Juliana Milani Scorisa

**Caracterização celular e molecular da influência do astrócito na
degeneração do neurônio motor no modelo *in vitro* da esclerose
lateral amiotrófica utilizando camundongos transgênicos para SOD1
humana mutante**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa: Neurologia
Orientador: Prof. Dr. Gerson Chadi

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Scorisa, Juliana Milani

Caracterização celular e molecular da influência do astrócito na degeneração do neurônio motor no modelo *in vitro* da esclerose lateral amiotrófica utilizando camundongos transgênicos para SOD1 humana mutante / Juliana Milani Scorisa. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Neurologia.
Orientador: Gerson Chadi.

Descritores: 1.Esclerose amiotrófica lateral 2.Astrócitos 3.Neurônios motores

USP/FM/DBD-005/13

Dedicatória

Aos meus pais que me transmitiram os valores mais íntegros e me incentivaram a seguir meus sonhos;

Ao Meu irmão pela cumplicidade, amizade e confiança;

Ao meu marido pela paciência, apoio e motivação.

Agradecimentos

À Deus por ter estado ao meu lado me protegendo e colocando pessoas tão boas ao meu lado que me deram forças para continuar e finalizar esse trabalho.

Ao professor Gerson Chadi pela oportunidade de desenvolver esse trabalho e também pela orientação segura e ensinamentos recebidos.

Aos meus pais por toda compreensão e apoio durante toda minha vida. Sem o suporte e a segurança que me transmitiram não teria chegado até aqui.

Ao meu irmão pelo carinho e atenção em tudo que precisei. Um grande companheiro que tenho para a vida toda.

Ao meu marido pelo amor e compreensão em especial nos momentos mais difíceis, principalmente neste último ano, sempre me motivando e incentivando a chegar ao final desta difícil etapa.

Aos funcionários do Laboratório: Gilmar e Sarah, por sempre serem tão prestativos e atenciosos comigo e com o meu trabalho.

À Florence pela amizade, alegria de todos os dias e conselhos valiosos que levarei para a vida.

À Jéssica pela amizade, por toda ajuda prestada e pelas inúmeras correções que me guiaram para a finalização deste trabalho.

À Gabi por toda ajuda laboratorial para o desenvolvimento deste trabalho, pelo incentivo em não me deixar desistir. Além da agradável amizade descoberta neste período.

À minha querida amiga Tati, que teve participação em cada etapa deste trabalho, sendo fundamental para que estivesse hoje pronto e concluído. Tive uma excelente companheira de trabalho, da qual sentirei muita falta, uma verdadeira amiga que tive o prazer de ter ao meu lado por esses anos em SP. Muito obrigada pelo apoio e incentivo nos momentos mais difíceis, jamais esquecerei tudo o que fez por mim.

Aos meus colegas de laboratório Chrystian, Chary, Thaís, Alan, Juliana e Vanessa pela convivência.

À Dra. Débora, Dra. Vânia e Dr. Dagoberto pelos valiosos conselhos durante a qualificação.

À Pós-graduação da Neurologia, por me acolher.

Agradeço a FAPESP (2010/20457-7) e ao CNPq pelos auxílios concedidos e a FAPESP pela bolsa de estudo concedida (2009/16995-6) que foram fundamentais para a realização deste projeto.

“Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós.”

Chico Xavier

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS.....	I
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	IV
ABSTRACT	VI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Esclerose lateral amiotrófica	1
1.2. Mutação da SOD1	1
1.3. Modelo animal.....	2
1.4. Neurônios motores	3
1.5. Astrócitos	5
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo Geral	12
2.2. Objetivos Específicos.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. Modelo animal.....	13
3.1.1. Colônias de animais	13
3.1.2. Genotipagem dos Camundongos.....	14
3.2. Culturas primárias de células	15
3.2.1. Cultura de astrócito a partir de camundongo P1	16
3.2.2. Cultura de astrócito a partir do camundongo P60	17
3.3. Análise da pureza das culturas de astrócitos	19
3.3.1. Imunocitoquímica e análise estereológica.....	19
3.3.2. Western Blotting	20
3.3.3. PCR transcriptase reversa (PCR-RT).....	21
3.4. Análise da pureza das culturas de neurônios motores.....	22
3.5. Tratamento dos neurônios com meio condicionado de astrócito	23
3.5.1. Análise do trofismo de neurônios <i>in vitro</i> na presença do meio condicionado de astrócito.....	24
3.5.2. Análise da degeneração neuronal <i>in vitro</i> na presença do meio condicionado de astrócito.....	25
3.6. Sistema de co-cultura neurônio motor/astrócito.....	25
3.6.1. Análise da degeneração neuronal <i>in vitro</i> no sistema de co-cultura neurônio motor/astrócito	26
3.7. Microarray	26
3.8. ELISA Sanduíche	27
3.9. Extração de RNA e realização da PCR quantitativa (qPCR)	28
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5. RESULTADOS	32
5.1. Padronização dos experimentos <i>in vitro</i> e análise de pureza das culturas	32
5.1.1. Culturas de astrócitos P1 e P60	32
5.1.2. Culturas de neurônios motores	34
5.2. Sistema de co-cultura neurônio/astrócito	36
5.3. Tratamento com meio condicionado de astrócitos P1 e P60.....	36
5.3.1. Análise dos prolongamentos neuronais.....	36
5.3.2. Análise da morte neuronal após o tratamento com o meio condicionado de astrócito	37
5.4. Sistema de co-cultura neurônio motor/astrócito P1 e P60	38

5.4.1. Análise da morte neuronal na co-cultura neurônio motor/astrocito	38
5.5. Moléculas analisadas pelo ELISA Sanduíche	39
6. DISCUSSÃO.....	44
6.1 Avanços metodológicos para realização do trabalho	44
6.2 Toxicidade diferencial dos astrócitos em diferentes idades	45
6.3 Moléculas tóxicas secretadas versus exacerbação de processos existentes	47
7. CONCLUSÕES.....	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXO A-	75
ANEXO B-.....	76
ANEXO C-.....	85
ANEXO D-.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ALS	Do inglês, Amyotrophic Lateral Sclerosis
Atg	Astrócito transgênico
Awt	Astrócito <i>wild type</i>
BDNF	Do inglês, Brain-derived neurotrophic factor
BSA	Do inglês, Bovin serum albumin
cDNA	Do inglês, complementary DNA
CGRP	Do inglês, Calcitonin gene related peptide
ChAT	Do inglês, Choline actetyltransferase
CNTF	Do inglês, Ciliary neurotrophic factor
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
DAB	Diaminobenzidina
DMEM	Meio Dulbecco MEM
DNA	Do inglês, Deoxyribonucleic acid
DTT	Ditiotreitol
EBS	Do inglês, Eagle's balanced salt
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELA	Esclerose lateral amiotrófica
ELISA	Do inglês, Enzyme-linked immunosorbent assay
EGF	Do inglês, Epidermal growth factor
EGFR	Do inglês, Epidermal growth factor receptor
ET-1	Endotelina-1
FMUSP	Faculdade de medicina da Univerisade de São Paulo
FADD	Do inglês, Fas-Associated protein with Death Domain
GAPDH	Do inglês, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GDNF	Do inglês, Glial cell line-derived neurotrophic factor
GFAP	Do inglês, Glial Fibrillary Acidic Protein
HBSS	Solução salina balanceada de Hank
hSOD1	Superóxido dismutase 1 humana
Iba-1	Do inglês, Ionized calcium binding adaptor molecule 1
IL	Interleucina
IGF-I	Do inglês, Insulin-like growth fator
iNOS	Do inglês, Inducible nitric oxide synthase
IFN- γ	Interferon gama
mGluRs	Receptores metabotrópicos de glutamato
ml	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nm	Absorbância
nM	Nanomolar
NGF	Do inglês, Nerve growth fator
NGS	Do ingles, Normal Goat Serum
Ntg	Neurônio transgênico
Nwt	Neurônio <i>wild type</i>
NO	Do inglês, Nitric oxide
NOS	Do inglês, Nitric oxide synthase
PBS	Do inglês, Phosphate buffered saline
PCR	Do inglês, Polymerase chain reaction
PCR-RT	Do ingles, Reverse transcription polymerase chain reaction
PDO	Poli D Ornitina

PLL	Poli L Lisina
PVDF	Do inglês, polyvinylidene difluoride
RNA	Do inglês, Ribonucleic acid
ROS	Do inglês, Reactive oxygens species
SDF1	Do inglês, Stromal cell-derived factor-1
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central
SOD1	Superóxido dismutase 1
Spf	Do inglês, specif pathogen free
SUMO	Do inglês, Small Ubiquitin-like Modifier
TBS	Do inglês, Tris-buffered saline
TBS-T	Tampão salino de Tris com Tween 20
Tg	Transgênico
TGF α	Do inglês, Transforming growth factor alpha
TGF- β	Do inglês, Transforming growth factor beta
TNF α	Do inglês, Tumor necrosis factor alpha
TRL	Do inglês, Toll like receptors
UBE2I	Do inglês, Ubiquitin-conjugating enzyme E2I
Wt	Do inglês, <i>Wild type</i>
VEGF	Do inglês, Vascular endothelial growth factor
μ l	Microlitro
μ M	Micromolar
μ g	Micrograma
$^{\circ}$ C	Graus celsius

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Gel de agarose com produto da PCR para verificar o genótipo dos camundongos transgênicos e <i>wild type</i> .	15
Figura 2: Imunocitoquímicas de culturas purificadas de astrócitos P1.	32
Figura 3: Imunocitoquímica da cultura pura de astrócito P60.	33
Figura 4: Quantificação de pureza das culturas de astrócitos P1 e P60.	33
Figura 5: Bandas de proteínas detectadas por Western Blotting em cultura de astrócito P1.	34
Figura 6: Gel de agarose com produto da PCR semi quantitativa da cultura purificada de astrócito P1.	34
Figura 7: Imagens de culturas purificadas de neurônios motores e imunocitoquímica.	35
Figura 8: Quantificação da pureza da cultura de neurônio motor.	35
Figura 9: Imagem de co-cultura neurônio/ astrócito e imunocitoquímica.	36
Figura 10: Gráficos representando as quantificações dos prolongamentos dos neurônios tratados com meio condicionado de astrócitos P1 e P60.	37
Figura 11: Gráficos representando as porcentagens de morte neuronal dos grupos tratados com meio condicionado de astrócitos P1 e P60.	38
Figura 12: Imagem de morte neuronal na co-cultura neurônio motor/astrócito.	38
Figura 13: Gráficos representando as porcentagens de morte neuronal dos grupos de co-cultura neurônios motores/ astrócitos P1 e P60.	39
Figura 14: Gráficos representando as quantificações das moléculas estudadas nos meios condicionados de astrócitos por ELISA Sanduíche.	41
Figura 15: Gráficos representando as quantificações da expressão gênica dos genes estudados nos astrócitos por PCR quantitativo Taqman.	43
Figura 16: Gráficos representando as quantificações da expressão gênica dos genes estudados nos astrócitos por PCR quantitativo SYBR.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências dos iniciadores utilizados na PCR transcriptase-reversa.	22
Tabela 2: Grupos experimentais estudados.	24
Tabela 3: Sequências dos iniciadores dos genes SYBR utilizados na PCR quantitativa.	28

RESUMO

Scorisa, JM. Caracterização celular e molecular da influência do astrócito na degeneração do neurônio motor no modelo *in vitro* da esclerose lateral amiotrófica utilizando camundongos transgênicos para SOD1 humana mutante [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa de caráter progressivo caracterizada pela morte seletiva de neurônios motores que leva rapidamente os pacientes à morte. O camundongo transgênico que expressa a superóxido dismutase 1 humana mutante é o modelo experimental mais aceito para o estudo da doença. Os mecanismos que levam a perda neuronal ainda são pouco conhecidos e não existe tratamento eficaz para prolongar a vida do indivíduo. Estudos recentes indicam que as células gliais aceleram o processo neurodegenerativo, entretanto os mecanismos moleculares ainda não estão estabelecidos. Os astrócitos merecem uma atenção particular, pois apresentam íntima interação com os neurônios, fornecendo suporte estrutural, metabólico e trófico. Além disso, participam ativamente da modulação excitatória neuronal e da neurotransmissão, controlando os níveis extracelulares de íons e neurotransmissores. O presente estudo propôs investigar *in vitro* os possíveis dos astrócitos extraídos da medula espinal do camundongo de idade neonatal (P1) e adulta pré-sintomática (P60) sobre a morte de neurônios motores na ELA. Para isso, o trofismo e sobrevivência do neurônio motor espinal foram avaliados nas culturas de neurônios motores tratados com meio condicionado de astrócitos e também em sistemas de co-culturas neurônios motores/astrócitos, de origem SOD1^{G93A} (transgênica) e selvagem (*wild type*) em diferentes combinações. Investigou-se ainda, a expressão gênica de genes nos astrócitos nas culturas P1 e P60 realizadas através do PCR quantitativo (qPCR) e a quantificação de moléculas secretadas pelos astrócitos por ELISA Sanduíche. Para o estudo do trofismo e degeneração neuronal, as células foram marcadas com marcadores específicos de morte neuronal e o trofismo dos neurônios também foi quantificado por contraste de fase. As células foram quantificadas por métodos estereológicos específicos e as análises mostraram que o tratamento com meio condicionado de astrócitos transgênicos P1 e P60 causaram respectivamente retrações nos prolongamentos e morte dos neurônios transgênicos. As análises da morte neuronal dos meios condicionados e co-cultura mostraram que os astrócitos transgênicos de ambas as idades causaram a morte de neurônios *wild type* e apenas os astrócitos transgênicos P60 levaram os maiores perfis de morte nos neurônios transgênicos, demonstrando a toxicidade dessas células. Quanto à análise da expressão gênica, os genes *NKRF*, *UBE2I* e *TGFA* mostraram-se diferencialmente expressos nos astrócitos transgênicos P1 e os genes *HIPK3*, *TGFA* e *NTF5* diferencialmente expressos nos astrócitos transgênicos P60. Nas análises das moléculas secretadas nos meios condicionados maior quantidade de NGF foi encontrada no meio dos astrócitos transgênicos P60 comparando-se aos astrócitos *wild type*. A quantidade de IGF-I diminuiu no meio condicionado da cultura de astrócitos transgênicos P60 comparando-se aos astrócitos *wild type*. E ainda, há a diminuição autócrina de TNF- α e IL-6 nos astrócitos transgênicos P60. Os astrócitos transgênicos parecem promover a toxicidade ao neurônio motor na ELA e moléculas liberadas pelos astrócitos parecem estar envolvidas no processo de desenvolvimento da ELA.

Descritores: Esclerose amiotrófica lateral; astrócitos; neurônios motores.

ABSTRACT

Scorisa, JM. Astrocytes influence in cellular and molecular characterization in motor neuron degeneration in vitro model of amyotrophic lateral sclerosis using transgenic mice for mutant human SOD1 [Tesis]. São Paulo: Faculty of Medicina, University of São Paulo; 2012.

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by selective motor neurons death that readily leads patients to death. Transgenic mice expressing human mutant superoxide dismutase 1 (hSOD1) is the most accepted experimental model for the disease studying. The mechanisms that lead to neuronal loss are still poorly understood and there is no effective treatment able to prolong the patient's life. Recent studies indicate that glial cells accelerate the neurodegenerative process, but the molecular mechanisms are not yet established. Astrocytes deserve particular attention, since they have close interaction with neurons, providing structural, metabolic and trophic support. In addition, they also participate actively in the neuronal excitatory modulation and in neuronal transmission, controlling ions and neurotransmitters at extracellular levels. The present study aimed to investigate the possible *in vitro* effects in astrocytes on the motor neurons death in ALS from newborn (P1) and adult pre symptomatic (P60) spinal cord mice. Thus, we evaluated spinal motor neuron survival and trophism in cultures treated with astrocytes conditioned medium and also in co-culture neuron/astrocyte systems of SOD1^{G93A} (transgenic) and wild type in different cells combinations. Still, we investigated genes expression related to P1 and P60 astrocytes cultures performed by quantitative PCR (qPCR) and the molecules secreted by astrocytes were quantified by Sandwich ELISA. For the neuronal degeneration and trophism study, cells were immunostained with specific markers and neurons were also visualized by phase contrast. These cells were quantified by stereological method and their analysis showed that treatment with transgenic P1 and P60 astrocytes conditioned medium cause length retractions and death on transgenic motor neuron. But, the neuronal death on conditioned medium and co-cultures experiments showed that transgenic P1 and P60 astrocytes caused wild type neuronal death and only transgenic P60 astrocytes led transgenic neurons death, demonstrating major toxicity of transgenic astrocytes. For the gene expression analysis *NKRF*, *UBE2I* and *TGFα* genes showed differentially expressed in transgenic P1 astrocytes and *HIPK3*, *TGFα* and *NTF5* genes showed differentially expressed in transgenic P60 astrocytes. The analyzes of molecules secreted by conditioned media a larger amount of NGF was found in transgenic P60 astrocytes comparing to wild type astrocytes. The amount of IGF-I in the conditioned medium was reduced in astrocytes transgenic P60 cultures compared to the wild type astrocytes. Also, there is a reduction autocrine of TNF-α and IL-6 on transgenic astrocytes P60. The transgenic astrocytes seem to promote motor neuron toxicity in ALS and molecules released by astrocytes appear to be involved in the ALS development.

Descriptors: Amyotrophic lateral sclerosis; astrocytes; motor neuron.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Esclerose lateral amiotrófica

A Esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença neurológica de caráter degenerativo, que se caracteriza pela perda progressiva dos neurônios motores e leva o paciente à morte em 3 a 5 anos. O início dos sintomas clínicos geralmente apresenta-se entre os 50 e 60 anos, podendo também ocorrer em adultos jovens. Os principais sintomas incluem a fraqueza muscular, a atrofia, a espasticidade e a paralisia, estes que refletem a degeneração progressiva dos neurônios motores. A progressão da doença é rápida e leva à denervação dos músculos respiratórios, causando a morte dos pacientes (Van Den Bosch e Robberecht, 2008; Naganska e Matyja, 2011). A incidência de casos anuais novos da doença é 1-2/100.000 indivíduos e é mais frequente em homens do que mulheres (Huisman et al., 2011). A fisiopatologia da doença não está completamente esclarecida e, portanto, não há tratamento efetivo no combate da mesma.

A primeira descrição da ELA foi realizada por Jean-Martin Charcot em 1869, como uma doença progressiva que acomete neurônios motores superiores e inferiores. A ELA é classificada em duas formas. A forma esporádica que está presente em aproximadamente 90% dos casos e a forma familiar, em geral autossômica dominante, que representa apenas 10% dos casos da doença. A mutação no gene Cu/Zn superóxido dismutase 1 (SOD1) ocorre em aproximadamente 20% dos casos familiares, sendo que já foram descritas até o momento mais de 150 mutações relacionadas à SOD1 (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>). Ambas as formas apresentam patogênese similar e são indistinguíveis clinicamente (Pratt et al., 2012).

A identificação dos locis cromossômicos dos casos de ELA familiar definiu 12 subtipos chamados de ELA1 a ELA12. A ELA associada à demência frontotemporal, que caracteriza-se pela degeneração do lobo frontotemporal e aquela associada à doença de Parkinson também são expressões clínicas das formas familiares. Todos os tipos apresentam em comum o acometimento dos neurônios motores (Volonté et al., 2011).

1.2. Mutação da SOD1

A enzima citosólica SOD1 apresenta localização sub-celular, próximo ao retículo endoplasmático, e é constituída por 153 aminoácidos (~16kDa) (Milani et al.,

2011). Esta enzima não covalente age como um homodímero capaz de converter o superóxido em água e peróxido de hidrogênio e tem sua atividade enzimática dependente dos íons cobre (Cu^{+2}) e zinco (Zn^{+2}) (Redler e Dokholyan, 2012). Por catalizar a dismutação do superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$), a enzima protege as células contra possíveis efeitos deletérios daquelas espécies reativas, elas que quando não neutralizadas, promovem danos no DNA e nas proteínas intracelulares diversas. O Zn^{+2} é o responsável pelo sítio ativo e pelo posicionamento correto do Cu^{+2} , o qual atua diretamente no processo de dismutação (Furukawa e O'Halloran, 2006).

As primeiras mutações no gene da SOD1 na ELA familiar foram identificadas por Rosen e colaboradores em 1993, sendo estas um marco no estudo da doença. Estas mutações podem ocorrer em qualquer posição da estrutura do gene SOD1. A descoberta da mutação gênica da SOD1 no cromossomo 21q22.1 ajudou na compreensão do mecanismo de patogênese da doença e também no entendimento do perfil genético das mutações desse gene (Bruijn et al., 2004; Boillée et al., 2006).

O estudo de Takeuchi e colaboradores (2002) mostrou através de experimentos *in vitro* que a localização da SOD1 humana (hSOD1) mutante na mitocôndria desencadeou a liberação do citocromo c mitocondrial seguido pela ativação da cascata das caspases e indução da morte neuronal sem a formação de agregados citoplasmáticos. Estes resultados mostram que a localização da hSOD1 mutante na mitocôndria é evento crítico na patogênese da ELA.

Camundongos *knockout* para SOD1 mostraram que a toxicidade não ocorre devido à perda ou à diminuição de função da enzima, mas sim ao ganho de propriedades tóxicas pela presença da molécula mutante (Reaume et al., 1996). As observações levaram à hipótese atualmente aceita de que a mutação SOD1 adquire propriedades tóxicas independente da sua atividade enzimática intrínseca.

1.3. Modelo animal

A descoberta de mutações genéticas em pacientes com ELA criou a oportunidade para o desenvolvimento dos modelos animais que apresentam sintomas similares aos observados na doença humana.

Há mais de 10 linhagens de camundongos estabelecidas até o presente, sendo que o modelo mais utilizado é aquele que contém cópias do gene da hSOD1 mutante, com substituição da glicina pela alanina na posição 93 da cadeia de aminoácidos

(SOD1^{G93A}), seguida pelas linhagens SOD1^{G85R} e SOD1^{G37R} (Neusch et al., 2007). A linhagem de camundongos transgênicos SOD1^{G93A} apresenta início precoce da doença e progressão rápida do quadro, sendo que os sintomas motores, como tremor e fraqueza dos membros posteriores, iniciam-se por volta de 90 dias de idade e progridem até o estágio final da doença por volta de 130-150 dias de vida do animal (Gurney et al, 1994; Shibata, 2001). Alves e colaboradores (2011) mostraram alterações comportamentais precoces nos animais SOD1^{G93A}, como foi o caso da fraqueza da cauda já a partir de 5 semanas e alterações eletrofisiológicas no nervo isquiático em 3 semanas de vida.

Os camundongos *knockout* para o gene da SOD1 não reproduzem os sintomas da ELA e os que apresentam o hSOD1 mutante, como no modelo SOD1^{G93A}, desenvolvem seu quadro clínico e patológico do tipo neurodegeneração progressiva do neurônio motor e grave. Essas observações suportam a hipótese de ganho de propriedades tóxicas pela presença da mutação da SOD1 nas células nervosas motoras, porém este mecanismo é altamente complexo, principalmente pelo envolvimento das células não neuronais (Nagai et al., 2008; Furukawa, 2012). De fato, os modelos de animais geneticamente modificados existentes para o estudo da ELA têm possibilitado o detalhamento de tais mecanismos.

A linhagem SOD1^{G93A} escolhida para o desenvolvimento do presente estudo, esta utilizada amplamente em trabalhos sobre ELA, é empregada na avaliação das hipóteses mais aceitas sobre a patogenia da doença como o estresse oxidativo, a excitotoxicidade pelo glutamato, a formação de agregados protéicos, o processo neuro-inflamatório, a disfunção mitocondrial, os defeitos no transporte axonal, a ativação da apoptose e, sobretudo, a participação das células não neuronais nestes processos (Jaiswal e Keller, 2008; Cheroni et al., 2008; Dobrowolny et al., 2011). O modelo da SOD1^{G93A} é também empregado nas avaliações das intervenções terapêuticas *in vivo* (Shibata, 2001).

1.4. Neurônios motores

Os neurônios motores apresentam vulnerabilidade seletiva na ELA, sendo esta uma característica marcante da doença. A razão dos neurônios motores serem susceptíveis à presença de mutações que afetem proteínas ubiquitinadas, como mutações da SOD1, não é algo compreendido completamente (Shaw e Eggett, 2000).

Sabe-se que o desenvolvimento da doença em modelos animais depende da expressão de SOD1 mutante. Fatores secundários à mutação da SOD1 estão relacionados à toxicidade do neurônio motor, como as formações de inclusões citoplasmáticas com acúmulo de SOD1, Hsp70, neurofilamentos e ubiquitina (Clement et al., 2003; Bruijn et al., 2004; De Vos et al., 2007). A diminuição localizada do transportador de glutamato EAAT2 no corno anterior da medula de animais transgênicos também foi referida, tanto que coincide com o fenômeno da gliose nesta área que, de fato, aparece antes da degeneração do neurônio motor e do seu axônio (Howland et al., 2002). A disfunção mitocondrial também está envolvida na morte do neurônio motor, evento este amplamente relacionado também à toxicidade na ELA. A organela apresenta-se dilatada e vacuolizada nos neurônios motores nas formas esporádicas e familiares antes do aparecimento dos sintomas (Hirano, 1991). Ainda, estudo em camundongos transgênicos SOD1^{G93A} mostrou a redução no transporte de organelas ligadas à membrana, tanto na direção anterógrada quanto retrógrada (Howland et al., 2002). O transporte mitocondrial é seletivamente reduzido na direção anterógrada levando, possivelmente, ao defeito na sinalização neuromotora (De Vos et al., 2007).

A morte do neurônio motor na ELA foi abordado recentemente como parte da sinalização parácrina das células não neuronais. Clement e colaboradores (2003) utilizaram camundongos quiméricos formados pela mistura de células normais (não transgênicas) e células SOD1 transgênicas. A perda dos neurônios motores nesses animais não foi uniforme, havendo aumento da sobrevivência neuronal nos locais de maiores populações de células gliais não transgênicas. Ainda, alguns neurônios não transgênicos acumularam inclusões de ubiquitina em seus pericários, evento este freqüente na doença, quando próximos de células não neuronais mutantes. Estas observações, portanto, indicaram a contribuição da sinalização de células não neuronais para o processo de morte do neurônio motor na ELA. De fato, o envolvimento de mais de um tipo celular (neurônio, astrócito e microglia) é necessário para a evolução da doença (Ferraiolo et al., 2011). No entanto, a presença de neurônios transgênicos é fundamental para evolução da neurodegeneração (Gong et al., 2000; Lino et al., 2002).

1.5. Astrócitos

As células gliais fazem parte do Sistema Nervoso e dentre suas diversas funções destacam-se o auxílio no suporte e as ações no funcionamento do sistema nervoso central (SNC). A microglia é a célula glial que desempenha o papel imunomodulador no SNC (Ling et al., 1973). Quando há lesão no tecido nervoso, ocorrem ativação e proliferação microglial com subsequente secreção de citocinas, prostaglandinas e outras substâncias que participam do processo inflamatório (Kreutzberg et al., 1996; Hanisch et al., 2002).

A ativação microglial foi observada em tecidos *pós mortem* de pacientes com ELA, indicando a presença de uma cascata de eventos inflamatórios mediados por estas células durante o curso da neurodegeneração na doença (Kawamata et al., 1992). Essa ativação microglial já foi descrita como ocorrência histológica precoce que ocorre cerca de 60 dias após o nascimento do animal que carrega a mutação da SOD1 (Troost et al., 1993; Alexianu et al., 2001; Weydt et al., 2003; Boillee et al., 2006). Outro estudo demonstrou a presença de fatores solúveis pró-inflamatórios no fluido cérebrospinal de pacientes com ELA sendo que, muito possivelmente, esses fatores foram secretados pela microglia ativada (Almer et al., 2002). Ainda, daqueles pacientes com ELA a maior a severidade da doença foi correlacionada a maior quantidade de líquido cefalorraquidiano (Keizman et al., 2009).

Os astrócitos são as células gliais encontradas em maior quantidade no SNC, tendo importância no suporte trófico, metabólico e estrutural dos neurônios (Ricci et al., 2009). A interação entre os astrócitos e os neurônios em situações fisiológicas é conhecida de longa data (Ramón e Cajal, 1899), entretanto os seus detalhes ainda precisam ser esclarecidos (Carmignoto, 2000). Essas células expressam diversas citocinas e fatores neurotróficos que podem interferir no metabolismo e na sobrevivência neuronal (Ransom e Ransom, 2012). Além disso, estas moléculas regulam a sinalização sináptica e podem também apresentar influência sobre o desenvolvimento das células neuronais precursoras do SNC (Seifert et al., 2006). Quando o SNC sofre uma lesão, os astrócitos tornam-se reativos, estado no qual a célula deflagra mecanismos de neuroproteção (Araque et al., 2001). Subsequentemente, os astrócitos participam da formação da cicatriz glial que é necessária para resolução

da lesão, formação aquela que também prejudica o crescimento axonal e a regeneração plena do SNC (Karimi-Abdolrezaee e Billakanti, 2012).

