveles de ARNm de ST8SiaI, ST8SiaIII y ST8SiaVI relativa a β -actina en cerebelo de ratones neonatos, adultos y seniles.

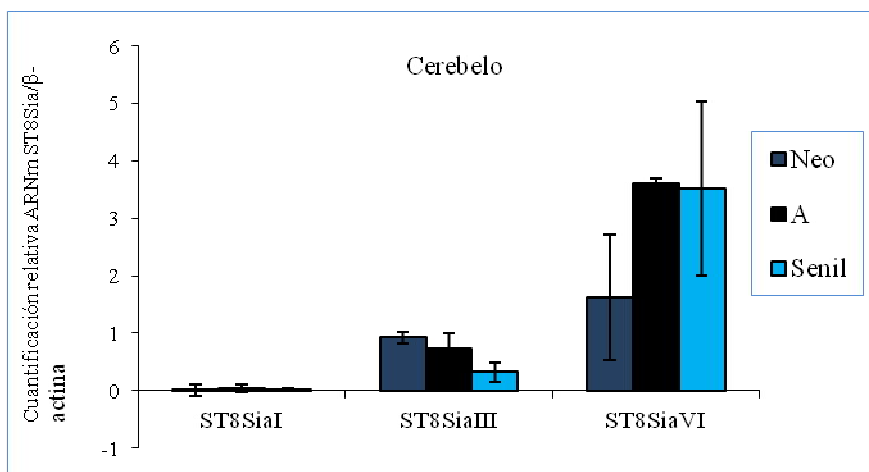


Figura 2.11. Cuantificación de ARNm de ST8SiaI, ST8SiaIII y ST8SiaVI relativa a β -actina en cerebelo de ratón Neo (neonato), A (adulto) y Senil.

A partir de estos resultados se observó que los niveles de expresión de ARNm de la sialiltransferasa ST8SiaIII muestran un comportamiento similar al de los niveles de DiSia en el SNC, como podemos ver en la figura 2.12, de manera particular en el cerebelo, donde en ambos casos (ARNm de ST8SiaIII y DiSia) presentan variaciones en el transcurso de la vida.

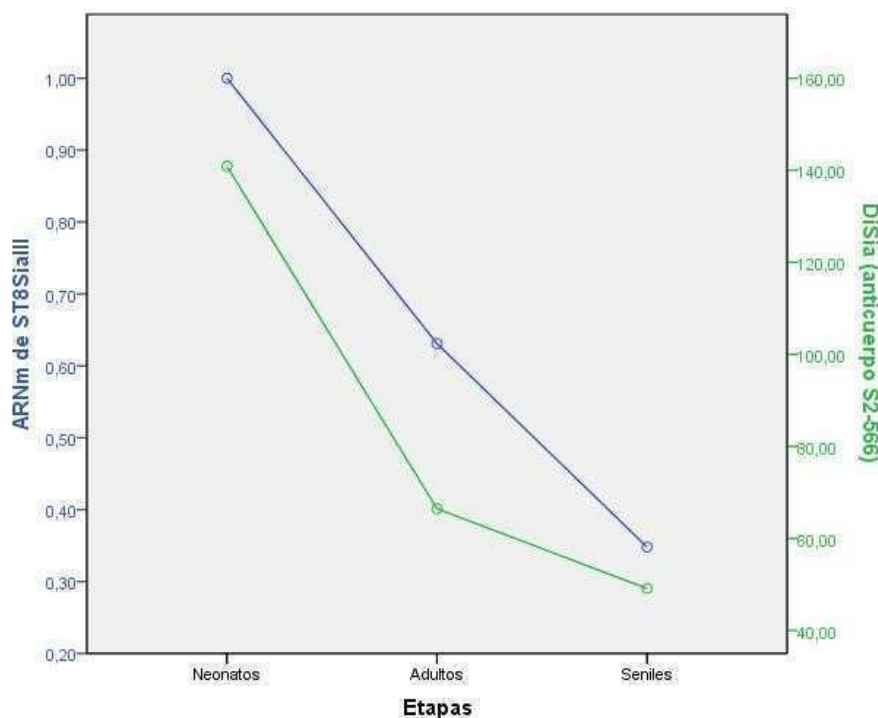


Figura 2.12. Representación, mediante gráfico de medias, de la naturaleza decreciente en el tiempo de las expresiones de DiSia y ARNm de ST8SiaIII en el cerebelo de ratón.

Con el fin de analizar si la expresión de ST8SiaIII podría vincularse transcripcionalmente con la expresión de un gen relacionado con la arquitectura de las sinápsis, se analizó la expresión génica de sinaptofisina en diferentes etapas del desarrollo (Fig. 2.13). Sinaptofisina es una glicoproteína que se encuentra en las vesículas sinápticas, en el cerebro y tiene por función estabilizar las uniones sinápticas ya establecidas (Tarsa y Goda, 2002).

En el cerebelo de animales del grupo neonatos, así como en los seniles, la expresión del gen de sinaptofisina, se vio disminuida en comparación con los animales adultos ($P < 0,01$, $F = 8,46$ análisis de varianza entre los grupos). En esta estructura se observó que en neonatos la expresión del gen sinaptofisina tuvo una correlación inversa fuerte y significativa con la del gen ST8SiaIII ($r = -0,95$, $P < 0,05$). Sin embargo, en animales adultos y seniles, la correlación fue directa, aunque no significativa ($r = 0,84$, $P > 0,05$, $r = 0,83$; $P > 0,05$). Esto podría indicar una relación funcional entre ambos genes en las sinapsis cerebelares. Podemos especular, que la baja expresión de ST8SiaIII podría estar relacionada con una disminución en la estabilidad de las uniones sinápticas (Ver más adelante implicancias en la patología neurológica).

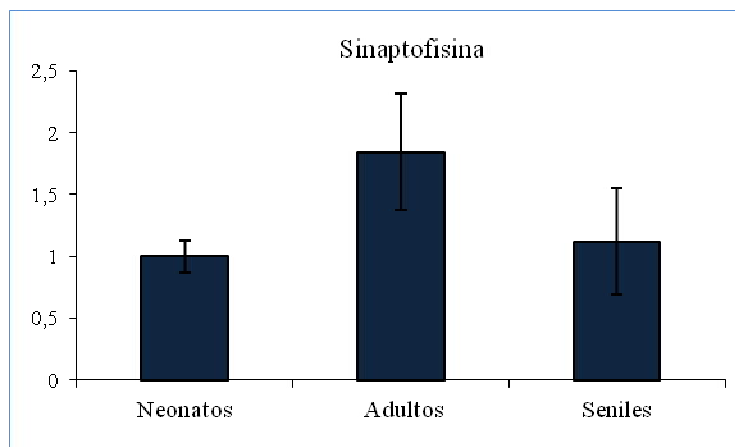


Figura 2.13. Cuantificación relativa del ARNm de Sinaptofisina en cerebro ratón a diferentes etapas del desarrollo postnatal, (* $P < 0,05$, $t = -3,46$, prueba de “t” entre neonatos y adultos; ** $P < 0,05$, $t = 2,72$, prueba de “t”-entre adultos y seniles).

2.2.2. Evaluación de la expresión de proteínas (SDS-PAGE y Western blot).

Se investigó a nivel proteico la expresión de la enzima ST8SiaIII y de su producto, las glicoproteínas disialiladas, para lo cual se realizó Western-blots y sobre la misma membrana se marcó con el anticuerpo anti- β -actina, para luego medir intensidades y restar la intensidad de β -actina a la del epítipo de interés. De este modo el valor final no está sujeto a diferencias en cantidad de siembra. Se compararon las cantidades de proteínas entre diferentes edades en la misma estructura.

La banda obtenida con el anticuerpo anti-ST8SiaIII se observó a 44 kDa, coincidentemente con las referencias proporcionadas por el fabricante. Se observaron variaciones insignificantes en hipocampo, bulbo olfatorio y corteza a diferentes edades. Sin embargo, en cerebelo los niveles de la proteína sialiltransferasa ST8SiaIII disminuye de neonatos a adultos, pero más notoriamente en seniles (Fig. 2.14). Se realizó la cuantificación de ST8SiaIII relativa a β -actina, y para ello se utilizó el programa *ImageJ* para medir y relativizar la intensidad de las bandas.

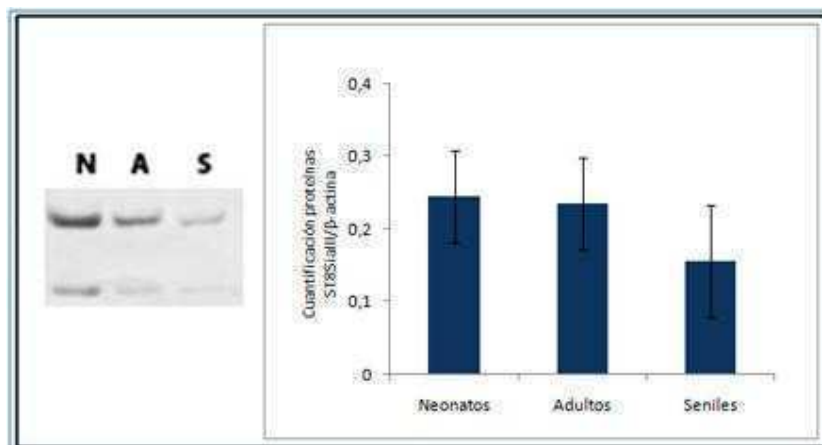


Figura 2.14: Western-blot ST8SiaIII/ β -actina. A la izquierda: N: Neonatos, A: Adultos y S: Seniles. Electroforesis en gel de acrilamida 10%. Transferencia a membrana PVDF e inmunodetectadas con anticuerpo primario anti- β -actina, y anti-ST8SiaIII. Las bandas correspondientes a β -actina (47 KDa) y ST8SiaIII (44 KDa), superior e inferior respectivamente fueron reveladas con el sistema HRP-DAB como se explica en el capítulo 3. A la derecha: Mediciones de concentración relativa ST8SiaIII/ β -actina, de acuerdo a la intensidad de las bandas (con el programa *ImageJ*).

Por otro lado, en la figura 2.15 se observan las glicoproteínas marcadas en el western que se obtuvo con anti- DiSia. Los pesos moleculares de las mismas correspondieron a 38 KDa, 44 kDa, 48 kDa, 70 kDa, 76 kDa y la ya identificada por Sato y colaboradores de 100 kDa (CD166). Además, de acuerdo con las referencias donde la membrana había sido tratada con una lisis alcalina suave para eliminar O-glicanos (β -eliminación) no aparecían las bandas de 70 kDa y de 76 kDa (Sato et al., 2002), lo cual podría indicar que ambas corresponden a glicoproteínas con enlaces O-glicosídicos.

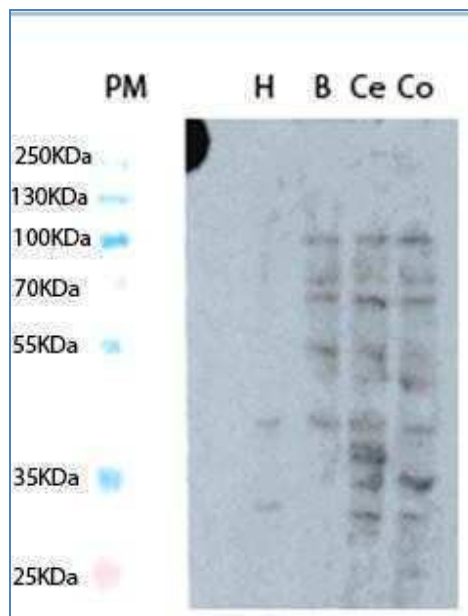


Figura 2.15. Western-blot. Proteínas de **H**ipocampo, **B**ulbo olfatorio, **Ce**rebelo y **Co**rteza de ratones neonatos. Electroforesis en gel de poliacrilamida 10%. Transferidas a membrana PVDF inmunodetectadas con anticuerpo primario anti- DiSia (S2-566).

2.2.3. *Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución (HPAEC).*

Con la técnica de HPAEC se pretendía cuantificar las concentraciones de ácido disiálico en cerebro, en cada estructura y en diferentes etapas del desarrollo. Luego de varias pruebas llegamos a identificar los ácidos siálicos, pero éste método resultó no ser apropiado para nuestra investigación, dado que el tratamiento requerido para liberar los ácidos disiálicos de las proteínas adheridas a la membrana de PVDF (previamente transferidas desde un western-blot) probablemente hidrolizaba las uniones entre los ácidos siálicos.

2.3. Potencial función de los DiSia en las glicoproteínas de membrana de células neurales in vitro.

Para estudiar la potencial función de DiSia optamos por inhibir la expresión de la enzima ST8SiaIII a nivel transcripcional. Los experimentos con RNAi para ST8SiaIII en cultivos de Neuro2A contribuyeron a seleccionar la secuencia más eficiente y las condiciones experimentales para inhibir la expresión de la sialiltransferasa *in vitro*. Luego, se administró el plásmido a ratones neonatos. A diferentes edades del ratón, se analizaron los niveles de ARNm y proteína ST8SiaIII; además se evaluó a los ratones tratados en un test conductual.

2.3.1. Análisis de la capacidad de las células de expresar un plásmido y silenciar su producto (GFP) mediante RNAi.

Se transfectó el cultivo Neuro2A, a diferentes tiempos para observar la eficiencia de transfección y tiempo requerido para el silenciamiento; y de este modo optimizar los resultados.

En este experimento comprobamos la capacidad de la línea celular neural Neuro2A de incorporar un plásmido mediante la administración del complejo liposomas-ADN al cultivo, y de traducir a proteína la secuencia que transporta el plásmido (pGFP), en este caso la proteína fluorescente verde (GFP-Green Fluorescent Protein).

Además, co-transfectamos plásmidos pGFP (a la hora “cero”), y RNAi para GFP (pGFP-RNAi) a las 24 h, 48 hs y 72 h como se observa en la Figura 2.16.

De este modo corroboramos que la línea Neuro2A también es capaz de transcribir la secuencia para RNAi del plásmido, y que además desencadena el mecanismo de RNAi. Esta última observación, de importancia para los siguientes experimentos, y dado que se trata de una línea celular de origen tumoral, era imprescindible asegurarnos que las enzimas de esta vía se encuentren funcionales.

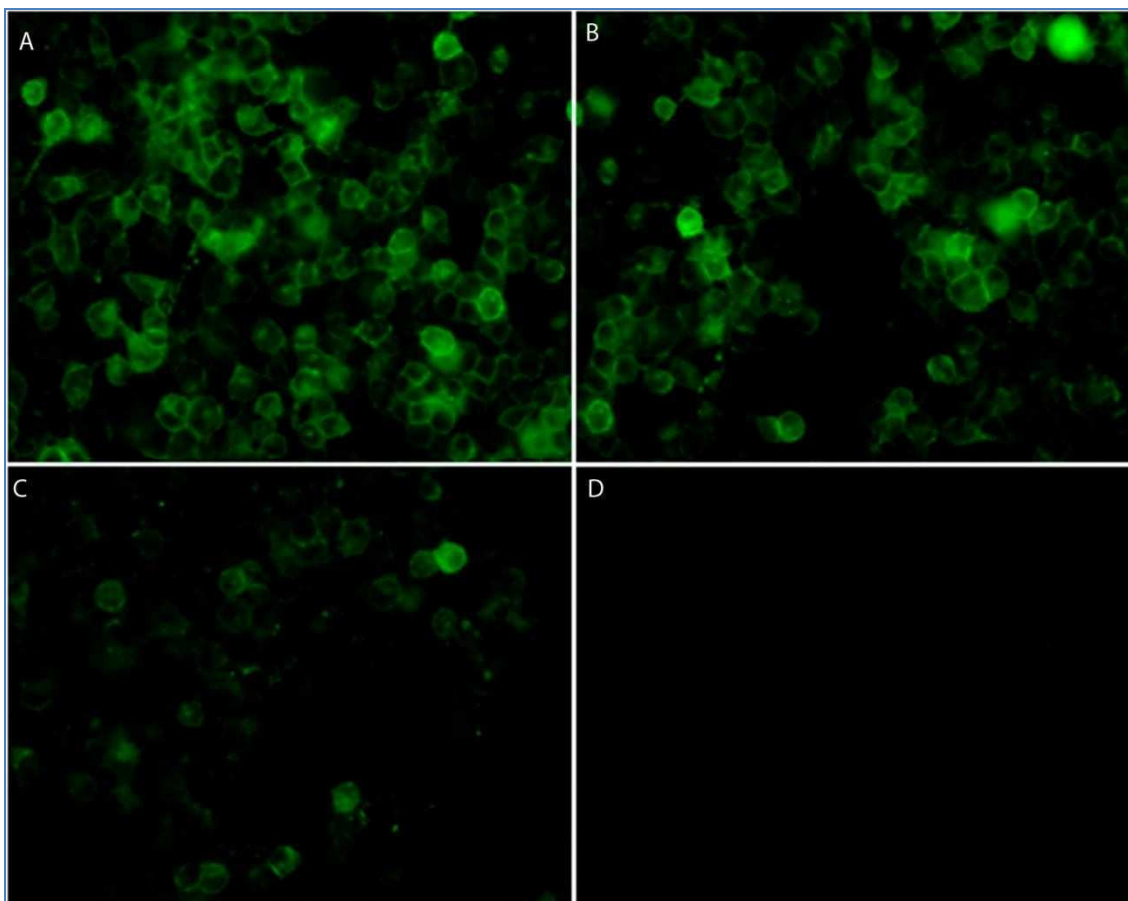


Figura 2.16. Las células Neuro2A, 72 h post- transfección con pGFP. **A:** 24 h. **B:** 48h. **C:** 72 h post-RNAi para GFP. **D:** Control (transfectadas solo con pGFP-RNAi). Microscopio de fluorescencia, aumento 40x.

2.3.2. Evaluación de la eficiencia de silenciamiento por parte de las secuencias RNAi en cultivo celular.

Para evaluar que secuencia (de 4 posibles) sería la más eficiente en inhibir la expresión de ST8SiaIII transfectamos cultivos de células Neuro2A y se observó cual era eficiente en evitar la extensión de las neuritas.

Se enumeraron los plásmidos como p1, p2, p3, p4, pSi y pIs.

Los cultivos controles, tratados con lipofectamina sin plásmido (Figura 2.17 A), y los cultivos blanco, sin lipofectamina y sin plásmido (Figura 2.17 B), así como también el cultivo transfectado con p4, presentaban más del 80% de las células con neuritas cuando fueron tratados con el neurotrópico AR (Fig. 2.17 E).

