

Tesis Doctoral

# Investigación de la acción neuroprotectora de la eritropoyetina en modelos in vitro

Wenker, Shirley Denise

2012

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

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

Cita tipo APA:

Wenker, Shirley Denise. (2012). Investigación de la acción neuroprotectora de la eritropoyetina en modelos in vitro. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Wenker, Shirley Denise. "Investigación de la acción neuroprotectora de la eritropoyetina en modelos in vitro". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**  
**Departamento de Química Biológica**

## **Investigación de la acción neuroprotectora de la eritropoyetina en modelos *in vitro***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área Química Biológica

**Shirley Denise Wenker**

Director de Tesis: Dra. Alcira Nesse

Director Asistente de Tesis: Dra. Daniela Vittori

Consejero de Estudios: Dra. Elba Vazquez

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología Celular de la Eritropoyetina.  
Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.  
Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2012

**Dedico este trabajo a todas las personas  
que me acompañaron a lo largo de este recorrido**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco profundamente a la Dra. Alcira Nesse por su paciencia, apoyo y guía, permitiéndome realizar mi carrera de doctorado en su laboratorio.

Hago extensivo este agradecimiento a todo el equipo del Laboratorio de Fisiología Celular de la Eritropoyetina, Daniela Vittori, Renée Crisp, Mariana Callero, Daiana Vota y María Eugenia Chamorro. Gracias por su apoyo y por todo lo que me enseñaron.

También quisiera agradecer especialmente a Valeria, Luciana, Mario, Laura, Julio, Vanesa, Esteban, Daniel, Claudia y Rosanna, por haber compartido no sólo sus conocimientos, sino también sus experiencias de vida.

No quiero olvidarme de dar las gracias a todos los integrantes del Departamento de Química Biológica.

A mis padres. Gracias por el apoyo constante e incondicional y el ejemplo que me han dado de lucha y fortaleza.

A mi abuela Inés. Gracias por inundar mi niñez de flores y abrazos, de buñuelitos y tortas criollas. Gracias por tu amor.

A Lucila Gamarra, a mi amiga, a mi hermana del alma. Gracias por estar siempre. Gracias por los momentos de alegría y porque no, alguna vez de tristeza.

A Paula Tribelli. Compañera de estudios y amiga incondicional. Gracias por los grandes momentos en Serrano. Gracias por las risas y por las lágrimas. Gracias por estar en todo momento.

Tampoco no puedo dejar de agradecer en especial a Luciana Balboa, Laura González, Martiniano Ricardi y Marina Ruiz Grecco, a quienes agradezco el haber pasado momentos que nunca olvidaré.

Gracias a mi familia del alma, a Zulema, Edgardo, Mauricio, Natalia y los peques. Gracias por su cariño y amor incondicional.

A Virginia Gaveglio. Compañera de viajes y amiga. Gracias por las lindas charlas y los momentos compartidos.

Gracias a todos aquellos que me enseñaron, a su manera, a vivir.

¡Gracias a todos!

## RESUMEN

La supervivencia de las células neuronales depende de un estricto balance entre diversos factores pro y antiapoptóticos. La pérdida de este delicado equilibrio puede conducir a la muerte celular por apoptosis como se manifiesta en accidentes cerebro-vasculares y en enfermedades neurodegenerativas.

La muerte neuronal puede ocurrir en forma directa, donde el daño *per sé* induce la disminución del número de células viables o bien indirectamente, involucrando la activación de células de la glía, las cuales liberan citoquinas proinflamatorias, nitritos y especies reactivas del oxígeno, agentes causantes de la degeneración neuronal.

La deficiencia de oxígeno (hipoxia) en el sistema nervioso central es un factor de estrés que induce múltiples respuestas. A nivel celular, la exposición a hipoxia puede inducir una desregulación metabólica con pérdida de la homeostasis y muerte celular. Además, durante dicho proceso se desarrolla un microambiente proinflamatorio generado por la activación de la glía, lo cual afecta indirectamente a las células neuronales. Dado el impacto de las secuelas que pueden originarse, se desarrollaron diferentes líneas de investigación con el fin de prevenir el daño neuronal y sus consecuencias.

La eritropoyetina (Epo) es una citoquina pleiotrópica, originalmente definida por su rol en la eritropoyesis. Sin embargo, el hallazgo de receptores específicos en tejidos no hematopoyéticos, expandió su acción biológica y farmacológica. La utilización potencial de los efectos no hematopoyéticos de la eritropoyetina recombinante es uno de los aspectos más promisorios en la investigación de la acción farmacológica de esta hormona. De hecho, la Epo ha sido asociada a la prevención de apoptosis de células neuronales sometidas a agresiones tales como privación de nutrientes o factores de crecimiento.

Si bien se propone a la Epo como factor de protección celular frente a estímulos apoptóticos, poco se sabe acerca de la modulación de su acción en diferentes estadios de diferenciación neuronal. Por otro lado, resultados de investigaciones utilizando diversos modelos experimentales le han adjudicado a la Epo una acción antiinflamatoria, aunque aún se desconoce el rol que puede presentar este factor sobre la microglía ante un daño tisular.

En este trabajo se planteó, como objetivo general, el estudio del efecto modulador y/o neuroprotector de la Epo frente a daños inducidos por hipoxia y por otros estímulos.

Para el estudio de la acción antiapoptótica de Epo frente al daño por hipoxia se utilizó un modelo *in vitro* de cultivos de la línea de origen neuronal SH-SY5Y. Además de disminución de la viabilidad celular y aumento significativo de la apoptosis, la exposición a hipoxia indujo alteraciones morfológicas tales como disminución del área celular y pérdida de la adhesión celular en cultivos indiferenciados. Como resultado del pretratamiento de estos cultivos con Epo, fueron prevenidos los efectos de la posterior exposición a hipoxia. En esta acción antiapoptótica de la Epo se encontraron involucrados la vía mediada por PI3K y el incremento de los niveles de los factores antiapoptóticos Bcl-2 y Bcl-xL.

Actualmente, se reconoce que los mecanismos de muerte celular son marcadamente diferentes en el cerebro inmaduro y en desarrollo por lo que, en el siguiente paso de este trabajo se realizó una comparación de la acción de Epo entre estadios inmaduro y maduro de células de origen neuronal.

Los resultados obtenidos sugieren que la diferenciación celular, mediada por el agente diferenciador ácido retinoico (atRA), aumenta el umbral de resistencia celular ante diferentes agentes proapoptóticos, como staurosporina (STP), TNF- $\alpha$  o hipoxia. Este hallazgo se encontró asociado a la activación de la vía de supervivencia celular PI3K y a una regulación positiva del factor antiapoptótico Bcl-2, lo que explicaría, al menos parcialmente, la disminución de la susceptibilidad celular.

En los cultivos de células neuronales diferenciadas con atRA no se pudo detectar un efecto protector de la Epo frente a la exposición a STP. Esta observación coincidió, a su vez, con la ausencia de modulación de los factores Bcl-2 y Bcl-xL por Epo. Además, la acción de Epo fue afectada por la modulación negativa de la expresión de su receptor observada en los cultivos diferenciados por atRA.

Como se mencionó anteriormente, la inflamación se encuentra involucrada de manera crónica en enfermedades neurodegenerativas como también en procesos de isquemia cerebral y es una de las principales causas de muerte neuronal.

En base a trabajos previos en los que se reportó un efecto antiinflamatorio de la Epo en distintos tejidos, se investigó si la Epo podía presentar un efecto modulador en cultivos de células de microglía murina EOC-2 activados por hipoxia química y se estudió el comportamiento de la hormona frente a estímulos proinflamatorios.

No se observó un efecto antiinflamatorio clásico de Epo frente al estímulo de hipoxia química. Sin embargo, los resultados mostraron una acción directa de la Epo sobre la microglía incrementando los niveles de iNOS, enzima responsable de la síntesis de óxido nítrico. Además, la Epo mostró acción antioxidante previniendo la formación de especies reactivas de oxígeno e impidió la proliferación de las células de microglía inducida por hipoxia química en ausencia de Epo. Estos hallazgos sugieren que si bien la Epo no impide la activación de la microglía, podría reducir el daño potencial implicado, contrarrestando la inflamación a largo plazo mediante una acción antioxidante y antiproliferativa.

En base a los resultados obtenidos, resultó interesante investigar la acción de la Epo en modelos de interacción microglía-neurona. Se observó el efecto neuroprotector de Epo ante la exposición de cultivos de células neuronales SH-SY5Y a medios condicionados obtenidos en cultivos de microglia estimulados por hipoxia. Esta acción citoprotectora de Epo también fue observada en cultivos de las células neuronales expuestas a medios condicionados de cultivos de macrófagos (células RAW) estimulados con LPS-IFN $\gamma$ .

Los resultados obtenidos en este trabajo aportan nuevos conocimientos sobre la acción de la Epo sobre células neuronales y de microglia. Por un lado, la Epo presenta acción neuroprotectora ante el daño directo inducido en células indiferenciadas por diversos agentes proapoptóticos como también ante un ambiente proinflamatorio inducido por la activación, tanto de células de microglía como de macrófagos.

Si bien la Epo no presentó una acción antiinflamatoria clásica sobre la microglia, sí mostró un efecto antioxidante y antiproliferativo. De esta manera, se podría sugerir que la acción de la Epo atenuaría la activación de la microglía y, de esta forma, contribuiría a prevenir el desarrollo de un cuadro proinflamatorio mayor, disminuyendo el riesgo de la aparición de efectos perjudiciales para el sistema nervioso.

Dada la búsqueda constante de nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y la existencia de la eritropoyetina recombinante humana, el conocimiento de la acción antiapoptótica y moduladora de dicha hormona sobre células del sistema nervioso puede constituir un aporte importante a sus características terapéuticas ya conocidas.

## **TITLE: Neuroprotective action of erythropoietin in *in vitro* models**

### **SUMMARY**

Among the factors that support cell survival, erythropoietin (Epo) is well known as a growth factor that maintains the number of circulating erythrocytes primarily by preventing apoptosis of erythroid progenitors. However, its biological role has been expanded by the finding of specific receptors in non-hematopoietic tissues, such as endothelial and neuronal tissues. Evidence has shown that Epo exhibits neuroprotective effects *in vitro* against proapoptotic agents. In addition, *in vivo* studies in adult and neonatal animal models have revealed a neuroprotective action of exogenous Epo administration. In this work, we compared the protective action of Epo between immature and mature cultures of neuroblastoma cells. We found a neuroprotective action of Epo upon undifferentiated neuronal SH-SY5Y cells against cytotoxicity induced by staurosporine (STP), TNF- $\alpha$  or hypoxia. Our results suggest that Epo might repress neuronal apoptosis by activation of PI3K and JAK-2 signaling pathways upregulating the expression of the antiapoptotic factors Bcl-2 and Bcl-xL. On the other hand, SH-SY5Y cell differentiation by retinoic acid (atRA) caused cell resistance to the Epo action. Together, the results describing modulation of the signaling pathways activated by Epo and those observed in cultures with atRA suggest that differentiated cell resistance to Epo protection can be coupled to an altered response at the EpoR level.

During cerebral ischemia, hypoxia may not only cause neuronal cell injury in a direct way, since neuron-microglia interactions are important for neuronal viability. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that hypoxia can activate microglia cells, leading to proinflammatory reactions that contribute to create a stressing environment upon neighboring neurons. Because of the role of hypoxia in proinflammatory mechanisms in the nervous system, and the protective effect of Epo against a proinflammatory condition resembled by TNF- $\alpha$ , we investigated the role of the hormone in the dialogue between neuron and microglial cells. As the first line of defense, microglia play a critical role in the innate immune response of the central nervous system (CNS) but an excessive response to CNS injury induces microglial activation. Thus, it is likely that toxic inflammatory mediators produced by activated microglial cells under hypoxic conditions may exacerbate neuronal injury following cerebral ischemia. The next step in the current



research was the characterization of microglia activation. The murine EOC-2 cell line activated by chemical hypoxia induced by  $\text{CoCl}_2$  showed increased proinflammatory mediators (nitrites and  $\text{TNF-}\alpha$ ), reactive oxygen species (ROS), iNOS and Cox-2 modulation while cell proliferation data and PCNA stain demonstrated the mitogenic effect of chemical hypoxia. Pretreatment with Epo prevented the  $\text{CoCl}_2$  effect on cell proliferation and oxidative stress without changing nitrite production, iNOS protein expression or  $\text{TNF-}\alpha$  secretion.

Finally and taking into consideration the results obtained, it was interesting to investigate the effect of hypoxia upon the dialogue microglia-neuron. Conditioned media from activated microglial cells induced apoptosis of SH-SY5Y neuronal cells, effect that was abolished by Epo. Neuroprotection by this cytokine was also demonstrated against the cytotoxic effect of conditioned media obtained from activated macrophages (RAW 264.7 cell line). These results show that even though Epo did not exert a direct antiinflammatory effect upon microglial activation it did increase the resistance of neurons to subsequent damage derived from a proinflammatory environment.

In conclusion, our results suggest that Epo protects neuronal cells from direct injuries as well as from the indirect damage caused by cytotoxic agents produced from microglia activation. The demonstrated antioxidant and antiapoptotic ability of Epo could contribute to consider this agent as a neuroprotective factor.

## Difusión de resultados

Parte de los resultados incluidos en la presente Tesis Doctoral han dado origen a las siguientes publicaciones:

- **Wenker SD**, Chamorro ME, Vota DM, Callero MA, Vittori DC, Nesse AB.

**Differential antiapoptotic effect of erythropoietin on undifferentiated and retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells.** J Cell Biochem. 110(1):151-61. 2010

- Pregi N, **Wenker S**, Vittori D, Leirós CP, Nesse A.

**TNF-alpha-induced apoptosis is prevented by erythropoietin treatment on SH-SY5Y cells.** Exp Cell Res. Feb 1;315(3):419-31. 2009

El siguiente trabajo fue enviado para su publicación:

- **Wenker SD**, Chamorro ME, Vittori DC, Nesse AB.

**Effects of erythropoietin upon activation of microglial cells and neuronal damage.**

Enviado a *Neurochemistry International*. En etapa de revisión.

## ÍNDICE

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>Muerte celular programada: función fisiológica y neurodegeneración</b>	<b>2</b>
<b>Muerte celular programada</b>	<b>2</b>
<b>Proceso apoptótico</b>	<b>2</b>
<b>Mecanismo de la muerte por apoptosis</b>	<b>3</b>
<b>Apoptosis y su relación con patologías neurodegenerativas</b>	<b>5</b>
<b>Inflamación</b>	<b>6</b>
<b>Glía y su rol en el proceso inflamatorio</b>	<b>6</b>
<b>Astrocitos</b>	<b>7</b>
<b>Microglía</b>	<b>7</b>
<b>Hipoxia y muerte neuronal</b>	<b>8</b>
<b>Eritropoyetina</b>	<b>10</b>
<b>Historia</b>	<b>11</b>
<b>Características estructurales de la eritropoyetina</b>	<b>12</b>
<b>Biosíntesis de la eritropoyetina</b>	<b>13</b>
<b>Fisiología de la eritropoyetina</b>	<b>13</b>
<b>Eritropoyesis</b>	<b>13</b>
<b>Acción de eritropoyetina en tejidos no hematopoyeticas</b>	<b>14</b>
<b>Acción antiapoptótica</b>	<b>14</b>
<b>Acción antioxidante</b>	<b>15</b>
<b>Eritropoyetina en procesos inflamatorios</b>	<b>15</b>
<b>Mecanismo de acción de la eritropoyetina</b>	<b>16</b>
<b>Acción farmacológica de la eritropoyetina</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>22</b>
<b>I. Equipos</b>	<b>23</b>
<b>II. Reactivos</b>	<b>23</b>
<b>II-a. Reactivos</b>	<b>24</b>
<b>II-b. Reactivos específicos</b>	<b>24</b>
<b>II-c. Anticuerpos</b>	<b>24</b>

<b>III. Líneas celulares y condiciones de cultivo</b>	<b>25</b>
<b>III-a. Líneas celulares</b>	<b>25</b>
III-a.i. Línea SH-SY5Y	25
III-a.ii. Línea EOC-2	25
III-a.iii. Línea LADMAC	25
III-a.iv. Línea RAW 264.7	26
<b>III-b. Soluciones y materiales de cultivo</b>	<b>26</b>
III-b i. Medios de cultivo	26
III-b ii. Agentes suplementarios de medios de cultivo	26
<b>III-c. Mantenimiento y desarrollo de cultivos celulares</b>	<b>27</b>
III-c.i. Línea SH-SY5Y	27
III-c.ii. Línea EOC-2	27
III-c.iii. Línea LADMAC	27
III-c.iv. Línea RAW 264.7	27
III-c.v. Optimización de la obtención del medio condicionado LADMAC para la línea celular EOC-2	28
<b>III-d. Criopreservación</b>	<b>29</b>
III-d. i. Procedimiento de congelación	29
III-d. ii. Procedimiento de descongelación	30
<b>IV. Diferenciación celular de la línea SH-SY5Y</b>	<b>31</b>
<b>IV-a. Cambios morfológicos debidos a la diferenciación celular</b>	<b>31</b>
IV-a. i. Desarrollo de neuritas	31
IV-a. ii. Recuento de células diferenciadas	32
<b>IV-b. Análisis de marcadores de diferenciación</b>	<b>32</b>
<b>IV-c. Optimización de la inducción de diferenciación de las                 células SH-SY5Y por ácido retinoico</b>	<b>32</b>
<b>V. Inductores de muerte celular</b>	<b>33</b>
i) Staurosporina	33
ii) TNF- $\alpha$	34
iii) Hipoxia	34
iv) Obtención de medios condicionados	35
<b>VI. Exposición de cultivos de microglía a factores proinflamatorios</b>	<b>36</b>

VI-a. Agentes proinflamatorios	36
VI-a. i. Lipopolisacárido	36
VI-a. ii. TNF- $\alpha$	36
VI-a. iii. IFN $\gamma$	36
VI-a. iv. Hipoxia química	36
VII. Caracterización de la activación de microglía	37
VII-a. Proliferación celular	37
VII-b. Mediadores proinflamatorios	37
VII-b.i. Cuantificación de nitritos	37
VII-b.ii. Cuantificación de TNF- $\alpha$	37
VII-b.iii. Análisis del estado redox intracelular mediante la cuantificación de ROS	38
VIII. Estudio de la participación de vías de señalización	38
VIII-a. Inhibidores Ly-294002 y AG-490	38
IX. Análisis de las características morfológicas de las células	39
IX-a. Cuantificación del área celular	39
IX-b. Microscopía electrónica de barrido (MEB)	39
X. Análisis de la viabilidad y proliferación celular	40
X-a. Ensayo de exclusión del colorante azul Tripán	40
X-b. Ensayo de MTT	40
X-c. Tinción con yoduro de propidio y naranja de acridina	40
XI. Evaluación de la muerte celular por apoptosis	41
XI-a. Recuento de células apoptóticas después de tinción con colorante de Hoechst	41
XI-b. Detección de clivaje de PARP	42
XI-c. Recuento de células apoptóticas por anexina V/yoduro de propidio	42
XII. Análisis de la expresión génica por RT-PCR y <i>Real time</i> PCR	42
XII-a. Extracción de ARN	42
XII-b. Reacción de retro-transcripción	43
XII-c. Amplificación de fragmentos de ADNc por PCR	43
XII-d. Observación de los fragmentos amplificados	46

XII-e. Calidad y tratamiento del material	46
XIII. Detección proteica por electroforesis y <i>Western blotting</i>	47
XIII-a. Lisis celular	47
XIII-a.i. Cultivos SH-SY5Y	47
XIII-a.ii. Cultivos EOC-2.	47
XIII-b. Inmunoprecipitación	47
XIII-c. Desarrollo electroforético	48
XIII-d. Transferencia eléctrica e inmunodetección	48
XIII-e. <i>Stripping y reprobing</i>	49
XIV. Análisis por inmunofluorescencia indirecta	49
XIV-a. PCNA y receptor de eritropoyetina en cultivos EOC-2	49
XIV-a.i. Análisis de imágenes	50
XIV-b. Detección de NF-L	50
XV. Análisis del potencial de membrana mitocondrial de células SH-SY5Y mediante inmunofluorescencia	50
XVI. Estadística	51
XVII. Descarte del material biológico y residuos peligrosos	51
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>52</b>
I. Efecto de la exposición de células neuronales indiferenciadas a condiciones de hipoxia	53
I-a. Efecto citotóxico de la exposición de cultivos SH-SY5Y indiferenciados a condiciones de hipoxia	53
II. Efecto de la eritropoyetina sobre células neuronales en estadio indiferenciado inducidas a apoptosis	57
II-a. Acción protectora de la eritropoyetina en cultivos SH-SY5Y expuestos a hipoxia	57
II-b. Modulación de factores de la familia Bcl-2 por eritropoyetina en cultivos neuronales inmaduros	62
III. Influencia de la diferenciación en la respuesta de células neuronales a hipoxia ambiental	65
III-a. Caracterización de diferenciación neuronal de células SH-SY5Y por el agente ácido retinoico	65
III-b. Resistencia celular ante la exposición a condiciones de	68

hipoxia ambiental en cultivos SH-SY5Y diferenciados con atRA	
<b>IV. Efecto de la eritropoyetina en cultivos de células neuronales diferenciadas</b>	<b>71</b>
IV-a. Eritropoyetina y diferenciación celular	71
IV-b. Acción de la eritropoyetina en cultivos diferenciados con atRA	72
<b>V. Estudio de la susceptibilidad celular de cultivos en distintos estadios de madurez</b>	<b>74</b>
V-a. Diferenciación y supervivencia celular	74
V-b. Diferenciación y supervivencia celular. Factores involucrados	75
<b>VI. Mecanismos de acción de eritropoyetina sobre células neuronales indiferenciadas y diferenciadas</b>	<b>78</b>
VI-a. Efecto de la eritropoyetina en cultivos indiferenciados y diferenciados expuestos a agentes citotóxicos	78
VI-b. Análisis de modulación de los genes Bcl-2 y Bcl-xL por eritropoyetina en cultivos neuronales maduros	79
VI-c. Regulación de la vía del receptor de eritropoyetina en cultivos neuronales inmaduros y maduros	80
<b>CONCLUSIONES PARCIALES Y DISCUSIÓN</b>	<b>83</b>
<b>VII. Activación de cultivos de células de microglía</b>	<b>87</b>
VII-a. Caracterización de la activación de la microglía	87
Mediadores proinflamatorios: determinación de nitritos	88
VII-b. Análisis de iNOS en condiciones de hipoxia	88
VII-c. Regulación por hipoxia de otros mediadores proinflamatorios	90
VII-d. Proliferación y actividad celular	91
<b>VIII- Efecto de la eritropoyetina en la activación de la microglía</b>	<b>93</b>
VIII-a. Expresión del receptor de eritropoyetina en la línea murina de microglía EOC-2	93
VIII-b. Efecto de la eritropoyetina sobre la activación de la microglía inducida por hipoxia	94
VIII-c. Efecto de la eritropoyetina sobre la proliferación celular producida durante la activación de la microglía por hipoxia	97
VIII-d. Efecto de la eritropoyetina sobre el estrés oxidativo generado por activación de la microglía	98



<b>CONCLUSIONES PARCIALES Y DISCUSIÓN</b>	<b>101</b>
<b>IX. Diálogo glía-neurona. Acción de la eritropoyetina</b>	<b>105</b>
<b>IX-a. Acción de la activación de la microglía sobre cultivos de origen neuronal</b>	<b>105</b>
<b>IX-b. Obtención y caracterización de medios condicionados de cultivos de microglía activada</b>	<b>105</b>
<b>IX-c. Activación de macrófagos murinos por agentes proinflamatorios y acción sobre células neuronales</b>	<b>108</b>
<b>X. Acción de la eritropoyetina frente a un ambiente proinflamatorio</b>	<b>111</b>
<b>CONCLUSIONES PARCIALES Y DISCUSIÓN</b>	<b>116</b>
<b>CONCLUSIONES FINALES</b>	<b>120</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>124</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

## INTRODUCCIÓN

Figura 1. Representación de distintas vías de muerte celular programada	5
Figura 2. Representación de los efectos directo e indirecto del daño tisular sobre la neurona por hipoxia	10
Figura 3: Esquema estructural de la eritropoyetina	11
Figura 4: Vías de señalización activadas por eritropoyetina	17

## MATERIALES Y METODOS

Figura III.1. Análisis del crecimiento de macrófagos peritoneales expuestos al medio condicionado LADMAC	29
Figura IV.1. Fórmula estructural bidimensional (2D) del ácido trans-retinoico	31
Figura IV.2. Análisis de la viabilidad celular de cultivos SH-SY5Y expuestos a diferentes concentraciones de atRA	33
Figura V.1. Fórmula estructural bidimensional (2D) de la staurosporina	34
Figura V.2. Control de generación de hipoxia. Determinación de los niveles de oxígeno disuelto en medio de cultivo y detección del marcador HIF-1 $\alpha$ en células SH-SY5Y	35
Figura VI.1. Análisis de la viabilidad celular de cultivos EOC-2 expuestos a diferentes agentes proinflamatorios	36
Figura VIII.1. Fórmula estructural bidimensional (2D) de los inhibidores Ly-294002 y AG-490	39

## RESULTADOS

Figura I.1. La exposición a hipoxia produce alteraciones morfológicas en cultivos indiferenciados de células SH-SY5Y	54
Figura I.2. La exposición a hipoxia disminuye la viabilidad celular de células SH-SY5Y	55
Figura I.3. La exposición a hipoxia induce muerte celular por apoptosis en cultivos de células SH-SY5Y	56
Figura II.1. Eritropoyetina previene las alteraciones morfológicas inducidas por hipoxia. Análisis morfológico por microscopía óptica	58
Figura II.2. Eritropoyetina previene el efecto de la hipoxia sobre	59

la viabilidad celular	
Figura II.3. Eritropoyetina previene alteraciones morfológicas. Análisis por MEB	60
Figura II.4. Eritropoyetina previene la muerte por apoptosis de células neuronales expuestas a hipoxia	61
Figura II.5. La eritropoyetina previene alteraciones del potencial de membrana mitocondrial inducidas por hipoxia	62
Figura II.6. Eritropoyetina modula positivamente los factores antiapoptóticos Bcl-2 y Bcl-xL en cultivos de células SH-SY5Y indiferenciadas	64
Figura II.7. Eritropoyetina activa la vía PI3K	65
Figura III.1. Análisis morfológico de células SH-SY5Y. Curvas de concentración y de tiempo del diferenciador ácido retinoico	66
Figura III.2. Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido de células SH-SY5Y diferenciadas	67
Figura III.3. Ácido retinoico induce diferenciación celular en cultivos SH-SY5Y hacia un estadio neuronal maduro	68
Figura III.4. La exposición a hipoxia produce alteraciones morfológicas en cultivos diferenciados	69
Figura III.5. Los cultivos SH-SY5Y diferenciados con ácido retinoico muestran resistencia frente a su exposición a hipoxia	70
Figura III.6. Células SH-SY5Y diferenciadas con ácido retinoico muestran resistencia a la apoptosis inducida por hipoxia	70
Figura IV.1. Eritropoyetina no induce diferenciación neuronal	71
Figura IV.2. La eritropoyetina no previene las alteraciones morfológicas causadas por hipoxia en células maduras	72
Figura IV.3. Eritropoyetina no protege del daño por hipoxia a las células diferenciadas con ácido retinoico	73
Figura V.1. Comportamiento diferencial de cultivos indiferenciados y diferenciados ante agentes proapoptóticos	75
Figura V.2. El ácido retinoico modula positivamente la expresión del factor antiapoptótico Bcl-2	76
Figura V.3. La vía PI3K se encuentra involucrada en la supervivencia celular de células diferenciadas por ácido retinoico	77
Figura VI.1. Efecto de la eritropoyetina en cultivos de células SH-SY5Y diferenciadas con ácido retinoico ante la exposición a agentes proapoptóticos	78
Figura VI.2. Eritropoyetina y modulación de genes de la familia Bcl-2 en células SH-SY5Y diferenciadas con ácido retinoico	79

Figura VI.3. Estudio de la vía JAK-2 en cultivos inmaduros y maduros de células SH-SY5Y	81
Figura VI.4. La expresión del receptor de eritropoyetina se encuentra disminuida en cultivos de SH-SY5Y diferenciados con ácido retinoico	81
Figura VII.1. Activación de la microglía por factores proinflamatorios. Producción de nitritos	88
Figura VII.2. Cinética de la modulación de iNOS por hipoxia química	89
Figura VII.3. Modulación de iNOS por hipoxia química	90
Figura VII.4. Modulación de COX-2, TNF- $\alpha$ y ROS por hipoxia química	91
Figura VII.5. Caracterización de la activación de cultivos de microglía. Proliferación celular	92
Figura VIII.1. Expresión del receptor de eritropoyetina en cultivos de microglía	93
Figura VIII.2. Efecto de la eritropoyetina sobre la proliferación de cultivos de microglía	94
Figura VIII.3. Efecto de la eritropoyetina sobre la activación de la microglía. Modulación de iNOS y producción de nitritos	95
Figura VIII.4. Efecto de la eritropoyetina sobre la modulación de la producción de TNF- $\alpha$ durante la activación de la microglía	95
Figura VIII.5. La producción de nitritos por eritropoyetina es mediada por la vía de señalización de PI3K	96
Figura VIII.6. Efecto de la eritropoyetina sobre la proliferación celular inducida durante la activación de la microglía	97
Figura VIII.7. Efecto antiproliferativo de la eritropoyetina	98
Figura VIII.8. Efecto antioxidante de la eritropoyetina	99
Figura VIII.9. Balance redox y proliferación celular	100
Figura IX.1. Caracterización de los medios condicionados de microglía activada en función de su efecto sobre los cultivos de células neuronales	106
Figura IX.2. Efecto de la activación de la microglía por hipoxia sobre cultivos de células neuronales SH-SY5Y	107
Figura IX.3. Activación de macrófagos por factores proinflamatorios	109
Figura IX.4. Toxicidad del medio condicionado de cultivos de células RAW activados sobre la viabilidad de células SH-SY5Y	110
Figura X.1. Efecto neuroprotector de la eritropoyetina frente a la	111

exposición a medios condicionados de microglía activada	
Figura X.2. Fotografía de células SH-SY5Y teñidas con colorante de Hoechst	<b>112</b>
Figura X.3. Efecto neuroprotector de la eritropoyetina frente a la exposición a medios condicionados de microglía activada	<b>113</b>
Figura X.4. Efecto neuroprotector de la eritropoyetina en cultivos expuestos a medio condicionado de macrófagos activados	<b>114</b>
Figura X.5 Efecto del pretratamiento de células de microglía con eritropoyetina antes de su activación y obtención de medios condicionados a los que fueron expuestas células neuronales	<b>115</b>

## **TABLAS**

Tabla 1: Densidad celular empleada en el protocolo de congelación para cada línea	<b>30</b>
Tabla 2: Secuencia de los <i>primers</i> empleados para el análisis de la expresión génica	<b>44</b>
Tabla 3: Protocolo de amplificación	<b>45</b>
Tabla 4: Diluciones de los anticuerpos empleados para <i>Western blotting</i>	<b>49</b>
Tabla 5: Anticuerpos empleados para inmunofluorescencia indirecta	<b>50</b>

## **ABREVIATURAS**

## ABREVIATURAS

ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
AG	AG-490
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
atRA	ácido retinoico ( <i>All trans retinoic acid</i> )
BCL-2	<i>B-cell leukaemia/lymphoma-2</i>
BSA	albúmina sérica bovina
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CoCl <sub>2</sub>	cloruro de cobalto
DCF	2,7 diclorofluorescina
DEPC	dietil pirocarbonato
DMEM	<i>"Dulbecco's Modified Eagle Medium"</i>
DMSO	dimetil sulfóxido
Epo	eritropoyetina
EDTA	ácido Na-etilenodiaminatetra-acético
EGTA	ácido Na-etilenoglicol-bi(-aminoetiléter)-N,Ntetraacético
GAPDH	gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
HIF-1 $\alpha$	factor inducible por hipoxia alfa ( <i>Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha</i> )
Hoechst N* 33258	Trihidroclorhidrato de (2'-[4-Hidroxifenil]-5-[4-metil-1-pipetrazinil]-2,5'-bi-1H benzimidazol)

iNOS	isoforma óxido nítrico sintasa inducible (sigla en inglés iNOS de <i>inducible nitric oxide synthase</i> )
IFN $\gamma$	Interferón gamma
JAK	<i>Janus</i> quinasa
Ly	Ly294002
LPS	Lipopolisacárido
M-CSF	factor estimulador de colonias de macrófagos
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
MAP-2	<i>Microtubule-associated protein 2</i>
MEB	microscopía electrónica de barrido
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NAC	N-acetil-cisteína
NC	membrana de nitrocelulosa
NF-KB	<i>Nuclear factor Kappa B</i>
PARP	<i>Poly-ADP-ribose-polymerase</i>
pb	pares de bases
PBS	<i>buffer</i> fosfato salino
PMSF	fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
PS	fosfatidilserina
REpo	receptor de eritropoyetina
RHuEpo	eritropoyetina recombinante humana



ROS	especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	PCR por transcripción reversa ( <i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i> )
SBTI	inhibidor de tripsina
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
SEM	error estándar de la media
SFB	suero fetal bovino
STAT5	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
STP	staurosporina
TBS	buffer Tris salino
TBS-T	buffer Tris salino Twenn
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
Tm	temperatura de <i>melting</i>
TNF- $\alpha$	factor de necrosis tumoral alfa ( <i>Tumour necrosis factor alfa</i> )
Trizol	Reactivo de fenol e isotiocianato de guanidina

# INTRODUCCIÓN

## I. Muerte celular programada

### Función fisiológica y neurodegeneración

---

#### I-a. Muerte celular programada

La muerte celular programada o apoptosis es un mecanismo genéticamente programado y energéticamente dependiente (Elmore *et al*, 2007).

A nivel fisiológico, este proceso es fundamental durante el desarrollo y mantenimiento tisular (Paschos *et al*, 2008; Budd *et al*, 2000). La apoptosis interviene, por ejemplo, durante el desarrollo del sistema nervioso central de vertebrados, en donde se produce una pérdida de más del 50% de la masa celular con la finalidad de ajustar la población de neuronas invadoras a la cantidad de tejido que requiere de inervación (Benn *et al*, 2004). A su vez, la muerte celular programada es importante para la eliminación de células superfluas, dañadas, infectadas o transformadas, las cuales representan un riesgo para la integridad del organismo (Hail *et al*, 2006).

Sin embargo, la inducción inadecuada de este tipo de muerte celular a raíz de un desbalance bioquímico durante condiciones patológicas, tales como síndrome autoinmune, daño isquémico o enfermedades neurodegenerativas, resulta en una disfunción tisular (Elmore *et al*, 2007; Paschos *et al*, 2008).

El análisis de los mecanismos celulares y de las vías de señalización que regulan la vida o la muerte de una célula constituye un potencial terapéutico de alta relevancia (Elmore *et al*, 2008).

#### Proceso apoptótico

El proceso denominado apoptosis es un programa de muerte celular estrictamente controlado que necesita de una interrelación entre múltiples factores. La célula posee todos los componentes necesarios para la regulación de la muerte celular programada y tanto la prevención como la inducción de la apoptosis son el resultado de un balance entre señales anti y proapoptóticas intrínsecas de la célula, las cuales se encuentran controladas por factores externos (Kumar *et al*, 2004). La naturaleza de dichos factores es variada. Por un lado se encuentran aquellos elementos que favorecen la supervivencia

celular, como los factores de crecimiento y algunas hormonas, mientras que por otro lado citoquinas proinflamatorias, estrés oxidativo, efectores citotóxicos y daños irreversibles en el material genético constituyen factores proapoptóticos (Benn *et al*, 2004).

Las células apoptóticas pueden ser reconocidas por cambios morfológicos típicos: contracción celular y aumento de la densidad intracelular por salida de líquido e iones intracelulares, así como cambios en la composición de la membrana plasmática que llevan a la formación de “cuerpos apoptóticos”. Además, las células sufren alteración del citosol, agregación de mitocondrias y ribosomas, condensación y fragmentación de la cromatina (Dean, 2008). Los cuerpos apoptóticos son captados por los macrófagos y, de esta forma, son removidos del tejido sin inducir una respuesta inflamatoria (Gewies, 2003).

### **Mecanismo de muerte por apoptosis**

#### **Vías del proceso apoptótico: intrínseca y extrínseca**

El proceso de activación de muerte celular programada se puede desarrollar por dos vías, extrínseca e intrínseca.

La vía extrínseca es mediada por la activación de receptores de muerte, los cuales se caracterizan por presentar un dominio de muerte (DD, *death domains*). La activación de este tipo de receptores inicia el reclutamiento y activación de caspasas iniciadoras de la eventual muerte celular (Donovan *et al*, 2004; Benn *et al*, 2004; Dean, 2008).

La vía mitocondrial o intrínseca es mediada por daños a nivel de la mitocondria. Las causas que pueden provocar dicho evento son de naturaleza variada, destacándose el estrés oxidativo, radiaciones ionizantes y alteración de la homeostasis del calcio, entre otras (Benn *et al*, 2004; Donovan *et al*, 2004). La vía intrínseca de activación se caracteriza por una disminución en el potencial de la membrana mitocondrial, acompañada por la liberación de proteínas (citocromo c, SMAC/DIABLO, *apoptosis-inducing factor-AIF*) desde dicha organela hacia el citosol, las cuales generan la activación de una cascada proteolítica, mediada, generalmente, por caspasas (Benn *et al*, 2004; Dean, 2008).

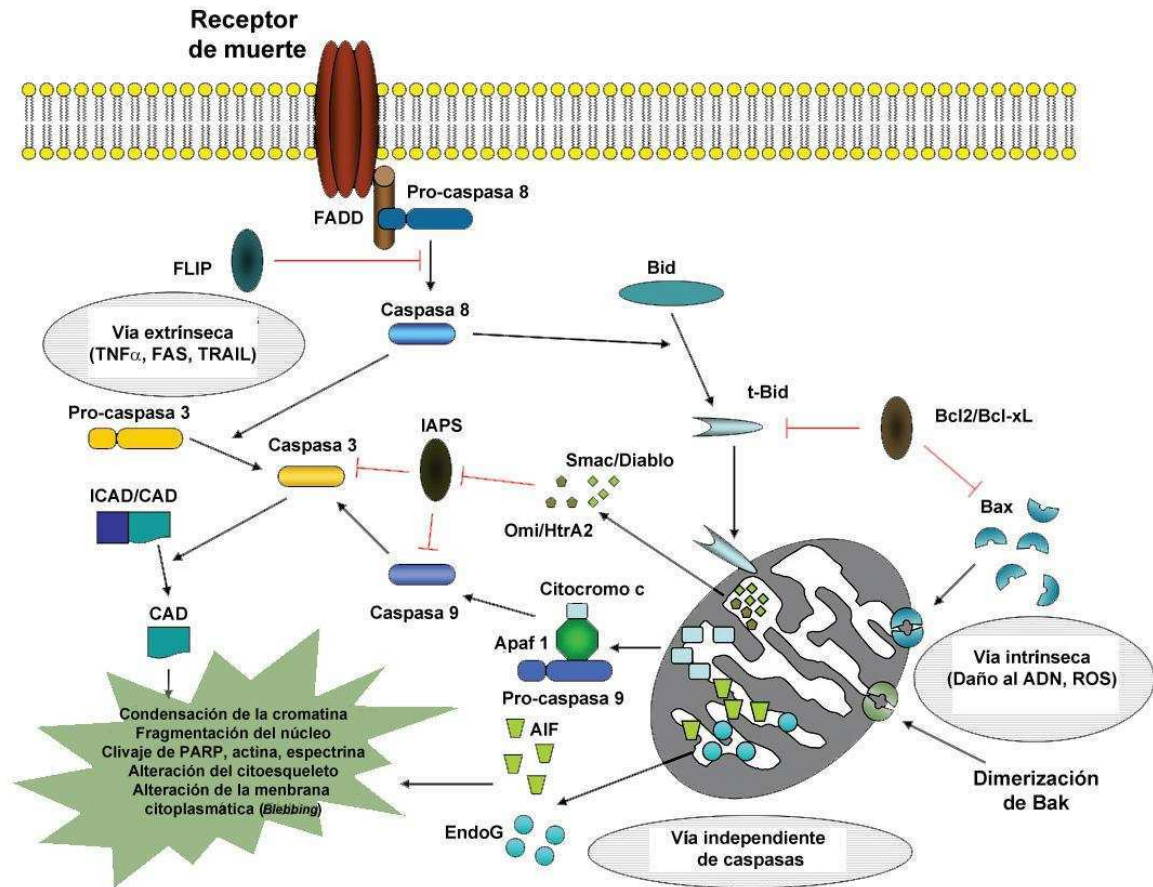
Una vez activado el proceso apoptótico, la interacción entre los diferentes integrantes de cada vía, extrínseca e intrínseca, logra incrementar el efecto letal (Johnson *et al*, 2000; Zhao *et al*, 2001).

La decisión de morir por parte de la célula, depende de la localización subcelular de los miembros de la familia Bcl-2 (*B-cell leukaemia/lymphoma-2*) (Benn *et al*, 2004). Esta familia se encuentra conformada por miembros pro y antiapoptóticos, los cuales ejercen efectos opuestos sobre la integridad de la mitocondria. Mientras que los factores proapoptóticos afectan la permeabilidad de la mitocondria, sus antagonistas preservan la integridad de dicha organela, impidiendo la liberación de proteínas solubles involucradas en la activación de caspasas efectoras (Benn *et al*, 2004; Donovan *et al*, 2004).

Hasta el momento han sido identificados al menos 25 genes pertenecientes a la familia génica Bcl-2. A nivel estructural, esta familia presenta cuatro dominios conservados, denominados BH (*Bcl-2 homology domains*) (Elmore *et al*, 2007).

Entre los factores antiapoptóticos se encuentran Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xL, Bcl-xS, Bcl-w y BAG, mientras que entre los agentes proapoptóticos se destacan Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik y Blk (Elmore *et al*, 2007). Estas proteínas cumplen un rol importante, dado que pueden determinar la supervivencia o la muerte de la célula.

El mecanismo por el cual los factores de la familia Bcl-2 actúan sobre la integridad de la mitocondria se encuentra aún en discusión. Uno de los caminos propuestos para la inducción del proceso de muerte celular involucra la oligomerización de factores proapoptóticos como Bax, con el fin de facilitar la liberación de citocromo c. Este proceso podría ser prevenido por Bcl-2 induciendo la inhibición de la oligomerización de Bax junto con el accionar de otros factores proapoptóticos (Budd *et al*, 2000; Zhao *et al*, 2001; Donovan *et al*, 2004). Mientras que un modelo de apoptosis propone que los miembros de la familia Bcl-2 controlarían directamente la activación de caspasas (Strasser, 2000), otro modelo postula que la principal acción de esos factores estaría relacionada con el mantenimiento de la integridad mitocondrial (Wang, 2001).



**Figura 1. Representación de distintas vías de muerte celular programada**

Ante un estímulo apoptótico, se inicia el proceso de muerte celular programada. Durante dicho proceso el volumen celular disminuye, se activan proteasas que se encargan de la degradación del material genético, produciendo, así, la desintegración del núcleo. En la fase final, se desorganiza el citoesqueleto y se forman cuerpos apoptóticos, los cuales serán fagocitados (Adaptación de Ghavami *et al*, 2012).

### I-b. Apoptosis y su relación con patologías neurodegenerativas

La desregulación de señales apoptóticas puede cumplir un rol importante en varias enfermedades.

En el tejido nervioso, la supervivencia de las células neuronales depende de un estricto balance entre diversos factores. Ha sido establecido que la apoptosis contribuye a la pérdida de neuronas en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas (enfermedades de Alzheimer y Parkinson, entre otras). Además, se ha observado que la muerte por apoptosis contribuye negativamente a la neurodegeneración en accidentes cerebro-vasculares (Blomgren y Hagberg, 2006).

La asfixia perinatal, el infarto y la hemorragia cerebral son las causas más frecuentes de daño cerebral en neonatos. Luego de ocurrido el daño, se inicia un proceso que involucra la liberación al medio de agentes neurotóxicos. Con el fin de prevenir dicho daño secundario, se ha planteado el desarrollo de agentes neuroprotectores para su uso luego de un daño primario (McPherson *et al*, 2007).

## II. Inflamación

---

La inflamación es una respuesta de defensa del organismo que se desarrolla ante un daño tisular de carácter mecánico, una enfermedad autoinmune o un cuadro infeccioso. El proceso de inflamación puede presentar tanto efecto beneficioso como perjudicial. Mientras que la inflamación puede contribuir a la eliminación de patógenos y restos celulares, así como a la reparación celular, dicho proceso puede presentar efectos secundarios de carácter perjudicial para el tejido (Brown *et al*, 2010; Kaur *et al*, 2008; Kim *et al*, 2008; Sun *et al*, 2005).

En una amplia variedad de desórdenes agudos o crónicos del sistema nervioso central los procesos inflamatorios contribuyen al daño cerebral y al progreso de la enfermedad (Kim *et al*, 2008).

Existen evidencias que sugieren que la inflamación puede contribuir al progreso de neuropatologías agudas (meningitis, infarto y trauma cerebral) o crónicas (enfermedad de Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple). Las causas de cada una de estas patologías son distintas, si bien todas ellas presentan como denominador común el proceso de inflamación (Brown *et al*, 2010).

Se ha sugerido que en los procesos de inflamación en el sistema nervioso podrían estar involucrados diversos tipos celulares. Entre ellos se incluye a células de astrogliá y de microglía (Block *et al*, 2005).

### **Glía y su rol en el proceso inflamatorio**

Diversos trabajos han sugerido que el cerebro es un órgano que se encuentra protegido del sistema inmune mediante su compartimentalización y separación del sistema sanguíneo periférico por la barrera hematoencefálica. Sin embargo, diversas

enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por presentar un foco inflamatorio constituido por células propias del cerebro como también por leucocitos infiltrados provenientes del sistema circulatorio periférico. Por otro lado, no siempre se ha asociado la infiltración de leucocitos a neurotoxicidad, indicando que existe un rol importante por parte de la glía en la respuesta inflamatoria (Block *et al*, 2005).

La activación de células de la glía (particularmente, astrocitos y microglía) localmente en los sitios de la injuria se ha encontrado asociada con daño neuronal causado por numerosos factores de agresión contra el sistema nervioso central. Por ello se ha sugerido que las células gliales activadas constituyen un marcador histopatológico de un proceso neurodegenerativo (Wang *et al*, 2006)

### **Astrocitos**

Los astrocitos cumplen un rol fundamental en el mantenimiento de las células neuronales. Son consideradas células de soporte. Su función es mantener la homeostasis iónica, regular los niveles de neurotransmisores, secretar factores de crecimiento, así como también funcionar como un componente de la barrera hematoencefálica.

Los astrocitos se activan en respuesta a un daño tisular o a un estímulo inmunológico y pueden presentar una respuesta proinflamatoria. A su vez, producen factores tróficos para la supervivencia de las neuronas (Block *et al*, 2005).

### **Microglía**

La microglía es la primera línea de defensa del sistema nervioso central. Durante el desarrollo, células precursoras del linaje monocítico ingresan al tejido nervioso, para diferenciarse en células de microglía (Kaur *et al*, 2008). Desde el punto de vista funcional, las células de la microglía cumplen, en el sistema nervioso central, el rol de los macrófagos (Mander *et al*, 2006).

En condiciones normales, la microglía se encuentra en un estado quiescente, con una morfología caracterizada por presentar un soma celular de tamaño pequeño, con múltiples prolongaciones.

Ante un daño tisular, exposición a toxinas o infecciones, la microglía pasa a un estado activo, sufriendo cambios a nivel morfológico, como la retracción de los procesos



celulares, e incremento en el tamaño del cuerpo celular. Además, presenta una elevada capacidad proliferativa, fagocítica y migratoria. Las células adquieren la capacidad de sintetizar una variedad de mediadores como factores de crecimiento, quemoquinas y citoquinas, además de nitritos y especies reactivas del oxígeno, los cuales presentan una acción neurotóxica (Mander *et al*, 2006).