A reatividade dos astrócitos é fenômeno presente nas patologias neurológicas do SNC, incluindo as lesões traumáticas, as isquemias, os tumores, as doenças infecciosas e neuroinflamatórias e as desordens neurodegenerativas. As mudanças que ocorrem nos astrócitos reativos é vasta e inclui hipertrofia da célula, aumento da expressão da proteína fibrilar glial ácida (GFAP). Alteração na expressão e na atividade do transportador de glutamato, da glutamina sintetase, das efrinas e seus receptores, da aquaporina-4 (AQP4) e dos canais de potássio são ocorrências observadas no astrócito reativo (Araque et al., 2001). Por sua vez, aumento da produção de moléculas inflamatórias como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interferon- γ , interleucina-6 (IL-6) e espécies reativas de oxigênio (ROS) são características dos astrócitos reativos em resposta ao estado de lesão neuronal (Wagoner et al., 1999; Lau e Yu, 2001; Moreau et al., 2005; Murai e Pasquale 2011; Agulhon et al., 2012).

Destaca-se então que a desregulação dos mecanismos da interação neurônio-glia pode influenciar diretamente a integridade dos neurônios motores, contribuindo para a fisiopatologia da ELA. De fato, estudos recentes sugerem que, em determinadas situações, as células gliais podem contribuir para o dano neuronal na ELA por tornar o ambiente tóxico aos mesmos (Bruijn et al., 2004). Descreve-se que a presença da SOD1 mutante nas células gliais é decisiva para a evolução da ELA. No SNC adulto, essas células atuam em processos fisiológicos neuronais diversos, como na modulação da neurotransmissão, na produção de fatores neurotróficos e na manutenção e desenvolvimento da vida da célula, além dos eventos de neuroplasticidade, e o envelhecimento neuronal (Neush et al., 2007). Essas células ainda apresentam papéis importantes nas respostas neuroimunomodulatórias e nos eventos neurodegenerativos de reparo e cicatrização (Morgenstern et al., 2002; Rhodes et al., 2003).

Os astrócitos que mostraram-se notavelmente reativos no corno anterior da medula espinal e produzem quantidades aumentadas de moléculas relacionadas à inflamação na ELA, como é o caso da proteína ligada ao cálcio S100 β , da ciclo oxigenase-2 (COX-2) e do óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Crosio et al., 2011). Ainda, os astrócitos reativos secretam mediadores pró-apoptóticos como o fator de crescimento do nervo (NGF) ou ligante Fas e produzem óxido nítrico (NO) e

peroxinitrito (ONOO), estas que presentes antes do aparecimento dos sintomas iniciais causam danos mitocondriais nos neurônios motores (Barbeito et al., 2004; Schiffer e Fiamò, 2004). Em pacientes com ELA e camundongos SOD1^{G93A} foram observados astrócitos com inclusões contendo agregados ricos em SOD1, sendo que a quantidade de inclusões nestas células aumenta com a evolução da doença (Bruijn et al., 1997; Hall et al., 1998). As inclusões astrocitárias aparecem antes mesmo daquelas vistas nos neurônios das regiões comprometidas do camundongo transgênico e a quantidade destas formações é 10 vezes maior nos astrócitos, denotando que esta célula é altamente sensível à presença da SOD1 mutante (Bruijn et al., 1997). Alguns mecanismos tóxicos relacionados à presença da proteína mutante no astrócito incluem a inibição do proteossoma e alterações no retículo endoplasmático da célula (Kikuchi et al., 2006), comprometendo os processos normais de degradação protéica intracelular, com posterior formação de agregados, alteração no transporte intracelular e desregulação das vias intracelulares de sinalização (Bruijn et al., 1998; Johnston et al., 2000).

Disto posto, o estudo da interação neurônio/astrócito em muitas doenças neurodegenerativas, como a ELA, nas quais a causa primária da doença não está bem esclarecida, é fundamental para a compreensão da fisiopatogênia da doença. Os astrócitos se destacam não somente por serem células responsáveis pela homeostase e pelo suporte trófico dos neurônios no SNC, mas também por contribuírem com o processo neurodegenerativo através da liberação de citocinas pró-inflamatórias e apresentando perdas de funções normais ou ganhos de funções anormais (Araque et al., 2001; Seifert et al., 2006; Allaman et al., 2011).

Nagai e colaboradores (2007) analisaram as interações neurônio motor/ astrócito em sistema de co-cultura utilizando camundongos SOD1^{G93A} e mostraram aumento da morte neuronal quando os astrócitos transgênicos eram co-cultivados com neurônios transgênicos. Já o efeito dos astrócitos não transgênicos não diferiu dos astrócitos de camundongos normais na sobrevivência do neurônio motor. Ainda, os autores observaram a diminuição do número de neurônios quando estes eram tratados com meio condicionado de astrócito transgênico, o que não ocorria quando eles eram tratados com o meio condicionado de astrócito não transgênico, evidenciando assim o papel tóxico destas células na ELA.

Sabe-se que o transportador de glutamato EAAT2/GLT-1 dos astrócitos retira o excesso do neurotransmissor da fenda sináptica, prevenindo assim a ocorrência do evento excitotóxico. Notavelmente, a diminuição e a disfunção nesse transportador nos astrócitos foram correlacionadas com o aumento de glutamato e ativação de seus receptores AMPA no corno anterior da medula espinhal dos camundongos SOD1^{G93A} e dos pacientes com ELA (Rothstein 2005; Howland et al., 2002). Assim, os eventos acima corroboram para o estado de excitotoxicidade aos quais os neurônios motores estão submetidos na ELA (Tortarolo et al., 2004; Pratt et al., 2012).

Aumento dos receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) mGluR1 α , mGluR5 e mGluR2/3 nos astrócitos reativos é descrito na medula espinal de pacientes com ELA esporádica e familiar, sendo este um dos substratos para a excitotoxicidade na ELA (Niswender e Conn, 2010).

Neste contexto, drogas que aumentam a recaptação de glutamato na fenda sináptica foram utilizadas no intuito de retardar a progressão dos sintomas de pacientes com ELA. Tais tentativas, porém, não mostraram efeitos clínicos relevantes (Stevenson et al., 2009; Gilbson e Bronberg 2012). Por outro lado, a ceftriaxona, que aumenta a atividade do receptor EAAT2, promoveu o aumento na sobrevivência do animal SOD1^{G93A} (Rothstein et al., 2005), denotando que os mecanismos exatos da morte do neurônio motor ainda são desconhecidos.

O aumento da sinalização para os receptores metabotrópicos pode levar também à expressão maior de variantes de *splicing* NOS nos astrócitos da medula espinal de pacientes com ELA (Hensley et al., 2006). A reação do NO com o superóxido forma o peroxinitrito e, conseqüentemente, a nitração das proteínas transportadoras de glutamato (Barbeito et al., 2004).

O astrócito pode contribuir ainda com a excitotoxicidade na ELA pelo aumento na liberação de glutamato através das mudanças inflamatórias que ocorrem nestas células (Blanc et al., 1998; Sica 2012). Quando estão reativos, os astrócitos expressam a COX-2, enzima que cataliza a síntese de prostanglandina E2 e estimula a liberação de glutamato. O tratamento de camundongos com inibidor de COX-2 atrasou o início da doença e aumentou a sobrevivência dos camundongos, o que coloca os astrócitos no centro dos processos de inflamação e excitotoxicidade, estes já descritos como fenômenos participantes da doença (Volterra et al., 1994; Drachman et al., 2002).

Adicionalmente a isto, a ativação dos mGluRs II estimula a liberação de TGF β , o qual inibe a COX2 neuronal (Seifert et al., 2006).

Os mecanismos da toxicidade glial, em particular no astrócito, são possivelmente mediados por moléculas secretadas por estas células ou por modificações na sinalização intracelular nelas com reflexo na comunicação neurônio-glial. Há várias maneiras as quais tais alterações da comunicação astrócito/ neurônio motor podem levar à toxicidade neuronal, como é o caso da inflamação, dos eventos relacionados à adesão, da toxicidade glutamatérgica, do trofismo parácrino astrocitário, entre outros. Então, tais moléculas são secretadas pelos astrócitos em condições normais e também patológicas sendo que algumas delas foram selecionadas para o estudo nesse trabalho.

Dentre todas as moléculas secretadas pelos astrócitos algumas se destacam. No SNC, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) está relacionado com a angiogênese, permeabilidade vascular e proliferação glial e recentemente foram relatadas outras funções como neuroproteção e neurogênese (Yasuhara et al, 2004). Outro fator que estimula o crescimento e a proliferação celular agindo durante o desenvolvimento e neurodegeneração é o fator de crescimento insulínico (IGF-I) (Corbo et al., 2010). Assim como as endotelinas (ET) que são responsáveis pelo tônus vascular cerebral e produzida por células endoteliais, neurônios e astrócitos em situações funcionais, por outro lado, quando em níveis altos, elas podem levar à ativação dos astrócitos e, assim, participar dos eventos neurodegenerativos (Hung et al., 2012).

Os astrócitos reativos produzem e liberam quantidades aumentadas de alguns fatores neurotróficos, incluindo, o fator de crescimento do nervo (NGF) (Küst et al., 2002). O NGF foi a primeira neurotrofina a ser descoberta e, posteriormente, caracterizada com papel anti-apoptótico durante o desenvolvimento neuronal (Colafrancesco e Villoslada, 2011). O NGF que também age nos neurônios maduros e particularmente em células nervosas lesadas ou em degeneração (Lindvall et al., 1994; Tuszynski e Gage, 1995; Lykissas et al., 2007). A atividade biológica do NGF é regulada por dois tipos diferentes de receptores: A saber, o receptor de alta afinidade NGF (TrkA), que pertence à família dos receptores tirosina quinase e ativa a via da MAP quinase e o receptor de baixa afinidade NGF (p75), uma glicoproteína de transmembrana com falta do domínio tirosina quinase (Meakin e Shooter, 1992;

Casaccia-Bonnet et al., 1999). Quando há a reatividade astrocitária, o NGF produz efeito tóxico potente por induzir a expressão do receptor p75 e a morte dos neurônios motores (Pehar et al., 2004; Turner et al., 2004; Vargas et al., 2004).

Sabe-se que o TNF- α produzido pelos neurônios pode induzir a expressão de NGF nas células gliais. Além disso, a potente citocina inflamatória TNF- α , quando sintetizada pelos neurônios, pode rapidamente atrair células imunes como macrófagos e micróglia e deste modo, ser o mediador glial dos processos neurodegenerativos (Heese et al., 1998; Takei e Laskey 2008).

Dentre as várias resultantes da sinalização do TNF- α já descritas (para revisão ver McCoy e Tansey, 2008), o controle da liberação de glutamato na fenda pré-sináptica e respostas aos receptores glutamatérgicos AMPA pós-sinápticos (Steinmetz e Turrigiano 2010) são potencialmente importantes na participação da citocina na patogênese da ELA. De fato, o aumento de TNF- α foi reportado no líquido de pacientes com ELA e parece estar relacionado à progressão da doença (Moreau et al., 2005; Cereda et al., 2008).

O TNF- α produzido pelo astrócito é capaz de regular a expressão de outra citocina, a interleucina-6 (IL-6) nestas células (Sawada et al., 1992 and Chiang et al., 1994). A IL-6 é a citocina mais abundante no SNC saudável e o astrócito é o maior produtor dessa citocina (Gruol e Nelson, 1997; Erta et al., 2012). De fato, o TNF- α e a IL-6 podem se regular uma a outra, positiva ou negativamente de modo em que as vias de sinalização subcelular e intercelular são mobilizadas (Al-Shanti et al., 2008). O aumento de IL-6 na medula espinal de camundongos SOD1^{G93A} e também no líquido e soro de pacientes com ELA já foram reportados (Moreau et al., 2005; Terenghi et al., 2006), denotando a importância da citocina na patogênese da doença. As observações descritas acima apontam a participação da desregulação dos mecanismos de sinalização mediado por citocinas na toxicidade astrocitária na ELA.

Deste modo, as alterações morfológicas e funcionais das células não neurais, em particular os astrócitos, parecem intervir com o processo da morte neuronal na ELA, e o conhecimento dos mecanismos relacionado se faz necessário. Este trabalho detalhou os efeitos tóxicos dos astrócitos sobre os neurônios motores no modelo experimental da ELA através de experimentos quantitativos *in vitro* e avaliou a participação de alguns genes e moléculas secretadas potencialmente envolvidas nesse processo. Para o

delineamento das vias possivelmente envolvidas, este estudo fundamentou-se nos achados das análises das expressões gênicas em larga escala feitas por experimentos de microarray realizados no laboratório a partir de tecido da medula espinal de camundongos SOD1^{G93A}.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência dos astrócitos na morte dos neurônios motores em sistemas *in vitro* de culturas de neurônios motores e co-culturas de neurônios motores/astrócitos, células obtidas da medula espinal dos camundongos transgênicos SOD1^{G93A} e não-transgênicos (*wild type*). Neste contexto, estudar *in vitro* a expressão de genes e a secreção de moléculas diferenciais pelos astrócitos obtidos da medula espinal de animal neonato (P1) e adulto jovem (P60) na fase pré-sintomática da doença.

2.2. Objetivos Específicos

- Adequar a metodologia para a obtenção de culturas altamente purificadas de neurônios motores e astrócitos da medula espinal de camundongos transgênicos e *wild type* em P1;
- Avaliar a influência das moléculas secretadas no meio condicionado de astrócitos transgênicos e *wild type* (P1 e P60) no trofismo dos neurônios motores transgênicos e *wild type*, através da quantificação de prolongamentos neuronais e da morte neuronal, utilizando métodos estereológicos específicos;
- Avaliar a influência dos astrócitos transgênicos e *wild type* (P1 e P60) co-cultivados com neurônios motores transgênicos e *wild type* através da quantificação da morte neuronal;
- Quantificar moléculas potencialmente envolvidas na patogênese da ELA, indicadas pelos experimentos de *microarray*, no meio condicionado de astrócitos transgênicos e *wild type* (P1 e P60) utilizando-sea técnica do ELISA sanduíche;
- Quantificar e expressão gênica de genes potencialmente envolvidos na patogênese da ELA que foram indicadas pelos experimentos de *microarray*, nos astrócitos transgênicos e *wild type* (P1 e P60), através da técnica de PCR quantitativo (qPCR).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelas Comissões de Ética e de Biossegurança em Organismos Geneticamente Modificados da Faculdade de Medicina/Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (Aprovação número: 0113/08- ANEXO A).

3.1. Modelo animal

Camundongos transgênicos B6SJL-TgN(SOD1^{G93A})1 Gur que expressam o gene mutante G93A para hSOD1, originalmente produzidos por Gurney e colaboradores (1994), foram obtidos do Laboratório Jackson (Bar Harbor, ME, USA). Estes animais são largamente utilizados como modelo experimental para o estudo da ELA (Miana-Mena et al., 2005).

3.1.1. Colônias de animais

As colônias de camundongos transgênicos SOD1^{G93A} foram estabelecidas no Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). A reprodução e o alojamento dos animais são realizados em ambiente *specif pathogen free* (*spf*) para garantir a estabilidade das colônias, controle sobre a reprodução e homogeneidade fenotípica entre os animais. Este procedimento foi realizado por técnicos especializados do Biotério Central da FMUSP. O regime *spf* compreende gaiolas ventiladas com filtros especiais, bem como a manipulação dos camundongos e suas proles em regime estéril dentro de câmara de fluxo laminar. Temperatura ambiente controlada entre 21 e 22°C, umidade do ar em torno de 55% e iluminação sob ciclo claro/escuro com fase de 12 horas em cada ciclo. Ainda, a ração, a água e a maravalha são autoclavadas antes da utilização. Para verificar a não contaminação da colônia por agentes patogênicos, os animais são periodicamente submetidos a controles bacteriológicos e parasitológicos segundo a rotina *spf* estabelecida no Biotério da FMUSP. A identidade genética dos animais foi obtida por testes de genotipagem realizados pelos alunos do laboratório.

Os cruzamentos foram realizados entre machos heterozigotos SOD1^{G93A} com fêmeas da linhagem B6/SJL-F1, com o intuito de gerar uma prole aproximadamente 50% heterozigota SOD1^{G93A} (transgênica) e 50% *wild type* (selvagem), segundo orientações do Laboratório Jackson que nos forneceram as matrizes para o estabelecimento das colônias. Os casais foram mantidos com suas respectivas proles

até 30 dias de idade quando, então, foram separados por sexo e por genótipo. Os animais transgênicos foram utilizados como experimentais e os não transgênicos como controles.

3.1.2. Genotipagem dos Camundongos

A identificação dos camundongos transgênicos ou *wild type* utilizados nos experimentos foi realizada através da genotipagem. O primeiro passo constituiu na extração de amostras de DNA de cada um dos animais a partir de fragmento da cauda. O procedimento de extração de DNA seguiu o protocolo a seguir 500µl de tampão contendo 1mg/ml de proteinase K, 20mM TrisHCl (pH 8,0), 10mM NaCl, 30mM EDTA (pH8,0) e 0,5% SDS (Sigma) que foram adicionados a cada amostra individual da cauda. As amostras foram incubadas a 60°C e agitadas 1.400 r.p.m no Thermomixer (Eppendorf) por 1 hora. Após a diluição completa da cauda, as amostras foram centrifugadas a 146000x g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos contendo 500µl de isopropanol gelado e misturados suavemente, oscilando o tubo até o aparecimento do precipitado. As amostras foram centrifugadas a 14.000 r.p.m por 10 minutos e os sobrenadantes desprezados. Os tubos foram lavados por duas vezes com 500µl de etanol 70%. Após uma centrifugação final de 14.000 r.p.m por 5 minutos, os sobrenadantes foram descartados e os tubos deixados secar em posição invertida por 15 minutos. Após a secagem do precipitado de DNA foi adicionado a cada tubo 200µl de tampão TE contendo 10mM Tris-HCl (pH 7,4), 1mM EDTA e água deionizada. As amostras de DNA foram armazenadas à 4°C até a realização da genotipagem por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Os iniciadores utilizados para realização da PCR foram: IMR113 (5' ATCAGCCCTAATCCATCTGA-3') e IMR114 (5'CGCGACTAACAATCAAAGTGA-3') foram utilizados para amplificação de um fragmento da hSOD1 (236 pares de bases) e IMR042 (5'CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3') e IMR043 (5'GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-3') para amplificação de um fragmento da interleucina-2 de murino (324 pares de bases) como controle positivo, de acordo com as recomendações descritas pelo Laboratório Jackson (http://jaxmice.jax.org/publicgi/protocols/protocols.sh?objtype=protocol&protocol_id=523). A reação de PCR inclui os primers citados acima e contem para cada amostra 12,5µl PCR Master Mix (2X) (Fermentas Life Sciences), 500nM de cada iniciador, 100ng de DNA e água livre

de nucleotídeos para o volume final de 25µl. A reação compreendeu um período inicial de 3 minutos à 95°C, seguidos por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, que se repetiam por 35 ciclos, além de um período de 2 minutos à 72°C com um resfriamento até 10°C. Os produtos das reações das PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo, visualizados por exposição à luz ultravioleta (Figura 1).

Figura 1. Imagem das bandas obtidas por PCR e visualizadas em gel de agarose para determinação do genótipo dos animais, transgênico (tg) e *wild type* (wt), para a enzima hSOD1. O marcador (M) da PCR aparece na coluna da esquerda. Para o animal tg (coluna do centro) observa-se a presença da banda de 236 pares de bases correspondente à SOD1 humana mutante e da banda de 324 pares de bases correspondente à interleucina-2, o gene constitutivo usado como controle. Nos animais wt (coluna da direita) observa-se apenas a presença do fragmento de 324 pares de bases, correspondente ao gene controle.

3.2. Culturas primárias de células

As culturas primárias de neurônios motores e astrócitos foram obtidas a partir das medulas espinais de camundongos de um dia de vida (P1) transgênicos e *wild type* segundo protocolos publicados e modificados em nosso laboratório. Além disso, a cultura de astrócitos também foi obtida a partir da medula espinal de animais adultos jovens de 60 dias de vida (P60) transgênicos e *wild type*, período em que já existe ativação astrogliar e que precedem os primeiros sintomas clínicos da doença (Troost et al., 1993; Alexianu et al., 2001; Weydt et al., 2003; Alves et al., 2011).

A grande maioria dos estudos em ELA cultiva neurônios a partir da medula espinal de animais em idades embrionárias devido à dificuldade de cultivo a partir do tecido do animal após o nascimento. Entretanto, nosso grupo conseguiu bons resultados com a obtenção destas células do animal neonato P1, após adaptação do protocolo

(Scorisa et al., 2010). Os animais neonatos foram decaptados no seu primeiro dia de vida e imersos em solução de etanol 70% por cerca de 2 minutos para assepsia da superfície corpórea, a região lombar da medula espinal foi exposta e removida com tesouras previamente esterilizadas. Posteriormente, a dura-máter e vasos sanguíneos foram retirados do segmento da medula espinal, com o auxílio de pinças microcirúrgicas sem danificar o tecido e então foi colocada em tubos esterilizados e submetida aos protocolos descritos a seguir.

3.2.1. Cultura de astrócito a partir de camundongo P1

As medulas espinais foram retiradas conforme descrito acima e a obtenção de culturas de astrócitos dos camundongos transgênicos e *wild type* P1 foi reproduzida a partir de uma cultura mista de células gliais (Silva et al., 1998; Nagai et al., 2007). As medulas espinais dos animais P1 foram retiradas e mantidas em Solução salina balanceada de Hank (HBSS- Life technologies). No fluxo laminar foram lavados novamente com HBSS os fragmentos medulares e transferidos para um tubo contendo HBSS. As medulas foram trituradas primeiramente por pipeta Pasteur e posteriormente por uma seringa com uma agulha 19G. Após não serem mais visíveis os fragmentos medulares, o conteúdo foi centrifugado a 700x g por 5 minutos. O precipitado foi ressuspensionado em DMEM acrescido com 10% de soro fetal bovino (SFB/Gibco), 100U/ml (Gibco) de penicilina e estreptomicina (D-10). As células foram então plaqueadas em placas de 12 poços com lamínulas de vidro previamente tratadas com poli-L-lisina (PLL) e mantidas à 37°C em incubadora de CO₂ à 5%. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias sendo que a cultura atingiu a confluência no 14º dia. A cultura não estava purificada até aquele período, sendo ainda, uma cultura mista de células gliais. Após a confluência, as placas foram então, centrifugadas à 200 r.p.m por 18 horas, processo de destacamento das microglias amebóides que permaneceram suspensas no meio de cultura.. O meio glial foi então retirado e DMEM puro foi adicionado no poço para eliminação do soro. As células gliais foram então tripsinizados com uma solução de tripsina (0,06%) na presença de EDTA (0,25mM) e Ca⁺² (0,25mM). Para que as microglias ramificadas permaneceram fixas à placa, enquanto que os astrócitos passaram a estar suspensos na solução de tripsina. Assim, a solução contendo os astrócitos foi coletada e colocada em outra placa com lamínulas de vidro previamente tratadas com PLL. O mesmo volume de DMEM com SFB foi

adicionado para bloquear o processo de tripsinização e, assim, as células aderiram nas lamínulas.

3.2.2. Cultura de astrócito a partir do camundongo P60

Os procedimentos para a cultura de astrócitos a partir da medula espinal P60 foram reproduzidos conforme descrito por Marriott et al., (1996) e modificado pelo nosso grupo. Grupos de 3-5 animais transgênicos e *wild type* P60 foram perfundidos com solução salina. As medulas espinais foram removidas e suas meninges e vasos sanguíneos retirados com auxílio de pinças finas previamente esterilizadas. Em seguida, o tecido foi transferido para um tubo com solução salina balanceada de Earle (*Earle's balanced salt solution*; Sigma). Posteriormente, em fluxo laminar, esta solução foi trocada por uma nova solução de DMEM e os fragmentos medulares foram cortados com o auxílio de uma tesoura e colocados em tubos onde foram triturados com uma pipeta Pasteur e com uma seringa acoplada à agulha 19G. As medulas que estavam já completamente dissolvidas na solução foram então centrifugadas à 700x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em DMEM suplementado com 0,1mg/ml de l-valina, 10% SFB e 100µ/ml de penicilina e estreptomicina. As células foram plaqueadas em placas de 6 poços previamente tratadas por 1 hora com PLL e mantidas à 37°C em incubadora de CO₂ à 5%. Ao atingirem a confluência em 3 semanas, as placas de 6 poços foram centrifugadas à 200 r.p.m por 18 horas em temperatura ambiente para eliminação das microglias amebóides. Em seguida, o DMEM puro foi adicionado às culturas para eliminação do soro e os astrócitos foram tripsinizados com uma solução de tripsina (0,06%) na presença de EDTA 0,25mM e Ca⁺² (0,25mM). Após essa etapa, as microglias ramificadas permaneceram fixas à placa e os astrócitos passaram a ficar suspensos na solução de tripsina. A suspensão contendo as células foram colocadas em outra placa de 12 poços contendo lamínulas pré-tratadas com PLL onde foi adicionado o mesmo volume de DMEM com SFB para interromper o processo de tripsinização. Os astrócitos foram, então, mantidos nessas placas por cerca de 2 semanas até atingirem a confluência.

3.2.3. Cultura de neurônios motores a partir de camundongos P1

As culturas de neurônios motores da medula espinal de camundongos transgênicos e *wild type* foram obtidas a partir do protocolo descrito por Henderson et al. (1996), posteriormente adaptado pelo pesquisador Bradley Turner da Universidade de Melbourne (Austrália) e gentilmente cedido para nós. Ainda, foram realizadas algumas modificações e adequações do protocolo no laboratório, principalmente em relação ao cultivo dessas células de animais transgênicos e *wild type* P1.

A medula espinal dissecada foi colocada em solução tampão fosfato (PBS) e transferida para um tubo contendo PBS e tripsina na concentração final 0,025% (Gibco) e colocado em banho-maria à 37°C por 5 minutos e depois mais 5 minutos sob leve agitação. Em seguida, a medula espinal foi colocada em um novo tubo contendo 400µl do meio Leibovitz-15 (L-15, Gibco), 50µl de albumina soro bovina (BSA) 4% (Sigma) e 50µl de DNase (Sigma) na concentração de 1mg/ml, o frasco foi então agitado manualmente e o tecido ressuspensionado com pipeta. Alguns pequenos fragmentos que restavam do material foram então colocados em outro tubo com 450µl de L-15, 50µl de BSA 4% e 10µl de DNase na concentração de 1mg/ml. Os fragmentos de tecidos foram ressuspensionados, denucleados e colocados juntos em seus respectivos tubos e transferidos cuidadosamente para tubos já contendo 1ml de BSA 4%. O material foi submetido à centrifugação de 5 minutos à 350x g e após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e o precipitado ressuspensionado em 1ml de L-15 e transferido para um novo tubo contendo 1ml de 3,7% de gradiente de densidade Optiprep (Sigma) diluído em Tricina, uma interface rosada foi formada e o material foi então centrifugado a 700x g por 15 minutos sem breque. Após a centrifugação os neurônios motores estavam localizados na banda turva da interface e foram coletados com a ajuda de uma pipeta Pasteur. As células foram colocadas em um novo tubo e centrifugadas a 700x g por 5 minutos e a seguir foram depositadas em placa com 24 poços e lamínula de vidro, previamente tratada com Poli-L-D-Ornitina (25µg/ml, Sigma) e laminina (25µg/ml, Sigma). Foi possível obter cerca de 10^5 células a partir de cada medula espinal. As células foram cultivadas com meio Neurobasal A suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina, 2% de soro de cavalo, 0,5mM de L-glutamina, 25µM de 2-mercaptoethanol, 10ng/ml de fator neurotrófico ciliar (CNTF), 10ng/ml de fator

neurotrófico derivado da glia (GDNF) todos adquiridos da Sigma e suplementado B27 da Gibco.

3.3. Análise da pureza das culturas de astrócitos

A pureza das culturas primárias de astrócitos foi detalhadamente estudada através de metodologias distintas, porém complementares. Assim, marcações imunocitoquímicas seguidas por quantificação estereológica, o western blotting e PCR semi quantitativo (PCR-RT).