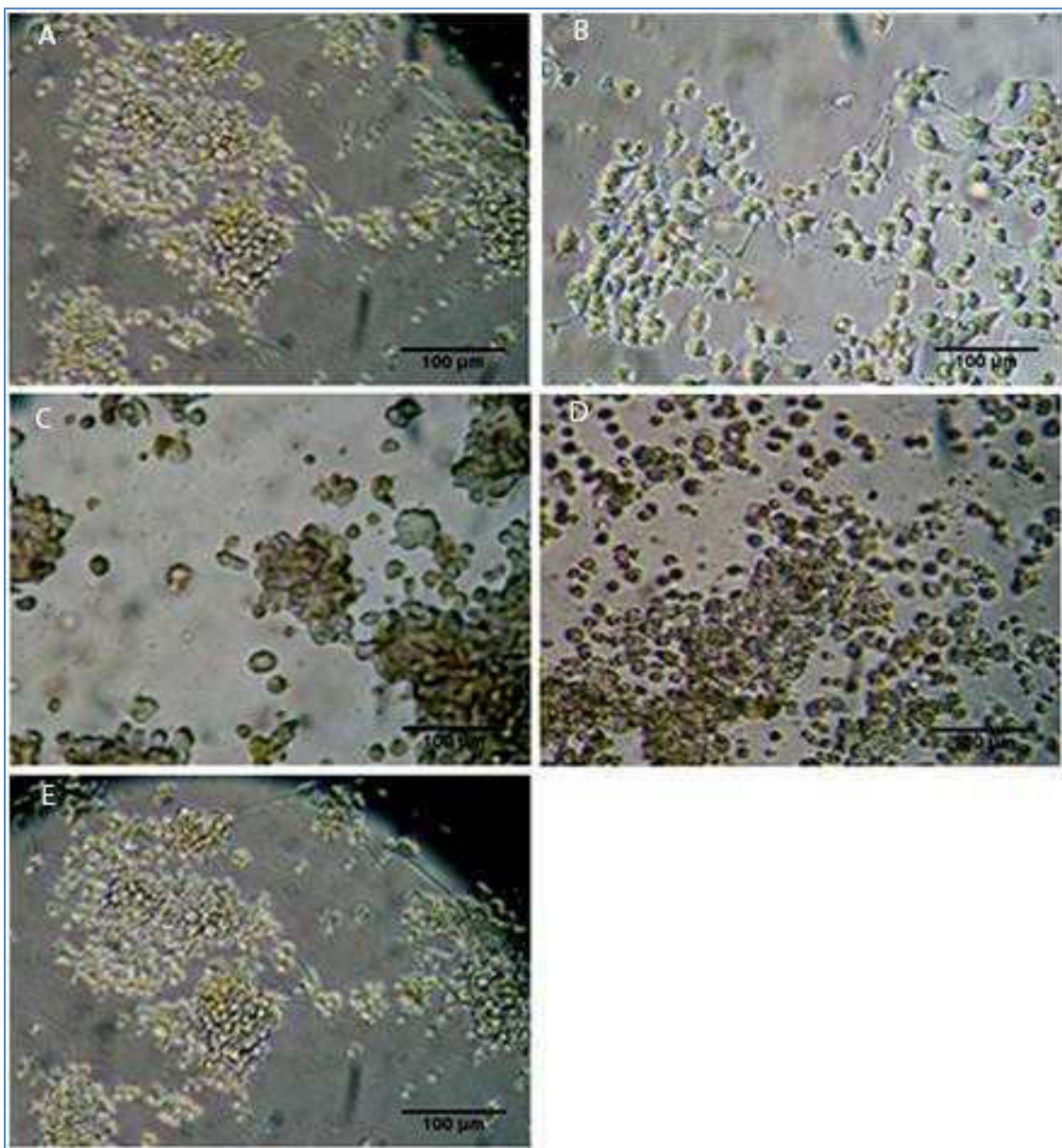


Figura 2.17. Cultivo de células Neuro2A transfectadas con plásmidos con RNAi para la enzima ST8SiaIII. **A:** Control (con lipofectamina y sin plásmido), **B:** Blanco (sin lipofectamina y sin plásmido), **C:** Plásmido 1, **D:** Plásmido 3, y **E:** Plásmido 4. Microscopio de contraste de fase, aumento 10 X.

2.3.3. Estimación de la eficiencia de transfección de los plásmidos RNAi.

Con el objetivo de optimizar la transfección de las células in vivo, se cuantificó en cultivo de células Neuro2A, el número de células transfectadas (GFP positivo) y no transfectadas (GFP negativo) con los plásmidos candidatos (Figuras 2.17 y 2.18), y se

determinó cual amplificar para proceder a las siguientes etapas. Se obtuvieron los siguientes porcentajes:

Células GFP⁺ / (Células GFP⁺ + células GFP⁻):

| | |
|------------|---------------|
| p1: | 27,27% |
| p2: | 20,10% |
| p3: | 37,20% |
| p4: | 33,33% |
| pIs: | 36,10% |
| pSi: | 44,33% |

p1, p2, p3, p4 son los plásmidos con secuencias RNAi para ST8SiaIII, mientras que los plasmidos controles son pIs, plásmido con inserto inespecífico y pSi, plásmido sin inserto.

Los plásmidos p1, p2 y p3 eran los candidatos a seleccionar para inhibir la expresión de ST8SiaIII en los experimentos de RNAi. De estos tres el más eficiente en transfectar células en el cultivo Neuro2A fue p3 con el 37,2 %, por lo que fue el elegido para los experimentos que siguen.

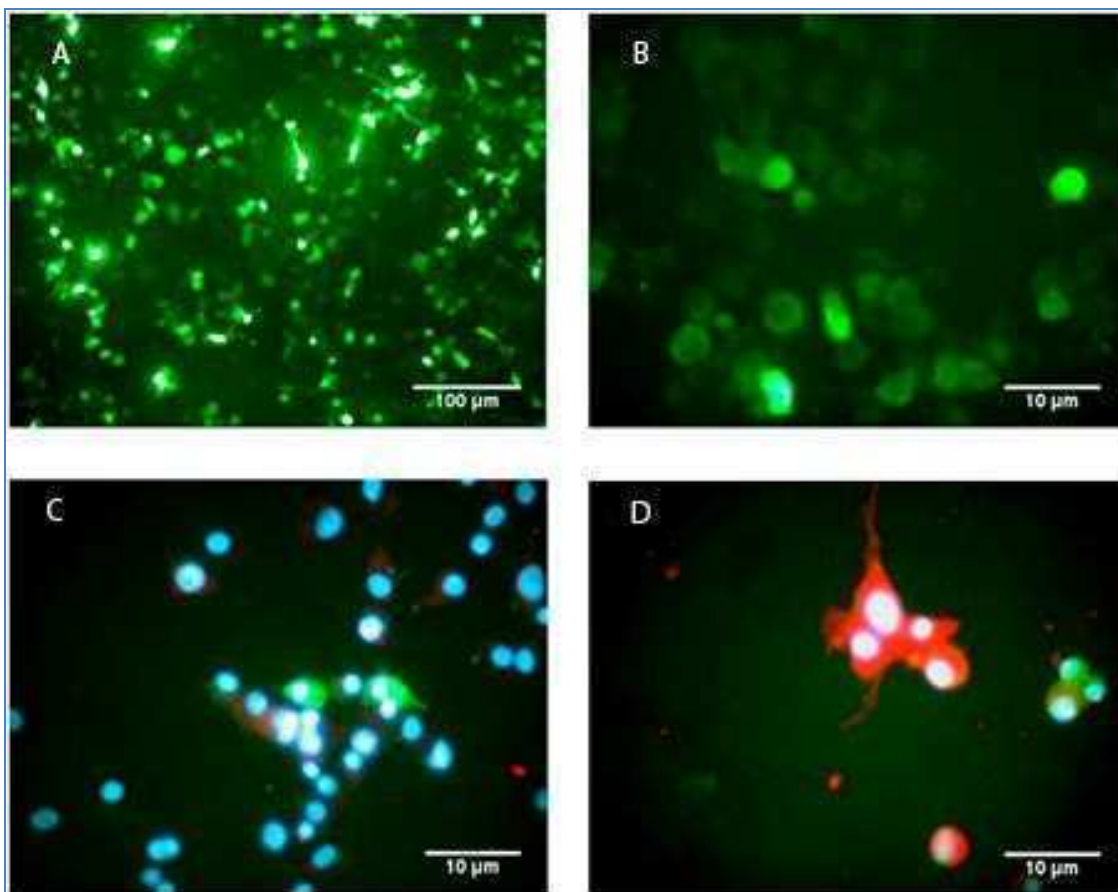


Figura 2.18. Cultivos de células Neuro2A transfectadas con plásmidos (pIs: con secuencia RNAi inespecífica) con GFP. **A y B:** para contar células positivas/negativas, a 10x y 40x respectivamente. **C y D:** el mismo cultivo inmunomarcado con S2-566.

2.3.4. Estimación del tiempo requerido en células neurales para la transcripción del plásmido.

Mediante la transfección de un cultivo primario de células de cerebro de ratón neonato se estimó el tiempo requerido para la expresión óptima del plásmido (el gen reportero GFP -Proteína Fluorescente Verde- se expresa en todas las células que hayan incorporado el plásmido), por lo que el cultivo fue observado diariamente, al microscopio y los resultados fueron los detallados en la tabla IV.

Tabla IV: Tiempo transcurrido desde la transfección con pSi (GFP+) hasta que se observó al microscopio de fluorescencia para estimar el porcentaje de células transfectadas (GFP+).

| Desde la transfección | Células GFP ⁺ |
|-----------------------|--------------------------|
| 48 hs | no |
| 72 hs | no |
| 120 hs | 10 % |
| 144 hs (6 días) | 40% |
| 192 hs (8 días) | no |

De estas observaciones definimos que 6 días después de la transfección el plásmido se encuentra en su máximo nivel de expresión.

La siguiente etapa consistió en administrar el plásmido con RNAi para ST8SiaIII (pST8) in vivo.

2.3.5. Análisis de los efectos del tratamiento con RNAi para ST8SiaIII en ratones, mediante técnicas de biología molecular e histoquímica.

Una vez administrado el plásmido a los ratones y transcurrido el tiempo correspondiente en cada grupo, el siguiente objetivo fue poner en evidencia la disminución de la expresión del gen por el tratamiento con RNAi. Mediante RT-PCR y Western-blot evaluamos los niveles de ARNm y de proteínas, respectivamente.

2.3.5.1. Análisis de los niveles de ARNm de ST8SiaIII mediante RT-PCR en diferentes estructuras del cerebro de ratones.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en las experiencias de (a) selección de la secuencia más eficiente en inhibir la traducción de ST8SiaIII (p1, p2, p3) (b) secuencia más eficiente en cuanto a transfección (p3), y (c) el tiempo requerido para la expresión

del plásmido (6-7 días), se procedió al siguiente paso: la administración del plásmido con RNAi para ST8SiaIII (pST8) al cerebro de ratones neonatos.

Los resultados fueron similares a los obtenidos cuando se administró pST8 a células en cultivo primario. A los 8 días de administrado el plásmido, la expresión del gen se había reducido considerablemente en todas las estructuras analizadas, indicando que el plásmido fue transcrito y el mecanismo de ARNi inhibió la expresión del gen a nivel post- transcripcional. Sin embargo, luego de algunos días los niveles de ARNm retornaron a la normalidad y se mantuvieron (Figura 2.19).

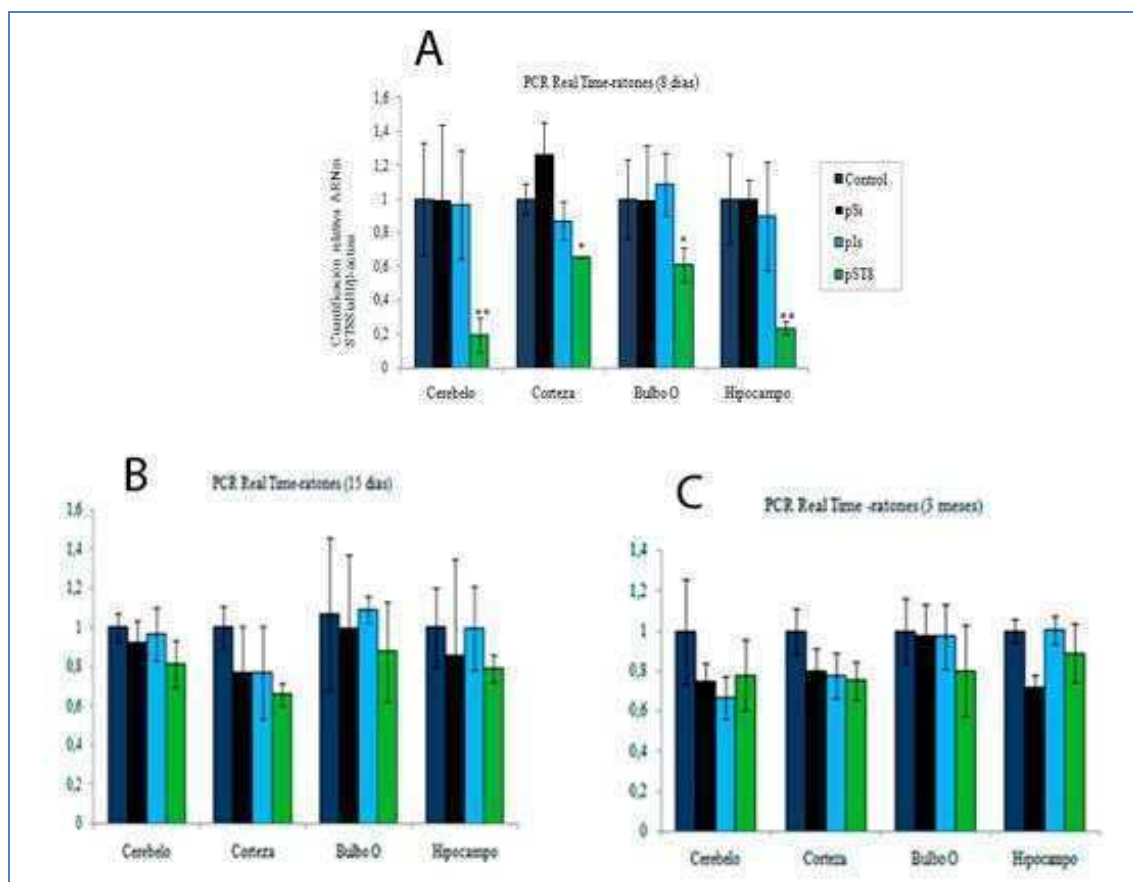


Figura 2.19. Cuantificación relativa de ARN mensajero de ST8SiaIII/ β -actina en las estructuras del cerebro de ratón: Cerebelo, Corteza, Bulbo olfatorio e Hipocampo, en ratones de diferentes edades pos-tranfección **A:** 8 días, **B:** 15 días y **C:** 3 meses. Las barras representan: Azul: Control (ratones sin tratamiento). Negro: transfectados con pSi. Celeste: transfectados con pIs. Verde: transfectados con pST8 -secuencia RNAi para ST8SiaIII- (*P < 0,05 y **P < 0,01 en test de ANOVA).

2.3.5.2. *Western-blot.*

A nivel de las proteínas se evaluó la inhibición de la traducción de la enzima ST8SiaIII en diferentes estructuras del sistema nervioso central (cerebelo, corteza hipocampo y bulbo olfatorio).

Corroboramos por este método que los niveles de ST8SiaIII se veían disminuidos en dos estructuras de modo considerable y en otros dos se mantiene sin variación en los ratones tratados con en plásmido RNAi para ST8SiaIII (pST8). Mediante un test de ANOVA de un factor se comprobó estadísticamente que el grupo tratado con pST8 presenta una media menor a los otros tres grupos en cerebelo y en bulbo olfatorio ($p < 0.05$) (Figura 2.20 A y B).

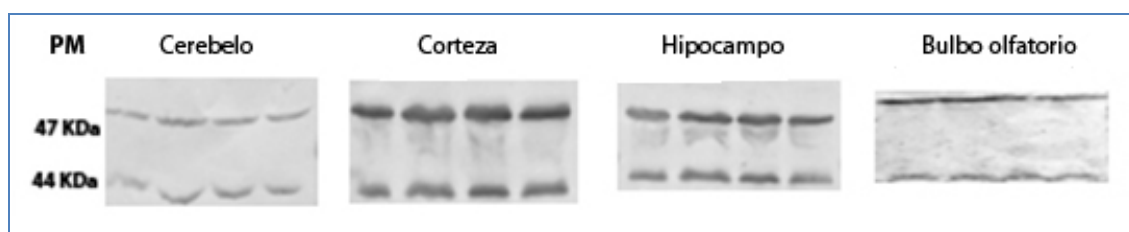


Figura 2.20A: Western-blot ST8SiaIII/ β -actina. Proteínas de cerebro de ratones (8 días después del tratamiento), de cerebelo, corteza, hipocampo y bulbo olfatorio. Cada calle corresponde, de izquierda a derecha: control, tratados con pSi, con pIs y pST8, respectivamente. Electroforesis en gel de acrilamida 10%. Transferencia a membrana PVDF e inmunodetectadas con anticuerpo primario anti- β -actina, y anti-ST8SiaIII. Las bandas correspondientes a β -actina (47 KDa) y ST8SiaIII (44 KDa), superior e inferior respectivamente; fueron reveladas con el sistema HRP-DAB como se explica en el capítulo 3.