*In vivo*, se ha observado que el rol de la microglía en estado activado es controversial. Por un lado, presenta un rol protector caracterizado por la clarificación de restos celulares o *debris* y el *uptake* de glutamato, tóxico para las neuronas. Por otro lado, la microglía activada libera especies reactivas de oxígeno y mediadores proinflamatorios (Block y Hong, 2005; Turrin y Rivest, 2006).

Aún cuando el contacto de microglía con neuronas no necesariamente es tóxico *per sé*, existe una relación entre neurodegeneración y activación de la microglía. La supervivencia de la microglía es esencial para el mantenimiento del sistema nervioso central. Sin embargo, la desregulación de la activación de dicho tipo celular puede llevar a consecuencias deletéreas, dado que en ese estado, las células de la microglía liberan al medio factores que afectan tanto al crecimiento como a la supervivencia neuronal. Varios trabajos han demostrado que en este estado inflamatorio hay liberación de citoquinas proinflamatorias y aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, siendo ambos elementos los principales causantes de la degeneración neuronal durante procesos inflamatorios crónicos, así como también en accidentes cerebro vasculares (Kim *et al*, 2008). Es por ello que el estudio de agentes capaces de modular la activación de la microglía podría tener potencial importancia terapéutica.

### **III. Hipoxia y muerte neuronal**

---

El sistema nervioso central presenta una elevada sensibilidad a variaciones en la tensión de oxígeno y a la falta de glucosa. A nivel patológico, la hipoxia es un evento de relevancia a causa del daño tisular que puede causar. El estrés por hipoxia causa un desbalance metabólico por depleción de ATP, despolarización de la membrana citoplasmática, inapropiado *re-uptake* de glutamato y pérdida de la homeostasis iónica por parte de la

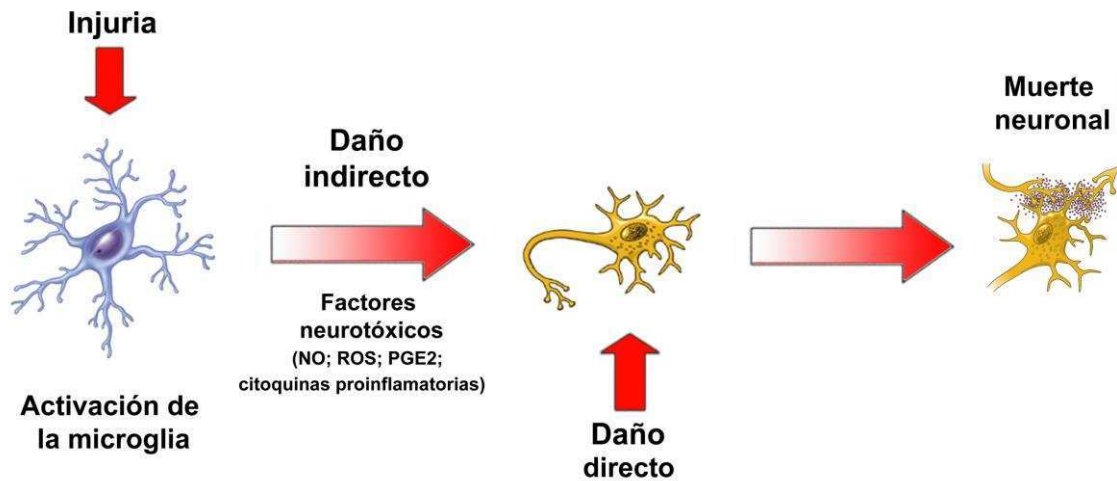
neurona, con la subsecuente muerte neuronal. Todo ello causa un daño irreversible del tejido nervioso (Araya *et al*, 1998).

*In vitro*, se ha demostrado muerte celular por hipoxia en diversas líneas celulares, entre las que se incluyen la línea de fibroblasto humano GM701, células SKW6.4, células de feocromocitoma PC12 y de neuroblastoma humano SK-N-MC (Araya *et al*, 1998; Kim *et al*, 2003; Mander *et al*, 2006).

Han sido sugeridas diversas vías a través de las cuales se induciría este tipo de muerte neuronal. Durante el fenómeno de hipoxia-isquemia hay un incremento tanto en los niveles de glutamato como también en la actividad neuronal. También se activan receptores de NMDA, los cuales causan muerte celular (Mander *et al*, 2005). Además, se ha sugerido que la falta de oxígeno causa alteraciones a nivel mitocondrial, incremento en los niveles de especies reactivas del oxígeno y activación de caspasas de la vía intrínseca (Araya *et al*, 1998; Kim *et al*, 2003).

Por otro lado, durante el fenómeno de isquemia, células de astrogliá y microglía pasan a estado activado con la función de remover los restos celulares. En este estado se produce un aumento de la expresión de la isoforma óxido nítrico sintetasa inducible (sigla en inglés iNOS de *inducible nitric oxide synthase*), así como del nivel de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), el cual al interactuar con especies reactivas del oxígeno es convertido en peroxinitrito, una especie reactiva de nitrógeno que presenta una elevada citotoxicidad para la célula (Mander *et al*, 2006).

Por otra parte, la activación de la microglía mediada por hipoxia modula la proliferación celular. Estudios en animales sugieren que, ante un cuadro de isquemia, existe una correlación entre activación de la microglía y muerte neuronal (Mander *et al*, 2006; Lu *et al*, 2006). Esto sugiere que la hipoxia no sólo tiene un efecto directo sobre las neuronas, sino que además puede presentar una acción indirecta a través de mediadores proinflamatorios producidos por la microglía activada (Figura 2).



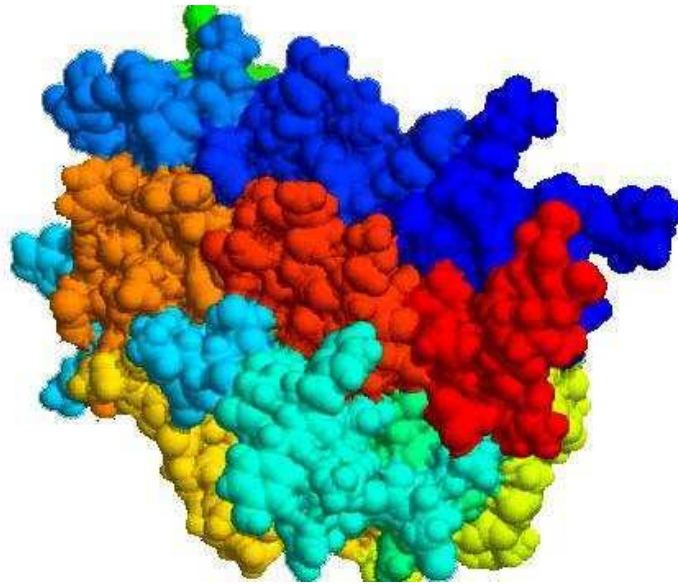
**Figura 2. Representación de los efectos directo e indirecto del daño tisular sobre la neurona por hipoxia**

La hipoxia puede ejercer un efecto directo sobre la neurona, afectando la homeostasis celular y causando, de esta forma, la muerte. También puede afectar indirectamente a la célula neuronal, ya que ante una condición de hipoxia las células de la glía son activadas liberando factores neurotóxicos.

## IV. Eritropoyetina

La eritropoyetina (Epo) es una citoquina pleiotrópica originalmente definida por su rol en la eritropoyesis. Es una glicoproteína de, aproximadamente 34 kDa, tamaño molecular que varía en función del contenido glucídico de la proteína (Figura 3).

A nivel terapéutico, la Epo se produce a nivel biotecnológico y se emplea para el tratamiento de cuadros de anemia debidos a insuficiencia renal crónica, causados por procesos inflamatorios o por tratamientos con drogas quimioterapéuticas.



**Figura 3: Esquema estructural de la eritropoyetina**

Estructura terciaria de la eritropoyetina. La estructura terciaria se encuentra conformada por cuatro hélices antiparalelas de lazos vecinos.

**Historia**

En 1906, Carnot y Deflandre, realizaron un ensayo en el cual, luego de haber inducido un sangrado en conejos, se recolectaba plasma de los mismos y se lo inyectaba a conejos no tratados. La observación de un incremento notorio en el número de reticulocitos, sugirió la existencia de un elemento humoral al que denominaron “hemopoietine”. Dicha hipótesis fue confirmada por estudios posteriores (Carnot *et al*, 1906; Reissmann *et al*, 1950). En ensayos de hipoxia, se advirtió un aumento en los niveles de hemoglobina en concomitancia con el número de reticulocitos, sugiriéndose que una disminución en los niveles de oxígeno podía regular la producción de Epo (Erslev, 1974).

Fueron Bonsdorff y Jalavisto, quienes denominaron “eritropoyetina” a la sustancia que regulaba la síntesis de los glóbulos rojos maduros (Ahmet *et al*, 2005; Jelkmann *et al*, 2007).

La obtención, purificación y caracterización de la Epo permitió su estudio a nivel fisiológico y terapéutico. Desde ese momento, numerosos trabajos han permitido demostrar la estructura y función, avanzando, así, en el estudio de los mecanismos de acción de esta proteína.

En 1977, Goldwasser y Kung lograron purificar la Epo humana, lo que permitió su secuenciación y subsecuente identificación del gen de Epo (Miyake *et al*, 1977).

Investigadores de la Universidad de Columbia desarrollaron el protocolo de síntesis de Epo. Dicha técnica fue patentada y su licencia fue obtenida por la empresa *Amgen*. En la década del 80, comenzaron las pruebas clínicas de la Epo (*Epogen, Amgen*) presentando resultados positivos para su uso farmacológico (Eschbach *et al*, 1987).

En 1985, Lin y colaboradores aislaron, a partir de una biblioteca genómica, el gen de la eritropoyetina humana. Mediante ingeniería genética, la expresión del gen de la Epo humana en células CHO permite la producción de cantidades abundantes de la hormona, las que, posteriormente son purificadas por cromatografía. Este procedimiento ha permitido la provisión de cantidades de eritropoyetina recombinante humana (rhuEpo) apropiadas para su uso terapéutico y para completar los estudios químicos y biofarmacológicos (Davis *et al*, 1987).

### **Características estructurales de la eritropoyetina**

La Epo pertenece filogenéticamente a la familia de las citoquinas, entre las que se encuentran también la somatotrofina, prolactina, interleuquinas 2, 3, 4, 5, 6 y 7 (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7) y los llamados “Factores Estimuladores de Colonias”: factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).

El gen de la Epo esta localizado en el cromosoma 7 (posición 7q21-7q22), existiendo como una sola copia en una región de DNA genómico de 5,4 kb. El gen humano posee 5 exones y 4 intrones y codifica un polipéptido de 193 aminoácidos (Maiese *et al*, 2008).

La síntesis de la Epo sufre diversas modificaciones post traduccionales. Es sintetizada como precursor de 166 aminoácidos, polipéptido que sufre el clivaje de 27 aminoácidos hidrofóbicos y glicosilación (Wen *et al*, 1994; Robert *et al*, 1994). La remoción del extremo C-terminal del aminoácido arginina da por finalizado el proceso post traduccional (Bahlmann *et al*, 2004).

La producción y secreción de Epo depende de la integridad de las cadenas glicosiladas (Maiese *et al*, 2008). Aproximadamente 40% del peso corresponde a la glicosilación. Los

carbohidratos de la glucoproteína son principalmente ácido siálico (11 / ), hexosas, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido N-acetilneuramínico. A su vez, el grado de glicosilación puede variar de acuerdo a la fuente y al método de obtención. La Epo contiene cuatro cadenas glicosiladas, tres cadenas de N- y una de O-oligosacárido ácido, lo cual es importante para la actividad biológica de la hormona. Dichas cadenas de carbohidratos protegen a la proteína de la degradación por radicales libres. A su vez, el grado de glicosilación permite la regulación del metabolismo de la Epo, dado que moléculas de Epo con alto contenido en ácido siálico son metabolizadas en el hígado. Otro elemento importante para la actividad biológica de la Epo es la presencia de dos uniones de puente disulfuro que se establecen entre residuos de cisteínas entre las posiciones 7-160 y 29-33 (Wang *et al*, 1985).

### **Biosíntesis de la eritropoyetina**

La Epo es producida en riñón e hígado, siendo este último el sitio de síntesis predominante durante la vida fetal. Después del nacimiento, aproximadamente el 10 / de la producción de Epo sigue generándose en el hígado mientras que el 85-90 / de dicha hormona es sintetizada en las células intersticiales peritubulares de la corteza renal (Lacombe *et al*, 1988; Koury *et al*, 1988; Fisher, 2003).

La Epo es una citoquina cuya expresión se ve inducida ante condiciones de hipoxia, siendo la proteína HIF-1 (*hipoxia-inducible factor*) el factor responsable de regular la expresión del gen de Epo (Lacombe y Mayeux, 1998). Ante bajos niveles de oxígeno, se produce una traslocación de la proteína HIF-1 $\alpha$  del citosol al núcleo, formando, con la subunidad  $\beta$  (HIF- $\beta$ ), el heterodímero HIF-1. Este heterodímero forma un complejo proteico con los factores de transcripción CREB y p300, responsable de la transcripción del gen de Epo (Iyer *et al*, 1998).

### **Fisiología de la eritropoyetina**

#### **Eritropoyesis**

La producción de glóbulos rojos es ajustada continuamente para suplir la desaparición de las células envejecidas y garantizar un aporte de oxígeno adecuado a todo el organismo. En este proceso, la Epo es el factor de crecimiento crítico que, ya sea producido en el

hígado fetal o en el riñón adulto, actúa sobre los progenitores eritroides en la médula ósea para prevenir su muerte programada.

El sistema hematopoyético de los vertebrados requiere la presencia de progenitores que aseguren una producción continua de nuevas células, necesarias para reemplazar las células eritroides maduras, cuya vida media es limitada.

La Epo actúa primariamente sobre las unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E), induciendo los procesos de proliferación y maduración, actuando a su vez en forma sinérgica, junto a otros factores, sobre los progenitores tempranos eritroides (BFU-E). Así, desde ambos estadios, CFU-E y BFU-E, se promueve tanto la proliferación, como la diferenciación (Testa, 2004).

### **Acción de eritropoyetina en tejidos no hematopoyéticos**

El hallazgo de receptores específicos en tejidos no hematopoyéticos expandió la acción biológica y farmacológica de la Epo, siendo su efecto antiapoptótico uno de los aspectos principales de la investigación de esta hormona como potencial agente terapéutico.

Una gran cantidad de estudios ha confirmado la presencia del REpo en tejidos no hemopoyéticos, tales como nervioso, endotelios vascular e intestinal, miocardio, músculo liso, testículo y placenta. Se ha reportado que la Epo constituye un importante factor de inducción de neurogénesis durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario (Genc *et al*, 2004).

El hallazgo de que ambos, la producción de Epo y la expresión de su receptor específico REpo en distintas zonas del cerebro embrionario y fetal, sustenta la hipótesis que le confiere a la Epo una función primordial en ese estadio del desarrollo del sistema nervioso central (Genc *et al*, 2004; Sola *et al*, 2005).

### **Acción antiapoptótica**

Recientemente, la notable actividad de la Epo en la protección tisular ha sido demostrada en modelos de isquemia neuronal, renal y cardíaca (Jelkmann, 2004; Rossert y Eckardt, 2005; van der Kooij *et al*, 2008; Sirén *et al*, 2009). La alta eficacia de la Epo, observada en estos modelos, depende de la activación de múltiples caminos de protección que incluyen inhibición de muerte por apoptosis, restauración de la autoregulación vascular e

incremento de funciones reconstituyentes (Grasso *et al*, 2004). En nuestro laboratorio hemos observado que el pretratamiento con Epo presenta un efecto neuroprotector sobre células de origen neuronal, ante la exposición a staurosporina y TNF- $\alpha$  (Pregi *et al*, 2006; Pregi *et al*, 2009). También se ha observado que la Epo presenta una acción protectora en células de la microglía frente a la exposición a lipopolisacárido (LPS) o bajo condiciones de hipoxia-reoxigenación (Vairano *et al*, 2002; Li *et al*, 2006).

### **Acción antioxidante**

En varios sistemas experimentales se ha observado que la Epo presenta una acción antioxidante. Recientemente, ha sido reportado que ejerce su acción antiapoptótica en cultivos de cardiomiocitos mediante la regulación positiva de hemooxigenasa-1, proteína involucrada en procesos antioxidantes (Calo *et al*, 2006; Xiang *et al*, 2009).

Por otro lado, en cultivos de células de origen neuronal PC-12, la Epo ha mostrado protección de las mismas frente a un agente prooxidante mediante la modulación de Bax y Bcl-2, miembros de la familia Bcl-2 y la disminución en los niveles de especies reactivas del oxígeno (Wu *et al*, 2007).

### **Eritropoyetina en procesos inflamatorios**

Otro aporte relevante para el potencial terapéutico de la Epo fue el realizado por Brines y colaboradores (2000) quienes han sugerido que la Epo podría tener una acción antiinflamatoria al observar en un sistema *in vivo* que la administración sistémica de dicha hormona reducía la respuesta inflamatoria así como la infiltración de monocitos ante un trauma mecánico.

Otros trabajos sugieren también una acción antiinflamatoria de la Epo en diversos tejidos (Lee *et al*, 2006; Maiese *et al*, 2008). En cultivos de cardiomiocitos se ha observado que previene la atrofia cardíaca inducida por doxirrubucina y que esta acción es dependiente de la modulación de COX-2 (Li *et al*, 2006).

Por otra parte, Chong y colaboradores (2003), demostraron que la Epo puede modular la activación de la microglía. Sin embargo, recientemente se ha sugerido que la Epo no podría prevenir la liberación de nitritos ni de citoquinas proinflamatorias en cultivos



primarios de microglía (Wilms *et al*, 2009). Más estudios son necesarios a fin de dilucidar la acción de Epo a este nivel.

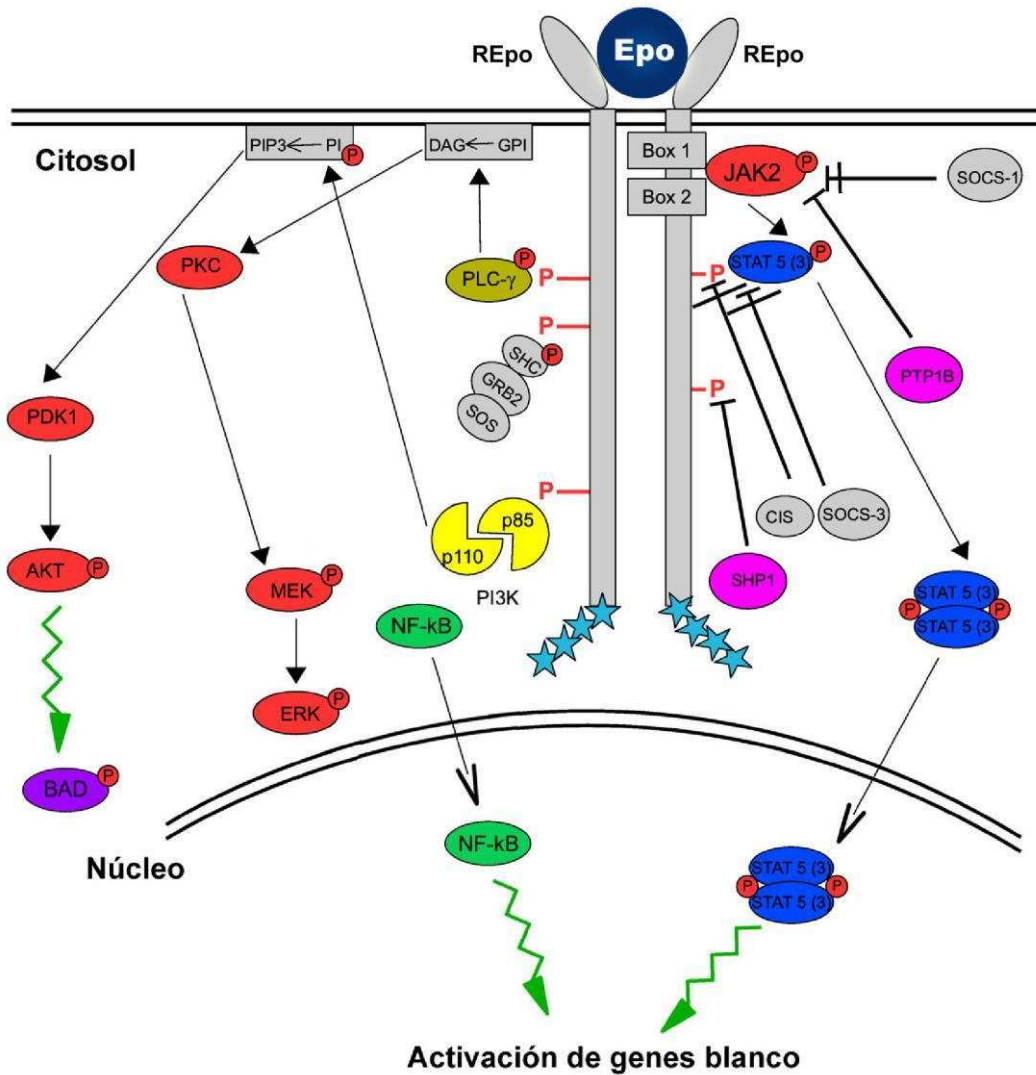
### **Mecanismos de acción de la eritropoyetina**

La Epo actúa mediante su unión específica al receptor de eritropoyetina (REpo), el cual pertenece a la superfamilia de receptores de citoquinas de tipo I. Este tipo de receptores se caracterizan por presentar un dominio N-terminal, el cual muestra cisteínas conservadas y un motivo WSXWS. A su vez, presenta un segmento transmembrana de carácter hidrofóbico y un dominio citosólico sin actividad quinasa.

Se conoce que el receptor de Epo está compuesto por dos subunidades, conformando un homodímero. La unión de su ligando Epo al homodímero REpo induce un cambio conformacional que activa dos moléculas de proteína tirosina-quinasa JAK-2 (*Janus family tyrosine kinase*), las cuales se encuentran asociadas al REpo. La activación de JAK-2 inicia la fosforilación de determinadas regiones del receptor, permitiendo la subsecuente activación de diversas vías de señalización (Figura 4). Entre ellas se pueden destacar: PI3K, Ras/ERK1/2 (*extracellular signal regulated kinases*), el factor de transcripción STAT-5 (*signal transducers and activators of transcription*) y NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa-B*), entre otros (Sirén *et al*, 2001; Zhao *et al*, 2006; Byts *et al*, 2009).

La activación de fosfatasa, entre las cuales se destacan PTP-1B, SOCs3, entre otras, son las encargadas de defosforilar a JAK-2 inactivando de esta manera la señalización mediada por Epo (Byts *et al*, 2009; Callero *et al*, 2011). A su vez, el complejo ligando-receptor es degradado por la vía de proteasoma (Byts *et al*, 2009).

A nivel del sistema nervioso, se ha demostrado que Epo activa las vías PI3K/AKT y RAS/ERK1/2, ambas involucradas en los efectos tróficos y antiapoptóticos de Epo. En este tejido la hormona modula también los niveles de calcio intracelular y activa los factores de transcripción STAT y NF- $\kappa$ B. Mientras que se conoce que este último factor de transcripción media la acción antiapoptótica de Epo en neuronas así como también la acción trófica de *neural stem cells*, la acción de STAT todavía está en estudio. Se ha sugerido que STAT 5 es necesario para activar mecanismos tróficos de Epo (Byts *et al*, 2008).



**Figura 4: Vías de señalización activadas por eritropoyetina.** Adaptación de Szenajch *et al*, 2010.

### Acción farmacológica de la eritropoyetina

La eritropoyetina recombinante humana (rhuEpo) ha adquirido gran importancia en terapéutica, ya que, como regulador primario de la eritropoyesis, actúa inhibiendo la apoptosis de los progenitores eritroides e induciendo su proliferación clonal a normoblastos.

El conocimiento de la secuencia aminoacídica de la Epo y el advenimiento de la ingeniería genética permitieron obtener líneas celulares productoras a gran escala de rhuEpo con potente actividad biológica (Lin *et al*, 1985).

La rhuEpo fue utilizada por primera vez en pacientes con insuficiencia renal crónica. Los resultados del tratamiento demostraron la eficacia de la hormona para corregir la anemia asociada a esa patología, ya que este signo deriva, en parte, de una marcada disminución de la síntesis renal de Epo (Eschbach *et al*, 1987).

Actualmente, la terapéutica con rhuEpo abarca también a pacientes con cáncer, mielodisplasias, trasplante de médula ósea y a pacientes que sufren procesos crónicos (SIDA, artritis reumatoidea).

La efectividad de la rhuEpo como agente neuroprotector ha sido probada en múltiples modelos de daño del sistema nervioso (en ratón, rata y conejo), incluyendo isquemia cerebral, donde se ha visto que reduce la muerte neuronal (Calapai *et al*, 2000; Sirén *et al*, 2001; Brines, 2002; Erbayraktar *et al*, 2003).

Aunque el mecanismo neuroprotector de la Epo todavía es motivo de investigación, algunos resultados sugieren que potencia mecanismos antiapoptóticos y antioxidantes. A su vez, se ha sugerido que dicha citoquina presentaría una acción antiinflamatoria, angiogénica y moduladora de la actividad neuronal (Ehrenreich, 2004).

La utilización de la rhuEpo como neuroprotector en la neuropatía diabética (Lipton, 2004) y en el infarto cerebral (Ovbiagele *et al*, 2004) constituye una promesa de aplicación del potencial efecto terapéutico de la hormona en las enfermedades neurodegenerativas.

**OBJETIVOS**

### Objetivos

---

La eritropoyetina (Epo) es el principal factor modulador de la producción de eritrocitos, efecto basado en la inhibición de la apoptosis de progenitores eritroides y en el estímulo de la proliferación y diferenciación celular.

Es por eso que el tratamiento terapéutico con eritropoyetina humana recombinante humana (rhuEpo) ha resultado exitoso para disminuir la anemia asociada a varias patologías. La utilización potencial de los efectos no hematopoyéticos de la rhuEpo es uno de los aspectos más promisorios en la investigación de la acción farmacológica de dicha hormona, en particular en lo que se refiere a mejorar el pronóstico de trastornos de hipoxia cerebral. Si bien numerosos estudios muestran los posibles efectos protectores de la Epo sobre el cerebro adulto, son menos las investigaciones de su acción en el cerebro en desarrollo. A su vez, ante una injuria ocurre un daño directo sobre las células neuronales, e indirecto sobre esas células a causa de activación de la microglía. Este último punto merece ser investigado, ya que aún se desconoce el rol que puede tener la Epo frente a una injuria de la microglía.

#### **Objetivo General**

Estudiar el efecto modulador y/o protector de la Epo frente a estímulos proapoptóticos y proinflamatorios, esperando observar la inducción de mecanismos citoprotectores involucrados en procesos antiapoptóticos y antioxidantes.

La importancia de este estudio radica en conocer si la acción antiapoptótica y moduladora de la Epo sobre el tejido neuronal puede permitir ampliar las características terapéuticas hematológicas ya conocidas.

#### **Objetivos específicos**

En el presente trabajo se utiliza como modelo la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y con el fin estudiar el efecto neuroprotector de la Epo y la línea celular de microglía murina EOC-2 a fines de poder analizar el potencial antiinflamatorio de dicha hormona.

#### **Objetivo 1:**

- Analizar la acción farmacológica de la Epo y describir su mecanismo de acción en células neuronales inmaduras y en células inducidas a diferenciación.

En este aspecto, se plantean las siguientes hipótesis:

- 1) “En el cultivo de células SH-SY5Y se induce muerte celular programada en condiciones de hipoxia”.
- 2) “Las células de neuroblastoma SH-SY5Y tienen diferente susceptibilidad a la apoptosis provocada por la falta de oxígeno según se encuentren en estadio indiferenciado o hayan sido inducidas a diferenciación con ácido retinoico”.
- 3) “La Epo es neuroprotectora de células SH-SY5Y ante un evento de hipoxia”.

### **Objetivo 2:**

- Investigar si la Epo participa en la modulación de mecanismos proinflamatorios.

Hipótesis planteada:

- 4) “Las células neuronales son afectadas por la presencia de microglía activada”.
- 5) “La modulación de iNOS, COX-2 y TNF- $\alpha$  en cultivos de microglía por Epo contribuye a la acción neuroprotectora de este factor”.

Los resultados obtenidos aportarán información al conocimiento sobre los mecanismos de acción de la Epo en el campo de la ciencia básica, permitiendo así ampliar y/o adecuar su aplicación terapéutica ante procesos neurodegenerativos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

## Materiales y Métodos

---

### I. Equipos

Centrífuga refrigerada Hermle Z323K

Equipo para la obtención de agua ultrapura (Millipore Simplicity 185)

Estufa de cultivo (Revco RMI 3000S-7VBA)

Flujo laminar. Cámara de bioseguridad de clase II (Nuair)

Microscopio óptico (Nikon XS100)

Microscopio invertido de fluorescencia (Zeiss Axiovert 135), con cámara digital Nikon Coolpix 5000 y *software* AxioVision REL 4.6 para análisis de imágenes

Microscopio electrónico de barrido (Phillips 515, Holanda) del Servicio de Microscopía Electrónica de CITEFA (Centro de Investigación de las Fuerzas Armadas).

Lector de microplacas (Modelo 680, BioRad)

Espectrofotómetro (Beckman DB)

Transiluminador (Hoeffer Macro Vue UV-20) acoplado a cámara digital (Kodak DC 120)

Termocicladores para RT-PCR (Mastercycler gradient, Eppendorf y Bioer technology)

Termociclador para Real Time-PCR (Opticon Monitor, BioRad)

Cuba electroforética para geles de agarosa (Liberty 2, Biokey American Instruments)

Cuba electroforética para SDS-PAGE y electrotransferencia (Miniprotean III, BioRad)

Fuente de poder (EPS 600, Pharmacia)

Equipo de revelado por quimioluminiscencia Dark Box II (FujiFilm)

### II. Reactivos

Se empleó agua ultrapura con resistividad específica de 18 MOhm (Milli-Q Water System, Millipore, USA) para el lavado de material y para la preparación de reactivos y medios de cultivo.



### II-a. Reactivos

Los reactivos generales (sales, ácidos, solventes) empleados fueron de grado analítico (*Mallinckrodt, Merck, Sigma-Aldrich*).

### II-b. Reactivos específicos

*GibcoBRL*: medios de cultivo MEM, D-MEM y Ham F12, antibióticos penicilina-streptomina.

*Bioser (GENSA)*: suero fetal bovino (SFB).

*Invitrogen Life Technologies*: L-glutamina, Tryplex, reactivo Trizol, Taq polimerasa y *primers* específicos para Bcl-xL, Bcl-2, Bax, GAP-43, MAP-2, REpo, iNOS, COX-2 y GAPDH. Ioduro de propidio, *Mitotracker Red (Molecular Probes)*.

*BD Biosciences*: Proteína A agarosa, *kit* de ELISA para cuantificación de TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  recombinante humana, IFN- $\gamma$  recombinante murino, Anexina V.

*Mallinckrodt*: bromuro de etidio.

*Sigma-Aldrich*: staurosporina (STP), ácido trans-retinoico (*All-trans-retinoic-acid*), EDTA, Nonidet P40, fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF), aprotinina, leupeptina, pepstatina A, colorante Hoechst 33258, dimetilsulfoxido (DMSO), *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (MTT), azul Tripán.

*Calbiochem*: inhibidores AG490 y LY294002.

*GE Biotechnology*: *kits Ready-To-Go-T-Primed First-Strand* y de quimioluminiscencia (ECL), dNTPs, dietilpirocarbonato (DEPC).

*Biodynamics*: mezcla para PCR en tiempo real y marcador de número de pares de bases.

*Tecolab*: placas y tapas para PCR en tiempo real (*BioRad*), marcador de peso molecular de proteínas (*Fermentas*).

*Biosidus*: eritropoyetina recombinante humana (Hemax).

*Zelltek*: eritropoyetina recombinante humana (rhEpo).

*Roche*: *SybrGreen*.

### II-c. Anticuerpos

*BD Biosciences*: anticuerpos monoclonal anti-PARP y policlonal anti-iNOS.

*Santa Cruz Technology*: anticuerpos anti-REpo (M-20) y anti-actina.

GE: anticuerpos anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (HRP) y anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (HRP).

*Synaptic System*: anticuerpo anti-neurofilamento-L.

*Invitrogen Life Technologies*: anticuerpo anti-mouse IgG conjugado a Alexa-Fluor 488 (*Molecular Probes*).

### III. Líneas celulares y condiciones de cultivo

#### III-a. Líneas celulares

##### III-a.i. Línea SH-SY5Y

Se empleó la línea celular SH-SY5Y (CRL-2266), obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC). Es un clon de neuroblastoma humano proveniente de la sublínea celular SK-N-SH, la cual fue obtenida de un neuroblastoma metastásico humano de la cresta neural del sistema nervioso simpático (Raguenez *et al*, 1999; Ties *et al*, 2000). Presenta morfología de tipo epitelial y crecimiento adherente.

##### III-a.ii. Línea EOC-2

Las células EOC-2 (CRL-2420), obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC), constituye una línea de microglía murina inmortalizada, obtenida de tejido nervioso de ratones de 10 días. Los cultivos son dependientes del factor estimulador de colonias 1 (*colony stimulating factor 1*, CSF-1). Presenta morfología esférica, ovoidea y poligonal, con crecimiento adherente.

##### III-a.iii. Línea LADMAC

La línea celular LADMAC (CRL-2420) fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC). Presenta morfología monocítica y crecimiento en suspensión. Es una línea de origen murino, transformada mediante la transfección de una población enriquecida en progenitores de macrófagos con la construcción pR myc. Dicha construcción es un quimera constituida entre secuencias homólogas al clon humano *myc* y pBR325.

Estos cultivos secretan el factor estimulador de colonias 1 (*colony stimulating factor 1*, CSF-1). Este factor de crecimiento es capaz de mantener la proliferación *in vitro* de macrófagos provenientes de la médula ósea. Esta línea celular se emplea con el fin de producir medio

condicionado enriquecido en CSF-1, el cual sirve como un factor de complemento para la proliferación de los cultivos de microglía EOC-2.

### **III-a.iv. Línea RAW 264.7**

La línea celular RAW 264.7 (TIB-71) de la American Type Culture Collection (ATCC), es una línea de macrófago de origen murino. Se obtuvo a partir de un tumor inducido por el virus de la leucemia de Abelson. Presenta morfología esférica, ovoidea con crecimiento adherente.

### **III-b. Soluciones y materiales de cultivo**

El material fue esterilizado por calor seco (160-170°C, 90 min), por calor húmedo (121°C, 1 atm, 30 min) o por radiación gamma, según las características del mismo. Las soluciones termolábiles fueron esterilizadas por pasaje a través de membrana de ésteres de nitrato y acetato de celulosa, con poro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore), utilizando presión positiva de nitrógeno.

#### **III-b.i. Medios de cultivo**

**MEM** (*Minimum Essential Medium*). Mezcla de nutrientes esenciales. Fue preparado con agua ultrapura (18 mOhm), esterilizado por filtrado, fraccionado y conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Una vez descongelado, fue conservado a  $4^{\circ}\text{C}$ . Suplementado con  $\text{NaHCO}_3$  2,2 gr/L.

**Ham-F12**. Mezcla de nutrientes esenciales. Fue preparado con agua ultrapura, esterilizado por filtrado, fraccionado y conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Una vez descongelado, fue conservado a  $4^{\circ}\text{C}$ . Suplementado con  $\text{NaHCO}_3$  1,176 gr/L.

**D-MEM**. Fue fraccionado y conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Una vez descongelado, fue conservado a  $4^{\circ}\text{C}$  protegido de la luz. Suplementado con  $\text{NaHCO}_3$  3,7 gr/L.

**RPMI 1640**. Modificación Hepes, pH  $7,0 \pm 0,3$ . Fue fraccionado y conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Una vez descongelado, fue conservado a  $4^{\circ}\text{C}$  protegido de la luz. Suplementado con  $\text{NaHCO}_3$  2 gr/L.

#### **III-b.ii. Agentes suplementarios de medios de cultivo**

Los factores del complemento del suero fetal bovino (SFB) fueron inactivados por incubación en baño de agua a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 30 min para su uso en los cultivos de las líneas SH-SY5Y, RAW y LADMAC.

Para los cultivos de la línea EOC-2 se empleó SFB sin decomplementar y medio condicionado de la línea LADMAC.

En algunos cultivos fue necesario agregar soluciones de piruvato de sodio y L-glutamina.

### **III-c. Mantenimiento y desarrollo de cultivos celulares**

La preparación de las soluciones y la manipulación de los cultivos y fueron realizadas bajo estrictas condiciones de esterilidad (cámara de bioseguridad Clase II).

#### **III-c.i. Línea SH-SY5Y**

Las células SH-SY5Y fueron mantenidas en medio MEM:HAM-F12:SFB en proporción 44:44:10 (v/v/v), conteniendo L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml (Pregi *et al*, 2006).

#### **III-c.ii. Línea EOC-2**

Los cultivos fueron mantenidos en medio D-MEM, suplementado con 20/ de medio condicionado LADMAC, 10/ de SFB no de complementado, 1/ de piruvato de sodio, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 g/ml (Saud *et al*, 2005; Li *et al*, 2006).

Para obtener los subcultivos, los cultivos seleccionados fueron incubados con 1,5 ml de *TRyPLEX* durante 15 min a 37°C y centrifugado (400 g, 10 min). Se descartó el sobrenadante, resuspendiendo el *pellet* en 1 ml de medio. Luego, se procedió al recuento celular, tomando 10 µl de la suspensión para calcular la densidad celular deseada.

#### **III-c.iii. Línea LADMAC**

Cultivos celulares de la línea LADMAC se mantuvieron en medio MEM, suplementado con 10/ de SFB de complementado, 1/ de piruvato de sodio, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 g/ml.

#### **III-c.iv. Línea RAW 264.7**

Los cultivos fueron mantenidos en medio RPMI 1640 suplementado con 10/ de SFB de complementado, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 g/ml.

Para obtener los subcultivos, los cultivos seleccionados fueron incubados con 1,5 ml de *TRyPLEX* durante 15 min a 37°C y centrifugado (400 g, 10 min). Se descartó el sobrenadante, resuspendiendo el *pellet* en 1 ml de medio. Luego, se procedió al recuento celular, tomando 10 µl de la suspensión para calcular la densidad celular deseada.

El medio en los cultivos de las diferentes líneas celulares fue reemplazado cada 3 días.

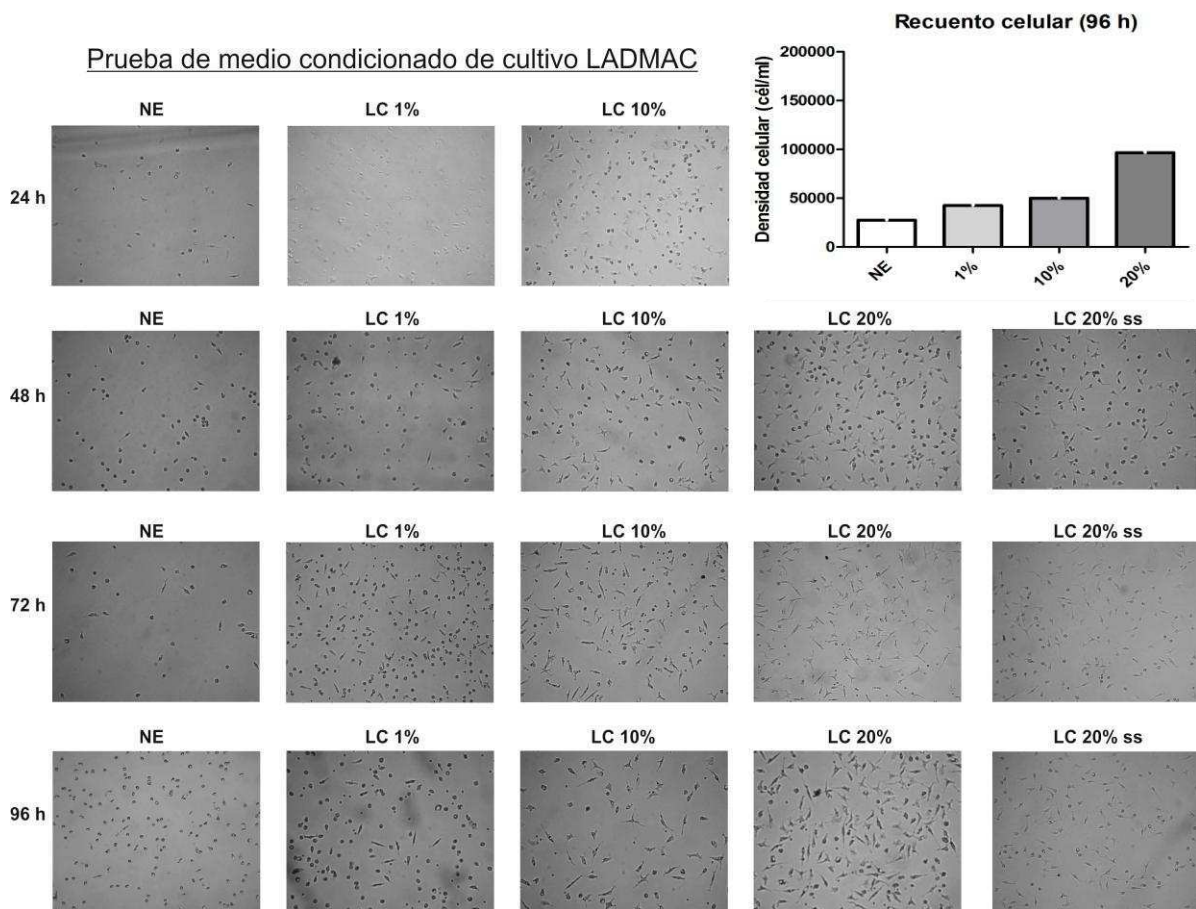
Los cultivos, realizados en frascos de 25 cm<sup>2</sup>, en placas de Petri de 35 mm o en placas de 24 *wells*, según las necesidades experimentales, fueron incubados a 37°C, en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad.

### **III-c.v. Optimización de la obtención del medio condicionado LADMAC para la línea celular EOC-2**

Las células EOC-2 requieren para su crecimiento del factor M-CSF. A su vez, dicho factor de crecimiento estimula la proliferación de macrófagos peritoneales (Olivas et al, 1995).

Diversos autores han introducido considerables variaciones en el protocolo de obtención del medio condicionado. Por lo tanto, fue necesario determinar las condiciones de desarrollo ideales para la obtención del medio de cultivo en base al protocolo reportado por Olivas y col. (1995). Se evaluó el crecimiento de macrófagos peritoneales cultivados durante diferentes períodos.

Se desarrollaron cultivos primarios de macrófagos peritoneales de ratones (cepa BALBc) con una densidad celular inicial de 500.000 cél/*well*). Fueron incubados en medio de cultivo (RPMI, SFB 10%, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml) y diferentes concentraciones del medio condicionado LADMAC (LC). Mediante recuento de células se determinó el número de macrófagos y se calculó su crecimiento durante distintos tiempos de incubación, para cada porcentaje de LC empleado. Como controles se emplearon cultivos incubados sin LC (Figura 2.1). Se determinó que la concentración óptima de medio condicionado fue de 20%.



**Figura III.1. Análisis del crecimiento de macrófagos peritoneales expuestos al medio condicionado LADMAC**

Cultivos primarios de macrófagos peritoneales fueron incubados con diferentes concentraciones de medio condicionado LADMAC (1-20/ v/v). Controles: no estimulados con LC (NE) y con medio condicionado en ausencia de suero fetal bovino (LC-ss). Se evaluó el crecimiento de los cultivos a las 24, 48, 72 y 96 h de incubación.

### III-d. Criopreservación

#### III-d.i. Procedimiento de congelación

La preservación de cultivos celulares por un período prolongado requiere de temperaturas extremadamente bajas con el fin de disminuir el metabolismo celular. Para evitar la formación cristales en el citosol durante el procedimiento de congelado, los cuales terminarían alterando la membrana celular, se emplea el agente químico DMSO que permite un descenso gradual de la temperatura intracelular.

Partiendo de cultivos en estado de confluencia, las células fueron resuspendidas en medio de cultivo. A continuación, se centrifugó a 400 g, durante 10 min y se descartó el medio. Luego de un lavado con *buffer* fosfato salino (PBS) estéril, el *pellet* fue resuspendido en medio de mantenimiento (medio de cultivo:SFB:DMSO, 50:40:10, v/v/v), homogeneizando rápidamente y separado en alícuotas de, aproximadamente, 0,8 ml en sendos criotubos, rotulados con fecha, pasaje y número de botella de origen. Los criotubos fueron colocados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, en un contenedor para congelar “Mr. Frosty” (Nalgene). Cuando el sistema alcanzó la temperatura de  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  los criotubos fueron colocados y mantenidos en atmósfera de nitrógeno líquido a  $-174\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Vittori *et al*, 2005).

**Tabla 1: Densidad celular empleada en el protocolo de congelación para cada línea**

Línea celular	Densidad celular (células/ml)
SH-SY5Y	$\sim 6 \times 10^6$
EOC-2	$\sim 4 \times 10^5$
LADMAC	$\sim 4 \times 10^6$
RAW	$\sim 4 \times 10^6$

#### III-d.ii. Procedimiento de descongelación

Este procedimiento tiene como finalidad la eliminación del medio de congelación que contiene DMSO, molécula que resulta tóxica para las células en crecimiento.

El criotubo fue descongelado rápidamente en baño a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se trasvasó el volumen total a un frasco de  $25\text{ cm}^2$ , agregándose 10 ml de medio de cultivo fresco, a fin de diluir los factores citotóxicos. Los cultivos fueron mantenidos en estufa por 24 h. Tras dicha incubación, se centrifugó (400 g, 10 min), se separó el medio en otro tubo y se agregaron 4 ml de medio fresco. El medio separado fue centrifugado nuevamente (3.000 g, 5 min) a fin de recuperar las células que no lograron adherirse. Luego de eliminar el sobrenadante, el *pellet* fue resuspendido en 8 ml de medio fresco, y luego, dividido en partes iguales en dos frascos de  $25\text{ cm}^2$ .

En cada evento de descongelación de un *stock*, el cultivo obtenido, en estado de confluencia, fue dividido en 3 frascos. De esta manera, se dispone de material suficiente tanto para la realización de los experimentos como para la obtención de un nuevo *stock*, asegurándose la continuidad de la línea celular.

#### IV. Diferenciación celular de la línea SH-SY5Y

Las células SH-SY5Y pueden diferenciarse hacia un fenotipo colinérgico, adrenérgico o dopaminérgico, dependiendo de las condiciones de cultivo y del inductor de diferenciación a emplear (Xie *et al*, 2010).

El ácido trans-retinoico (atRA) presenta un rol importante durante la embriogénesis de diversos tejidos, incluido el nervioso. A su vez, es un reconocido inductor de diferenciación celular.

El atRA induce la diferenciación neuronal hacia un fenotipo colinérgico. Actúa mediante su unión a los receptores RARs (*retinoic acid receptors*) y RXRs (*retinoic X receptors*), los cuales pertenecen a la familia de receptores nucleares de hormonas no esteroides.

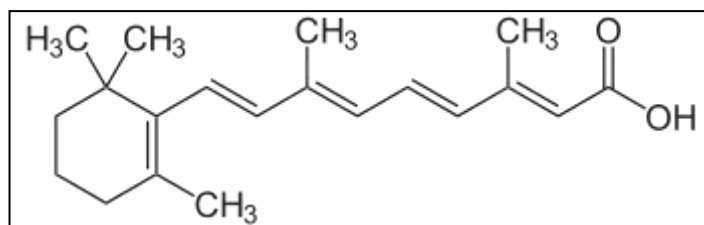


Figura IV.1. Fórmula estructural bidimensional (2D) del ácido trans-retinoico

##### IV-a. Cambios morfológicos debidos a la diferenciación celular

Los cambios morfológicos fueron observados por microscopía de contraste de fase en un microscopio invertido. Se tomaron imágenes digitales usando objetivos 5×, 20× y 40×.

##### IV-a.i. Desarrollo de neuritas

En imágenes observadas con objetivo de 40×, se seleccionaron 10 neuritas al azar en cada uno de diferentes campos con el objeto de cuantificar la longitud de las mismas. La medición



se realizó empleando el *software Image J* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), con el Neuron Morphon como *plugin*, el cual sirve como herramienta de determinación del parámetro ya mencionado (Pregi *et al*, 2006).