3.3.1. Imunocitoquímica e análise estereológica

A imunocitoquímica de dupla marcação foi realizada nas culturas de astrócitos. As células plaqueadas nas lamínulas foram marcadas com o anticorpo contra a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), que está presente apenas nos astrócitos. Anticorpo cálcio ionizado ligado ao adaptador de molécula I (Iba-I), é uma proteína exclusiva de microglia. Após, diferenciação dos dois perfis celulares presentes puderam ser quantificados. O procedimento da imunocitoquímica iniciou-se com a remoção do meio de cultivo e a fixação das células em paraformaldeído 4% em temperatura ambiente por 30 minutos, seguida de uma lavagem com PBS por 5 minutos. Em seguida, uma solução de Triton 1% diluída em PBS foi adicionada por 10 minutos, seguida por duas lavagens de 5 minutos, a primeira com uma solução composta por PBS e Tween 20 (0,02%) e a segunda com uma solução de PBS, Tween 20 (0,02%) e BSA (1%). Após essas lavagens, bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com PBS, soro normal de cabra (2%), BSA (4%) e Triton (0,2%) por 30 minutos em temperatura ambiente. O anticorpo anti-Iba-1 feito em coelho (Wako) diluído 1:350 em PBS foi incubado à 4°C por 18 horas. Após esse período, 3 lavagens de PBS foram realizadas e o anticorpo secundário biotinilado anti-coelho, feito em cabra IgG (Vector) e diluído 1:250 em PBS foi incubado em temperatura ambiente por 60 minutos. Após esta incubação, o anticorpo secundário foi removido com 3 lavagens de 5 minutos de PBS e Avidina e Biotina (Vector) foram acrescentadas e diluídas em PBS na concentração 1:125 por 50 minutos. A reação imunocitoquímica foi realizada com 0,03% de diaminobenzidina (DAB) e 2,5% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para reação de peroxidase. A reação foi finalizada com lavagem da lamínula em solução trizma base (pH 7,4). Esta reação

cromogênica conferiu coloração marrom ao tipo celular específico com cada um dos anticorpos primários.

Em seguida, 3 lavagens de 10 minutos em PBS foram realizadas e um novo bloqueio foi feito com solução de PBS contendo NGS (2%), BSA (4%), Triton (0,2%) por 30 minutos em temperatura ambiente. Depois desta etapa o anticorpo anti-GFAP feito em cabra foi incubado diluído 1:300 em PBS por 18 horas a 4°C. Após esse período 3 lavagens de PBS foram realizadas e o anticorpo secundário biotinilado anti-cabra feito em coelho (Vector) diluído 1:250 em PBS foi incubado em temperatura ambiente por 60 minutos. Após esta incubação, o anticorpo secundário foi removido com 3 lavagens de 5 minutos de PBS e Avidina e Biotina (Vector) foram acrescentadas diluídas 1:125 em PBS por 50 minutos. A reação imunocitoquímica para GFAP foi realizada com 0,05% 4-cloro-naftol e 2,5% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para reação de peroxidase. Esta reação cromogênica conferiu coloração azulada aos tipos celulares de interesse. As lamínulas foram montadas com solução de glicerol em PBS e as imagens foram capturadas em microscópio (Olympus AX-70).

Na próxima etapa, preparados contendo as imunomarcações de duas cores foram submetidas a quantificação dos tipos específicos de células através da metodologia estereológica. Para isso 9 imagens equidistantes de cada lamínula foram capturadas em um aumento de 20 vezes. Uma moldura de contagem formada por 216 pontos foi sobreposta às imagens coletadas e todas as células imunomarcadas com GFAP e Iba-1 que atingiram os pontos da moldura foram contadas. Assim foi possível estimar o número médio de células de cada perfil presentes na cultura e calcular a porcentagem de pureza com base na razão entre o número de células marcadas com GFAP pela soma do número de células marcadas com GFAP e Iba-1.

3.3.2. Western Blotting

Para a extração de proteínas e realização do Western Blotting nas culturas astrocitárias, as células foram lavadas com PBS por 5 minutos e depois o tampão de lise composto por DTT (Sigma) e 10µg/ml coquetel inibidor de proteases (Sigma) foi adicionado aos poços de cultivo das células. As células foram destacadas da superfície da placa com o auxílio de um raspador de células, que então ficaram soltas no tampão de lise. O homogenado foi transferido para um tubo de plástico e mantido à 100°C por

10 minutos em banho-maria. A quantidade de proteína presente no tampão foi quantificada através do método de Bradford (1976).

Para quantificação da expressão de GFAP, marcador de astrócitos, e Iba1, marcador de microglia, nas culturas de astrócitos foram utilizados respectivamente 20µg e 60µg de proteína. As proteínas foram submetidas à eletroforese de 100V durante 60 minutos em gel de poliacrilamida (10%) contendo SDS (dodecil sulfato de sódio). Como controle, foi colocado no gel proteína extraída de cultura purificada de microglia. Após a eletroforese, as proteínas presentes no gel foram transferidas para membranas de PVDF sob voltagem constante de 100V por 60 minutos. As membranas com as proteínas foram bloqueadas em solução contendo leite (10%) e tampão de Tris contendo 0,05% Tween 20 (TBS-T) por 15 minutos sob leve agitação à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas à 4°C por um período de 18 a 24 horas com leite a 3% em TBS-T contendo o anticorpo anti-GFAP na concentração de 1:20.000 ou o anticorpo anti-Iba1 na concentração 1:1.000. No dia seguinte, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho conjugado a HRP na concentração de 1:10.000 diluído em TBS-T com leite (3%) por 1 hora. Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram lavadas por duas vezes com TBS-T e uma vez com tampão TBS por 10 minutos cada. A reação quimioluminescente foi realizada com o kit ECL (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, Perkinelmer, EUA) por 2 minutos. As membranas foram expostas aos filmes fotográficos sensíveis a quimioluminescência (Hyperfilm ECL, AmerSham Biosciences) pelo período de 30 segundos e revelados de acordo com as recomendações do fabricante do filme.

3.3.3. PCR transcriptase reversa (PCR-RT)

O RNA das células foi extraído com método do Trizol (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Brevemente, as células foram lisadas em 500µl de solução de Trizol, ao qual foi adicionado 200µl de clorofórmio. Após agitação, a solução foi incubada à temperatura ambiente durante 5 minutos, seguidos de centrifugação à 12.000x g durante 15 minutos em centrífuga refrigerada (4°C). A fase aquosa foi transferida para outro tubo para precipitação do RNA em 500µl de isopropanol. Para aumentar a eficiência da precipitação, a solução foi incubada durante 18 horas à -80°C. Após este período, o RNA foi descongelado sobre gelo e então

incubado durante 10 minutos à temperatura ambiente. A solução foi centrifugada a 13.000x g por 30 minutos à 4°C para coleta do RNA. O precipitado foi lavado com etanol 75% e novamente centrifugado com 1.500x g por 5 minutos à 4°C. Após a remoção do etanol e secagem por 15 minutos, o RNA foi eluído em 50µl de água livre de nucleotídeos. Para a realização da reação de transcrição reversa já com amplificação dos genes de interesse o *Kit Ready-to-go PCR beads* (GE healthcare) foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante. Para cada reação 1µg de RNA total foi utilizado. As sequências utilizadas para os iniciadores podem ser encontradas na Tabela 1. O gene constitutivo gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH) foi escolhido como controle endógeno. O protocolo de ciclagem foi 5 minutos à 94°C, seguidos de 40 ciclos de 3 segundos à 94°C, 60 segundos à 60°C para anelamento dos iniciadores e 90 segundo à 72°C para extensão, finalizando com 7 minutos a 72°C. Os produtos das PCRs foram analisados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo sob exposição à luz ultravioleta.

Tabela 1: Sequências de iniciadores utilizados na PCR transcriptase reversa específica para astrócito (GFAP), microglia (CD11b) e controle (GAPDH) foram obtidas pelo *GenBank*.

Genes	Iniciador avanço 5'-3'	Iniciador retrocesso 5'-3'
GFAP	GCA GAG ATG ATG GAG CTC AAT GAC C	GTT TCA TCC TGG AGC TTC TGC CTC A
CD11b	ATG GAC GCT GAT GGC AAT ACC	TCC CCA TTC ACG TCT CCA
GAPDH	CCA AGG TCA TCC ATG ACA AC	GCT TCA CCA CCT TCT TGA TG

3.4. Análise da pureza das culturas de neurônios motores

A pureza da cultura primária de neurônio motor foi avaliada por análise estereológica de marcações imunocitoquímicas para neurônios motores. Para identificação dos neurônios motores na cultura o anticorpo colina acetiltransferase (ChAT) foi utilizado. Resumidamente, as culturas plaqueadas em lamínulas foram lavadas por 5 minutos com PBS para retirada do meio de cultura, depois foram incubadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos e lavadas com PBS novamente. Após essa etapa, a solução de PBS contendo 1% de triton foi incubada por 10 minutos, depois PBS contendo 0,02% de Tween 20 foi incubado por 5 minutos e para finalizar a

permeabilização uma solução de PBS contendo 0,02% Twenn 20 e 1% BSA foi colocada por 5 minutos. O bloqueio das marcações inespecíficas foi realizado com uma solução de PBS contendo 2% NGS, 4% BSA, 0,2% triton por 30 minutos em temperatura ambiente.

O anticorpo primário contra a ChAT (Millipore) foi utilizado na concentração de 1:1.500, diluído em PBS contendo 0,2% Triton, 1% NGS e 2% BSA incubados por 24 horas. As células nas laminulas foram lavadas 3 vezes com PBS por 5 minutos e incubadas com anticorpo secundário específico ao hospedeiro do anticorpo primário e conjugado a um fluoróforo Texas Red (Jackson). O controle negativo foi realizado pela omissão do anticorpo primário da incubação. As lamínulas foram montadas em lâminas utilizando meio de contagem contendo DAPI (Vector).

Logo após o término dos produtos de imunomarcação, seis imagens de cada lamínula (n=3) foram fotografadas em microscópio de fluorescência (Olympus AX70) e as células ChAT positivas e ChAT negativas (apenas marcadas com DAPI) foram contadas. O grau de pureza das culturas foi obtido através da razão entre o número de células ChAT positivas pelo número total de células.

3.5. Tratamento dos neurônios com meio condicionado de astrócito

Os meios condicionados das culturas de astrócitos transgênicos e *wild type* de P1 e P60 foram mantidos nas culturas por 4 dias. Então, os meios foram coletados e centrifugados a 700x g por 5 minutos para eliminação das células em suspensão. O sobrenadante foi coletado e congelado. Antes do uso, os meios condicionados foram suplementados com penicilina/estreptomicina e com 10ng/ml de cada um dos fatores neurotróficos CNTF e GDNF (Nagai et al., 2007).

As culturas purificadas de neurônios motores foram obtidas de animais transgênicos e *wild type* como descrito no tópico 3.2.3. Vinte por cento do meio das culturas dos neurônios foi substituído pelo meio condicionado das culturas de astrócitos obtidos de animais transgênicos e *wild type* de P1 e P60 perante os 5 dias de cultura. O tratamento das culturas de neurônios foi realizado de acordo com a Tabela 2:

Tabela 2: Grupos experimentais estudados na co-cultura e no tratamento de neurônio wild type (wt) ou transgênico (tg) com o meio condicionado de astrócitos wt ou tg (n=3).

	Astrócito wt	Astrócito tg
Neurônio (wt)	P1	P1
	P60	P60
Neurônio (tg)	P1	P1
	P60	P60

3.5.1. Análise do trofismo de neurônios *in vitro* na presença do meio condicionado de astrócito

As culturas contendo os neurônios derivados dos animais transgênicos e *wild type* tratados com meio condicionado de astrócitos transgênicos e *wild type* de P1 e P60 foram acompanhadas por 6 dias após o plaqueamento (n=3). As culturas foram fotografadas no pré e 5º dia de tratamento em microscópio invertido com objetiva de 20 vezes em 6 campos da placa equidistantes entre si, sendo o primeiro campo obtido de um ponto aleatório no quadrante superior esquerdo da placa.

A área dos prolongamentos neuronais foi determinada em cada animal utilizando ferramenta esterológica específica segundo procedimento de rotina no laboratório (Gomide e Chadi, 1999). Após o procedimento de coleta, as imagens foram transferidas para o computador e sobrepostas a uma moldura de contagem estereológica formada por 675 pontos com área definida de $4,9 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ foi sobreposta às imagens coletadas dos 6 campos da placa. Todos os prolongamentos neuronais dos neurônios que atingiam os pontos da moldura foram contados. Este procedimento foi realizado em todos os campos. Os resultados foram obtidos a partir da quantificação da fração de área (Aa) que é a somatória de pontos dos prolongamentos (Σpr) divididos pelo total de pontos da moldura ($Aa = \Sigma\text{pr} / \text{total pontos}$) de cada imagem obtida pela estereologia. Os resultados do 5º dia de tratamento foram expressos como porcentagem em relação aos resultados obtidos no pré-tratamento com meio condicionado. A partir disso foi possível obter uma visão geral sobre o crescimento dos prolongamentos dos neurônios tratados em relação aquele período que não receberam tratamento. A média e o erro padrão dos grupos foram calculados.

3.5.2. Análise da degeneração neuronal *in vitro* na presença do meio condicionado de astrócito

A degeneração dos neurônios motores da cultura foi estudada através da marcação do Fluoro-Jade C (Millipore), um marcador que emite fluorescência quando ligado à neurônios que estão em processo de morte. As culturas foram avaliadas ao final do 5º dia de tratamento com meio condicionado de astrócitos transgênicos e *wild type* P1 e P60 (n=3). Os poços de neurônios motores transgênicos e *wild type* submetidos aos tratamentos com meios condicionados de astrócitos foram lavados por 5 minutos com PBS e fixados com paraformaldeído 4%. Após a fixação, os poços foram novamente lavados com PBS por 5 minutos e as células permeabilizadas com 0,2% triton diluído em PBS. O Fluoro-Jade C foi incubado por 30 minutos na concentração de 0,0001%. Após esse período, as células foram lavadas no escuro com água destilada por 3 vezes de cinco minutos e depois foram montadas em lâminas com Montex contendo DAPI (Vector). De cada lâmina 6 imagens equidistantes entre si foram obtidas sob microscópio de fluorescência (Olympus AX70) no aumento de 20 vezes. Depois desta etapa, as células em degeneração (marcadas em verde) e os núcleos totais das células presentes, marcados com DAPI, foram quantificados pelo método estereológico utilizando uma moldura de 432 pontos com distância de $30\mu\text{m}^2$ sobreposta as imagens fotografadas em microscópio de fluorescência sob o aumento de 20x. Os corpos celulares marcados em verde indicavam o processo de neurodegeneração e foram contados, assim como todos os núcleos celulares, marcados em azul com DAPI. Assim, os corpos celulares marcados foram expressos pela quantidade de núcleos, resultando na porcentagem de células em degeneração existente em cada imagem. A média e o erro padrão dos grupos foram calculados.

3.6. Sistema de co-cultura neurônio motor/astrócito

Para os experimentos de co-culturas, os astrócitos P1 e P60 e os neurônios motores foram cultivados e purificados como descrito no item 3.2. Um dia após realização das culturas de neurônios motores, os astrócitos foram tripsinizados das placas, coletados e centrifugados a $700\times g$ por 5 minutos. Em seguida, os astrócitos foram ressuspensos em DMEM contendo 10% de SFB e contados no microscópio. 5×10^4 astrócitos foram plaqueados sobre os neurônios motores. No dia seguinte, o meio de cultivo foi trocado e assim foi mantida a troca a cada 2 dias. A partir desse dia, as

co-culturas foram mantidas por 5 dias quando, então, realizou-se os procedimentos de marcações citológicas e quantificação.

3.6.1. Análise da degeneração neuronal *in vitro* no sistema de co-cultura neurônio motor/astrocito

As mesmas combinações de grupos experimentais que foram realizadas para o experimento do meio condicionado também foram realizadas nas co-culturas (Tabela 2). As lamínulas com as co-culturas foram imunomarcadas com Fluoro-Jade C, conforme descrito anteriormente, tornando possível observar neurônios em degeneração. Para análise da degeneração neuronal, 6 imagens equidistantes no aumento de 20 vezes foram capturadas em microscópio (Olympus AX70). Depois desta etapa análise estereológica quantitativa foi realizada para as células em degeneração (marcadas em verde) e os núcleos totais das células presentes, marcadas com DAPI. Moldura de contagem de 432 pontos, com área por pontos de $30\mu\text{m}^2$ foi utilizada. Os pontos que se sobrepunham aos núcleos das células e as células em degeneração foram contados. Assim, quantificar a morte dos neurônios motores foi possível em cada grupo. Uma média aritmética das imagens foi realizada e calculada a porcentagem dos núcleos celulares saudáveis com as células em degeneração.

3.7. Microarray

O experimento de *microarray* avaliou a expressão gênica de animais SOD1^{G93A} transgênicos e *wild type* nas idades pré-sintomáticas de 40 e 80 dias. A plataforma utilizada continha 44.000 genes correspondentes ao genoma completo do camundongo. Os resultados obtidos foram analisados segundo aspectos funcionais desses genes que foram diferencialmente expressos. Através da ferramenta DAVID foi possível organizar os dados segundo as famílias de genes, funções moleculares, processos biológicos, componente celular, classe da proteína, vias de sinalização e relação em doenças neurodegenerativas.

Um longo estudo foi realizado objetivando a eleição dos genes alterados que estivessem relacionados aos astrócitos e que pudessem ser responsáveis pelo desencadeamento da morte do neurônio motor. Para isso, foi levada em consideração a diferença de expressão do transgênico em relação ao *wild type* (fold relativo), a importância do gene para a sinalização parácrina na sobrevivência neuronal, funções

moleculares, processos biológicos, via de sinalização, relevância na literatura e contextualização como astrócitos.

A análise da literatura indicou algumas moléculas solúveis secretadas pelos astrócitos que pudessem ser quantificadas no meio condicionado e objetos deste estudo (ANEXO C e D).

3.8. ELISA Sanduíche

A análise da literatura indicou algumas moléculas solúveis secretadas pelos astrócitos que pudessem ser quantificadas no meio condicionado (Anexo C);

A quantificação das moléculas secretadas nos meios condicionados das culturas de astrócitos foi realizada pela técnica do ELISA Sanduíche utilizando kits comerciais. As moléculas investigadas foram: NGF (Chemicon), endotelina-1, IGF-I (Uscn) e foi utilizado um kit Multiplex (Millipore) para IL-6, TNF α e VEGF.

Após condicionamento dos meios por 4 dias, os mesmos foram coletados, centrifugados e armazenados em alíquotas de 100 e 200 μ l e estocadas a -80 °C até sua utilização (n=4).

As amostras, os calibradores e a curva de diluição foram incubados em poços pré-sensibilizados com o antígeno por um período de 4 a 24 horas dependendo das instruções dos kits. Depois desta etapa, lavagens foram realizadas para remover anticorpos não ligados e os poços foram incubados com o conjugado enzimático para amplificação da leitura por um período de 1 hora. Em seguida, incubou-se o substrato TMB, que reage com o conjugado enzimático e produz uma cor. Essa cor foi medida no espectrofotômetro, onde foi determinada a densidade óptica de cada poço, mensurando na absorbância $\lambda=450\text{nm}$ (BioTek). As leituras foram dadas a partir das curvas de diluições seriadas com concentrações conhecidas e dos poços preparados com o anticorpo em questão de cada kit, os dados foram expressos em pg/ μ l.

As moléculas quantificadas pelo Multiplex foram observadas através de quimioluminescência, onde anticorpos específicos presentes na placa foram conjugados com microesferas de cores diferentes. As amostras e os padrões foram incubados nos poços junto com o mix de microesferas coloridas e em seguida, os anticorpos de detecção biotinilados foram adicionados. Assim, cada anticorpo de detecção específico se ligou as microesferas correspondentes. A amplificação do sinal foi realizada

adicionando o conjugado Estreptoavidina-ficoeritrina que se ligou ao anticorpo biotinilado e emitiu um sinal fluorescente lido no aparelho Luminex. Todos os dados foram expressos em pg/ml.

Para controle da validação de todas as placas, foram realizados dois padrões com concentrações conhecidas (um acima da concentração e outro abaixo) que foram lidos e comparados com os valores da curva.

3.9. Extração de RNA e realização da PCR quantitativa (qPCR)

Os RNAs das culturas de astrócitos transgênicos e *wild type* foram extraídos pelo método do Trizol conforme descrito anteriormente. A quantificação do RNA foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop 1.000 (Thermo) e a integridade do RNA foi avaliada utilizando o kit Nano6000 Bionalyzer (Agilent). Após essa etapa 1.000ng de RNA total foram submetidos à reação de transcrição reversa utilizando-se o kit RT-transcription reagents (Applied Biosystems), que utiliza a enzima Multiscribe como transcriptase, de acordo com as recomendações do fabricante. A reação foi incubada em termociclador por 10 minutos a 25 °C seguidos de 30 minutos a 42°C, e por último 5 minutos a 70 °C, após essa etapa o cDNA foi armazenado no freezer -20 °C.

A descrição dos genes de interesse estudados e escolhidos a partir do *microarray* (Anexo D) foram avaliados pelos métodos Taqman e SYBR. Os genes *AKAP13* (Mm01320098_m1), *HIPK3* (Mm01278553_g1), *NKRF* (Mm01297400_m1) e *UBE2I* (Mm04243971_g1) foram avaliados pelo método Taqman. Enquanto que os genes *NTF5* e *TGFA* foram estudados pelo método SYBR. As sequências dos iniciadores utilizados para os experimentos SYBR estão descritos na Tabela 3:

Tabela 3: Sequências de iniciadores dos genes avaliados pelo método SYBR.

Genes	Iniciador avanço 5'-3'	Iniciador retrocesso 5'-3'	Amplificado (pb)	Eficiência (%)
NTF5	GCACTGGCTCTCAGAATGCAA	CCCGCACATAGGACTGCTTA	44	102,58
TGFA	GGAACCTGCCGGTTTTTGG	CACCCACGTACCCAGAGTG	67	100,37
GAPDH	CGGCACAGTCAAGGC	CCGGCCTTCTCCATG	156	92,30

O gene GAPDH foi utilizado como controle endógeno tanto para o SYBR quanto para o Taqman (Mm99999915_g1) uma vez que esse gene não mostrou alterações de expressão gênica pela análise do *microarray*. Todas as reações foram realizadas no

aparelho StepOnePlus Real-Time PCR System utilizando placas de 96 poços Fast MicroAmp Optical (Applied Biosystems).

As reações Taqman seguiram conforme as recomendações do fabricante, tendo sido usados 1X TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied biosystems), 1x ensaio a ser avaliado e 60ng cDNA transcrito a partir de 1.000 ng de RNA total. As reações foram realizadas nas condições universais de ciclagem que consiste em 2 minutos a 50°C, seguidos de 10 minutos a 95°C para a ativação da enzima AmpliTaq Gold® DNA polymerase, seguidos de 50 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos e 1 minuto a 60 °C para o pareamento dos iniciadores de sonda e extensão.

As reações SYBR foram realizadas em volume final de 25µl, contendo 1X Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (Fermentas), 400nM ou 800nM de oligonucleotídeos e cDNA convertido a partir de 1.000ng de RNA total.

As reações foram realizadas nas condições universais de ciclagem: 10 minutos a 95°C para a ativação da enzima Maxima® Hot Start Taq DNA Polymerase, seguidos de 50 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos e um minuto a 60°C para o pareamento dos iniciadores e extensão. Ao final da amplificação foi adicionada uma etapa de 20 minutos de duração, na qual a temperatura aumenta gradualmente de 60°C para 95°C a 0,3°C por segundo com a contínua aquisição da fluorescência (Morrison et al., 1998), a partir da qual se obtém uma curva de dissociação, na qual a presença de um pico único confirma a especificidade da amplificação.

Uma vez que a cada ciclo da reação (tanto Taqman quanto SYBR) novas moléculas de fita dupla são formadas, o nível de fluorescência emitida aumenta gradualmente, sendo que quanto menor o ciclo em que a fluorescência atinge um determinado limite, maior é o nível de expressão do transcrito analisado (Morrison et al., 1998). O parâmetro utilizado é o Ct (Cycle Threshold ou ciclo limite), uma linha aleatória fixa na região exponencial das reações e usada para determinar o ciclo em que cada amostra atinge determinado valor de fluorescência (Livak e Schmittgen, 2001). As reações, realizadas em duplicata, aceitaram valores de desvio padrão até 0,5 e foram repetidas quando ultrapassaram esse valor.

Os oligonucleotídeos foram obtidos a partir do banco de dados <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>. Apesar deste banco de dados fornecer tanto a sequência dos iniciadores quanto as temperaturas de anelamento e tamanho do

fragmento, as sequências e tamanhos dos fragmentos foram verificados através do banco de dados para genoma <http://www.ensembl.org/index.html>, e as temperaturas de anelamento foram avaliadas no programa OligoTech versão 1.00 (Copyright© 1995) para identificação de estruturas secundárias e homodímeros.

Para cada par de oligonucleotídeos foram testadas diferentes concentrações (400nM, 800nM e 1000nM), sendo as quantidades ideais padronizadas individualmente. Considerou-se a utilização da menor concentração de oligonucleotídeos, a fim de evitar a formação de estruturas secundárias devido ao seu excesso obtendo-se os menores valores de Cts.

Obtidas as concentrações ideais dos oligonucleotídeos, a eficiência para cada par foi calculada usando cinco diluições seriadas de cDNA convertido de RNA total (100ng, 20ng, 4ng, 0,8ng e 0,16ng). A partir dos resultados, um gráfico relaciona os Cts com o valor das quantidades de cDNA em logaritmo de base 10. O valor correspondente ao coeficiente angular (slope) da equação da reta da curva padrão ($y = ax + b$, $a = \text{slope}$) foi utilizado para cálculo da eficiência da reação (Tabela 3) através da seguinte equação:

$$Ef = 10^{\left(-\frac{1}{\text{slope}}\right)} - 1$$

O uso da amostra calibradora, que é uma amostra comum utilizada em todas as placas, permite a comparação de duas reações independentes para um mesmo gene. Essa amostra é utilizada quando o número de amostras avaliadas é superior ao número de amostras que cabem em uma placa e no caso de haver necessidade de repetições de amostras que eventualmente apresentarem duplicatas ruins (desvio padrão maior do que 0,5).

A expressão diferencial dos transcritos alvo foi determinada pela quantificação relativa em relação à média de GAPDH, uma vez que o experimento do *microarray* não apontou expressão diferencial entre transgênicos e selvagens para este gene em nenhuma das idades analisadas. Para cálculo da medida relativa de expressão foi utilizado o modelo matemático $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram obtidos através da análise de variância (ANOVA) de uma via (*One-Way*), seguido pelo pós-teste de Bonferroni, também foi realizado em alguns casos o teste t, que será relatado no momento da apresentação de cada resultado. Foram

aceitas como variações significativas aquelas em que a diferença entre os grupos resultou em um $p < 0,05$. Os resultados estão apresentados como média aritmética $\pm$ erro padrão da média.

O programa estatístico GraphPad Prism versão 5 foi utilizado como ferramenta para todos os cálculos estatísticos.

5. RESULTADOS

A apresentação dos resultados foi dividida em 4 partes. A primeira parte demonstra as padronizações das culturas celulares e a purificação das culturas de astrócitos e neurônios motores. Na segunda parte, observam-se os resultados obtidos dos experimentos *in vitro* com o tratamento com meio condicionado e a co-cultura neurônio motor/astrócito. Na sequência, o ELISA Sanduíche das moléculas secretadas no meio condicionado dos astrócitos está descrito. Por último, o qPCR dos genes estudados nos astrócitos é apresentado.

5.1. Padronização dos experimentos *in vitro* e análise de pureza das culturas

5.1.2. Culturas de astrócitos P1 e P60

A técnica para a obtenção das culturas de astrócitos P1 e P60 altamente purificadas foi padronizada no laboratório. Alguns protocolos de cultivo de astrócitos foram cuidadosamente estudados e testados (Saura et al., 2007; Nagai et al, 2008). Após modificações e adequações destes protocolos, as culturas puras de astrócitos foram obtidas e foram identificadas através da imunocitoquímica (Figuras 2 e 3). As análises permitiram constatar a pureza do tipo celular de aproximadamente 96% nas culturas de astrócito P1 (Figura 4a) e de 98% para as culturas de astrócitos de P60 (Figura 4b).