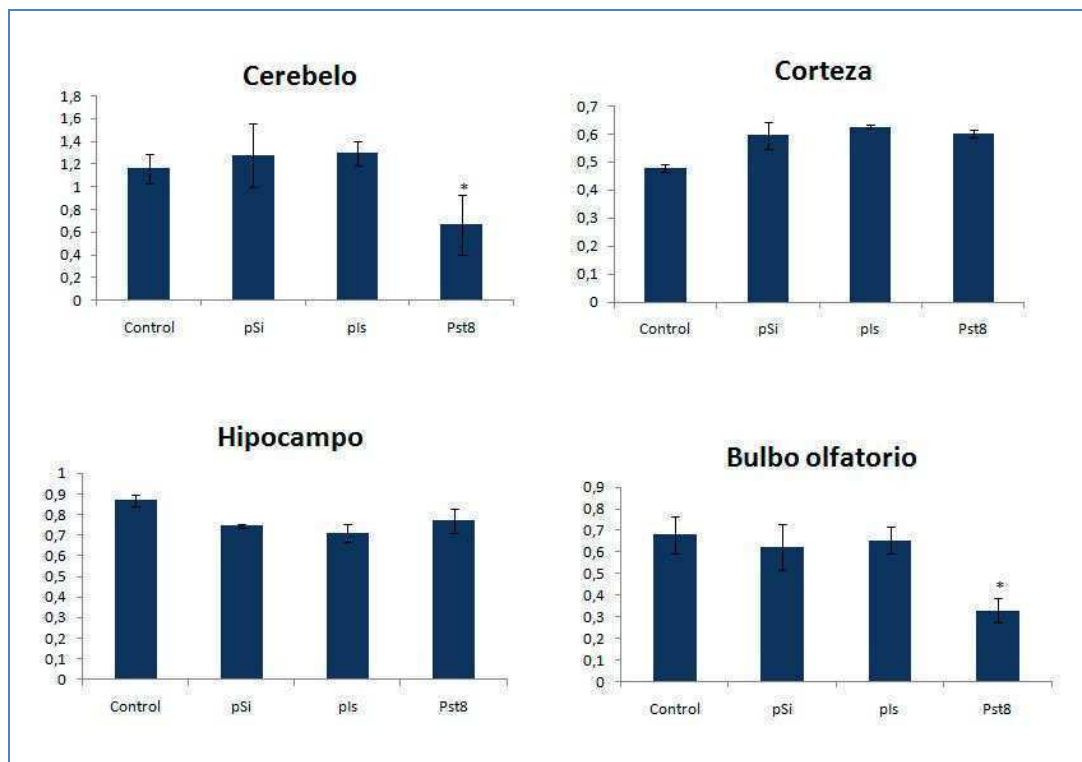


Figura 2.20B: Gráfico de barras de los niveles relativos de proteínas ST8SiaIII/β-actina en las diferentes estructuras del cerebro de ratones control, y tratados (pSi, pls, pST8 respectivamente). Mediciones de concentración relativa ST8SiaIII/ β-actina, de acuerdo a la intensidad de las bandas (con el programa *ImageJ*). Mediante un test de ANOVA de un factor se constató que el grupo tratado con pST8 posee una media significativamente menor a los otros tres grupos en cerebelo y en bulbo olfatorio (*P < 0,05). Las comparaciones post hoc fueron realizadas mediante LSD Fisher.

Una explicación plausible de la disminución que se observa en cerebelo como en bulbo olfatorio sería la siguiente: los ratones concluyen el desarrollo de la arquitectura del cerebelo al finalizar la tercera semana de vida, después de nacer, es decir 30 días después del tratamiento con RNAi para ST8SiaIII. El tratamiento (en el día cero) fue aplicado al ventrículo lateral del cerebro, que se comunica con los demás ventrículos mediante el fluido cerebroventricular. Las células del neuroepitelio ventricular migran hasta formar el cerebelo, y las células de la zona subventricular son precursoras del bulbo olfatorio (Goldowitz y Hamre, 1998; Menezes et al., 1995). Por lo que, las células del neuroepitelio y de la zona subventricular debieron incorporar los plásmidos, y el efecto inhibitor se hizo evidente cuando estas alcanzaron su localización final, el cerebelo y el bulbo olfatorio respectivamente.

2.3.5.3. *Inmunohistoquímica.*

Cortes por congelación de cerebro de ratones de 8 días de edad, controles y tratados (pST8, pSi, pIs) fueron inmunomarcados con el anticuerpo anti-ST8SiaIII. Se observó una clara disminución de la marca en cerebelo de ratones tratados con pST8 respecto a los controles (Figura 2.21).



Figura 2.21. Inmunomarcación de ST8SiaIII en criosecciones de cerebelo de ratones: **A:** Control (ratones sin tratamiento). **B:** Transfectados con pST8. **C:** Control de la técnica histológica (PBS en lugar del anticuerpo primario). Las barras representan 20 μm (10 X magnificación).

2.3.5.4. *Histoquímica: Tinción de Klüver-Barrera.*

Con el objetivo de poner en evidencia los efectos del tratamiento inhibitorio a nivel microscópico, y en busca de alteraciones anatómicas en el cerebro de los ratones se utilizó la tinción de Klüver-Barrera (Figura 2.22).

Esta técnica histoquímica (Klüver-Barrera), colorea de azul las fibras nerviosas mediante la acción del Luxol fast blue, y por otro lado las células nerviosas se colorean de rojo debido al Rojo neutro.

En ratones de un mes de edad observamos que las fibras (materia blanca) presentan una apariencia esponjiforme irregular en los cerebros de ratones tratados con pST8, respecto a los ratones controles, y este fenómeno se hace más evidente en el cerebelo (Figura 2.22).

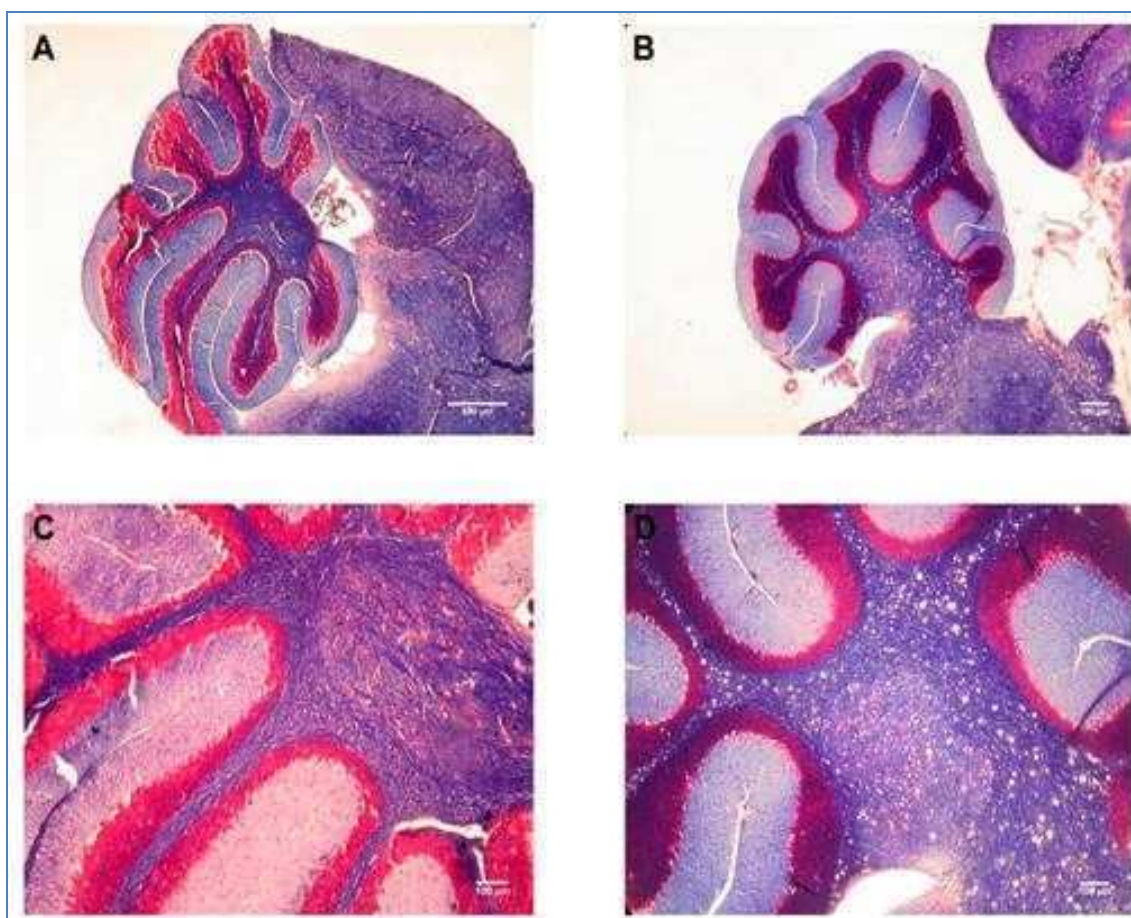


Figura 2.22. Fotos de cerebelo de ratones con tinción de Klüver-Barrera. **A y C:** Control. **B y D:** Transfectados con pST8 (**A-B:** 10X y **C-D:** 40X de magnificación). Barra representa **A - B:** 200 μm , y **C - D:** 100 μm .

No se encontró una explicación concluyente respecto a estas observaciones, ya que la bibliografía disponible, que hace referencia a casos de cerebros con aspecto similar (espongiforme) corresponden a casos de enfermedades complejas como las causadas por priones (Li et al., 2007), o la enfermedad de Canavan (Matalon y Michals-Matalon, 2000). Esta última se debe a la ausencia o pérdida de función de la aspartoacilasa, una enzima abundante en la materia blanca del cerebro y que su ausencia lleva a la acumulación de ácido N-acetilaspártico, lo que causa desordenes neurológicos (Matalon y Michals-Matalon, 2000).

2.3.6. Análisis de los efectos de RNAi para ST8SiaIII en el comportamiento de ratones.

Un primer resultado de carácter netamente descriptivo observacional fue que los ratones tratados con el plasmido pST8 (RNAi para ST8SiaIII) eran más lentos y perdían el equilibrio al caminar (datos observacionales compartidos por el investigador y personal de bioterio). Esto podría explicarse por algún daño infringido durante la inyección en el cerebro, que afecte al SNC, específicamente a estructuras encargadas de la motricidad del animal; pero dado que, este fenómeno no se observa en ratones controles, que también recibieron la inyección, sin plásmido o con uno distinto al inhibidor de ST8SiaIII, se relacionó este fenómeno con la inhibición de los niveles de ST8SiaIII en cerebelo, durante etapas tempranas del desarrollo.

Para corroborar esta hipótesis se sometieron los ratones a una prueba conductual. Ocho ratones de cada grupo (control, pST8, pSi y pIs), fueron evaluados en cuanto a su comportamiento en un laberinto en forma de T (conocido como “T-Maze”).

Las edades de los ratones al momento de la evaluación fueron 45 días, 3 meses 6 meses y ratones seniles controles de 13 meses. Por otro lado los ratones que fueron inyectados en el cerebelo (en día cero), fueron evaluados a los 45 días de vida, y los que fueron tratados en edad adulta fueron evaluados 45 días después del tratamiento.

Se intentó evaluar su comportamiento en edades más tempranas pero al colocar los ratones en el laberinto estos no se desplazaban, por lo que confirmamos que esta prueba no es apta para ratones de menos de 30 días de vida (Lalonde, 2002).

Calculamos la alternancia en porcentajes como se detalla en la tabla V y representamos en la Figura 2.23.

Los ratones, debido a su instinto de exploración, naturalmente, ante dos opciones (brazos), alternan a uno y al otro brazo en el laberinto en T, siendo esta alternancia “normal” cuando se observa en el 75-80% de las veces (Deacon y Rawlins, 2006).

Tabla V: Porcentaje de alternancia en el laberinto en T.

| Ratones evaluados | Control | pSi | pI | pST8 |
|--------------------|---------|------|------|---------------|
| 45 días* | 79 % | 70 % | 70 % | 64 % |
| 3 meses* | 85 % | 83% | 86.6 | 53 % |
| 6 meses* | 76 % | 69 % | 83 % | 33.3 % |
| P30** | 80 % | 70 % | 73 % | 64 % |
| Iny. en cerebello* | 82 % | 76 % | 80 % | 73 % |
| 13 meses | 65 % | | | |

*Inyectados el día en que nacieron (día cero).

**Inyectados a los 30 días de nacidos y evaluados 15 días después, es decir con 45 días de vida.

Los ratones inyectados en el cerebello el día cero, fueron evaluados a los 45 días.

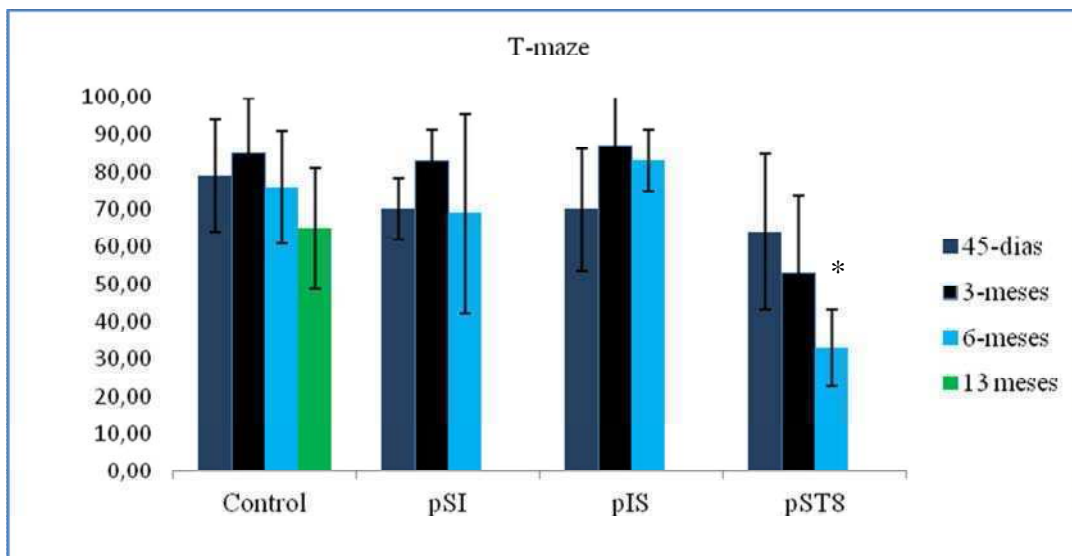


Figura 2.23. Representación gráfica de los resultados obtenidos en los experimentos en el laberinto en T (T-Maze) de la tabla V. Ratones controles, y tratados: pSi, pIs, pST8. (*P < 0,001 T-test, ratones transfectados con pST8Sia respecto al grupo control).

El laberinto en T o T-maze, es una prueba de comportamiento que elegimos porque según la bibliografía (Lalonde et al., 2002) es el que más se ajusta a nuestro propósito de evidenciar a nivel comportamental los efectos causados en el cerebelo de los ratones por la inhibición de ST8SiaIII. Nos permitió evaluar la memoria procedural en los ratones.

Tal como se observa en la Tabla V, y la figura 2.23, los resultados obtenidos demuestran que los ratones inyectados con el plásmido con RNAi para ST8SiaIII tienen inconvenientes en la alternancia de brazos en el T-maze, en todas las edades. Pero a medida que transcurre la vida del ratón se hace más notoria la pérdida de performance en el T-maze. A los 45 días 64% de veces alternaban los brazos, a los 3 meses 53% de las veces, y a los 6 meses solo 33%. Mientras que el grupo de ratones control de 13 meses de edad, los cuales pierden normalmente la performance como efecto de la senilidad (Lalonde, 2002), alternaban el 65% de las veces, es decir mejor que los ratones tratados con pST8 (el día que nacieron o día cero), evaluados a los 45 días (Figura 2.23).

Se puede especular, de acuerdo a estos resultados y la bibliografía consultada al respecto, que el tratamiento inhibitorio de ST8SiaIII en neonatos, genera algún trastorno en la migración y/o diferenciación neural durante la última etapa de este proceso, generando trastornos permanentes en las conexiones que afectan a la memoria procedural y que se hacen más evidentes hacia la vida adulta. Estos resultados cobran relevancia clínica en medicina humana (valga la extrapolación de resultados experimentales a condiciones clínicas). Existe al menos una entidad neurológica, la ataxia congénita cerebelar no progresiva, en la cual hay daño cerebelar y trastornos cognitivos asociados con el aprendizaje procedural (Steinlin et al., 1999). Por otra parte, niños con alteraciones cerebelosas debidas a la exposición temprana a tóxicos, prematuros y con alteraciones morfológicas presentan alteraciones cognitivas relacionadas con la memoria procedural (Steinlin, 2008). En estos casos no se ha estudiado la relación con alteraciones glicobiológicas. Sin embargo, se ha observado que pacientes con ataxia cerebelosa presentan anomalías en el metabolismo de los ácidos siálicos, lo que sugiere que la sialilación de proteínas importantes del sistema nervioso central en el cerebelo se encuentra alterada (Mochel et al., 2009). A su vez, es conocida la relación entre las enfermedades hereditarias que provocan desordenes en el metabolismo de los ácidos siálicos y la ataxia. Esta característica, es compartida por las tres enfermedades más conocidas: las deficientes en cuanto al almacenamiento

lisosomal de gangliósidos (GM1 y GM2 o de Sadhoff) como así también la enfermedad de Tay-Sachs, que consiste en la ausencia de la enzima hexosaminidasa (Manto y Marmolino, 2009).

Por otro lado la ataxia ha sido relacionada con mutaciones en un alelo del gen que codifica para canales de calcio dependiente de voltaje en la sinapsis del SNC y nervios motores (Yue et al., 1997). El correcto funcionamiento de los canales de calcio, en parte se debe al campo negativo de la matriz extracelular. Este campo se genera por la carga negativa de los ácidos siálicos que decoran los glicolípidos y glicoproteínas de la membrana celular en el SNC como también ocurre en los cardiomiocitos, (Marengo et al., 1998). Consistentemente con lo anterior y en relación con nuestros resultados de expresión diferencial de DiSia en el cerebelo a lo largo de la vida y la ataxia fisiológica que acompaña a la vejez, en las células granulares del cerebelo de ratas se han registrado cambios en la cantidad de la subunidad $\alpha 1D$ y pérdida de actividad de los canales durante el transcurso de la vida (Chung et al., 2001). Se podría sugerir, con cautela, que el incremento de calcio intracelular desregula la excitabilidad de las células nerviosas y de este modo generaría el fenotipo de ataxia cerebelar en ratones seniles (Fermini y Nathan, 1991). De acuerdo al patrón de expresión por nosotros observado, podemos sugerir una relación directa entre la reducción de los niveles de DiSia en el cerebelo y la inactivación de los canales de calcio dependientes de voltaje capaz de causar ataxia cerebelar y su expresión conductual de alteración de la memoria episódica.