### **IV-a.ii. Recuento de células diferenciadas**

Según el criterio morfológico, una célula de origen neuronal se diferencia cuando presenta neuritas cuya longitud es equivalente al doble de su soma (López-Carballo *et al*, 2002). Conforme a dicho criterio, se realizó el recuento de células diferenciadas y no diferenciadas en imágenes obtenidas con objetivo de 20×.

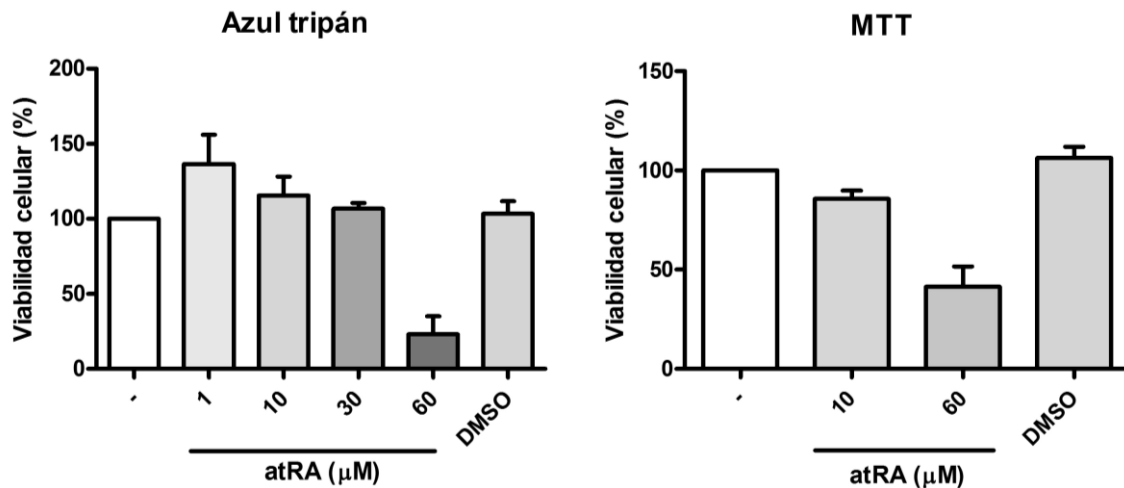
### **IV-b. Análisis de marcadores de diferenciación**

Para analizar, a nivel bioquímico, cambios indicativos de diferenciación, se estudió el grado de expresión génica de GAP-43, MAP-2 y del factor Bcl-2 mediante RT-PCR semicuantitativa (la metodología se describe en la Sección 2.12). Además, se analizó la expresión de MAP-2 y Bcl-2, mediante *Western blotting*, y del neurofilamento L (NF-L), por inmunofluorescencia indirecta (Ver descripción de las técnicas en la Sección 2.14.b).

### **IV-c. Optimización de la inducción de diferenciación de las células SH-SY5Y por ácido retinoico**

Para establecer las condiciones de concentración y tiempo de exposición con el inductor atRA, se realizaron ensayos de viabilidad y de diferenciación celular.

Los análisis de viabilidad realizados mediante exclusión del colorante azul Tripán y el ensayo de MTT muestran que atRA, en concentración de 10  $\mu$ M, no afecta la viabilidad celular, mientras que en concentración elevada (60  $\mu$ M) tiene un efecto citotóxico (Figura 2-3).



**Figura IV.2. Análisis de la viabilidad celular de cultivos SH-SY5Y expuestos a diferentes concentraciones de atRA**

Células SH-SY5Y fueron expuestas a diferentes concentraciones de atRA durante 4 días. Luego de dicho periodo se determinó la viabilidad celular por recuento de células viables mediante tinción con el colorante azul Tripán y ensayo de MTT.

## V. Inductores de muerte celular

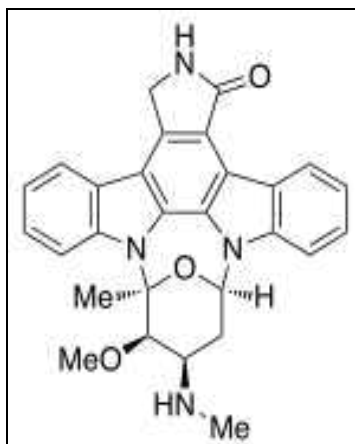
### i) Staurosporina

La staurosporina es un producto natural originalmente aislado de la bacteria *Streptomyces staurosporeus Sp.* (Omura *et al*, 1977).

Una de las actividades biológicas de la STP es la de inhibir proteína quinasas induciendo una desregulación de la señalización celular, la cual puede llevar a la diferenciación o a la muerte, de acuerdo al tipo celular y a las condiciones de tiempo y concentración.

La STP es un potente inhibidor de la proteína quinasa C (PKC) y en menor medida de la proteína quinasa A, quien es ampliamente utilizada como inductor de apoptosis en células de origen neuronal (López *et al*, 2000; Tieu *et al*, 1999).

Se ha demostrado que este inhibidor puede inducir muerte celular en la línea SH-SY5Y en estado indiferenciado (Pregi *et al*, 2006).



**Figura V.1. Fórmula estructural bidimensional (2D) de la staurosporina**

### ii) TNF- $\alpha$

El factor de necrosis tumoral (*Tumour necrosis factor alfa*, TNF- $\alpha$ ) es una citoquina con funciones pleiotrópicas.

En trabajos previos de nuestro laboratorio hemos demostrado que dicha citoquina puede inducir muerte celular en la línea SH-SY5Y en estado indiferenciado (Pregi *et al*, 2009).

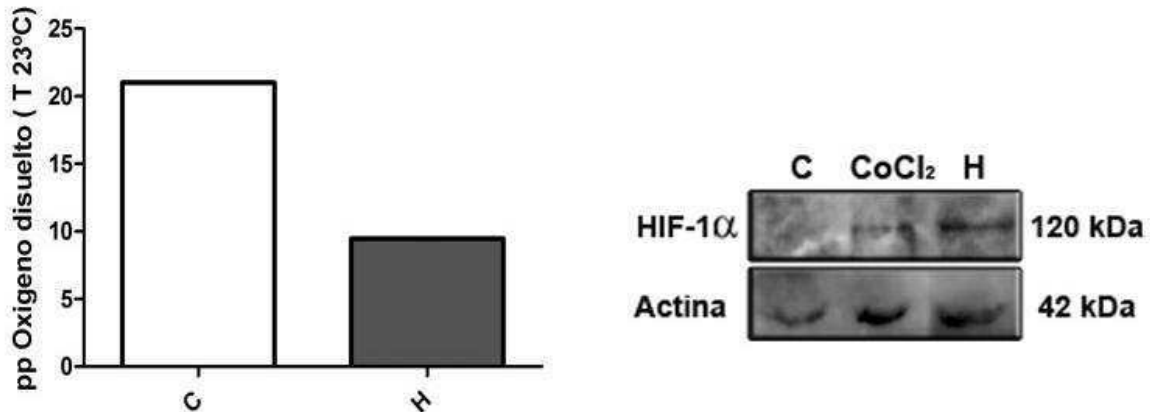
### iii) Hipoxia

**Sistema 1:** Los cultivos de células SH-SY5Y fueron incubados por diferentes períodos a 37°C, en jarra de anaerobiosis, empleando el reactivo Anaerocult C (Merck, Argentina), el cual crea una atmósfera de CO<sub>2</sub> con 5-7% (v/v) de O<sub>2</sub> (Imhof *et al*, 1996; Yoshida *et al*, 1998; Hartmann *et al*, 1999; Ryuto *et al*, 1996; Stolze *et al*, 2002). Los cultivos controles fueron cultivados en paralelo en condiciones de normoxia (5% CO<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub> y 74% N<sub>2</sub>).

**Sistema 2:** Hipoxia química por tratamiento con cloruro de cobalto (CoCl<sub>2</sub>), un estabilizador del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ , estimulando la transcripción de genes asociados a la respuesta por hipoxia (An *et al* 1998; Stolze *et al*, 2002).

**Controles:** Para controlar el sistema de hipoxia ambiental se cuantificó oxígeno disuelto en el medio de cultivo mediante el uso de un oxímetro. Como se observa en la figura 2-5, en condiciones de normoxia el porcentaje es de 21% (presión parcial 210 mbar), mientras que en condiciones de hipoxia la presión parcial de 70 mbar corresponde a un porcentaje de oxígeno de 7% .

Por otro lado, se determinó la presencia del factor inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ) que se encuentra presente bajo condiciones de hipoxia o en presencia de CoCl<sub>2</sub>, agente que inhibe las enzimas encargadas de inducir la degradación de HIF-1 $\alpha$ . Como se puede observar, en condiciones de anoxia como de hipoxia química, se observa la presencia de HIF-1 $\alpha$ .



**Figura V.2. Control de generación de hipoxia. Determinación de los niveles de oxígeno disuelto en medio de cultivo y detección del marcador HIF-1 $\alpha$  en células SH-SY5Y**

Luego de la exposición a hipoxia, se cuantificó la presión de oxígeno en medio líquido mediante el uso de un oxímetro. Por otra parte, mediante *Western blotting* se determinó la presencia del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ . La incubación en condiciones de hipoxia ambiental (H) disminuye los niveles de oxígeno en el medio. Esto se puede corroborar por la presencia de HIF, factor que se estabiliza con baja tensión de oxígeno. Por otro lado, CoCl<sub>2</sub> es un estabilizador químico de dicha proteína, por lo cual se puede observar a dicha proteína.

#### iv) Obtención de medios condicionados

Cultivos de células de microglía EOC-2 con un 80% de confluencia fueron expuestas a hipoxia química durante 48 h. Al finalizar dicho periodo, el medio condicionado fue recolectado. Se realizó un *spin down* para eliminar los cuerpos celulares.

Cultivos de células de macrófagos RAW 264.7 con un 80% de confluencia fueron expuestas a un estímulo proinflamatorio con LPS+IFN- $\gamma$  durante 24 h. Al finalizar dicho periodo, el medio condicionado fue recolectado. Se realizó un *spin down* para eliminar los cuerpos celulares (Shavali *et al*, 2006).

Cultivos SH-SY5Y ( $2 \times 10^5$  cél/ml) previamente desarrollados fueron incubadas con 0,3 ml de medio condicionado de células EOC-2 ó de células RAW 264.7, con un volumen final de 0,5 ml.

## VI. Exposición de cultivos de microglía a factores proinflamatorios

### VI-a. Agentes proinflamatorios

Se caracterizó la activación de la microglía empleando los siguientes agentes proinflamatorios:  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ , LPS e  $\text{IFN } \gamma$ . El análisis de la viabilidad celular demostró que no es afectada por las dosis empleadas de estos agentes (Figura 2-6).

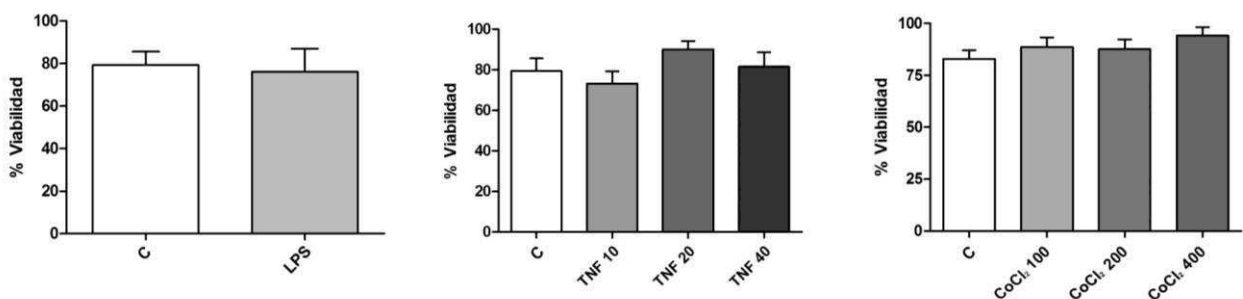
**VI-a.i. Lipopolisacárido (LPS):** El LPS es uno de las componentes estructurales de la membrana exterior de las bacterias Gram negativas.

En macrófagos, el LPS induce la síntesis de citoquinas, tales como  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, así como metabolitos del ácido araquidónico, especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno entre otros factores (Sweet y Hume, 1996).

**VI-a.ii.  $\text{TNF-}\alpha$ :** es una citoquina proinflamatoria que se encuentra involucrada en varias neuropatologías. Además, se ha reportado que es un factor que estimula células de microglía (Mander *et al*, 2006).

**VI-a.iii.  $\text{IFN } \gamma$ :** el Interferón gamma es una citoquina proinflamatoria involucrada en la activación de macrófagos y de células de la microglía (Larocca *et al*, 2011; Mayo *et al*, 2007).

**VI-a.iv. Hipoxia química:** la hipoxia *per se* induce la expresión de genes proinflamatorios como también la liberación de mediadores proinflamatorios que resultan ser tóxicos para las neuronas (Rothwell y Hopkins, 1995). El cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ) es un mimético de la hipoxia que estabiliza a HIF-1  $\alpha$  (An *et al*, 1998; Stolze *et al*, 2002).



**Figura VI.1. Análisis de la viabilidad celular de cultivos EOC-2 expuestos a diferentes agentes proinflamatorios**

Las células fueron expuestas por 24 h a diferentes agentes: LPS (100 ng/ml),  $\text{TNF-}\alpha$  (10-40 ng/ml) y  $\text{CoCl}_2$  (100-400  $\mu\text{M}$ ) y al finalizar el período de incubación se analizó la viabilidad celular por ensayos de tinción con azul Tripán. Los tratamientos no afectaron la viabilidad de los cultivos. Las barras representan Media $\pm$ SEM de n=4 ensayos independientes.

## VII. Caracterización de la activación de microglía

Se investigaron posibles modificaciones de la morfología y proliferación celular, así como de la expresión de marcadores de membrana que podrían haberse desarrollado durante el período de activación de la microglía. Dado que la activación de este tipo celular puede inducir la síntesis y liberación de diversos mediadores proinflamatorios, se determinó la concentración de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ),  $\text{TNF-}\alpha$  y especies reactivas de oxígeno.

### VII-a. Proliferación celular

Ante la activación celular hay una alteración metabólica y un incremento en la proliferación celular. Se empleó el ensayo de MTT (Sección IX-b) para estudiar dicho parámetro (Zhu *et al*, 2008). Además, se determinó la densidad celular mediante recuento de células (Sección IX-a) y se analizó la presencia del marcador de proliferación PCNA (Sección XIII-a).

### VII-b. Mediadores proinflamatorios

#### VII-b.i. Cuantificación de nitritos

Para determinar la producción de óxido nítrico, se cuantificó la acumulación de nitritos (metabolito oxidado del óxido nítrico) en el medio de cultivo de células de microglía empleando el método de Griess.

Una vez que finalizó el período experimental, se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos que fueron procesados en el momento o conservados a  $-20^\circ\text{C}$ .

Un volumen de 100  $\mu\text{l}$  de sobrenadante fue incubado con 50  $\mu\text{l}$  de ácido sulfanílico y 50  $\mu\text{l}$  de NEDA (0,1/ N-1-naftil-etilendiamina diclorhidrato en  $\text{H}_3\text{PO}_4$  5/ ). Al finalizar la incubación de 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad, se cuantificó al absorbancia a 570 nm en lector de microplacas.

Para la cuantificación, se realizó una curva de calibración (rango de concentraciones: 0-100  $\mu\text{M}$ ), empleando solución de nitrito de sodio 0,5 mM.

#### VII-b.ii. Cuantificación de $\text{TNF-}\alpha$

La determinación de la secreción de  $\text{TNF-}\alpha$  al sobrenadante de los cultivos se realizó utilizando ensayos comerciales inmunoenzimáticos (ELISA *Mouse TNF ELISA Set II*, BD Biosciences) siguiendo el protocolo del fabricante.

### VII-b.iii. Análisis del estado redox intracelular mediante la cuantificación de ROS

Para evaluar el contenido de ROS, cultivos EOC-2 realizados sobre vidrios previamente esterilizados fueron tratados con  $\text{CoCl}_2$  100  $\mu\text{M}$  durante 2 o 24 h. Posteriormente, los cultivos fueron incubados durante 30 min en presencia de diacetato de 2,7 dicloro fluorescina (DCF), sonda que emite fluorescencia verde al ser oxidada. Como controles positivos se utilizaron células incubadas con peróxido de hidrógeno, 100  $\mu\text{M}$ , durante 30 min.

Las muestras fueron fijadas con ácido acético:metanol (1:3) (10 min, temperatura ambiente). Luego de dos lavados con PBS las muestras fueron observadas al microscopio.

Se obtuvieron 10 imágenes al azar por muestra y el análisis de imágenes fue realizado utilizando el programa *Image J*. Para cada célula, se obtuvo el cociente entre la intensidad de fluorescencia (IF) y el área (A) de la misma.

Como controles positivos, se realizaron ensayos en paralelo con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100nM, 30 min) como agente prooxidante.

## VIII. Estudio de la participación de vías de señalización

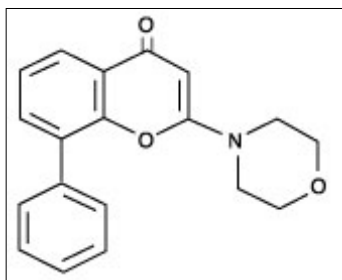
### VIII-a. Inhibidores Ly-294002 y AG-490

A fin de definir la participación tanto de fosfoinositol 3-quinasas o fosfoinositida-3-quinasas (PI3K) como de JAK2 en la acción de Epo, se utilizaron respectivamente los inhibidores Ly-294002 y AG-490.

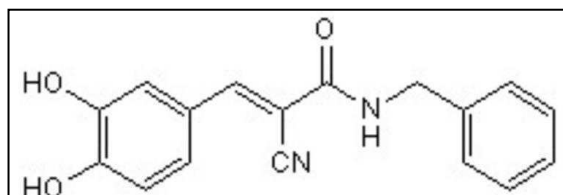
El compuesto AG-490 es un derivado de la erbstatina, inhibidor de la fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico. Pertenece a la familia de las tirofostinas, que comprende un gran número de inhibidores de tirosina y fosforilaciones que inhiben residuos específicos de tirosina de determinadas proteínas tirosina quinasas.

Para analizar la participación de PI3K se utilizó Ly-294002, un inhibidor sintetizado a partir de la quercetina, un polifenol.

Ly-294002



AG-490



**Figura VIII.1. Fórmula estructural bidimensional (2D) de los inhibidores Ly-294002 y AG-490**

Las células fueron preincubadas con distintas concentraciones de Ly-294002 (10 y 25  $\mu\text{M}$ ) durante 2 h previas al tratamiento celular (Pregi *et al*, 2009).

Las condiciones de uso de los inhibidores fueron previamente establecidos para los cultivos SH-SY5Y. Para los cultivos EOC-2 se evaluó la citotoxicidad de este inhibidor mediante el ensayo de MTT.

## IX. Análisis de las características morfológicas de las células

### IX-a. Cuantificación del área celular

Se obtuvieron 10 imágenes al azar, con objetivo de 40 $\times$ . El área celular se determinó empleando el *software Image J* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

### IX-b. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para la observación morfológica de las células se empleó MEB, analizándose imágenes tridimensionales de la superficie celular y tomando fotografías de campos representativos.

Las células ( $\sim 1 \times 10^5$  cél/ml) fueron sembradas sobre un soporte de vidrio de 10 mm de diagonal. Luego del crecimiento celular bajo los tratamientos correspondientes, cada muestra fue fijada con glutaraldehído 3 / (v/v) en *buffer* fosfato 0,1 M, pH 7,4 durante 20 min. A continuación, fueron efectuados 3 lavados con el mismo *buffer*, retirando el exceso de las soluciones de fijación. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a un proceso de deshidratación, sumergiéndolas sucesivamente en acetona 25 / , 50 / , 75 / , 80 / , 90 / y



100 / , repitiendo tres veces cada operación (Vittori *et al*, 2005). Para completar el secado de la muestra biológica fue efectuado el punto crítico, proceso que, mediante variaciones de presión y temperatura, reemplaza la acetona por dióxido de carbono gaseoso, empleando una bomba de punto crítico (Balzers CPD 030). Como último tratamiento, la muestra fue cubierta con carbono y metalizada con oro (Balzers Union SCD 040). Este proceso de metalizado permite la interacción entre el haz de electrones del microscopio y la muestra, la cual emite señales que luego se traducen en pulsos eléctricos.

### **X. Análisis de la viabilidad y proliferación celular**

#### **X-a. Ensayo de exclusión del colorante Azul Tripán**

La prueba de exclusión de colorante supravital Azul Tripán permite distinguir células viables de las que no lo son. La membrana plasmática de las células muertas pierde la propiedad de permeabilidad selectiva, de modo que el colorante penetra tiñendo el citoplasma de color azulado opaco. Las células vivas permanecen brillantes e incoloras (Phillips y Terryberry, 1957).

El recuento celular diferencial fue realizado por microscopía óptica empleando cámara de Neubauer empleando una dilución 1:2 de la suspensión celular con azul Tripán 2 g/l en PBS.

#### **X-b. Ensayo de MTT**

Mediante el ensayo colorimétrico de MTT (Mosmann, 1983), se determinó la proliferación celular y citotoxicidad. El mismo se basa en la reducción metabólica de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), realizada por la enzima mitocondrial succinato–deshidrogenasa que lo transforma en un compuesto coloreado azul (formazán). El número de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán formado.

Luego de los tratamientos realizados, se llevó a cabo la incubación con el sustrato (Conc. final = 5 mg/ml) durante 2 h a 37°C. Finalizada la incubación, el precipitado azul de formazan se solubilizó con 100 µL de solución HCl en isopropanol (0,04M). Se cuantificó la absorbancia, a 570 nm referida a la obtenida a 655 nm en lector de microplacas.

#### **X-c. Tinción con yoduro de propidio y naranja de acridina**

Finalizado el experimento, células SH-SY5Y fueron teñidas con una solución de yoduro de propidio (IP)/naranja de acridina (NA) (IP 100 µg/ml; NA 100 µg/ml). Luego de la tinción se realizaron lavados con PBS, finalizando el procedimiento con el montaje del preparado en sentido invertido sobre un portaobjetos empleando una solución de glicerol (50 / v/v en PBS). Las muestras fueron observadas al microscopio de fluorescencia. Se obtuvieron imágenes durante los primeros 15 minutos.

Se cuantificó y se determinó el porcentaje de células viables para cada tratamiento. Se considera célula viable, aquella que presentaba fluorescencia verde. Las células que presentan condensación de la cromatina o fluorescencia naranja son consideradas no viables (Calafat *et al*, 2009).

### **XI. Evaluación de la muerte celular por apoptosis**

#### **XI-a. Recuento de células apoptóticas después de tinción con colorante de Hoechst**

El colorante Hoechst es una molécula con capacidad para intercalarse entre las bases adenina y timina del ADN. El ADN, teñido con dicho colorante y excitado con luz de longitud de onda apropiada ( $\lambda = 350$  nm), emite fluorescencia de color azul brillante. El recuento diferencial de células apoptóticas se realiza mediante microscopia de fluorescencia.

Los subcultivos de células SH-SY5Y ( $2 \times 10^5$  células) fueron realizados sobre cubreobjetos previamente esterilizados por tratamiento con etanol 96° y calor y colocados en placas de Petri de 35 mm estériles (Cellstar). Después de una incubación de 48 h a 37°C, en atmósfera con 5/ de CO<sub>2</sub> y 100/ de humedad, las muestras fueron fijadas durante 20 min a 4°C, con solución de paraformaldehído (4 / v/v en PBS). Descartada la solución fijadora, se expuso la muestra al reactivo de Hoechst 33258 (0,05 g/l en PBS) por 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Con el fin de retirar remanentes de dicho intercalante, se realizaron tres lavados con PBS, finalizando el procedimiento con el montaje del preparado en sentido invertido sobre un portaobjetos empleando una solución de glicerol (50 / v/v en PBS).

La cuantificación de núcleos apoptóticos fue realizado mediante el recuento de 500 células, empleando microscopía de fluorescencia, bajo filtro de 365 nm. Las imágenes fueron digitalizadas y analizadas.

### **XI-b. Detección de clivaje de PARP**

La proteólisis, a diferencia de la mayoría de las modificaciones postraduccionales, es irreversible y altamente específica.

PARP (*poly-ADP-ribose-polymerase*) es una proteína nuclear que se activa con el fin de reparar el ADN. Durante la apoptosis PARP es blanco de inactivación por clivaje mediado por varias proteasas, entre las cuales se encuentran las caspasas.

La identificación del clivaje de PARP en los distintos tratamientos experimentales fue realizada por *immunoblotting* (Ver sección XII) empleando el anticuerpo monoclonal anti-PARP en dilución 1:500.

### **XI-c. Recuento de células apoptóticas por anexina V/ioduro de propidio**

Finalizado el experimento, células SH-SY5Y fueron marcadas con una solución de anexina V (AV)/ioduro de propidio (IP) (15 min a temperatura ambiente). Finalizando el procedimiento con el montaje, se determinó el porcentaje de células AV/IP positivas.

## **XII. Análisis de la expresión génica por RT-PCR y *Real time* PCR**

Para observar la expresión génica de los marcadores neuronales GAP-43, MAP-2, de los moduladores antiapoptóticos de la familia Bcl, como también de los genes REpo, iNOS, TNF- $\alpha$  y COX-2 se utilizó la técnica de RT-PCR (*reverse transcriptase - polymerase chain reaction*). Dicha metodología consta de dos etapas: uso de oligo dTs (complementario a la cola PoliA de los ARNm) como *primer* para la reacción de transcripción reversa de la cual se obtiene ADN copia (ADNc) a partir de ARNm, seguido de la amplificación mediante PCR y el uso de *primers* específicos de los ADNc correspondientes a los ARNm de interés.

### **H<sub>2</sub>O –DEPC (dietilpirocarbonato)**

En un volumen final de 1 L de agua bidestilada, se agregó un volumen de DEPC para obtener una solución con una concentración final de 0,1% (v/v). Finalizada la incubación *over night* (ON) de dicha solución bajo agitación magnética, la solución fue estelizada por calor húmedo en autoclave.

### **XII-a. Extracción de ARN**

La suspensión celular (SH-SY5Y ~  $5 \times 10^6$  células; EOC-2 ~  $2 \times 10^6$  células) en medio de cultivo trasvasada a un tubo Falcon de 15 ml fue centrifugada durante 2 min a 400 g. El sobrenadante fue descartado y el *pellet* resuspendido y homogeneizado en 500  $\mu$ l de Trizol. A continuación, se agregaron 100  $\mu$ l de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 seg. Después de incubar durante 5 min a temperatura ambiente se procedió a la obtención de la fase acuosa mediante centrifugación de la suspensión (9.500 g, 15 min, 8°C). La fase acuosa fue trasvasada a un tubo nuevo al cual se le agregaron 250  $\mu$ l de alcohol isopropílico. Luego de 10 min de incubación a temperatura ambiente, se centrifugó la solución durante 10 min a 9.500 g a 8°C. El sobrenadante fue descartado y el ARN residual fue lavado con 500  $\mu$ l de etanol 98% y centrifugación (7.500 g, 5 min, 8°C). El ARN obtenido fue resuspendido en 30  $\mu$ l de agua DEPC (0,1% v/v), con el fin de liberar el medio de ARNasas. Dicha solución fue incubada durante 10 min a 55°C. La cantidad de ARN fue cuantificada mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm y considerando 1 unidad de absorbancia equivalente a 40  $\mu$ g/ml.

### **XII-b. Reacción de retro-transcripción**

Ya obtenido el ARN, para la reacción de transcripción reversa, empleando el kit *Ready-to-Go T-Primed First Strand*, se tomaron 2,5  $\mu$ g de ARN que fueron resuspendidos en 33  $\mu$ l de agua DEPC e incubados durante 5 min a 65°C. El contenido de las muestras fue trasvasado a tubos *Ready-to-Go T-Primed First Strand* e incubado durante 5 min a 37°C. Luego de homogeneizar el contenido y realizar una breve centrifugación (*spin down*), la reacción fue desarrollada a 37°C durante 1 h. El contenido fue dividido en alícuotas para su conservación a -20 °C.

### **XII-c. Amplificación de fragmentos de ADNc por PCR**

Los *primers* utilizados para amplificar la secuencia correspondiente al ARNm de Bcl-xL, Bcl-2 (Benito *et al*, 1996) y GAP-43 (Raguenez *et al*, 1999) se detallan en la Tabla 2.

Su selección se fundamenta en el alineamiento de *primers* con las secuencias de ARNm, y el subsiguiente análisis físico-químico (longitud, composición de bases, temperatura de *melting* -T<sub>m</sub>-, etc.) como así también a la ausencia de formación de estructuras secundarias (*hairpin loops*) y la no-complementariedad entre ellos. Por otra parte, se consideró la longitud del fragmento amplificado en cada caso.

De la base de datos del *National Center for Biotechnology Information (NCBI Sequence Viewer)* del *National Institute of Health* se obtuvieron las secuencias de ARNm.

El análisis físico-químico se realizó empleando los programas *Primer Blast (NCBI)* y el *Beacon Designer*.

Se realizó la estandarización de las condiciones óptimas para amplificar cada uno de los fragmentos correspondientes a MAP-2, iNOS, COX-2 y GAPDH.

Las condiciones seleccionadas para amplificar los diferentes productos se detallan en la Tabla 3.

**Tabla 2: Secuencia de los *primers* empleados para el análisis de la expresión génica**

<i>Primers para</i>	<i>Secuencias forward y reverse</i>	<b>Longitud del producto (pb)</b>
<b>Bcl-2</b>	Forward 5'-AGATGTCCAGCCAGCTGCACCTGAC-3' Reverse 5'-AGATAGGCACCAGGGTGAGCAAGCT-3'	367
<b>Bcl-xL</b>	Forward 5'-CGGGCATTCACTGACCTGAC-3' Reverse 5'-TCAGGAACCAGCGGTTGAAG-3'	340
<b>GAP-43</b>	Forward 5'-GAGAAGGCCGGCTCAGCTGA-3' Reverse 5'-CTCTTCAGCTTGGCTGCTCT-3'	228
<b>MAP-2</b>	Forward 5'-GACGGAGTAACCAAGAGCCCA-3' Reverse 5'-GTGTGCGTGAAGAATAACTTGGTG-3'	256
<b>REpo</b>	Forward 5'-GTGGAGATCCTGGAGGGCCG-3' Reverse 5'-ACTTCCAGGGAAGCAGGTGG-3'	413
<b>iNOS</b>	Forward 5'-AACAAATGGCAACATCAGGTGCG-3' Reverse 5'-CCAGCGTACCGGATGAGCT-3'	101
<b>COX-2</b>	Forward 5'-CATTCTTTGCCAGCACTTCAC-3' Reverse 5'-GACCAGGCACCAGACCAAAGAC-3'	297
<b>GAPDH (*)</b>	Forward 5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3' Reverse 5'-TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT-3'	240

(\*) Secuencia murina con alta homología con la secuencia humana.

**Tabla 3: Protocolo de amplificación**

	<b>Bcl-2</b>	<b>Bcl-xL</b>	<b>MAP-2</b>	<b>GAP-43</b>	<b>COX-2</b>	<b>REpo (qRT)</b>	<b>iNOS</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	94 °C 5 min	94 °C 5 min	94 °C 5 min	94 °C 5 min	94°C 5 min	94°C 5 min	94°C 5 min
<b>Cantidad de ciclos</b>	30	30	30	30	30	40	40
<b>Desnaturalización de cada ciclo</b>	94 °C 45 seg	94 °C 45 seg	94 °C 30 seg	94 °C 45 seg	94 °C 30 seg	94°C 60 seg	94°C 60 seg
<b>Primer annealing</b>	60 °C 30 seg	60 °C 30 seg	62 °C 30 seg	58 °C 45 seg	62 °C 30 seg	59°C 60 seg	59°C 60 seg
<b>Elongación</b>	72 °C 45 seg	72 °C 45 seg	72 °C 30 seg	72 °C 45 seg	72 °C 30 seg	72°C 60 seg	72°C 60 seg
<b>Elongación final</b>	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72°C 10 min	72°C 10 min	72°C 10 min

\* qRT: *Real time* RT-PCR

Las condiciones de amplificación del control interno, GAPDH fueron las mismas empleadas para los distintos fragmentos blancos a amplificar.

Para la reacción de PCR, se preparó el volumen de reacción requerido conteniendo *buffer* Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs 200 μM, *primers* 0,25 μM y la enzima Taq Polimerasa 25 U/ml.

El volumen final de reacción fue de 25 μl. En cada ensayo de amplificación, se incluyó una mezcla *Mix*, sin agregado de molde para detectar posibles contaminaciones, sirviendo como control negativo.

Las mismas condiciones fueron empleadas para el desarrollo de las reacciones RT-PCR y *Real Time* PCR.

Las reacciones de RT-PCR fueron llevadas a cabo en termociclador Eppendorf, mientras que se emplearon los termocicladores Opticon e iQCyler para *Real Time* PCR.

### **XII-d. Observación de los fragmentos amplificados**

Los productos resultantes de la reacción de PCR fueron visualizados en geles de agarosa 1,5% en *buffer* TBE (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8) conteniendo bromuro de etidio (50 μl/l).

Un volumen de 10 μl de cada producto de PCR fue mezclado con 2 μl de *buffer* de siembra (xilene 0,25% , glicerol 40% v/v en *buffer* TBE) y sembrado en el gel. Con el fin de controlar, tanto el tamaño de los productos de amplificación obtenidos como la presencia de material contaminante, se sembraron en paralelo con las muestras de interés, un marcador de pares de bases y el control negativo ya descrito.

Los productos de amplificación obtenidos fueron detectados por la emisión del bromuro de etidio intercalado en el ADNc, obtenida tras la exposición a luz UV en transiluminador y las imágenes fueron digitalizadas (programa *GelPro 4.0*).

Los cambios de expresión fueron expresados comparando la intensidad de banda obtenida por el producto de PCR en estudio con respecto a la del control positivo GAPDH (Vittori *et al*, 2005; Pregi *et al*, 2006).

### **XII-e. Calidad y tratamiento del material**

Para la extracción de ARN, así como para las reacciones de RT-PCR, se empleó material plástico descartable libre de enzimas degradadoras de ADN (ADNasas) y ARN (ARNasas).

El material plástico no descartable, así como la cuba utilizada para la separación electroforética de ARN, fueron tratados con solución de NaOH 0,5 M durante 10 min, con el objeto de inactivar las ARNasas presentes. Posteriormente fueron enjuagados exhaustivamente con H<sub>2</sub>O-DEPC. Todo el material plástico fue esterilizado por autoclavado. Con el objeto de evitar la introducción de ARNasas foráneas, se implementó el uso de guantes para todos los procedimientos. Los ensayos de extracción de ARN y de PCR se llevaron a cabo en gabinete de flujo laminar. Se utilizaron equipos de micropipetas automáticas separadas para el trabajo con ARN y ADN, de manera de prevenir la contaminación de material foráneo.

### **XIII. Detección proteica por electroforesis y *Western blotting***

#### **XIII-a. Lisis celular**

**XIII-a.i. Cultivos SH-SY5Y.** La monocapa celular ( $\sim 5 \times 10^6$  cél/ml) fue suspendida en 1,5 ml de PBS frío y centrifugada a 400 g durante 10 min. El sobrenadante fue descartado y el *pellet* celular fue lavado con PBS a fin de eliminar contaminantes del medio. Luego de centrifugar, el *pellet* fue tratado con 100  $\mu$ l de *buffer* de lisis RIPA (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,1% SDS y 0,5% de deoxicolato de Na), conteniendo inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, leupeptina 4  $\mu$ M y pepstatina A 2  $\mu$ M) en una relación de 200  $\mu$ l/10<sup>7</sup> cél.). Luego de incubación con agitación frecuente por 1 h a 0 °C, se centrifugó a 15.000 g durante 15 min a 4 °C (Pregi *et al*, 2006). La cuantificación de proteínas se llevó a cabo según el método de Lowry (1951).

**XIII-a.ii. Cultivos EOC-2.** Para la lisis celular de cultivos de microglía se empleó el protocolo de lisado con 100  $\mu$ l de *buffer* de siembra (Tris-HCl 62,5 mM; pH 6,8; conteniendo SDS 2% (p/v); 2-mercaptoetanol 5% (v/v); glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0,01 g/l) 2x preparado en el momento y precalentado a 100°C durante 10 min. Los lisados celulares fueron conservados a -20°C hasta el momento de uso.

#### **XIII-b. Inmunoprecipitación**

Los extractos celulares (100  $\mu$ g/ $\mu$ l) fueron incubados con el anticuerpo correspondiente (1 h, 4°C), seguido de adición de Proteína A-agarosa para la inmunoprecipitación. Los



inmunoprecipitados fueron obtenidos por centrifugación (15.000 g, 15 min) y lavado con *buffer* de lisis.

### **XIII-c. Desarrollo electroforético**

Para dicho procedimiento se prepararon geles discontinuos de poliacrilamida (T = 8% y 10%). Las muestras de proteínas (50-100 µg) fueron tratadas con *buffer* de siembra (Tris-HCl 0,625 M pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10% v/v, azul de bromofenol 0,001% p/v, 2-mercaptoetanol 5% v/v), para desarrollar la electroforesis en condiciones desnaturalizantes, a 20 mA y 25 mA en los geles concentrador y separador, respectivamente, empleando *buffer* Tris-Glicina pH 8,3 (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1%) para el desarrollo electroforético.

### **XIII-d. Transferencia eléctrica e inmunodetección**

Finalizado el desarrollo electroforético, el gel y la membrana de nitrocelulosa (NC, Hybond, Amersham) fueron incubados en *buffer* de transferencia (Tris 0,025 M, glicina 0,195 M, SDS 0,05%, metanol 20% v/v) para luego realizar el proceso de transferencia, utilizando el mismo *buffer* (100 V durante 80 min).

Al finalizar la transferencia, la NC fue incubada en TBS-T (Tris 0,025 M, NaCl 0,137 M, KCl 0,003 M, Tween 0,1% v/v, pH 7,4) durante 30 min para después ser tratada por 1 h con solución bloqueante (leche en polvo Molico® 5% p/v en TBS-T).

Para eliminar contaminantes del procedimiento anterior, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con TBS-T. Se continuó con la incubación de las membranas (cámara húmeda, 16 h con agitación permanente) con la dilución del anticuerpo primario en TBS-T. Luego, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con TBS-T, para luego iniciar la incubación durante 1 h con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa diluido 1:2.000 en TBS-T. Después de realizar lavados con TBS-T, la membrana fue incubada con el sustrato luminol y las bandas detectadas por quimioluminiscencia, obteniéndose las imágenes. Para visualizar las bandas se utilizaron los programas informáticos *Image Reader* LAS-1000 y *LProcess* V1.Z2 (Vittori *et al*, 2005; Pregi *et al*, 2006). Las imágenes obtenidas fueron procesadas con el programa *GelPro 4.0*. Los cambios de expresión fueron expresados comparando la intensidad de banda obtenida de la proteína en estudio con respecto a la de la actina utilizada como control de carga (Pregi *et al*, 2009).

**XIII-e. Stripping y reprobing**

Después de efectuar el procedimiento anterior, las membranas fueron reutilizadas con el fin de identificar otras proteínas. Para remover completamente el primer y segundo anticuerpo, las membranas fueron incubadas en *buffer* de *stripping* (2-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2% , Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,7) a 50°C por 30 min bajo agitación. Fueron lavadas 2 veces en TBS-T durante 10 min, a temperatura ambiente. Luego, las membranas fueron nuevamente bloqueadas e incubadas con el anticuerpo primario correspondiente. Finalizada la incubación, se realizaron lavados con TBS-T, se incubó 1 h con el segundo anticuerpo (1 h; temperatura ambiente) y posteriormente se retiró el exceso de anticuerpo con lavados con TBS-T. El revelado por quimioluminiscencia se efectuó como fue detallado en el punto anterior.

**Tabla 4: Diluciones de los anticuerpos empleados para *Western blotting***

Anticuerpo	Características	Dilución empleada
PARP	Monoclonal	1:500
REpo	Policlonal	1:200
Bcl-2	Monoclonal	1:200
Bcl-xL	Monoclonal	1:100
MAP-2	Policlonal	1:500
iNOS	Policlonal	1:500
HIF-1 $\alpha$	Monoclonal	1:200
Actina	Policlonal	1:500

**XIV. Análisis por inmunofluorescencia indirecta****XIV-a. PCNA y receptor de eritropoyetina en cultivos EOC-2**

Los cultivos celulares fueron fijados con paraformaldehído (4% v/v) en PBS e incubados a temperatura ambiente, 20 min. Después de los lavados con PBS-T (PBS; Tween 0,1% v/v; pH

7,4) (3 lavados, 5 min cada uno en agitación a temperatura ambiente), se bloqueó con BSA 1% en PBS-T (1 h, en agitación a temperatura ambiente). Luego de nuevos lavados, se agregó el anticuerpo correspondiente (anti-REpo o anti-PCNA), incubándose durante 1 h a 37°C. Luego de realizar lavados con PBS-T, se desarrolló la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 durante 30 min a 37°C en oscuridad. Al finalizar, se retiró el exceso del anticuerpo con tres nuevos lavados con PBS, se realizó tinción nuclear con solución de Hoechst y se montaron los preparados en portaobjetos para observarlos al microscopio de fluorescencia.

**XIV-a.i. Análisis de imágenes**

Se obtuvieron 20 imágenes al azar por muestra. El análisis de imágenes se realizó mediante el programa *Image J*. Empleando el *plugin* de superposición de imágenes, se contabilizó el número total de células por campo y el número de células PCNA-positivas. De esta manera, se obtuvo el porcentaje de células positivas para PCNA.

**XIV-b. Detección de NF-L**

Luego de descartar el medio de cultivo y lavar los cultivos celulares con PBS, se procedió a la fijación empleando metanol (10 min, -20°C). A continuación, se procedió como se indicó en a).

**Tabla 5: Anticuerpos empleados para inmunofluorescencia indirecta**

Anticuerpo	Características	Dilución empleada
PCNA	Policlonal	1:80
REpo	Policlonal	1:50
NF-L	Policlonal	1:80

**XV. Análisis del potencial de membrana mitocondrial de células SH-SY5Y mediante inmunofluorescencia**

Las células SH-SY5Y ( $2 \times 10^5$  células) fueron cultivadas sobre cubreobjetos, previamente esterilizados por tratamiento con etanol 96° y calor, y colocadas en placas de Petri de 35 mm

estériles (Cellstar). Se dio inicio al experimento, después de una incubación de 48 h a 37°C, en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad. Para el análisis de potencial de membrana mitocondrial se empleó la sonda fluorescente *MitoTracker Red CMXRos*. Luego de los tratamientos, las células fueron incubadas con dicha sonda a una concentración final de 100 nM durante 30 minutos a 37 °C. Luego los cultivos fueron lavados con PBS y fijados con paraformaldehído (4% v/v en PBS) (20 min a temperatura ambiente). Finalizada la fijación, se realizaron lavados con PBS y luego del montaje se observaron las muestras al microscopio. Se obtuvieron 10 imágenes al azar por muestra y el análisis de imágenes se realizó mediante el programa *Image J*.

### **XVI. Estadística**

Los resultados se expresan como media aritmética y error estándar de la media (Media±SEM) como medidas de tendencia central y de dispersión, respectivamente.

La prueba de *Kruskal-Wallis* se utilizó para comparar más de dos grupos independientes. De hallarse diferencias significativas, posteriormente, se realizó la prueba de Mann-Whitney entre dos grupos, para comparar distribuciones poblacionales. Diferencias de hasta P< 0,05 fueron consideradas estadísticamente significativas.

### **XVII. Descarte del material biológico y residuos peligrosos**

Las normas del Servicio de Higiene y Seguridad de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales fueron respetadas para el descarte de todo el material empleado, en particular, el que estuvo en contacto con el colorante de Hoechst, los geles conteniendo bromuro de etidio y los solventes orgánicos empleados en electroforesis. Los líquidos biológicos y las células fueron descontaminados mediante el agregado de hipoclorito de sodio 5% durante 2 h, previo al lavado.



## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## ***I. Efecto de la exposición de células neuronales indiferenciadas a condiciones de hipoxia***

La deficiencia de oxígeno es un factor de estrés que induce múltiples respuestas. En el hombre adulto, la hipoxia cerebral severa puede causar pérdida del habla, ceguera y parálisis. Por otro lado, la hipoxia neonatal, que es una situación frecuente, puede originar encefalopatía hipóxica isquémica, deficiencias cognitivas y motoras, epilepsia y otras condiciones patológicas (Johnston *et al*, 2001; Hossain, 2005).

A nivel celular, la exposición a hipoxia puede inducir desregulación metabólica con pérdida de la homeostasis y muerte celular.

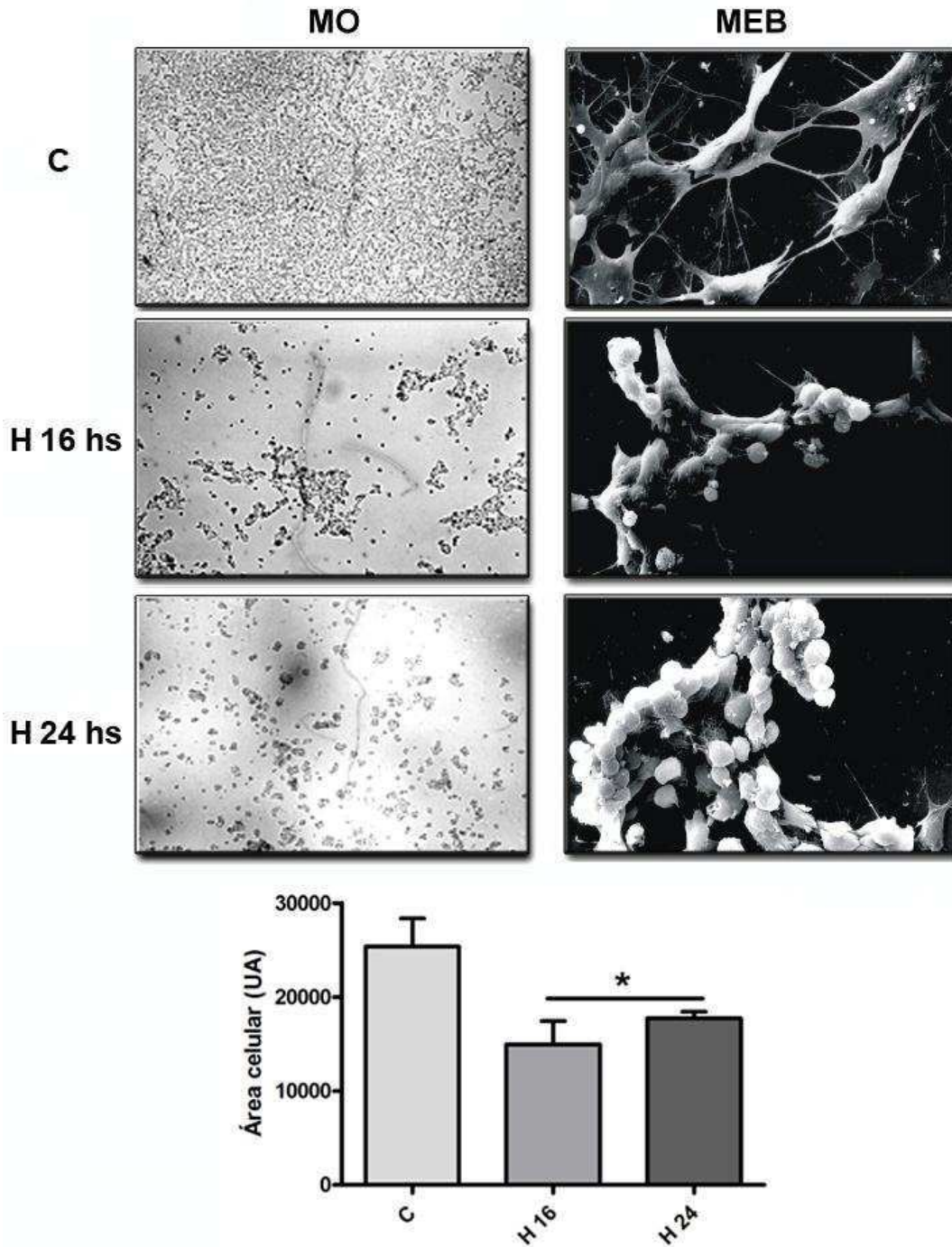
El daño por hipoxia afecta procesos críticos, como la diferenciación celular durante el desarrollo del cerebro. Es por ello, que el período de gestación en el que ocurre el daño por hipoxia es un factor importante a ser considerado cuando se investiga el daño causado. Por otro lado, se ha observado que el nivel de activación de las caspasas ejecutoras es mayor en el cerebro inmaduro que en el maduro (Hossain, 2005).