Figura 2: Fotomicrografias representativas de imunocitoquímicas de culturas purificadas de astrócitos obtidos da medula espinal de camundongos P1 realizada através do método de imunoperoxidase com diaminobenzidina (a e b). As setas apontam para astrócitos imunomarcados com GFAP em a. A seta indica presença de microglia imunomarcada com o anticorpo específico Iba-1 nas culturas em b. Barra: 20µm.

Figura 3: Fotomicrografia ilustra a cultura purificada de astrócitos obtidos a partir da medula espinal de camundongo selvagem P60. O método de imunoperoxidase de duas cores, empregando diferentes cromógenos, foi utilizado. O 4-chloro-naphthol (coloração azul) e a diaminobenzidina (coloração marrom) foram os cromógenos utilizados na detecção de GFAP e Iba1, respectivamente. A seta aponta para a presença de rara microglia encontrada na cultura. Barra: 20µm.

Figura 4: Os gráficos mostram a pureza das culturas de astrócitos quantificadas por estereologia a partir de imagens imunomarcadas com a GFAP, marcador específico de astrócitos e o Iba-1, marcador específico para microglia. (a) A análise das culturas de astrócitos de camundongos *wild type* P1 indicou aproximadamente 96% de pureza. (b) A análise das culturas de astrócitos de camundongos *wild type* P60 indicando 98% de pureza.

O Western Blotting da GFAP foi realizado nas culturas de astrócitos e do Iba-1 nas culturas de microglia (usada como referência). A marcação da banda de 50kDa, correspondente à proteína GFAP foi intensa, e a marcação para a banda de 17kDa, correspondente à proteína Iba-1 foi fraca nas culturas de astrócitos, sendo que o inverso disto foi observado nas culturas de microglia (Figura 5). Estes resultados indicam a pureza na cultura de astrócitos deste trabalho.

O produto da PCR foi observado no gel de agarose nos experimentos de PCR-RT (Figura 6). A expressão gênica de GFAP foi semelhante àquela observada para GAPDH, enquanto que a marcação de CD11b mostrou-se mais fraca (Figura 6).

Figura 5: Análise da pureza das culturas de astrócitos de camundongos *wild type* P1 e comparação com cultura de microglia de camundongos *wild type* P1 pelo método de Western Blotting. Observa-se a marcação mais intensa da banda de 50kDa, correspondente ao GFAP, nas culturas de astrócitos. Por outro lado, a banda de 17kDa, correspondente à marcação do anti-Iba-1, está fracamente marcada na cultura de astrócitos e fortemente marcada na cultura de microglia.

Figura 6: Imagens representativas das bandas obtidas por PCR-RT e visualizadas em gel de agarose para a verificação da pureza das culturas de astrócitos P1. As PCRs foram realizadas utilizando-se primers de oligonucleotídeos para a GAPDH (308 pares de base) como controle endógeno, para o GFAP (260 pares de base, específico para astrócitos) e para o CD11b (135 pares de base, específico para microglia). Observa-se a marcação da GFAP semelhante à observada para aquela do GAPDH, enquanto que a marcação da banda do CD11b mostrou-se menos evidente.

5.1.3. Culturas de neurônios motores

O desenvolvimento e o crescimento dos neurônios motores, nas culturas obtidas da medula espinal de camundongos *wild type* foram observados pelo contraste de fase (Figura 7a). A presença dos neurônios motores e a pureza das culturas destes neurônios

foram avaliadas pela técnica de imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti- ChAT e o DAPI para a detecção do núcleo das células (Figura 7b).

Figura 7: Fotomicrografias ilustrativas das culturas purificadas de neurônios motores obtidas a partir da medula espinal de camundongos P1 (a,b). Imagem de contraste de fase da cultura mostra os corpos celulares dos neurônios e seus prolongamentos (a). Culturas neuronais imunoreativas ao ChAT confirmam a presença dos neurônios motores na cultura (b). Os núcleos celulares marcados com DAPI são observados em azul. Barra: 20µm.

Nota-se que a grande maioria das células presentes (núcleos DAPI positivos) é ChAT positiva e consequentemente representada por neurônios motores.

A pureza das culturas de neurônios motores foi realizada a partir da quantificação estereológica das células ChAT positivas em relação ao número total de células da cultura que tiveram seus núcleos marcados com DAPI. Esta análise permitiu a verificação do grau de pureza da ordem de 80% nestas culturas (Figura 8).

Figura 8: Gráfico demonstra a presença de 80% de células imunorreativas para a ChAT (ChAT+) e 20% de células desprovidas desta imunorreatividade (ChAT-) na cultura de neurônios motores da medula espinal do camundongo P1. Todas as células tiveram seus núcleos marcados com DAPI. *** $p < 0,001$, segundo o teste-t de Student.

5.2. Sistema de co-cultura neurônio/astrocito

A Figura 9a ilustra, por contraste de fase, a presença de ambos os tipos celulares em co-cultura. Ainda, a Figura 9b ilustra, por imunofluorescência de duas cores, a presença de células imunomarcadas com ChAT (neurônios motores) e GFAP (astrocitos) no 3º dia do cultivo destas células.

Figura 9: Fotomicrografias representativas de co-culturas de neurônios motores e astrócitos retirados de animais $SOD1^{G93A}$ em P60. A co-cultura visualizada por contraste de fase (a) permitiu a observação da presença de dois perfis celulares com morfologias distintas. A imunofluorescência de duas cores (b) permitiu a observação da marcação específica dos neurônios motores ChAT positivos (vermelho) além da marcação específica dos astrócitos GFAP positivos (verde). Barras de escala: 10µm.

5.3. Tratamento com meio condicionado de astrócitos P1 e P60

5.3.1. Análise dos prolongamentos neuronais

A quantificação estereológica das culturas neuronais tratadas com o meio condicionado de astrócitos é apresentada na Figura 10a e 10b. Os tratamentos dos neurônios transgênicos com os meios condicionados dos astrócitos P1 e P60 reduziram em 36,2% e 29,7%, respectivamente, a quantidade de prolongamentos destes neurônios em relação àqueles mantidos em seu meio de cultivo após 5º dia de cultura (Figura 10a e b), de acordo com a análise de variância de uma via *ANOVA*, seguida do pós teste de Bonferroni. Os tratamentos com o meio condicionado dos astrócitos *wild-type* P1 e P60 não foram capazes de promover alterações na quantidade dos prolongamentos dos neurônios de nenhum dos genótipos (Figura 10a e b).

Figura 10: Os gráficos mostram a quantidade de prolongamentos no 5º dia de culturas de neurônios motores de animais *wild-type* (wt) e transgênicos (tg) após os tratamentos com os meios condicionados (MC) de astrócitos da medula espinal de camundongos P1 (a) e P60 (b) expressa em porcentagem dos respectivos valores encontrados imediatamente antes dos tratamentos. Para controle do procedimento, culturas adicionais de neurônios motores de animais wt e tg foram tratadas com meio neuronal, seguindo os mesmos parâmetros daquelas tratadas com MC. Para detalhes do tratamento consultar o texto. Os dados mostraram diferença tanto em P1 quanto em P60. * $p < 0,05$, segundo teste ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni

5.3.2. Análise da morte neuronal após o tratamento com o meio condicionado de astrócito

A quantificação estereológica dos perfis Fluoro-Jade C positivos nos neurônios motores após o tratamento com o meio condicionado de astrócitos está apresentada na Figura 11. Os tratamentos com os meio condicionado dos astrócitos transgênicos P1 e P60 aumentaram em 136% e 62,3%, respectivamente, os perfis de morte nas culturas de neurônios motores de camundongos *wild type* em relação ao tratamento com meio condicionado de astrócitos *wild type* da mesma idade (Figura 11a e b). Quando os os neurônios transgênicos P60 receberam o tratamento do meio condicionado de astrócitos transgênicos, aumento de 25,3% de morte neuronal em relação ao tratamento com meio condicionado dos astrócitos *wild type* da mesma idade foi observado (Figura 11b).

Figura 11: Os gráficos mostram a porcentagem de morte neuronal marcada pelo Fluoro-Jade C no 5º dia de tratamento dos neurônios *wild type* (nwt) e transgênico (ntg) tratados com os diferentes meios condicionados de astrócitos *wild type* e transgênicos, P1 (A) e P60 (B), em relação à morte neuronal observada antes dos tratamentos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, segundo o teste ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni

5.4. Sistema de co-cultura neurônio motor/astrócito P1 e P60

5.4.1. Análise da morte neuronal na co-cultura neurônio motor/astrócito

As culturas de neurônios motores que foram co-cultivadas com astrócitos e submetidas à coloração com marcador de morte neuronal Fluoro-Jade C estão ilustradas na Figura 12.

Figura 12: Fotomicrografia representativa de co-cultura de neurônios motores/astrócitos obtidas de camundongos $SOD1^{G93A}$ submetida à marcação com Fluoro-Jade C. Os neurônios foram retirados da medula espinal do camundongo P1 e os astrócitos, por sua vez, dos animais P60. Os núcleos estão marcados com DAPI (azul) e os neurônios em degeneração marcados com Fluoro-Jade C (verde). Barra: 10 μ m.

O resultado das quantificações da morte de neurônios motores nos sistemas de co-culturas com astrócitos de camundongos *wild type* e transgênicos P1 e P60 estão

demonstradas nas Figura 13a e 13b, respectivamente. Número maior de neurônios em neurodegeneração (perfis Fluoro-Jade C positivos) foi observado nas culturas dos neurônios *wild type* cultivados com astrócitos transgênicos P1 (110%) quando comparado às co-culturas de neurônios *wild type* cultivados com astrócitos *wild type*. Ainda, as culturas de neurônios transgênicos cultivadas com astrócitos transgênicos apresentaram maior morte neuronal quando comparados aos neurônios transgênicos cultivados com astrócitos *wild type* tanto em P1 (56%) quanto em P60 (80,6%).

Figura 13: Os gráficos mostram a porcentagem de morte neuronal após a quantificação dos perfis neuronais Fluoro-Jade C positivos no 5º dia de tratamento dos neurônios *wild type* (wt) e transgênicos (tg) com os diferentes meios condicionados de astrócitos P1 (a) e P60 (b) *wild type* e transgênicos em relação à presença de perfis Fluoro-Jade C positivos antes dos tratamentos. ** $p < 0,001$ segundo o teste ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni

5.5. Moléculas analisadas pelo ELISA Sanduíche

As moléculas endotelina-1, IGF-I, NGF, TNF α , IL-6 e VEGF foram selecionadas para o estudo. As quantidades dessas moléculas nos meios condicionados das culturas astrocitárias de animais *wild type* e transgênicos de idades P1 e P60 foram detectadas pelo ELISA Sanduíche, como mostra o ANEXO C. A seleção das moléculas foi fundamentada pelos resultados do estudo da expressão gênica pelo *microarray* da medula espinal dos camundongos e, também, pela análise da literatura sobre a secreção delas pelos astrócitos.

As análises dos dados foram feitas por ANOVA de uma via. As quantidades da endotelina-1 e do VEGF (Figura 14a e 14f) não demonstraram diferenças significativas entre os grupos. As quantidades de IGF-I no meio condicionado do astrócito

transgênico P60 diminuiu (38%) comparado aos astrócitos *wild type* P60 e aumentou (1.476%) comparado aos astrócitos transgênicos P1. Ainda, a quantidade de IGF-I nos astrócitos *wild type* P60 mostrou-se aumentado (1.870%) quando comparado ao meio condicionado de astrócitos *wild type* P1 (Figura 14b). A quantidade de NGF (Figura 14c) mostrou-se aumentada no meio condicionado dos astrócitos transgênicos P60 (255,3%) quando comparado ao *wild type* de mesma idade e em relação ao transgênico P1 (391,4%). A quantidade de TNF- α (Figura 14d) mostrou-se diminuído no meio condicionado dos astrócitos transgênicos P60 (89,3%) comparado ao *wild type* de mesma idade e também ao transgênico P1 (90,7%). Finalmente a quantidade de IL-6 (Figura 14e) mostrou-se aumentada no meio condicionado dos astrócitos *wild type* P60 (1.068%) quando comparado ao valor do meio condicionado do astrócito *wild type* P1 e no meio condicionado dos astrócitos transgênicos P60 (363%) quando comparado ao astrócito transgênico P1.

Moléculas presentes no MC de astrócitos

Figura 14: Gráficos mostram os resultados de ELISA Sanduíche para os fatores edotelina-1 (a), IGF-I (b), NGF (c), TNFα (d), IL-6 (e) e VEGF (f) realizado nos meios condicionados (MC) dos grupos astrócito *wild type* P1 (wtP1), astrócito transgênico P1 (tgP1), astrócito *wild type* P60 (wtP60) e astrócito transgênico P60 (tgP60).. Os valores são expressos em pg/ml * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ segundo ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Bonferroni.

5.6. Análise de genes indicados pelo *Microarray*

Experimentos de *microarray* realizados a partir do tecido da porção lombar da medula espinal de camundongos transgênicos e *wild type* foram processados em lâminas com 44.000 genes, sendo que 1.318 deles foram diferencialmente expressos ($p < 0,05$) nos camundongos transgênicos com 40 dias e 1.314 deles estiveram diferentemente expressos nos animais transgênicos com 80 dias. A eleição dos genes foi realizada após estudo feito por vários integrantes do laboratório de acordo com o *fold* relativo, ou seja, a diferença de expressão entre o animal transgênico e o *wild type*, e também, a importância desses genes para os astrócitos no contexto da ELA.

As análises foram realizadas pelos sistemas Taqman e SYBR a partir de culturas de astrócitos transgênicos e *wild type* de P1 e P60 como detalhado na metodologia. A expressão dos genes *AKAP13*, *HIPK3*, *UBE2I* e *NKRF* foram avaliados pelo método Taqman, e os genes *TGFA* e *NTF5* foram estudados por SYBR. O teste ANOVA de uma via foi utilizado para análise estatística, porém os genes que não apresentaram diferenças estatísticas pelo ANOVA foram avaliados por teste t.

Diferença de expressão gênica do *AKAP13* não foi detectada nos astrócitos cultivados entre os grupos avaliados (Figura 15a). Com relação ao gene *HIPK3*, aumento da expressão de 446% foi observado nos astrócitos transgênicos P60 quando comparado aos astrócitos *wild type* P60 e aumento de 775% quando comparados aos astrócitos transgênicos P1 (Figura 15b). Aumento (107,9%) na expressão do gene *NKRF* foi observado nos astrócitos transgênicos P1 em comparação a medida feita nos astrócitos *wild type* P1 (Figura 15c). Com relação ao gene *UBE2I*, o ANOVA não mostrou diferença entre os grupos, mas o teste t evidenciou a diminuição da expressão do gene nas culturas de astrócitos transgênicos P1 (60,1%) em relação aos valores encontrados nos astrócitos *wild type* P1 da mesma idade (Figura 15d).

Dos genes estudados por SYBR, o ANOVA de uma via mostrou que houve diminuição da expressão do gene *TGFA* nos astrócitos *wild type* P1 (106%) quando comparado aos valores encontrados nas culturas de astrócitos transgênicos P1 e um aumento da expressão do gene nos astrócitos transgênicos P60 (93%) em comparação aos astrócitos *wild type* da mesma idade (Figura 16a). Adicionalmente, a análise pelo teste t mostrou aumento do *NTF5* (69,4%) nos astrócitos P1 quando comparados aos astrócitos transgênicos P60 (Figura 16b).

Figura 15: Gráficos mostram a expressão dos genes *AKAP13* (a), *HIPK3* (b), *NKRF* (c) e *UBE2I* (d) através da técnica de PCR pelo método de Taqman, nas culturas de astrócitos da medula espinal de camundongos *wild type* em idades P1 e P60 (wtP1/wtP60) e de astrócitos de camundongos transgênico P1 e P60 (tgP1/tgP60). Os valores são expressos em *fold* relativo (a diferença de expressão entre o animal transgênico e o *wild type*). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, segundo ANOVA de uma via e # $p < 0,05$, segundo o teste t.

Figura 16: Gráficos mostram a expressão dos genes *TGFA* (a) e *NTF5* (b) através da técnica de PCR pelo método de SYBR nas culturas de astrócitos da medula espinal de camundongos *wild type* em idades P1 e P60 (wtP1/wtP60) e de astrócitos de camundongos transgênico P1 e P60 (tgP1/tgP60). Os valores são expressos em *fold* relativo (a diferença de expressão entre o animal transgênico e o *wild type*). * $p < 0,05$, segundo ANOVA de uma via e # $p < 0,05$, segundo o teste t.

6. DISCUSSÃO

A paralisia progressiva da ELA é promovida pela degeneração de neurônios motores e evidências sugerem que esse evento seja influenciado por células não neuronais. O estudo de Clement e colaboradores (2003) mostrou a participação das células gliais no desenvolvimento da ELA através da utilização de animais quiméricos. A degeneração dos neurônios motores que expressavam a hSOD1 mutante nesses camundongos foi diminuída quando estavam em contato com as células gliais *wild-type*. Outros trabalhos demonstraram a importância dos astrócitos no desenvolvimento da ELA quando estas células eram obtidas de animais em idade pré natal (Nagai et al., 2007; Di Giorgio et al., 2008) e em idade pós-natal pré-sintomática (Haidet-Phillips et al., 2011).

Assim, para compreender melhor a importância dos astrócitos na morte dos neurônios motores na ELA, este trabalho utilizou sistemas *in vitro* de células de camundongos transgênicos SOD1^{G93A} e *wild type*. O trabalho avaliou a morte neuronal bem como a expressão de genes nas culturas de astrócitos e a presença de moléculas no meio condicionado destas células.

6.1 Avanços metodológicos para realização do trabalho

Os estudos *in vitro* mostraram-se importantes para as pesquisas científicas, sendo possível com eles o estudo de células individualmente ou de grupos celulares específicos integrados. (Nagai et al., 2007; Di Giorgio et al., 2008; Haidet-Phillips et al., 2011).

Este trabalho realizou padronizações para obter maior grau de pureza e viabilidade das culturas de astrócitos e neurônios motores, uma vez que a influência de tipos celulares contaminantes pode invalidar a interpretação correta dos resultados (Saura et al., 2007).

Os trabalhos publicados não descrevem com detalhes o grau da pureza celular das culturas de astrócitos e neurônios (Nagai et al., 2007; Di Giorgio et al., 2008; Haidet-Phillips et al., 2011). Deste modo, os detalhes do cultivo e purificação das culturas de astrócitos de camundongos P1, realizado nas fases iniciais deste estudo, proporcionou a publicação de um artigo metodológico (Scorisa et al., 2010). As culturas de astrócitos de camundongos P1 e P60 foram iniciadas fundamentando-se em

protocolos descritos na literatura, porém, experimentos que comprovassem a pureza das culturas eram omitidos (Nagai et al., 2007; Marriott et al., 1996). O trabalho metodológico de Saura e colaboradores (2007) apresentou procedimentos diferentes para a purificação das culturas de células, permitindo-nos a realização de modificações que chegassem ao grau maior de pureza desejado nas culturas aqui realizadas, os quais foram da da ordem de 96% e 98% para as culturas de astrócitos P1 e P60, respectivamente.

Deste modo, a primeira grande contribuição deste estudo foi o desenvolvimento da metodologia para obtenção de culturas purificadas de astrócitos da medula espinal do camundongo modelo da ELA, bem como a apresentação clara do estudo para demonstração do grau de pureza delas.

O cultivo de neurônios motores empregado nesse trabalho foi padronizado de tecido retirado dos camundongos P1. Os protocolos descritos na literatura utilizam culturas obtidas de animais em fase embrionária (Nagai et al., 2007; Haidet-Phillips et al., 2011). O emprego dos animais neonatos foi um avanço para o estudo da ELA, uma vez que o SNC dos animais já está mais desenvolvido, e principalmente, por ser esta uma doença pós natal. O protocolo adaptado para esse trabalho, que utilizou a separação das células por densidade, possibilitou obtenção de 80% de pureza nas culturas de neurônios motores, valor considerado alto por se tratar de cultura primária de células. Trabalho que utilizou a metodologia de anticorpos para a separação das células reportou 70% de pureza nas culturas de neurônios de animais na fase embrionária (Haastert et al., 2005). Até onde sabemos, não há outros trabalhos na literatura que detalham a especificidade e a pureza das culturas de neurônios motores da medula espinal de camundongos para o estudo *in vitro* da ELA

6.2 Toxicidade diferencial dos astrócitos em diferentes idades

O tratamento das culturas de neurônios motores com o meio condicionado de astrócitos e a co-cultura de neurônios motores/astrócitos possibilitaram a análise da ação dos astrócitos sobre os neurônios motores. A influência dos astrócitos obtidos de animais SOD1^{G93A} com 1 dia de vida (P1) e 60 dias de vida (P60, fase pré-sintomática da doença). De fato, trabalhos já exploram a influência e a toxicidade dos astrócitos obtidos de animais de diferentes idades para o desenvolvimento da ELA (Nagai et al., 2007; Haidet-Phillips et al., 2011).

Os astrócitos das diferentes idades estudados aqui são importantes para compreender momento em que as alterações dessas células surgem, e se essas alterações se comportam da mesma maneira desde a fase neonatal até a idade pré sintomática. A ELA, mesmo sendo uma doença de indivíduos adultos parece envolver alterações celulares diversas e precoces, ou seja em fases não sintomáticas. Assim, o estudo dos astrócitos, localizados próximos dos neurônios motores, é importante para o entendimento do seu envolvimento no desenvolvimento da patologia, uma vez que os neurônios motores são exclusivamente afetados na doença.

Os neurônios motores transgênicos tratados com o meio condicionado de astrócitos transgênicos de camundongos P1 e P60 mostraram diminuição dos prolongamentos, indicando que os astrócitos transgênicos de ambas idades diminuem o trofismo neuronal.

A morte neuronal promovida pela toxicidade dos astrócitos também foi avaliada e os resultados mostraram que o meio condicionado de astrócitos transgênicos contribuíram para a maior morte neuronal. Os resultados sugerem que os astrócitos transgênicos P60 são mais tóxicos do que os P1, pois promoveu o aumento da morte em neurônios transgênicos e *wild type*, enquanto que os astrócitos P1 apenas causaram morte nos neurônios transgênicos. Dados na literatura corroboram com estes resultados, onde tratamento com meio condicionado de astrócitos SOD1^{G93A} (Nagai et al., 2007) ou de pacientes com ELA esporádica e familiar levou ao aumento da morte neuronal quando comparados com astrócitos saudáveis (Haidet-Phillips et al., 2011), evidenciando o papel tóxico do astrócito na patogenia da ELA. Ressalta-se que esta é a primeira vez que a toxicidade do astrócito transgênico na ELA é relacionada à idade do modelo animal doador das células.

Experimentos de co-cultura foram realizados na avaliação da toxicidade ser causada por moléculas secretadas no meio ou pelo contato direto de neurônios motores com astrócitos. Os resultados mostraram que os astrócitos transgênicos P1 causaram morte tanto nos neurônios transgênicos quanto *wild type*. Enquanto que os astrócitos P60 promoveram maior grau de morte apenas nos neurônios transgênicos. Nota-se que o contato entre as células favoreceu a toxidade dos astrócitos P1, porém não podemos descartar a presença de moléculas solúveis secretadas pelos astrócitos agindo no sistema de co-cultura. Os resultados das co-culturas obtidos por Nagai e colaboradores

(2007) corroboram com os achados desse trabalho, acerca dos astrócitos transgênicos P1 causando a morte de neurônios motores independentemente de seu genótipo, entretanto, a análise do efeito do astrócito retirado do animal na fase pré-clínica da doença (P60) é uma contribuição original do nosso estudo. Haidet-Phillips et al. (2011) demonstraram a indução maior da morte dos neurônios motores co-cultivados com astrócitos transgênicos provenientes tanto de camundongos G93A de idade P60 quanto de pacientes com ELA familiar e esporádica. Nossos dados, entretanto, mostraram que a toxicidade astrocitária ocorre já antes do aparecimento dos sinais clínicos.

6.3 Moléculas tóxicas secretadas *versus* exacerbação de processos existentes

Ainda não se sabe exatamente por qual via os astrócitos prejudicam o neurônio motor e colaboram com o processo de degeneração na ELA. Um dos objetivos desse trabalho foi mostrar a importância dos astrócitos e quais moléculas secretadas por eles poderiam colaborar com o processo de neurodegeneração.

Os astrócitos se comunicam com outros astrócitos ou neurônios através da difusão de moléculas no espaço extracelular. Essa comunicação pode ser realizada através do contato célula-célula, mediado por moléculas que formam sua matriz extracelular, como a laminina, fibronectina e proteoglicana (Perea et al., 2005).

Assim, algumas moléculas foram escolhidas para serem estudadas nesse trabalho. Com a ajuda do estudo do *microarray* e a identificação dos genes alterados, foi possível a seleção de algumas moléculas que pudessem também estar alteradas nos astrócitos. A endotelina-1 (ET-1), o IL-6, o IGF-I, o NGF, o TNF α e o VEGF, foram as moléculas escolhidas

O *EDNRA*, gene do receptor para a ET-1, que esteve superexpresso nos resultados do *microarray* nos camundongos transgênicos de 40 dias comparados ao *wild type* foi avaliado neste trabalho. Diferença estatística não houve entre os grupos, demonstrando que aparentemente a ET-1 não tenha relação com os astrócitos na ELA.

A ET-1 é conhecida como moduladora da inflamação, mas pouco se sabe sobre seu possível papel na inflamação do cérebro. Os efeitos deletérios da ET-1 no SNC incluem o distúrbio na homeostase de água e a quebra da integridade da barreira hematoencefálica. No SNC, lesões isquêmicas favorecem a liberação de ET-1 dos astrócitos (Wang et al., 2011). A produção excessiva de NO aparece em processos neuroinflamatórios diversos e em algumas doenças neurodegenerativas que envolvem a

ativação dos astrócitos e causam a morte neuronal. Os mecanismos que envolvem ET-1 e a liberação de NO nos astrócitos permanecem desconhecidos (Koyama e Michinaga, 2012). No estudo de Hung e colaboradores (2012) foi mostrado que a exposição de astrócitos à ET-1 resulta no aumento na iNOS, produção de NO e metaloproteinase de matriz-9, elementos reconhecidamente relacionados à neurodegeneração

A estimulação dos astrócitos com prostaglandina, um mediador antiinflamatório, cuja síntese é realizada pela endotelina-3 (ET-3), não modificou a síntese basal de NO (Wang et al., 2011). Por outro lado, foi observado aumento no modelo de isquemia cerebral aumento da iNOS no astrócito e na microglia após a exposição de ET-1 e ET-3. Filipovich e colaboradores (2008) demonstraram que as 3 endotelinas (ET-1, ET-2 e ET-3) aumentaram a síntese do NO e de prostaglandinas nas células gliais. Antagonista seletivos para os receptores ETA e ETB inibiram a produção de NO e prostaglandinas, induzidas pelas endotelinas. Estas observações sugeriram que os mecanismos regulatórios das endotelinas interagem com ambos os receptores de endotelinas na inflamação glial. A inibição de receptores de endotelina pode ser um alvo terapêutico quando respostas inflamatórias estão envolvidas nas condições patológicas.

O gene *IGFPB4* se apresentou subexpresso na análise do *microarray* nos animais de 80 dias. Os resultados obtidos nas culturas de astrócitos mostraram ausência de diferença no nível de IGF-I na comparação entre os animais transgênicos e *wild type* P1. Apenas nas culturas dos astrócitos P60 foi possível observar a diminuição nos níveis de IGF-I nos animais transgênicos quando comparados aos *wild type* de mesma idade. A diminuição da IGF-I na cultura do astrócito transgênico P60 pode relacionar-se à perda de suporte trófico dos astrócitos para os neurônios e, assim, colaborar para a morte neuronal. No tecido nervoso, o IGF-I tem ação pleiotrópica influenciando o desenvolvimento neuronal, plasticidade sináptica, regulação neuroendócrina, neurogênese adulta e cognição (Torres-Aleman, 1999; Fernández e Torres-Aleman, 2010) e é um neuroprotetor por reduzir a inflamação cerebral e a reatividade astrocitária (Piriz et al., 2011).

O NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5 formam a família das neurotrofinas, estas moléculas com capacidade neurotrófica. (Meakin e Shooter, 1992; Casaccia-Bonnet et al., 1999).