Capítulo 3

Materiales y Métodos

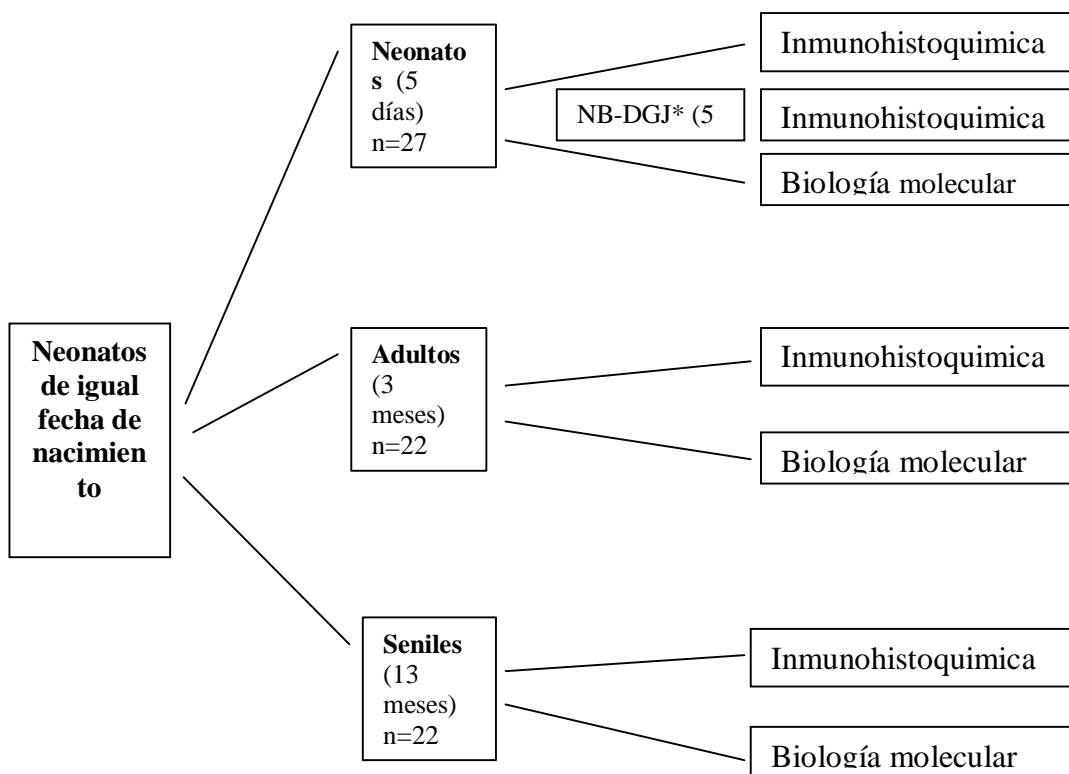
3. Materiales y Métodos

3.1. Localización de los DiSia, y de la enzima sialiltransferasa ST8SiaIII a través de técnicas inmunohistoquímica, en estructuras del sistema nervioso de ratones neonatos, adultos y seniles.

3.1.1. Sujetos experimentales.

Se utilizaron ratones C57BL/6 hembra de 21 días de edad, los que fueron colocados por primera vez con ratones machos para permitir el apareamiento. La progenie fue sacrificada a distintos tiempos para los diferentes experimentos.

Todos los animales fueron mantenidos bajo un ciclo de 12 horas luz/ 12 horas oscuridad, temperatura ambiental de $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$, y con libre acceso a agua y alimento balanceado (Gepsa Ganave, Buenos Aires, Argentina). El diseño experimental constó de 3 grupos:



* Animales tratados con un inhibidor selectivo de la biosíntesis de glicoesfingolípidos, N-butildeoxigalactonojirimicin, para probar que las marcas correspondían realmente a glicoproteínas. Mediante inyección intraperitoneal a neonatos desde p-0 hasta p-6 administramos el vehículo (0,9% solución salina) o NB-DGJ en una concentración de 600 mg/kg (Kasperzyk et al., 2004; Kasperzyk et al., 2005).

Tejidos analizados: cerebro: hipocampo, bulbo olfatorio y corteza.

3.1.2. Inmunomarcación para detectar DiSia y ST8SiaIII.

3.1.2.1. Control positivo para DiSia y localización de ST8SiaIII en cultivo.

A modo de control, se utilizó la línea celular de neuroblastoma de ratón, Neuro2A. Resultados publicados previamente respecto a la expresión de ácidos disialícos en dichas células sugieren que éstos son expresados en la superficie celular cuando las células Neuro2A son inducidas a diferenciación neural con ácido retinoico (Sato et al., 2002).

Diferenciación: células Neuro2A se cultivaron en medio Dulbecco modificado por Eagle (Sigma) suplementado con 0,5 mg/ml de sulfato de streptomicina, 100 unidades/ml de penicilina G (Gibco), y 10% SFB (Suero Fetal Bovino) en atmósfera con 5% CO₂ y 95% aire humidificado, a 37 °C. Las células se sembraron a 1,0 x 10⁶ e incubadas por 24 h en placas de 60-mm de diámetro. Las placas se trataron previamente con colágeno IV para mejorar la adherencia de las células al plástico. Luego, la inducción a neuritogénesis fue de acuerdo a publicaciones previas (Sato et al, 2002), mediante la administración de 20 µM de ácido retinoico (Sigma) en Dulbecco modificado por Eagle con 2% de SFB. Se recambió el medio de cultivo cada dos días. Se observó y fotografió la morfología de las células al microscopio.

Se analizaron los cultivos al cuarto día, dos placas de cada grupo experimental mediante técnicas de inmunocitología con un anticuerpo monoclonal anti-DiSia S2-566 (Seikagaku Co.) o con anti-ST8SiaIII (Santa Cruz Inc.) y anti-A2B5 (Millipore Co.). Para esto último el cultivo se fijo e inmunomarcó como prosigue:

Fijación mediante PAF 4%, por 5-10 minutos.

Tres lavados con PBS.

Bloqueo: 10-15 minutos con Powerblock (Bio Genex, Inc., Oakland, CA.)

Incubación Over night (ON) con el anticuerpo S2-566 [1 ul/100ul], anti-ST8SiaIII [1 ul/150ul] o anti-A2B5 [1 ul/100ul], a 4°C.

Lavados en PBS pH 7,2 por 15 minutos.

Incubación con el anticuerpo secundario IgM- biotina durante 1 hora para S2-566 o multilink ((Bio Genex, Inc., Oakland, CA.) para anti-ST8SiaIII.

Lavados con PBS pH 8,2 por 15 minutos.

Incubación con el anticuerpo -Streptavidina-FITC o Streptavidina-Texas Red (Vector Laboratories)- durante 1 hora.

Lavados con PBS pH 8,2 por 15 minutos.

Coloración con Hoesch, para contrastar los núcleos celulares.

3.1.2.2. Análisis de la efectividad del inhibidor de la síntesis de gangliósidos NB-DGJ en cultivo de células PC12 (Feocromocitoma de rata).

De acuerdo con trabajos previamente publicados, en cultivo, tras la inducción con factores neurotróficos como el ácido retinoico o el factor de inducción neural (NGF), el desarrollo de las neuritas requiere la expresión de gangliósidos en la superficie de la membrana celular (Sato et al., 2002).

Para probar la efectividad de N-butildeoxigalactonojirimicin (NB-DGJ) como inhibidor de la biosíntesis, se adicionó al medio e indujo la diferenciación neural.

Procedimiento:

Placas de 8 wells cultivadas con células de la línea PC12 se trataron como sigue:

Primera etapa: evaluación de la concentración de NB-DGJ efectiva y no tóxica para el cultivo.

Well 1 y 2: Blanco

Well 3 y 4: 50 μ M de NB-DGJ

Well 3 y 4 250 μ M de NB-DGJ

Well 7 y 8: 500 μ M de NB-DGJ

Segunda etapa: evaluación del efecto de NB-DGJ en el cultivo de PC12 inducido a diferenciación.

Well 1 y 2: Blanco

Well 3 y 4: 500 μ M de NB-DGJ

Well 3 y 4: 500 NB-DGJ + 20 μ M de ácido retinoico

Well 3 y 4: 500 NB-DGJ + 50 ng de NGF

Se incubó cada placa por 24 horas con NB-DGJ y luego se lavó con solución fisiológica. A continuación se procedió a la inducción con ácido retinoico o NGF según corresponda, en medio Dulbecco modificado por Eagle (Gibco) con 8 % de SFB a 37°C y 5% CO₂. Se observaron las placas al microscopio para corroborar su comportamiento durante 4 días consecutivos, y luego se fijaron e inmunomarcaron (diariamente).

3.1.2.3. Inmunomarcación de cortes de cerebro de ratón.

Los ratones de los grupos experimentales fueron anestesiados completamente por inhalación de isoflurano (Sevorane[®]), decapitados y se extrajo rápidamente el cerebro.

Se procesaron los cerebros de ratones (de diferentes edades, al igual que los ratones tratados con NB-DGJ) sumergiéndolos en solución crioprotectora (OCT) y almacenándolos a -20°C, para luego proceder a la criosección.

Los portaobjetos con el corte (de 11 µm) fueron fijados por deshidratación y almacenados a -20°C o se procedió a la incubación con el anticuerpo correspondiente tal como se describe anteriormente (sección 3.1.2.1.).

3.1.2.3.1. Inmunomarcación y análisis de la efectividad del inhibidor de la síntesis de gangliósidos NB-DGJ en cortes de cerebro de ratón neonato.

El anticuerpo S2-566 reconoce glicoconjugados disialilados, y dado que en cerebro de ratones tanto glicoproteínas como glicolípidos pueden estar disialilados, las marcas podrían corresponder a gangliósidos, como GD3, GT1. Por este motivo, un grupo de ratones fueron tratados con el inhibidor de la biosíntesis de gangliósidos, NB-DGJ.

Con el objetivo de analizar si fue reducida la síntesis de gangliósidos, las criosecciones (de cerebros de ratón tratados y sin tratar con NB-DGJ) se inmunomarcaron con Choleric Toxin Alexa 555 (donación del Dr. Hugo Daniotti, de la Universidad de Córdoba) que reconoce GM1.

El procedimiento se desarrolló como sigue:

Fijamos el tejido con PAF 4% durante 10 minutos.

Lavados en PBS pH 7,2, por 5 minutos (3 veces).

Bloqueo: 10-15 minutos con Powerblock.

Incubación durante 16 h con el anticuerpo Cholerae Toxin Alexa 555 [1 ul/50ul] (Sigma) a 4°C.

Lavados con PBS pH 8,2 por 5 minutos (3 veces).

Coloración con Hoesch, para contrastar los núcleos celulares.

3.1.2.4. Tratamiento de criosecciones de cerebro de ratón, para hidrólisis selectiva de epitopes glicosilados y sialilados.

La ventaja de los cortes por congelación reside en que la muestra se conserva, sin tratamientos químicos. Esta característica nos permite tratar la muestra del tejido con enzimas y reactivos, cuyo efecto es conocido, y observar su efecto *in situ*.

3.1.2.4.1. N-glicanasa (para hidrolizar los epitopes en glicanos con enlaces del tipo N-glicosídico).

Se fijaron los cortes con acetona durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se hicieron tres lavados con PBS (pH: 7,2). Se incubaron los vidrios en 100 mU/mL de N-glicanasa F disuelta en buffer (10 nM de HEPES-NaOH pH 7,4, 0,1% Tritón X-100 0,1 M 2-mercaptoetanol y coctel inhibidor de proteasas) a 37° C durante 2 horas, 10 horas y 24 horas.

Transcurridos los tiempos indicados fueron lavados con 0,1 mg/mL de BSA disueltos en PBS y se procedió a la inmunomarcación.

3.1.2.4.2. β -eliminación (para hidrolizar los epitopes en glicanos con enlaces del tipo O-glicosídico).

Los cortes fueron fijados con acetona durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego de tres lavados con PBS, se incubaron los vidrios en NaOH 0,5 N disuelto en 70% etanol (v/v) por 1, 3, 5 y 10 días respectivamente, a 4° C. Se lavaron con PBS y posteriormente se procedió a la inmunomarcación.

3.1.2.4.3. Hidrólisis ácida (para hidrolizar los epitopes sialilados).

Los cortes fueron fijados con acetona durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se incubaron los vidrios en ácido clorhídrico 0,1 M durante 1, 2 y 3 horas, respectivamente, a 82° C. Se lavaron con PBS y posteriormente se procedió a la inmunomarcación.

3.1.2.4.4. N-glicanasa y a continuación β -eliminación.

Se procedió como en la sección 3.1.2.4.1. y a continuación 3.1.2.4.2. para la eliminación completa del epitope.

A

3.1.2.5. Cultivo primario de cerebro de ratón neonato e inmunomarcación para identificar las células S2-566 positivas.

Dos ratones neonatos fueron anestesiados completamente por inhalación de isoflurano (Sevorane[®]), decapitados y se extrajo el cerebro rápidamente, en condiciones de esterilidad.

Primeramente se realizó la disección mecánica del tejido y luego se trató con tripsina durante 15 minutos a 37° C, con agitación.

Se centrifugó a 1.100 r.p.m. a T° ambiente durante 10 minutos.

El precipitado se resuspendió en medio DMEM completo, con 10% de SFB, y 1% de antibióticos. Se contó en cámara de Neubauer y se sembró 5×10^6 células (a confluencia), en placa de 30 mm previamente tratada con polilisina para facilitar la adhesión celular.

La inmunomarcación se realizó como se describió previamente.

3.1.2.6. Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución (HPAEC).

Se utilizó un equipo DIONEX DX3000, con detector por pulso amperométrico (PAD) y electrodo de oro, empleando una columna de intercambio aniónico CarboPacPA-100 (4 x 250 mm), equipada con su respectiva guarda columna CarboPac PA-100 (4 x 50 mm), gradiente lineal desde 50 a 300 mM de NaAcO en 100 mM de NaOH durante 60 minutos. Flujo: 1,0 ml/min a 25 °C.

Desialilación de glicoproteínas. Las glicoproteínas de cerebelo y de corteza de cerebro de ratón neonato, adulto y senil, adheridas a membrana de polyvinylidene fluoruro PVDF (Millipore. Co, M.A. U.S.A.) se sometieron a hidrólisis ácida suave para escindir sus ácidos siálicos. Para ello se incubaron las membranas en buffer acetato por 1 h a 0° C, se lavaron con agua (2 veces), se calentó con 0,1M TFA 1 h a 80° C y la solución se evaporó a presión reducida. El residuo se resuspendió en NaOH 0,2 M.

Se inyectaron 20 µL de cada muestra en el equipo DIONEX.

3.1.3. Localización y cuantificación de ST8Sia III, mediante técnicas de biología molecular, en las distintas estructuras del sistema nervioso de ratones neonatos, adultos y seniles.

Los ratones de los grupos experimentales fueron anestesiados completamente por inhalación de isoflurano (Sevorane[®]), decapitados y se extrajo rápidamente el cerebro. El hipocampo, bulbo olfatorio, cerebelo y la corteza fueron extraídos manualmente, en frío, y procesados para los análisis que se describen a continuación.

3.1.3.1. Extracción de ARN total de estructuras del cerebro de ratón.

Para la extracción de ARN total (ARNt), el tejido fue homogenizado completamente en Trizol® (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el homogenato fue centrifugado a 12000g por 10min a 4°C, el sobrenadante fue incubado con cloroformo (0,2ml/ml Trizol), y luego de la centrifugación se tomó la fase acuosa, la cual contiene el ARNt. Para precipitar el ARNt, se agregó alcohol isopropílico (0,5ml/ml Trizol) a -20°C por 45 minutos, luego se centrifugó a 12000 g por 15 minutos a 4°C y se hicieron varios lavados con etanol 75% y centrifugaciones de 12000 g por 5 minutos a temperatura ambiente. Se dejó secar el pellet y se resuspendió el ARNt en agua destilada estéril libre de ARNasas. La calidad del ARNt se controló en una corrida electroforética en gel de agarosa 1%.

3.1.3.2. Preparación de cADN de hipocampo, bulbo olfatorio, cerebelo y corteza.

Previamente se eliminó del ARNt cualquier ADN contaminante con ADNsa [RQ1 RNase-free DNase (Promega)]. Luego, se incubó 1 µg de ARNtotal (ARNt) en 1 µl de *primer* Oligo (dT) (Invitrogen) a 70°C durante 5 minutos y en hielo 1 minuto. A los tubos de reacción se agregó: ImProm-II® 5X Reaction Buffer (Promega), 0,1M dTT, 10mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), inhibidor de ribonucleasas [Ribolock RNase inhibitor (Fermentas)] e ImProm-II ®Transcriptasa Reversa (Promega) durante 5 minutos a 25 °C, 1 hora a 42°C y 15 minutos a 70°C.

3.1.3.3. Diseño de primers de sialiltransferasas para “Real-Time PCR”.

Se diseñaron *primers* para varias sialiltransferasas, sinaptofisina y para genes de expresión constitutiva (*housekeeping genes*) (tabla VI), usando un set restringido de condiciones. La secuencia codificante para un gen específico fue analizada en el

programa de diseño de primers público *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) con los siguientes parámetros: rango del tamaño del producto, 75-150 pares de base (pb); tamaño del primer, 18-20 pb; porcentaje de bases GC, 49-51%; Tm del primer, 58-60 °C. Todos los otros parámetros son valores *default*. Los primers fueron sintetizados por Eurofins MWG/Operon (ver Tabla VI).

Tabla VI. Primers

| Genes | Forward 5`→3` | Reverse 5`→3` |
|---------------|----------------------|----------------------|
| β-actina | GCCCAGAGCAAGAGAGGTA | AGAAGGTGTGGTGCCAGAT |
| ST8Sia I | CTGCTTTTGATGTTGGCTTG | CATCTGGTCCTCGAATCACA |
| ST8Sia II | TTAGCCCTGCGTACATTCTC | GATGAAAGGCTCTGGAGACA |
| ST8Sia III | GGCATTTCACCAGTCAGTCT | TATGTGGCAAAGCAGTCAGA |
| ST8Sia IV | CTTCACCCTCTGCTTTGTGT | GAAAGGGTGTGTGTGTGAG |
| ST8Sia VI | CGGCAAGCAGAAGAATATGA | TCATGTTAGTCCCCACTGGA |
| Sinaptofisina | TGGGTCGATGTGACTTTTTC | CATTTCATCCAAGCCACCT |

3.1.3.4. *Real-Time PCR*.

La mezcla de reacción contenía Platinum® *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), 10X PCR Buffer, mezcla 10 mM de dNTPs, 50 mM MgCl₂, mezcla de primers (10 μM de cada uno), agua destilada estéril, y *SYBR Green I nucleid acid stain* (Invitrogen). Todos los ensayos se realizaron con el siguiente protocolo de amplificación: Desnaturalización, 10 minutos a 94 °C; Ciclado, 45 ciclos de 10 segundos a 94 °C, 10 segundos a la Tm respectiva para cada gen y 10 segundos a 72 °C. Las curvas de *melting* de todas las muestras se realizaron siempre como control de especificidad.