Estudios en modelos *in vivo* e *in vitro* han sugerido que luego del daño por hipoxia-isquemia se desencadenan procesos bioquímicos y moleculares, tales como edema, despolarización de membrana, liberación o inhibición del *uptake* de neurotransmisores, incremento de los niveles de calcio intracelular, producción de especies reactivas de oxígeno, neurodegeneración y muerte celular.

Diversos trabajos han demostrado que la hipoxia causa muerte por apoptosis y que esta muerte celular es acelerada por estrés oxidativo, excitotoxicidad e inflamación.

### **I-a. Efecto citotóxico de la exposición de cultivos SH-SY5Y indiferenciados a condiciones de hipoxia**

Con el fin de estudiar si la hipoxia puede producir alteraciones en cultivos de células de origen neuronal SH-SY5Y en estado indiferenciado, se diseñó un ensayo con distintos tiempos de exposición celular a hipoxia ambiental. Se analizaron características morfológicas, así como parámetros de viabilidad celular y muerte por apoptosis.



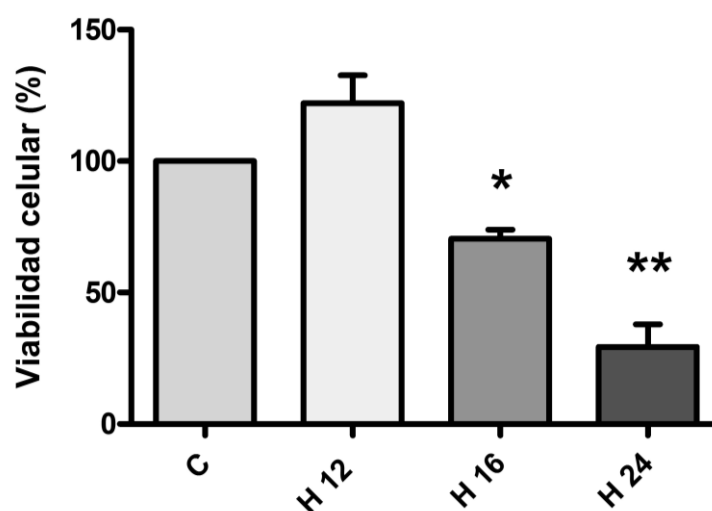
**Figura 1.1. La exposición a hipoxia produce alteraciones morfológicas en cultivos indiferenciados de células SH-SY5Y**

Células de origen neuronal, SH-SY5Y, fueron incubadas bajo condiciones de hipoxia ambiental durante distintos períodos. El análisis morfológico se realizó mediante microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de barrido (MEB). La figura muestra pérdida notoria de la neuritogénesis con disminución de la adhesión celular ya a partir de 16 h de exposición a hipoxia. El gráfico representa las alteraciones a nivel del área celular ante la incubación en condiciones de hipoxia (\* $P < 0,05$ ; con respecto al Control). Las barras representan Media $\pm$ SEM de 3 ensayos independientes.



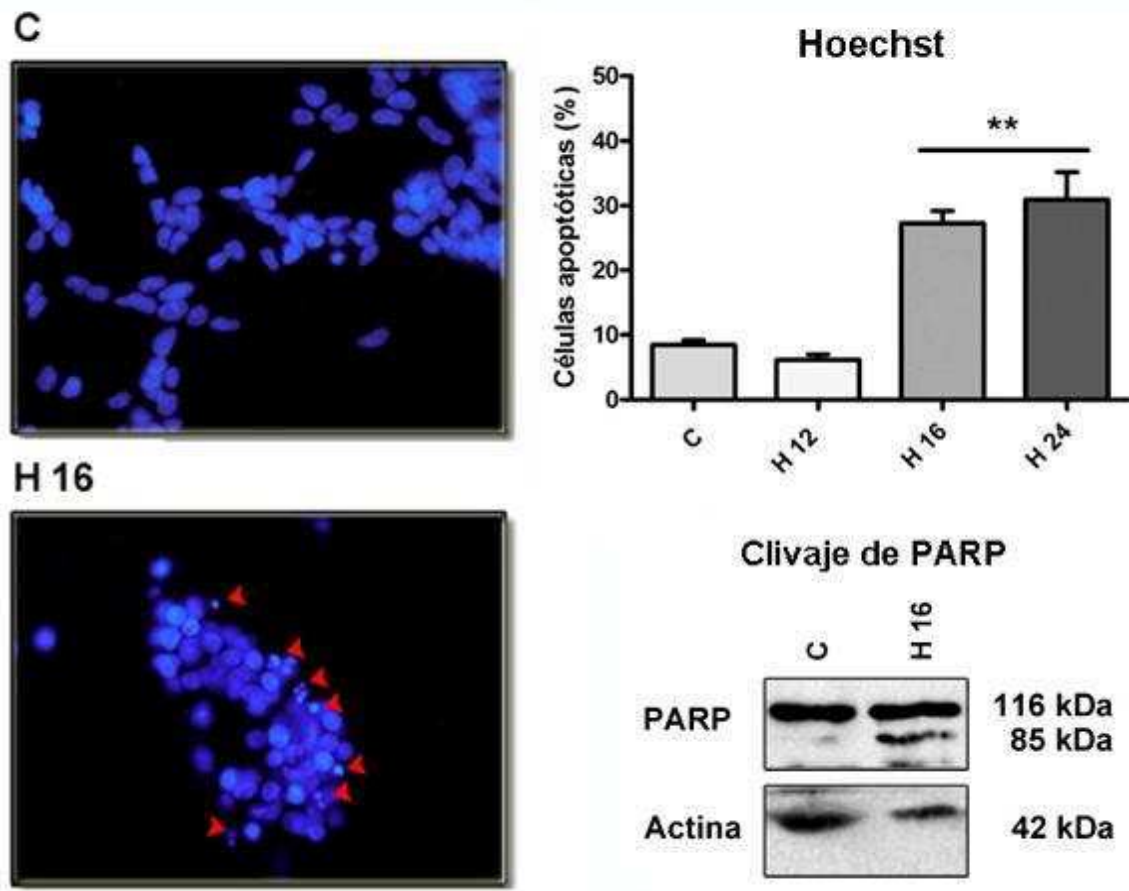
Los resultados muestran que a partir de las 16 h de exposición a hipoxia se observan alteraciones morfológicas notorias, con pérdida de neuritas, disminución de la adhesión al sustrato y reducción del tamaño celular (Figura I.1).

Además, se advirtió una disminución significativa de la viabilidad celular dependiente del tiempo de exposición (Figura I.2). Esta observación fue coincidente con un incremento de la muerte celular por apoptosis, analizada mediante el recuento de núcleos apoptóticos y el clivaje de la proteína PARP, sustrato de caspasa 3 y caspasa 7 (Figura I.3).



**Figura I.2. La exposición a hipoxia disminuye la viabilidad celular de células SH-SY5Y**

Células SH-SY5Y, en estado indiferenciado, fueron expuestas a diferentes períodos de hipoxia ambiental (12, 16 ó 24 h). Se analizó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. La viabilidad celular disminuyó significativamente en una forma dependiente del tiempo de exposición a partir de las 16 horas (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  con respecto al Control). Las barras representan Media $\pm$ SEM de 5 ensayos independientes, expresados como porcentaje del control.



**Figura I.3. La exposición a hipoxia induce muerte celular por apoptosis en cultivos de células SH-SY5Y**

Cultivos de células SH-SY5Y fueron expuestos a hipoxia ambiental por diferentes períodos (12, 16 ó 24 h). Se analizó la muerte celular mediante cuantificación de núcleos apoptóticos (tinción de Hoechst) por microscopía de fluorescencia. Las flechas muestran los cuerpos apoptóticos que se observan en las microfotografías. Se observó un incremento significativo de muerte celular por apoptosis luego de la exposición a hipoxia (\*\*P<0,01 con respecto al Control). Las barras representan Media±SEM de 5 ensayos independientes. Los resultados observados por fluorescencia fueron complementados con la detección del clivaje de PARP por *Western blotting*. La presencia de la banda de 85 kDa indica la degradación de dicha proteína. La proteína actina, de 42 kDa, fue incluida como control de carga proteica.

## ***II. Efecto de la eritropoyetina sobre células neuronales en estadio indiferenciado expuestas a hipoxia***

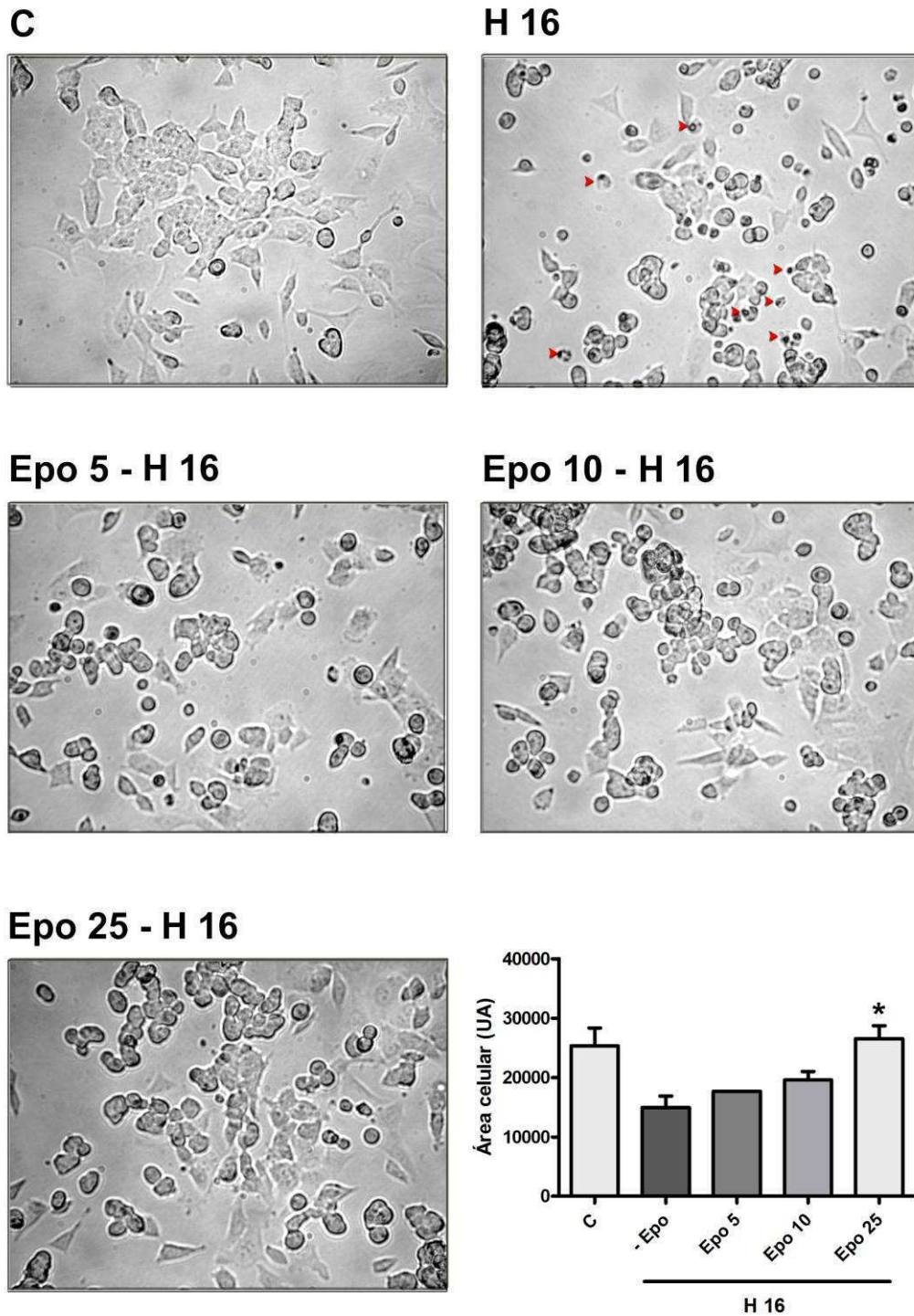
Numerosos estudios han confirmado la presencia del receptor de Epo (REpo) en tejidos no hematopoyéticos, tales como sistema nervioso central (SNC), endotelio vascular, miocardio, endotelio intestinal, músculo liso, testículo y placenta. Se ha reportado que la Epo constituye un importante factor de inducción de neurogénesis durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario (Genc *et al*, 2004).

En trabajos previos de nuestro laboratorio hemos demostrado que el pretratamiento con Epo protege a cultivos de células neuronales SH-SY5Y indiferenciadas de la apoptosis inducida por distintos factores, como staurosporina (Pregi *et al*, 2006) y TNF- $\alpha$  (Pregi *et al*, 2009).

### **II-a. Acción protectora de la eritropoyetina en cultivos SH-SY5Y expuestos a hipoxia**

Uno de los objetivos principales de este trabajo es analizar el efecto neuroprotector de Epo en diferentes estadios de diferenciación celular. Inicialmente, se investigó la acción de Epo sobre células neuronales indiferenciadas expuestas a hipoxia ambiental. Para ello, cultivos de células SH-SY5Y indiferenciadas fueron pretratados durante 9 h con distintas concentraciones de Epo (5, 10 y 25 U/ml) y luego expuestos a hipoxia. Mediante el ensayo de viabilidad de MTT y recuento diferencial de núcleos apoptóticos se evaluó la acción citoprotectora de Epo.

En cultivos con 10 U Epo/ml, se observó, por microscopía óptica, la disminución de alteraciones morfológicas inducidas por exposición a hipoxia. Sin embargo, los resultados de cuantificación del área celular sugieren que 25 U/ml de Epo son necesarios para la prevención de alteraciones morfológicas (Figura II.1).

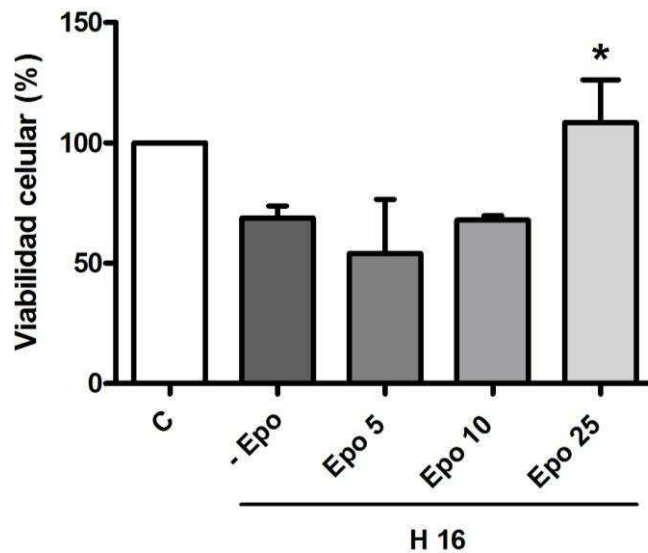


**Figura II.1. Eritropoyetina previene las alteraciones morfológicas inducidas por hipoxia.**

**Análisis morfológico por microscopía óptica**

Células SH-SY5Y fueron pretratadas por 9 h con diferentes dosis de Epo (5, 10 y 25 U/ml) y luego expuestas a hipoxia durante 16 h. Como controles, se utilizaron células sin tratamiento (Control) y células expuestas a hipoxia sin pretratamiento con Epo (-Epo). Las imágenes de microscopía óptica muestran que el tratamiento de los cultivos SH-SY5Y con Epo (25 U/ml, 9 h) previene la disminución del área celular. Los resultados de los ensayos sin Epo y con Epo 5 y 10 U/ml no fueron diferentes entre sí y todos resultaron significativamente diferentes del Control (\*P<0,05). Las barras representan Media±SEM del área celular medida en 4 ensayos independientes.

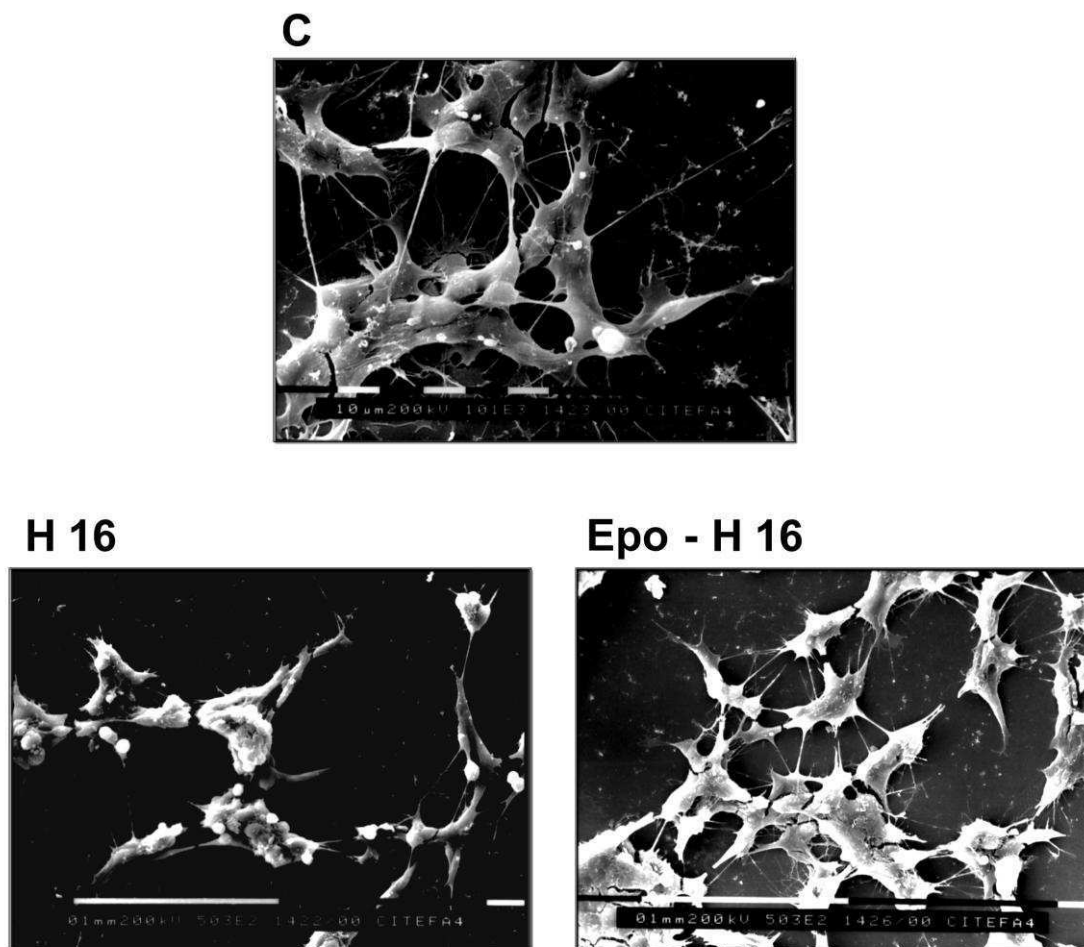
Por otro lado, los ensayos de viabilidad celular mostraron la dosis de Epo para la cual se observa un efecto citoprotector ante la exposición de células indiferenciadas a hipoxia es de 25 U Epo/ml (Figuras II.2).



**Figura II.2. Eritropoyetina previene el efecto de la hipoxia sobre la viabilidad celular**

Cultivos SH-SY5Y fueron tratados con diferentes dosis de Epo (5, 10 y 25 U/ml) por 9 h. Luego, los cultivos fueron incubados bajo condiciones de hipoxia ambiental y se analizó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. La disminución de la viabilidad celular causada por hipoxia es prevenida por el pretratamiento con Epo (\* $P < 0,05$  Epo 25 vs. -Epo). Las barras representan  $\text{Media} \pm \text{SEM}$  de 5 ensayos independientes, expresados como porcentaje del control.

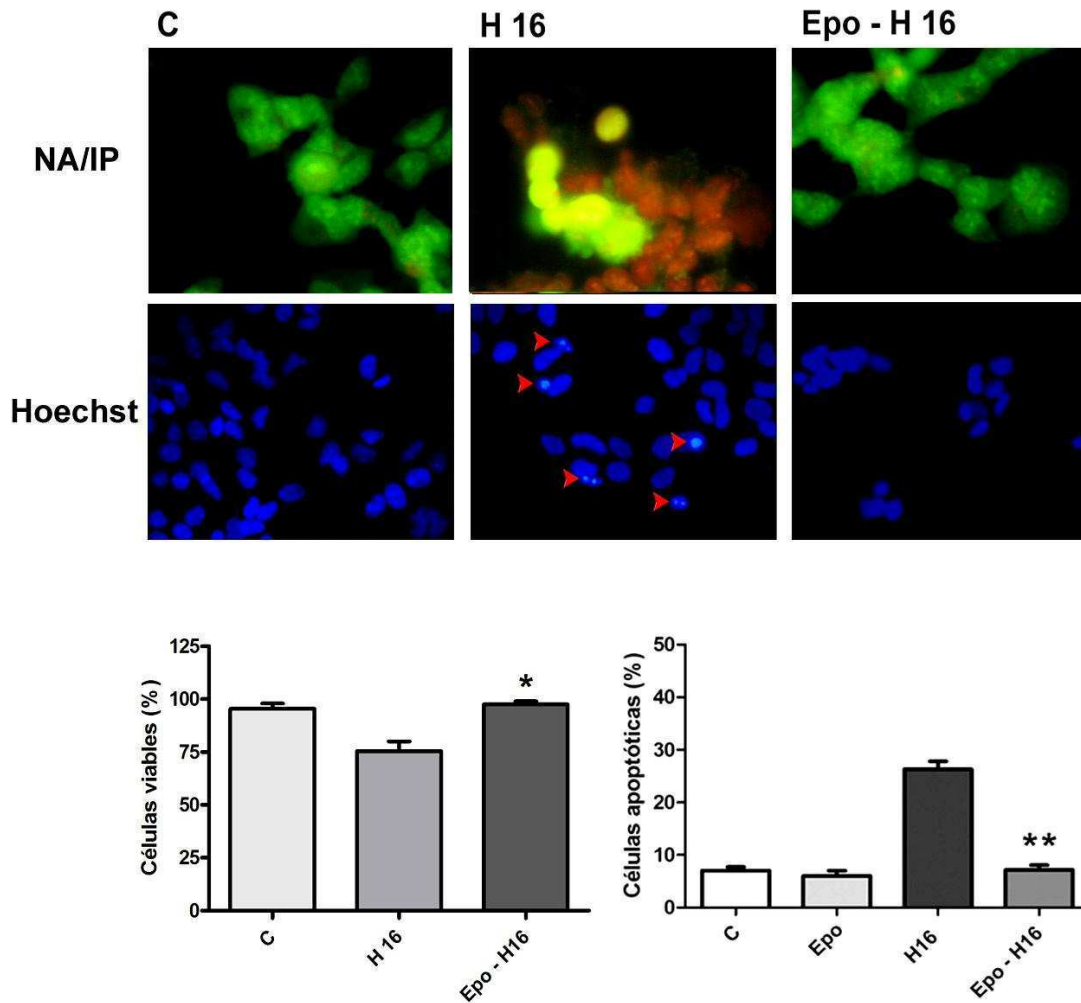
Empleando la dosis de Epo para la cual se advirtió un efecto neuroprotector, se realizó un análisis de la morfología celular con mayor detalle mediante MEB. Como se puede observar, la dosis más alta de Epo impidió totalmente los cambios morfológicos causados por el daño por hipoxia (Figura II.3).



**Figura II.3. Eritropoyetina previene alteraciones morfológicas. Análisis por MEB**

Cultivos SH-SY5Y fueron pretratados con Epo (25 U/ml, 9 h) y luego expuestos a hipoxia durante 16 h. Un análisis detallado de la morfología fue realizado mediante MEB. Se pueden advertir los cambios morfológicos inducidos por la exposición a hipoxia y la prevención de tales alteraciones por el pretratamiento con Epo.

En concordancia con los resultados anteriores se observó que el pretratamiento con Epo (25 U/ml) previno la disminución en la viabilidad celular, analizado por tinción con naranja de acridina/ioduro de propidio y la muerte celular por apoptosis, determinado por tinción de Hoechst y recuento de núcleos apoptóticos (Figura II.4).

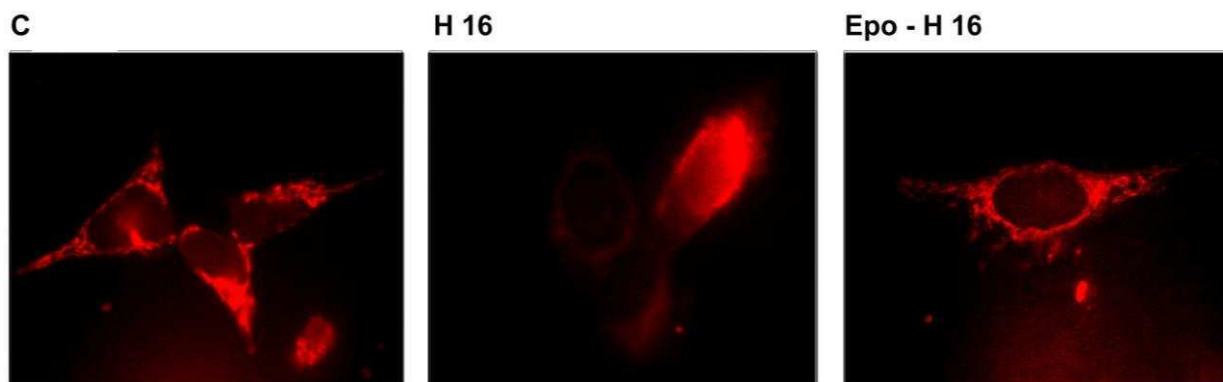


**Figura II.4. Eritropoyetina previene la muerte por apoptosis de células neuronales expuestas a hipoxia**

Células SH-SY5Y fueron pretratadas con Epo (25 U/ml; 9h) y luego expuestas a hipoxia (Epo25-H16). Se determinó la viabilidad celular mediante tinción con ioduro de propicio/naranja de acridina. A su vez, se analizó el porcentaje de muerte celular por recuento de núcleos apoptóticos (tinción de Hoechst) mediante microscopía de fluorescencia. El pretratamiento de los cultivos indiferenciados SH-SY5Y con Epo previno la disminución en la viabilidad celular (\* $P < 0,05$  Epo-H16 vs. H16) como también la muerte por apoptosis inducida por hipoxia (\*\* $P < 0,01$  Epo-H16 vs. H16). Las barras representan Media $\pm$ SEM de 5 ensayos independientes.

Se ha reportado que uno de los mecanismos por el cual la Epo presenta un efecto citoprotector es mediado por el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial en células de origen epitelial (Wang *et al*, 2009). Es por ello que analizamos el potencial de membrana empleando la sonda *Mitotracker Red*. En células vivas, dicha sonda marca mitocondrias, siendo su acumulación dependiente a su potencial de membrana. De esta manera, mitocondrias con alteraciones presentaran una marca difusa (Alaimo *et al*, 2011). Los resultados obtenidos indican que los cultivos expuestos a hipoxia ambiental

presentan una marcación mitocondrial de tipo difusa sugiriendo una alteración a nivel del potencial de membrana. Por otro lado, cultivos tratados con Epo presentan mitocondrias marcadas con morfología de tipo tubular, similares al tratamiento control, sugiriendo que la Epo previene alteraciones en el potencial de la mitocondria inducidos por hipoxia (Figura II.5).



**Figura II.5. La eritropoyetina previene alteraciones del potencial de membrana mitocondrial inducidas por hipoxia**

Células SH-SY5Y, fueron tratadas con Epo (25 U/ml, 9h) y luego expuestas a hipoxia. Se analizaron alteraciones de la morfología mitocondrial mediante la marcación con la sonda *Mitotracker Red*. El pretratamiento de los cultivos indiferenciados de células SH-SY5Y con Epo previno las alteraciones mitocondriales inducidas por hipoxia. Se muestran imágenes representativas de 3 ensayos independientes.

**II-b. Modulación de factores de la familia Bcl-2 por eritropoyetina en cultivos neuronales inmaduros**

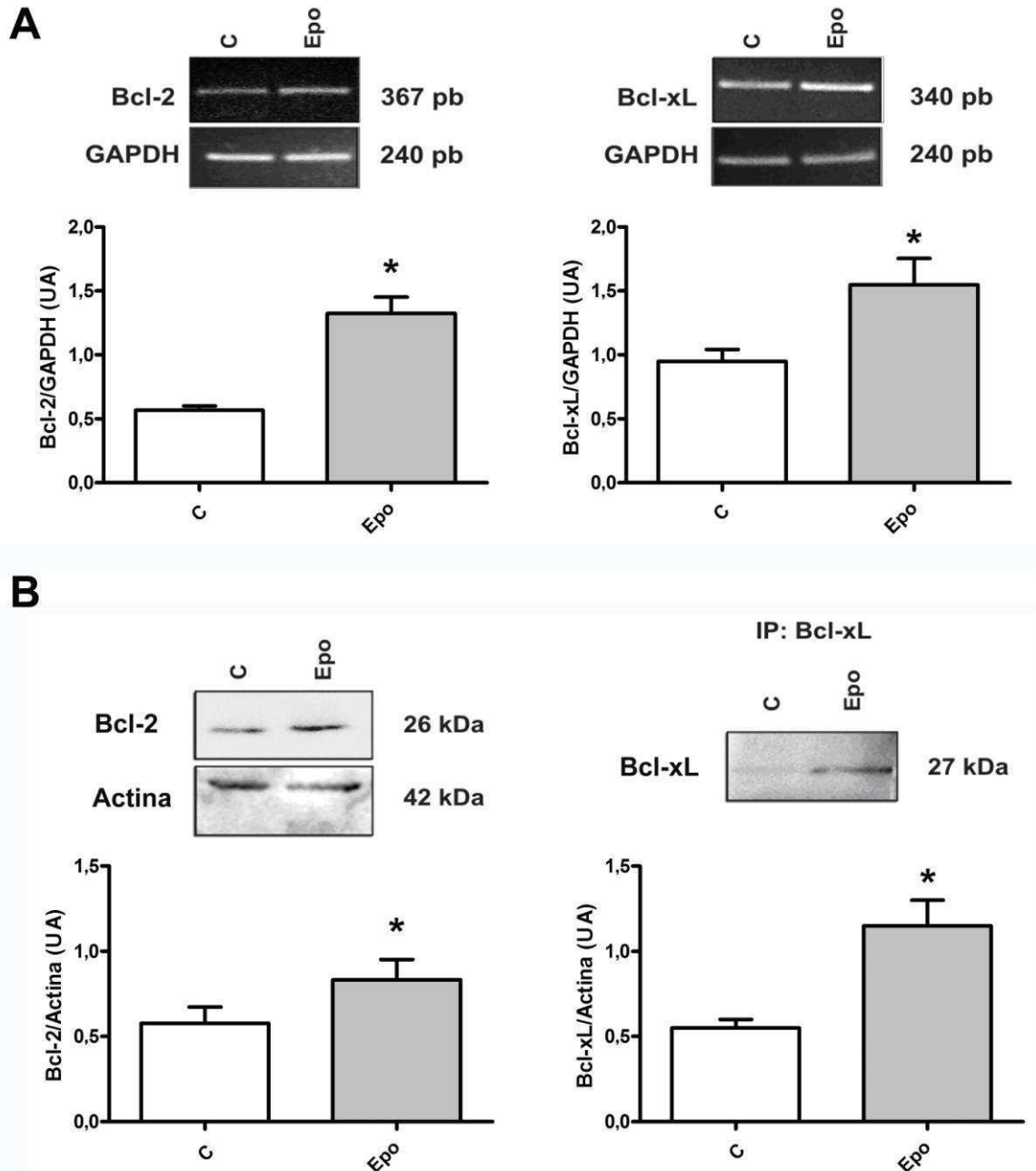
En la fisiología de la muerte celular por apoptosis, los miembros de la familia Bcl-2 (*B-cell leukaemia/lymphoma-2*) tienen gran relevancia. Esta familia se encuentra conformada por miembros pro y antiapoptóticos, los cuales ejercen efectos opuestos sobre la integridad mitocondrial. El balance entre estos factores pro y antiapoptóticos determina la activación de la fase efectora del proceso apoptótico (Benn *et al*, 2004; Donovan *et al*, 2004).

La Epo es reconocida como un factor antiapoptótico y una de sus vías de acción es la modulación de los factores de la familia Bcl-2, siendo genes blanco de la cascada de señalización causada por la activación del receptor de Epo ante la unión con su ligando (Buemi *et al*, 2002; Chong *et al*, 2003; Wen *et al*, 2003; Testa *et al*, 2004; Pregi *et al*, 2006; Pregi *et al*, 2009).



A partir de estos antecedentes se formuló como objetivo analizar la regulación de Bcl-2 y Bcl-xL en cultivos de células SH-SY5Y. Mediante RT-PCR semicuantitativa y Western blotting se estudiaron los niveles de expresión de ambos factores.

Como se puede observar en la Figura II.6, Epo indujo un aumento en los niveles de ARNm y proteína de Bcl-2 y Bcl-xL en cultivos indiferenciados.



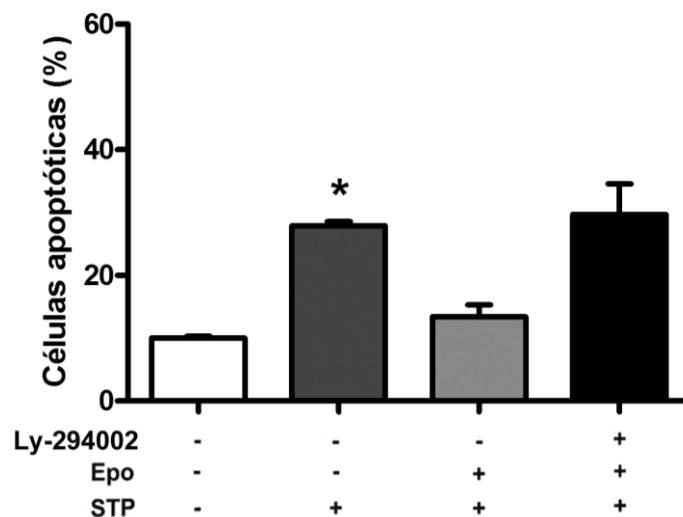
**Figura II.6. Eritropoyetina modula positivamente los factores antiapoptóticos Bcl-2 y Bcl-xL en cultivos de células SH-SY5Y indiferenciadas**

Se analizó la modulación de la expresión de Bcl-2 y Bcl-xL por Epo. Mediante RT-PCR semicuantitativa se analizaron los niveles de ARNm, utilizando GAPDH como estándar interno. Mediante *Western blotting* se determinaron los niveles proteicos, empleando actina como control

de carga. Las barras representan Media+SEM. (A) Epo reguló positivamente la expresión a nivel de ARNm de ambos factores antiapoptóticos en células inmaduras (\*P<0,05; n=3). (B) La expresión de proteína de ambos factores antiapoptóticos también aumentó con el tratamiento con Epo (\*P<0,05; n=3).

La quinasa PI3K representa un elemento importante para distintas vías de señalización involucradas en el control de la diferenciación, supervivencia y ciclo celular. Por otra parte, ésta es una vía que media la protección de células neuronales inmaduras SH-SY5Y frente a la apoptosis inducida por staurosporina (Pregi *et al*, 2006) o TNF- $\alpha$  (Pregi *et al*, 2009).

En este trabajo observamos también el bloqueo del efecto protector de la Epo en los cultivos de células SH-SY5Y por preincubación con el inhibidor de PI3K, Ly-294002. Como se muestra en la Figura II.7, el efecto protector de la Epo frente a la apoptosis inducida por hipoxia ambiental fue impedido por la presencia del inhibidor de PI3K.



**Figura II.7. Eritropoyetina activa la vía PI3K**

Cultivos de células SH-SY5Y fueron pretratados con el inhibidor Ly-294002 (25  $\mu$ M, 2 h) y luego expuestos a Epo durante 12 h. A continuación, los cultivos fueron inducidos a apoptosis con 100 nM de STP por 12 h. Al finalizar la incubación, se determinó el nivel de muerte celular mediante tinción de Hoechst. El efecto neuroprotector de Epo se vio afectado por la inhibición de PI3K.

### ***III. Influencia de la diferenciación en la respuesta de células neuronales a hipoxia ambiental***

Actualmente se reconoce que los mecanismos de muerte celular en el cerebro son marcadamente diferentes en estadios inmaduro y en desarrollo, por lo que las estrategias terapéuticas aplicadas en adultos no son trasladables en forma directa al neonato (Vannucci *et al*, 2004). En relación a esto, si bien la Epo constituye un factor de protección celular frente a estímulos apoptóticos, poco se sabe acerca de la modulación de su acción en diferentes estadios de diferenciación neuronal, siendo un tema de investigación necesario para la utilización de la Epo recombinante humana en neonatos.

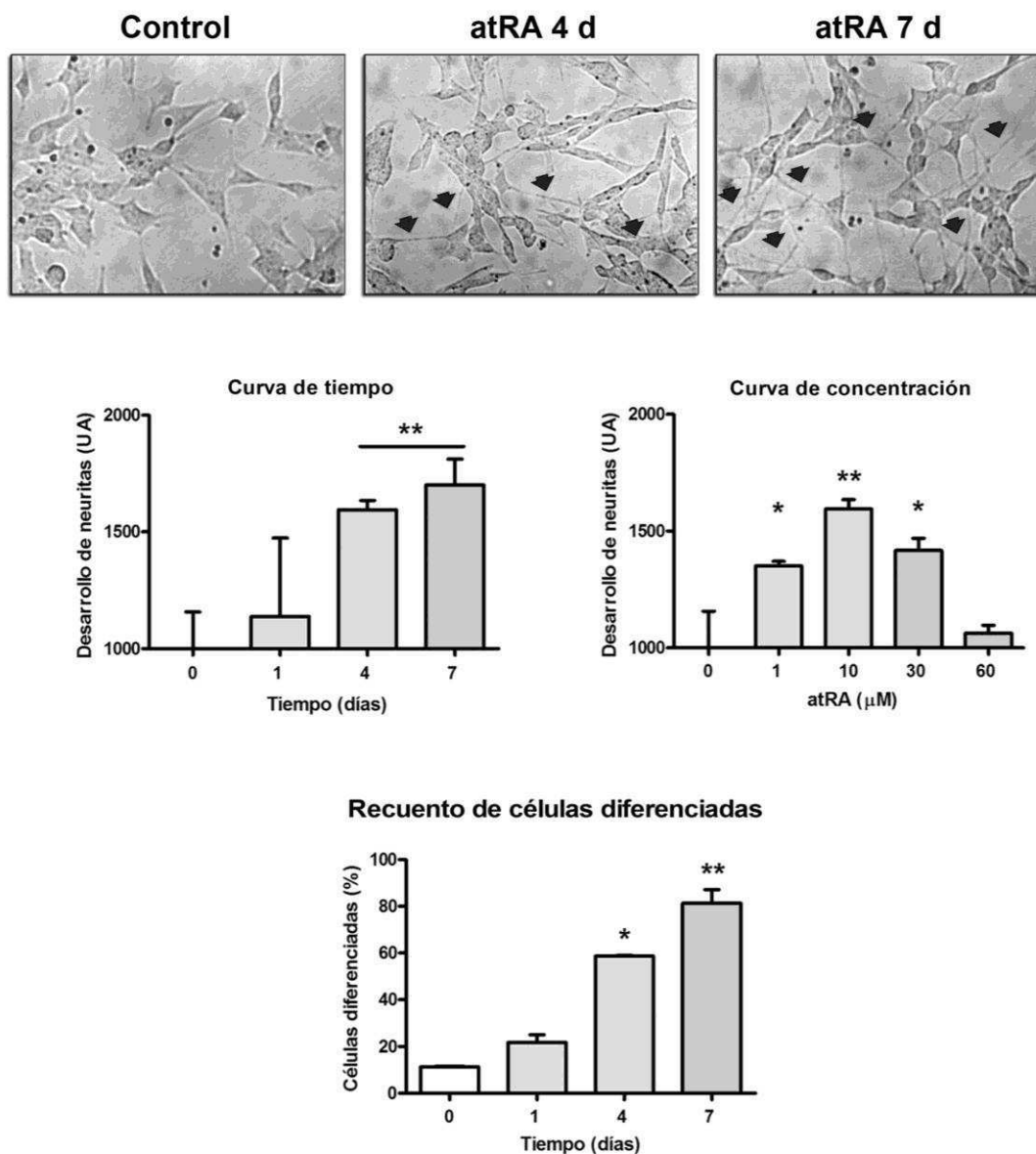
#### **III-a. Caracterización de diferenciación neuronal de células SH-SY5Y por ácido retinoico**

El fenómeno de diferenciación es un proceso complejo regulado por vías intrínsecas de la propia célula, por las interacciones célula-célula y célula-sustrato, así como por la participación de un amplio espectro de moléculas extracelulares, como hormonas, factores de crecimiento, citoquinas y factores tróficos, entre otros (López-Carballo *et al*, 2002).

El ácido retinoico (atRA), derivado de la vitamina A, tiene un rol importante durante el desarrollo de las primeras etapas embrionarias y en la regeneración de órganos y sistemas, incluyéndose entre ellos el nervioso. *In vitro*, el atRA participa de la regulación de la transición entre el estado de célula precursora y célula en estado diferenciado. Dos tipos de receptores, RAR y RXR son los responsables de mediar la señalización de atRA. Éstos pertenecen a la superfamilia de receptores dependiente de ligando cuya activación conduce a la modificación del patrón de expresión de genes *target* (López-Carballo *et al*, 2002). A su vez, el atRA es un reconocido inductor de diferenciación celular (Presgraves *et al*, 2004; Xie *et al*, 2010).

Durante el proceso de diferenciación, la célula desarrolla prolongaciones (o neuritas), mientras que el cuerpo celular sufre una disminución de su tamaño (López-Carballo *et al*, 2002; Edsjö *et al*, 2004).

Mediante análisis morfológico y de madurez celular se determinaron las condiciones de tiempo y concentración del diferenciador atRA a emplear. En la Figura III.1 se observa que la diferenciación de células SH-SY5Y con atRA 10  $\mu$ M durante 4 días induce un incremento significativo de la neuritogénesis y del porcentaje de células morfológicamente diferenciadas, observadas también por MEB (Figura III.2).



**Figura III.1. Análisis morfológico de células SH-SY5Y. Curvas de concentración y de tiempo del diferenciador ácido retinoico**

Mediante microscopía óptica y análisis morfológico se determinaron las condiciones de concentración de atRA y de tiempo de incubación (en presencia de atRA 10  $\mu$ M) a emplear. Como se puede observar, la diferenciación con atRA incrementa significativamente la longitud de neuritas (\* $P < 0,05$  y \*\* $P < 0,01$  atRA vs.  $C_0$ ). Las barras representan Media+SEM de 7 ensayos independientes.

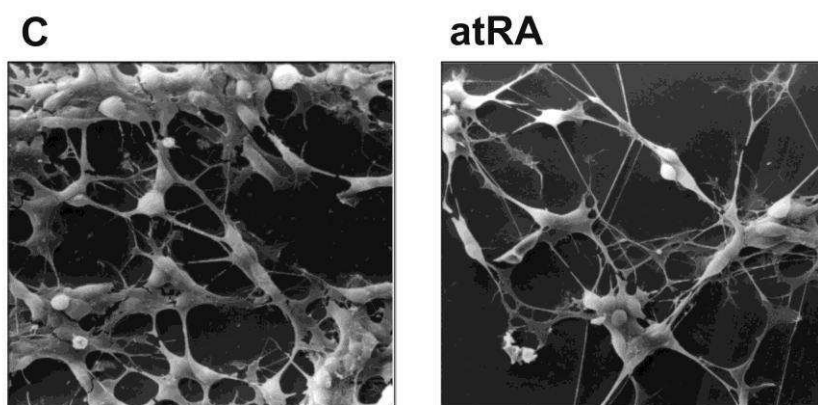
Además de los cambios morfológicos, durante el proceso de diferenciación se producen cambios bioquímicos, tales como la expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de neurotransmisores, de canales iónicos involucrados en la señalización eléctrica y de proteínas estructurales. Entre éstas, se encuentra la proteína GAP-43, la cual está involucrada en el crecimiento y motilidad del cono axonal durante la formación de sinapsis. Dado que su expresión es neuroespecífica, el aumento de su ARNm constituye una herramienta útil para establecer el estado de diferenciación neuronal (Encinas *et al*, 1999; López-Carballo *et al*, 2002; Edsjö *et al*, 2004).

Por otro lado, se ha reportado que el factor Bcl-2 participa en la regulación de la diferenciación neuronal (Hanada *et al*, 1993; Monaghan *et al*, 2008; Zhang *et al*, 1996).

Otro marcador asociado a la diferenciación neuronal es la proteína MAP-2 (*Microtubule-associated protein 2*), cuya función se encuentra relacionada con el mantenimiento del citoesqueleto y la morfología celular (Kalcheva *et al*, 1995).

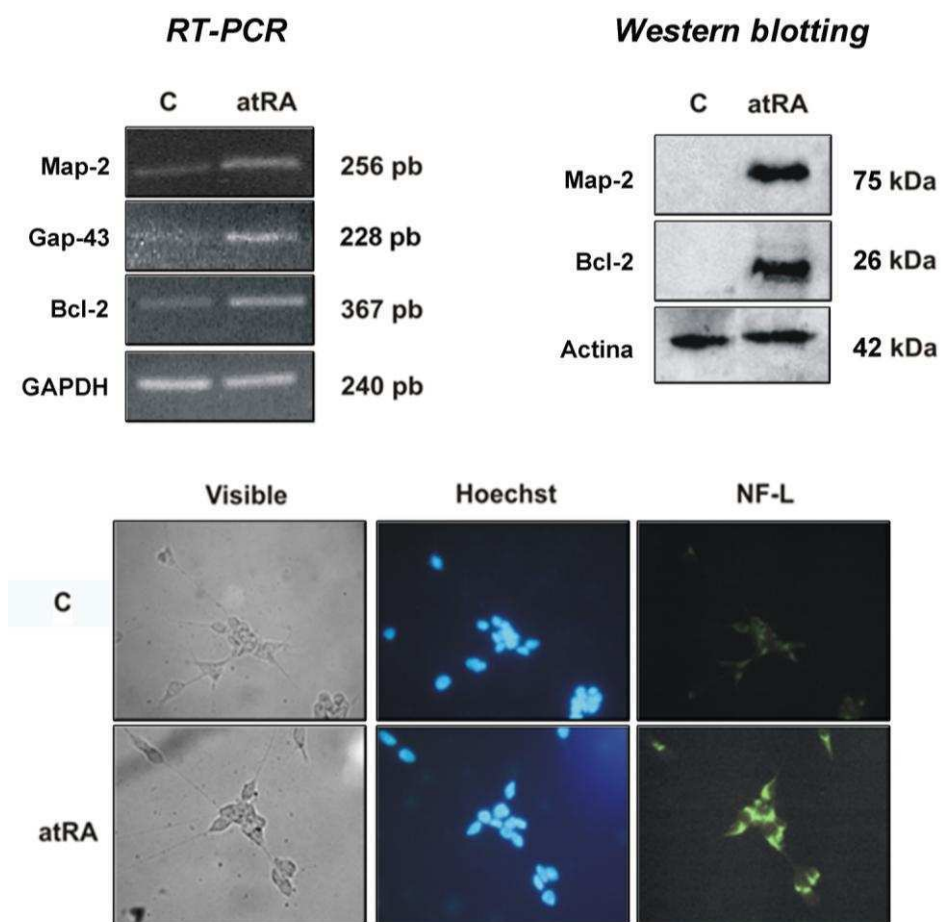
A su vez, los neurofilamentos (NF), se expresan en neuronas maduras, sirviendo así de marcador de diferenciación (Montzka *et al*, 2009).