O receptor de alta afinidade do NGF, expresso pelo gene *NTRK1*, está diminuído nas análises do *microarray* em animais transgênicos de 40 dias e o receptor p75 *NGFR* está superexpresso nesses animais, aumentando a probabilidade do NGF se ligar ao receptor p75. O resultado do ELISA sanduíche no meio condicionado de astrócito mostrou que o nível do NGF está aumentado no meio condicionado dos astrócitos transgênicos P60 em relação aos astrócitos transgênicos e *wild type* P1 e P60, justificando a toxicidade na fase pré-sintomática da doença, que irá colaborar sinalizando para a morte do neurônio motor. Um estudo *in vitro* publicado por Peahr e colaboradores (2004) confirmou que a liberação de NGF por astrócitos SOD1 mutante pode ser tóxica no meio de cultura, pois induz a apoptose em culturas de neurônios motores. Considerando que os níveis de seu receptor de maior afinidade está diminuído na medula espinal desses camundongos, a possibilidade desse fator, secretado pelos astrócitos, sinalizar os neurônios para a morte é maior.

O trabalho de Domeniconi e colaboradores (2007) demonstrou que a forma precursora do NGF (pro-NGF) pode induzir a morte do neurônio motor por ocupação do receptor p75. A fonte inicial do pró-NGF são os astrócitos reativos, que aumentam os níveis de pró-NGF em resposta ao peroxinitrito. Os resultados demonstraram o papel dos astrócitos ativados e do pró-NGF na indução da morte do neurônio motor, sugerindo um possível alvo terapêutico para o tratamento da ELA. Adicionalmente, Ferraiolo e colaboradores (2011) demonstraram que a inibição do p75 em sistemas de co-cultura neurônios motores/astrócitos está relacionada à diminuição da secreção de pró-NGF pelos astrócitos. Esse trabalho também observou aumento da expressão do RNAm da p75 na medula espinal de pacientes com ELA.

O NGF é reportado como indutor da expressão de TNF- α nos neurônios (Takei e Laskey 2008). Esse *feedback* parece ser importante para a manutenção da homeostase entre as células gliais e os neurônios. Porém, um distúrbio nessa comunicação pode levar à morte neuronal excessiva. O TNF- α produzido pelos neurônios pode induzir a expressão de NGF nas células gliais. Além disso, o TNF- α é uma citocina inflamatória potente que, quando sintetizada pelos neurônios, pode rapidamente atrair células imunes como os macrófagos e a microglia (Heese et al., 1998).

O receptor *NGFR* tem afinidade primária ao TNF- α que em algumas situações pode adicionalmente exercer efeito de proteção ou toxicidade. Hiperexpressão do gene

que codifica o *NGFR* foi observado nos animais de 40 dias pela análise do *microarray*. Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que o meio condicionado das culturas de astrócitos secretaram níveis fisiológicos de TNF- α , corroborando com os dados de Chung e Benveniste, 1990. Apenas o grupo de astrócitos adultos transgênicos P60 apresentou nível diminuído de secreção de TNF- α comparado com os outros grupos.

O TNF- α se liga aos receptores: TNFR1 e TNFR2, estes que apresentam padrões diferentes de expressão, transdução de sinais e afinidades de ligação. O TNFR1 é expresso na maior parte das células do SNC e tem como alvo o TNF- α solúvel, já o TNFR2 é principalmente expresso pela microglia e células endoteliais. Quando o TNF- α se liga ao TNFR1, o domínio citoplasmático do receptor, chamado domínio de morte, é recrutado e diversas proteínas formam uma sinalização complexa. Isso pode consequentemente resultar na ativação de fatores de transcrição, como o fator NF-KappaB e a sua expressão gênica se torna importante para determinar o processo biológico de crescimento, morte ou inflamação celular que irá ocorrer. Os astrócitos normalmente expressam uma fosfoproteína, a PEA-15, que inibe os sinais de transdução pro-apoptóticos do TNFR1 e torna essas células resistentes aos sinais de morte. Já o TNFR2, utiliza um conjunto de proteínas do TNFR1, mas não apresenta o domínio de morte funcional e a sua estimulação conduz preferencialmente a ativação das vias de transdução de sinal anti-apoptótica e pró-inflamatória (Micheau e Tschopp 2003; Cheng e Goeddel 2002).

A ação do TNF- α é mais complexa do que inicialmente se pensava e pode produzir efeitos opostos, protetores ou nocivos dependendo de diversos fatores, incluindo o tipo de receptores predominantemente ativo pelo TNF- α , a concentração na qual a citocina age e a duração de sua ação. Santello e Volterra (2012) demonstraram que o TNF- α controla a função sináptica dos neurônios de acordo com as concentrações de TNF- α presentes no meio celular. Em níveis muito baixos, encontrado em cérebro saudáveis, a citocina age provavelmente como um fator permissivo para a regulação sináptica. Já a produção em massa durante estados patológicos do SNC, torna-se capaz de modificar a função sináptica e produzir consequências nocivas, mostrando que não apenas o TNF- α , mas outras citocinas pró-inflamatórias podem funcionar como via de mão dupla no SNC.

Já é sabido que as sinapses excitatórias são o alvo principal de ação do TNF- α , controlando a liberação de glutamato na fenda pré-sináptica e respostas aos receptores AMPA pós-sinápticos (Steinmetz e Turrigiano 2010), que se encontram aumentados com o intuito de fortalecer as sinapses. Além disso, dependendo da dose, o TNF- α controla o tráfego dos receptores GABA promovendo a endocitose ou a exocitose do mesmo. Em combinação, o TNF- α pode conduzir mudanças no equilíbrio excitatório ou inibitório das redes sinápticas através da regulação dos dois receptores (Santello e Volterra 2012). O TNF- α constitutivo foi reportado como controlador da liberação de glutamato dos astrócitos, além disso, os astrócitos são capazes de modular a sinapse através da gliotransmissão. A liberação de gliotransmissores tais como glutamato, D-Serina, ATP e adenosina é induzida pelo aumento de cálcio citosólico, geralmente liberado pelo retículo endoplasmático. A liberação dessas moléculas pode induzir a ativação de receptores neuronais e subsequentemente modular as sinapses (Santello et al., 2011; Santello e Volterra 2012).

Em pacientes com ELA foi observado aumento de TNF- α no líquido e no soro (Moreau et al., 2005) e no modelo animal de camundongos SOD1^{G93A} foi visto aumento da imunoreatividade de TNF- α antes dos primeiros sintomas (Elliott et al., 2001). Interessantemente, o estudo de Growing e colaboradores (2006) mostrou que camundongos SOD1^{G93A} e SOD1^{G37R} *knockout* para TNF- α não apresentaram melhora no tempo de vida ou diminuição da perda neuronal, indicando que o TNF- α não contribui diretamente com a degeneração neuronal causada pela mutação da SOD1.

O astrócito é o maior produtor da IL-6 (Gruol e Nelson, 1997; Erta et al., 2012). O gene *IRF4* é requerido para a liberação de IL-6 e ativação de respostas imunológicas (Huber et al., 2008). Camundongos com deficiência em *IRF-4* apresentam produção menor de IL-6 (Mudter et al., 2008). Os resultados mostram níveis semelhantes de secreção de IL-6 nos astrócitos transgênicos e *wild type* P1. Já em P60, houve a diminuição dos níveis no meio condicionado do astrócito transgênico quando comparado com o *wild type*. Essa diminuição da IL-6 pode ser justificada pela falta de sinalização de TNF- α nos animais transgênicos P60.

Sabe-se que a secreção de IL-6 é induzida pelo TNF- α dos astrócitos (Sawada et al., 1992; Tanabe et al., 2010) e já foi demonstrado que em camundongo modelo da ELA o TNF- α do neurônio motor induz a IL-6 durante o processo de neurodegeneração

(Ikeda et al., 1996). Dessa forma, o TNF- α e a IL-6 podem se auto regular tanto estimulando quanto inibindo, dependendo da via de ativação ou da expressão dos receptores em questão (Sawada et al., 1992; Al-Shanti et al., 2008; Tanabe et al., 2010). Por outro lado, o exercício induz a IL-6 a diminuir a regulação de TNF- α , diminuindo a inflamação (Funk et al., 2011).

Os genes que codificam o VEGF, que tem função de neuroproteção e neurogênese, são o *VEGFA*, importante durante o desenvolvimento e para formação de vasos sanguíneos, e o *VEGFB*, que apresenta função na formação e manutenção de novos vasos sanguíneos durante processos patológicos e atuação na proteção de diversos tipos de neurônios como retina, córtex e neurônios motores (Poesen et al, 2008; Zhang et al 2009). As análises do *microarray* mostrou que o gene *VEGFA* e o *VEGFB* apresentaram subexpressos nos animais de 40 dias e 80 dias respectivamente, fator que pode associar-se às modificações que já devem ocorrer na fase pré-sintomática.

Os resultados aqui obtidos não demonstraram alterações na secreção de VEGF entre os grupos transgênicos e *wild type* em ambas idades, evidenciando que as alterações de VEGF na ELA podem ser provenientes de outras células gliais. Estudos recentes mostraram que quando a secreção de VEGF é aumentada no corno ventral da medula spinal há aumento das junções neuromusculares e redução da astrogliose e inflamação no modelo animal da ELA (Barbeito et al 2009; Zheng et al, 2007). Van Damme (2009) demonstrou que o VEGF retarda a degeneração dos neurônios motores em ratos com ELA e estimula a expressão GluR2 nos neurônios motores através da influência dos astrócitos e protege os neurônios contra a estimulação excessiva dos receptores de glutamato AMPA. Sabe-se que a expressão VEGF está diminuída nos neurônios sobreviventes na ELA (Brockington et al., 2006) e que seus níveis são reduzidos em 50% no soro de pacientes com ELA (Lambrechts et al., 2003).

As alterações gênicas encontradas nos astrócitos neste estudo é inovadora e pode auxiliar na compreensão dos mecanismos da ELA. O gene *AKAP13* que codifica para a proteína quinase A de ancoragem 13 se liga a outras proteínas quinases A formando complexos que atuam em mecanismos de inflamação e migração celular. O gene se apresentou superexpresso na análise do *microarray* nos animais transgênicos, quando comparados com os animais *wild type*, tanto em 40 quanto em 80 dias de vida. No

entanto, a análise da expressão gênica da *AKAP13* nas culturas de astrócitos não mostrou diferenças entre os grupos analisados em nenhuma das idades do estudo (P1 e P60).

O gene parece agir como ativador do fator de transcrição NF-KappaB (Matsumoto et al., 2003) e participar da regulação da sinalização de TLR2 (*toll like receptor-2*), esta proteína que tem um papel fundamental no reconhecimento patogênico e ativação do sistema imunológico inato (Kim et al., 2011). Em cultura de células *AKAP13* deficientes, foram observadas diminuição da ativação NF-KappaB e translocação nuclear p65, corroborando com a diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias. Foi relatado ainda que a *AKAP13* media a sinalização TLR2 através da fosforilação da via JNK (Shibolet et al., 2007).

Nas análises do *microarray*, o gene *HIPK3* apresentou-se superexpresso nos animais transgênicos comparados com os *wild type* em 80 dias. Os resultados mostraram que os astrócitos transgênicos P60 apresentam maior expressão de *HIPK3* em relação aos astrócitos *wild type* P60 e aos astrócitos transgênicos P1.

O gene *HIPK3* tem como função codificar proteínas quinases serina/threonina envolvidas na regulação da transcrição e apoptose. Ele regula resistência à apoptose promovendo a fosforilação do domínio de morte FADD, é largamente expresso no tecido de mamífero e está localizado no núcleo e citoplasma das células (Curtin e Cotter, 2004).

Relatos recentes mostraram que a superexpressão de *HIPK3* inibe a ativação da JNK e diminui a apoptose via regulação da Fas (Curtin e Cotter, 2003). No trabalho de Rochat-Steiner e colaboradores (2000), foi identificada uma nova proteína quinase de interação Fas de 130kDa chamada FIST/HIPK3. Fas é o receptor de morte neuronal que sinaliza para apoptose e está associada ao FADD. O FIST/HIPK3 fosforila a FADD, porém essa fosforilação parece não regular a apoptose. Apesar da via FasL ser indutor de apoptose, o FIST/HIPK3 ativo impede a ativação JNK pelas FasL e confere resistência à apoptose. Deste modo, a alta expressão do *HIPK3* nos astrócitos transgênicos P60 pode impedir a apoptose destas células e mantendo-as vivas, aumentando, assim, a toxicidade na ELA.

O gene *NKRF* que codifica para a proteína *nkrf*, repressora do NF-KappaB, também se apresentou superexpresso nos animais transgênicos de 80 dias segundo a

análise do *microarray*. O *NKRF* tem seu RNAm constitutivamente expresso em todos tecidos. A análise das culturas de astrócitos mostrou que a expressão gênica está aumentada nos animais transgênicos P1 quando comparados com os *wild type* da mesma idade. Nos animais P60 não houve diferença entre os transgênicos e *wild type*, apresentando talvez pouca influência nessa idade nas culturas de células.

O *NKRF* promove a repressão do NF-KappaB, que inclui também outros genes alvos, como IFN- β , IL-8/CXCL8, iNOS. O *NKRF* se liga especificamente ao DNA abolindo a atividade transcripcional ao redor do NF-KappaB, ligando a locais não competitivos, distantes e com mecanismos independentes de posição. Porém, ainda não está claro se o *NKRF* é regulado por si só, ou se o papel funcional induz a ação do *NKRF* (Ho et al., 2009).

Como já foi descrito anteriormente, o fator de transcrição NF-KappaB a chave regulatória da inflamação no SNC. Após trauma ou doença, a expressão do NF-kappaB é dependente da ativação de genes que podem levar para proteção ou favorecer a lesão. No trabalho de Brambilla e colaboradores (2009) foi demonstrado que a inibição do NF-KappaB nos astrócitos resultou na redução da severidade da doença e melhora funcional no modelo animal da esclerose múltipla (Encefalomielite Autoimune Experimental).

A expressão aumentada do *NKRF* nos animais TG P1 pode representar a tentativa dos astrócitos em suprimir algum processo inflamatório causado por ROS ou citocinas liberadas no local, que possam de alguma forma romper o processo de homeostase, e levar os astrócitos ao processo de morte.

As células gliais são ativadas precocemente nos animais transgênicos, sugerindo que a neuroinflamação tem um papel relevante na cascata de eventos em fases pré lesão e que guiam os neurônios motores para a morte nas fases subsequentes (Phillips e Robberecht, 2011). Essa cascata inflamatória inclui a expressão de COX2, secreção de citocinas e liberação de NO dos astrócitos que podem descender da ativação do NF-KappaB tanto nos modelos experimentais quanto em pacientes com ELA (Barbeito et al., 2004). O trabalho de Crosio e colaboradores (2011) tentou realizar a inibição do fator NF-KappaB seletivamente nos astrócitos de camundongos SOD1^{G93A}, porém não houve benefícios no início e na progressão da doença, indicando que a morte dos neurônios motores na ELA não pode ser prevenida pela inibição de uma simples via

inflamatória, pois vias alternativas estão ativadas na presença de estímulos tóxicos persistentes. Recentemente, ativação do NF-KappaB em neurônios, astrócitos e microglias da medula espinal pós *mortem* de pacientes com ELA foi reportada (Sako et al., 2012).

Na análise do *microarray*, o *UBE2I* foi encontrado superexpresso nos animais transgênicos em relação aos *wild type*, tanto em 40 quanto em 80 dias. A enzima conjugadora de molécula SUMO (*Small ubiquitin-like modifier*) UBC9 é a proteína codificada pelo gene *UBE2I*. A conjugação de SUMO foi implicada em processos celulares diversos, como a transcrição, o transporte nuclear, o reparo de DNA, as interações proteína-proteína, a atividade mitocondrial, canais de membrana plasmática, ciclo celular e estrutura da cromatina (Seeler e Dejean, 2003; Johnson, 2004; Andreou e Tavernarakis, 2009).

No resultado da expressão desse gene nos astrócitos, foi possível verificar diminuição da expressão de *UBE2I* nos animais transgênicos P1 em relação aos *wild type*. O *UBE2I*, como já foi descrito, está envolvido com diversas funções essenciais da célula e a diminuição da expressão nos astrócitos transgênicos P1 pode estar alterando alguma função celular precocemente. Nota-se que há uma mudança de comportamento celular nos astrócitos P60, pela idade e pelo genótipo, onde a expressão desse gene não se apresenta diminuída. Esse achado é de grande importância, já que se trata de um gene com funções celulares essenciais e se encontra alterado em uma idade tão precoce. Talvez essa alteração esteja relacionada com modificações nos astrócitos que se tornará tóxico para os neurônios. Já foi descrito por Akar e Feinstein (2009) que a sumoilação regula a expressão de NOS2 nos astrócitos. Eles comprovaram que a SUMO-Ubc9 reduz a ativação do promotor NOS2 nos astrócitos, portanto a diminuição da expressão de *UBE2I* aumenta a expressão de NOS2 e outros fatores inflamatórios que são tóxicos para os neurônios.

O gene *TGFA*, que codifica para o fator de crescimento de transformação α (TGF α), apresentou-se subexpresso no *microarray* dos animais transgênicos com 40 dias quando comparados com os animais *wild-type*. Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que a expressão de *TGFA* está diminuída nos astrócitos transgênicos P1 em comparação aos astrócitos *wild type*. Porém, essa situação se

inverte nas culturas de animais P60, em que foi observado um aumento na expressão deste gene em astrócitos transgênicos comparado aos *wild type*.

Já foi descrito que a secreção de TGF α é aumentada nos astrócitos durante a degeneração do neurônio motor da medula espinal de camundongos com doença do neurônio motor, onde foi observado participação no TGF α no desenvolvimento da astrogliose. O ligante de TGF α é o receptor EGFR que também encontra-se aumentado na doença (Junier et al., 1994).

O trabalho de White e colaboradores (2011) demonstrou que a administração de TGF α em camundongos no sítio de lesão da medula espinal pode aumentar o infiltrado de astrócitos e promover o crescimento axonal. O TGF α se liga ao EGF e ao seu receptor EGFR. Ele ativa diretamente o EGFR nessas células *in vitro*, induzindo a proliferação, migração e transformação do fenótipo celular. Já a superexpressão de TGF α *in vivo* através de injeção intraparenquimal adjacente ao local da lesão gerou proliferação celular, alteração na distribuição de astrócitos, facilitou o crescimento axonal e penetração das células na borda rostral da lesão. Dentre todas as funções desse gene, o aumento de *TGFA* nos astrócitos P60 pode estar relacionado com a astrogliose e proliferação celular.

Os resultados do *microarray* também demonstraram a subexpressão do gene *NTF5* nos animais de 40 dias. Os resultados obtidos nas culturas de astrócitos mostraram que esse gene está expresso de modo similar entre transgênicos e *wild type* nas mesmas idades. No entanto, o nível de expressão desse gene caiu nas culturas P60. As análises mostraram que houve uma diferença na expressão entre transgênicos P1 e P60. Nota-se que esse gene está menos expresso no transgênico da fase adulta, colaborando com a sinalização parácrina neuronal e diminuindo o suporte trófico astrocitário para esses neurônios.

O gene *NTF5* codifica um fator neurotrófico, a neurotrofina 5. As secreções de fatores neurotróficos permitem a sobrevivência neuronal e agem prevenindo o início da morte neuronal programada. Ainda, as neurotrofinas podem induzir diferenciação de células progenitoras para formar neurônios (Allen SJ, Dawbarn 2006). O trabalho de Duberley e colaboradores (1997) não demonstrou diferenças de *NTF5* entre pacientes com ELA esporádica e controle através de imunohistoquímica de neurônios do córtex cerebral. Por outro lado, o trabalho de Küst e colaboradores (2002) demonstrou

aumento da expressão de NT-3 e NT4/5 em biopsias de bíceps braquial de pacientes *pos mortem* com ELA quando comparado ao controle.

7. CONCLUSÕES

1- Culturas purificadas de astrócitos e neurônios são eficazes para o estudo *in vitro* da ELA.

2- Astrócitos transgênicos são tóxicos aos neurônios motores transgênicos e também potencialmente tóxicos aos neurônios motores *wild type*.

3- A toxicidade dos astrócitos ao neurônio motor já é observada em P1e se arrasta até P60;

4- A toxicidade astrocitária parece envolver a secreção de moléculas já que o experimento de co-cultura não invalida essa possibilidade. A concentração dessas moléculas no meio condicionado pode explicar alguns resultados discrepantes entre os experimentos do meio condicionado e co-cultura.

5- A análise do ELISA e expressão gênica indicam o envolvimento do astrócito na desregulação dos mecanismos parácrinos fisiológicos destas células e possivelmente modulação sináptica, o neurotrofismo, a inflamação e a apoptose induzida. O TNF- α parece ser uma molécula importante desse mecanismo.

6- Níveis aumentados de NGF secretados pelos astrócitos transgênicos P60 pode estar colaborando com o processo de morte neuronal e o baixo nível de TNF- α liberado por esses astrócitos indica problema de sinalização intracelular.

7- As análises da regulação da expressão gênica nos astrócitos *in vitro* podem ser métodos adicionais e viáveis para o estudo da ELA. Experimentos adicionais nesse sentido são necessários e poderão detalhar as vias de sinalização tóxica.

8- Os astrócitos transgênicos aparecem com funções celulares alteradas desde idade neonatal, sugerindo que as alterações de toxicidade mediada pelo astrócito para o desenvolvimento da ELA ocorram precocemente, já em fase pré-sintomática. Estudos são necessários para total compreensão do gatilho na participação dos astrócitos na ELA.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agulhon, C.; Sun, M.Y; Murphy, T; Myers, T; Lauderdale, K; Fiacco, T.A. Calcium Signaling and Gliotransmission in Normal vs. Reactive Astrocytes. *Front Pharmacol* 2012. 3:139.

Allaman, I.; Bélanger, M.; Magistretti, A. Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse, *Trends in Neuroscience*. 2011.; 34(2):76-87.

Allen, S.J.; Dawbarn, D. Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clin. Sci.* 2006. 110(2):175-91.

Alexander, S.; Phillip, M.T.; Rappolda, I.; Fujitaa,T.; Torresa, A.; Bekara, L.K.; Takanoa, T.; Penga, W.; Wang, F.; Rangroo V., et al. Critical role of aquaporin-4 (AQP4) in astrocytic Ca²⁺ signaling events elicited by cerebral edema. *PNAS*. 2010. 108 (2): 846-851

Alexianu, M.E.; Kozovska, M.; Appel, S.H. Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression, *Neurology*. 2001.; 57:1282-1289.

Almer G, Teismann P, Stevic Z, Halaschek-Wiener J, Deecke L, Kostic V, et al. Increased levels of the pro-inflammatory prostaglandin PGE₂ in CSF from ALS patients. *Neurology*. 2002 Apr 23;58(8):1277-9.

Al-Shanti, N.; Saini, A.; Faulkner, S.H.; C.E,Stuart. Beneficial synergistic interactions of TNF-alpha and IL-6 in C2 skeletal myoblasts potential cross-talk with IGF system. 2008. 26(2):61-73.

Alves, C.J.; De Santana, L.P.; Dos Santos, A.J.; De Oliveira, G.P.; Duobles, T.; Scorisa, J.M.; Martins, R.S.; Maximino, J.R.; Chadi, G. Early motor and electrophysiological changes in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis and gender differences on clinical outcome. *Brain Res*. 2011.; 1394:90-104.

Anand, P.; Parrett, A.; Martin, J.; Zeman, S.; Foley, P.; Swash, M. et al. Regional changes of ciliary neurotrophic factor and nerve growth factor levels in post mortem spinal cord and cerebral cortex from patients with motor disease. *Nat Med*. 1995 1(2):168-72.

Andreou, A.M.; Tavernarakis, N. SUMOylation and cell signaling. *Biotechnol J*. 2009. (12):1740-1752.

Akar, C.A.; Feinstein, D.L. Modulation of inducible nitric oxide synthase expression by sumoylation. *J Neuroinflammation*. 2009. 26: 6-12.

Araque, A.; Carmignoto, G.; Haydon, P.G. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 2001.63: 795-813

Bach LA, Headey SJ, Norton RS. IGF-binding proteins--the pieces are falling into place. *Trends Endocrinol Metab.* 2005. 16(5):228-34.

Bajetto, A., Bonavia, R., Barbero, S., Piccioli, P., Costa, A., Florio, T.; Schettini G. Glial and neuronal cells express functional chemokine receptor CXCR4 and its natural ligand stromal cell-derived factor 1. *Journal of Neurochemistry.* 1999 73 2348–2357.

Banfield, M.J.; Naylor, R.L.; Robertson, A.G.; Allen, S.J.; Dawbarn, D.; Brady, R.L. Specificity in Trk receptor:neurotrophin interactions: the crystal structure of TrkB-d5 in complex with neurotrophin-4/5. *Structure.* 2001.(12):1191-9.

Barbeito, L.H.; Pehar, M.; Cassina, P.; Vargas, M.R.; Peluffo, H.; Viera, L.; Estevez, A.G.; Beckman, J.S. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis, *Brain Res Rev.*2004. 47(1-3): 263-274.

Barnes, K.; Turner, A.J. The endothelin system and endothelin-converting enzyme in the brain: molecular and cellular studies. *Neurochem Res.* 1997. 22(8):1033-40

Beilharz, E.J.; Russo, V.C; Butler, G.; Baker, N.L.; Connor, B.; Sirimanne, E.S., et al. Co-ordinated and cellular specific induction of the components of the IGF/IGFBP axis in the rat brain following hypoxic-ischemic injury. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998. 59(2):119-34.

Bellini, M.J.; Herenu, C.B.; Goya, R.G.; Garcia-Segura, L.M. Insulin-like growth factor-I gene delivery to astrocytes reduces their inflammatory response to lipopolysaccharide. *J Neuroinflammation.* 2011;8:21.

Bendotti, C.; Atzori, C.; Piva, R.; Tortarolo, M.; Strong, M.J.; De Biasi, S.; Migheli, A. Activated p38MAPK is a novel component of the intracellular inclusions found in human amyotrophic lateral sclerosis and mutant SOD1 transgenic mice.; *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004.; 63(2):113-119.

Bezzi, P.; Domercq, M.; Brambilla, L.; Galli, R.; Schols, D.; De Clercq, E.; Vescovi A.; Bagetta, G.; Kollias, G.; Meldolesi, J.; Volterra A. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. 2001. *Nat Neurosc.* 4 (7):702-10.

Blanc, E.M.; Keller, J.N.; Fernandez, S.; Mattson, M.P. 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, impairs glutamate transport in cortical astrocytes. *Glia.* 1998. 22(2):149:60.

Blackburn, D.; Sargsyan S.; Monk, P.N.; Shaw, P.J. Astrocyte function and role in motor neuron disease: a future therapeutic target?, *Glia.* 2009. 57(12): 1251-1264.

Boillée, S.; Vande Velde, C.; Cleveland, DW. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron*. 2006. 52(1): 39-59.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1979. 72:248-254.

Brambilla, R.; Hurtado, A.; Persaud, T.; Esham, K.; Pearse, D.D.; Oudega, M.; Bethea, J.R. Transgenic inhibition of astroglial NF-kappa B leads to increased axonal sparing and sprouting following spinal cord injury. *J Neurochem*. 2009. 110(2):765-778

Brockington, A., Wharton, SB, Fernando, M., Gelsthorpe, C.H., Baxter, L., Ince, P.G., et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the central nervous system in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006. 65(1):26-36.

Bruijn, L.I.; Becher, M.W.; Lee, M.K.; Anderson, K.L.; Jenkins, N.A.; Copeland, N.G.; Sisodia, S.S.; Rothstein, J.D.; Borchelt, D.R.; Price, D.L.; Cleveland, D.W. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1. *Neuron*. 2004. 18(2):327-338.

Bruijn, L.I.; Miller, T.M.; and Cleveland, D.W. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci*. 1997. 27: 723-749.

Cali, C.; Marchaland, J.; Regazzi, R.; Bezzi, P. SDF 1-alpha (CXCL12) triggers glutamate exocytosis from astrocytes on a millisecond time scale: Imaging analysis at the single-vesicle level with TIRF microscopy. *Journal of Neuroimmunology*. 2008. 198(1-2) 82-91.

Carmeliet P. VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angioma-genesis? *Nat Med*. 2000. (10):1102-3.

Carmignoto, G. Reciprocal communication systems between astrocytes and neurons. *Prog Neurobiol*. 2000. 62(6):561-81.

Carro, E. Torres-Aleman. Serum insulin-like growth factor I in brain function. *Keio J Med*. 2006 (2):59-63.

Casaccia-Bonnet, P.; Gu, C.; Khursigara, G.; Chao, M.V. p75 neurotrophin receptor as a modulator of survival and death decisions. *Microsc Res Tech*. 1999. 45(4-5):217-224.