3.1.4. *Dot-blot, SDS-PAGE y Western blot*

3.1.4.1. *Extracción de glicoproteínas de hipocampo, bulbo olfatorio, cerebelo y corteza.*

Todas las soluciones usadas para obtener los extractos proteicos contenían una mezcla de inhibidores de proteasas: AEBSF [4-(2-aminoetil) benzenosulfonil fluoruro hidrocloreuro] 104 mM, aprotinina 0.085 mM, bestatina 4mM, E-64 1,4 mM, leupeptina 2 mM, Pepstaina A 1,5 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para obtener los extractos totales, el hipocampo, bulbo olfatorio, cerebelo y la corteza fueron disecados del cerebro y homogeneizados en buffer de lisis (50 mmol/L Tris-HCl, pH: 8,0; 100 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100 y 01% SDS) durante 15 minutos a 4°C. Luego fueron centrifugados a 10000 g durante 10 minutos a 4°C, y el sobrenadante fue usado como extracto proteico total.

Se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford, utilizando el reactivo *Protein Assay* (Bio-Rad) en un espectrofotómetro Genesys 10S (Thermo Scientific).

3.1.4.2. *Dot blot.*

Las membranas de PVDF fueron activadas mediante incubación por 1 minuto en metanol 100%, se sembraron 2µl del extracto proteico, se secó para mejor adherencia y luego se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con a) leche 5% en tris buffer salino con tween 20 (TTBS), b) leche 2,5% en TTBS, c) albúmina serica bobina (BSA) al 2% en tris buffer TTBS, o d) albúmina serica bovina al 1% en TTBS.

Las diluciones probadas fueron para anti- ST8SiaIII 1:100, 1:200, 1:500 y para anti-disialicos (S2-566) 1:100, 1:200, 1:500; 1:1000. Se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios a 4°C en agitación ON. Luego, se hicieron 3 lavados en TBS y se incubó con el respectivo anticuerpo secundario conjugado con Horse Peroxidase Radish (HRP)(dilución 1:1000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar 3 veces las membranas, las bandas fueron reveladas luego de la incubación con el sustrato para la HRP: diaminobencidina (DAB) [*Liquid DAB+ Substrate Chromogen System* (Dako)].

3.1.4.3. SDS-PAGE.

Las proteínas del extracto total fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes utilizando una celda *Miniprotean II System* (Bio-Rad). Luego del armado del gel de corrida (10 % acrilamida) y del gel separador, se sembraron 25-30 μg de proteínas (diluídas en 1% DTT y Buffer de muestra) previamente incubadas a 100°C en agua por 5 minutos. Como marcador de peso molecular, se utilizó el *Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder* (Fermentas).

La electroforesis se desarrolló a 130 V durante los primeros 15 minutos (hasta que el frente de corrida atravesara el gel separador) y luego a 100 V durante 1,5 hs, en Buffer de electroforesis (Tris-Base 0,125M, Glicina 0,96M, SDS 0,05 p/v, pH: 8,3). Las proteínas separadas de esta manera fueron transferidas a una membrana de PVDF en buffer de transferencia (Tris-base 25mM, glicina 192mM, metanol 20% v/v, pH 8.,6) durante 2 horas. Se controló la transferencia de proteínas a la membrana luego de la tinción reversible con Ponceau-S, observándose las bandas características. Las membranas fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de uso.

3.1.4.4. Western-blot.

Las membranas con proteínas transferidas, de la sección anterior, fueron activadas mediante incubación por 1 minuto en metanol 100% y luego fueron bloqueadas en leche descremada 5% en TBS durante 1 hora a temperatura ambiente.

Las diluciones de uso, en el caso del anticuerpo anti-disiálicos (S2-566) fue 1:150, para anti- ST8SiaIII fue de 1:200 y para anti- β -actina fue 1:1000. Se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios a 4°C en agitación durante toda la noche. Luego, se hicieron 3 lavados en TBS y se incubó con el respectivo anticuerpo secundario conjugado con HRP (dilución 1:1000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar 3 veces las membranas, las bandas fueron reveladas luego de la incubación con HRP: DAB. Se cuantificaron las intensidades y áreas de las bandas obtenidas mediante densitometría usando el programa público de procesamiento de imágenes *Image J* (NIH, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) y los resultados fueron expresados como densidad óptica relativa (Intensidad/ Área).

3.1.5. Análisis estadístico y correlación de la presencia y los niveles de expresión de la enzima ST8Sia III a través de la técnica Real Time PCR, y la de los ácidos disiálicos por Inmunohistoquímica.

Los análisis estadísticos fueron hechos utilizando el programa SPSS 17.0 (Chicago, IL, USA).

3.1.5.1. Análisis digital de marcaciones histoquímicas.

Las imágenes fueron generadas en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400-Y-FL-EPI Fluorescence) y capturadas con cámara digital (Coolpix 4500, Nikon).

En el estudio citohistoquímico con anticuerpos anti-disiálicos y anti-ST8SiaIII, se determinó como marca positiva a una tinción clara y homogénea con respecto al control negativo con PBS (sin anticuerpo primario). En el análisis cuantitativo de la expresión de ácidos disiálicos mediante el método histoquímico se utilizó el programa de procesamiento de imágenes *Image J*. La inmunofluorescencia fue semicuantificada usando este programa mediante el cálculo de la densidad de marca fluorescente en relación al fondo. En cada corte examinado se tomaron 10 regiones representativas y se tuvo cuidado para que coincidan al mismo nivel las regiones del cerebro analizadas valiéndose de marcas anatómicas, manteniendo también el mismo aumento y filtro.

3.1.5.2. Análisis de Real-time PCR. Método de curvas estándar para cuantificación relativa.

Los valores de fluorescencia se registran durante cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificado en ese punto en la reacción de amplificación. A mayor cantidad de molde presente al comienzo de la reacción, menor es el número de ciclos que lleva alcanzar el punto en el cual la señal de fluorescencia registrada sobrepasa la línea umbral. Este punto es definido como el Ct (*threshold cycle*), cuyos valores son

centrales en la cuantificación de *real-time PCR*. La cantidad de cada muestra experimental se determina primero en relación a una curva estándar (Wong y Medrano, 2005; Larionov et al., 2005), la cual se genera a partir de una serie de diluciones de cDNA molde, que en este caso correspondía a un *pool* de todas las muestras evaluadas.

Debido a que el material de uso es obtenido a partir de diferentes individuos, es necesario primero normalizar los datos de expresión génica para corregir variaciones entre muestras. La normalización a un gen de expresión estable (*housekeeping*) es actualmente el mejor método. En esta tesis se utilizó β -actina como el gen de referencia debido a su estabilidad tanto en condiciones fisiológicas como en patologías.

Los valores normalizados se expresaron en relación a una muestra de referencia o calibrador. El calibrador es designado como 1x, y todas las muestras son expresadas como la diferencia en n-veces en relación al calibrador. Por ejemplo, cuando analizamos la expresión de un gen entre ratones neonatos, adultos y seniles, el calibrador correspondía al grupo neonatos.

3.1.6.1. Expresión de genes.

La expresión de genes en cada grupo se analizó a través del test ANOVA, considerando significativo un valor de $p < 0.05$. Los resultados fueron expresados como media \pm desvío estándar.

3.2. Análisis de la potencial función de los ácidos disiálicos en el Sistema Nervioso Central mediante técnicas de RNAi.

RNA-interference o interferencia mediada por ARN, es una técnica utilizada para inhibir postranscripcionalmente la expresión de un gen, que utiliza la maquinaria de defensa antiviral propia de las células (Fig. 3.1). Fue por primera vez identificada y aplicada como técnica de silenciamiento por el grupo de Fire en *C. elegans* (Fire et al., 1998) y luego aplicada a mamíferos como estrategia para determinar la función de los genes, (Krichevsky y Kosik, 2002).

Consiste en administrar a las células, mediante terapia génica, una secuencia complementaria al ARN mensajero del gen de interés. De este modo se generan

secuencias de hebra doble de ARN que son reconocidas por la maquinaria ARNi y la degrada evitando su traducción (Judge et al., 2006; Wianny y Zernicka-Goetz, 2000).

Como podemos ver en la Figura 3.1, la maquinaria ARNi consiste en: una enzima citoplasmática (Dicer) que corta los extremos del bucle para obtener una secuencia de doble hebra de aproximadamente 21pb con los dos extremos 3' sobresalientes; esta hebra doble es reconocida por RISC (RNA-induced silencing complex) que cuenta con varias proteínas, algunas de ellas enzimas, que se encargan de separar las hebras de ARN, permaneciendo una de ellas unida al complejo. Cuando esta secuencia ahora simple, unida al complejo RISC, encuentra complementariedad se une al ARNm citoplasmático de un gen en la célula blanco y lo degrada evitando su traducción (Judge et al., 2006; Wianny y Zernicka-Goetz, 2000).

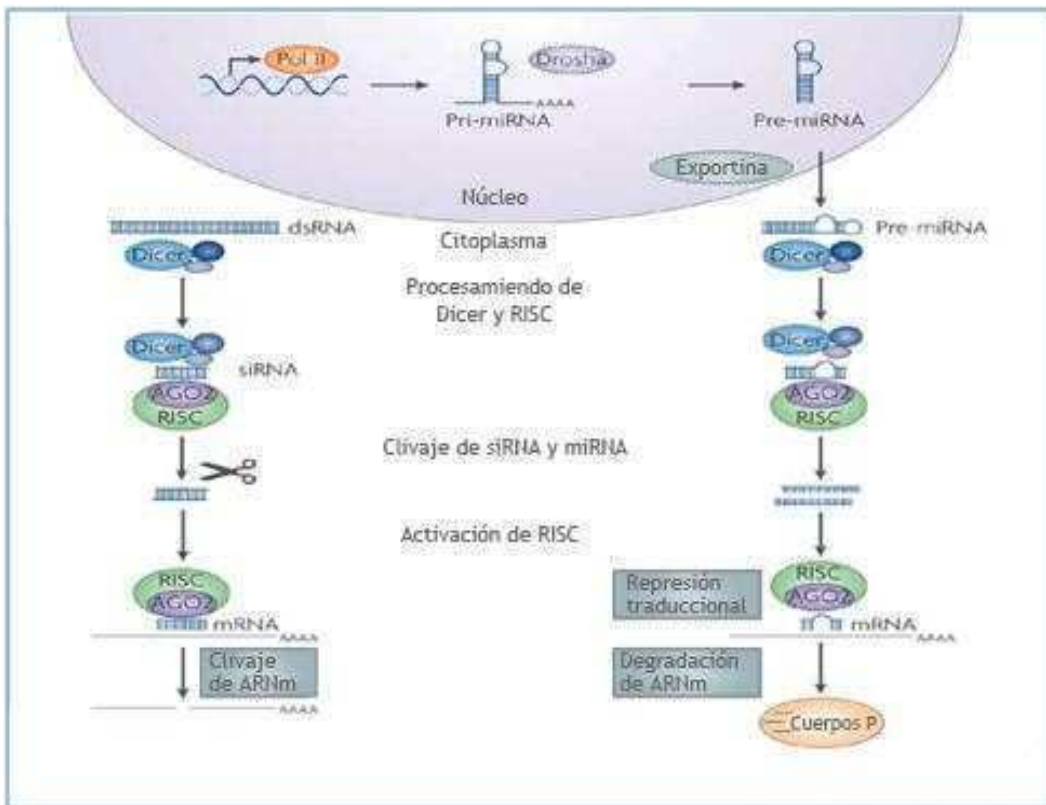


Figura 3.1: Etapas y enzimas implicadas en la degradación de ARNm mediante la técnica de ARNi (ARN interferencia). Gráfico tomado y modificado de http://www.nature.com/nrd/journal/v6/n6/fig_tab/nrd2310_F1.html

Terapia génica: son los diferentes métodos de administración de material genético capaces de modificar la biología de un sistema vivo.

Este objetivo se puede lograr utilizando vectores, que son moléculas de ácidos nucleicos de tamaño pequeño, fáciles de aislar y caracterizar, con secuencia y mapa de restricción conocidos. Podemos clasificar a los vectores según sus características: los que utilizan virus y los no virales. Ninguno de los conocidos actualmente reúne todas las características requeridas para obtener la mayor eficiencia y seguridad deseada, por ello es que la elección depende de las expectativas del investigador y del material de estudio (Naidoo y Young, 2012).

Nosotros pretendíamos aplicarlos en cerebro de ratón, *in vivo*, por lo que elegimos un vector no viral, de expresión transiente, de pequeño tamaño y con un promotor fuerte (Rogers y Rush 2012; Fountaine et al., 2005).

También utilizamos otras estrategias que benefician la transfección a las células, como los liposomas (Karra y Dahm, 2010), y el manitol (Cruz et al., 2002).

Lipofectamina 2000TM (Invitrogen Inc.) es un lípido catiónico que se adhiere al material genético por su carga negativa y se fusiona con la membrana celular facilitando su posterior incorporación a la célula. El manitol, por otro lado, es un edulcorante obtenido por hidrogenación del azúcar manosa. En medicina se usa el manitol al 20 % como diurético osmótico en situaciones agudas, como el síndrome nefrótico, o para aliviar la hipertensión intracraneal. Facilita también la manipulación quirúrgica craneal (Cruz et al., 2002; Fu et al., 2003). Rescatamos de sus características beneficiosas el efecto hiperosmótico en las células, que facilita la incorporación del plásmido a la célula. Varios trabajos han publicado el fabuloso efecto de la administración de manitol a roedores cuando se estudia la eficiencia de métodos de terapia génica aplicada al sistema nervioso central (Ghodsí et al., 1999).

3.2.1. Evaluación de la eficiencia de silenciamiento de las secuencias ARNi en cultivo celular.

En trabajos previos (Sato et al., 2000) demostraron que ante la ausencia (bloqueo con anticuerpos) de ácidos disialícos en células Neuro2A, estas dejaban de

extender neuritas. Con este conocimiento, transfectamos las 4 secuencias inhibidoras (ARNi) en cultivos de células Neuro2A. Las secuencias utilizadas en los cultivos donde se observaban menor extensión de neuritas fueron seleccionadas como inhibidoras más eficientes de la expresión de la enzima ST8SiaIII.

Se cultivaron las células Neuro2A en placas de 8 wells.

Al día siguiente de la siembra, se cambió el medio de cultivo a DMEM sin antibióticos y con 2% SFB.

Por otro lado se prepararon los complejos ADN-Liposoma (Lipofectamina) de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante. Se utilizó una concentración de plásmido 0,5µg/100µl en DMEM, y una relación 2:1 ADN (µg): Liposomas (µl).

Incubamos por 24 horas y cambiamos el medio nuevamente a DMEM con 10% SFB, 5% suero de caballo y antibióticos.

Las secuencias RNAi utilizadas fueron:

p1: GGATTCCGGTCACAGTTTGCCTGAAGTT
p2: ACAACCTTCAATCCGAGCATCTTAGAGAA

p3: GCTGCTGGCCGCTCAATGGACCGATTTC
p4: CTCTGTCACACTGTGCCTAAGAACTCCAA

Controles:

pSi: plásmido sin inserto (vacío).

pIs: plásmido con inserto inespecífico.

Se observó diariamente, al microscopio, el comportamiento de las neuritas en los cultivos.

3.2.2. Estimación de la eficiencia de transfección de los distintos plásmidos.

Se repitió la experiencia de la sección 3.2.1, con el objetivo de cuantificar el número de células transfectadas (GFP positivo) y no transfectadas (GFP negativo) y así determinar la mejor secuencia para amplificar y proceder a las siguientes etapas.

Tratamos los cultivos con Hoesch, marcador de núcleos celulares.

Se contaron 10 campos de cada cultivo (por duplicado) y calculamos la relación GFP+/GFP-.

3.2.3. Estimación del tiempo requerido en células neurales para la transcripción del plásmido.

Se estimó el tiempo requerido para la expresión óptima del plásmido en células de cultivo primario de cerebro de ratón neonato (el gen reportero GFP se expresa en todas las células que hayan incorporado el plásmido), por lo que el cultivo fue observado diariamente, al microscopio.

Para obtener el cultivo primario de cerebro total de ratón neonato se procedió como sigue:

Dos ratones neonatos fueron anestesiados completamente por inhalación de isoflurano (Sevorane[®]), decapitados y se extrajo el cerebro rápidamente, en condiciones de esterilidad.

Primeramente se realizó disección mecánica del tejido y luego se trató con tripsina durante 15 minutos a 37° C, en agitación.

Se centrifugó a 1.100 rpm a temp. ambiente durante 10 minutos y se resuspendió en medio DMEM completo, con 10% SFB, y 1% de antibióticos. Se contó en cámara de Neubauer y sembró 5×10^6 células (a confluencia), en placa de 30 mm previamente tratada con polilisina.

Por otro lado se sembró en vidrios de 1cm de diámetro, tratados con poliornitina, dentro de placa de 24 multiwells (sin tratar).

Luego de 24 horas cambiamos el medio de cultivo y transfectamos con los plásmidos pSi o pIs como se describió anteriormente.

Se retiraron placas y vidrios cada 24 horas luego de la transfección, durante 7 días.

3.2.4. Administración de plásmidos ARNi para ST8SiaIII a ratones neonatos mediante estereotaxia.

Previo al protocolo utilizado finalmente, habíamos dirigido la inyección, intraútero, al IV ventrículo de ratones neonatos de 14 días post coito (dpc) (Fig. 3.2 y 3.3). Sin embargo, el trauma generado por la manipulación y la cirugía en la madre provocaba el canibalismo por parte de la misma. Luego de varios intentos decidimos optar por el periodo neonato para la administración del plásmido. En esta etapa (neonatos), las células del cerebro del ratón se encuentran procesos migratorios.

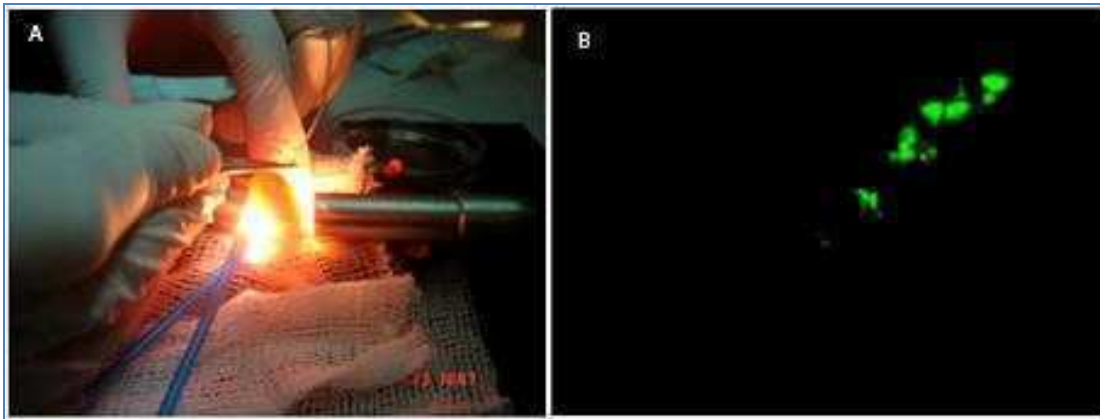


Figura 3.2: A: Inyección de plásmidos en el ventrículo de ratones no natos (intra-útero). B: Localización de los plásmidos (GFP) inyectados en el ventrículo mediante microscopía de fluorescencia.