El proceso de diferenciación fue corroborado con la detección de un aumento en los niveles de ARNm y proteína de marcadores neuronales GAP-43, Bcl-2 y MAP-2, analizados por RT-PCR y *Western blotting*, respectivamente, así como de NF-L analizado por microscopía de fluorescencia (Figura III.3).



**Figura III.2. Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido de células SH-SY5Y diferenciadas**

Mediante MEB se observó en detalle la morfología de cultivos indiferenciados (C) y diferenciados por atRA (10  $\mu$ M, 4 d). Se puede advertir con más detalle la aparición de neuritas luego de la diferenciación con atRA.



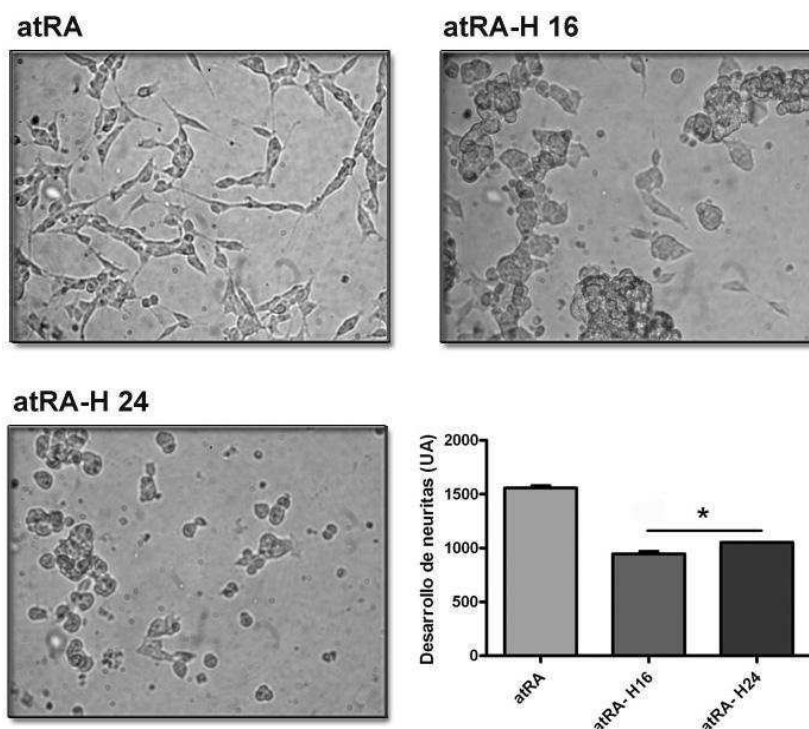
**Figura III.3. Ácido retinoico induce diferenciación celular en cultivos SH-SY5Y hacia un estado neuronal maduro**

Cultivos de células SH-SY5Y fueron incubados con el agente diferenciador atRA (10  $\mu$ M, 4 d). Mediante estudios por RT-PCR, *Western blotting* e inmunofluorescencia indirecta, se detectó un aumento en los niveles de ARNm y proteína de marcadores neuronales GAP-43, Bcl-2, MAP-2 y NF-L, factores expresados en el estado neuronal maduro.

**III-b. Resistencia celular de cultivos SH-SY5Y diferenciados con ácido retinoico ante la exposición a condiciones de hipoxia ambiental**

Se analizó el efecto de la hipoxia sobre cultivos de células SH-SY5Y diferenciadas con atRA con el fin de investigar si por exposición a condiciones de hipoxia aguda se producen efectos similares a los observados en cultivos de células indiferenciadas.

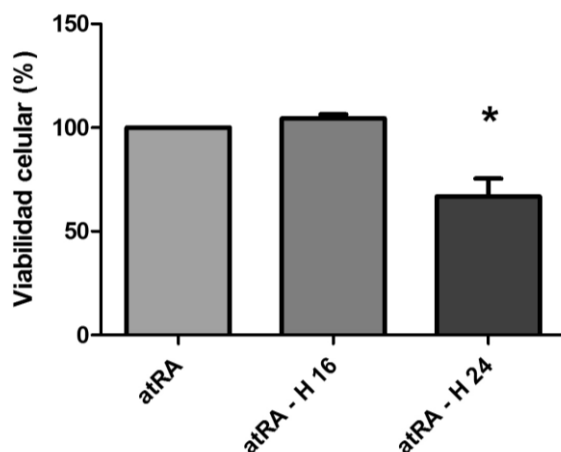
A nivel morfológico se pudieron observar alteraciones causadas por la exposición a hipoxia sobre el desarrollo de neuritas inducido por atRA (Figura III.4).



**Figura III.4. La exposición a hipoxia produce alteraciones morfológicas en cultivos diferenciados**

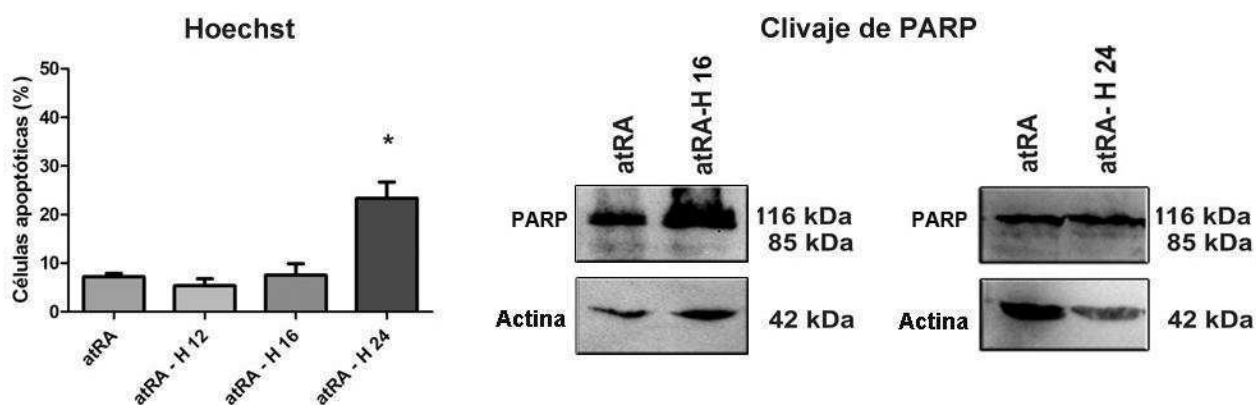
Cultivos SH-SY5Y diferenciados con atRA (10  $\mu$ M, 4 d) fueron expuestos a condiciones de hipoxia ambiental durante distintos períodos. Se pudo observar que a partir de 16 h de hipoxia se producen alteraciones morfológicas notorias, tales como disminución significativa de neuritas (\* $P < 0,05$  vs. atRA), con pérdida de adhesión celular a las 24 h. Las barras representan Media  $\pm$  SEM de 4 ensayos independientes.

A diferencia de lo observado en cultivos de células indiferenciadas SH-SY5Y, los cultivos diferenciados con atRA no sufrieron alteración de la viabilidad ni apoptosis por exposición a hipoxia durante 16 h. Pérdida de la viabilidad y aumento de muerte celular programada (incremento del número de células apoptóticas y clivaje de PARP) fueron detectados a partir de las 24 h, sugiriendo que la diferenciación celular por este factor incrementa la supervivencia celular en ambientes con bajos niveles de oxígeno (Figuras III.5 y III.6).



**Figura III.5. Los cultivos SH-SY5Y diferenciados con ácido retinoico muestran resistencia frente a su exposición a hipoxia**

Células SH-SY5Y diferenciadas con atRA (10  $\mu$ M, 4 d) fueron expuestas a diferentes períodos de hipoxia ambiental (16 ó 24 h), analizándose la viabilidad celular por el ensayo de MTT. La figura muestra la disminución significativa de la viabilidad celular observada después de 24 h de exposición (\* $P < 0,05$  vs. atRA). Las barras representan Media  $\pm$  SEM de 4 ensayos independientes, expresados como porcentaje del control.



**Figura III.6. Células SH-SY5Y diferenciadas con ácido retinoico muestran resistencia a la apoptosis inducida por hipoxia**

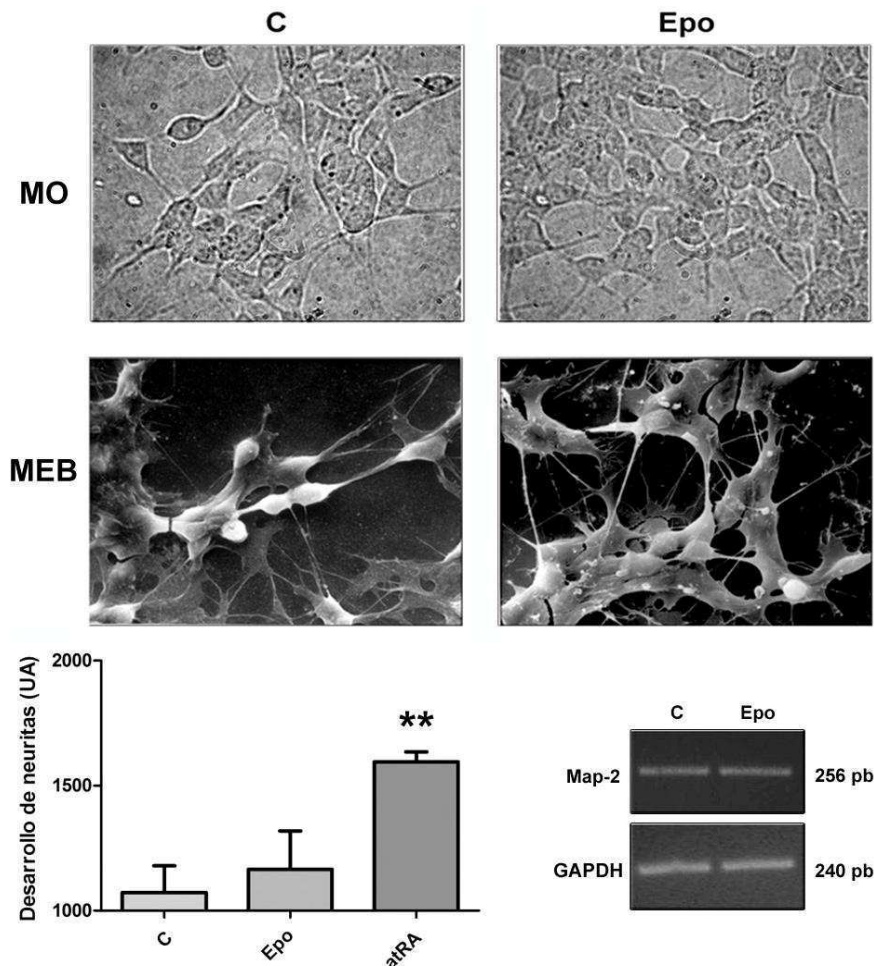
Cultivos diferenciados (atRA 10  $\mu$ M, 4 d) fueron incubados en condiciones de hipoxia ambiental por diferentes períodos (16 ó 24 h). Se cuantificó el número de núcleos apoptóticos (tinción de Hoechst) por microscopía de fluorescencia de muestras codificadas. Las barras representan Media  $\pm$  SEM de 5 ensayos independientes. Se observó un incremento significativo de muerte celular por apoptosis luego de 24 h de exposición a hipoxia (\* $P < 0,05$  vs. atRA). Además, la exposición a hipoxia no induce clivaje de PARP.



## IV- Efecto de la eritropoyetina en cultivos de células neuronales diferenciadas

### IV-a. Eritropoyetina y diferenciación celular

Diversos trabajos han demostrado una acción de la Epo en la diferenciación celular de los progenitores eritroides durante la eritropoyesis (Jelkmann, 2011). Además, se ha observado que la Epo puede tener una acción en la neurogénesis (Byts *et al*, 2008). Es por ello que investigamos si la Epo podía tener una acción como agente diferenciador en cultivos de células SH-SY5Y.



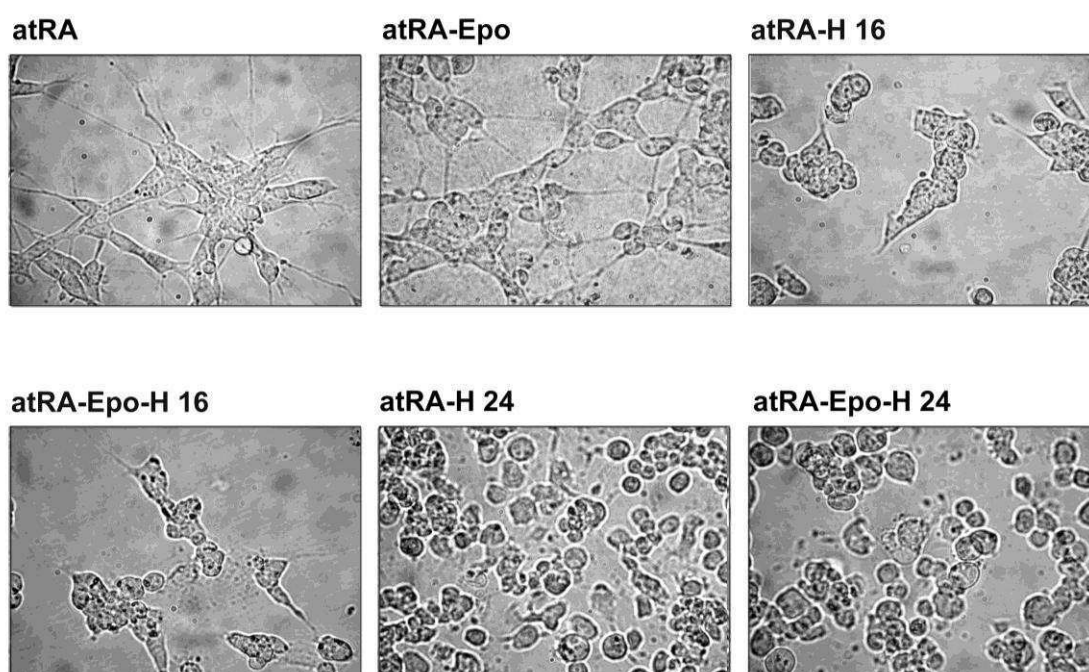
**Figura IV.1. Eritropoyetina no induce diferenciación neuronal**

Células SH-SY5Y fueron tratadas con Epo (25 U/ml). Se realizó análisis de imágenes por microscopía óptica y estudio del desarrollo de neuritas. Mediante RT-PCR semicuantitativa se analizaron los niveles de ARNm de Map-2, marcador de diferenciación neuronal. El tratamiento con Epo no incrementó la neuritogénesis. Las barras representan Media $\pm$ SEM de 3 ensayos independientes (Epo vs. C, NS; atRA vs. C P<0,01). Tampoco se observó modulación de la expresión

génica del marcador de diferenciación neuronal Map-2. Mediante MEB, se puede advertir en detalle que a nivel morfológico la Epo no induce diferenciación neuronal.

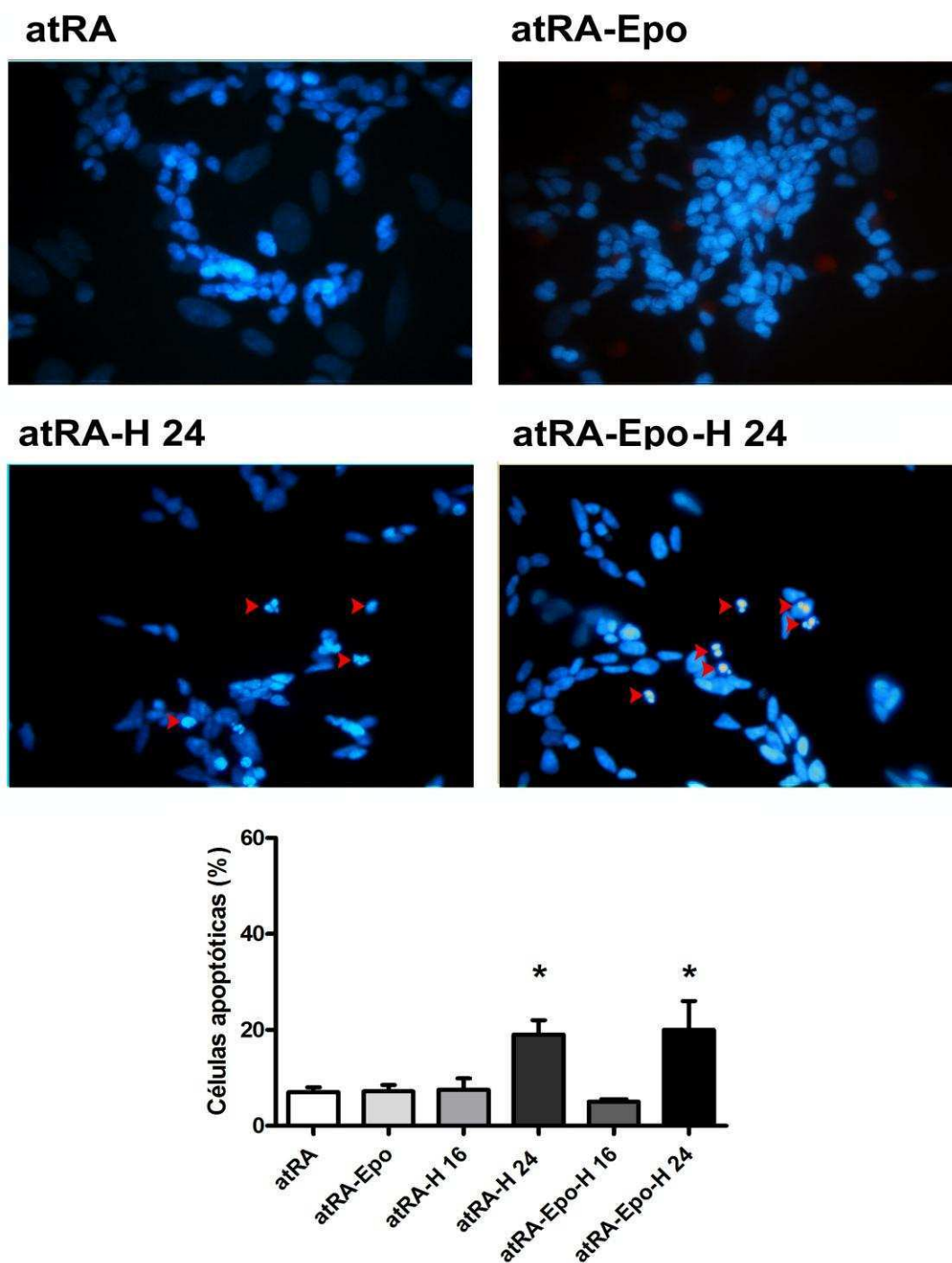
#### **IV-b. Acción de la eritropoyetina en cultivos diferenciados con ácido retinoico**

Como se puede observar en las Figuras IV.2 y IV.3, no se pudo detectar un efecto de Epo, tanto a nivel morfológico como a nivel citoprotector, en el modelo de células diferenciadas por atRA. Este resultado era esperable debido a la resistencia a la muerte celular inducida por hipoxia de los cultivos SH-SY5Y diferenciados con atRA (Figura III.6).



**Figura IV.2. La eritropoyetina no previene las alteraciones morfológicas causadas por hipoxia en células maduras**

Células SH-SY5Y diferenciadas con atRA (10  $\mu$ M, 4 d) fueron pretratadas con Epo (25 U/ml) antes de la exposición a hipoxia por distintos períodos (16 ó 24 h). En las fotografías representativas de 3 ensayos independientes, obtenidas por microscopía óptica, no se observa una prevención de los cambios morfológicos inducidos por la exposición a hipoxia.



**Figura IV.3. Eritropoyetina no protege del daño por hipoxia a las células diferenciadas con ácido retinoico**

Cultivos diferenciados de células SH-SY5Y fueron pretratados con Epo (25 U/ml) y luego expuestos a hipoxia ambiental. No se observaron alteraciones en la muerte celular entre los distintos tratamientos realizados por 16 h. El porcentaje de células apoptóticas aumentó después de 24 h de hipoxia (atRA-H 24 vs. atRA, \* $P < 0,05$ ) y la Epo no impidió este aumento (atRA-Epo-H 24 vs. atRA-H 24, NS). Las barras representan Media $\pm$ SEM de 4 ensayos independientes.

## ***V- Estudio de la susceptibilidad celular de cultivos de células SH-SY5Y en distintos estadios de madurez***

### **V-a. Diferenciación y supervivencia celular**

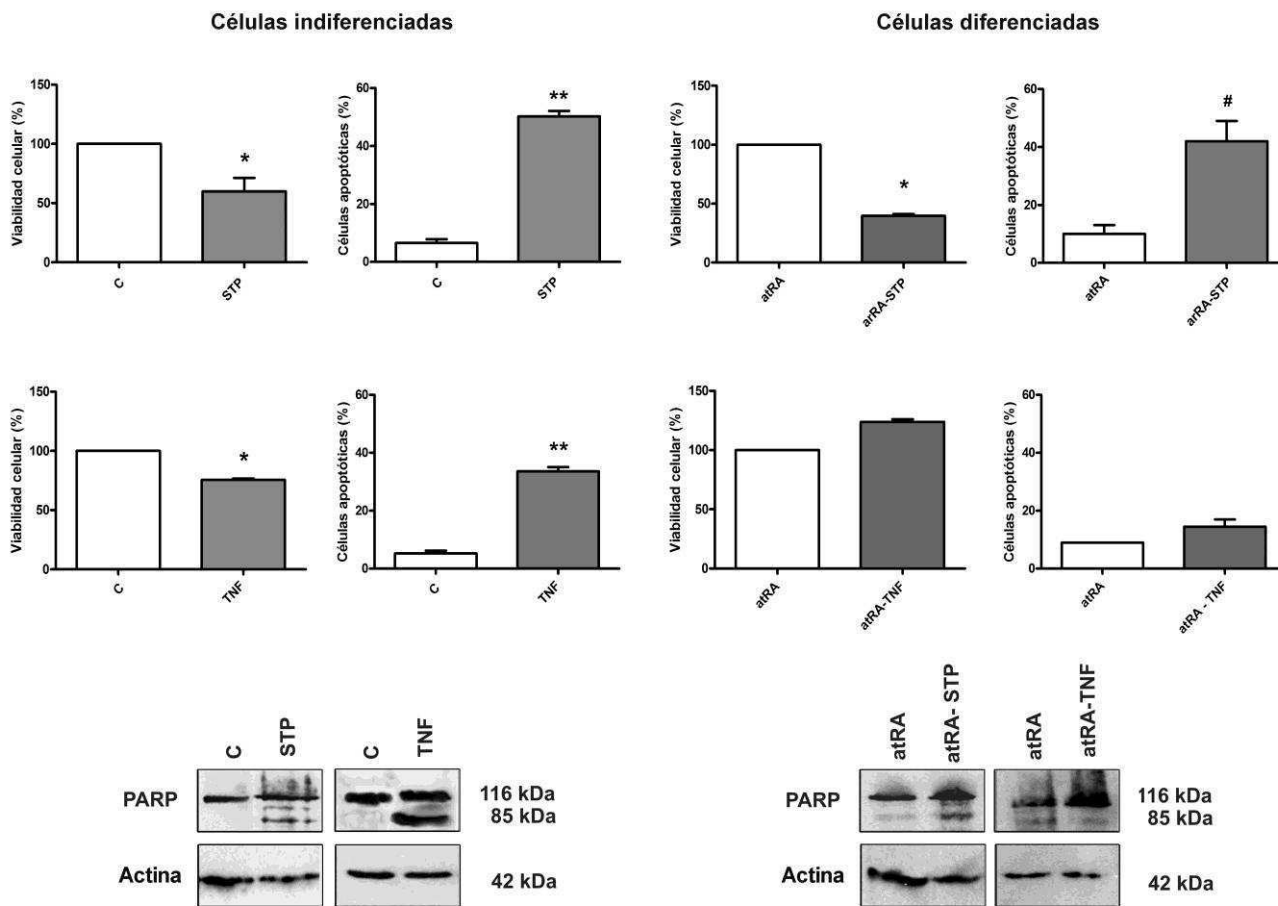
Trabajos previos han demostrado que la diferenciación celular puede alterar la supervivencia y la división celular, entre otros procesos bioquímicos (López-Carballo, 2002, Wu *et al*, 2003; Ross *et al*, 2003). Debido a las respuestas observadas en cultivos de las células SH-SY5Y frente a la exposición a hipoxia, se procedió al análisis de la respuesta celular de cultivos inmaduros y maduros expuestos a los agentes proapoptóticos STP y TNF. Inicialmente, se establecieron las condiciones de concentración y tiempo en las cuales estos agentes inducen muerte celular programada.

Luego de la exposición de cultivos de células SH-SY5Y a los tratamientos proapoptóticos, se evaluó la viabilidad celular (MTT) y la muerte por apoptosis (tinción de Hoechst y clivaje de la proteína PARP), comparándose los resultados entre los cultivos previamente tratados y los no tratados con atRA.

Como se puede observar en la Figura V.1, los cultivos indiferenciados sufrieron una disminución significativa de la viabilidad celular cuando fueron expuestos a TNF- $\alpha$  o a STP, efecto acompañado por un incremento en el porcentaje de núcleos apoptóticos y del clivaje de la proteína PARP.

Por otra parte, los cultivos diferenciados por atRA fueron resistentes a la exposición a TNF- $\alpha$ .

Se ha reportado que cultivos SH-SY5Y indiferenciados son susceptibles a concentraciones de 25 nM de STP (Pregi *et al*, 2006). Por otro lado, cultivos diferenciados con atRA presentan mayor supervivencia para dicha concentración de STP. Se observó muerte celular ante la exposición de cultivos diferenciados con dosis altas de STP (100 nM, 12 h).



**Figura V.1. Comportamiento diferencial de cultivos indiferenciados y diferenciados ante agentes proapoptóticos**

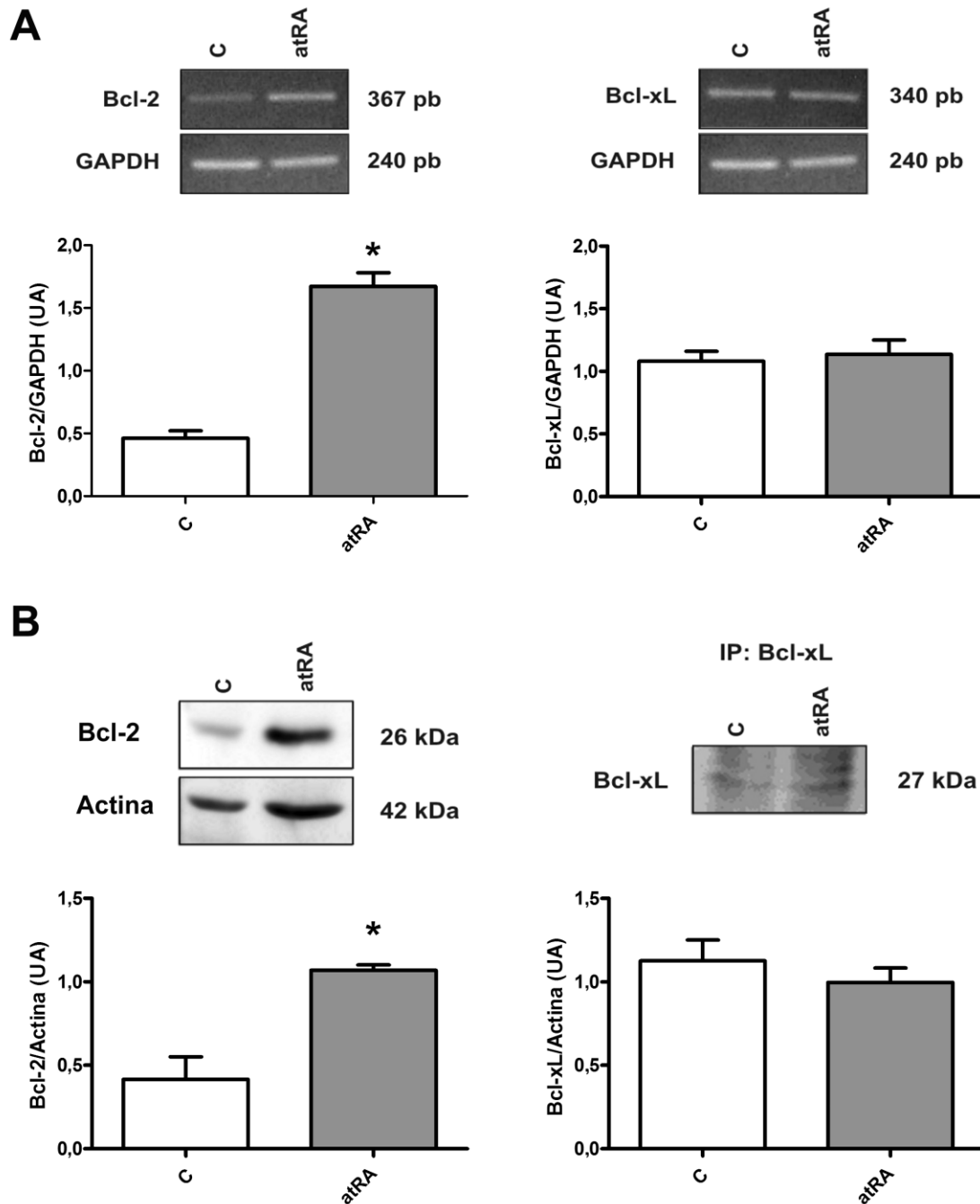
Cultivos indiferenciados o diferenciados con atRA (10  $\mu$ M, 4 d) fueron tratados con TNF- $\alpha$  (25 ng/ml) o con STP (100 nM) por 12 h. Se analizó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. La viabilidad se expresó como porcentaje respecto del control. Se determinó el número de núcleos apoptóticos (tinción de Hoechst y microscopía de fluorescencia de muestras codificadas) y se analizó el clivaje de la proteína PARP (*Western blotting*).

La exposición a STP o TNF- $\alpha$  redujo significativamente la viabilidad (\* $P < 0,05$  vs. C) e incrementó la muerte celular por apoptosis (\*\* $P < 0,005$  vs. C,  $n = 6$ ) en cultivos de células indiferenciadas. Por otro lado, en los cultivos diferenciados con atRA, sólo el tratamiento con STP indujo apoptosis ( $\#P < 0,01$ , atRA-STP vs. atRA), con disminución de la viabilidad celular (\* $P < 0,05$  vs. atRA). Las barras representan Media  $\pm$  SEM de 5 ensayos independientes. Los resultados observados por microscopía de fluorescencia fueron corroborados por la detección del clivaje de PARP. La presencia de la banda de 85 kDa indica la degradación de dicha proteína. Como control de carga se detectó la proteína actina, de 42 kDa.

### V-b. Diferenciación y supervivencia celular. Factores involucrados

Dada las diferencias observadas en la supervivencia celular entre cultivos de células neuronales inmaduras y maduras, interés analizar la expresión de los factores antiapoptóticos Bcl-2 y Bcl-xL en ambas condiciones.

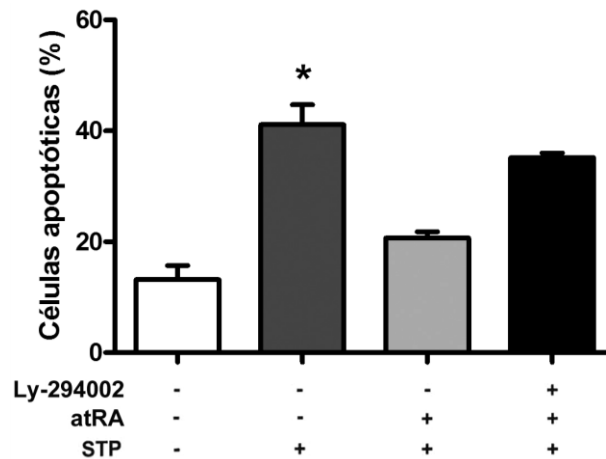
En la Figura V.2 se puede observar que la exposición a atRA indujo el aumento de los niveles de ARNm y de proteína del factor Bcl-2 sin alterar los niveles de Bcl-xL.



**Figura V.2. El ácido retinoico modula positivamente la expresión del factor antiapoptótico Bcl-2**

Mediante RT-PCR semicuantitativa (A) y *Western blotting* (B) se analizaron los niveles de ARNm y proteína, respectivamente, de los factores Bcl-2 y Bcl-xL en cultivos de SH-SY5Y diferenciados con atRA. Como se puede observar, atRA incrementó significativamente los niveles de ARNm y proteína de Bcl-2 (\* $P < 0,05$ ;  $n = 3$ ). Las barras representan Media  $\pm$  SEM de 4 ensayos independientes.

Como hemos mostrado en secciones anteriores, atRA induce la diferenciación neuronal de las células SH-SY5Y a la vez que aumenta la resistencia celular a la apoptosis. Este último proceso es mediado por un mecanismo que involucra la participación de las vías de señalización relacionadas con PI3K, ya que ese efecto protector de atRA disminuye por la presencia de Ly294002, inhibidor de PI3K (Figura V.3).



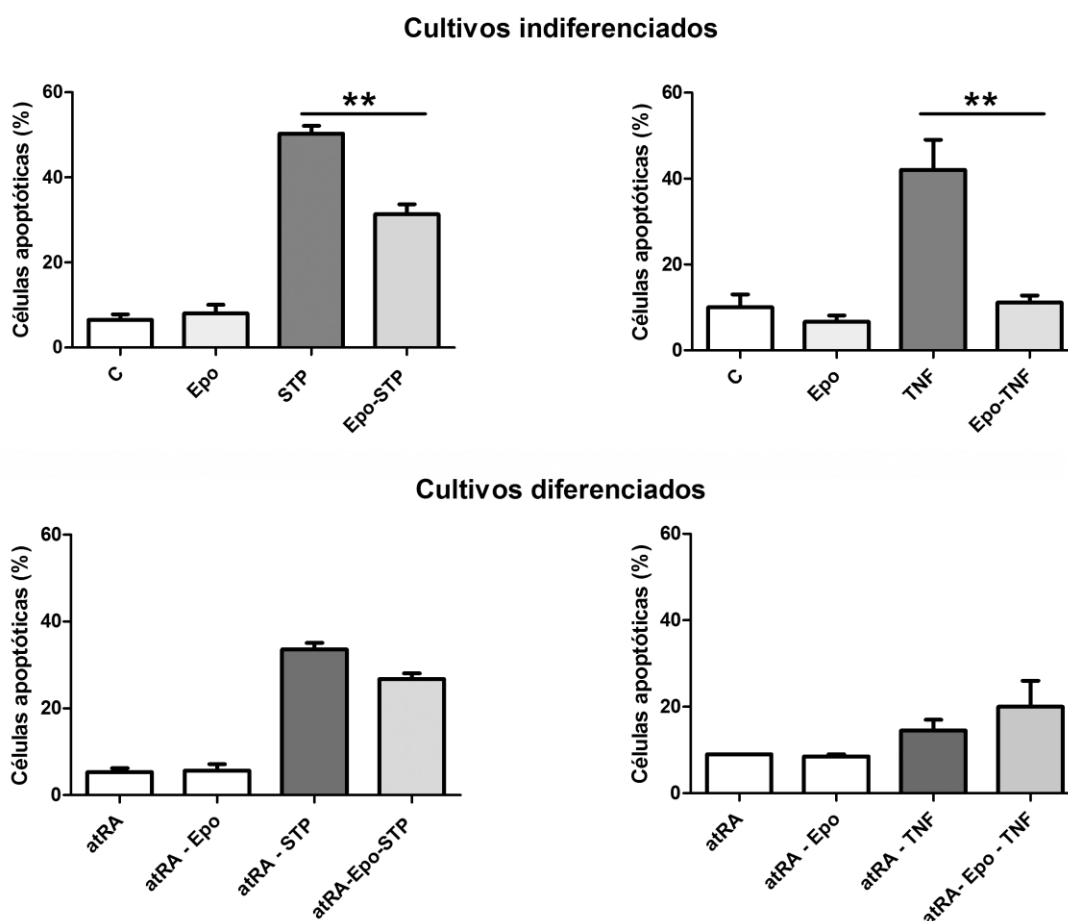
**Figura V.3. La vía PI3K se encuentra involucrada en la supervivencia celular de células diferenciadas por ácido retinoico**

Cultivos de células SH-SY5Y fueron pretratados con el inhibidor Ly-294002 (25  $\mu$ M, 2 h) y luego expuestos a atRA durante 24 h. A continuación, los cultivos fueron inducidos a apoptosis con 100 nM de STP por 12 h. Al finalizar la incubación, se determinó el nivel de muerte celular mediante tinción de Hoechst. La acción antiapoptótica de atRA se vio afectada por la inhibición de PI3-K.

## VI. Mecanismos de acción de eritropoyetina sobre células neuronales indiferenciadas y diferenciadas

### VI-a. Efecto de eritropoyetina en cultivos indiferenciados y diferenciados expuestos a agentes citotóxicos

Como ya hemos expuesto, resultados anteriores mostraron que la Epo protege a cultivos de células SH-SY5Y indiferenciadas ante un efecto proapoptótico. Por ello se decidió realizar un análisis comparativo de los efectos de la Epo (25 U/ml, 12 h de pretratamiento) en cultivos maduros e inmaduros frente a la exposición a STP y a TNF- $\alpha$ .



#### VI.1. Efecto de la eritropoyetina en cultivos de células SH-SY5Y diferenciadas con ácido retinoico ante la exposición a agentes proapoptóticos

Cultivos indiferenciados o diferenciados con atRA (10  $\mu$ M, 4 d) fueron pretratados con Epo (25 U/ml, 12 h) y luego expuestos a injuria (STP o TNF- $\alpha$ ). Ante la exposición a estos agentes, Epo sólo ejerce un efecto antiapoptótico en cultivos inmaduros (\*\* P<0,01; n=6). Las barras representan Media+SEM.

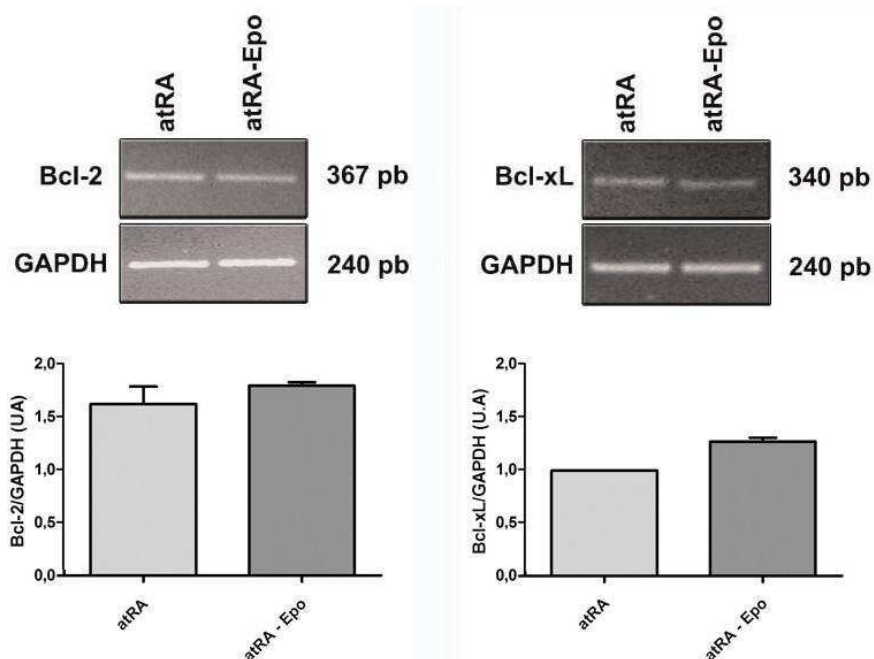


Los resultados obtenidos reflejan que la Epo, en las condiciones empleadas en estos ensayos, sólo presenta una acción citoprotectora en cultivos inmaduros frente a la inducción de apoptosis por STP o TNF- $\alpha$  (Figura VI.1).

Estos resultados coinciden en parte con los mostrados en la Figuras V.1, en cuanto a que las células diferenciadas con atRA mostraron ser resistentes a la acción del factor proapoptótico TNF- $\alpha$ . Sin embargo, la Epo fue incapaz de prevenir la muerte de células neuronales frente a la exposición de células maduras a ambos factores proapoptóticos ensayados, lo que sugiere que dicha hormona no estaría ejerciendo un efecto neuroprotector sobre las células diferenciadas por atRA.

### VI-b. Análisis de modulación de los genes Bcl-2 y Bcl-xL por eritropoyetina en cultivos neuronales maduros

Dada la respuesta diferencial observada entre los cultivos indiferenciados y diferenciados con atRA ante la estimulación con Epo, se analizó la regulación de Bcl-2 y Bcl-xL, genes blanco de Epo. Mediante RT-PCR semicuantitativa, se estudiaron los niveles de expresión de ambos factores en los estadios celulares indiferenciado y diferenciado.



### VI.2. Eritropoyetina y modulación de genes de la familia Bcl-2 en células SH-SY5Y diferenciadas con ácido retinoico

Cultivos diferenciados con atRA (10  $\mu$ M, 4 d) fueron tratados con Epo (25 U/ml, 12 h). Mediante RT-PCR semicuantitativa se analizaron los niveles de ARNm de los factores Bcl-2 y Bcl-xL. Como se

puede observar, Epo no induce la expresión génica de dichos agentes antiapoptóticos. Las barras representan Media $\pm$ SEM de 4 ensayos independientes.

Como se puede observar en la Figura VI.2, en cultivos previamente diferenciados con atRA no se observa una regulación positiva de dichos genes luego del tratamiento con Epo.

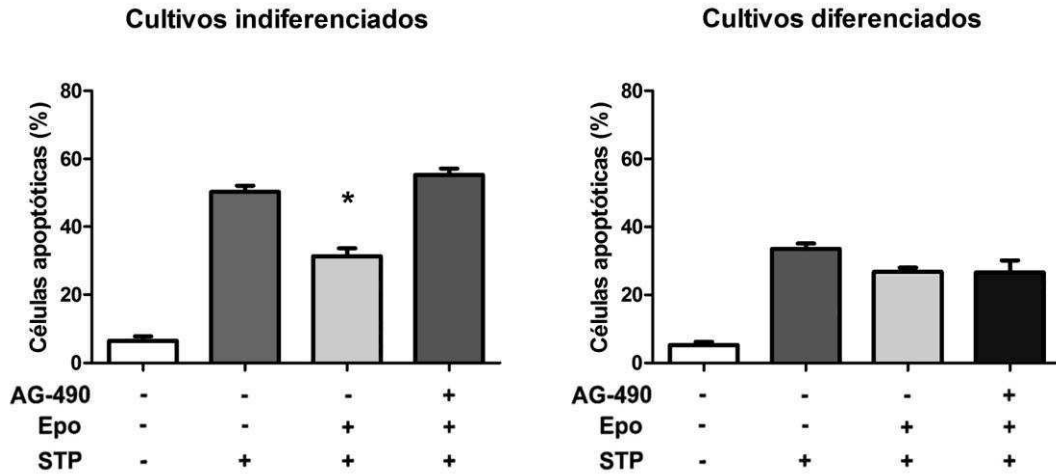
### **VI-c. Regulación de la vía del receptor de eritropoyetina en cultivos neuronales inmaduros y maduros**

Como se mencionó anteriormente, el receptor de eritropoyetina (REpo) pertenece a la superfamilia de receptores de citoquina de tipo I. Su activación causa la homodimerización, la subsiguiente autofosforilación y activación de JAK-2, una tirosina quinasa asociada al REpo. Dicha activación, lleva a la fosforilación de determinados *targets*, como PI3K, el factor de transcripción STAT-5 y NF-kB, entre otros (Um y Lodish, 2006).

A partir de los resultados obtenidos al momento y con el objeto de encontrar una posible explicación del comportamiento diferencial observado entre los cultivos inmaduros y maduros frente a la estimulación con Epo, se analizó la vía del receptor (REpo).

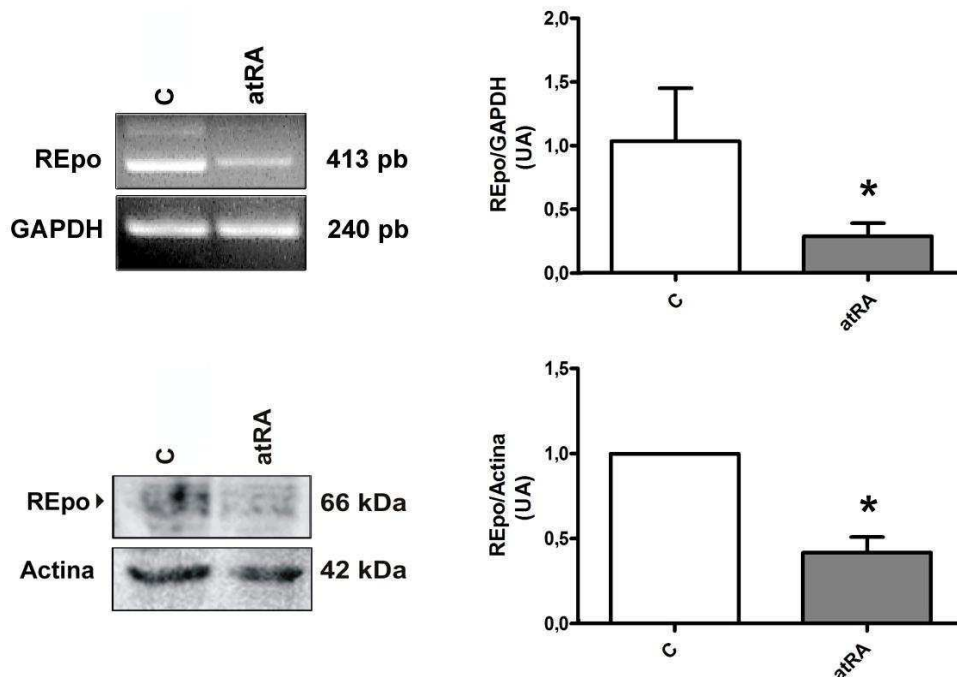
La proteína quinasa JAK-2, forma parte de la cascada de señalización de REpo. Empleando el inhibidor específico AG-490, se analizó el comportamiento de los cultivos en ambos estadios de diferenciación. A su vez, se evaluaron los niveles de ARNm y proteína del receptor de Epo, por qRT-PCR y *Western blotting*, respectivamente.

La figura VI.3 muestra que mientras la inhibición de JAK-2 bloquea la acción protectora de Epo en cultivos SH-SY5Y inmaduros, dicho fenómeno no se advierte en los cultivos diferenciados con atRA. Esto condice con la alteración en los niveles de expresión, tanto de ARNm como de proteína de REpo, ya que se observó una disminución significativa en los cultivos diferenciados (Figura IV.4).



**VI.3. Estudio de la vía JAK-2 en cultivos inmaduros y maduros de células SH-SY5Y**

Cultivos indiferenciados y diferenciados con atRA fueron pretratados con el inhibidor AG-490 (25  $\mu$ M, 2 h) y luego expuestos a 25 U/ml de Epo durante 12 h. A continuación, los cultivos fueron inducidos a apoptosis con 100 nM de STP por 12 h. Al finalizar la incubación, se determinó el nivel de muerte celular mediante tinción de Hoechst y microscopía de fluorescencia. La inhibición de JAK-2 bloqueó la acción citoprotectora de Epo en células indiferenciadas (\* $P < 0,05$  vs. STP; AG-Epo-STP vs. STP, NS). En cambio, no se observó alteración alguna en cultivos diferenciados con atRA ante dicha inhibición.



**Figura VI.4. La expresión del receptor de eritropoyetina se encuentra disminuida en cultivos de SH-SY5Y diferenciados con ácido retinoico**

Se analizaron los niveles de ARNm (RT-PCR y qRT-PCR) y de proteína (*Western blotting*) de REpo en cultivos inmaduros y maduros. Los niveles de ARNm se expresan en unidades arbitrarias y se encuentran normalizados con respecto a su control de carga GAPDH. Los niveles de proteína fueron estandarizados con respecto al control de actina. Como se puede observar, la expresión de REpo, a nivel de ARNm y de proteína, se ve disminuida en los cultivos pretratados con atRA

(\*P<0.05, n=3). Las barras indican Media±SEM del análisis de densidad de bandas, el cual es expresado en unidades arbitrarias (UA).