Cereda, C.; Boiocchi, C.; Bongioanni, P.; Cova, E.; Guareschi, S.; Metelli, M.R.; Rossi, B.; Sbalsi, I. Cuccia, M.C.; Ceroni, M. TNF and sTNFR1/2 plasma levels in ALS patients. *J Neuroimmunol*. 2008. 194:123-131.

Charcot, J.M.; Joffroy, A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance grise et des faisceaux anterolateraux de la moelle epiniere. *Arch Physiol Norm Pathol.* 1869. 2: 354-367.

Chen, G.; Goeddel, D.V. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science.* 2002. 296(5573):1634-5.

Cheroni, C.; Marino, M.; Tortarolo, M.; Veglianese, P.; De Biasi, S.; Fontana, E.; Zuccarello, L.V.; Maynard, C.J.; Dantuma, NP.; Bendotti, C. Functional alterations of the ubiquitin-proteasome system in motor neurons of a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2009. 18(1):82-96.

Chiang, C.S.; Stalder, A.; Samimi, A.; Campbell, I.L. Reactive gliosis as a consequence of interleukin-6 expression in the brain: studies in transgenic mice. 1996. *Developmental neuroscience.* 16(3-4):212-21.

Clement, A. M.; Nguyen, M. D.; Roberts, E.A.; Garcia, M.L.; Boille, S.; Rule, M.; McMahon, A. P.; Doucette, W.; Siwek, D.; Ferrante, R.J.; Brown, R.H.; Jr Julien J.P.; Goldstein, L.S.; Cleveland, D.W. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science.* 2003. 302(5642): 113-117.

Colafrancesco, V.; Villoslada, P. Targeting NGF-pathway for developing neuroprotective therapies for multiple sclerosis and other neurological diseases. 2011 *Arc. Ita. de Bio.,* 149: 183-192.

Corbo, M.; Lunetta, C.; Magni, P.; Dozio, E.; Ruscica, M.; Adobbati, L. et al. Free insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF-binding proteins-2 and -3 in serum and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Eur J Neurol.* 2010. 17(3):398-404.

Crosio, C.; Valle, C.; Casciati, A.; Iaccarino, C.; Carri, MT. Astroglial inhibition of NF-B does not ameliorate disease onset and progression in a mouse model for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *PLoS One.* 2011. 18;6(3):17187.

Curtin, J.F.; Cotter, T.G. JNK regulates HIPK3 expression and promotes resistance to Fas-mediated apoptosis in DU 145 prostate carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2004. 279(17):17090-17100.

De Vos, K.; Chapman, A.L.; Tennant, M.E.; Manser, C.; Tudor, E.L.; Lau, K.F.; Brownlee, J.; Ackerley, S.; Shaw, P.J.; McLoughlin, D.M.; Shaw, C.E., Leigh, P.N.; Miller, C.C.; Grierson, A.J. Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Hum Mol Genet.* 2007. 16(22): 2720-2728.

Di Giorgio, F.P.; Carrasco, M.A.; Siao, M.C.; Maniatis, T.; Eggan, K. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci.* 2007. 10(5):608-614.

Diviani, D.; Dodge-Kafka, K.L.; Li, J.; Kapiloff, M.S. A-kinase anchoring proteins: scaffolding proteins in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011. 301(5):H1742-53.

Drachman, D.B.; Frank, K.; Dykes-Hoberg, M.; Teismann, P.; Almer, G.; Przedborski, S.; Rothstein, J.D. Cyclooxygenase 2 inhibition protects motor neurons and prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Ann Neurol*. 2002. 52(6): 771-778.

Dobrowolny, G.; Aucello, M.; Musarò, A. Muscle atrophy induced by SOD1G93A expression does not involve the activation of caspase in the absence of denervation. *Skelet Muscle*. 2011. 1(1):3.

Domercq, M.; Alberdi, E.; Sánchez-Gómez, M.V.; Ariz, U.; Pérez-Samartín, A.; Matute C. DUSP-6 phosphatase and Erk mediate AMPA receptor- induced oligodendrocyte death. *J. Molec. Chem*. 2011. 286. 11825-11836.

Domeniconi, M.; Hempstead, B. L.; Chao, M.V. Pro-NGF secreted by astrocytes promotes motor neuron cell death. *Mol. and cel. Neurosc*. 34: 271-279.

Duberley, R.M.; Johnson, I.P.; Anand, P.; Leigh, P.N.; Cairns, N.J. Immunocytochemical studies of neurotrophins in cerebral motor cortex in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain Res*. 1997. 763(2):259-263.

Elliott JL. Cytokine upregulation in a murine model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001 1;95(1-2):172-8.

Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci*. 2012. 8(9):1254-66.

Fernandez, S.; Torres-Aleman, I Oral administration of a GSK3 inhibitor increases brain insulin-like growth factor I levels.. *J Biol Chem*. 2010. 285 (23):17693-700

Feng, X.; Guo, Z.; Nourbakhsh, M.; Hauser, H.; Ganster, R.; Shao, L., et al. Identification of a negative response element in the human inducible nitric-oxide synthase (iNOS) promoter: The role of NF-kappa B-repressing factor (NRF) in basal repression of the iNOS gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002. 99(22):14212-7.

Ferraiuolo, L.; Kirby, J.; Grierson, A.J.; Sendtner, M.; Shaw, P.J. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2011 Nov;7(11):616-30.

Filipovich T.; Fleisher-Berkovich S. Regulation of glial inflammatory mediators synthesis: possible role of endothelins. *Peptides*. 2008. 29(12):2250-6

Funk, J.A.; Gohlke, J.; Kraft, A.D.; McPherson, C.A.; Collins, J.B.; Jean Harry, G. Voluntary exercise protects hippocampal neurons from trimethyltin injury: possible role of interleukin-6 to modulate tumor necrosis factor receptor-mediated neurotoxicity. *Brain Behav Immun*. 2011. 25(6):1063-77

Furukawa Y. Pathological Roles of Wild-Type Cu, Zn-Superoxide Dismutase in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurology Research International*. 2012. ID 323261

Furukawa, Y.; O'Halloran, T.V. Amyotrophic lateral sclerosis mutations have the greatest destabilizing effect on the apo- and reduced form of SOD1, leading to unfolding and oxidative aggregation. *J Biol Chem*. 2005; 280(17):17266-17274.

Gibson, S.B.; Bronberg, M.B. Amyotrophic lateral sclerosis: drug therapy from the bench to the bedside. 2012. *Semin Neurol*.32(3):173-178.

Gong, Y.H.; Parsadanian, A.S.; Andreeva, A.; Snider, W.D.; Elliott, J.L. Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrogliosis but does not cause motoneuron degeneration.2000. *J Neurosci* 20:660–665.

Gomide,V.C.; Chadi, G.The trophic factors S-100beta and basic fibroblast growth factor are increased in the forebrain reactive astrocytes of adult callosotomized rat. *Brain Res*. 1999. 835(2):162-174.

Gowing G, Dequen F, Soucy G, Julien JP. Absence of tumor necrosis factor- α does not affect motor neuron disease caused by superoxide dismutase 1 mutations. *J Neurosci*. 2006 Nov 1;26(44):11397-402.

Gruol, D.L., Nelson, T.E. Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. *Mol. Neurobiol*.1997 15, 307–339.

Gudi, V.; Skuljec, J.; Yildiz, O.; Frichert, K.; Skripuletz, T.; Moharreggh-Khiabani, D, et al. Spatial and temporal profiles of growth factor expression during CNS demyelination reveal the dynamics of repair priming. *PLoS One*. 2011.(7):22623.

Gurney, M.E.; Pu, H.; Chiu, A.Y.; Dal Canto, M.C.; Polchow, C.Y, Alexander, D.D.; Caliendo, J.; Hentati, A.; Kwon, Y.W.; Deng, H.X. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science New York*. 1994; 264:1772-1775

Haastert, K.; Grosskreutz, J.; Jaeckel, M.; Laderer, C.; Bufler, J.; Grothe, C.; Claus, P. Rat embryonic motoneurons in long-term co-culture with Schwann Cells- a system to investigate motoneuron diseases on a cellular level *in vitro*. *Journal of Neuroscience Methods*. 2005. 275–284

Haidet-Phillips, A.M.; Hester, M.E.; Miranda, C.J.; Meyer, K.; Braun, L.; Frakes, A.; Song, S.; Likhite, S.; Murtha, M.J.; Foust, K.D.; Rao, M.; Eagle, A.; Kammesheidt, A.; Christensen, A.; Mendell, J.R.; Burghes, A.H.; Kaspar, B.K.; 2011, Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat Biotechnol*. 29(9):824-8.

Hall, E.D.; Oostveen, J.A.; Gurney, M.E. Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia*.1998; 23(3):249-256.

Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*. 2004. 40(2):140-55.

Heese, K.; Hock, C.; Otten, U. Inflammatory signals induce neurotrophin expression in human microglial cells. *J Neurochem*. 70(2):699-707.

Henderson, C.E.; Bloch-Gallego, E.; Camu, W. Purified embryonic motoneurons. In: Cohen, J.; Wilkin, G.P. *Neural Cell Culture. A practical approach*. Londres: ILR Press; 2002. 69-81.

Hirano, A. Cytopathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol*. 1991; 56:91-101.

Ho, S.C.; Lee, K.Y.; Chan, Y.F.; Kuo, L.W.; Ito, K.; Adcock, I.M.; Chen, B.C.; Sheu, J.R.; Lin, C.H.; Kuo, H.P. Neutrophil elastase represses IL-8/CXCL8 synthesis in human airway smooth muscle cells through induction of NF-kappa B repressing factor. *J Immunol*. 2009. 183(1):411-420

Howland, D. S.; J, Liu.; She, Y.; Goad, B.; Maragakis, N.J.; Kim, B.; Erickson, J.; Kulik, J.; DeVito, L.; Psaltis, G.; De Gennaro, L.J.; Cleveland, D.W.; Rothstein, J.D. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002.99(3): 1604-1609.

Huber, M.; Brüstle, B.; Reinhard, K. Guralnik, A.; Walter, G.; Mahiny, A., Von Löw, E.; Lohoff, M. IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype. 2008. 105(52): 20846–20851.

Huisman, M.H.; de Jong, S.W; Van Doormaal, P.T.; Weinreich, S.S.; Schelhaas, H.J; Van der Kooi, A.J.; de Visser, M.; Veldink, J.H.; Van den Berg, L.H. Population based epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis using capture-recapture methodology. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011. 82(10):1165-70.

Hung V.K.; Chan S.M.; Tai L.W; Chen A.Y; Chung S.K; Cheung C.W. Over-expression of endothelin-1 in astrocytes, but not endothelial cells, ameliorates inflammatory pain response after formalin injection. *Life Sci*. 2012. Aceito para publicação.

Ikeda, K.; Kinoshita, M.; Tagaya, N.; Shiojima, T.; Taga, T.; Yasukawa, K.; Suzuki, H.; Okano, A. *Brain Res*. 1996 Jul 8;726(1-2):91-7. Coadministration of interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor delays progression of wobbler mouse motor neuron disease.1996. 726(1-2):91-7.

Ilieva,H.; Polymenidou, M.; Cleveland, D.W. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol*. 2006. 187(6):761-72.

Jaiswal, M.K.; Keller, B.U. Cu/Zn superoxide dismutase typical for familial amyotrophic lateral sclerosis increases the vulnerability of mitochondria and perturbs Ca^{2+} homeostasis in SOD1G93A mice. *Mol Pharmacol*. 2009 75(3):478-89.

Johnson, E.S. Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem*. 2004;73:355-382.

Johnston, J. A., Dalton, M. J., Gurney, M. E. Kopito. Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. 2000. *PNAS*. 97(23):12571-6.

Jones, R.J.; Brunton, V.G.; Frame, M.C. Adhesion-linked kinases in cancer; emphasis on src, focal adhesion kinase and PI 3-kinase. *Eur J Cancer*. 2000 36:1595-606.

Junier, M.P.; Couplier, M.; Le Forestier, N.; Cadusseau, J.; Suzuki, F.; Peschanski, M. Dreyfus, PA. Transforming growth factor alpha (TGF alpha) expression in degenerating motoneurons of the murine mutant wobbler: a neuronal signal for astrogliosis? *J Neurosci*. 1994 14(7):4206-4216

Karimi-Abdolrezaee, S.; Billakanti, R. Reactive astrogliosis after spinal cord injury- Beneficial and detrimental effects. *Mol. Neurobiol*. 2012 (aceito para submissão).

Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL. Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol*. 1992 Mar;140(3):691-707.

Kawamura, M.F.; Yamasaki, R.; Kawamura, N.; Tateishi, T., Nagara, Y.; Matsushita T, et al. Impaired recruitment of neuroprotective microglia and T cells during acute neuronal injury coincides with increased neuronal vulnerability in an amyotrophic lateral sclerosis model. *Experimental neurology*. 2012 234(2):437-45.

Keizman D, Rogowski O, Berliner S, Ish-Shalom M, Maimon N, Nefussy B, et al. Low-grade systemic inflammation in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2009 Jun;119(6):383-9.

Kikuchi, H.; Almer, G.; Yamashita, S.; Guégan, C.; Nagai, M.; Xu, Z.; Sosunov, A.A.; McKhann, G.M.; Przedborski, S. Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006. 103(15):6025-6030.

Kim, E.; Hong, H.U.; Cho, D.; Hari, J.M.; Kim, S.; Kim, T.S. Enhancement to toll-like receptor 2-mediated immune responses by AIMP1, a novel cytokine, in mouse dendritic cells. *Immunology*. 2011. 134(1):73-81.

Koyama, Y.; Michinaga, S. Regulations of astrocytic functions by endothelins: roles in the pathophysiological responses of damaged brains. *J Pharmacol Sci*. 2012;118(4):401-7.

Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 1996 Aug;19(8):312-8.

Kust, B.M.; Copray, J.C., Brouwer, N., Troost, D., Boddeke, H.W. Elevated levels of neurotrophins in human biceps brachii tissue of amyotrophic lateral sclerosis. 2002. *Exp. Neurol.* 177(2):419-27

Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, et al. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet.* 2003. 34(4):383-94.

Lau.; T.L.; Yu, A.H. Astrocytes Produce and Release Interleukin-1, Interleukin-6, Tumor Necrosis Factor Alpha and Interferon-Gamma Following Traumatic and Metabolic Injury. 2001. *J. Neurotrauma.* 18(3):351-9.

Lino, M.M.; Schneider, C.; Caroni, P. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J Neurosci.* 2002. 22(12):4825-4832.

Lindvall, O.; Kokaia, Z.; Bengzon, J.; Elmér, E.; Kokaia, M. Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci.* 1994. 17 (11):490-496.

Ling EA, Leblond CP. Investigation of glial cells in semithin sections. II. Variation with age in the numbers of the various glial cell types in rat cortex and corpus callosum. *The Journal of comparative neurology.* 1973 May 1;149(1):73-81.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001. (4): 402-408.

Lykissas, M.G.; Batistatou, A.K.; Charalabopoulos, K.A.; Beris, A.E. The role of neurotrophins in axonal growth, guidance, and regeneration. *Curr Neurovasc Res.* 2007. 4(2):143-51.

Luo, Y.; Xue, H.; Pardo, A.C.; Mattson, M.P.; Rao, M.S.; Maragakis, N.J. Impaired SDF1/CXCR4 signaling in glial progenitors derived from SOD1(G93A) mice. *J Neurosci Res.* 2007. 85(11): 2422-2432.

Ma, Q.; Kinner, K. Chemoprotection by phenolic antioxidants. Inhibition of tumor necrosis factor alpha induction in macrophages. *J Biol Chem.* 2002. 277(4):2477-84.

Marriott, D.R.; Hirst, W.D.; Ljungberg, C. Astrocytes. In: *Neural Cell Culture A practical approach.*; ed: Cohen J.; Wilkin. 1996. 85:96.

Matsumoto, M.; Funami, K.; Tanabe, M.; Oshiumi, H.; Shingai, M.; Seto, Y.; et al. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol.* 2003. 171(6):3154-62.

Mayers CM, Wadell J, McLean K, Venere M, Malik M, Shibata T, et al. The Rho guanine nucleotide exchange factor AKAP13 (BRX) is essential for cardiac development in mice. *J Biol Chem*. 2010.16. 285(16):12344-54.

McCoy, M.K; Tansey, M.G. TNF signaling inhibition in the CNS implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J. Neuroinflammation*, 2008. 5:45

Meakin, S.O.; Shooter, E.M. The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci*. 1992. 15(9):323-31.

Miana-Mena, F.J.; Munoz, M.J.; Yague, G.; Mendez, M.; Moreno, M.; Ciriza, J.; Zaragoza, P.; Osta, R. Optimal methods to characterize the G93A mouse model of ALS. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disorder*. 2005. 6:55-62.

Micheau,O.; Tschopp, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes.*Cell*.2003 114(2):181-90.

Milani, P., Glagliardi, S., Cova, E., Cereda, C. SOD1 Transcriptional and Posttranscriptional Regulation and Its Potential Implications in ALS. *Neurology Research International*2011 (2011).

Moreau, C., Devos, D., Brunaud-Danel, V., Defebvre, L., Perez, T., Destee, A., Tonnel, A.B., Lassalle, P., Just, N. Elevated IL-6 and TNF-alpha levels in patients with ALS: inflammation or hypoxia? *Neurology* 65. 2005. 1958–1960.

Morgenstern DA, Asher RA, Fawcett JW. Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Prog Brain Res*. 2002;137:313-32.

Morrison, T.B.; Weis, J.J.; Wittwer, C.T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*. 1998. 24(6):954-958, 60, 62.

Mudter,J.,Amoussina,L.; Schenk, M.; Yu, J.; Brüstle,A.;Weigmann, L.; Atreya, R.; Wirtz,S.; Becker,C.; Hoffman, A.et al. The transcription factor IFN regulatory factor-4 controls experimental colitis in mice via T cell-derived IL-6. 2008. 118(7):2415-26.

Murai, K.K.; Pasquale, E.B. Eph receptors and ephrins in neuron-astrocyte communication at synapses. *Glia*. 2011. 59(11):1567-78

Nagai, M.; Re, D.B.; Nagata, T.; Chalazonitis, A.; Jessell, T.M.; Wichterle, H.; Przedborski, S. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons, *Nat Neurosci*. 2007. 10(5): 615-622.

Naganska, E.; Matyja, E. Amyotrophic lateral sclerosis - looking for pathogenesis and effective therapy. *Folia Neuropathol*. 2011. 49(1):1-13.

Neusch, C.; Bahr, M.; and Schneider-Gold, C. Glia cells in amyotrophic lateral sclerosis: new clues to understanding an old disease?. *Muscle Nerve*. 2007. 35:712-724.

Nicholas, J.; Wagoner, V.; Jae-Wook, O.; Repovic, P.; Benveniste E. Interleukin-6 (IL-6) Production by Astrocytes: Autocrine Regulation by IL-6 and the Soluble IL-6 Receptor. *The Journal of Neuroscience*, 1999 19(13): 5236-5244.

Niswender, C.M.; Conn, P.J. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010. 50:295-322.

O'Donnell, S.L.; Frederick, T.J.; Krady, J.K.; Vannucci, S.J.; Wood, T.L. IGF-I and microglia/macrophage proliferation in the ischemic mouse brain. *Glia*. 2002 39(1):85-97.

Ono, S.; Hu, J.; Shimizu, N.; Imai, T.; Nakagawa, H. Increased interleukin-6 of skin and serum in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 200;187(1-2):27-34.

Pehar, M.; Cassina, P.; Vargas, M.R.; Castellanos, R.; Viera, L.; Beckman, J.S.; Estevez, A.G.; Barbeito, L.;Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis, *J Neurochem*. 2004. 89(2): 464-473.

Perea, G.; Navarrete, M.; Araque. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*. 2005. 32: 421–431.

Phillip, T.; Robberecht, W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol*. 2011. 10(3):253-263.

Piriz J, Muller A, Trejo JL, Torres-Aleman I. IGF-I and the aging mammalian brain. *Exp Gerontol*. 2011. 46(2-3):96-9.

Pratt, J.A; Getzoff, E,D; Perry, J.P. Amyotrophic lateral sclerosis: update and new developments. *Degener Neurol Neuromuscul Dis*. 2012. (2): 1–14.

Poesen, K.; Lambrechts, D.; Van Damme, P.; Dhondt, J.; Bender, F.; Frank, N.; Bogaert, E.; Claes, B.; Heylen, L.; Verheyen, A.; Raes, K.; Tjwa, M.; Eriksson, U.; Shibuya, M.; et al. Novel role for vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 and its ligand VEGF-B in motor neuron degeneration. *J Neurosci*. 2008. 28(42):10451-9.

Qin, Y.; Xu, J.; Aysola, K.; Begum, N.; Reddy, V.; Chai, Y.; et al. Ubc9 mediates nuclear localization and growth suppression of BRCA1 and BRCA1a proteins. *J Cell Physiol*. 2011. 226 (12):3355-67.

Qu, W.S.; Tian, D.S.; Guo, Z.B.; Fang, J.; Zhang, Q.; Yu, Z.Y.; Xie, M.J.; Zhang, H.Q.; Lü J.G.; Wang, W. Inhibition of EGFR/MAPK signaling reduces microglial

inflammatory response and the associated secondary damage in rats after spinal cord injury. *J Neuroinflammation*. 2012. 9:178.

Ramon e Cajal. Contribución al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano. Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid. 1899. Tomo X

Ransom, B.R.; Ransom, C.B. Astrocytes: Multitalented stars of the central nervous system. *Methods Mol. Biol.* 2012. 814:3-7

Reaume, A.G.; Elliott, J.L.; Hoffman, E.K.; Kowall, N.W.; Ferrante, R.J.; Siwek, D.F.; Wilcox, H.M.; Flood, D.G.; Beal, M.F.; Brown, R.H. Jr.; Scott, R.W.; Snider, W.D. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury, *Nat Genet.* 1996. 13(1): 43-47.

Redler, R.L.; Dokholyan, N.V. The complex molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2012. 107:215-262.

Rezaie, P.; Trillo-Prazos, G.; Everal, I.P.; Male, D.K. Expression of β -chemokines and chemokine receptors in human fetal astrocyte and microglial co-cultures: Potential role of chemokines in the developing CNS. *Glia.* 2002. 37(1) 64-75.

Ricci, G., Volpi, L., Pasquali, L., Petrozzi, L., Siciliano, G. Astrocyte–neuron interactions in neurological disorders. 2009. 35(4): 317–336.

Rochat-Steiner, V.; Becker, K.; Micheau, O.; Schneider, P.; Burns, K.; Tschopp, F. FIST/HIPK3: a Fas/FADD-interacting Serine/Threonine Kinase that Induces FADD Phosphorylation and Inhibits Fas-mediated Jun NH 2-terminal Kinase Activation. 2000. 192 (8): 1165-1174.

Rhodes KE, Moon LD, Fawcett JW. Inhibiting cell proliferation during formation of the glial scar: effects on axon regeneration in the CNS. *Neuroscience.* 2003;120(1):41-56.

Rosen, D. R. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 1993. 364(6435): 362.

Rothstein, J.D.; Patel, S.; Regan, M.R.; Haenggeli, C.; Huang, Y.H.; Bergles, D.E.; Jin, L.; Hoberg, M.D.; Vidensky, S.; Chung, D.C.; Toan, S.V.; Bruijn, L.I.; Su, Z.Z.; Gupta, P.; Fisher, P.B. β -Lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature.* 2005. 433(7021):73-77.

Rothstein, J.D. Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 65 Suppl. 2009. 1:S3-9.

Salman, H.; Bergman, M.; Bessler, H.; Wolloch, Y.; Punskey, I.; Djaldetti, M. Effect of colon carcinoma cell supernatants on cytokine production and phagocytic capacity. *Cancer Lett.* 2000.159(2):197-203.

Santello, M., Bezzi, P., and Volterra, A. TNF α controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal dentate gyrus. *Neuron*. 2011. 69, 988–1001.

Santello, M.; Volterra, A. TNF α in synaptic function: Switching gears. *Trends Neurosci*. 2012 (10):638-647

Sako, W.; Ito, H.; Yoshida, M.; Koizumi, H.; Kamada, M.; Fujita, K. et al. Nuclear factor kappa B expression in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis and hereditary amyotrophic lateral sclerosis with optineurin mutations. *Clin Neuropathol*. 2012. (6):418-423.

Sasaki, Y.; Hori, S.; Oda, K.; Okada, T.; Takimoto, M. Both ET(A) and ET(B) receptors are involved in mitogen-activated protein kinase activation and DNA synthesis of astrocytes: study using ET(B) receptor-deficient rats (aganglionosis rats). *The European journal of neuroscience*. 1998. 10(9):2984-93.

Saura.; 2007, Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note, *J. of neuroinfl*. 15:4-26.

Sawada, M.; Suzumura, A.; Marunouchi, T. TNF α induces IL-6 production by astrocytes but not by microglia. *Brain Res*. 1992. 583:296–299

Scorisa, J.M.; Duobles, T.; de Oliveira, G.P.; Maximino, J.R.; Chadi, G. The review of the methods to obtain non-neuronal cells to study glial influence on Amyotrophic Lateral Sclerosis pathophysiology at molecular level *in vitro*. *Acta Cir. Bras*. 2010. 25(3): 281-289.

Seeler, J.S.; Dejean, A. Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003. 4(9):690-699.

Seifert, G.; Schilling, K.; Steinhäuser, C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci*. 2006. 7(3): 194-206.

Shibata, N. Transgenic mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation. *Neuropathology*. 2001. 21(1): 82-92.

Shiboleet, O.; Giallourakis, C.; Rosenberg, I.; Mueller, T.; Xavier, R.J.; Podolsky, D.K. AKAP13, a RhoA GTPase-specific guanine exchange factor, is a novel regulator of TLR2 signaling. *J. Biol. Chem*. 2007. 282 (48): 35308-35317.

Sica, RE. Is amyotrophic lateral sclerosis a primary astrocytic disease? 2012. *Medical Hypotheses*. ;79(6):819-22

Silva, G.A.; Feeney, C.; Mills, L.R.; Theriault, E. A novel and rapid method for culturing pure rat spinal cord astrocytes on untreated glass. *J. Neurosci. Methods*. 1998. 80: 75-79

Schiffer, D.; Fiano, V. Astrogliosis in ALS: Possible interpretations according to pathogenetic hypotheses, *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2004. 5(1):22-25.

Shaw, P.J.; Eggett, C.J. Molecular factors underlying selective vulnerability of motor neurons to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.* 2000. 247:17-27.

Steinmetz, C.; Turrigiano, g.C.; Tumor necrosis factor alpha signaling maintains the ability of cortical synapses to express synaptic scaling. *J. Neurosci.* 2010. 30: 14685-14690.

Stevenson, A.; Yates D. M.; Manser C.; De Vos K.J.; Vagnoni A.; Leigh P.N.; McLoughlin D.M.; Miller C.C. Riluzole protects against glutamate-induced slowing of neurofilament axonal transport. *Neurosci Lett.* 2009. 454(2): 161-164.

Stuerenburg, H.J.; Kunze, K. Tissue nerve growth factor concentrations in neuromuscular diseases. *Eur J Neurol.* 1998. (5):487-90.

Tanabe, K.; Matsushima-Nishiwaki, R.; Yamaguchi, S.; Iida, H.; Dohi, S.; Kozawa, O. Mechanisms of tumor necrosis factor- α -induced interleukin-6 synthesis in glioma cells. *Journal of Neuroinflammation.* 2010. 7:16.

Takei, Y.; Laskey, R. Interpreting crosstalk between TNF- α and NGF: potential implications for disease. *Trends in Mol. Med.* 2008.14 (9): 381-388,

Takeuchi, H.; Kobayashi, Y.; Ishigaki S.; Doyu M.; Sobue G. Mitochondrial localization of mutant superoxide dismutase 1 triggers caspase-dependent cell death in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis. 2002. 277(52):50966-50972.

Terenghi, F.; Allaria, S.; Nobile-Orazio. Circulating levels of cytokines and their modulation by intravenous immunoglobulin in multifocal motor neuropathy. *J. Peripher Nerv. Syst.* 2006. 11(1) 67-71.

Torres-Aleman I. Insulin-like growth factors as mediators of functional plasticity in the adult brain. *Horm Metab Res.* 1999. 31(2-3):114-9.

Tortarolo, M.; Crossthwaite, A. J.; Conforti L.; Spencer J.P.; Williams R.J.; Bendotti C.; Rattray M. Expression of SOD1 G93A or wild-type SOD1 in primary cultures of astrocytes down-regulates the glutamate transporter GLT-1: lack of involvement of oxidative stress. *J Neurochem.* 2004. 88(2): 481-93.