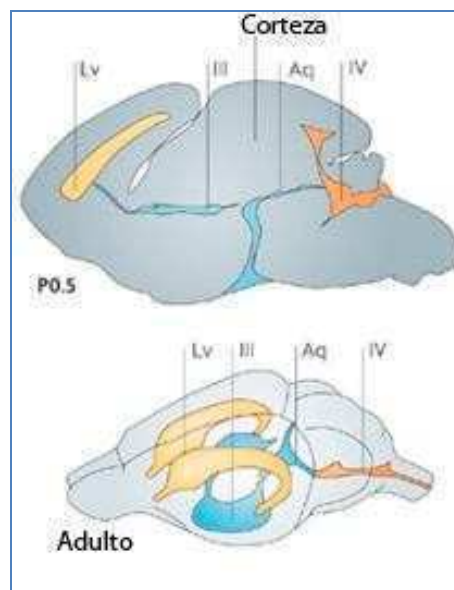


Figura 3.3. Localización de los ventrículos cerebrales en no natos. Lv: ventrículo lateral, III: tercer ventrículo, IV: cuarto ventrículo y Aq: acueducto cerebral en ratones neonatos (P 0,5) y Adultos. Imagen tomada y modificada de http://www.nature.com/nrm/journal/v8/n11/fig_tab/nrm2278_F4.html

Los ratones de 0 a 1 día de nacidos (P 0-1) fueron inoculados intraperitonealmente con 20 μ L de manitol, 15 minutos antes de la anestesia (Ghodsi et al., 1999) que se realizó por hipotermia (hielo seco).

Se ubicó al ratón en un adaptador para neonatos y éste en un marco de estereotaxia (Fig.3.4).

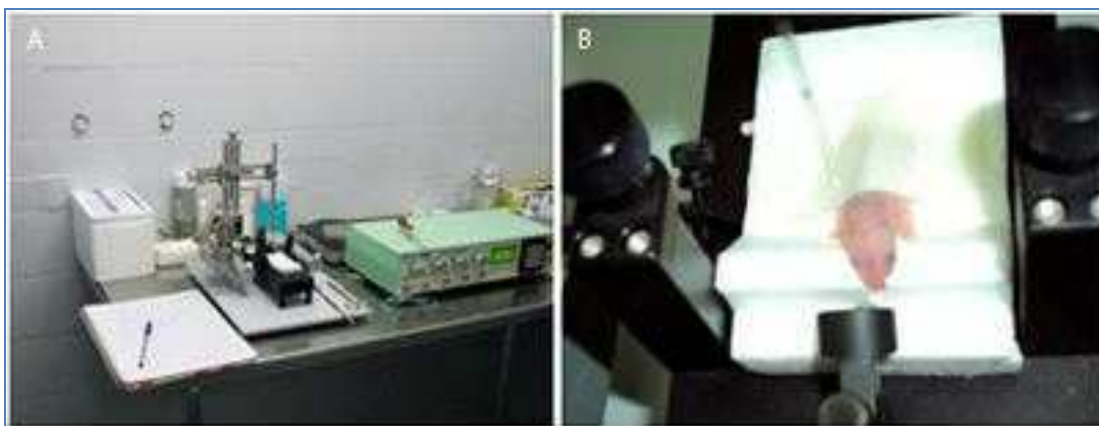
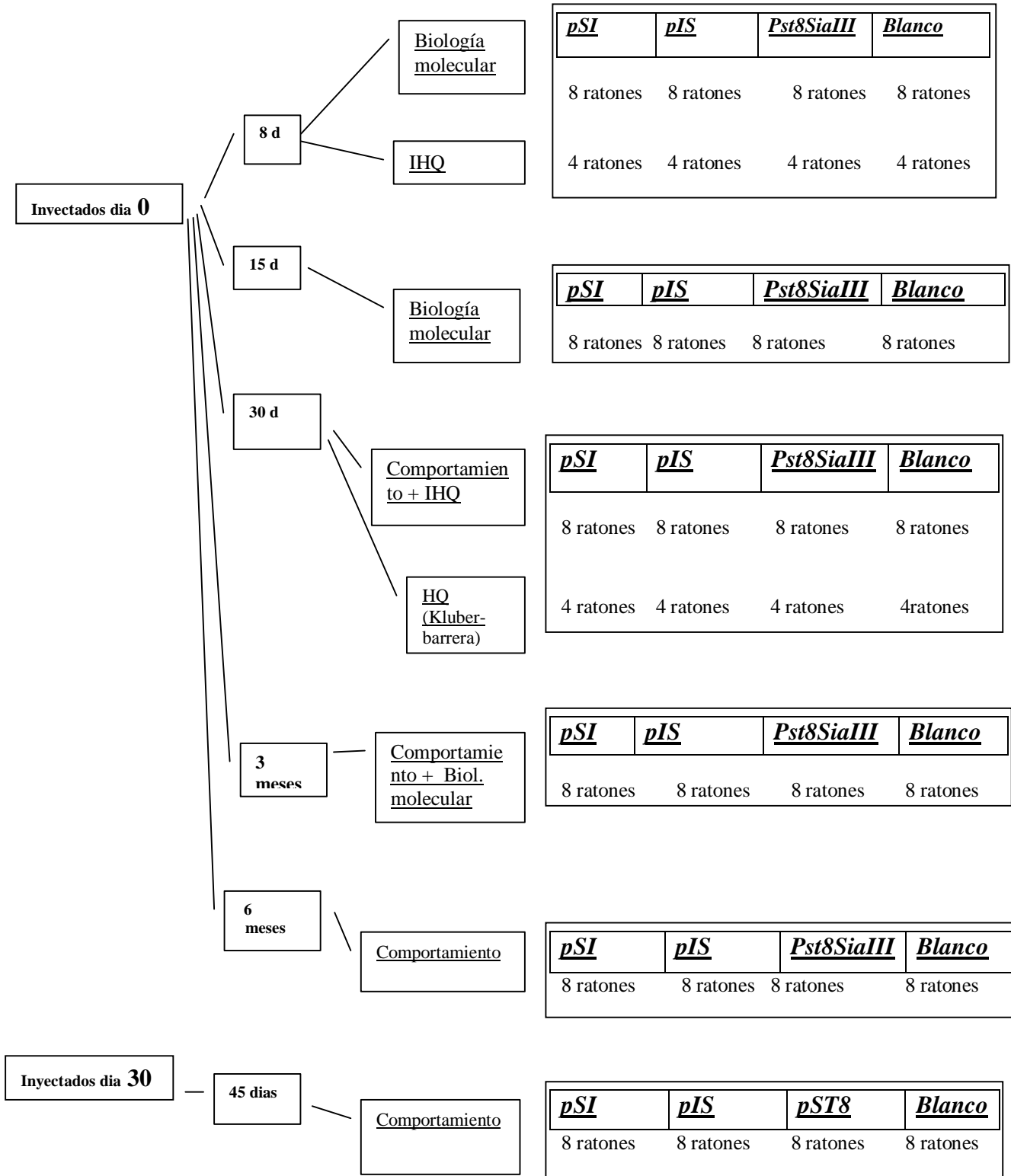


Figura 3.4: A: Marco estereotáxico y microinyector. B: Adaptador para neonatos.

Se localizó la posición lambda (que se trasluce en la piel del neonato sin pelos) y luego, de acuerdo a Pilpel y colaboradores (Pilpel et al., 2009), se determinó el sitio de inyección para dirigir el material a la estructura deseada. Para el ventrículo lateral (Figura 3.3) las coordenadas fueron: de lambda 1mm en dirección rostral y 1,5mm en dirección ventral. Para dirigir el material al cerebelo las coordenadas fueron: desde lambda 1mm en dirección caudal y 2mm en dirección ventral (Pilpel et al., 2009). Previa prueba de difusión de la solución tinta china filtrada en el cerebro, y posterior análisis macroscópico, inyectamos 1,5 μg de plásmido acomplexado con lipofectamina en un máximo de 1,5 μL de solución total.

Las secuencias seleccionadas para administrar fueron pST8, pSi y pIs. A modo de control fueron inyectados neonatos con solución fisiológica. Luego los neonatos fueron marcados mediante corte de cola, y posteriormente colocados sobre placa térmica a 37°C. Permanecieron en incubadora por 1 hora para recuperar la temperatura antes de ser regresados a su madre.

Los ratones inyectados y controles compartían las jaulas aleatoriamente, separados únicamente por sexo para evitar apareamiento. Para identificarlos se les cortó la cola a diferentes longitudes de acuerdo al tratamiento que recibieron (pSi: sin cola, pIs: la punta cortada, pST8: cola media y los controles: sin cortar).



Cuadro con la distribución de los ratones de acuerdo a la fecha de tratamiento (inyección de RNAi) y el procedimiento que sigue: Comportamiento e Histotécnica, o Biología molecular.

Ratones adultos (P30):

Ratones de 30 días de vida (P30) fueron anestesiados completamente mediante la inyección intraperitoneal de una combinación de ketamina (Holliday) y xilasina (Rompum) 75 mg/kg y 10 mg/kg respectivamente, disueltos en solución fisiológica.

Las coordenadas fueron calculadas a partir del atlas de Paxinos (Paxinos & Franklin, 2005). Para alcanzar el ventrículo, desde el bregma -0,7mm dorsal, +1,20mm lateral, +1,75mm en dirección ventral.

Una vez localizada la posición se perforó el cráneo en condiciones estériles y a continuación inyectamos 3 µg de plásmidos acompañado con lipofectamina en un máximo de 2 µL de solución total (previa prueba de difusión de la solución con tinta china filtrada, y posterior análisis macroscópico).

Las secuencias administradas fueron al igual que antes p3, pSi y pIs y como control fueron inyectados ratones de la misma edad con solución fisiológica siguiendo el mismo procedimiento.

3.2.5. Análisis de los efectos del tratamiento con RNAi para ST8SiaIII, mediante técnicas de biología molecular e histología.

Para comprobar la disminución de la expresión de ST8SiaIII en ratones inyectados con el plásmido con ARNi sacrificamos ratones de 8 días, 30 días, 45 días, 3 y 6 meses.

Procedimos a cuantificar, en forma relativa, los niveles de ARN mensajero para ST8SiaIII en las diferentes estructuras, utilizando la técnica de RT-PCR, como describimos anteriormente.

Otro grupo fue procesado por métodos histológicos para obtener criosecciones y proceder a inmunomarcación para ST8SiaIII.

Dado que al momento de administración del ARNi el cerebro del ratón neonato todavía no concluye su migración neural sino hasta 20 días después del nacimiento, un tercer grupo fue procesado para analizar variaciones morfológicas en el desarrollo de las estructuras del cerebro del ratón.

Para ello se procedió como sigue:

Ratones (tratados y controles) fueron anestesiados completamente por inhalación de isoflurano (Sevorane[®]), decapitados y se extrajo el cerebro rápidamente y sumergido en paraformaldehído (PAF) 4%.

Se lavó en agua destilada para retirar el exceso de formaldehído e incubó ON en alcohol 70°.

Luego, para deshidratar el tejido se trató con alcoholes de creciente graduación (96° y 100°) durante 1 hora cada paso, xilol durante 1 hora, + 1 hora en xilol nuevo.

Se incluyó en parafina por 1 hora + una hora en parafina pura.

Una vez frío, mediante un micrótopo se realizaron cortes de 4µm de grosor. Se desparafinaron los cortes durante 30 minutos en soluciones de xilol. Seguidamente se hidrataron los cortes en alcoholes de graduación decreciente (100°, 96°, 70°) durante 30 minutos cada paso.

Técnica de Kluber-Barrera (mielina y células nerviosas)

Una vez desparafinado el corte se trató con solución *luxol fast blue* (0,1% en alcohol 95°) ON a 60°C.

Se lavó con alcohol 95° y luego con agua destilada para retirar el exceso de colorante.

Se logró la diferenciación (o viraje) de la tinción, por inmersión en solución de carbonato de litio (0,05% en agua destilada) y lavados en agua destilada. Se finalizó el proceso de diferenciación mediante el tratamiento con solución de carbonato de litio y alcohol 70° (alternadamente), hasta lograr el tono deseado y luego se lavó con agua destilada.

Se incubó por 30 minutos en el colorante *violeta de crecilo* (0,1% en agua destilada) previamente calentado (a 57°C). Luego se diferenció la coloración mediante lavados con alcohol 95°.

Para deshidratar el corte se trató con alcoholes de creciente graduación (96° y 100°) durante 1 hora cada paso, xilol durante 1 hora, + 1 hora en xilol nuevo. Luego se realizó el montaje para preservación de la muestra con *bálsamo de Canadá*.

3.3. *Análisis del comportamiento de ratones tratados con RNAi para ST8SiaIII.*

Considerando los resultados obtenidos en las etapas previas, en la que el cerebelo es la única estructura que sufre naturalmente una variación significativa en los niveles del epítipo DiSia hacia la etapa senil del ratón, y que los niveles de ST8SiaIII disminuyen con el tratamiento ARNi, seleccionamos una prueba comportamental que nos permita evaluar caracteres relacionados con la función del cerebelo.

El cerebelo está involucrado en la memoria procedural, por lo que la prueba de laberinto en T fue el que mejor se ajustaba nuestros objetivos.

La memoria procedural en particular, se refiere al “saber cómo”, incluye el aprendizaje de tareas o habilidades perceptivo-motoras y son informaciones que no requieren una referencia consciente de la información adquirida. Se diferencia de la memoria declarativa, el “saber qué”, referida a los conocimientos adquiridos que el sujeto puede evocar y comunicar en forma verbal o no verbal (Junque y Barroso, 1999).

Para analizar este tipo de memoria en el ratón se han desarrollado diferentes pruebas (test) y el que ha resultado más eficiente en esta especie es la “prueba de laberinto en T” (Fig. 3.5). Aunque el hipocampo es el sistema que está más involucrado en el mecanismo de la alternación espontánea, otras áreas del cerebro también están involucradas, incluyendo el cerebelo, el tálamo y la sustancia innominata (Lalonde R, 2002).

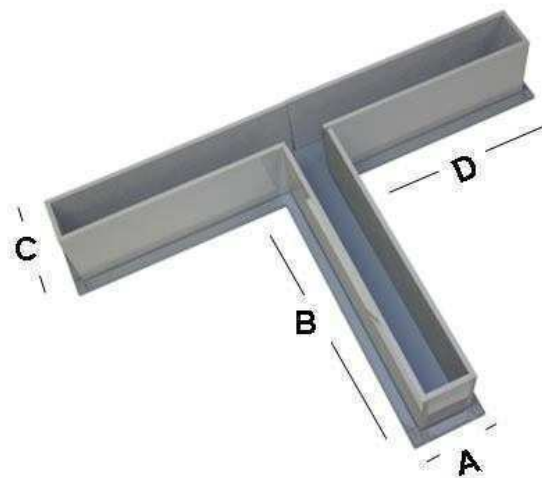


Figura 3.5: Laberinto en T.

Se colocó al animal en el área de comienzo (A). El animal elige entrar en el brazo C o en D. Se lo dejó por 30 segundos, luego se tomó al animal, gentilmente, lo volvimos a posicionar en el área de comienzo (A), el animal eligió entrar al brazo opuesta al que eligió en el intento anterior o el mismo brazo. El hecho de que elija siempre los opuestos es la conducta que se llama: alternación espontánea.

Capítulo 4

Resumen

Resumen

La sialilación de las glicoproteínas y los glicolípidos es un proceso biológico importante para el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso central (SNC), fundamentalmente porque el agregado de estas moléculas enriquece el sistema de señales intercelulares del sistema nervioso (Tsuji et al., 1983; Hildebrandt et al., 1998; Rutishauser y Landmesser, 1996; Seki y Rutishauser, 1998). Uno de los ejemplos más difundido y estudiado ha sido el de los ácidos polisiálicos cuya distribución y función han sido investigadas en diferentes organismos (Troy, 1992). Sin embargo, poco se conoce acerca de estructuras más simples, como los DiSia. En este sentido, el objetivo general de esta tesis fue: 1) identificar la ubicación subcelular de los DiSia, 2) determinar la distribución anatómica en el SNC de los DiSia, 3) identificar en el SNC la enzima sialiltransferasa capaz de biosintetizar DiSia y analizar su distribución y 4) estudiar la relación que los DiSia pudieran tener con algunos procesos cognitivos específicos. Los resultados serían la base para futuros estudios fisiológicos y moleculares.

Tomando como base los estudios previos de Sato y colaboradores (Sato et al., 2000; Sato et al., 2002) y para tener un “*gold standard*” adecuado en una primera etapa, localizamos a los epitopes DiSia en la superficie de la membrana celular de células Neuro2A (neuroblastoma de ratón) en cultivo (Figura 2.1), y también en cultivos primarios de cerebro de ratón neonato (Figura 2.3). A la conclusión de que los DiSia se encuentran en la superficie externa de la membrana celular llegamos a través de las técnicas histoquímicas, dado que cuando el cultivo celular es fijado y sin permeabilizar las células, las marcas observadas con el anticuerpo anti-DiSia corresponden a componentes de la membrana plasmática.

Mientras que los estudios con S2-566, anticuerpo específico para DiSia, sobre la línea Neuro2A habían sido previamente descritos por el grupo mencionado, nada había sido publicado acerca de la expresión de los DiSia en células extraídas directamente del cerebro, hecho de importancia, ya que es sabido que numerosas células tumorales tienen un patrón de glicosilación diferente al de las células normales

(Hakomori, 2002). De esta manera verificamos que al menos en cultivo, las neuronas provenientes de cerebros de neonatos expresan DiSia.