## ***Discusión***

### ***I-VI. Eritropoyetina y neuroprotección***

De acuerdo con los resultados alcanzados, se puede sugerir lo siguiente:

- 1- La Epo presenta una acción antiapoptótica en cultivos SH-SY5Y en estadio indiferenciado ante la exposición a hipoxia, STP y TNF- $\alpha$  (Figuras II.1 - II.5).
- 2- La acción neuroprotectora de Epo es acompañada por una regulación positiva de los factores antiapoptóticos Bcl-2 y Bcl-xL (Figura II.6).
- 3- Los cultivos de células SH-SY5Y diferenciados con atRA son menos susceptibles a la muerte celular. Esto se debería, en parte, a un incremento de los niveles de Bcl-2 (Figuras III.4 y III.5).
- 4- La Epo no presenta una acción sobre la diferenciación neuronal en cultivos de células SH-SY5Y (Figuras IV.1).
- 5- Los cultivos diferenciados sufren una regulación negativa del receptor de Epo, lo cual explicaría insensibilidad al estímulo con dicha hormona (Figuras IV.2, IV.3, VI.1 – VI.4).

Las células neuronales son susceptibles a la falta de oxígeno y glucosa. Por diversas causas, como accidente cerebro-vascular, trauma o arterioesclerosis, el cerebro es expuesto a condiciones de hipoxia-isquemia lo cual lleva a la muerte neuronal (Mander *et al*, 2006).

La eritropoyetina recombinante humana ha sido empleada, desde su obtención, al tratamiento de pacientes que sufren anemia crónica. La existencia de receptores específicos en tejidos no hematopoyéticos expandió el conocimiento de su acción biológica y farmacológica, siendo su efecto antiapoptótico uno de los aspectos principales

de la investigación de la Epo como potencial agente terapéutico. El hallazgo de que ambos, la producción de Epo y la expresión de su receptor específico REpo, fueron detectadas en distintas zonas del cerebro embrionario y fetal (Sola *et al*, 2005) sustenta la hipótesis que le confiere a la Epo una función primordial en el sistema nervioso central. Esto concuerda con los resultados de Genc y colaboradores (2004), los cuales postularon que la expresión del receptor de Epo es necesaria para la supervivencia celular y el desarrollo del cerebro.

Trabajos previos de nuestro laboratorio sugirieron algunas de las hipótesis investigadas en el presente trabajo. Por un lado, se observó un efecto protector de la Epo sobre células SH-SY5Y indiferenciadas afectadas por STP, un inductor de diferenciación neuronal capaz, a la vez, de inducir apoptosis (Pregi *et al*, 2006). Por otra parte, células con características eritroides (líneas K562 y UT-7) presentaron distinta sensibilidad a la inducción de apoptosis según el estadio de diferenciación y de su dependencia de Epo (Vittori *et al*, 2010).

Con el fin de investigar el efecto antiapoptótico de Epo en células de origen neuronal en estados diferenciado e indiferenciado, en el presente trabajo se comparó la acción protectora de Epo en dichos estadios, empleando la línea celular SH-SY5Y. Dicha línea puede diferenciarse a un estadio neuronal maduro mediante el tratamiento con atRA (Prince y Orelan, 1997; Lopez-Carballo *et al*, 2002; Yuste *et al*, 2002).

Distintas experiencias han mostrado el efecto neuroprotector de la Epo. En modelos de hipoxia se ha demostrado que el tratamiento previo con Epo produce un efecto neuroprotector (Sirén *et al*, 2009). En estos modelos se propone que la producción de Epo por parte de los astrocitos generaría el efecto de tolerancia de las neuronas a la hipoxia o a otros agentes citotóxicos. Se ha sugerido que la neuroprotección generada por Epo en estos sistemas se debe a la inducción de la expresión de la proteína Bcl-xL (Kapur *et al*, 2001).

Los resultados obtenidos sugieren que la Epo protege cultivos indiferenciados ante el daño por hipoxia, previniendo tanto alteraciones morfológicas como la inducción de muerte celular programada (Figuras II.3 – II.5).

Esto puede ser explicado por un aumento en los niveles de ARNm y proteína de los factores antiapoptóticos Bcl-2 y Bcl-xL (Figura II.6). Estos resultados coinciden con

observaciones previas en donde la expresión de dichos agentes fue paralela a la prevención de la muerte celular por hipoxia (Araya *et al*, 1998).

Estudios comparativos entre ambos estadios muestran que los cultivos diferenciados son menos susceptibles que los indiferenciados a los agentes proapoptóticos empleados, siendo necesario el tratamiento con elevada concentración de STP (100 nM) para causar un incremento significativo de la muerte celular en cultivos maduros (Figura V.1). Estos resultados concuerdan con observaciones anteriores, que sugieren que, además de inducir diferenciación neuronal, el ácido retinoico muestra una acción anti o proapoptótica de acuerdo al tipo celular expuesto a este factor (Xie *et al*, 2010).

En relación a la acción de la Epo frente a la apoptosis de células neuronales, se observó que mientras dicha citoquina presenta una capacidad citoprotectora en cultivos inmaduros, esta acción antiapoptótica no fue demostrada en cultivos maduros (Figuras IV.2 y IV.3). Los resultados sugirieron que la diferenciación con atRA podría interferir con la acción de la Epo. Esto se apoya en la incapacidad de la Epo para regular positivamente la expresión de Bcl-xL y Bcl-2, genes *target* en la acción protectora de Epo sobre células neuronales indiferenciadas y sobre otros tipos celulares.

En la activación celular mediada por Epo está involucrada la vía JAK-2. Empleando el inhibidor específico de esta vía AG-490 no se encontraron diferencias entre los cultivos de células maduras tratados y no tratados con Epo antes de la exposición a hipoxia, sugiriendo que dicha hormona no activaría la vía JAK-2 en células diferenciadas (Figura IV.3). Estos resultados concuerdan con los de Choi *et al* (2005), quienes reportaron que atRA suprime la activación de las vías JAK/STAT en cultivos de astrocitos.

Dado que para que la Epo pueda ejercer su acción es necesaria la expresión de su receptor en el tejido blanco, se quiso determinar si la diferenciación con atRA podría afectar el nivel de receptor. Para ello se analizó la expresión de REpo a nivel de ARNm y de proteína en cultivos indiferenciados y diferenciados por atRA. Los resultados mostraron una regulación negativa del REpo en cultivos diferenciados con atRA (Figura IV.4). Este hallazgo explicaría la falta de acción de Epo en estos cultivos. En concordancia, se había demostrado la regulación negativa de la expresión del REpo durante la diferenciación de progenitores eritroides por atRA, estando involucrada en esta respuesta la modulación de los factores de transcripción GATA-1 y GATA-2 (Labbaye *et al*, 1995).

Con respecto a la expresión del REpo durante el desarrollo del sistema nervioso, diversos trabajos han demostrado que, durante este proceso, existe una regulación de la misma tanto en células endoteliales como en neuronas. Se ha observado que la expresión del REpo disminuye durante la diferenciación de progenitores neuronales (Wallach *et al*, 2009; Mazur *et al*, 2010). Por su parte, Wallace *et al* (2009), observaron una regulación negativa del ARNm del REpo durante el desarrollo del sistema nervioso de ratones. En dicho trabajo destacan, en neuronas, una regulación mediada por metilación de CpGs de zonas regulatorias del gen del REpo. Mientras que una elevada expresión de la Epo y su receptor fuera detectada durante el desarrollo fetal, se encontró una disminución en la expresión en estadios postnatales (Giddy *et al*, 2010). De esta manera, existiría una regulación de la expresión de REpo en función del desarrollo, observándose en células maduras una disminución de dicho receptor y por consiguiente una menor respuesta a la citoquina.

En resumen, los presentes resultados concuerdan con las sugerencias previas de que tanto Epo como su receptor tienen un rol importante durante el desarrollo del sistema nervioso.



## ***VII. Activación de cultivos de células de microglía.***

Las causas de muerte neuronal ante una determinada injuria pueden deberse a la existencia de un daño directo, causado por el insulto en sí, o a un daño indirecto ocasionado por la inducción de un foco proinflamatorio.

En secciones anteriores hemos demostrado que la Epo previene la apoptosis de células de neuroblastoma SH-SY5Y, no sólo cuando es inducida por la exposición a un ambiente con bajo contenido de oxígeno sino también aquélla debida a la acción de factores proapoptóticos. Se ha reportado que la exposición a hipoxia, además de causar muerte neuronal, es capaz de inducir un aumento de citoquinas proinflamatorias, como IL-1 y TNF- $\alpha$  (Ghezzi *et al*, 1991). La microglía tiene un rol importante en la inflamación. Aunque la Epo ha sido involucrada en procesos de neuroinflamación (Brines *et al*, 2000; Chong *et al*, 2003; Wilms *et al*, 2009) su rol sobre la microglía aún debe ser clarificado. Por ello, a continuación, decidimos investigar si la Epo ejerce alguna acción sobre la activación de la microglía.

### **VII-a. Caracterización de la activación de la microglía**

Células de la línea EOC-2 de microglía murina fueron activadas por hipoxia química inducida por CoCl<sub>2</sub>. Dicho compuesto se ha empleado en diferentes modelos *in vitro*, dado que por su acción sobre el factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ , mimetiza las condiciones de hipoxia (An *et al* 1998; Stolze *et al*, 2002; Wanga *et al*, 2008; Che *et al*, 2009; Hur *et al*, 2010).

La microglía, en su estado activo, adquiere la capacidad de sintetizar una variedad de mediadores como factores de crecimiento, quemoquinas y citoquinas anti y proinflamatorias, además de nitritos y especies reactivas del oxígeno. A su vez, su actividad metabólica se ve alterada, así como también su capacidad proliferativa (Mander *et al*, 2006).

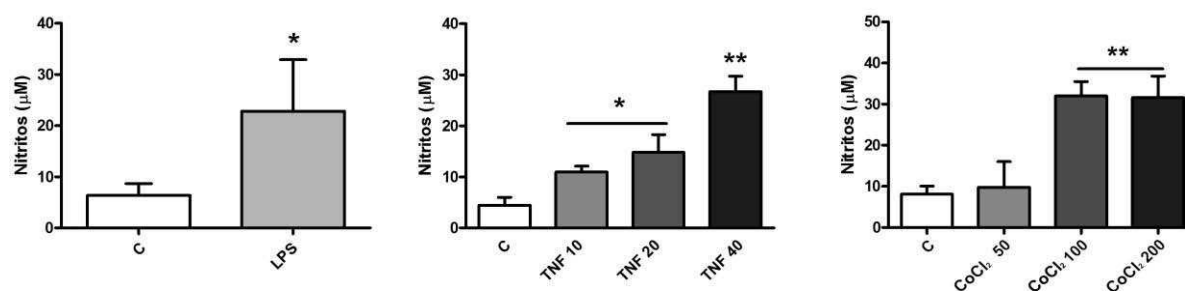
Con el fin de caracterizar la activación de la microglía se analizó la activación metabólica, la proliferación celular y la producción de mediadores proinflamatorios, tales como óxido nítrico (NO), TNF- $\alpha$  y especies reactivas del oxígeno (ROS).

Otros inductores de activación de microglía, como LPS o TNF- $\alpha$ , fueron incluidos en los ensayos con fines comparativos.

### Mediadores proinflamatorios: determinación de nitritos

Durante su activación, la microglía adquiere la capacidad de sintetizar y liberar NO, citoquinas y ROS, los cuales pueden afectar la supervivencia celular.

La producción de NO fue determinada por la cuantificación de nitrito acumulado en el medio de cultivo, el metabolito estable del NO. Mediante el método de Griess (Calafat *et al*, 2009) se determinaron los niveles de nitritos liberados al medio luego de la exposición de los cultivos de células EOC-2 a diversos agentes proinflamatorios. Se observó que tanto los agentes LPS y TNF- $\alpha$  como la hipoxia química por CoCl<sub>2</sub> presentan la capacidad de inducir el aumento de la producción de nitritos por la microglía (Figura VII.1).



**Figura VII.1. Activación de la microglía por factores proinflamatorios. Producción de NO** Cultivos de células de microglía fueron estimulados con LPS o distintas concentraciones de TNF- $\alpha$  (10, 20 y 40 ng/ml) y CoCl<sub>2</sub> (50, 100 y 200  $\mu$ M). Se observó un incremento significativo de la producción de nitritos (\*P<0,05 y \*\*P<0,01 vs. Control). Las barras representan Media $\pm$ SEM de 6 ensayos independientes.

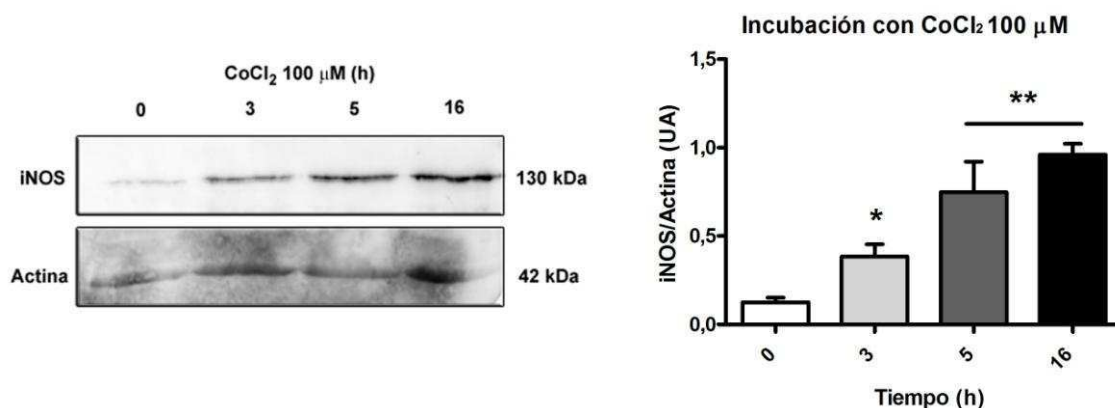
### VII-b. Análisis de iNOS en condiciones de hipoxia

El NO se origina a partir de la oxidación de L-arginina por la enzima óxido nítrico sintetasa (*nitric oxide synthases*, NOS). Existen tres isoformas de NOS, la nNOS, expresada en células neuronales, la eNOS, que se encuentra en células endoteliales y la iNOS que es inducida en algunas células, como macrófagos, astrocitos o microglía. Mientras que las isoenzimas constitutivas generan pequeñas cantidades de NO, la isoforma iNOS produce cantidades mucho mayores que caracterizan algunos estados patológicos en los que se induce la expresión de esta enzima.

En algunos de los signos inducidos por NO, como el descenso de la presión arterial, este factor puede presentar acción vasodilatadora. Asimismo, la elevada concentración de NO, al interactuar con ROS pasa a convertirse en peroxinitrito, una especie reactiva del nitrógeno que presenta una elevada citotoxicidad para la célula.

Ha sido reportado que la activación de la microglía media la muerte neuronal, en parte por la inducción de iNOS y la subsecuente liberación de NO al medio (Lipton, 2009; Shavali *et al*, 2006). Es por ello que, en este marco, el análisis de la regulación de iNOS es importante.

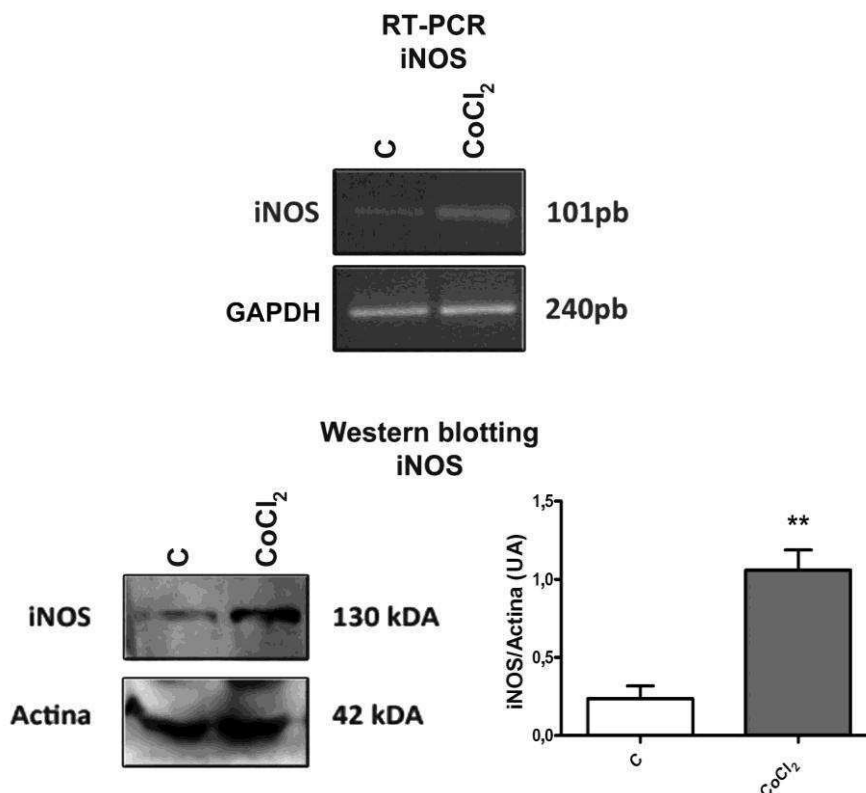
Con el fin de estudiar si la hipoxia es capaz de modular la expresión de iNOS, se determinó el nivel de expresión de esta proteína mediante *Western blotting*. De acuerdo con la cinética de activación diseñada, se observó un incremento en los niveles de iNOS a partir de las 3 h de exposición a CoCl<sub>2</sub> (Figura VII.2).



**Figura VII.2. Cinética de la modulación de iNOS por hipoxia química**

Cultivos de células EOC-2 fueron expuestos a hipoxia química durante diferentes periodos indicados en la figura. Se analizó la expresión de iNOS a nivel de proteína por *Western blotting*, observándose un incremento a partir de las 3 h de exposición a CoCl<sub>2</sub> (100μM). Las barras representan Media±SEM del análisis de densidad de banda de la proteína iNOS, expresada en unidades arbitrarias (UA) referida a la actina (n = 3 ensayos independientes).

La regulación de iNOS también fue analizada a nivel de ARNm. Después de 24 h de exposición a hipoxia química se observó regulación positiva de ARNm en concordancia con el análisis de proteína realizado por *Western blotting* (Figura VII.3).



**Figura VII.3. Modulación de iNOS por hipoxia química**

Cultivos de células EOC-2 fueron expuestos por 24 h a hipoxia química. Se analizaron los niveles de iNOS por RT-PCR (empleando GAPDH como estándar interno) y por *Western blotting* (usando actina como control de carga proteica). La exposición a CoCl<sub>2</sub> moduló positivamente la expresión de iNOS a nivel de ARNm y de proteína. Las barras representan Media±SEM del análisis de densidad de banda de la proteína iNOS, expresada en unidades arbitrarias (UA) referida a la actina (n = 3 ensayos independientes).

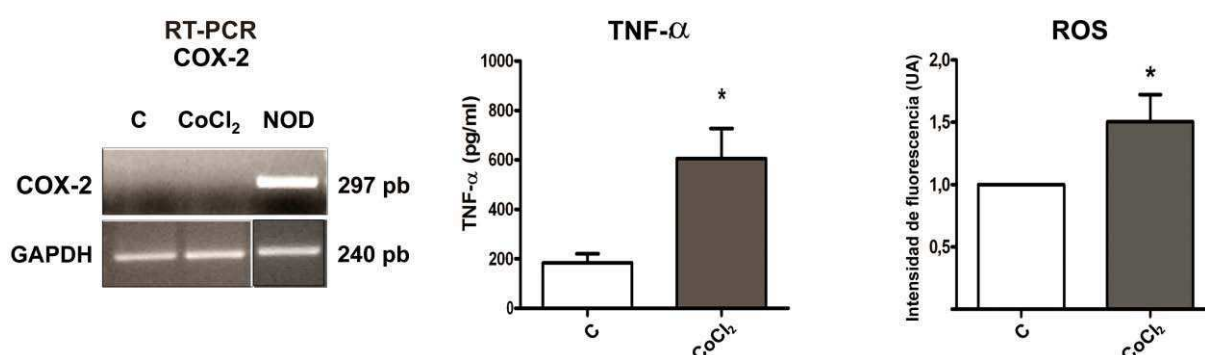
### VII-c. Regulación de distintos mediadores proinflamatorios por hipoxia

La citoquina TNF- $\alpha$  es sintetizada inicialmente como un precursor de 26 kDa, alcanzando, en su forma madura, 17 kDa debido a clivaje. Los macrófagos activados son la fuente principal de dicha citoquina, aunque otros tipos celulares, como células de tipo neuronal y endotelial, también sintetizan TNF- $\alpha$ .

En células de microglía, la exposición a LPS o IFN- $\gamma$ , entre otros agentes, induce la producción de TNF- $\alpha$ . Se ha sugerido que la liberación de este factor constituye uno de los sucesos tempranos que ocurren luego de una injuria. Por otra parte, el TNF- $\alpha$  presenta acción citotóxica en células neuronales (Pregi *et al*, 2009).

Otro agente proinflamatorio es la ciclooxygenasa 2 (COX-2), la cual se encuentra involucrada en la activación de la microglía durante el proceso proinflamatorio mediante la síntesis de prostaglandinas (Lorenz *et al*, 1999).

Con el fin de analizar otros mediadores proinflamatorios en la respuesta a hipoxia, se analizaron la expresión de COX-2 y la cuantificación de TNF- $\alpha$  después de 24 h de exposición a hipoxia. Los niveles de ROS generados fueron detectados por microscopía de fluorescencia después de 2 h de exposición de las células de microglía a hipoxia. Los resultados de la Figura VII.4 muestran la significativa producción de TNF- $\alpha$  mientras que no se observan diferencias en los niveles de expresión de ARNm de COX-2. Por otro lado, 2 h de exposición a CoCl<sub>2</sub> fueron suficientes para incrementar los niveles de ROS en cultivos EOC-2 (Figura VII.4).



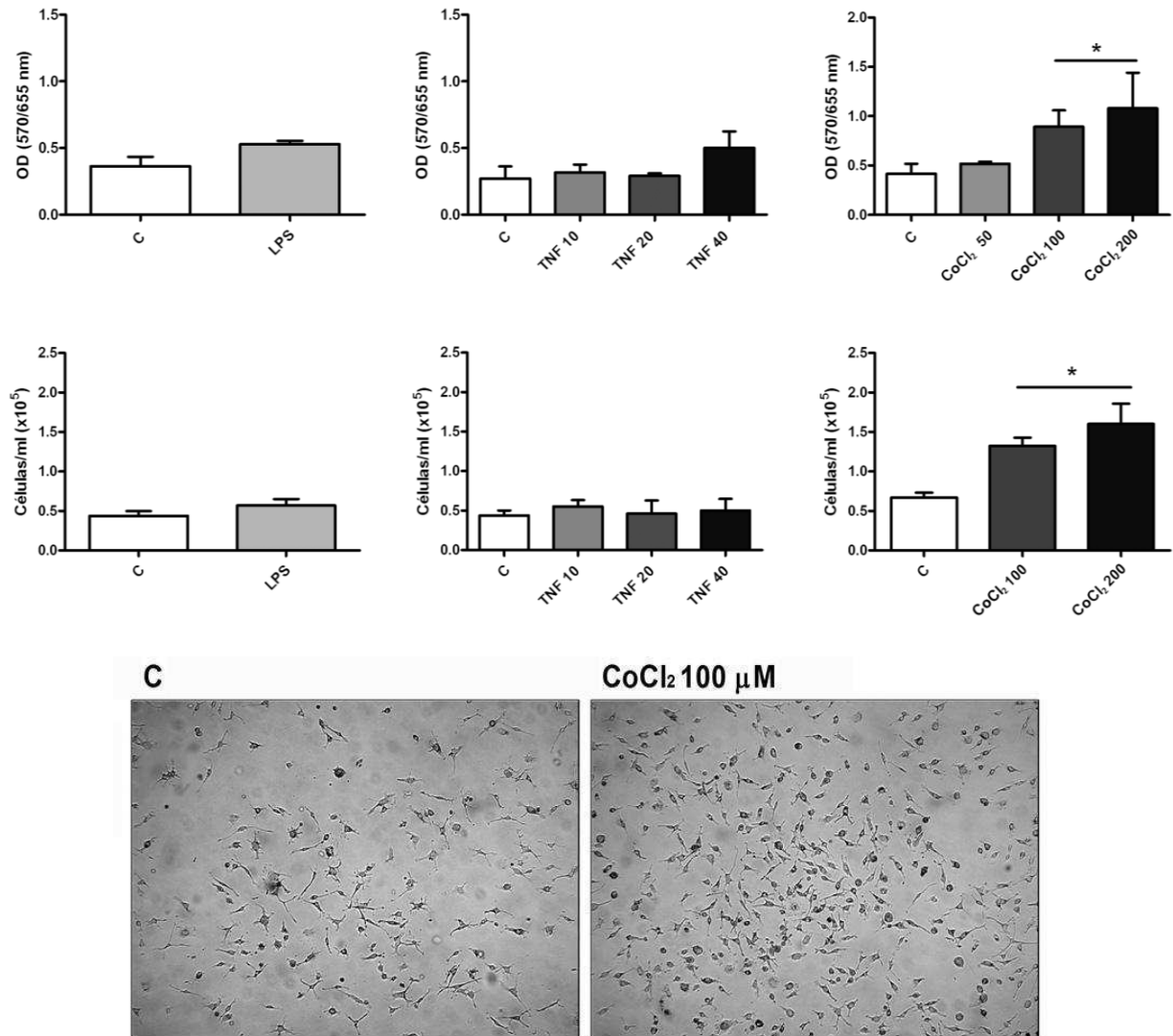
**Figura VII.4. Modulación de COX-2, TNF- $\alpha$  y ROS por hipoxia química**

Células de microglía EOC-2 fueron expuestas a hipoxia química durante 24 h para el análisis de los niveles de ARNm de COX-2 (RT-PCR), la liberación de TNF- $\alpha$  al medio (ELISA) y la producción de ROS (microscopía de fluorescencia, empleando la sonda DCF). Como control de la reacción de PCR para COX-2 se emplearon muestras de macrófagos de ratones de la cepa NOD, positivos para la expresión de esta proteína. No se observó expresión génica de COX-2 ni en la condición basal ni por exposición a hipoxia. En cambio, se observó un incremento significativo en los niveles de TNF y ROS (\*P<0,05, n=3). Las barras representan Media $\pm$ SEM de 3 ensayos independientes.

#### VII-d. Proliferación y activación celular

Otro parámetro que puede ser afectado por la activación de la microglía es el proceso de proliferación celular. Por ello, el siguiente paso fue investigar si la activación celular por exposición a LPS, TNF- $\alpha$  o CoCl<sub>2</sub> podía alterar la proliferación celular, empleándose para el análisis el recuento celular y el ensayo de MTT.

Los resultados obtenidos indican que, bajo las condiciones empleadas, sólo el tratamiento con CoCl<sub>2</sub> induce un incremento significativo de la proliferación celular de la microglía (Figura VII.5).



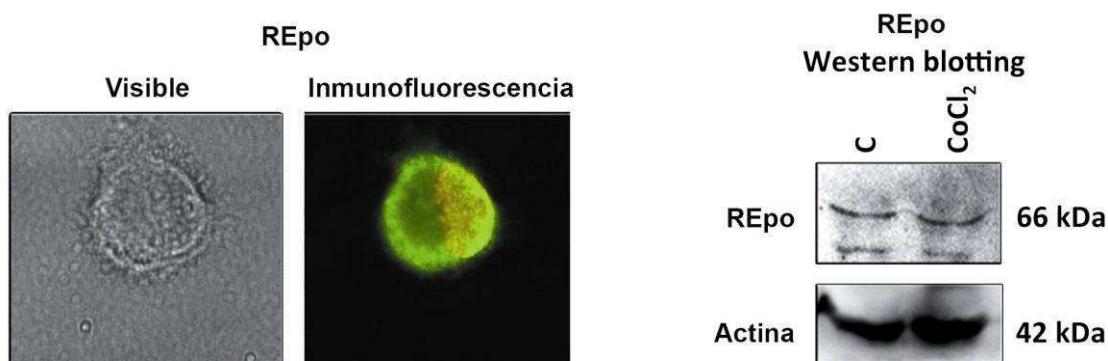
**Figura VII.5. Caracterización de la activación de cultivos de microglía. Proliferación celular.**

Células EOC-2 fueron estimuladas con LPS, TNF- $\alpha$  (10, 20 y 40 ng/ml) o CoCl<sub>2</sub> (50, 100 y 200  $\mu$ M) por 24 h. Mediante recuento celular y ensayo de MTT se analizó la proliferación celular. Se observó que ésta es afectada por la exposición a 100 y 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> (CoCl<sub>2</sub> 100  $\mu$ M y CoCl<sub>2</sub> 200  $\mu$ M vs. C \*P<0,05). Se muestra microfotografías representativas del efecto a la exposición a 100  $\mu$ M de CoCl<sub>2</sub> sobre la densidad celular. Las barras representan Media $\pm$ SEM de 7 ensayos independientes.

## VIII- Efecto de la eritropoyetina en la activación de la microglía

### VIII-a. Expresión del receptor de eritropoyetina en la línea murina de microglía EOC-2

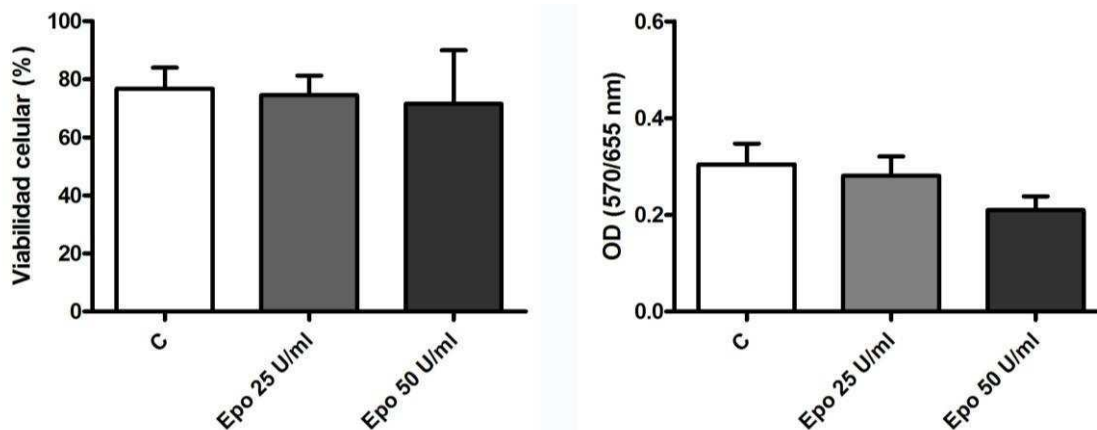
Antes de diseñar ensayos para determinar si la Epo tiene algún efecto sobre la línea celular de microglía, se investigó la expresión del receptor de eritropoyetina (REpo) en esta línea celular. Mediante técnicas de *Western blotting* e inmunofluorescencia indirecta se detectó la expresión de REpo en células EOC-2, tanto en su estadio basal como después de la activación por hipoxia química (Figura VIII.1).



**Figura VIII.1. Expresión del receptor de eritropoyetina en cultivos de microglía**

Mediante inmunofluorescencia y *Western blotting* se estudio la presencia de REpo en la línea EOC-2 de microglía. La fluorescencia verde corresponde a la señal del REpo, mientras que el núcleo se ve con fluorescencia roja. La detección de la proteína por WB no muestra modulación de los niveles del receptor por el tratamiento por  $\text{CoCl}_2$ .

Además, se evaluó un posible efecto directo de la Epo sobre la viabilidad celular realizando una curva dosis-respuesta. La Figura VIII.2 muestra que la presencia de Epo no induce cambios significativos de la proliferación celular.



**Figura VIII.2. Efecto de la eritropoyetina sobre la proliferación de cultivos de microglía**

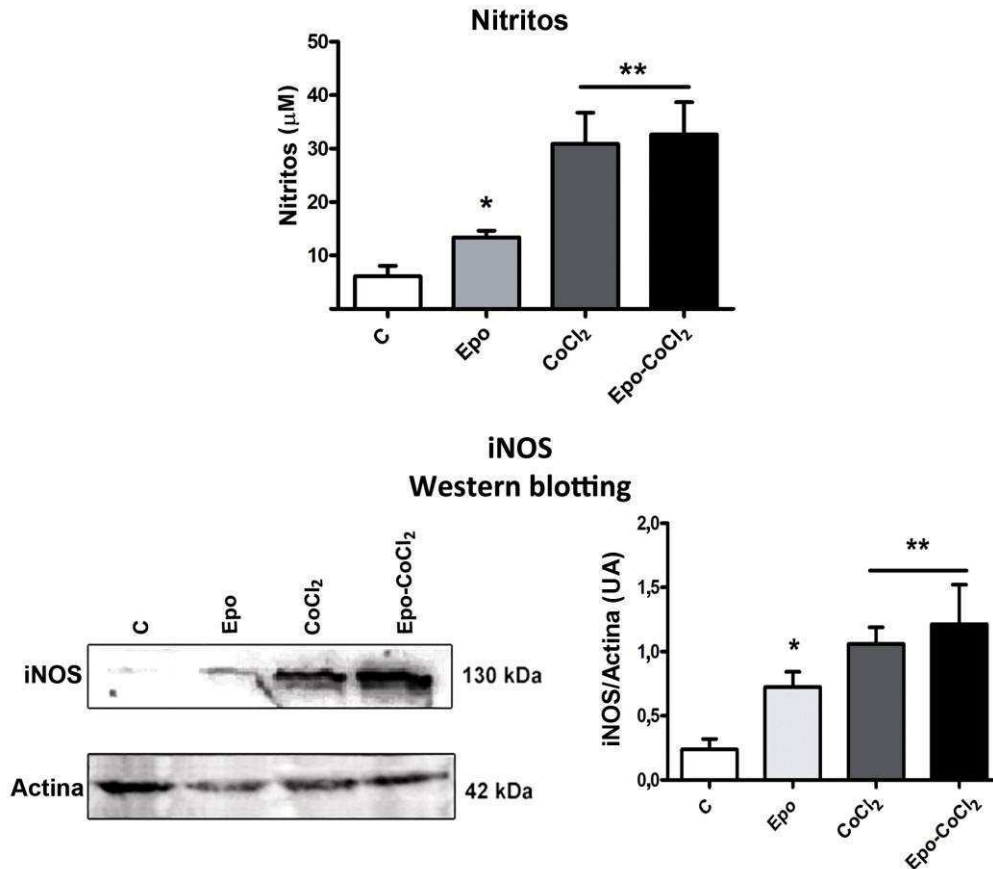
Cultivos de células EOC-2 fueron expuestos a diferentes dosis de Epo durante 24 h. Se analizó viabilidad celular/proliferación por microscopía óptica con azul Tripán y por el ensayo de MTT. Epo no alteró significativamente la viabilidad celular ni la proliferación, aunque se observó una tendencia descendente, no significativa, de la proliferación con el aumento de la dosis de Epo. Las barras representan Media $\pm$ SEM de 5 ensayos independientes.

### VIII-b. Efecto de la eritropoyetina sobre la activación de la microglía inducida por hipoxia

Debido a la presencia del REpo en la línea celular EOC-2, surgió la hipótesis de que la Epo pudiera ejercer un efecto directo sobre la activación de las células EOC-2. En primer término, se investigó si la Epo podía contrarrestar el incremento de factores proinflamatorios inducidos por la hipoxia en las células de microglía.

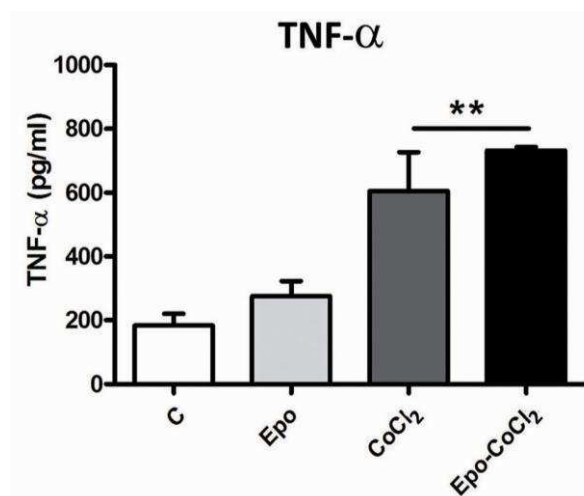
Como se puede observar en la figura VIII.3, el pretratamiento con Epo, en células expuestas a hipoxia, no logró disminuir la producción de nitritos, ni los niveles de la proteína iNOS. Por otro lado, tampoco se advirtió disminución de la producción de TNF- $\alpha$  (Figura VIII.4). Sin embargo, es importante notar un efecto proinflamatorio de la Epo sobre las células cultivadas en condiciones de normoxia, ya que la Epo *per se* indujo un leve pero significativo aumento de nitritos (Figura VIII.3).





**Figura VIII.3. Efecto de la eritropoyetina sobre la activación de la microglía. Modulación de iNOS y producción de nitritos**

Cultivos de células EOC-2 fueron pretratados con Epo (25 U/ml, 24 h), seguido de la exposición a CoCl<sub>2</sub> (100 µM, 24 h). El pretratamiento con Epo no alteró la expresión de iNOS, ni la producción de nitritos (\*\*P<0,01 con respecto a C; CoCl<sub>2</sub> vs. Epo-CoCl<sub>2</sub>, NS) inducidos por la activación celular. Debe notarse el aumento de la secreción de nitritos inducido sólo por la presencia de Epo (\*P<0,05 vs. C). Las barras representan Media±SEM de 5 ensayos independientes.

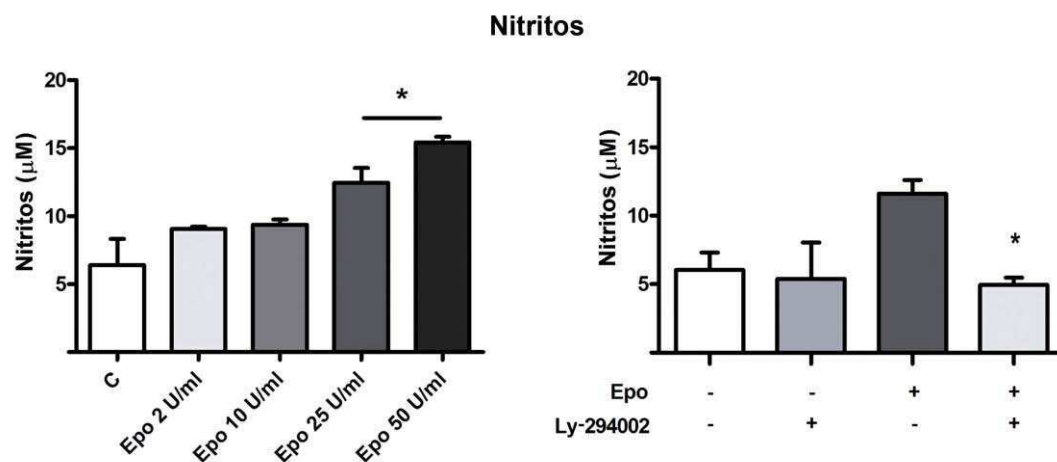


**Figura VIII.4. Efecto de la eritropoyetina sobre la modulación de la producción de TNF-α durante la activación de la microglía**

Cultivos de células EOC-2 fueron pretratados con Epo (25 U/ml, 24 h), seguido de la exposición con CoCl<sub>2</sub> (100 µM, 24 h). El pretratamiento con Epo no previno el incremento de TNF-α

(\*\*P<0,01 vs. C; CoCl<sub>2</sub> vs. Epo-CoCl<sub>2</sub>, NS). Las barras representan Media±SEM de 3 ensayos independientes.

La habilidad de Epo para inducir *per se* el aumento de nitritos, en una acción directa sobre la línea celular de microglía, nos indujo a analizar más profundamente este efecto.



**Figura VIII.5. La producción de nitritos por eritropoyetina es mediada por la vía de señalización de PI3K**

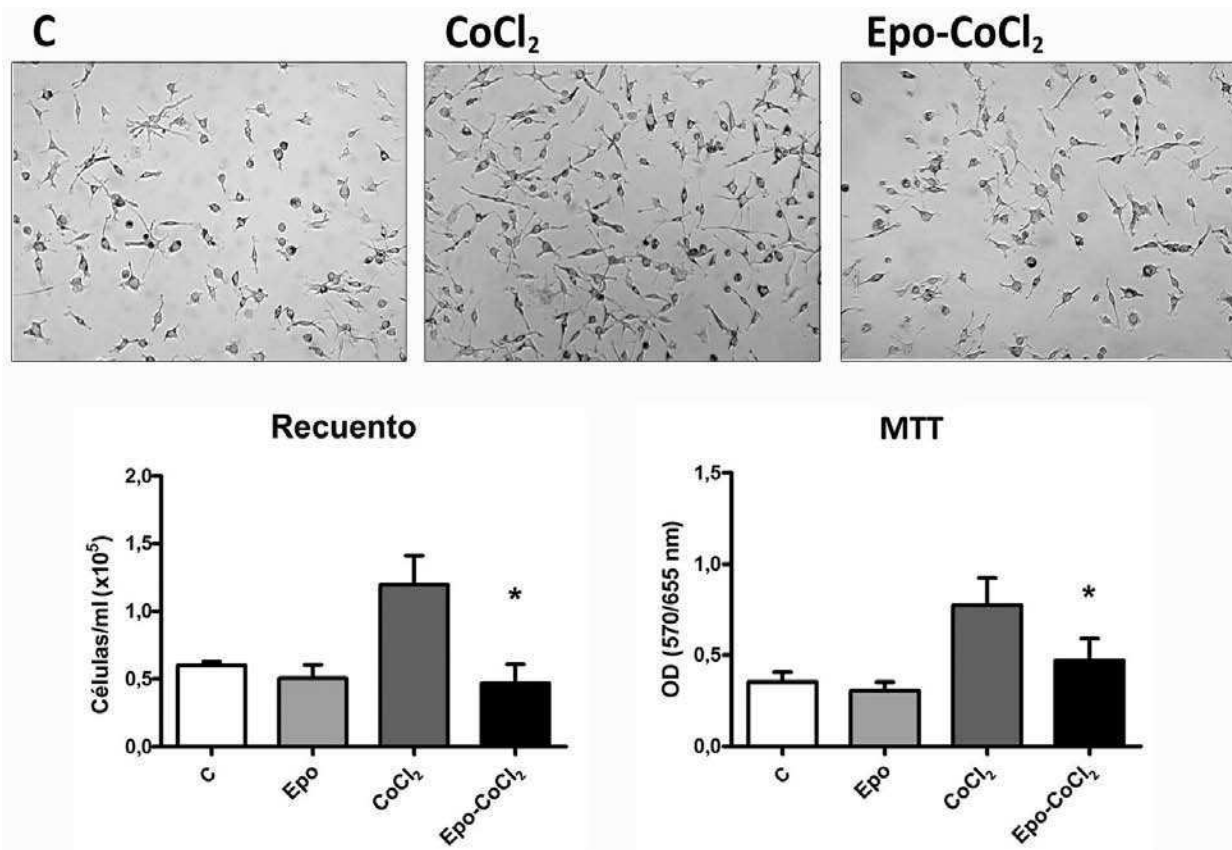
Cultivos EOC-2 fueron expuestos a diferentes dosis de Epo durante 24 h. Se analizó la producción de nitritos (Griess), observándose un aumento significativo en los niveles a partir de 25 U Epo/ml (Epo 25 y Epo 50 vs. C; \*P<0,05). Las barras representan Media±SEM de 5 ensayos independientes. Este efecto de la Epo (25 U/ml) fue prevenido por pretratamiento de los cultivos con el inhibidor de PI3K, Ly-294002 (25 µM) (Ly-Epo vs. Epo; \*P<0,05). Las barras representan Media±SEM de 5 ensayos independientes.

Mediante una curva dosis-respuesta, se observó el aumento de producción de nitritos en forma creciente con la dosis de Epo utilizada en la incubación de las células. Los incrementos fueron significativos a partir de concentraciones de 25 U/ml (Figura VIII.5).

Se sabe que la acción celular de Epo es mediada por vías de señalización de PI3K. Por otra parte, PI3K ha sido implicada en la inducción de iNOS (Lu *et al*, 2006). Por ello, resultó de interés analizar el efecto de la Epo sobre la producción de nitritos en la línea celular de microglía bajo condiciones de inhibición de PI3K. Encontramos que la presencia de Ly-294002, inhibidor de PI3K, impidió la producción de nitritos por Epo (Figura VIII.5), mostrando, de esta forma, otro rol importante para la vía de PI3K en la acción celular mediada por Epo.

### VIII-c. Efecto de la eritropoyetina sobre la proliferación celular producida durante la activación de la microglía por hipoxia

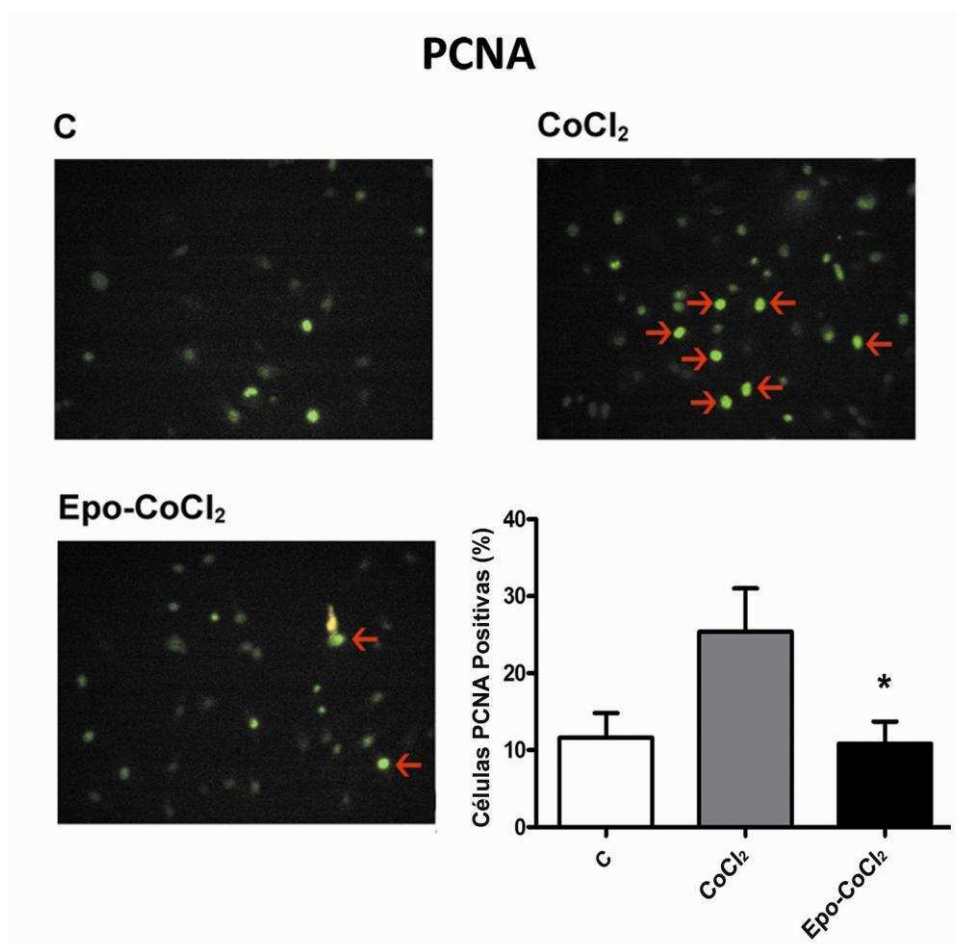
Como fuera mencionado anteriormente, durante la activación de la microglía se produce un incremento de la proliferación celular (Figura VII.5). Esta característica resulta fundamental para la respuesta tisular ante un daño en el sistema nervioso central (Mander *et al*, 2006).