Tovar-y-Romo LB, Tapia R. Delayed administration of VEGF rescues spinal motor neurons from death with a short effective time frame in excitotoxic experimental models in vivo. *ASN Neuro.* 2012;4(2).

Troost, D.; Claessen, N.; Van den Oord, J.J.; Swaab, D.F.; de Jong, J.M. Neuronophagia in the motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1993. 19:390-397.

Turner, M.R.; Cagnin, A.; Turkheimer, F.E.; Miller, C.C.; Shaw, C.E.; Brooks, D.J.; et al. Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis.* 2004 15(3):601-9.

Tuszynski, M.H.; Gage, F.H. Bridging grafts and transient nerve growth factor infusions promote long-term central nervous system neuronal rescue and partial functional recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995. 92(10):4621-4625

Van Damme P. The role of AMPA receptors and VEGF in ALS. 2009. 71(4):241-50.

Van Den Bosch, L.; and W, Robberecht. Crosstalk between astrocytes and motor neurons: what is the message?. *Exp Neurol.* 2008. 211(1): 1-6.

Vargas, M.R.; Pehar, M.; Cassina, P.; Estevez, A.G.; Beckman, J.S.; Barbeito, L. Stimulation of nerve growth factor expression in astrocytes by peroxynitrite. 2004. 18: 269-274.

Vieira, A.R. Association between the transforming growth factor alpha gene and nonsyndromic oral clefts: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2006. 1;163(9):790-810.

Volonté, C.; Apolloni, S.; Carri, M.T.; D'Ambrosi, N. ALS: focus on purinergic signaling. *Pharmacol Ther.* 2011. 132(1):111-122.

Volterra, A.; Trotti, D.; Racagni, G. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J Neurosci.* 1994. 14: 2924-32.

Xu, J.; Watkins, T.; Reddy, A.; Reddy, E.S.; Rao, V.N. A novel mechanism whereby BRCA1/1a/1b fine tunes the dynamic complex interplay between SUMO-dependent/independent activities of Ubc9 on E2-induced ERalpha activation/repression and degradation in breast cancer cells. *Int J Oncol.* 2009. 34(4):939-49.

Wang H.H; Hsieh H.L; Yang C.M. Nitric oxide production by endothelin-1 enhances astrocytic migration via the tyrosine nitration of matrix metalloproteinase-9. *J Cell Physiol.* 2011. 226(9):2244-56.

Wagoner, N.J.; Oh J.W., Repovic, P., Benveniste, E.N. Interleukin-6 (IL-6) production by astrocytes: autocrine regulation by IL-6 and the soluble IL-6 receptor. *J Neurosci.* 1999 1;19(13):5236-44.

Weydt, P.; Hong, S.Y.; Klot, M.; Moller, T. Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS. *Neuroreport.* 2003 14:1051-1054.

White, R.E.; Rao, M.; Gensel, J.C.; McTigue, D.M.; Kaspar, P. K.; Jakeman, L.B. Transforming Growth Factor Alpha (TGF α) Transforms Astrocytes to a Growth Supportive Phenotype after Spinal Cord Injury. *J Neurosci.* 2011. 31(42): 15173–15187

Yasuhara, T.; Shingo, T.; Kobayashi, K.; Takeuchi, A.; Yano, A.; Muraoka, K.; Matsui T.; Miyoshi, Y.; Hamada, H. Neuroprotective effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) upon dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 2004. 19(6):1494-504

Zhang, S.Q.; Yang, W.; Kontaridis, M.I.; Bivona, T.G.; Wen G.; Araki, T. Shp2 Regulates Src Family Kinase Activity and Ras/Erk Activation by Controlling Csk Recruitment. *Molecular Cell.* 2004. 13, 341–355,

ANEXO A- Aprovação **Ao****Departamento de Neurologia**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10.02.10, tomou conhecimento que o Protocolo de Pesquisa nº **0113/08** intitulado **"Análise de novos mecanismos envolvidos na neurodegeneração da Esclerose Lateral Amiotrófica. Estudo molecular no modelo experimental da doença e avaliação preliminar da possível relação com a clínica"**, contempla o sub-projeto intitulado **"Caracterização celular e molecular da influência do astrócito na degeneração do neurônio motor no modelo in vitro da esclerose lateral amiotrófica utilizando camundongos transgênicos para SOD1 humana mutante"**, que será tese doutorado da aluna **Juliana Milani Scorisa**.

Pesquisador Responsável: **Prof. Dr. Gerson Chadi**

São Paulo, 10 de janeiro de 2010 .

PROF. DR. EDUARDO MASSAD

**Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa**

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

ANEXO B-Artigo publicado

11 - ORIGINAL ARTICLE
Models, Biological**The review of the methods to obtain non-neuronal cells to study glial influence on Amyotrophic Lateral Sclerosis pathophysiology at molecular level *in vitro*¹**Revisão dos métodos de obtenção de células não neuronais para o estudo da fisiopatologia da Esclerose Lateral Amiotrófica ao nível molecular *in vitro*Juliana Milani Scoris¹, Tatiana Duobles², Gabriela Pintar de Oliveira³, Jessica Ruivo Maximino⁴, Gerson Chadi^{IV}¹ Master in Sciences, Fellow of Department of Neurology, USP, São Paulo, Brazil.² Fellow PhD degree of Neurology, School of Medicine, USP, São Paulo, Brazil.³ PhD, Researcher, Experimental Neurology, Department of Neurology, School of Medicine, USP, São Paulo, Brazil.^{IV} PhD, Full Professor, Experimental Neurology, Department of Neurology, School of Medicine, USP, São Paulo, Brazil.**ABSTRACT**

Purpose: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease that displays a rapid evolution. Current treatments have failed to revert clinical symptoms because the mechanisms involved in the death of motoneuron are still unknown. Recent publications have put non-neuronal cells, particularly, astrocyte and microglia, in the scenario of pathophysiology of the disease. Animal models for ALS, particularly transgenic mice expressing the human SOD1 gene with a G93A mutation (hSOD1), are available and display the phenotype of the disease at cellular and clinical levels. However, it is a lack of detailed information regarding the methods to study the disease *in vitro* to better understand the contribution of non-neuronal cells in the onset and progression of the pathology.

Methods: Colonies of Swiss mice and transgenic mice expressing hSOD1 mutation as well as non-transgenic controls (wild-type) were amplified after a genotyping evaluation. Disease progression was followed behaviorally and mortality was registered. Highly purified primary cultures of astrocytes and microglia from mouse spinal cord were obtained. Cells were identified by means of GFAP and CD11B immunocytochemistry. The purity of astroglial and microglial cell cultures was also accompanied by means of Western blot and RT-PCR analyses employing a number of markers. **Results:** The disease onset was about 105 days and the majority of transgenic mice displayed the disease symptoms by 125 days of age and reached the endpoint 20 days later. A substantial motor weakness was registered in the transgenic mice compared to wild-type at the end point. Immunocytochemical, biochemical and RT-PCR analyses demonstrated a highly purified primary cultures of spinal cord astrocytes and microglia. **Conclusion:** It is possible to achieve highly purified primary cultures of spinal cord astrocytes and microglia to be employed in cellular and molecular analyses of the influence of such non-neuronal cells in the pathophysiology of ALS.

Key words: Amyotrophic Lateral Sclerosis. Astrocytes. Microglia. Neurons. Cell Culture Techniques. PCR. Mice, Transgenic.**RESUMO**

Objetivo: A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa fatal com evolução rápida. Os tratamentos atualmente disponíveis falham em reverter os sintomas porque os mecanismos envolvidos na morte do neurônio motor ainda não são conhecidos. Publicações recentes colocam as células não neuronais, particularmente o astrócito e a microglia, no cenário da fisiopatologia da doença. Modelos animais para a ELA, particularmente os camundongos transgênicos que expressam o gene da SOD1 humana (hSOD1) mutante estão disponíveis e mostram o fenótipo da doença ao nível celular e clínico. Entretanto, informações detalhadas são escassas sobre os métodos de estudo da doença *in vitro* para a melhor compreensão da participação das células não neuronais no início e na progressão da patologia. **Métodos:** Colônias de camundongos Swiss e camundongos transgênicos que expressam a hSOD1 mutante assim como os controles não transgênicos (selvagem) foram amplificadas após avaliação genotípica. A progressão da doença foi acompanhada pelo comportamento e a mortalidade foi registrada. Culturas primárias altamente purificadas de astrócitos e microglia da medula espinal dos camundongos foram obtidas. As células foram identificadas pela imunocitoquímica da GFAP e CD11B. A pureza das culturas de astrócitos e microglia foi acompanhada pelas análises do Western blot e RT-PCR empregando-se marcadores específicos. **Resultados:** Os primeiros sinais da doença ocorreram por volta dos 105 dias de vida e a maioria dos camundongos transgênicos já estava com a doença manifestada aos 125 dias de idade e alcançaram o estágio terminal aproximadamente 20 dias depois. Fraqueza substancial da força muscular foi registrada nos animais transgênicos comparados com os animais selvagens. Análises imunocitoquímica, bioquímica e pelo RT-PCR demonstraram culturas primárias altamente purificadas de astrócito e microglia da medula espinal dos camundongos. **Conclusão:** É possível obter culturas purificadas de astrócitos e microglia da medula espinal do camundongo a ser empregadas em análises celulares e moleculares da influência destas células não neuronais na fisiopatologia da ELA.

Descritores: Esclerose Amiotrófica Lateral. Astrócitos. Microglia. Neurônios. Técnicas de Cultura de Células. PCR. Camundongos Transgênicos.¹Research performed at Neuroregeneration Center (LIM 45), Department of Neurology, School of Medicine, University of São Paulo (USP), Brazil.

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a human devastating and progressive neurodegenerative disorder that result in the selective death of motoneurons in the central nervous system. This progressive motoneuron degeneration culminates in muscle wasting and patient death on average three to five years after onset of the disease from respiratory failure¹.

The main neuronal cells undertaking degeneration are the upper giant motoneurons of layer V of the motor cortex and their projecting lower motoneurons that are located in the motor nuclei of the brainstem and in the anterior horn of the spinal cord. The degeneration of the lower motoneurons that project to skeletal muscles is responsible for the majority of the neurological impairments of ALS patients. Affected motoneurons often contain characteristic inclusions in their perikarya, dendrites and axons however, more recently in the era of molecular biology, new mechanisms of ALS have been elucidated and the involvement of non-neuronal cells have been described².

The knowledge on etiology and pathogenesis of ALS motoneuron death has been gained on the inherent limitation of human tissue from patients at the terminal stages, which makes it difficult to interpret events in the intermediate phases of the disease progression. Therefore, the search for animal models of ALS to gain insights into both the mechanisms of motoneuron death and therapeutic targets has allowed new information on the pathogenesis of ALS³. In fact, animal models have provided substantial advance into mechanisms that lead to motoneuron degeneration⁴.

The majority of ALS cases are apparently sporadic, with 90-95% of patients presenting disease symptoms without a familial history of the pathology, being the remaining 5-10% patients included as a familial ALS group, and about 25% of familial cases are caused by dominant mutations in the Cu/Zn super oxide dismutase (SOD1) gene⁵.

Identification of pathogenic alleles of SOD1 has led to the generation of transgenic mouse and rat, models for ALS studies. Overproduction of mutant human SOD1 protein in these models leads to a late-onset and a progressive motoneuron neurodegenerative disease. Such models have provided the identification of intrinsic pathogenic characteristics of ALS motoneurons, including the formation of protein aggregates, cytoskeletal abnormalities, proteasome dysfunction and increased sensitivity to cell death signals as well as the glial reactivity in the disease evolution⁶.

SOD1 mutant enzyme retains full enzymatic activity. Furthermore, experiments conducted in transgenic mice and rats bearing ALS-associated human SOD1 (hSOD1) mutations as well as SOD1 knockout mice indicate that SOD1-mediated toxicity is not due to a loss of function but rather to a toxic gain of function of the mutant protein. Taking together, results from *in vivo* and *in vitro* studies suggested that disease onset/progression is independent of the intrinsic SOD1 activity.

From the hitherto identified 119 mutations in the human SOD1 gene, more than 10 transgenic mouse lines have been established, and three of them (SOD1^{G93A}, SOD1^{G85R}, and SOD1^{G37R}) have been used extensively to study ALS pathology experimentally⁷.

Disturbed neuron–glia signaling leads to an impaired synaptic transmission and neurotrophic support, triggering neuronal cell death in a number of circumstances for instance ALS, prion diseases, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, etc. Studies on transgenic mouse *in vivo* and *in vitro* have been conducted to investigate whether neuron-specific expression of mutant SOD1 (mSOD1) protein is sufficient to produce an ALS phenotype or whether it might depend on the presence of mutant protein in glial cells^{8,9}.

In fact, evidence has been obtained that accumulation of mSOD1 in postnatal motoneurons is not sufficient to induce or accelerate neuronal death in ALS mice. Recent experiments have shown that the presence of non-neuronal cells, harboring SOD1 protein, in proximity to motoneurons appears to be a prerequisite for selective neuronal death, at least in later stages of the disease. However, the underlying molecular mechanisms that lead to the impairment of neuron–glia signaling in the ALS have only been partially demonstrated¹⁰.

In view of the above descriptions, methods to study glial influence on motoneuron death in ALS should be optimized. We presented in this paper our experience in obtaining non-neuronal cells to study ALS at cellular and molecular levels *in vitro*.

Methods

Swiss mice and also transgenic mice expressing the human SOD1 (hSOD1) gene with a G93A mutation¹¹ were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and maintained as hemizygotes by mating transgenic males with B6SJL/F1/J females. Non-transgenic littermates were used as controls (wild-type). The colony was derived at Jackson Laboratories from G93A mutant mice with 25 ± 1.5 copies of the human SOD1 transgene¹². The mice identification (mutant or wild-type) in our colony was performed by a genotyping method.

The animals were maintained in specific pathogen-free environment, in the biotery of the University of São Paulo. The mice were kept under controlled temperature and humidity conditions with a standardized light-dark cycle (lights on at 7.00 a.m. and off at 7.00 p.m.) and free access to food pellets and tap water. The study was conducted under protocols approved by the Animal Care and Use Ethic Committee at University of São Paulo and in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Genotyping

The DNA was extracted from mice tails by using the following protocol: 500µl of K proteinase buffer 1mg/ml (Sigma Chemicals, EUA) (TrisHCl 20mM pH 8.0, NaCl 10mM, EDTA 30mM pH8.0 e SDS 0.5%) were added to each sample of tail. The suspension was incubated at 55 to 60°C during 48 hours and then centrifuged (16,000g/10 minutes, at 4°C). The aqueous phase was replaced into a new tube and 500µl cold isopropanol were added. After gently mixing, DNA became visible and could be precipitated for centrifugation (16,000g/2 minutes, at room temperature). The DNA pellet was washed twice with 500µl ethanol 70%. After removal of ethanol and 5 minutes drying, the DNA was resolved in 50µl TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4; 1mM EDTA in deionized

water). DNA samples were stored at 4°C until PCR assay. PCR assay was performed as described earlier by Rosen *et al.*², by using the following primers: IMR113 (5'-ATCAGCCCTAATCCATCTGA-3') and IMR114 (5'-CGCGACTAACAATCAAAGTGA-3') to amplify SOD1h fragment IMR042 (5'-CTAGGCCACAGAA TTGAAAGATCT-3') and IMR043 (5'-GTAGGTGGAAATCTAGCATCATCC-3') to amplify a fragment of murin interleucin-2 as positive control. For each sample, PCR assay included 12.5µl PCR Master Mix (2X) (Fermentas Life Sciences), 0.5µl of each primer described above, 1µg DNA and water free from nucleotides for a final volume of 25µl, submitted to an initial period of 3 minutes at 95°C, followed by 36 PCR amplification cycles (30 seconds at 95°C, 30 seconds at 60°C and 45 seconds at 72°C) and finally 2 minutes at 72°C. PCR products with 1µl blue green could be visualized in an 1% agarose gel.

Behavior analysis by means of hanging wire test

Neuromuscular strength was tested by the hanging wire test¹³. Each mouse was placed on the wire lid of a conventional housing cage. The lid was gently turned upside down, 30 cm above a soft surface to avoid injuries. The latency to fall was timed. Each mouse was given up to three attempts to hold on the inverted lid for a maximum of 180 seconds and the longest period was recorded.

Primary cultures of spinal cord cells

Astrocyte culture

The protocol used for primary spinal cord astrocyte cultures is a combination of previously protocols published⁸ and modification according to our experience. Post-natal day 0 (within 24 hours of birth) mouse pups were decapitated. The skin and muscles overlying the spinal cord were dissected. Spinal cord between mid-cervical and lower lumbar levels was cut and quickly cleaned of meninges in ice-cold Hank's modified balanced salt solution (HBSS; LCG Biotechnology), and the spinal cord tissue from 10 animals was pooled in fresh ice cold HBSS. The tissue was triturated with a Pasteur pipette and subsequently passed through 19G needle in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; Cultilab) containing 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), and 100U/ml penicillin and 100U/ml streptomycin (Sigma). The cell suspension was pelleted at 900 r.p.m. for 5 minutes, the supernatant was removed and the pellet resuspended in fresh DMEM at 1ml per dissected cord segment. The resuspended cells were plated onto 6-well culture plates, and maintained at 37°C in a 5% CO₂/95% air atmosphere. The cultures were fed every second day with fresh DMEM. After 2 weeks, the cells were agitated (200 r.p.m. for 6 hours) to eliminate residual microglia and oligodendrocytes, then astrocytes were detached by 0.25% trypsin (Gibco) and plated onto coverslips.

Microglial culture

Mouse mixed glial cultures were prepared as previously described¹⁴ and adapted by our group. Spinal cords from 1 or 2-day-old neonatal mice were dissected, carefully stripped of their meninges and digested with 0.25% trypsin (Gibco) for 30

minutes at 37°C. Trypsinization was stopped by adding an equal volume of culture medium (DMEM F12 nutrient mixture, FBS 10%, penicillin 100U/ml and streptomycin 100µg/ml) to which 0.02% deoxyribonuclease I (Sigma) was added. The solution was pelleted, re-suspended in culture medium and brought to a single cell suspension by repeated pipetting followed by passage through a 19G needle. Cells were seeded at a density of 250,000 cells/ml (¼ 62,500 cells/cm²) and cultured at 37°C in humidified 5% CO₂-95% air. Medium was replaced every 4-5 days. Cultures reached confluency after 7-10 days *in vitro*. After, mixed glial cultures have been confluent for at least 3 days. Mixed glial cells have been washed for 1 minute in DMEM F12 to eliminate serum. After this, the cells were incubated at 37°C with 500µl per well of trypsin 0.25%: DMEM F12 1:3 until intact layer is detached. This step takes 4 hours. Next, 500µl of DMEM F12 with 10% fetal bovine serum was added for trypsin inactivation and the medium containing the layer of detached cells was aspirated and replaced for biochemical analysis. Microglial adherent cells could be grown¹⁵, and incubated with trypsin 0.25% and replated onto coverslips for immunohistochemical and biochemical analysis.

Immunocytochemistry

One-color immunohistochemistry

Cell cultures were rinsed 2 times with phosphate buffered saline (PBS), and then fixed in paraformaldehyde (30 minutes, at 4°C). Sequential incubation of the fixed cells then took place at room temperature in: (1) wash in PBS for 5 minutes in agitation; (2) wash in PBS with 1% Triton for 10 minutes; (3) wash in PBS with 0.02% Tween 20 (BioRad) for 5 minutes; (4) wash in PBS with 0.02% Tween 20 and 1% BSA (Sigma) for 5 minutes; (5) block in PBS with 2% normal goat serum (NGS), 4% BSA, 0.2% Triton (Sigma) for 30 minutes; (6) primary antibody incubation: using rabbit polyclonal glial fibrillary acidic protein (GFAP), a protein of the intermediate filament of the astroglial cytoskeleton (Dako) at 1:150 dilution for astrocytes cultures, CD11B (marker for microglia, BD Biosciences) at 1:600 dilution for microglial cultures in 2% NGS, 4% BSA, 0.2% Triton in PBS overnight. (7) wash 3 times with PBS; (8) secondary antibody incubation with biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Laboratories) at 1:250 dilution in PBS with 0.2% Triton, 1% NGS, 2% BSA for 2 hours except for microglial cultures that were incubated with a primary biotinylated antibody; (9) wash 3 times with cold PBS; (10) Incubation with avidin-biotin at 1:125 dilution in PBS; (11) wash again 3 times with PBS; (12) DAB reaction until color observation. The reaction was made in 0.01% H₂O₂, 0.5mg DAB/ml. DAB labeled cultures were washed 3 times with distilled water, and the reaction was interrupted with Trizma.

Two-color immunohistochemistry

Furthermore, two-color immunoperoxidase was used for further evaluation of the simultaneous detection of the GFAP (marker for astrocytes) and CD11B (marker for microglia) immunoreactivities in the astroglial cultures.

Astroglial cultures were submitted to GFAP immunocytochemistry as described above employing the DAB

as a chromogen, which gave a brownish color to the immunoreactive product. Following the DAB reaction, the plated cells were rinsed several times in PBS and incubated over 24 hours at 4°C with the CD11B antiserum described above diluted 1:600. After incubated with the avidin-biotin solution (both diluted 1:250, Vectastain, Vector) for 45 minutes at room temperature, and stained for 10 minutes using 0.05% 4-chloro-naphthol (Sigma) as a chromogen and 0.05% (v/v) H₂O₂ (Sigma). The plated cells were rinsed in PBS and cover-slipped in a glycerol phosphate buffered medium. The sections were analyzed and photographed with an AX70 Olympus photomicroscope (U.S.A.).

Western blot analysis of cultured cells

GFAP, IBA1 and chondroitin sulfate proteoglycan (NG2) protein levels were assessed by Western blot analysis. The astroglial and microglial cell cultures were homogenized in lysis buffer containing 1% protease inhibitor cocktail (Sigma), 1% NP40 (Sigma), 0.5% sodium deoxycholate (Sigma), 1% sodium dodecyl sulfate (Sigma), 1mM ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma), 1mM ethylene glycol tetraacetic acid (Sigma), diluted in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) and then homogenized. The homogenate was centrifuged (14,000r.p.m.) for 20 minutes at 4°C; supernatants were transferred into new tubes and stored at -70°C until use. After centrifugation at 14,000 r.p.m. for 20 minutes, the supernatants were transferred into new tubes and stored at -70°C until use. Protein concentrations were determined according to the method described by Bradford¹⁶.

To label a GFAP and NG2 bands, the samples were separated on a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (20µg of protein/lane) using a 12% Tris-HCl ready gel (Bio-Rad, California, USA) at 100V for 1 hour. For to NG2, the samples were separated on a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (80µg of protein/lane) using a 6% Tris-HCl ready gel (Bio-Rad, California, USA) at 100V for 1 hour. Proteins were transferred to nitrocellulose membrane for 1 hour at 100V. After 1 hour blocking with 5% milk in Tris-buffered saline 0.05% Tween 20 (TBS-T). Membrane was incubated overnight with rabbit polyclonal antibodies to GFAP (1:10,000, DAKO) and to NG2 (1:500, Chemicon), the antisera were diluted in 3% milk/TBS-T. Membrane was washed 2 times for 10 minutes in TBS-T and incubated at room temperature for 1 hour with anti-rabbit 1:10,000 dilution of anti-rabbit IgG-ECL conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, USA).

For to IBA1 band, the samples were separated on a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (80µg of protein/lane) using a 15% Tris-HCl ready gel (Bio-Rad, California, USA) at 130V for 40 minutes. Proteins were transferred to PVDF membrane for 40 minutes at 50V. After 24 hours blocking with 5% BSA in Tris-buffered saline 0.05% Tween 20 (PBS-T). Membrane was incubated for 1 hour with rabbit polyclonal antibodies to IBA1 (1:2,000, WAKO), the antisera were diluted in PBS-T. Membrane was washed 2 times for 10 minutes in PBS-T and incubated at room temperature for 1 hour with anti-rabbit 1:10,000 dilution of anti-rabbit IgG-ECL conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, USA). The IBA1 protein is a

17kDa protein consisting of 147 amino acids. The genomic copy of the IBA1 gene was mapped to within the major histocompatibility complex MHC class III region between the BAT2 and TNF-α genes. Using a specific antibody, IBA1 protein was shown to be expressed in monocytic cell lines and microglia among the cultured brain cells. IBA1 protein functions as an adapter molecule that mediates calcium signals in the monocytic lineage, including microglia.

Blots were washed two times with TBS-T and once TBS. After final washes, the membrane was incubated with Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Science, USA) for 1 minute. The membranes were exposed to an X-ray film for imaging (Hyperfilm™ ECL, Amersham Biosciences, USA) to visualize protein bands.

Gene expression by means of RT-PCR

RT-PCR was performed with oligonucleotide primes 5'-GCAGAGATGATGGAGCTCAATGACC-3' and 3'-GTTTCATCCTGGAGCTTCTGCCTCA-5'. Total RNA was extracted by Trizol method. Firstly, 1ml Trizol solution was added to the cell sample, and then 200µl chloroform were added. After mixing, the phases were separated by centrifugation (12,000g/15 minutes at 4°C). The aqueous phase was transferred to a new tube and 500µl isopropanol was added. After mixing and incubation for 10 minutes at room temperature, RNA was precipitated by centrifugation (13,000g/10 minutes at 4°C). The precipitate was washed with 75% ethanol and centrifuged (1,500g/5 minutes at 4°C). After removal of the ethanol and 15 minutes drying, the RNA was resolved in 50µl RNase free water. Complementary DNA (cDNA) templates were prepared from 1µl of total RNA with 2µl RNase free water and Kit Ready-to-go RT-PCR beads (GE healthcare), according to the manufacturer's recommendations, followed by 40 PCR amplification cycles (94°C for 30 seconds, annealing at 60°C for 60 seconds and extension at 72°C for 90 seconds). Ten µl of PCR product was analyzed by 2% agarose gel with 2µl of ethidium bromide.

Data analysis

The Student t-test was performed to compare data from behavior analysis of the different groups of animals. Data were presented as mean ± S.E.M. and significance level was set at p<0.05.

Results

Genotyping

The animals were identified as mutant or wild-type by genotyping. These assignments were successfully performed in all mice DNA samples, and were validated by agarose gel electrophoresis of PCR products. The genotype result was determined by analysis of the bands observed. Detection of two bands was clearly observed in mutant mice B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1 Gur with 236 pb and 324 pb. Wild-type mice showed one band with 324 pb (Figure 1).

FIGURE 1 – Procedure of genotyping in order to determine the phenotype, mutant and wild-type to the enzyme human superoxid dismutasis 1 (SOD1). In the mutant mice B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1 Gur (SOD1) two bands can be observed, the mutant one (236 pb) and the wild-type one (324 pb). Otherwise, in the wild-type mice, only 324 pb band can be seen. Interestingly, 324 pb band have a stronger marking in wild-type mice than in SOD1 animals, as expected because of the higher number of copy of mutant enzyme in transgenic mice comparing to the wild-type form of the enzyme

General aspects and behavior

Animals were examined daily in their cages by a trained observer. Around the age of the 105 days, the first clinical signs of an abnormal and slow gait appeared in mutant animals. Additionally, mice showed slight trembling of the hind limb when they were suspended by their tails during normal cage maintenance. These signs were observed in both females and males mice whereas wild-type littermate controls never displayed those motor symptoms. The majority of transgenic mice was such around 125 days of age and reached the endpoint 20 days later. At death, mutant animals showed a complete paralysis.

Disease onset is when these signs appear and will extend to symmetrical paralysis of the hindlimbs, followed by a complete paralysis at the end stage. Mice were killed when they were unable to roll over within 20 seconds after being pushed on their side, and this time point was recorded as the time of death. Survival of our transgenic mice is illustrated in Figure 2A.

The performance on hanging wire test showed more evidenced differences between transgenic and wild-type animals (around 120 days). During the entire period of analysis all control animals continued to perform at the maximum level (Figure 2B).

FIGURE 2 – The figure illustrates the differences in survival between mutant (SOD1) and wild-type animals (A) and the hanging wire test for muscle strength. The hanging wire test was expressed in terms of mean latency for each group. Data are means $\pm$ SEM. * $p < 0.001$ (Student t test) (B)

Immunocytochemistry

A high number of putative cultured astroglial cells was confluent and occupied the majority of the spaces in the plate surface as seen under phase contrast microscopy (Figure 3a). Immunocytochemistry demonstrated the presence of a strong labeling of GFAP in the cytoplasm and processes of the cultured astroglial cells (Figure 3b). All astrocytes in the culture stained for GFAP immunoreactivity. Confluent astrocytes possessed a round to elliptic shape with 2 long well visible processes (Figure 3b). Moreover, the cultures of astroglial cells stained for CD11B immunoreactivity demonstrated the presence of only very few and scattered microglia in the astroglial cultures (less than 1%) (Figure 3c).