Los resultados experimentales de Sato y colaboradores también indicaban que los portadores (“*Carriers*”) del epítipo DiSia, Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac α 2 \rightarrow 3Gal, podían ser tanto glicolípidos como glicoproteínas. Dada la importancia funcional de dicho tipo de unión, en nuestro caso nos interesaba la especificidad del anticuerpo, para lo cual elegimos bloquear la expresión de un posible portador, en este caso los glicolípidos. Para ello utilizamos N-butildesoxigalactonojirimicina (NB-DGJ), un inhibidor de la síntesis de gangliósidos, el más eficiente y menos tóxico, de acuerdo con la bibliografía previa (Kasperzyk et al., 2004; Kasperzyk et al., 2005). Nuestros resultados indican que los epítopos DiSia reconocidos por S2-566 deberían ser glicoproteínas. Pudimos probar que los cultivos de células PC12 controles y tratadas con NB-DGJ no eran diferentes en cuanto a los niveles de inmunomarcación con S2-566 observados al microscopio (Figura 2.5). Utilizamos la línea PC12 en este experimento para tener un control adicional de la expresión de gangliósidos, ya que según trabajos previos, la extensión de sus neuritas es dependiente de la expresión de gangliósidos, cuando se induce la diferenciación mediante factor de crecimiento neural (NGF) (Kimura et al., 2001). Por lo tanto, el tratamiento con NB-DGJ del cultivo de esta línea celular debería inhibir la extensión de las neuritas.

En nuestros cultivos de células PC12 observamos que cuando inducíamos el cultivo a diferenciación neural (con NGF) las células extendían neuritas (control), pero cuando administrábamos NB-DGJ al cultivo (tratado) no extendían las neuritas, corroborando de este modo que los gangliósidos no estaban siendo expresados (Figura 2.5), y además, que NB-DGJ es eficiente como inhibidor de la síntesis de gangliósidos (Rinflerch et al., 2012).

Por otra parte la bibliografía correspondiente a Sato y colaboradores, así como la del grupo de Itoh y colaboradores, demostraba la presencia de DiSia en extractos de cerebro de mamíferos (Sato et al., 2000; Itoh et al., 2008). Sin embargo, no se conocía la localización específica de esos azúcares. Para esto utilizamos cortes de cerebro de ratón. Tratamos a un grupo de ratones (n=6), con NB-DGJ durante 6 días (Baek et al., 2008), y vimos que presentaban un patrón y nivel de intensidad de la inmunotinción

similares al de los ratones que no fueron tratados con NB-DGJ, mientras que la síntesis de los gangliósidos GM1 era marcadamente inhibida en el cerebro de los ratones tratados (Figura 2.6 F y G). Estos resultados sugieren que las marcas obtenidas con S2-566 en cerebro de ratón corresponden a glicoproteínas disialiladas.

Los DiSia marcados con S2-566 se observan a nivel de la membrana celular, lo cual corresponde con la localización y las funciones que se le atribuyen a los ácidos siálicos en cuanto a las interacciones intercelulares (Varki et al., 2009).

Como proyecto futuro se planificarán experimentos para identificar las glicoproteínas portadoras de DiSia y correlacionar su expresión con su función en el SNC.

Un segundo aspecto de la presente tesis fue de naturaleza glicoquímica: determinar el tipo de unión glicosídica en las glicoproteínas disialiladas, habiendo previamente descartado la posibilidad de encontrar gangliósidos con DiSia dado los resultados del tratamiento con NB-DGJ. Para ello, analizamos el tipo de unión de las glicoproteínas que contienen DiSia, mediante técnicas químicas.

Luego del tratamiento *in-situ* con NaOH (β -eliminación), que elimina los epitopes O-glicosídicos, la inmunomarcación con S2-566 del tejido fue menor (32,6 %) que en las criosecciones control, indicando que una proporción de glicoproteínas O-glicosiladas en el tejido analizado eran portadoras de DiSia.

Para hidrolizar los oligosacáridos con uniones “N-glicosídicas” tratamos las criosecciones de cerebro de ratones neonatos con la enzima N-glicanasa (también llamada PNGasa) que libera N-glicanos de los glicopeptidos.

En las criosecciones de cerebro de ratón tratadas con N-glicanasa, las marcas se redujeron respecto al control (43,2%), pero no completamente, sugiriendo que un grupo de glicoproteínas mayormente N-glicosiladas presentan el epitope DiSia. Por lo tanto podemos concluir que en diferentes proporciones ambos tipos de oligosacáridos, tanto con uniones O-glicosídicas, como N-glicosídicas, se encuentran disialilados.

Para la deglicosilación total tratamos con N-glicanasa + β -eliminación, y al igual que luego del tratamiento de hidrólisis ácida suave no obtuvimos marca con S2-566 lo cual indicaba la ausencia de residuos de DiSia. Los datos bibliográficos indicaban la presencia tanto de O-glicosilación (Sato et al., 2002) como de N-glicosilación en relación a DiSia con enlaces α 2,8 (Itoh et al., 2008), pero ninguno había

inmunomarcado los epitopes *in situ*, con el fin de localizarlos anatómicamente en el SNC de ratón.

Nuestro siguiente paso fue evaluar cronológicamente los niveles del epítopo DiSia en el cerebro de ratones de diferentes edades. Encontramos que los cerebros de ratones neonatos expresaban el epítopo DiSia, y que todo el cerebro era intensamente marcado con S2-566 (Rinflerch et al., 2012). En el cerebro de los ratones neonatos el epítopo DiSia está ubicuamente distribuido. Sin embargo, cuando comparamos entre grupos, si bien no vimos una variación muy marcada en los cerebros de ratones adultos respecto a los neonatos había una excepción, observamos una disminución de aproximadamente 50% (Tabla II) de la marca para DiSia en el cerebelo de los ratones adultos. Este fenómeno se vio acentuado cuando comparamos los ratones seniles con los neonatos; la marca de DiSia en el hipocampo, el bulbo olfatorio y la corteza del cerebro de ratón senil se mantenía constante, pero en el cerebelo vimos que la marcación con S2-566 para DiSia se reducía considerablemente (aproximadamente 70%) respecto a los cerebelos de ratones neonatos. Es decir, si bien parecería que en el SNC de los ratones en diversas etapas cronológicas existe una distribución ubicua y homogénea de glicoproteínas disialiladas, observamos en el caso del cerebelo, a medida que avanzamos hacia el envejecimiento, un descenso gradual de la marca de DiSia correspondiente a las glicoproteínas.

Antes de adentrarnos en estos estudios topológicos de la distribución de DiSia, evaluamos a nivel molecular la expresión de sialiltransferasas capaces de biosintetizar DiSia en glicoproteínas, tanto en las cadenas O-glicosídicas como en las N-glicosídicas. Analizamos entonces los niveles transcripcionales de ST8SiaI, ST8SiaII, ST8SiaIII, ST8SiaIV y ST8SiaVI a nivel de ARN mensajero.

ST8SiaII y ST8SiaIV eran candidatas debido a que fueron previamente sugeridas como tales por Sato y colaboradores (Sato et al., 2000; Sato et al., 2002) y además por su capacidad de biosintetizar ácidos polisiálicos con uniones α 2-8 (Kojima et al., 1996; Eckhardt et al., 2000; Kitazume-Kawaguchi et al., 2001) en glicoproteínas del SNC como NCAM (Angata et al., 2000) y en la subunidad α del canal de sodio (Zuber et al., 1992).

En referencia a los resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica de la expresión del epítopo α 2,8 DiSia en el hipocampo, el bulbo olfatorio, corteza y el cerebelo de los animales de diferentes edades, corroboramos que las estructuras

mencionadas consistentemente expresaran ARNm de las sialiltransferasas candidatas. Con referencia a los niveles constantes de expresión del epítopo DiSia durante la vida del animal en hipocampo, bulbo olfatorio y corteza, observamos los niveles de ARNm de ST8SiaI, ST8SiaII, ST8SiaIV y ST8SiaVI y estas no presentaban un patrón de expresión similar. En cambio, el ARNm de ST8SiaIII mantiene una correspondencia con los niveles del epítopo DiSia, previamente observados (Figura 2.12). Cuando evaluamos a nivel proteínas encontramos que también, al igual que el ARNm y que el producto que sintetiza, los DiSia, las proteínas disminuyen de neonatos a adultos, pero la disminución se hace más evidente en la etapa senil.

En el cerebelo se vio reducida su expresión en los grupos de animales seniles, tal como ocurre con el epítopo DiSia (Rinflerch et al., 2012). Estos resultados refuerzan la hipótesis de una expresión diferencial de DiSia, cronológicamente regulada a nivel transcripcional.

Respecto a las otras estructuras del sistema nervioso central analizadas (bulbo olfatorio, corteza e hipocampo) la expresión de ST8SiaI, ST8SiaII, ST8SiaIV y ST8SiaVI por un lado y ST8SiaIII por otro, presentan notables diferencias en cuanto a la expresión génica: mientras las primeras enzimas muestran un patrón muy heterogéneo de expresión en diferentes etapas de la vida, ST8SiaIII permanece constante durante el desarrollo, con niveles estadísticamente equivalente entre los adultos y los recién nacidos. Esto sugeriría que, aunque otras enzimas tienen un papel variable fundamental en el desarrollo con un importante nivel de expresión post-natal, ST8SiaIII sigue siendo expresada constantemente, indicando un importante papel funcional en todas las etapas de la vida en bulbo, corteza e hipocampo, pero no en cerebelo.

Nuestros resultados sugieren una relación entre el epítopo DiSia y la enzima ST8SiaIII, dado que cuando los niveles de expresión de otras disialiltransferasas se estudiaron, los niveles de ARNm no coinciden con los niveles del epítopo DiSia.

Por otro lado, y en consistencia con nuestros resultados, trabajos previos corroboran la directa relación entre niveles de expresión de glicosiltransferasas y su producto glicosilado, probando que la regulación de la expresión de epítopos glicosilados es a nivel de la transcripción de la enzima (Wantanabe et al., 1996).

Podemos postular que el/los mecanismo/s relacionados con las enfermedades neurodegenerativas del cerebelo podrían tener una relación directa con los cambios que causan el envejecimiento. Respecto a esto, se observó que ST8SiaIII tienen niveles similares de expresión en el cerebelo de los recién nacidos y adultos, con una disminución gradual hasta la etapa de senilidad. Estos resultados coinciden con otros trabajos donde relacionan procesos neurodegenerativos causados por el envejecimiento y alteraciones en los mecanismos de sialilación (Mochel et al., 2009). Como siguiente paso nos propusimos evaluar si la disminución de DiSia y la expresión del gen de ST8SiaIII se correlacionaban a nivel sináptico. En este sentido, se utilizó sinaptofisina para cuantificación de las sinapsis (Calhoun et al., 1996).

En nuestro trabajo observamos que en animales adultos y seniles existe una correlación directa entre la disminución de la expresión de ambos genes en el cerebelo, sinaptofisina y ST8SiaIII sugiriendo que la baja expresión de ST8SiaIII, podría estar relacionada con una disminución en la estabilidad de las uniones sinápticas.

El patrón de expresión diferencial del gen ST8SiaIII y también del epítopo DiSia en el cerebelo de los animales seniles, nos llevó a investigar, indirectamente, las funciones de DiSia a nivel conductual, buscando algún tipo de relación entre funciones cognitivas (principalmente atribuidas al menos parcialmente al cerebelo) y DiSia.

En este sentido intentamos determinar la función de los DiSia unidos a las glicoproteínas del cerebro del ratón a través de técnicas de terapia génica, con RNAi para la enzima ST8SiaIII (Fountaine et al., 2005), ya que la ausencia de ST8SiaIII debería darnos información respecto a su función (Wianny y Zernicka-Goetz, 2000).

Particularmente el SNC es uno de los órganos más difíciles de acceder mediante TG, porque sus células presentan una tasa de reproducción muy baja, especialmente una vez alcanzada la adultez (Karra y Dahm, 2010), por lo cual una combinación de estrategias es requerida para obtener mayor eficiencia (Rogers y Rush, 2012).

Como estrategia elegimos el bloqueo molecular de la expresión de la enzima ST8SiaIII mediante ARNi o interferencia mediada por ARN. Utilizamos para ello el plásmido pGFP-V-RS con la secuencia ARNi para ST8SiaIII. Esta técnica nos permitió inhibir pos-transcripcionalmente la expresión del gen utilizando la maquinaria de defensa antiviral propia de las células (Fire et al., 1998).

El plásmido previamente acomplejado con liposomas catiónicos (Lipofectamina) fue administrado primeramente a células en cultivo, para probar su efectividad. Las células Neuro2A expresan DiSia en su superficie cuando extienden sus neuritas luego de la inducción a diferenciación neural (Sato et al., 2002). De 4 secuencias diferentes de RNAi para bloquear la expresión de ST8SiaIII, tres de ellas inhibían los niveles de ARNm en el citoplasma de las células, y por lo tanto los niveles de DiSia, por lo que las células no extendían sus neuritas. Observamos que algunas de las secuencias eran más eficientes que otras en la incorporación del plásmido y también había diferencias en la eficiencia respecto al silenciamiento, por lo que elegimos la secuencia con el mejor perfil para luego extrapolar la experiencia a un sistema in vivo.

In vivo, a través de neurocirugía estereotáxica inyectamos el vector de interferencia, para posteriormente analizar las consecuencias sobre la conducta estudiada. El grupo experimental consistió en dos grupos. Un grupo de ratones neonatos (P0, sexo aleatorio y peso: 1g), y otro grupo de ratones adultos (P30, sexo aleatorio y peso: 30 g).

El plásmido inhibidor fue dirigido ex profeso al ventrículo lateral del cerebro del ratón (Cetin et al, 2006; Pipel et al, 2009), bajo el supuesto de que las células que colonizan el cerebro durante su maduración postnatal provienen del neuroepitelio ventricular. Esta estrategia es particularmente importante en el caso del cerebelo, el cual se desarrolla y madura al final de la tercera semana de vida, y fundamentalmente a través del neuroepitelio de la cavidad ventricular (Goldowitz y Hamre, 1998). Los resultados demostraron que el tratamiento con el plásmido inhibidor reduce la expresión de ST8SiaIII a nivel de ARNm, los primeros días pos-tratamiento y luego revierten a niveles normales. En consecuencia, dado que en dicha etapa las células neurales del cerebro de ratón aun se encuentran migrando para llegar a su posición final, la ausencia o reducción de los niveles normales de DiSia podrían generar variaciones en este proceso, particularmente a nivel cerebelar, sitio diferencial en cuanto a la expresión de la enzima y el epítipo a lo largo de la vida. La prueba elegida, paradigma conductual de memoria procedural, fue también elegida por este motivo, ya que si bien intervienen en su ejecución estructuras cerebrales en general, se considera mayormente debida al cerebelo (Lalonde, 2002; Bastian, 2011).

Los resultados obtenidos sugieren que si bien el efecto de la inhibición de la expresión de la enzima fue transitorio y específico a nivel cerebelar, en ambos grupos, solo ocasionaron alteraciones en la prueba conductual en los animales inyectados durante el periodo neonatal. Esto nos permite generar al menos dos conclusiones: El plásmido inhibidor inyectado a nivel ventricular no tiene una influencia significativa a nivel encefálico, ya que la marca del epítipo se expresa en corteza cerebral, probablemente debido a la presencia de otras enzimas intervinientes, o a otro tipo de regulación de la expresión del epítipo DiSia. Por otra parte, la disminución de la expresión de la enzima en ambos grupos de animales inyectados, solo tuvo correlato inmunohistoquímico en los neonatos y significativamente a nivel cerebelar.

Es interesante el hecho de que estos animales (neonatos inyectados), fueron los que tuvieron alteraciones en el paradigma de memoria procedural. Es decir parecería demostrado el hecho de que la disminución transitoria de los niveles de ST8SiaIII y de DiSia, en etapas tempranas del desarrollo y a nivel cerebelar produce trastornos a nivel de la memoria procedural. Lo cual, sin poder definitivamente dar una explicación causal de la expresión de DiSia a nivel cerebelar, al menos sugiere una fuerte asociación estadística entre estas variables. Se podría especular en base a estos resultados y la bibliografía existente que el tratamiento inhibidor de ST8SiaIII en neonatos, genera algún trastorno en la migración y/o diferenciación neural durante la última etapa de este proceso, generando trastornos permanentes en las conexiones que afectan a la memoria procedural y que se hacen más evidentes hacia la vida adulta.

En relación a que otras estructuras cerebrales (hipocampo, corteza y bulbo olfatorio) no mostraron una variación significativa tras la administración del plásmido inhibidor, sugerimos dos posibles hipótesis: una de ellas es que los DiSia sean sintetizados por ST8SiaIII solamente en el cerebelo, y en las otras estructuras la síntesis dependa de otra sialiltransferasa. Otra posibilidad es que la vida media, o el “turnover” del ARNm de ST8SiaIII fuera mayor en estas estructuras, comparado al cerebelo, y entonces los niveles de ST8SiaIII y de DiSia se mantengan constantes.

En este trabajo se presentó:

- 1) La localización y distribución de DiSia, y de la enzima sialiltransferasa ST8SiaIII mediante técnicas inmunohistoquímicas, en estructuras del sistema nervioso de ratones neonatos, adultos y seniles.
- 2) Localización y cuantificación relativa de ST8SiaIII, mediante PCR en tiempo real, y técnicas de biología molecular, en las distintas estructuras del sistema nervioso de ratones neonatos, adultos y seniles.
- 3) Probable función de los DiSia en células del SNC, mediante la inhibición de la expresión de la enzima responsable de su síntesis utilizando técnicas de RNA de Interferencia.

Estos métodos dieron lugar a las siguientes conclusiones:

ST8SiaIII se expresa constantemente en hipocampo, bulbo olfatorio y corteza, sin embargo, en cerebelo los niveles de expresión de ST8SiaIII disminuyen durante el transcurso de la vida del ratón.

ST8SiaIII es la enzima sialiltransferasa que cataliza la síntesis de DiSia en el SNC ya que en cerebelo se correlacionan sus niveles de expresión.

ST8SiaIII cataliza la síntesis de DiSia en glicoproteínas dado que cuando se inhibió la síntesis de gangliósidos, la marca anti DiSia se mantuvo igual que en los controles.

Los niveles de expresión de la proteína sinaptofisina en adultos y seniles correlacionan con los niveles de ST8SiaIII, sugiriendo una relación entre los niveles de ST8SiaIII y la estabilidad de los contactos sinápticos.

La expresión de la enzima ST8SiaIII es regulada a nivel transcripcional, dado que pudimos modificar los niveles de ARNm mediante RNAi, tanto in vivo como in vitro.

La expresión de ST8SiaIII en etapas tempranas del desarrollo son importantes para el correcto desempeño del ratón adulto en pruebas de conducta, ya que bajos niveles provocan alteraciones que afectan a la memoria procedural y de trabajo.

Esta Tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:

Differential expression of disialic acids in the cerebellum of senile mice.

Adriana R. Rinflerch; Valeria L. Burgos; Alejandra M. Hidalgo; Monica Loresi; Pablo F. Argibay.