**Figura VIII.6. Efecto de la eritropoyetina sobre la proliferación celular inducida durante la activación de la microglía**

Células de microglía fueron tratadas con Epo (25 U/ml, 24 h), para luego, ser incubadas en un ambiente de hipoxia química con CoCl<sub>2</sub>. Epo inhibió el efecto del CoCl<sub>2</sub> sobre la proliferación celular (Epo-CoCl<sub>2</sub> vs. CoCl<sub>2</sub> \*P<0,05). Las barras representan Media±SEM de 7 ensayos independientes.

Con el fin de analizar si la Epo podía tener acción a este nivel, se preincubaron cultivos EOC-2 con Epo seguido de la exposición a hipoxia química. Se realizó el análisis de la proliferación mediante el ensayo de MTT y el recuento celular. Como se puede observar en la Figura VIII.6, el pretratamiento con Epo logró inhibir la actividad proliferativa de la microglía activada por hipoxia. Este resultado coincide con la detección de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), un marcador de proliferación celular (Figura VIII.7).

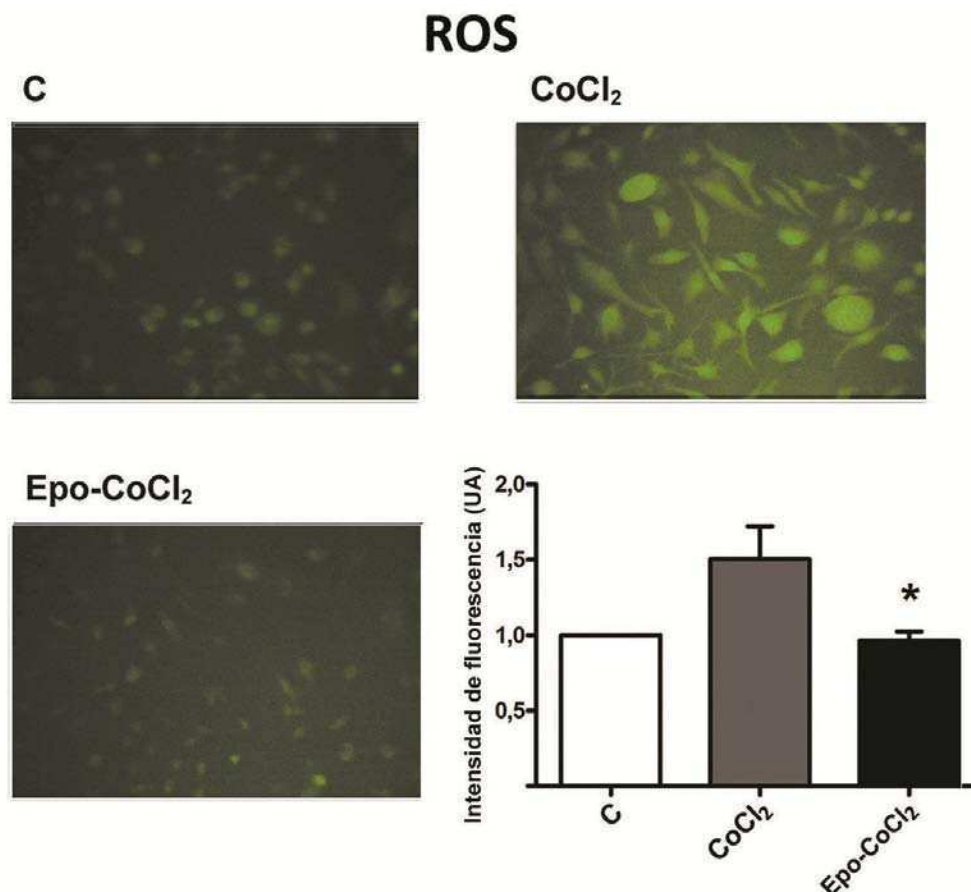


**Figura VIII.7. Efecto antiproliferativo de la eritropoyetina**

Células de microglía fueron tratadas con Epo (25 U/ml, 24 h), para luego, ser incubadas en hipoxia química con CoCl<sub>2</sub> durante 6 h. Se realizó la detección de PCNA por inmunofluorescencia indirecta. Epo previno el incremento del número de células PCNA-positivas inducido por CoCl<sub>2</sub> (\*P<0,05 Epo-CoCl<sub>2</sub> vs. CoCl<sub>2</sub>). Las figuras son representativas de 3 ensayos independientes con resultados similares.

**VIII-d. Efecto de la eritropoyetina sobre el estrés oxidativo generado por activación de la microglía**

Como fue demostrado en este trabajo (Figura VII.4), la hipoxia altera el estado redox de la célula. Dada la incapacidad de Epo para prevenir la liberación de mediadores inflamatorios durante la activación de la microglía, decidimos estudiar un posible efecto del pretratamiento de los cultivos con Epo sobre el estrés oxidativo.



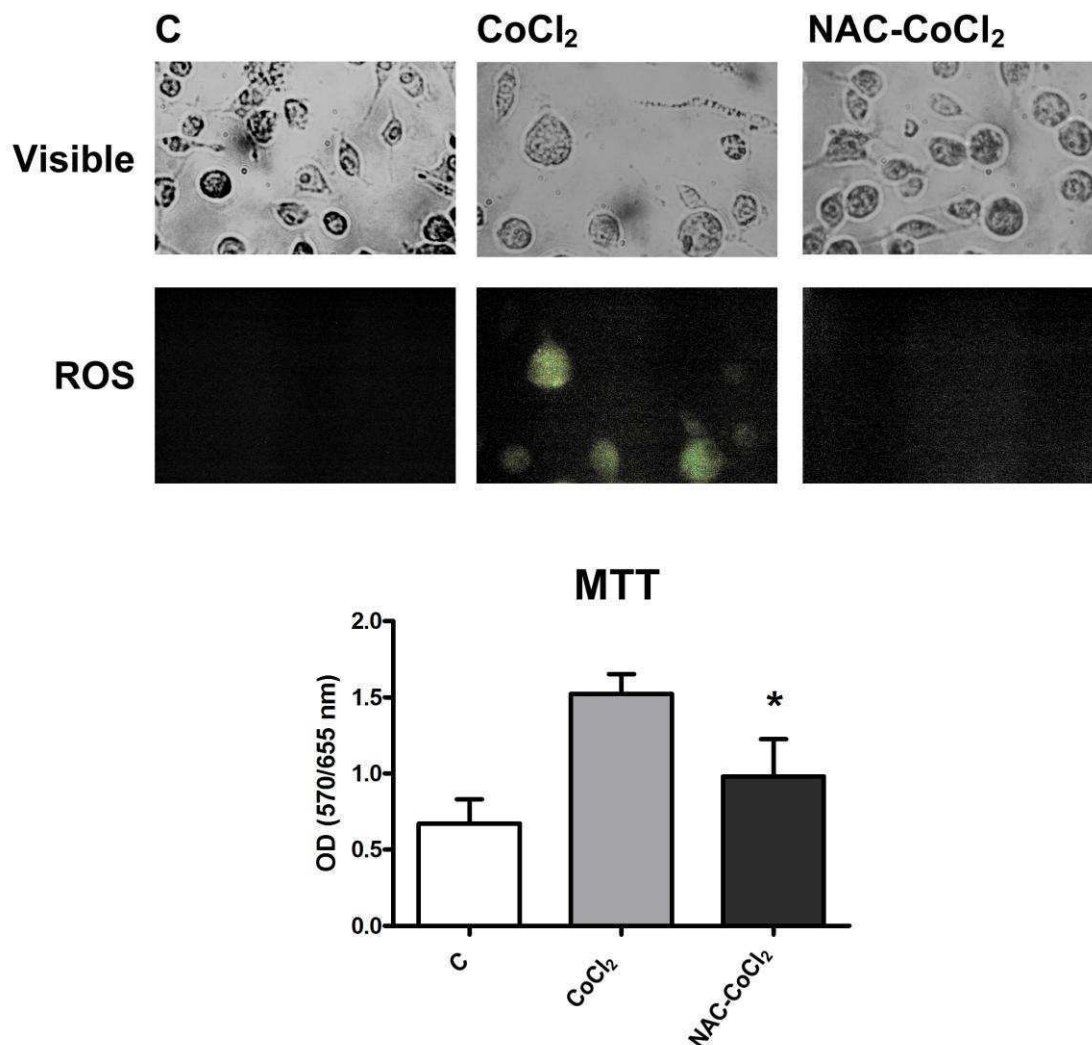
**Figura VIII.8. Efecto antioxidante de la eritropoyetina**

Cultivos de células EOC-2 fue pretratados con Epo (25 U/ml, 24 h), seguido de la exposición a CoCl<sub>2</sub> por 2 h. Ensayos de microscopía de fluorescencia empleando DCF mostraron que la Epo presenta una acción antioxidante, al impedir la generación de ROS. Mediante análisis de imágenes se realizó el estudio semicuantitativo de la intensidad de fluorescencia. Se cuantificó dicho parámetro en 10 imágenes y se obtuvo un promedio de la relación intensidad de fluorescencia:área (\*P<0,05 Epo-CoCl<sub>2</sub> vs. CoCl<sub>2</sub>). Las barras representan Media±SEM de 3 ensayos independientes.

Efectivamente, observamos que el aumento de los niveles de ROS generado durante la activación de la microglía por hipoxia química es prevenido por la capacidad antioxidante de la Epo (Figura VIII.8).

Se ha sugerido que el estrés oxidativo puede estar involucrado en la proliferación celular. Dosis subletales de ROS pueden estimular la proliferación celular. A su vez, se ha demostrado que la manipulación del balance redox ha inhibido la proliferación celular en cultivos de células hepáticas, como también de fibroblastos (Sarsour *et al*, 2009). En base a esto y con el fin de determinar la existencia de una relación entre estrés oxidativo y proliferación celular inducida por hipoxia, se realizaron ensayos en presencia de un agente antioxidante. Se incubaron cultivos de células de microglía EOC-2 con el

antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC) previamente a su activación por hipoxia química. Los resultados muestran que dicho agente antioxidante inhibe significativamente la proliferación celular inducida por la exposición de microglía a hipoxia (Figura VIII.9).



**Figura VIII.9. Balance redox y proliferación celular**

Cultivos de células EOC-2 fue pretratados con NAC (10 mM, 1h), seguido de la exposición a CoCl<sub>2</sub> por 2 h para la detección de ROS y 24 h para la determinación de la proliferación celular mediante MTT. Los niveles de ROS fueron determinados por microscopía de fluorescencia empleando DCF. Mediante análisis de imágenes se realizó el estudio semicuantitativo de la intensidad de fluorescencia. Dicho parámetro fue analizado en 10 imágenes, obteniéndose un promedio de la relación intensidad de fluorescencia:área. NAC presentó una acción antioxidante al impedir la generación de ROS. A su vez, la acción antioxidante previno la inducción de la proliferación celular por hipoxia química. (\*P<0,05 NAC-CoCl<sub>2</sub> vs. CoCl<sub>2</sub>). Las barras representan Media±SEM de 3 ensayos independientes.

## ***Discusión***

### **VII-VIII. Eritropoyetina y su acción sobre células de microglía**

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede sugerir lo siguiente:

1- La exposición a hipoxia provoca la activación de la microglía, induciendo la producción de mediadores inflamatorios como nitritos, TNF- $\alpha$  y ROS, a la vez que altera la proliferación celular (Figuras VII.1 – VII.5).

2- La producción de nitritos y de TNF- $\alpha$ , inducida por hipoxia, no es alterada por el pretratamiento con Epo de las células de microglía (Figuras VIII.3 y VIII.4).

3- La incubación de células de microglía con Epo aumenta los niveles de iNOS e induce la producción de nitritos (Figura VIII.4 y VIII.5).

4- El pretratamiento con Epo interfiere en la proliferación celular inducida por hipoxia (Figuras VIII.6 y VIII.7).

5- La Epo presenta una acción antioxidante frente a la activación de células de microglía por hipoxia (Figura VIII.8).

*In vivo*, el rol de la microglía en estado activado es bivalente. Por un lado, presenta un rol protector a través de la clarificación de restos celulares (*debris*) y el *uptake* de glutamato tóxico para las neuronas, mientras que la liberación tanto de radicales libres como de mediadores proinflamatorios participa de su función neurotóxica (Turrin y Rivest, 2006; Block y Hong, 2005).

Diversos trabajos han descrito que la exposición a hipoxia puede causar o agravar un cuadro inflamatorio mediante el incremento de los niveles de IL-1 y TNF- $\alpha$  (Ghezzi *et al*, 1991; Karakurum *et al*, 1994).

Los resultados mostrados en este trabajo demuestran que agentes proinflamatorios, como TNF- $\alpha$ , LPS o hipoxia, inducen la producción de nitritos en la microglía, siendo el

estímulo por hipoxia química capaz de alterar la proliferación celular en cultivos de células EOC-2. En concordancia, Mander (2005) reportó un aumento significativo en el número de células de microglía expuestas a hipoxia ambiental.

A su vez, se advirtió un incremento en la expresión de iNOS y en los niveles de ROS. Esto concuerda con trabajos reportados, en donde se observó que la hipoxia modula positivamente tanto la producción de nitritos como la expresión de iNOS, sugiriendo de esta manera que la exposición a hipoxia sería un estímulo proinflamatorio (Lu *et al*, 2006). En relación con el estrés oxidativo, se ha reportado que un desbalance en el estado redox contribuiría a la respuesta proinflamatoria en la microglía (Innamorato *et al*, 2009).

Se ha sugerido que la activación de la enzima NADPH oxidada por diversos agentes proinflamatorios, incrementa los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A su vez, se ha observado que en cultivos de microglía, este agente oxidante tiene acción mitogénica, induciendo así el aumento del número de células (Day *et al*, 2005; Mander *et al*, 2006).

En la actualidad, la Epo es reconocida como una citoquina con acción pleiotrópica en diversos tejidos. En este trabajo, se ha observado que la Epo no impide la producción de nitritos ni la de TNF- $\alpha$  ante la hipoxia inducida por CoCl<sub>2</sub>.

A su vez, se ha advertido que la Epo *per se* causa un aumento en la producción de nitritos por la microglía. En este contexto, ha sido reportado que Epo induce la producción de NO en células endoteliales a través de la activación de eNOS, reflejada en el aumento de la expresión y fosforilación de la enzima (Beleslin-Čokić *et al*, 2004). Se ha postulado que la Epo puede participar en la remodelación del tejido conectivo en la artritis reumatoidea a través de la producción de NO. La exposición a Epo de células de fibroblasto indujo un significativo aumento de los niveles de nitritos, mostrando que Epo tiene un efecto aditivo en el tratamiento con IL-1 $\beta$ . La inhibición del incremento de nitritos con L-NAME permitió sugerir que la producción de nitritos por Epo estaría mediada por NOS (Baig *et al*, 2002).

En relación con la modulación de agentes proinflamatorios por parte de Epo, nuestros resultados también concuerdan con los de otros autores que demostraron en un modelo de cultivo primario de microglía que la Epo, en cotratamiento con LPS, no puede prevenir la producción de nitritos ni de TNF- $\alpha$ , aunque observaron una acción proliferativa de Epo (Wilms *et al*, 2009). En el mismo contexto, Villa y colaboradores (2003) observaron disminución en el número de células activadas sin detectar una acción antiinflamatoria



por parte de Epo en modelos *in vivo* e *in vitro* de cultivos de células gliales expuestas a LPS.

Otro resultado interesante, reportado por Lifshitz (2010), sugiere un efecto proinflamatorio de la Epo en macrófagos peritoneales, con estimulación tanto del índice fagocítico, como de la producción de nitritos y TNF- $\alpha$ . Otro trabajo, un estudio en voluntarios expuestos a LPS reveló también el incremento de los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 por Epo (Hojman *et al*, 2009).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo sugieren que la Epo no presenta una acción antiinflamatoria directa sobre la línea de células EOC-2 expuestas a hipoxia química. Sin embargo, hemos observado otros efectos de la Epo durante la activación de la microglía. Como fuera mencionado anteriormente, ante determinados estímulos, como infección o daño tisular, la microglía entra en un estado activado, durante el cual se produce alteración de la actividad metabólica, afectando el número y tamaño de las células (Mander *et al*, 2006). Según los resultados obtenidos en este trabajo, el pretratamiento con Epo previene la proliferación celular de microglía causada por hipoxia. Esto concuerda con lo observado por Li *et al* (2006), quienes demostraron que el pretratamiento con Epo inhibe el incremento de PCNA y BrdU, ambos marcadores de proliferación celular, en un modelo de hipoxia-isquemia en la línea EOC-2.

Con respecto a la acción de la Epo sobre el estado redox celular, nuestros resultados demuestran que el pretratamiento con Epo previene la producción de ROS inducida por hipoxia en microglía. Esto concuerda con resultados previos en cardiomiocitos, células PC-12 o cultivos de epitelio de retina, los cuales sugieren que la Epo es capaz de ejercer una acción antioxidante. Recientemente, ha sido reportado que la Epo ejerce su acción antiapoptótica en cultivos de cardiomiocitos mediante la regulación positiva de hemoxygenasa-1, proteína involucrada en procesos antioxidantes (Calo *et al*, 2006; Wu *et al*, 2007; Xiang *et al*, 2009).

Otro resultado interesante es la prevención por parte de la Epo de la inhibición de la proliferación celular inducida por la exposición a hipoxia. Dicho resultado podría ser explicado por la acción antioxidante de Epo.

Con el fin de determinar la existencia de la relación entre estrés oxidativo y proliferación celular, se realizaron ensayos con el agente antioxidante NAC. Dicho compuesto,

precursor de glutation, ha mostrado la capacidad de inhibir la proliferación celular en cultivos de células de músculo liso (Kyaw *et al*, 2002; Sato *et al*, 2009). Los resultados obtenidos en el presente trabajo con dicho agente antioxidante sugieren que hay una relación entre el estrés oxidativo y la proliferación celular inducida por hipoxia química. En concordancia, trabajos previos en cultivos de microglia han demostrado que la estimulación de la proliferación inducida por agentes proinflamatorios es mediada por un incremento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, agente producido por la activación de la enzima NADPH oxidasa (Mander *et al*, 2006).

De esta manera, la prevención de un ambiente oxidativo por parte de Epo durante la activación de la microglia desfavorecería el incremento de más especies reactivas así como también la mediación de otro procesos celulares como la proliferación celular. Esto también sugiere que los radicales libres, además de presentar una acción neurotóxica, son capaces de incrementar la respuesta proinflamatoria.

En esta sección, se ha demostrado en nuestro modelo experimental, que mientras Epo no logra inhibir la producción de nitritos ni de TNF- $\alpha$ , si es capaz de tener un efecto regulador sobre la proliferación celular y el estrés oxidativo. Mediante este efecto, Epo podría reducir el daño potencial implicado, contrarrestando la inflamación a largo plazo, principalmente, mediante su acción antioxidante.

## ***IX. Diálogo glía-neurona. Acción de la eritropoyetina***

### **IX-a. Acción de la activación de la microglía sobre cultivos de origen neuronal**

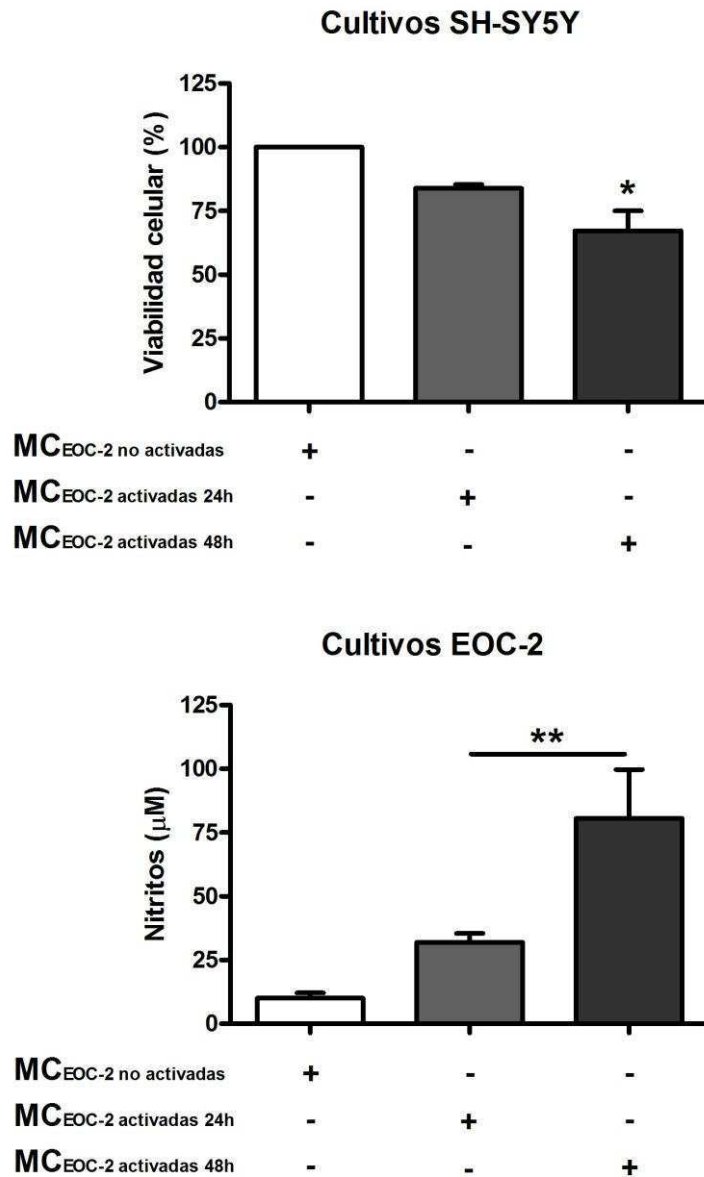
En la sección VII hemos demostrado que la activación de microglía por exposición a hipoxia química conduce a un aumento de la proliferación celular. Esta observación, coincidente con hallazgos de otros autores, podría tener roles contrapuestos sobre otras células del microambiente en el SNC. Por una parte, la microglía activada y en estado de proliferación podría asistir a la reparación tisular (Maiese *et al*, 2008). Sin embargo, la activación de células microgliales podría conducir a la remoción de neuronas y células vasculares. Además, también podría producir daño celular a través de estrés oxidativo y de la producción de citoquinas citotóxicas para las neuronas (Chong *et al*, 2005; Shavali *et al*, 2006).

### **IX-b. Obtención y caracterización de medios condicionados de cultivos de microglía activada**

Como ya hemos demostrado, la exposición durante 24 h a condiciones de hipoxia química activa la microglía induciendo la producción de nitritos, TNF- $\alpha$  y ROS (Figuras VII.1 y VII.4). Con el fin de estudiar el efecto de la microglía activada por hipoxia química sobre la viabilidad de cultivos de células neuronales, se obtuvieron medios condicionados de cultivos EOC-2 activados con CoCl<sub>2</sub> durante 24 ó 48 h y se analizó su efecto en cultivos de células neuronales de la línea SH-SY5Y (Gibbons *et al*, 2006).

Como se muestra en la Figura IX.1, la supervivencia de las células neuronales SH-SY5Y no fue afectada por la presencia de medios condicionados obtenidos por activación de las células EOC-2 durante 24 h. Sin embargo, la viabilidad celular disminuyó significativamente ( $P < 0,05$ ) cuando los cultivos de células neuronales fueron desarrollados en presencia de medios condicionados obtenidos después de 48 h de activación de la microglía. Este efecto fue explicado al determinar la concentración de nitritos en los medios condicionados obtenidos a distintos tiempos de activación celular. Como muestra la figura, la producción de nitritos aumentó casi tres veces por exposición de las células EOC-2 durante 48 h con respecto a los niveles observados después de 24 h

de incubación. A su vez, la exposición de cultivos SH-SY5Y a  $\text{CoCl}_2$  no altera la viabilidad celular (Recuento de células viables por tinción con azul Tripán: C  $90,6 \pm 4\%$ ;  $\text{CoCl}_2$   $100 \mu\text{M}$   $88,5 \pm 6,7\%$  células viables; Ensayo de MTT: C  $100\%$  ;  $\text{CoCl}_2$   $100 \mu\text{M}$   $99 \pm 7\%$  . Media  $\pm$  SEM de 3 ensayos independientes. Los valores se expresaron como porcentaje del Control).



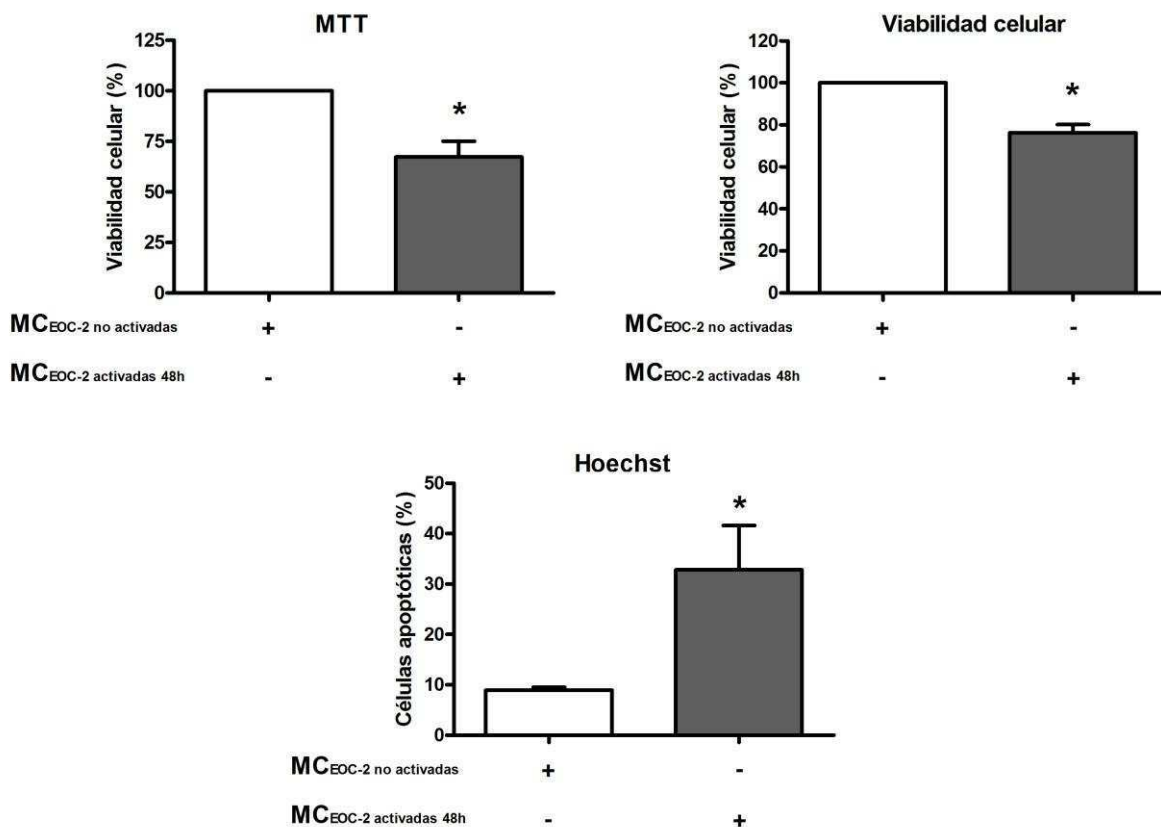
**Figura IX.1. Caracterización de los medios condicionados de microglía activada en función de su efecto sobre los cultivos de células neuronales**

Se analizó el efecto sobre la viabilidad de células SH-SY5Y, expuestas por 24 y 48 h a medios condicionados (MC) de cultivos de células EOC-2 estimulados con  $\text{CoCl}_2$  ( $100 \mu\text{M}$ ) durante 48 h, mediante ensayo de MTT expresado como porcentaje de crecimiento en función del control expresado como  $100\%$  . Se observó una disminución significativa de la viabilidad celular en cultivos con MC obtenidos luego de 48 h de activación de células EOC-2 con respecto al cultivo control (C) incubados en MC de células de microglía no activadas ( $*P < 0,05$ ). La cuantificación de la producción de nitritos por el método de Griess mostró el aumento significativo de la producción

de nitritos relacionado con el tiempo de activación celular (MC 24 h y 48 h vs. C **\*\*P<0,01**). Las barras representan Media±SEM de 3 ensayos independientes.

En base a los resultados observados, en los ensayos siguientes las células neuronales SH-SY5Y fueron expuestas por 48 h a medios condicionados obtenidos por la activación de células EOC-2 durante 48 h con  $\text{CoCl}_2$  100  $\mu\text{M}$ . Bajo estas condiciones, se analizaron la viabilidad (ensayo de MTT y recuento de células) y apoptosis celular (microscopía de fluorescencia bajo tinción con Hoechst).

La Figura IX.2 muestra la alteración en la viabilidad de las células SH-SY5Y, coincidente con el aumento de la muerte celular programada, en cultivos de las células neuronales en presencia de medios condicionados de microglía activada.



**Figura IX.2. Efecto de la activación de la microglía por hipoxia sobre cultivos de células neuronales SH-SY5Y**

Células de la línea EOC-2 fueron activadas con  $\text{CoCl}_2$  durante 48 h, obteniéndose el medio condicionado (MC) de dicho cultivo. La viabilidad celular fue analizada por recuento celular con tinción con azul Tripán. A su vez, se realizaron ensayos de MTT, expresando los valores obtenidos como porcentaje del control. La muerte celular por apoptosis de células SH-SY5Y fue analizada al finalizar los cultivos (48 h) expuestos al MC de microglía activada por hipoxia química. Paralelamente se desarrollaron, como controles, cultivos realizados en presencia de MC de células EOC-2 sin activar. Se observaron alteraciones significativas, tanto en la viabilidad celular como en

la muerte por apoptosis (MC-48 h vs. C \* $P < 0,05$ ). Las barras representan Media $\pm$ SEM de 3 ensayos independientes.

### **IX-c. Activación de cultivos de macrófagos por agentes proinflamatorios y acción sobre células neuronales**

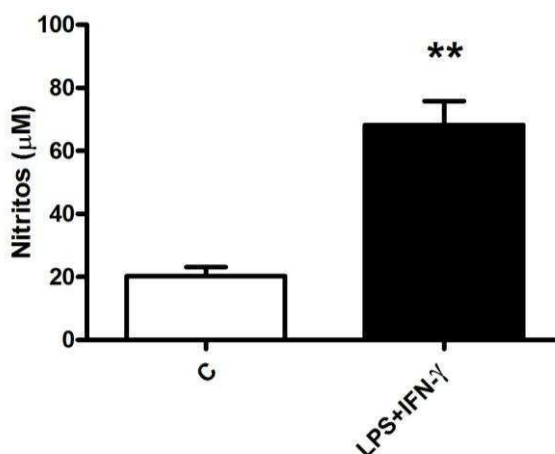
Los macrófagos han sido implicados como potentes inductores de apoptosis de células tumorales (Chambers y Weiser, 1972), de células endoteliales vasculares (Peri *et al*, 1990), de linfocitos T periféricos en desarrollo (Munn *et al*, 1996; Zheng *et al*, 1995) y de los linfocitos B en la médula ósea (Osmond *et al*, 1994) y han sido implicados en la regresión de varios tejidos (Ellis *et al*, 1991). Actualmente, no ha sido totalmente aclarada la identidad de las moléculas responsables de la inducción de apoptosis producida por los macrófagos. En este aspecto, se ha adjudicado a los productos reactivos del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) responsabilidad en numerosos procesos apoptóticos inducidos por los macrófagos (Lewis y McGee, 1992; Martin y Edwards, 1993). Por ejemplo, los intermediarios reactivos del oxígeno, generados a través de la cadena respiratoria de los macrófagos, pueden inducir apoptosis en las células NK (Hansson *et al*, 1996). La producción de NO por los macrófagos estimulados promueve la apoptosis de células tumorales (Cui *et al*, 1994; Keller *et al*, 1990) principalmente mediante la inducción de lesiones en el DNA (Messmer *et al*, 1994; Nguyen *et al*, 1992). Los macrófagos también secretan las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , las cuales son capaces de inducir apoptosis tanto en células normales como tumorales (Onozaki *et al*, 1985; Fratelli *et al*, 1995).

Existen diversos agentes, como PMA, LPS e IFN $\gamma$ , que presentan la capacidad de activar tanto macrófagos como células de la microglía (Mander *et al*, 2006).

El LPS, uno de los componentes estructurales de la membrana exterior de las bacterias Gram negativas, induce, en los macrófagos, los niveles de ROS y RNS, así como el aumento de la síntesis de citoquinas, tales como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 (Sweet y Hume, 1996).

Para profundizar el estudio de la relación entre inflamación y muerte neuronal, decidimos utilizar otro modelo *in vitro*, empleando cultivos de la línea de macrófagos murinos (RAW 264.7).

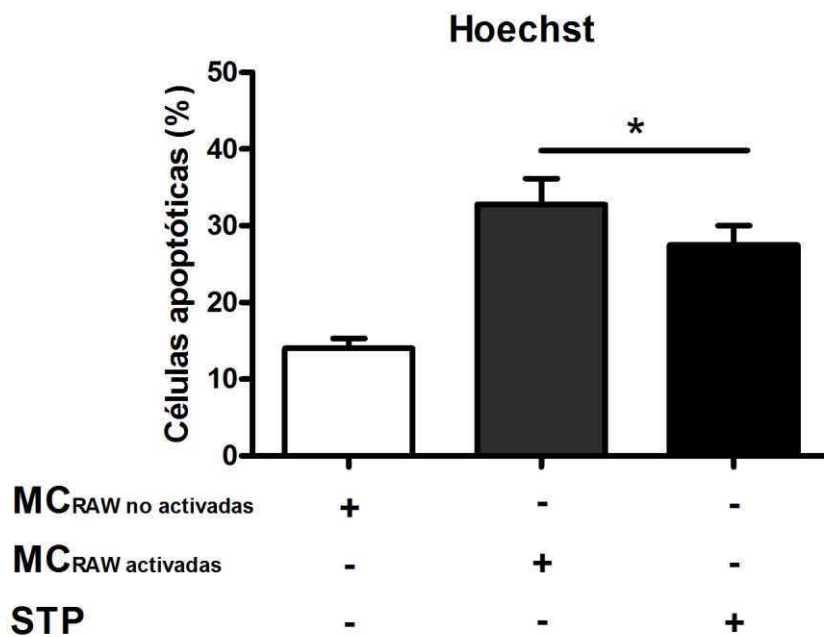
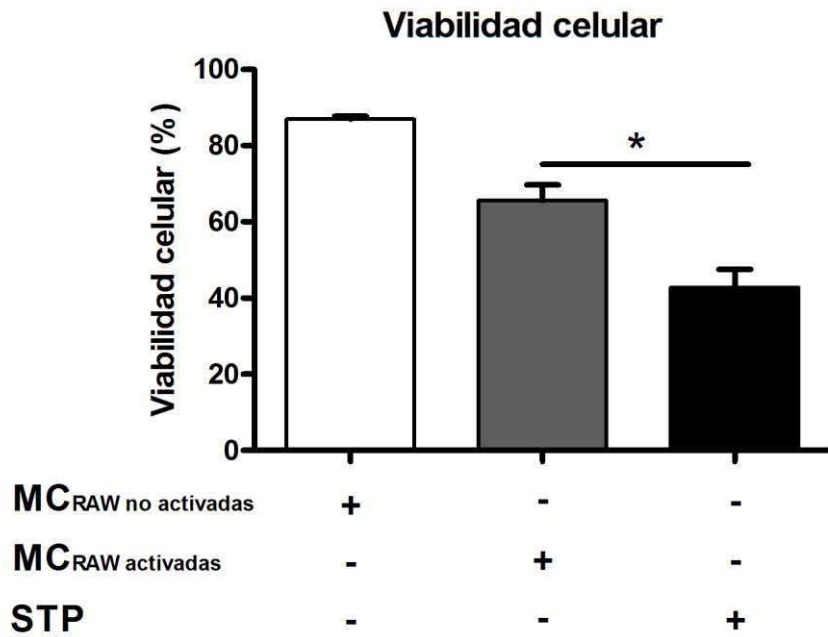
En este trabajo, se emplearon LPS e  $\text{IFN}\gamma$  para estimular células de la línea RAW 264.7 de macrófagos murinos (Figura IX.3) y obtener medios condicionados con el fin de estudiar su acción sobre cultivos de células neuronales SH-SY5Y como modelo de neurona dopaminérgica humana (Figura IX.4).



**Figura IX.3. Activación de macrófagos por factores proinflamatorios**

Cultivos de macrófagos RAW fueron estimulados con LPS+ $\text{IFN}\gamma$  (LPS 10 ng/ml y  $\text{IFN}\gamma$  100 U/ml) durante 24 h. En ambos ensayos se encontró aumento significativo de la producción de nitritos (LPS+  $\text{IFN}\gamma$  vs. C  $^{**}P<0,01$ ). Las barras representan Media $\pm$ SEM de 3 ensayos independientes.

Los medios condicionados, obtenidos de la activación de células RAW por LPS+  $\text{IFN}\gamma$  fueron adicionados a cultivos de células neuronales, analizándose la viabilidad celular al término de los cultivos. Los resultados que se muestran en la Figura IX.4 sugieren que la activación de células RAW induce la producción de mediadores que causan muerte neuronal.



**Figura IX.4. Toxicidad del medio condicionado de cultivos de células RAW activados sobre la viabilidad de células SH-SY5Y**

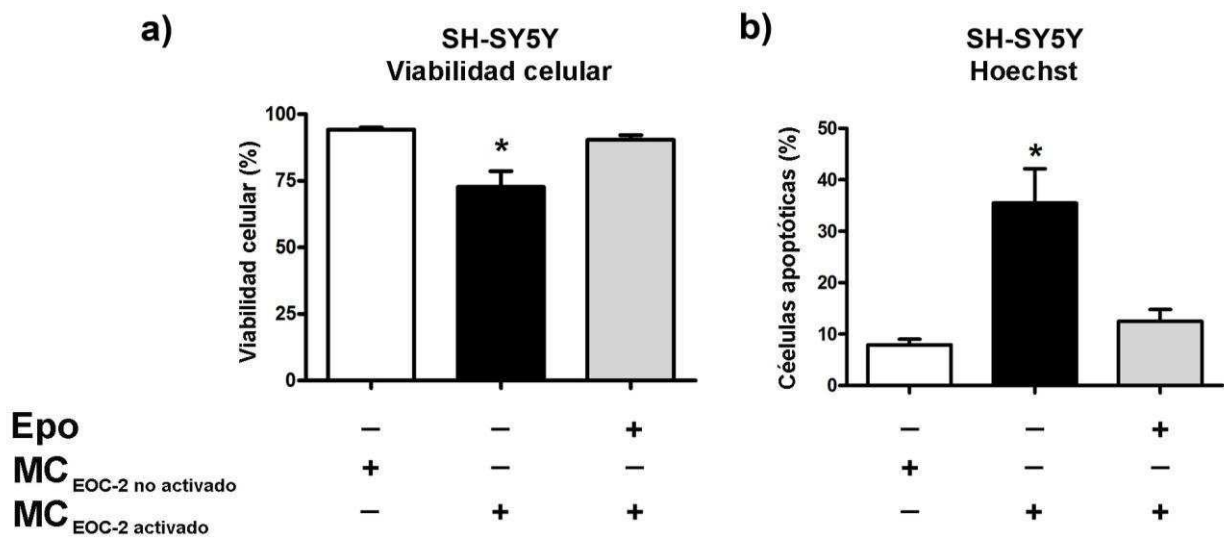
Cultivos de macrófagos (células RAW 264.7) fueron estimulados con LPS+IFN $\gamma$  durante 24 h. Se recolectaron los medios condicionados (MC), a los que fueron expuestas las células SH-SY5Y. Luego de 48 h de exposición, se analizó la viabilidad celular (ensayo de azul Tripán) y la muerte por apoptosis (microscopía de fluorescencia después de tinción con Hoechst). Se observó un aumento de la muerte de células neuronales incubadas con MC de células RAW activadas por factores proinflamatorios (MC RAW activadas vs. MC RAW no activada, \*P<0,05). Las barras representan Media $\pm$ SEM de 3 ensayos independientes. Ensayos en presencia de STP fueron realizados en paralelo como control positivo de apoptosis de la línea celular SH-SY5Y.



## X. Acción de la eritropoyetina frente a un ambiente proinflamatorio

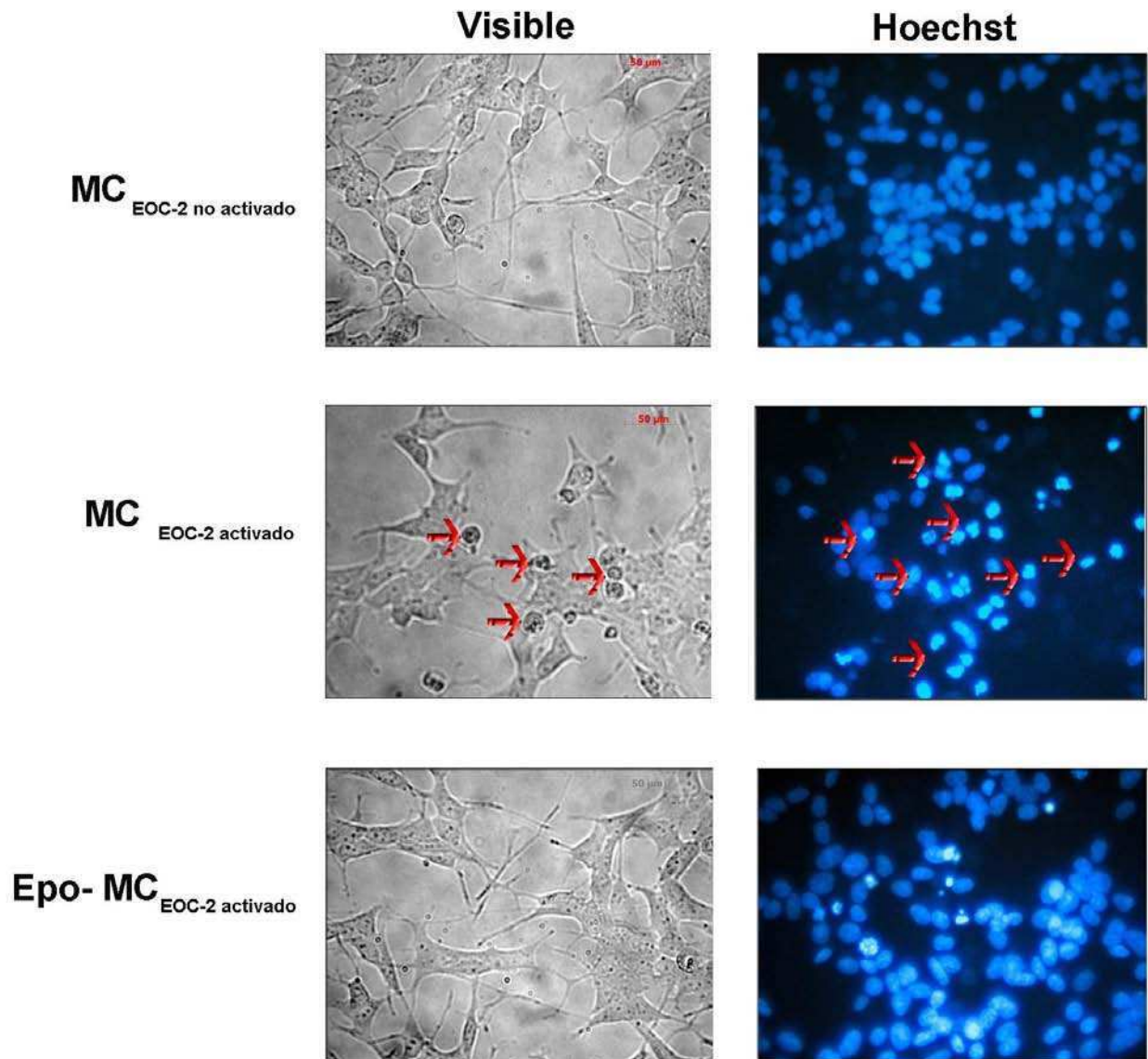
Dado que, durante una situación patológica, las células de microglía pueden presentar un rol relevante en la supervivencia celular o contribuir a la muerte neuronal, nos interesó investigar la interacción microglía/neurona. Además, ante la acción neuroprotectora demostrada por la Epo, nos planteamos analizar el efecto de dicha hormona en células neuronales expuestas a un medio condicionado obtenido de cultivos activados de microglía o de macrófagos.

Como se puede observar en la Figuras X.1, X.2 y X.3, los ensayos de viabilidad y de muerte celular mostraron el efecto citoprotector de la Epo frente a la exposición de células SH-SY5Y indiferenciadas al medio condicionado de cultivos de células EOC-2 activadas. Se observa que la Epo previene la muerte celular programada inducida por la presencia de factores proinflamatorios en los medios condicionados producidos durante la activación de células de microglía.



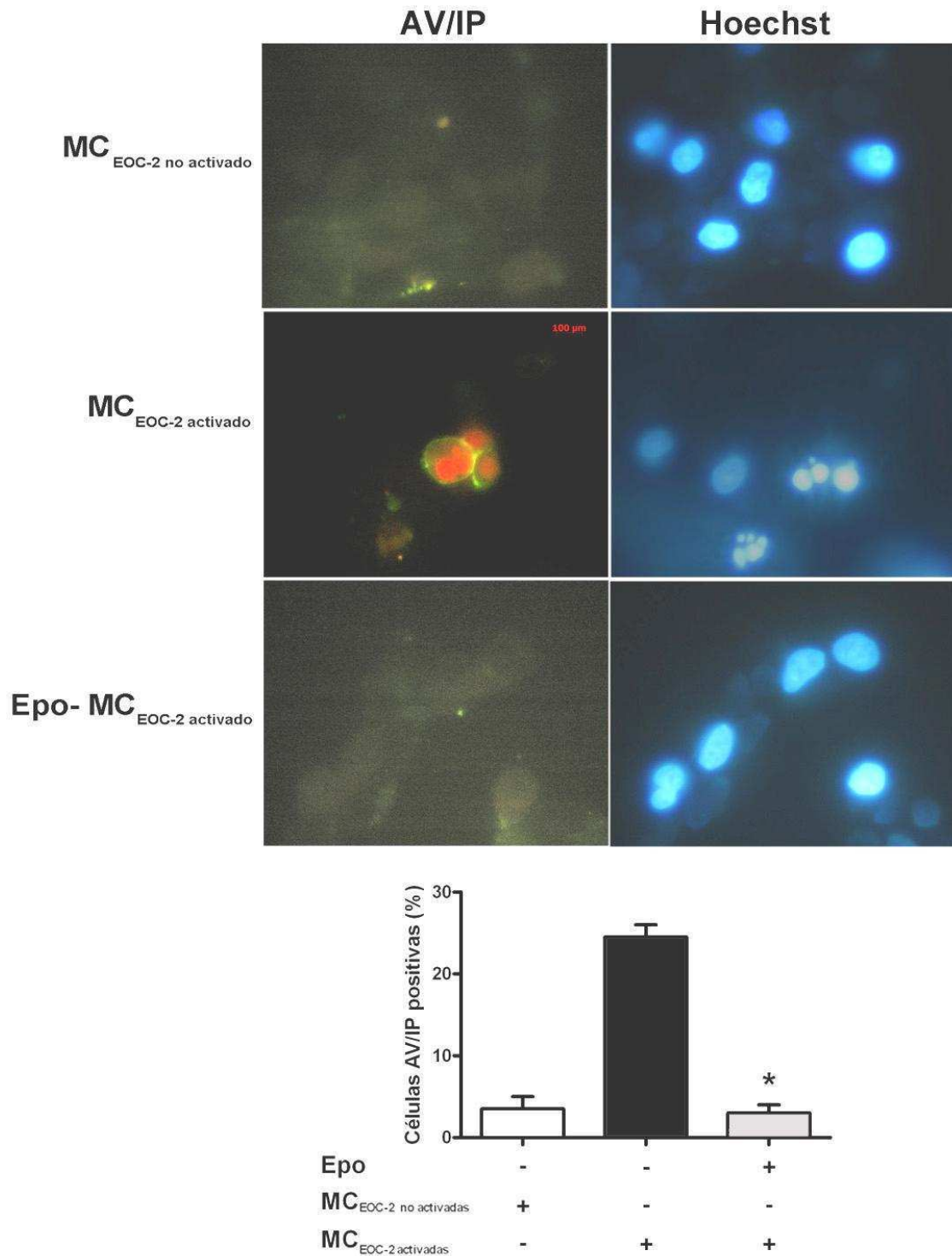
**Figura X.1. Efecto neuroprotector de la eritropoyetina frente a la exposición a medios condicionados de microglía activada**

Cultivos de células EOC-2 fueron estimulados con  $\text{CoCl}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) durante 48 h. El medio condicionado obtenido fue empleado en cultivos de células SH-SY5Y con o sin tratamiento previo con Epo (25 U/ml, 24 h). Luego de 48 h adicionales de exposición al medio condicionado, se analizó la viabilidad y la muerte celular programada. La Epo mostró acción neuroprotectora (MC EOC-2 activado vs. Epo-MC EOC-2 activado, \* $P < 0,05$ ; Epo-MC EOC-2 activado vs. MC EOC-2 no activado, NS). Las barras representan Media  $\pm$  SEM de 3 ensayos independientes.