FIGURE 3 – Digital microphotographs of confluent cultured purified astrocytes from mouse spinal cord under phase contrast (a) and immunolabelled for GFAP (b) or CD11B (c). Immunoperoxidase technique was applied with DAB as a chromogen. GFAP and CD11B were markers for astrocytes and microglia, respectively. The majority of cultured cells were astrocytes labeled for GFAP (b) and only the minority of the cells were microglia labeled for CD11B (c). Bars: 20µm (a) and 30µm (b,c)

The analysis of microglial cultures of the spinal cord mice demonstrated a high number of putative cultured microglial cells that were confluent and occupied the majority of the spaces in the plate surface as seen under phase contrast microscopy (Figure 4a). Already under phase contrast, it was possible to see a number of highly ramified microglial processes of second and third order surrounding each cell (Figure 4b,d). Immunocytochemistry demonstrated the presence of a strong labeling of CD11B in the membrane of the cell cytoplasm and process of the cultured microglial cells (Figure 4c). All microglial cells in the culture stained for CD11B. Confluent microglia with their processes possessed a round to elliptic shape (Figure 4c,d). Moreover, the cultured microglial cells stained for GFAP immunoreactivity showed no immunoreaction (data not shown).

FIGURE 4 – Digital microphotographs of confluent cultured purified microglia from mouse spinal cord [Swiss mice (a-c) and transgenic mice expressing the human SOD1 (hSOD1) gene with a G93A mutation (d)] under phase contrast (a,b,d) and immunolabelled for CD11B (c,d). Immunoperoxidase technique was applied with DAB as a chromogen. CD11B was a marker for microglia. The majority of cultured cells were microglia labeled for CD11B (c). Bars: 20µm (a), 10µm (b), 50µm (c) and 5µm (d)

Western blot analysis

Western blot technique revealed that GFAP protein, an astroglial protein, level is more intense in the purified astroglial culture than purified microglial culture (Figure 5). No GFAP band was detected in the supernatant cells derived from the purification process of microglial cell cultures. Furthermore, the IBA1 protein, a microglial protein, level is more intense in the purified microglial culture than purified astrocyte culture. However, the western blot revealed the band of the NG2 protein, a glycoprotein present in oligodendrocyte/astrocyte precursors, only in astrocytes cultures, that have been either or not purified (Figure 5).

FIGURE 5 - The bands of GFAP (upper panel), IBA1 (middle panel) and NG2 (lower panel) proteins detected in primary cultured cells from mouse spinal cord by means of Western blot technique. The GFAP, IBA1 and NG2 bands were about 50 kDa, 17 kDa and 270 kDa, respectively. Figure illustrate the bands of GFAP (protein of the intermediate filament of the astroglial cytoskeleton), IBA1 (a calcium modulator that is shown to be expressed in microglia) and NG2 (a glycoprotein detected in oligodendrocyte/astrocyte precursors)

Two-color immunoperoxidase for simultaneous visualization of astrocytes and microglia in culture plates

Two-color immunoperoxidase method for simultaneous detection of GFAP and CD11B immunoreactivities in primary cultured astrocytes from mouse spinal cord demonstrated the presence of a large number of brownish color (DAB as a chromogen) immunoreactive astrocytes and scattered bluish color immunoreactive microglia (4-chloro-naphthol as achromogen) in the plate (Figure 6).

FIGURE 6 – Primary astroglial culture obtained from mouse spinal cord submitted to a two-color immunoperoxidase procedures for simultaneous detection of GFAP (marker for astrocytes) and CD11B (marker for microglia) immunoreactivities. GFAP immunoreactivity is identified as a brownish color (diaminobenzidine as a chromogen) and CD11B immunoreactivity as a bluish color (4-chloro naphthol as a chromogen). Arrows indicate the presence of a large number of immunopositive astroglial cells and the double arrow illustrates the presence of a scattered immunoreactive microglia. Bars: 50µm

Control cultures incubated with the solvent for the primary antibodies, secondary antibody, or for avidin-biotin showed no reaction (data not shown).

Gene expression

The RNA of astrocyte culture cells was isolated and then transformed in cDNA by reverse transcriptase and amplified using GFAP primers. The cDNA was detected by agarose gel electrophoresis of PCR products. The reverse-transcriptase-PCR result showed a GFAP specific band of 260 pb (Figure 7).

FIGURE 7 - Agarosis gel showing RNA expression of glial fibrillary acid protein (GFAP) in an astrocyte cell culture from mouse spinal cord. Sample was obtained by RT-PCR performed with oligonucleotide primers to GFAP (sense primer: GCAGAGATGATGGAGCTCAATGACC and antisense primer: GTTTCATCCTGGAGCTTCTGCCTCA). The detection of a 260 pairs of basis band confirms astrocyte presence in the culture

Discussion

We have introduced the colony of transgenic mice model of ALS and the control animals for the disease in the biotery of the University of São Paulo Medical School. The animals were obtained from a specialized company abroad in producing genetically modified strains for experimental studies. We have followed the recommendations of the sender regarding amplification of the colonies of transgenic mice expressing the human SOD1 (hSOD1) gene with a G93A mutation¹¹. The animals were maintained as hemizygotes by mating transgenic males with B6SJL/F1/J females. The transgenic littermates possessed a number of copy of the human SOD1 transgene that is adequate to trigger disease onset by post natal day 105 as observed in our colonies in agreement to descriptions of groups that have used the same type of animals bearing the mutation⁴. Genotyping was used to detect or exclude the mutations in the littermates. Non-transgenic littermates that were called wild-type mice were used as controls. We have also used Swiss mice to compare the results regarding colony amplification, mortality and behavioral impairments as well as results obtained in the bench.

The animals were maintained in a specific pathogen-free environment in our biotery, being submitted to periodical bacteriological and proctoparasitological survey which may favor the colony amplification and homogeneity of results.

The mortality rate and longevity of G93A transgenic mice were in agreement to that described in the literature with a complete disease accomplishment onset around post natal day 125

and endpoint by 145 days of age. The average of 20-40 days of disease evolution and termination already confirms the fast progression of neurological impairments which culminate to respiratory failure and death¹¹.

There are several tests in the literature that have been used to follow voluntary motor deterioration in animal model of ALS i.e. rotarod test, hanging wire test and electromyography. In the present paper we have employed the hanging wire test that seems to be very sensitive to demonstrate disease onset. From the behavioral results demonstrated herein, we can confirm that genotyping can predict disease onset at early adult life in hundred percent of animals in accordance to the literature¹³.

We have also revised in this paper the method to obtain primary culture of astrocytes⁸ and microglia¹⁵ which have been adapted and optimized by our group for neuroglial cells from spinal cord of mice for *in vitro* cellular, biochemical and molecular analyses.

Based on the methodological descriptions presented in this paper, we obtained primary cultures of mouse spinal cord astrocytes with more than ninety-five percent purity which is considered a good index for *in vitro* studies^{8,15}. The phase contrast microscopy of the live cultured astrocytes showed cells with adequate vitality and morphological shape, resembling plated astrocytes. Cytological phenotype was confirmed by immunocytochemical labeling for GFAP, the intermediate filament of astroglial cytoskeleton, after paraformaldehyde fixation of astroglial primary cultures. Furthermore, the CD11B immunolabeling of fixed astroglial cultures revealed the presence of very few and scattered immunopositive microglia in the plate, thus confirming that the method leads acquisition of a remarkably purified astroglial culture.

As observed for astroglial cultures, we acquired primary cultures of mouse spinal cord microglia with more than ninety-five percent purity which is considered an excellent index for *in vitro* studies with that type of cell⁸. Phase contrast microscopy showed healthy live cultured microglia possessing morphological shape of so described plated cells¹⁵. The qualitative analysis based on cytological phenotype was confirmed by immunocytochemical labeling for CD11B, a cell surface receptor complement described with the method in the fixed cells. Furthermore, the GFAP immunolabeling of fixed microglial cultures revealed the presence of very few and scattered immunopositive astrocytes in the plate, thus prompting the acquisition and expansion of a purified microglial culture.

We have also demonstrated by means of Western blot technique that the obtained primary neuroglial cultures allow biochemical evaluation of protein contents in the plated cells after resuspension, homogenization and protein extraction which is very useful in the quantitative studies of molecular signaling that participates in the pathophysiological mechanisms of the ALS disease¹⁷. We have employed the Western blot analysis to further characterize the identity and purity of astroglial and microglial cultures. Purified microglial cultures showed a strong 17 kDa band of IBA1 immunoblot and almost no detectable 50 kDa GFAP band. In the other way, purified astroglial cultures showed an intense GFAP band and a slight IBA1 band, indicating a well acceptable degree of purity of both cell types by means of a biochemical method. The method was also employed to detect NG2, a marker

of oligodendrocyte/protoplasmic astrocyte precursors, in both non-purified and purified astrocytes, but not in microglial culture, an indication that those precursor cells are displaying mitogenic activity in culture. Moreover, it is of substantial interest the observation of the absence of GFAP, IBA1 and NG2 in the seeded supernatant cells after confluence from the process of microglial culture purification. That finding does emphasize the necessity of a good method to acquire cell culture purification¹⁸, because other type of cells, probably endothelial, ependymal and meningeal fibroblast cells, are present in the initial phases of the process and showed be eliminated. As far as we know, this is the first time the degree of purity has been detailed in the described methods to obtain those primary cultured non-neuronal cells derived from mouse spinal cord.

We have also demonstrated in this paper the RNA expression of GFAP in purified mouse astrocyte cultures by means of RT-PCR technique. Besides the importance of the method to characterize the plated cells, RT-PCR can be employed for molecular analysis of contribution of non-neuronal cells in the pathophysiological mechanisms of ALS progression.

Conclusion

It is possible to achieve highly purified primary cultures of spinal cord astrocytes and microglia to be employed in cellular and molecular analyses of the influence of such non-neuronal cells in the pathophysiology of ALS.

References

1. Ince PG, Lowe J, Shaw PJ. Amyotrophic lateral sclerosis: current issues in classification, pathogenesis and molecular pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1998;24(2):104-17.
2. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 1993;362(6415):59-62.
3. Shaw PJ. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005;76(8):1046-57.
4. Julien JP, Kriz J. Transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1762(11-12):1013-24.
5. Andersen PM. The genetics of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Suppl Clin Neurophysiol.* 2004;57:211-27.
6. Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron.* 2006;52(1):39-59.
7. Schymick JC, Talbot K, Traynor BJ. Genetics of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2007;16 Spec No. 2:R233-42.
8. Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat. Neurosci.* 2007;10(5):615-22.
9. Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH Jr, Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science.* 2003;302(5646):113-7.
10. Jaarsma D, Teuling E, Haasdijk ED, De Zeeuw CI, Hoogenraad CC. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase is sufficient to induce amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice. *J Neurosci.* 2008;28(9):2075-88.

The review of the methods to obtain non-neuronal cells to study glial influence on Amyotrophic Lateral Sclerosis pathophysiology at molecular level in vitro

11. Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*. 1994;264(5166):1772-5.
12. Gurney ME. The use of transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis in preclinical drug studies. *J Neurol Sci*. 1997;152 Suppl 1:S67-73.
13. Miana-Mena FJ, Munoz MJ, Yague G, Mendez M, Moreno M, Ciriza J, Zaragoza P, Osta R. Optimal methods to characterize the G93A mouse model of ALS. *Amyotroph Lateral Scler* 2005;6:55-62.
14. Giulian D, Baker TJ. Characterization of amoeboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci*. 1986;6(8):2163-78.
15. Saura J, Tusell JM, Serratos J. High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia*. 2003;44(3):183-9.
16. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
17. Martin LJ, Liu Z, Chen K, Price AC, Pan Y, Swaby JA, Golden WC. Motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mutant superoxide dismutase-1 transgenic mice: mechanisms of mitochondriopathy and cell death. *J Comp Neurol*. 2007;500(1):20-46.
18. Duobles T, Lima Tde S, Levy Bde F, Chadi G. S100beta and fibroblast growth factor-2 are present in cultured Schwann cells and may exert paracrine actions on the peripheral nerve injury. *Acta Cir Bras*. 2008;23(6):555-60.

Acknowledgement

The authors thank to Instituto Paulo Gontijo for the incentive.

Conflict of interest: none

Financial source: FAPESP (98/13122-5; 99/01319-1; 07/00491-3) and CNPq

Correspondence:

Gerson Chadi, M.D., Full Professor
Department of Neurology
University of São Paulo
Av. Dr. Arnaldo, 455/2119
01246-903 São Paulo – SP Brazil
Phone: (55 11)3061-7460
gerchadi@usp.br

Received: December 14, 2009

Review: February 12, 2010

Accepted: March 18, 2010

How to cite this article

Scorisa JM, Duobles T, Oliveira GP, Maximino JR, Chadi G. The review of the methods to obtain non-neuronal cells to study glial influence on Amyotrophic Lateral Sclerosis pathophysiology at molecular level *in vitro*. *Acta Cir Bras*. [serial on the Internet] 2010 May-June;25(3). Available from URL: <http://www.scielo.br/acb>

ANEXO C – Moléculas selecionadas a partir dos resultados do microarray para quantificação do meio condicionado dos astrócitos

Molécula/ Função	Gene relacionado/ Função	<i>Fold</i> na medula espinal SOD1^{G93A} / idade	Trabalhos relacionados/Idéias principais
Endotelina-1 São peptídeos responsáveis pelo tônus vascular cerebral e são produzidas por células endoteliais, neurônios, astrócitos e microglias. Também modula a inflamação (Barners e Turner 1997).	<i>EDNRA</i> : Receptor de endotelina-1 (ET-1).	+ 2,26 em 40 dias	<ul style="list-style-type: none"> • No trabalho de Filipovich e colaboradores (2008) foi demonstrado que as endotelinas aumentaram a síntese de NO e prostaglandina nas células gliais; • Os efeitos deletérios da ET-1 no SNC incluem distúrbio na homeostase de água e integridade da barreira hematoencefálica (Wang et al, 2011); • Altos níveis de endotelina podem induzir a ativação e proliferação de astrócitos (Sasaki et al., 1998) e a regulação da secreção de citocinas (Filipovich et al., 2008).

Molécula/ Função	Gene relacionado/ Função	<i>Fold</i> na medula espinal SOD1 ^{G93A} / idade	Trabalhos relacionados/Idéias principais
<p>IGF-I Fator de crescimento que pode agir durante o desenvolvimento e na neurodegeneração, fornecendo suporte trófico aos neurônios motores (Corbo et al., 2010).</p>	<p>IGFBP4: Codifica a proteína IGFBP4. Nos fluídos biológicos, o IGF se liga às IGF-binding proteins (IGFBP), que agem como transportadores de IGF, prolongando sua meia vida e modulando sua atividade (Bach et al., 2005).</p>	<p>- 1,64 em 80 dias</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Corbo et al (2010) demonstraram uma correlação entre o IGF livre e a maior severidade da doença, com diminuição das IGFBPs no liquor e no soro de pacientes com ELA esporádica; • Kawamura e colaboradores (2012) demonstraram em um experimento in vivo uma menor imunoreatividade e expressão gênica de IGF nas microglias transgênicas em relação as <i>wild types</i> após axotomia do nervo hipoglossal lesionado do camundongo modelo da ELA de 70 dias, evidenciando um potencial neuroprotetor diminuído nessas células; • Bellini et al (2011) mostraram que o tratamento com IGF-I em culturas de astrócitos diminuiu a expressão dos TLR4 reduzindo a resposta inflamatória astrocitária e aumentando a produção de IGF, evidenciando a terapia com IGF como relevante para controlar a gliose reativa; • A produção de IGF-I está aumentada na microglia ativada após lesão no SNC (Beilharz et al., 1998; Gudi et al., 2011). Em cultura, o IGF-I aumenta a proliferação microglial e astrocitária (O'Donnell et al., 2002).

Molécula/ Função	Gene relacionado/ Função	<i>Fold</i> na medula espinal SOD1 ^{G93A} / idade	Trabalhos relacionados/Idéias principais
<p>NGF Anti-apoptótico no desenvolvimento neuronal (Colafrancesco e Villoslada, 2011), age também nos neurônios maduros. Ao Se ligar no receptor p75 sinaliza diretamente para morte celular (Turner et al., 2004).</p>	<p><i>NTRK1</i>: Envolvido no desenvolvimento e maturação de neurônios centrais e periféricos, regulação da proliferação, diferenciação e sobrevivência neuronal.</p>	- 2,43 em 40 dias	<ul style="list-style-type: none"> •Aumento de NGF na medula espinal (Anand et al., 1995) e em músculos de pacientes com ELA (Stuerenburg and Kunze, 1998; Kust et al., 2002) •O tratamento com antagonista do receptor p75 em culturas de células bloqueou o efeito de morte neuronal, porém não mostrou efeitos estatisticamente diferentes quando reproduziu o experimento in vivo (Turner et al., 2004); •O Trabalho de Ferraiolo e colaboradores (2011) mostrou que o astrócito TG secreta mais pró-NGF que faz com que aumente a expressão de receptores p75 nos neurônios e aumente a morte neuronal. A inibição do p75 esta relacionada com diminuição do pró-NGF. Esse trabalho também observou aumento da expressão do RNAm de p75 na medula espinal de pacientes com ELA; •Não há trabalhos que quantificaram a quantidade de NGF secretada pela microglia na ELA. Heese e colaboradores (1998) mostraram que a secreção microglial de NGF aumenta com a estimulação através do LPS.
	<p><i>p75</i> ou <i>NGFR</i>: Receptor de afinidade secundária do NGF. Indutor de morte celular.</p>	+ 1,75 em 40 dias	

Molécula/ Função	Gene/ Função	Fold na medula espinal SOD1 ^{G93A} / idade	Trabalhos relacionados/Idéias principais
TNF-α Em excesso desencadeia a morte neuronal; Citocina pró inflamatória.	CXCR4: Transdução de sinal pelo aumento intracelular de íons de cálcio e aumento da ativação MAPK1/MAPK3.	-1,80 em 40 dias	<ul style="list-style-type: none"> •Weydt et al (2004) demonstraram um aumento de TNF-α pelas microglias TG P60 <i>in vitro</i> porém não mostrou dados de pureza da cultura; •Santello e Volterra (2012) publicaram que o TNF-α pode ser neuroprotetor ou não dependendo da quantidade e tempo de exposição das células ao TNF-α. Ainda a ausência de TNF-α sobrecarrega o sistema de captação de glutamato astrocitário e falha na ativação dos receptores pré-sinápticos NMDA enfraquecendo a sinapse; •Aumento de TNF-α no líquor e soro de paciente com ELA (Moreau et al., 2005) e aumento da imunoreatividade de TNF-α em camundongos SOD1^{G93A} antes dos primeiros sintomas (Elliott et al., 2001).
	NGFR: receptor de afinidade primária ao TNFA e de afinidade secundária ao NGF (p75).	+ 1,75 em 40 dias	
IL-6 Citocina pró inflamatória (Salman et al., 2000)	IRF-4: Requerido para a ativação da resposta imune. Ativação das células imunocompetentes.	- 3,76 em 80 dias	<ul style="list-style-type: none"> •Camundongos com deficiência em IRF-4 tem menor produção de IL-6 (Mudter et al., 2008) e outras citocinas pró inflamatórias e são resistentes a esclerose múltipla experimental (Brustle et al., 2007); •IRF-4 – Não está descrito no contexto da ELA; •Foi descrito o aumento de IL-6 no líquor (Terenghi et al., 2006), soro (Moreau et al., 2005) e pele (Ono et al., 2001) de pacientes com ELA; •Weydt et al (2004) demonstraram uma diminuição da secreção de IL-6 pelas microglias transgênicas P60 <i>in vitro</i>. Discutiram como um resultado surpreendente e usaram o diálogo microglia ativando astrócito através do TNFα e secretando IL-6 como hipótese.

Molécula/ Função	Gene relacionado/ Função	<i>Fold</i> na medula espinal SOD1 ^{G93A} / idade	Trabalhos relacionados/Idéias principais
<p>VEGF Angiogênese, permeabilidade vascular e proliferação glial, e recentemente outras funções como neuroproteção e neurogênese (Carmeliet 2000).</p>	<p>VEGFA: importante para a formação de vasos sanguíneos e durante o desenvolvimento.</p>	<p>- 1,08 em 40 dias</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Durante o processo de neurodegeneração aumenta a proliferação astrogliar e microglial através da sinalização dos receptores VEGFR-1 (Boer et al., 2008); • VEGF retarda a degeneração dos neurônios motores em ratos com ELA (Van Damme, 2009); • A expressão VEGF é diminuída nos neurônios sobreviventes na ELA (Brockington et al., 2006) e seus níveis são reduzidos em 50% no soro de pacientes com ELA (Lambrechts et al., 2003); • Tovar-y-Romo e Tapia (2012) mostraram que a administração do VEGF antes ou após o início dos sintomas da doença foi capaz de prevenir a morte neuronal; • Camundongos SOD1^{G93A} com inibição do <i>VEGFA</i> apresentaram animais com degeneração de motoneurônios mais graves e com curta expectativa de vida (Lambrechts et al., 2003); • Camundongos com <i>VEGFA</i> silenciado são modelos experimentais para ELA (Lambrechts et al., 2003); • Ainda não há registros na literatura que quantificaram VEGF secretado pelos astrócitos ou microglias na ELA.
	<p>VEGFB: Apresenta função na formação e manutenção de novos vasos sanguíneos durante processos patológicos, tem importância na proteção de diversos tipos de neurônios como retina, córtex e neurônios motores na ELA (Poesen et al, 2008; Zhang et al 2009).</p>	<p>- 1,31 em 80 dias</p>	

ANEXO D- Genes selecionados a partir dos resultados do microarray para quantificação da expressão gênica nos astrócitos

Gene/ Função	Fold na medula espinal SOD1 ^{G93A} / idade	Trabalhos relacionados/Idéias principais
<p>AKAP13</p> <p>É induzida pelo TLR2 para ativar a via NF-KappaB e direcionar o local e a resposta imunológica específica (Kim et al., 2011); coordena a via da Rho (Diviani et al., 2001).</p>	<p>+ 1,55 em 40 dias</p> <p>+ 2.62 em 80 dias</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Há pouca informação na literatura sobre a expressão de <i>AKAP13</i> em microglia, astrócitos e macrófagos; • <i>AKAP13</i> está diretamente relacionada com inflamação. Receptores <i>toll like</i> (TLR) são reguladores essenciais da imunidade inata, iniciando uma cascata cumulativa na ativação do fator de transcrição do NF-KappaB (Matsumoto et al., 2003). • Outra função conhecida da <i>AKAP13</i> é de ser uma proteína que coordena a via da Rho (Diviani et al., 2001). Essa via é composta principalmente pelas moléculas Cdc42, Rac1 e RhoA. Tais moléculas participam da organização do citoesqueleto e da adesão célula/matriz extracelular (Jones et al., 2000), participando da mobilidade celular. A <i>AKAP13</i> é ativada por moléculas extracelulares como proteínas G para regular a actina e o citoesqueleto, se tornando essencial para induzir a migração celular (Mayers et al., 2010); • A <i>AKAP13</i> é ativada por moléculas extracelulares e regula a actina e o citoesqueleto, se tornando essencial para induzir a migração celular (Mayers et al., 2010); • <i>AKAP13</i> não foi explorado no contexto da ELA.

Gene/ Função	<i>Fold</i> na medula espinal SOD1^{G93A} / idade	Trabalhos relacionados/Idéias principais
<p><i>HIPK3</i></p> <p>Regula a fosforilação da FADD, fator essencial para ativação da apoptose; confere resistência à apoptose (Curtin e Cotter, 2004).</p>	<p>- 2,37 em 80 dias</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Rochat-Steiner e colaboradores (2000) identificaram uma nova proteína quinase de interação Fas chamada FIST/HIPK3. Fas é o receptor de morte neuronal que sinaliza para apoptose e está associada à FADD. O FIST/HIPK3 fosforila a FADD, porém essa fosforilação parece não regular a apoptose. Apesar do ligante da Fas (FasL) ser um importante indutor de apoptose, o FIST/HIPK3 ativo impede a ativação JNK pelas FasL e confere resistência à apoptose; • A superexpressão de <i>HIPK3</i> inibe a ativação de JNK e diminui a apoptose via regulação da Fas (Curtin e Cotter, 2003); • Ainda não foi explorado no contexto da ELA.
<p><i>NKRF</i></p> <p>Codifica para a proteína NKRF, repressora do NF-KappaB (Feng et al., 2002).</p>	<p>+ 4,96 em 80 dias</p>	<ul style="list-style-type: none"> • O NF-KappaB é um fator requerido para transcrição de moléculas pró-inflamatórias, necessário para a imunidade inata e inflamação (Ma et al, 2011); • A inibição do NF-KappaB seletivamente em astrócitos não resultou em benefícios na progressão da ELA, apenas a diminuição dos processos inflamatórios (Crosio et al., 2011); • Foi reportado através de imunohistoquímica maior ativação do NF-KappaB em neurônios, astrócitos e microglias da medula espinal pós morte de pacientes com ELA (Sako et al., 2012); • O <i>NKRF</i> não foi estudado no contexto da ELA.

Gene/ Função	<i>Fold</i> na medula espinal SOD1^{G93A} / idade	Trabalhos relacionados/Idéias principais
<p><i>UBE2I</i> Participa do processo de sumoilação que é visto como uma pequena ubiquitinização levando à alteração na atividade protéica (Xu et al., 2009). Relacionada com regulação da proliferação e morte celular (Qin et al., 2011).</p>	<p>+ 2,04 em 80 dias +1,03 em 40 dias</p>	<ul style="list-style-type: none"> • O silenciamento do <i>UBE2I</i> por RNAi resultou em uma retenção citoplasmática da BCRA1, causando uma intensa proliferação celular (Qin et al., 2011); • Foi descrito por Akar e Feinstein (2009) que a sumoilação regula a expressão de NOS2 nos astrócitos. Foi demonstrado que a SUMO-Ubc9 reduz a ativação do promotor NOS2 nos astrócitos, portanto a diminuição da expressão de <i>UBE2I</i> nessas células aumenta a expressão de NOS2 e outros fatores inflamatórios tóxicos aos neurônios; • Não foi explorado no contexto da ELA.
<p><i>TGFA</i> Codifica para o fator de crescimento de transformação α (TGFα). Tem funções ligadas a diferenciação celular, proliferação neuronal e neuroproteção (Vieira, 2006).</p>	<p>-1,18 em 40 dias</p>	<ul style="list-style-type: none"> • A administração de TGFα no sítio da lesão da medula espinal de camundongos levou a proliferação astocitária, alteração na distribuição local destas células, crescimento axonal e penetração das mesmas na borda rostral da lesão (White et al., 2011); • Qu e colaboradores (2012) mostraram ativação microglial é acompanhada pela fosforilação do EGFR in vivo e <i>in vitro</i> modulando a resposta inflamatória após a lesão medular. E a inibição do EGFR reduz a ativação de microglia e astrócitos; • Não foi explorado no contexto da ELA.

Gene/ Função	<i>Fold</i> na medula espinal SOD1 ^{G93A} / idade	Trabalhos relacionados/Idéias principais
<p><i>NTF5</i> Codifica a NT-5. Sinalização pelos receptores p75 e TRKB (Banfield et al., 2001).</p>	<p>- 2,11 em 40 dias</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Todas as NT 3,4/5 apresentam mesma afinidade para se ligarem aos receptores p75. Porém, apresentam diferentes afinidades aos receptores Trk, e o receptor Trkb é o que apresenta maior afinidade para NT4/5 (Branfield et al., 2001). Ainda, as neurotrofinas podem se ligar simultaneamente aos receptores Trk e p75; • Os astrócitos podem dar suporte trófico e metabólico para os neurônios e regular crescimento de dendritos e guiamento axonal através da neurotrofina 5. As neurotrofinas liberadas pelos astrócitos podem também causar apoptose neuronal por ativação do receptor p75 na ausência dos receptores de ativação Trk (Blackburn et al., 2009); • Duberley et al(1997) analisaram secções cerebrais de neurônios corticais de pacientes pós morte com sALS e não observaram diferenças entre a intensidade de <i>NTF5</i> em relação aos controles; • Outro estudo mais recente mostrou aumento nos níveis de RNAm NT-4/5 no tecido muscular de pacientes com ELA durante a progressão da doença (Küst et al., 2002).