Glycobiology vol. 22 no. 3 pp. 411–416, 2012.

En prensa:

Inhibition of brain ST8SiaIII sialyltransferase leads to impairment of procedural memory in mice

Adriana R. Rinflerch; Valeria L. Burgos; Marcelo Ielpi; Marcos Ojea Quintana; Alejandra M. Hidalgo; Mónica Loresi; Pablo F. Argibay.

Neurochemistry International Available online 7 August 2013.

Bibliografía

Bibliografía

Angata K, Suzuki M, McAuliffe J, Ding Y, Hindsgaul O, Fukuda M (2000). Differential biosynthesis of polysialic acid on neural cell adhesion molecule (NCAM) and oligosaccharide acceptors by three distinct alpha 2,8-sialyltransferases, ST8Sia IV (PST), ST8Sia II (STX), and ST8SiaIII. *J Biol Chem.* **275**(24):18594-18601.

Baek RC, Kasperzyk JL, Platt FM, Seyfried TN (2008). N-butyldeoxygalactonojirimycin reduces brain ganglioside and GM2 content in neonatal Sandhoff disease mice. *Neurochem Int.* **52**(6):1125-1133.

Bastian AJ (2011). Moving, sensing and learning with cerebellar damage. *Curr Opin Neurobiol.* **21**(4):596-601.

Bleckmann C, Geyer H, Lieberoth A, Splittstoesser F, Liu Y, Feizi T, Schachner M, Kleene R, Reinhold V, Geyer R (2009). O-glycosylation pattern of CD24 from mouse brain. *Biol Chem.* **390**(7):627-645.

Butler M, Quelhas D, Critchley AJ, Carchon H, Hebestreit HF, Hibbert RG, Vilarinho L, Teles E, Matthijs G, Schollen E, Argibay P, Harvey DJ, Dwek RA, Jaeken J, Rudd PM (2003). Detailed glycan analysis of serum glycoproteins of patients with congenital disorders of glycosylation indicates the specific defective glycan processing step and provides an insight into pathogenesis. *Glycobiology.* **13**(9):601-622.

Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, Thinakaran G, Price DL, Mouton PR (1996). Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *J Neurocytol.* **25**(12):821-828.

Cartwright TA, Schwalbe RA (2009). Atypical sialylated N-glycan structures are attached to neuronal voltage-gated potassium channels. *Biosci Rep.* **29**(5):301-313.

Cetin A, Komai S, Eliava M, Seeburg PH, Osten P (2006). Stereotaxic gene delivery in the rodent brain. *Nat Protoc.* **1**(6):3166-3173.

Chung YH, Shin CM, Kim MJ, Shin DH, Yoo YB, Cha CI (2001). Differential alterations in the distribution of voltage-gated calcium channels in aged rat cerebellum. *Brain Res.* **903**(1-2):247-252. Errata en: *Brain Res.* 2001;919(2):322.

Cox TM, Cachón-González MB (2012). The cellular pathology of lysosomal diseases. *J Pathol.* **226**(2):241-254.

Cremer H, Chazal G, Lledo PM, Rougon G, Montaron MF, Mayo W, Le Moal M, Abrous DN (2000). PSA-NCAM: an important regulator of hippocampal plasticity. *Int J Dev Neurosci.* **18**(2-3):213-220.

Cruz J, Minoja G, Okuchi K (2002). Major clinical and physiological benefits of early high doses of mannitol for intraparenchymal temporal lobe hemorrhages with abnormal pupillary widening: a randomized trial. *Neurosurgery.* **51**(3):628-637.

Davies LR, Pearce OM, Tessier MB, Assar S, Smutova V, Pajunen M, Sumida M, Sato C, Kitajima K, Finne J, Gagneux P, Pshezhetsky A, Woods R, Varki A. (2012). Metabolism of vertebrate amino sugars with N-glycolyl groups: resistance of α 2-8-linked N-glycolylneuraminic acid to enzymatic cleavage. *J Biol Chem.* **287**(34):28917-28931.

Deacon RMJ, Rawlins JNP (2006). T-maze alternation in the rodent. *Nat Protoc.* **1**: 7–12.

Eckhardt M, Bukalo O, Chazal G, Wang L, Goridis C, Schachner M, Gerardy-Schahn R, Cremer H, Dityatev A (2000). Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SiaIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity. *J Neurosci.* **20**(14):5234-5244.

Fermini B, Nathan RD (1991). Removal of sialic acid alters both T- and L-type calcium currents in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **260**(3 pt 2):H735–H743.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* **391**(6669):806-811.

Fontaine TM, Wood MJ, Wade-Martins R (2005). Delivering RNA interference to the mammalian brain. *Curr Gene Ther.* **5**(4):399-410.

Fu H, Muenzer J, Samulski RJ, Breese G, Sifford J, Zeng X, McCarty DM (2003). Self-complementary adeno-associated virus serotype 2 vector: global distribution and broad dispersion of AAV-mediated transgene expression in mouse brain. *Mol Ther.* **8**(6):911-917.

Fukuda M, Hindsgaul O, eds (2000). *Molecular and cellular glycobiology.* Oxford: Oxford University Press.

Fukuda M, Rutishauser U, Shnaar RL (2005). *Neuroglycobiology.* Oxford: Oxford University Press.

Galuska SP, Rollenhagen M, Kaup M, Eggers K, Oltmann-Norden I, Schiff M, Hartmann M, Weinhold B, Hildebrandt H, Geyer R, Mühlenhoff M, Geyer H (2010). Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* **107**(22):10250-10255.

Goldowitz D, Hamre K (1998). The cells and molecules that make a cerebellum. *Trends Neurosci.* **21**(9):375-382.

Ghodsí A, Stein C, Derksen T, Martins I, Anderson RD, Davidson BL (1999). Systemic hyperosmolality improves β -Glucuronidase distribution and pathology in murine MPS VII brain following intraventricular gene transfer. *Exp Neurol.* **160**(1):109-116.

Hakomori S (2002). Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proc Natl Acad Sci USA*. **99**(16):10231-10233.

Hall MK, Cartwright TA, Fleming CM, Schwalbe RA. (2011). Importance of glycosylation on function of a potassium channel in neuroblastoma cells. *PLoS One*. **6**, e19317.

Hildebrandt H, Becker C, Müräu M, Gerardy-Schahn R, Rahmann H (1998). Heterogeneous expression of the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV during postnatal rat brain development. *J Neurochem*. **71**(6):2339-2348.

Inoko E, Nishiura Y, Tanaka H, Takahashi T, Furukawa K, Kitajima K, Sato C (2010). Developmental stage-dependent expression of an α 2,8-trisialic acid unit on glycoproteins in mouse brain. *Glycobiology*. **20**(7):916-928.

Isom LL, Ragsdale DS, De Jongh KS, Westenbroek RE, Reber BF, Scheuer T, Catterall WA (1995). Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell*. **83**(3):433-442.

Itoh S, Hachisuka A, Kawasaki N, Hashii N, Teshima R, Hayakawa T, Kawanishi T, Yamaguchi T (2008). Glycosylation analysis of IgLON family proteins in rat brain by liquid chromatography and multiple-stage mass spectrometry. *Biochemistry*. **47**(38):10132-10154.

Janas T, Janas T (2011). Membrane oligo- and polysialic acids. *Biochim Biophys Acta*. **1808**(12):2923-2932.

Johnson CP, Fujimoto I, Rutishauser U, Leckband DE (2005). Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion. *J Biol Chem*. **280**(1):137-145. Errata en: *J Biol Chem*. 2005;280(24):23424.

Judge AD, Bola G, Lee AC, MacLachlan I (2006). Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Mol ther.* **13**(3):494-505.

Junque C, Barroso J (1999). Neuropsicología. Madrid: Síntesis.

Kanato Y, Kitajima K, Sato C (2008). Direct binding of polysialic acid to a brain-derived neurotrophic factor depends on the degree of polymerization. *Glycobiology.* **18**(12):1044-1053.

Karra D, Dahm R (2010). Transfection techniques for neuronal cells. *J Neurosci.* **30**(18): 6171-6177.

Kasperzyk JL, El-Abbadi MM, Hauser EC, d'Azzo A, Platt FM, Seyfried TN (2004). N-butyldeoxygalactonojirimycin reduces neonatal brain ganglioside content in a mouse model of GM1 gangliosidosis. *J Neurochem.* **89**(3):645-653.

Kasperzyk JL, d'Azzo A, Platt FM, Alroy J, Seyfried TN (2005). Substrate reduction reduces gangliosides in postnatal cerebrum-brainstem and cerebellum in GM1 gangliosidosis mice. *J Lipid Res.* **46**(4):744-751.

Kay MA, Glorioso JC, Naldini L (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med.* **7**(1):33-40.

Kimura M, Hidari KI, Suzuki T, Miyamoto D, Suzuki Y (2001). Engagement of endogenous ganglioside GM1a induces tyrosine phosphorylation involved in neuron-like differentiation of PC12 cells. *Glycobiology.* **11**(4):335-343.

Kitajima K, Sato C, Honda N, Matsuda T, Yokoyama M-H, Close BE, Colley KJ (1999). Occurrence of α 2,8-linked oligosialic acid residues in mammalian glycoproteins. En: Inoue Y, Lee, YC, Troy FA. Sialobiology and other novel form of glycosylation. Osaka: Gakushin Publishing. 69–76.

Kitazume-Kawaguchi S, Kabata S, Arita M (2001). Differential biosynthesis of polysialic or disialic acid structure by ST8Sia II and ST8Sia IV. *J Biol Chem.* **276**(19):15696-15703.

Kojima N, Tachida Y, Yoshida Y, Tsuji S (1996). Characterization of mouse ST8Sia II (STX) as a neural cell adhesion molecule-specific polysialic acid synthase. *J Biol Chem.* **271**(32):19457-19463.

Krichevsky AM, Kosik KS (2002). RNAi functions in cultured mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99**(18):11926-11929.

Lalonde R (2002). The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci Biobehav Rev.* **26**(1):91-104.

Larionov A, Krause A, Miller W (2005). A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics.* **6**:62.

Liu H, Kojima N, Kurosawa N, Tsuji S (1997). Regulated expression system for GD3 synthase cDNA and induction of differentiation in Neuro2a cells. *Glycobiology* **7**(8):1067-1076.

Lodish H, Berk S, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipurski SL, Darnell J (2005). *Biología celular y molecular.* 5^a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana.

Manto M, Marmolino D (2009). Cerebellar ataxias. *Curr Opin Neurol.* **22**(4):419-429.

Marengo FD, Wang SY, Wang B, Langer GA (1998). Dependence of cardiac cell Ca²⁺ permeability on sialic acid-containing sarcolemmal gangliosides. *J Mol Cell Cardiol.* **30**(1):127-137.

Martin P (2002). Glycobiology of the synapse. *Glycobiology.* **12**(1):1R-7R.

Matsuura M, Yamazaki Y, Sugiyama M, Kondo M, Ori H, Nango M, Oku N. (2003). Polycation liposome-mediated gene transfer in vivo. *Biochim Biophys Acta.* **1612**(2):136-143.

Menezes J, Smith C, Nelson K, Luskin M (1995). The division of neuronal progenitor cells during migration in the neonatal mammalian forebrain. *Mol Cell Neurosci.* **6**, 496–508.

Mochel F, Sedel F, Vanderver A, Engelke UF, Barritault J, Yang BZ, Kulkarni B, Adams DR, Clot F, Ding JH, et al. (2009). Cerebellar ataxia with elevated cerebrospinal free sialic acid (CAFSA). *Brain.* **132**(3):801-809.

Mühlenhoff M, Manegold A, Windfuhr M, Gotza B, Gerardy-Schahn R (2001). The impact of N-glycosylation on the functions of polysialyltransferases. *J Biol Chem.* **276**(36): 34066-34073.

Mutoh T, Tokuda A, Inokuchi J, Kuriyama M (1998). Glucosylceramide synthase inhibitor inhibits the action of nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem.* **273**(40): 26001-26007.

Naidoo J, Young D (2012). Gene regulation systems for gene therapy applications in the central nervous system. *Neurol Res Int.* **2012**:595410-595420.

Nairn AV, York WS, Harris K, Hall EM, Pierce JM, Moremen KW (2008). Regulation of glycan structures in animal tissues: transcript profiling of glycan-related genes. *J Biol Chem.* **283**(25):17298-17313.

Ngamukote S, Yanagisawa M, Ariga T, Ando S, Yu RK (2007). Developmental changes of glycosphingolipids and expression of glycogenes in mouse brains. *J Neurochem.* **103**(6): 2327-2341.

Palte MJ, Raines RT (2012). Interaction of nucleic acids with the glycocalyx. *J Am Chem Soc.* **134**(14):6218-6223.

Paulson JC, Colley KJ (1989). Glycosyltransferases. structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem.* **264**(30):17615-17618.

Paxinos G, Franklin KBJ (2001). The mouse brain in stereotaxic coordinates 2. San Diego: Academic Press.

Pilpel N, Landeck N, Klugmann M, Seeburg PH, Schwarz MK (2009). Rapid, reproducible transduction of select forebrain regions by targeted recombinant virus injection into the neonatal mouse brain. *J Neurosci Methods.* **182**(1):55-63.

Rinflerch AR, Burgos VL, Hidalgo AM, Loresi M, Argibay PF (2012). Differential expression of disialic acids in the cerebellum of senile mice. *Glycobiology* **22**(3):411-416.

Rogers ML, Rush RA (2012). Non-viral gene therapy for neurological diseases, with an emphasis on targeted gene delivery. *J Control Release.* **157**(2):183-189.

Rutishauser U, Watanabe M, Silver J, Troy FA, Vimr ER (1985). Specific alteration of NCAM-mediated cell adhesion by an endoneuraminidase. *J Cell Biol.* **101**(5 pt 1):1842-1849.

Rutishauser U, Landmesser L (1996). Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends Neurosci.* **19**(10):422-427.

Sato C, Fukuoka H, Ohta K, Matsuda T, Koshino R, Kobayashi K, Troy FA 2nd, Kitajima K (2000). Frequent occurrence of pre-existing α 2-8-linked disialic and oligosialic acids with chain lengths up to 7 Sia residues in mammalian brain glycoproteins. *J Biol Chem.* **275**(20):15422-15431.

Sato C, Yasukawa Z, Honda N, Matsuda T, Kitajima K (2001). Identification and adipocyte differentiation-dependent expression of the unique disialic acid residue in an adipose tissue-specific glycoprotein adipo Q. *J Biol Chem.* **276**(31):28849–28856.

Sato C, Matsuda T, Kitajima K (2002). Neuronal differentiation-dependent expression of the disialic acid epitope on CD166 and its involvement in neurite formation in Neuro2A cells. *J Biol Chem.* **277**(47):45299-45305.

Schnaar RL (2010). Brain gangliosides in axon-myelin stability and axon regeneration. *FEBS Lett.* **584**(9):1741-1747.

Schauer R (2009). Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol.* **19**(5):507-514.

Seki T, Rutishauser U (1998). Removal of polysialic acid–neural cell adhesion molecule induces aberrant mossy fiber innervation and ectopic synaptogenesis in the hippocampus. *J Neurosci.* **18**(10):3757–3766.

Suzuki T (2007). Cytoplasmic peptide:N-glycanase and catabolic pathway for free N-glycans in the cytosol. *Semin Cell Dev Biol.* **18**(6):762-769.

Steinlin M, Styger M, Boltshauser E (1999). Cognitive impairments in patients with congenital nonprogressive cerebellar ataxia. *Neurology.* **53**(5):966-973.

Steinlin M (2008). Cerebellar disorders in childhood: cognitive problems. *Cerebellum.* **7**(4):607-610.

Takashima S, Ishida HK, Inazu T, Ando T, Ishida H, Kiso M, Tsuji S, Tsujimoto M (2002). Molecular cloning and expression of a sixth type of alpha 2,8-sialyltransferase (ST8Sia VI) that sialylates O-glycans. *J Biol Chem.* **277**(27):24030-24038.

Tarsa L, Goda Y (2002). Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99**(2):1012-1016.

Taylor M, Drickamer K (2012). Introduction to Glycobiology 3rd. Edition, Oxford University Press Inc. New York.

Teinteiner-Lelièvre M, Julien S, Juliant S, Guerardel Y, Duonor-Cérutti M, Delannoy, Harduin-Lepers A (2005). Molecular cloning and expression of a human hST8Sia VI (α 2,8-sialyltransferase) responsible for the synthesis of the diSia motif on O-glycosylproteins. *Biochem J.* **392**(3):665-674. Errata en: *Biochem J.* 2007;**401**(3):763.

Troy FA 2nd (1992). Polysialylation: from bacteria to brains. *Glycobiology.* **2**(1):5-23.

Tsuji S, Arita M, Nagai Y (1983). GQ1b, a bioactive ganglioside that exhibits novel nerve growth factor (NGF)-like activities in the two neuroblastoma cell lines. *J Biochem.* **94**(1):303-306.

Varki A (2007). Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature* **446**, 1023-1029.

Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Stanley P, Bertozzi C, Hart G, Etzler M (2009). Essentials of glycobiology. Cold Spring Harbor, NY: CSH Laboratory Press.

Watanabe Y, Nara K, Takahashi H, Nagai Y, Sanai Y (1996). The molecular cloning and expression of α 2,8-Sialyltransferase (GD3 synthase) in a rat brain. *J Biochem.* **120**(5): 1020-1027.

Wianny F, Zernicka-Goetz M (2000). Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol.* **2**(2):70-75.

Wong M, Medrano F (2005). Real time PCR for mRNA quantiation. *BioTechniques.* **39**(1):75-85.

Yanagisawa K (2011). Pathological significance of ganglioside clusters in Alzheimer`s disease. *J. Neurochem.* **116**(5):806-812.

Yoshida Y Kojima N, Kurosawa N, Hamamoto T, Tsuji S (1995). Molecular cloning of Sia α 2,3Gal β 1,4GlcNAc α 2,8-sialyltransferase from mouse brain. *J Biol Chem.* **270**(24): 14628-14633.

Yue Q, Jen JC, Nelson SF, Baloh RW (1997). Progressive ataxia due to a missense mutation in a calcium-channel gene. *Am J Hum Genet.* **61**(5):1078-1087.

Ziak M, Meier M, Novak-Hofer I, Roth J (2002). Ceruloplasmin carries the anionic glycan oligo/poly α 2,8 deaminoneuraminic acid. *Biochem Biophys Res Commun.* **295**(3):597-602.

Zuber C, Lackie PM, Catterall WA, Roth J (1992). Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain. *J Biol Chem.* **267**(14):9965-9971.