**Figura X.2. Fotografía de células SH-SY5Y teñidas con colorante de Hoechst**

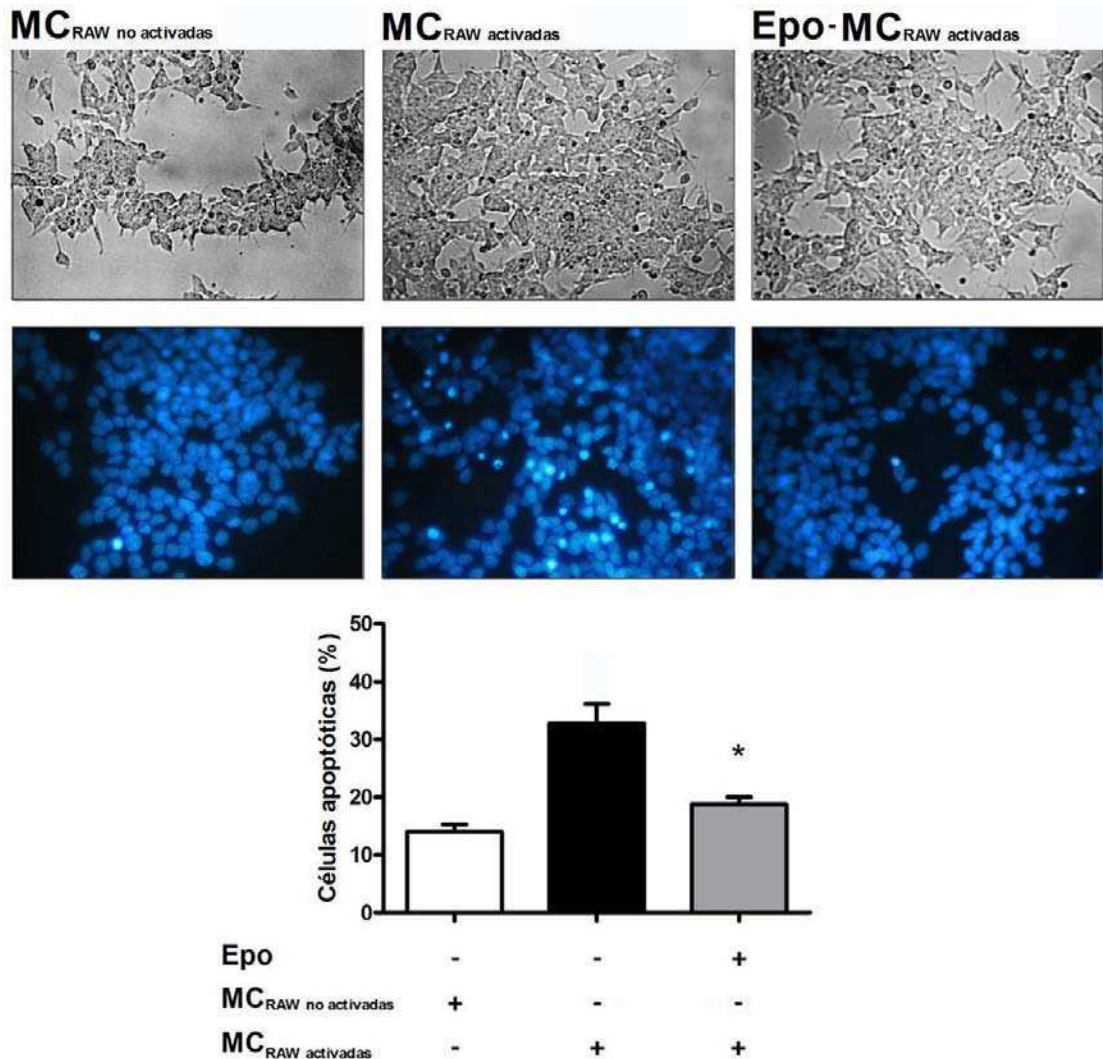
Las células fueron tratadas como fue descrito en la figura III.6 y luego fueron observadas por microscopía de fluorescencia, con filtro de 365 nm con aumento de 400x.



**Figura X.3. Efecto neuroprotector de la eritropoyetina frente a la exposición a medios condicionados de microglía activada**

Mediante recuento de células Anexina V/IP positivas se evaluó la muerte por apoptosis de células SH-SY5Y pretratadas por 24 h o no con Epo (25 U/ml, 24 h) y luego expuestas durante 48 h a medio condicionado de cultivos EOC-2 inactivados o activados por hipoxia química. La Epo previene la muerte por apoptosis (MC EOC-2 activado vs. Epo-MC EOC-2 activado, \*P<0,05; Epo-MC EOC-2 activado vs. MC EOC-2 no activado, NS). Las barras representan Media±SEM de 3 ensayos independientes.

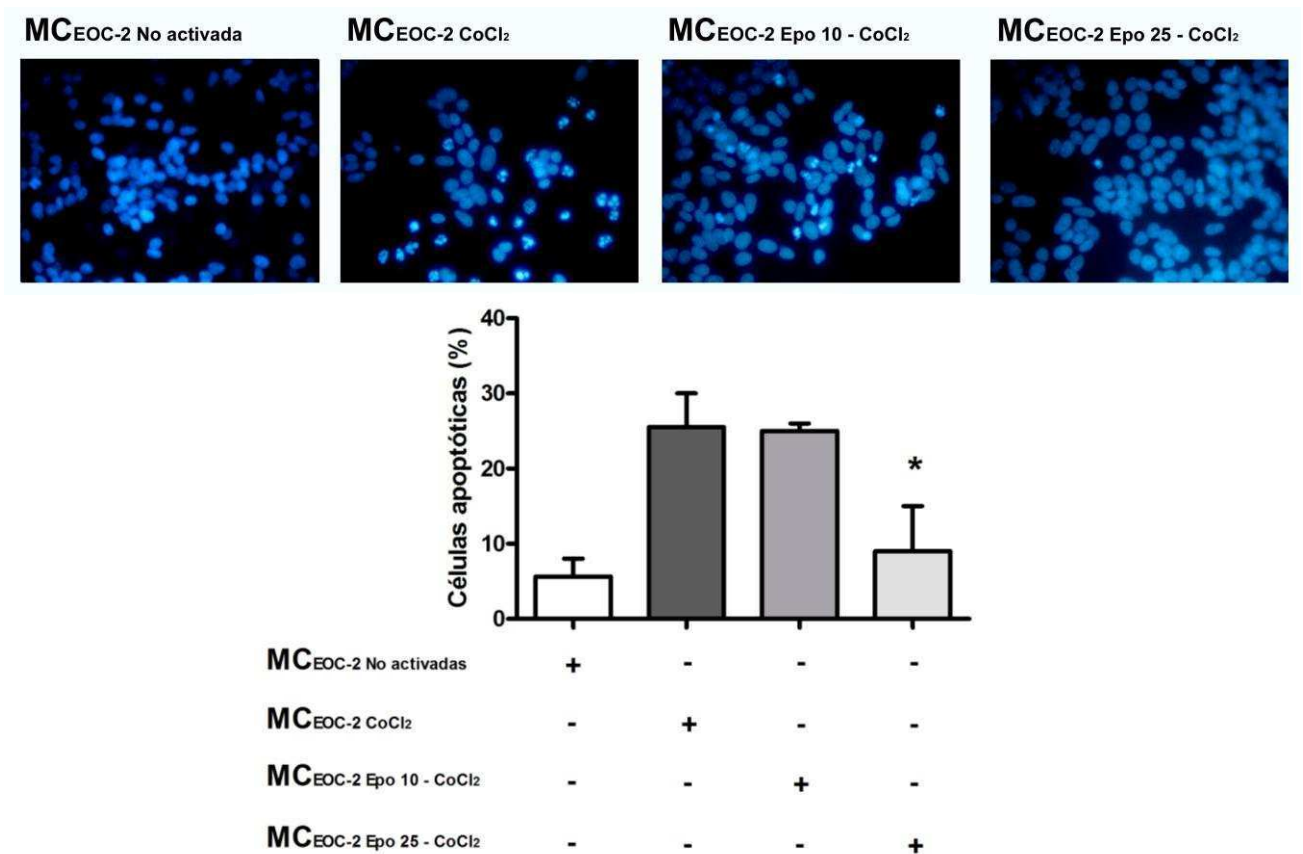
Con el fin de analizar el efecto citoprotector de la Epo sobre los cultivos de células SH-SY5Y ante otro modelo de citotoxicidad mediada por inflamación, se emplearon cultivos de células de macrófagos murinos activados por LPS+IFN $\gamma$  (Figura X.4). Se pudo observar que la Epo previene la muerte celular mediada por agentes proinflamatorios, lo cual condice con lo observado en el modelo de inflamación mediado por activación de la microglía (Figura X.3).



**Figura X.4 Efecto neuroprotector de la eritropoyetina en cultivos expuestos a medio condicionado de macrófagos activados**

Cultivos de células RAW fueron estimulados con LPS+IFN $\gamma$  durante 24 h. El medio condicionado obtenido fue empleado en cultivos de células SH-SY5Y con o sin tratamiento previo con Epo (25 U/ml, 24h). Luego de 48 h de exposición a medio condicionado, se analizó la muerte celular programada por microscopía de fluorescencia después de tinción con Hoechst. Los resultados muestran la acción neuroprotectora de Epo (MC RAW activadas vs. C, \*P<0,05; Epo-MC RAW activadas vs. MC RAW no activadas, NS). Las barras representan Media $\pm$ SEM de 3 ensayos independientes. En la parte superior de la figura se muestran fotografías correspondientes a la observación, por microscopía óptica, de los 3 ensayos.

Se ha sugerido que la combinación de especies reactivas de oxígeno y la expresión de iNOS resulta en la producción de peroxinitritos, agente prooxidante con capacidad neurotóxica (Brown et al, 2010; Shavali et al, 2006). Dada la acción antioxidante de Epo en cultivos EOC-2, se quiso evaluar el impacto de la Epo sobre la activación de la microglía, analizando el efecto de la exposición de células SH-SY5Y a medios condicionados de cultivos de células EOC-2 pretratados con Epo antes de su exposición a hipoxia química. Los resultados muestran que mientras el medio condicionado de células de microglía expuestas a hipoxia química causa muerte neuronal, el medio condicionado de cultivos EOC-2 pretratados con Epo no induce la muerte celular (Figura X.5).



**Figura X.5 Efecto del pretratamiento de células de microglía con eritropoyetina antes de su activación y obtención de medios condicionados a los que fueron expuestas células neuronales**

Cultivos de células EOC-2 fueron preincubadas con EPO (10 ó 25 U/ml) y luego activadas con CoCl<sub>2</sub> durante 48 h. El medio condicionado obtenido fue empleado en cultivos de células SH-SY5Y. Luego de 24 h de exposición a medio condicionado, se analizó la muerte celular programada. Los resultados muestran que el MC de células EOC-2 pretratadas con Epo 25 U/ml no causa muerte celular (MC EOC-2 CoCl<sub>2</sub> vs. C, \*P<0,05; MC Epo-CoCl<sub>2</sub> vs. C, NS). Las barras representan Media±SEM de 3 ensayos independientes.

## ***Discusión***

### ***IX-X. Eritropoyetina y su acción ante un ambiente proinflamatorio.***

De acuerdo con los resultados alcanzados, se puede sugerir lo siguiente:

- 1- La activación de la microglía induce la producción y liberación al medio de mediadores que inducen muerte programada de células de la línea neuronal SH-SY5Y (Figuras IX. 1 y IX.2).
- 2- Empleando otro modelo de inflamación, se pudo advertir que la activación de macrófagos también causa un efecto proapoptótico en cultivos SH-SY5Y (Figuras IX.3 y IX.4).
- 3- La Epo presenta una acción protectora en células SH-SY5Y expuestas a un ambiente proinflamatorio causado por la activación de células de microglía o bien de macrófagos (Figuras X.1; X.2; X.3 y X.4).
- 4- Medios condicionados de cultivos de células de microglía EOC-2 pretratados con Epo y luego expuestos a hipoxia química no inducen muerte neuronal en cultivos SH-SY5Y (Figura X.5).

La inflamación es un evento importante que puede causar muerte neuronal. Ha sido reportado que la activación de la microglía media la muerte neuronal, en parte por la inducción de iNOS y la subsecuente liberación de NO al medio (Lipton, 2009; Shavali *et al*, 2006). En este trabajo de Tesis hemos demostrado que la activación de la microglía por hipoxia química induce la producción de agentes proinflamatorios como nitritos, TNF- $\alpha$  y ROS (Figura VII.1; VII.4).

Por otra parte, se ha reportado que el estrés oxidativo es uno de los principales causantes de la muerte neuronal. Dado esto, resultó interesante estudiar el impacto de la activación de la microglía por hipoxia química sobre la supervivencia de cultivos SH-SY5Y.

Los resultados obtenidos muestran que el medio condicionado de cultivos de células de microglía activada provoca disminución de la viabilidad celular, acompañada del aumento de muerte celular por apoptosis (Figuras IX.1 y IX.2).

Se puede sugerir la participación de NO en este proceso, ya que trata de un inhibidor competitivo de la enzima citocromo oxidasa. Por inhibición de esta enzima, la exposición a elevadas concentraciones de NO induce muerte neuronal.

Como hemos observado, durante una respuesta proinflamatoria la microglía produce ROS con el fin de eliminar patógenos (Figura VII.4). A su vez, estos agentes oxidantes pueden presentar una acción neurotóxica (Qin *et al*, 2004; Won *et al*, 2009; Brown *et al*, 2010; Sarsour *et al*, 2011).

De esta manera, la actividad de iNOS y la producción simultánea de ROS resulta en la formación de peroxinitrito, agente altamente tóxico para las neuronas. En relación con esto se ha reportado que tanto la inhibición de iNOS como el uso de *scavengers* de superóxido o peroxinitritos previene la muerte neuronal (Brown *et al*, 2010).

Shavali *et al* (2006) reportaron que la muerte neuronal causada por la activación de la línea RAW 264.7 es mediada por un incremento en los niveles de peroxinitrito. En concordancia con ese hallazgo, en nuestros ensayos observamos un incremento de la muerte neuronal al cultivar las células SH-SY5Y en medio condicionado de cultivos de macrófagos RAW 264.7 activados con LPS+IFN $\gamma$  (Figura X.4).

Resultados previos de nuestro grupo de investigación (Pregi *et al*, 2006; Pregi *et al*, 2009), así como los mostrados en secciones anteriores del presente trabajo (Figuras II.1-II.5 y VI.1) demostraron la acción antiapoptótica de la Epo en cultivos SH-SY5Y. Dado esto y habiendo demostrado una acción antioxidante de dicha citoquina (Figura VIII.6), resultó interesante estudiar si la Epo era capaz de mostrar un efecto protector frente a un ambiente proinflamatorio.

Como se pudo observar, la Epo previene la muerte de células SH-SY5Y causada por los medios condicionados, obtenidos tanto de cultivos de microglía (EOC-2) como de macrófagos (RAW) en estado activado (Figuras X.1; X.2; X.3).

Según lo observado previamente y reportado también por otros autores, la Epo presentaría una acción citoprotectora mediante la activación de las vías PI3K y JAK-2, así como también una regulación positiva de los factores antiapoptóticos Bcl-2 y Bcl-xL (Pregi *et al*, 2009; Wenker *et al*, 2010). Por otro lado, se ha demostrado que la Epo presenta una acción antioxidante. En este trabajo se ha demostrado, además, que la Epo previene la producción de ROS en cultivos de microglía EOC-2.

Se ha sugerido como terapia protectora la implementación de compuestos antioxidantes con el fin de prevenir la producción de especies reactivas derivadas del NO, las cuales presentan capacidad neurotóxica (Brown *et al*, 2010). En este contexto, los ensayos con medios condicionados obtenidos de células EOC-2 previamente tratadas con Epo para luego ser expuestas a hipoxia no inducen muerte celular de cultivos SH-SY5Y (Figura X.5). De esta manera, se puede sugerir que además de los mecanismos de protección mencionados antes, la acción antioxidante de la Epo sobre los cultivos EOC-2 podría prevenir la producción de radicales libres derivados del NO.

En relación con esto, se ha reportado que la enzima NADPH oxidasa, involucrada en la producción de ROS, se induce cuando la microglía está activa (Brown *et al*, 2010). A su vez, en modelos *in vivo*, se observó que la administración de Epo disminuye la expresión y la activación de NADPH oxidasa a nivel del riñón, sugiriéndose así otra vía por la cual dicha citoquina presentaría una acción antioxidante (Toba *et al*, 2009).

Por otra parte, la Epo podría modular otros factores como se ha sugerido en la línea de microglía N9, donde la Epo modula la expresión de factores tróficos, los cuales pueden cumplir una función de relevancia sobre la supervivencia neuronal (Kuralay *et al*, 2008).

En resumen, los resultados que se muestran en este trabajo sugieren que la Epo presenta un efecto neuroprotector ante la exposición a un ambiente proinflamatorio. Es interesante resaltar que dicha acción de este factor puede constituir un importante potencial terapéutico.



## **CONCLUSIONES FINALES**

---

## Conclusiones finales

---

El hallazgo de la expresión de receptores específicos de Epo en tejidos no hematopoyéticos motivó la expansión del estudio de su fisiología. En particular, el objetivo principal de este trabajo ha sido enfocado al estudio de la acción neuroprotectora de la Epo.

Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que la Epo presenta un efecto protector sobre células de origen neuronal frente a apoptosis inducida por staurosporina y TNF- $\alpha$ . En este contexto, se decidió ampliar este estudio en cultivos de células neuronales SH-SY5Y expuestos a condiciones de hipoxia. La deficiencia de oxígeno es un factor de estrés que induce múltiples respuestas. A nivel celular, la exposición a hipoxia puede inducir una desregulación metabólica con pérdida de la homeostasis y muerte celular. En el adulto, la hipoxia cerebral severa puede causar pérdida del habla, ceguera y parálisis, mientras que la hipoxia prenatal puede originar retraso mental, encefalopatía hipóxica isquémica, entre otras condiciones patológicas. Los resultados presentes muestran alteraciones morfológicas, tales como disminución de la neuritogénesis y pérdida de la adhesión celular en cultivos indiferenciados, además del aumento de apoptosis por exposición a hipoxia. La prevención de estos efectos por Epo se debería, al menos en parte, a un incremento en los niveles de los factores antiapoptóticos Bcl-2 y Bcl-xL.

Actualmente, se reconoce que los mecanismos de muerte celular son marcadamente diferentes en el cerebro inmaduro en desarrollo por lo que, en el paso siguiente, se realizó una comparación de la acción de Epo entre cultivos de origen neuronal en estadio indiferenciado y diferenciado. Los resultados obtenidos permiten sugerir que la diferenciación celular mediada por el agente diferenciador ácido retinoico aumenta el umbral de resistencia celular ante diferentes agentes proapoptóticos. La regulación positiva del factor antiapoptótico Bcl-2, explicaría parcialmente la disminución de la susceptibilidad celular. Además, se observó que los cultivos maduros son resistentes al tratamiento con Epo, sin detectarse efecto protector frente a la exposición a staurosporina. Esto coincide con la ausencia de modulación de los factores Bcl-2 y Bcl-xL por Epo. La modulación negativa de la

expresión del receptor de Epo, inducida durante la diferenciación celular, afectaría la acción de Epo en un ambiente de hipoxia.

La inflamación es una respuesta de defensa ante diversas injurias, como la respuesta autoinmune y los procesos de infección. Este proceso también se encuentra involucrado de manera crónica en enfermedades neurodegenerativas como también en procesos de hipoxia e isquemia cerebral. Se sabe que, en procesos neurodegenerativos y accidentes cerebrovasculares, el desarrollo de un microambiente pro-inflamatorio generado por la activación de la glía representa uno de los principales efectores de muerte neuronal. De esta manera, la inflamación es capaz de causar muerte neuronal, incrementando así el cuadro de inflamación.

Dado que diferentes modelos experimentales han sugerido un efecto antiinflamatorio de la Epo, el próximo objetivo de este trabajo fue investigar si la Epo presenta un efecto modulador en cultivos de microglía y si la presencia de esta citoquina puede proteger a las células neuronales en un ambiente inflamatorio. No se observó un efecto antiinflamatorio clásico por parte de Epo ante la activación de células de microglía EOC-2 por hipoxia dado que induce *per se* el aumento de los niveles de iNOS, enzima involucrada en la síntesis de NO. Sin embargo, si bien la Epo no previno el incremento de nitritos ni de TNF- $\alpha$  ante la estimulación por hipoxia química, sí fue capaz de presentar una acción antioxidante y antiproliferativa.

Finalmente, el efecto neuroprotector de Epo también fue evidente en modelos de interacción microglía-neurona. Esta acción citoprotectora fue observada en cultivos de células neuronales SH-SY5Y expuestas a medios condicionados obtenidos, tanto a partir de cultivos de microglía estimulados por hipoxia química como de cultivos de macrófagos (células RAW) estimulados con LPS+IFN $\gamma$ .

En conclusión, el diseño experimental de modelos *in vitro* utilizado en este trabajo permitió ampliar el conocimiento acerca de la acción neuroprotectora de la Epo, objetivo principal de este trabajo. Los resultados aportan nuevos datos sobre la acción de la Epo sobre células neuronales y de microglía. Por un lado, la Epo mostró acción neuroprotectora ante el daño

directo inducido en células indiferenciadas por diversos agentes proapoptóticos como también ante un ambiente proinflamatorio inducido por la activación, tanto de células de microglía como de macrófagos.

Por otro lado, se puede sugerir que, si bien la Epo en las condiciones empleadas no presentó una acción antiinflamatoria clásica sobre la microglia, sus efectos antioxidante y antiproliferativo podrían atenuar la activación de la microglía y, de esta forma, contribuir a prevenir el desarrollo de un cuadro proinflamatorio mayor, disminuyendo el riesgo de la aparición de efectos perjudiciales para el sistema nervioso.

Desde su descubrimiento, el factor humoral eritropoyetina ha despertado la curiosidad de los hematólogos, pero ese interés se amplió a la clínica general cuando se demostró la acción de esta citoquina sobre tejidos no hematopoyéticos.

En este contexto, se espera que los datos provistos en el presente trabajo, en cuanto ayudan a explicar la acción neuroprotectora de la eritropoyetina frente al daño inducido por hipoxia, aporten información útil para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

## **REFERENCIAS**

---

**REFERENCIAS**

---

1. Ahmet H. Erythropoietin and the Nervous System. Berlin: Springer. ISBN 0-387-30010-4. 2005.
2. Alaimo A, Gorjod RM, Kotler ML. The extrinsic and intrinsic apoptotic pathways are involved in manganese toxicity in rat astrocytoma C6 cells. *Neurochem Int* 59:297-308. 2011.
3. An, W.G., Kanekal, M., Simon, M.C., Maltepe, E., Blagosklonny, M.V., Neckers, L.M. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature* 26;392:405-8, 1998
4. Arcasoy M, Jiang X, Haroon Z. Expression of Erythropoietin receptor splice variants in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 307:999-1007, 2003.
5. Ayako Y, Shigeo Y, Ahmad KK, Tatsuro I, Hajime I. Role of NF-KB-Mediated Interleukin-8 Expression in Intraocular Neovascularization. *Investigative Ophthalmol Visual Sci* 39:7, 1998.
6. Baig S, Patel Y, Coussons P, Grant R. Erythropoietin and interleukin-1b modulate nitrite production in a Swiss 3T3 cell model of rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochem Soc Trans* 30:6, 2002.
7. Beleslin-Čokić BB, Cokić VP, Wang L, Piknova B, Teng R, Schechter AN, Noguchi CT. Erythropoietin and hypoxia increase erythropoietin receptor and nitric oxide levels in lung microvascular endothelial cells. *Cytokine*. 54:129-35, 2011.
8. Benito A, Silva M, Grillot D, Nuñez G, Fernandez-Luna JL. Apoptosis induced by erythroid differentiation of human leukemia cell lines is inhibited by Bcl-xL. *Blood* 87:3837–3843, 1996.
9. Benn S, Woolf C. Adult neuron survival strategies – Slamming on the brakes. *Nature Rev* 5:686-700, 2004.
10. Block ML., Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* 76:77-98, 2005.
11. Brown GC., Neher JJ. Inflammatory Neurodegeneration and Mechanisms of Microglial Killing of Neurons. *Mol Neurobiol* 41:242-247, 2010.
12. Blomgren K, Hagberg H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. *Free Radic Biol Med* 40:388-397. 2006.

13. Budd SL, Tennesi L, Lishnak T, Lipton SA. Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci* 97:6161-6166, 2000.
14. Buemi M, Cavallaro E, Floccari F, Sturiale A, Aloisi C, Trimarchi M, Grasso G, Corica F, Frisinas N. Erythropoietin and the brain: From neurodevelopment to neuroprotection. *Clin Sci* 103:275–282, 2002.
15. Burger D, Xiang F, Hammoud L, Lu X, Feng Q. Role of heme oxygenase-1 in the cardioprotective effects of erythropoietin during myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296:H84-93, 2009.
16. Byts N, Sirén AL. Erythropoietin: a multimodal neuroprotective agent. *Exp Transl Stroke Med* 21:1-4, 2009.
17. Byts N, Samoylenko A, Fasshauer T, Ivanisevic M, Hennighausen L, Ehrenreich H, Sirén AL. Essential role for Stat5 in the neurotrophic but not in the neuroprotective effect of erythropoietin. *Cell Death Differ* 15:783-792, Epub 2008.
18. Calò LA, Davis PA, Piccoli A, Pessina AC. A role for heme oxygenase-1 in the antioxidant and antiapoptotic effects of erythropoietin: the start of a good news/bad news story? *Nephron Physiol* 103:107-111, 2006.
19. Carnot P, Deflandre C. Sur l'activité hémo-poie'tique du sérum au cours de la régénération du sang. *C R Acad Sci Paris* 143:384–386, 1906.
20. Chambers VC, Weiser RS. The ultrastructure of sarcoma I cells and immune macrophages during their interaction in the peritoneal cavities of immune C57BL-6 mice. *Cancer Res* 32:413-419.1972
21. Cheung YT, Lau WK, Yu MS, Lai CS, Yeung SC, So KF, et al. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology* 30:127-135, 2009.
22. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin fosters both intrinsic and extrinsic neuronal protection through modulation of microglia, Akt1, Bad, and caspase-mediated pathways. *Br J Pharmacol* 138:1107-1118, 2003.
23. Choi WH, Ji KA, Jeon SB, Yang MS, Kim H, Min KJ, Shong M, Jou I, Joe EH. Anti-inflammatory roles of retinoic acid in rat brain astrocytes: Suppression of

- interferon-gamma-induced JAK/STAT phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 329:125–131, 2005.
24. Cui S, Reichner JS, Mateo RB, Albina JE. Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms. *Cancer Res* 54:2462-2467, 1994.
  25. Davis J, Arakawa T, Strikland TW, Yphantis DA. Characterization of recombinant human erythropoietin produced in chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* 26:2638-2641, 1987.
  26. Day R, Suzuki Y. Cell Proliferation, Reactive Oxygen and Cellular Glutathione. *Dose Response* 3:425–442, 2005.
  27. Dean E. Apoptosis in Neurodegeneration: Programmed Cell Death and its Role in Alzheimer's and Huntington's Diseases. *Eukaryon* Vol. 4, 2008.
  28. Donovan M, Cotter T. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta* 1644:133-147, 2004.
  29. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35: 495–516, 2007.
  30. Ellis JA, Lairmore MD, O'Toole DT, Campos M. Differential induction of tumor necrosis factor alpha in ovine pulmonary alveolar macrophages following infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Pasteurella haemolytica*, or lentiviruses. *Infect Immun* 59:3254-3260, 1991.
  31. Ellis, R.E., Yuan, J. and Horvitz, R. Mechanisms and functions of cell death. *Ann Rev Cell Biol* 7:663-698, 1991.
  32. Erslev AJ. In vitro production of erythropoietin by kidneys perfused with a serum-free solution. *Blood* 44:77-85, 1974.
  33. Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. *N Engl J Med* 316:73–78, 1987.
  34. Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med* 228:1-14, 2003.



35. Fratelli M, Gagliardini V, Galli G, Gnocchi P, Ghiara P, Ghezzi P. Autocrine interleukin-1 beta regulates both proliferation and apoptosis in EL4-6.1 thymoma cells. *Blood* 85:3532-3537, 1995.
36. Genc S, Koroglu TF, Genc K. Erythropoietin as a novel neuroprotectant. *Restor Neurol Neurosci* 22:105-119, 2004.
37. Ghezzi P, Brines M. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death Diff* 11:S37-S44, 2004.
38. Gibbons HM, Dragunow M. Microglia induce neural cell death via a proximity-dependent mechanism involving nitric oxide. *Brain Res* 1084:1-15, 2006.
39. Hail N, Carter B, Konopleva M, Andreeff M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. *Apoptosis* 11:889-904, 2006.
40. Hartmann A, Kunz M, Kostlin S, Gillitzer R, Toksoy A, Brocker E, Eberhard K. Hypoxia-induced Up-Regulation of Angiogenin in Human Malignant Melanoma. *Cancer Res* 59:1578-1583, 1999.
41. Hojman P, Taudorf S, Lundby C, Klarlund Pedersen B. Erythropoietin augments the cytokine response to acute endotoxin-induced inflammation in humans. *Cytokine* 45:154-157, 2009.
42. Imhof A, Heinzer I. Continuous Monitoring of Oxygen Concentrations in Several Systems for Cultivation of Anaerobic Bacteria. *J Clin Microb* p. 1646-1648, 1996.
43. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GM. Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Genes Dev* 12: 149-162, 1998.
44. Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudesdorf, R., Neill, S.D., Kaufman, R.J., Mufson, A., Seehra, J., Jonwes, S.S., Hewick, R., Fritsch, E.F., Kawakita, M., Shimizu, T., Mikaye, T. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*. 313: 806-809, 1985.
45. Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* 43:649-59. 2004.
46. Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol* 78:183-205, 2007.

47. Johnson B.W, Cepero E, Boise L.H. Bcl-Xl inhibits cytochrome C release but not mitochondrial depolarization during the activation of multiple death pathways by Tumor Necrosis Factor Alpha. *J Biol Chem* 275:31546-31553, 2000.
48. Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakajima W. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res* 49:735-41, 2001.
49. Kalcheva N, Albala J, O'Guin K, Rubino H, Garner C, Shafit-Zagardo B. Genomic structure of human microtubule-associated protein 2 (MAP-2) and characterization of additional MAP-2 isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:10894–10898, 1995.
50. Kapur R, Zhang L. A novel mechanism of cooperation between c-Kit and erythropoietin receptor. Stem cell factor induces the expression of Stat5 and erythropoietin receptor, resulting in efficient proliferation and survival by erythropoietin. *J Biol Chem*. 12;276:1099-106, 2001.
51. Kaur C, Ling EA. Antioxidants and neuroprotection in the adult and developing central nervous system. *Curr Med Chem* 15:3068-3080, 2008.
52. Keller R, Geiges M, Keist R. L-arginine-dependent reactive nitrogen intermediates as mediators of tumor cell killing by activated macrophages. *Cancer Res*50:1421-1425. 1990.
53. Kim JY, Kim TH, Kim SS. Anti-inflammatory effect of a human prothrombin fragment-2-derived peptide, NSA9, in EOC2 microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 368:779–785, 2008.
54. Koury MJ, Sawyer ST, Brandt SJ. New insights into erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 9:93-100, 2002.
55. Kumar S, Cakouros D. Transcriptional control of the core cell-death machinery. *Biochem Sci* 29:193-199, 2004.
56. Kuralay F, Bingol Çakiri B, Genç S. The Effect of Erythropoietin on Neurotrophic Factors in N9 Murine Microglial Cells. *Turk J Med Sci*. 38: 519-524, 2008.
57. Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Kirima K, Suzaki Y, Abe S, Hasegawa T, Tamaki T. Antioxidants inhibit endothelin-1 (1-31)-induced proliferation of vascular smooth muscle cells via the inhibition of mitogen-activated protein (MAP) kinase and activator protein-1 (AP-1). *Biochem Pharmacol* 15;64:1521-1531, 2002.

58. Labbaye C, Valtieri M, Barberi T, Meccia E, Masella B, Pelosi E, Condorelli GL, Testa U, Peschle C. Differential expression and functional role of GATA-2, NF-E2, and GATA-1 in normal adult hematopoiesis. *J Clin Invest* 95:2346–2358, 1995.
59. Lacombe C, Mayeux P. Biology of erythropoietin. *Haematologica*. 83:724-32, 1998.
60. Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, Fournier JG, Wendling F, Casadevall N, Camilleri JP, Bariety J, Varet B, Tambourin P. Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J Clin Invest* 81:620-623, 1988.
61. Lee ST, Chu K, Sinn DI, Jung KH, Kim EH, Kim SJ, Kim JM, Ko SY, Kim M, Roh JK.. Erythropoietin reduces perihematoma inflammation and cell death with eNOS and STAT3 activations in experimental intracerebral hemorrhage. *J Neurochem* 96:1728-1739, 2006.
62. Lewis CE, McGee JO. *The macrophage*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom. 1992.
63. Li F, Chong ZZ, Maiese K. Microglial integrity is maintained by erythropoietin through integration of Akt and its substrates of glycogen synthase kinase-3beta, beta-catenin, and nuclear factor-kappaB. *Curr Neurovasc Res* 3:187-201, 2006.
64. Li L, Takemura G, Li Y, Miyata S, Esaki M, Okada H, Kanamori H, Khai NC, Maruyama R, Ogino A, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Preventive effect of erythropoietin on cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Circulation*. 31;113:535-43, 2006.
65. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82:7580–7584, 1985.
66. Lifshitz Lilach, Tabak Galit, Mittelman Moshe, Gassmann Max, Neumann Drorit. Macrophages as novel targets for erythropoietin. *Haematologica*. 95:1823-1831, 2010.
67. López E, Ferrer I. Staurosporine- and H-7-induced cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells is associated with caspase-2 and caspase-3 activation, but not with activation of the FAS/FAS-L-caspase-8 signaling pathway. *Brain Res Mol Brain Res* 85:61-67, 2000.

68. Lopez-Carballo G, Moreno L, Masiá S, Perez P, Baretino D. Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway by Retinoic Acid Is Required for Neural Differentiation of SH- SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *J Biol Chem.* 277:297–304, 2002.
69. Lorenz M, Slaughter HS, Wescott DM, Carter SI, Schnyder B, Dinchuk JE, Car BD. Cyclooxygenase-2 is essential for normal recovery from 5-fluorouracil-induced myelotoxicity in mice. *Exp Hematol* 27:1494-502, 1999.
70. Lowry OH. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-275, 1951.
71. Lu Dah-Yuu, Liou Houn-Chi, Tang Chih-Hsin, Fu Wen-Mei. Hypoxia-induced iNOS expression in microglia is regulated by the PI3-kinase/Akt/mTOR signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1a. *Biochemical pharmacology.* 72:992 – 1000, 2006.
72. Maiese K, Hou J, Chong ZZ, Shang YC. Erythropoietin, forkhead proteins, and oxidative injury: biomarkers and biology. *Scientific World Journal* 9:1072-104, 2009.
73. Maiese K, Chong ZZ, Shang YC.. Raves and risks for erythropoietin. *Cytokine Growth Factor Rev* 19:145-55, 2008.
74. Maiese K, Chong ZZ, Li F, Shang YC. Erythropoietin: elucidating new cellular targets that broaden therapeutic strategies. *Prog Neurobiol* 85:194-213, 2008.
75. Mander P, Jekabsone A, Brown GC. Microglia Proliferation Is Regulated by Hydrogen Peroxide from NADPH Oxidase. *The Journal of Immunology.* 176:1046-52, 2006.
76. Mander P, Borutaite V, Moncada S, Brown GC. Nitric oxide from inflammatory-activated glia synergizes with hypoxia to induce neuronal death. *Journal of Neuroscience Research.* 79:208 –215, 2005.
77. Martin JH, Edwards SW. Changes in mechanisms of monocyte/macrophage-mediated cytotoxicity during culture. Reactive oxygen intermediates are involved in monocyte-mediated cytotoxicity, whereas reactive nitrogen intermediates are employed by macrophages in tumor cell killing. *J Immunol.* 15;150(8 Pt 1):3478-86. 1993.

78. Mazur M, Miller RH, Robinson S. Postnatal erythropoietin treatment mitigates neural cell loss after systemic prenatal hypoxic-ischemic injury. *J Neurosurg Pediatr* 6:206-221, 2010.
79. McPherson R, Juul S. Recent trends in erythropoietin-mediated neuroprotection. *Int. J. Devl Neuroscience* 26:103–111, 2007.
80. McKinney M, Robbins M. Chronic atropine administration up-regulates rat cortical muscarinic m1 receptor mRNA molecules: Assessment with the RT/PCR. *Brain Res Mol Res* 12:39–45, 1992.
81. Messmer UK, Ankarcona M, Nicotera P, Brüne B. p53 expression in nitric oxide-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 355:23-26, 1994.
82. Miyake T, Kung, CK, Goldwasser, E. Purification of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 252:5558–5564, 1997.
83. Montzka K, Lassonczyk N, Tschöke B, Neuss S, Führmann T, Franzen R, Smeets R, Brook GA, Wöltje M. Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: misleading marker gene expression. *BMC Neurosci* 3:10-16, 2009.
84. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55, 1983.
85. Munn DH, Pressey J, Beall AC, Hudes R, Alderson MR. Selective activation-induced apoptosis of peripheral T cells imposed by macrophages. A potential mechanism of antigen-specific peripheral lymphocyte deletion. *J Immunol* 156:523-32. 1996.
86. Noguchi CT, Asavaritikrai P, Teng R, Jia Y. Role of erythropoietin in the brain. *Crit Rev Oncol Hematol* 64:159-71, 2007.
87. Omura S, Tanaka H, Oiwa R, Awaya J, Masuma R, Tanaka K. New antitumor antibiotics, OS-4742 A1, A2, B1 and B2 produced by a strain of *Streptomyces*. *J Antibiot.* 30:908-916, 1977.
88. Onozaki K, Matsushima K, Kleinerman ES, Saito T, Oppenheim JJ. Role of interleukin 1 in promoting human monocyte-mediated tumor cytotoxicity. *J Immunol* 135:314-320. 1985.
89. Osmond et al., D.G. Osmond, S. Rico-Vargas, H. Valenzona, L. Fauteux, L. Liu, R. Janani, L. Lu and K. Jacobsen, Apoptosis and macrophage-mediated cell deletion in

- the regulation of B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *Immunol. Rev* 142:208–230, 1994.
90. Ovbiagele B, Saver JL, Fredieu A, Suzuki S, McNair N, Dandekar A, Razinia T, Kidwell CS. PROTECT: a coordinated stroke treatment program to prevent recurrent thromboembolic events. *Neurology* 63:1217-1222. 2004
  91. Paschos N, Lykissas M, Beris A. The Role of Erythropoietin as an Inhibitor of Tissue Ischemia. *Int J Biol Sci* 4:161-168, 2008.
  92. Peri G, Chiaffarino F, Bernasconi S, Padura IM, Mantovani A. Cytotoxicity of activated monocytes on endothelial cells. *J Immunol* 144:1444-1448, 1990.
  93. Phillips HJ y Terryberry JE. Counting actively metabolizing tissue cultured cells. *Exp Cell Res* 13:341-347, 1957.
  94. Pregi N, Vittori D, Perez G, Perez Leiros C, Nesse A. Effect of erythropoietin on staurosporine-induced apoptosis and differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1763:238–246, 2006.
  95. Pregi N, Wenker S, Vittori D, Perez Leiros C, Nesse A. TNF-alpha induced apoptosis is prevented by erythropoietin treatment on SH-SY5Y cells. *Exp Cell Res* 315:419–431, 2009.
  96. Presgraves SP, Ahmed T, Borwege S, Joyce JN. Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotox Res* 5: 579-598, 2004.
  97. Prince JA, Orelan L. Staurosporine differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cultures exhibit transient apoptosis and trophic factor independence. *Brain Res Bull* 43:515–523, 1997.
  98. Powell, J.S. Human erythropoietin gene: high level expression in stably transfected mammalian cells and chromosome localization. *Proc. Natl. Acad Sci* 83:6465-6469, 1986.
  99. Raguenez G, Desire L, Lantrua V, Courtois Y. Bcl-2 is upregulated in human SH-SY5Y neuroblastoma cells differentiated by overexpression of Fibroblast Growth factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 258:745-751, 1999.

100. Ross ME. Cell division and the nervous system: regulating the cycle from neural differentiation to death. *Trends Neurosci* 19:62-8, 1996.
101. Rossert J, Eckardt K. Erythropoietin receptors: their role beyond erythropoiesis. *Nephrol Dial Transpl* 20:1025-1028, 2005.
102. Ryuto Masahiro, Ono Mayumi, Izumi Hiroto, Yoshida Shigeo, Weich Herbert A., Kohno Kimitoshi, Kuwano Michihiko. Induction of Vascular Endothelial Growth Factor by Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  in Human Glioma Cells. *J Biol Chem* 45:28220–28228, 1996.
103. Sato N, Ueno T, Kubo K, Suzuki T, Tsukimura N, Att W, Yamada M, Hori N, Maeda H, Ogawa T. N-Acetyl cysteine (NAC) inhibits proliferation, collagen gene transcription, and redox stress in rat palatal mucosal cells. *Dent Mater* 25:1532-1540. 2009.
104. Shavali S, Combs CK, Ebadi M. Reactive macrophages increase oxidative stress and alpha-synuclein nitration during death of dopaminergic neuronal cells in co-culture: relevance to Parkinson's disease. *Neurochem Res* 31:85-94. 2006.
105. Sirén AL, Fasshauer T, Bartels C, Ehrenreich H. Therapeutic potential of erythropoietin and its structural or functional variants in the nervous system. *Neurotherapeutics* 6:108-127, 2009.
106. Sola A, Rogido M, Lee BH, Genetta T, Wen TC. Erythropoietin alter focal cerebral ischemia activates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway and improves brain injury in postnatal day 7 rats. *Pediatr Res* 57:481–487, 2005.
107. Stolze I, Berchner-Pfannschmidt U, Freitag P, Wotzlaw C, et al. Hypoxia-inducible erythropoietin gene expression in human neuroblastoma cells. *Blood* 100:2623-2628, 2002.
108. Sun Y, Calvert JW, Zhang JH. Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration. *Stroke* 36:1672-1678, 2005.
109. Sweet MJ, Hume DA. Endotoxin signal transduction in macrophages. *J Leukoc Biol* 60:8-26, 1996.

110. Testa U. Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia* 18:1176–1199, 2004.
111. Tieu K, Zuo DM, Yu PH. Differential effects of staurosporine and retinoic acid on the vulnerability of the SH-SY5Y neuroblastoma cells: involvement of Bcl-2 and p53 proteins. *J Neurosci Res* 58:426-435, 1999.
112. Turrin NP, Rivest S. Molecular and cellular immune mediators of neuroprotection. *Mol Neurobiol* 34:221-42, 2006.
113. Um M, Lodish HF. Antiapoptotic effects of erythropoietin in differentiated neuroblastoma SH-SY5Y cells require activation of both the STAT5 and AKT signalling pathways. *J Biol Chem* 281:5648–5656, 2006.
114. Vairano M, Dello Russo C, Pozzoli G, Battaglia A, Scambia G, Tringali G, Aloe-Spiriti MA, Preziosi P, Navarra P. Erythropoietin exerts anti-apoptotic effects on rat microglial cells in vitro. *Eur J Neurosci* 16:584-92, 2002.
115. Van der Kooij MA, Groenendaal F, Kavelaars A, Heijnen CJ, van Bel F. Neuroprotective properties and mechanisms of erythropoietin in in vitro and in vivo experimental models for hypoxia/ischemia. *Brain Res Rev* 59:22-33, 2008.
116. Vannucci S, Hagberg H. Hypoxia–ischemia in the immature brain. *J Exper Biol* 207:3149, 2004.
117. Vittori D, Pregi N, Pérez G, Garbossa G, Nesse A. The distinct erythropoietin functions that promote cell survival and proliferation are affected by aluminum exposure through mechanisms involving erythropoietin receptor. *Biochim Biophys Acta* 1743:29-36, 2005.
118. Wallach I, Zhang J, Hartmann A, van Landeghem FK, Ivanova A, Klar M, Dame C. Erythropoietin-Receptor Gene Regulation in Neuronal Cells. *Pediatric Res* 65:619-624, 2009.
119. Wang FF, Kung CK, Goldwasser E: Some chemical properties of human erythropoietin. *Endocrinology*. 116:2286–2292, 1985.
120. Wang Zhao-yang, Shen Li-jun, Tu LiLi, Hu Dan-ning, Liu Guo-Ying, Zhou Zhong-lou, Lin Yi, Chen Lin-Hua, Qu Jia. Erythropoietin protects retinal pigment epithelial cells from oxidative damage. *Free Radical Biol Med* 46: 1032–1041, 2009.



121. Wen D, Boissel JP, Showers M, Ruch BC, Bunn HF. Erythropoietin structure-function relationships. Identification of functionally important domains. *J Biol Chem* 269:22839-22846, 1994.
122. Wenker, Pregi N, Vittori D, Nesse A. Efecto antiapoptotico de eritropoietina en celulas neuronales inducidas a diferenciación. *Medicina*. 67, suppl.III, pág. 148, 2007 (resumen).
123. Wenker S, Chamorro ME, Vota DM, Vittori D, Nesse A. Neuroprotective action of erythropoietin against cell death induced by hypoxia on SH-SY5Y cells. I Congress IBRO/LARC of Neurosciences for Latin America, Caribbean and Iberian Peninsula. Buzios, RJ. Brasil, 2008.
124. Wenker SD, Chamorro ME, Vota DM, Callero MA, Vittori DC, Nesse AB. Differential antiapoptotic effect of erythropoietin on undifferentiated and retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells. *J Cell Biochem* 110:151-161, 2010.
125. Wilms H, Schwabedissen B, Sievers J, Lucius R. Erythropoietin does not attenuate cytokine production and inflammation in microglia--implications for the neuroprotective effect of erythropoietin in neurological diseases. *J Neuroimmunol*. 212:106-111, 2009.
126. Wu Y, Shang Y, Sun S, Liu R. Antioxidant effect of erythropoietin on 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Eur J Pharmacol* 564:47-56, 2007.
127. Wu J, Tan X, Peng X, Yuan J, Qiang B. Translocation and phosphorylation of calyculin binding protein during retinoic acid-induced neuronal differentiation of neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Biochem Mol Biol* 36:354-358, 2003.
128. Xie HR, Hu LS, Li GY. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl)*. 123:1086-1092, 2010.
129. Yuste V, Sanchez-Lopez I, Sole C, Encinas M, Bayascas J, Boix J, Comella J. The prevention of the staurosporine-induced apoptosis by Bcl-xL, but not by Bcl-2 or caspase inhibitors, allows the extensive differentiation of human neuroblastoma cells. *J Neurochem* 80:126-139, 2002.

130. Zhao W, Kitidis C, Fleming M, Lodish H, Ghaffari S. Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood* 107: 907-915, 2006.
131. Zheng, L., G. Fisher, R. E. Miller, J. Peschon, D. H. Lynch and M. J. Lenardo. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 377:348–351. 1995.
132. Zhu Y, Bickford PC, Sanberg P, Giunta B, Tan J. Blueberry opposes beta-amyloid peptide-induced microglial activation via inhibition of p44/42 mitogen-activation protein kinase. *Rejuvenation Res* 11:891-901, 2008