



**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Buenos Aires, 2016**

**LA MIELINOGENESIS: ACCIÓN CONCERTADA DE LA  
TRANSFERRINA Y LA HORMONAS TIROIDEAS.**

Leandro Nazareno Marziali

**Directora de Tesis:** Juana M. Pasquini

**Directora Adjunta:** Corina I. Garcia

**Lugar de Trabajo:** Cátedra de Química Biológica Patológica. Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires- Instituto de Química y Físicoquímica Biológica (IQUIFIB-CONICET)

**Buenos Aires, 2016.**

## RESUMEN

En el sistema nervioso central (SNC) la Transferrina (Tf) y las Hormonas Tiroideas (HTs) favorecen la maduración de los oligodendrocitos (OLGs) y la mielinización. Resultados de nuestro laboratorio sugirieron que la Tf y las HTs, regularían en forma conjunta dichos procesos debido a que las HTs modulan la expresión de la Tf mientras que esta última tendría efecto sobre la expresión del receptor  $\alpha$  de las HTs (TR $\alpha$ ). Para dilucidar este potencial mecanismo de interacción realizamos experimentos *in vivo* en los que evaluamos la influencia combinada de la Tf y las HTs sobre la mielinización así como sobre los receptores de las HTs (TRs). Posteriormente utilizamos células progenitoras neurales (CPNs) y analizamos la acción de ambos factores en forma conjunta o individualmente sobre la maduración oligodendrogial.

Nuestros resultados *in vivo*, sugirieron que tanto la apoTransferrina (aTf) como las HTs ejercían efectos positivos individuales sobre la mielinización. Asimismo, las HTs regularon la expresión de la Tf durante las primeras dos semanas de vida y existió una interacción entre ambos factores a nivel de los TRs debido a que las HTs regularon la expresión del TR $\beta$  mientras que la Tf reguló la expresión del TR $\alpha$ .

Los experimentos *in vitro* revelaron que el silenciamiento de la expresión de la Tf condujo a una disminución de la maduración oligodendrogial. Bajo estas condiciones se observó una pérdida parcial de la capacidad de las HTs de favorecer la maduración oligodendrogial conjuntamente con la disminución de la expresión del TR $\alpha$ , efecto que se revierte por la adición de apoTf. La inhibición farmacológica del TR $\alpha$  también condujo a la disminución de la maduración oligodendrogial y además bloqueó parcialmente la capacidad de la aTf de promover la diferenciación de los OLGs. El tratamiento de las CPNs con HTs indujo la expresión del TR $\beta$  y el incremento prematuro de la expresión de la Tf el cual es abolido por la inhibición del TR $\alpha$ .

Estos hallazgos indicaron que las acciones combinadas de la Tf y las HTs son necesarias para que ocurran una adecuada maduración oligodendrogial y mielinización. Estos efectos serían consecuencia de la interacción entre los efectos de la Tf y las HTs que asegurarían la progresión del plan de maduración de los OLGs. En concordancia con la anterior hipótesis, nuestros resultados demostraron que las HTs son capaces de regular la expresión de la Tf, la que a su vez ejerció efectos positivos sobre la maduración oligodendrogial y aumentó la

expresión del TR $\alpha$  conformando un circuito de retroalimentación, que sumado a los efectos de las HTs mediados por el TR $\beta$  aseguraron que ocurra una adecuada maduración oligodendroglial.

**Palabras clave:** Oligodendrocito, Mielina, Transferrina, Hormonas Tiroideas, Receptores de las Hormonas Tiroideas

## **ABSTRACT**

In the central nervous system (CNS), Transferrin (Tf) and Thyroid Hormones (THs) promoted oligodendrocyte (OLG) maturation and myelination. Results from our laboratory suggested that Tf and THs could act together in the regulation of the above mentioned processes, given that THs modulated Tf expression and Tf might have effects on THs receptor alpha ( $TR\alpha$ ). In order to elucidate this potential interaction mechanism, we performed some *in vivo* experiments to test the combined effects of Tf and THs on myelination and on THs receptors (TRs) expression as well. Additionally, we used neural progenitor cells (NPCs) and analyzed the action of both factors acting together or individually on OLG maturation.

Our *in vivo* results showed that apoTransferrin (aTf) and THs exerted individual positive effects on myelination. Furthermore, THs regulated Tf expression during the first two weeks of life and there was an interaction between both factors involving TRs since THs regulated  $TR\beta$  expression and Tf modulated  $TR\alpha$  expression.

The *in vitro* experiments revealed that when Tf expression is knocked down OLG maturation was limited. Under these circumstances, THs partially promoted OLG maturation and when  $TR\alpha$  was blocked, aTf was able to partially support OLG maturation. Tf knock down decreased  $TR\alpha$  expression while aTf administration induced the contrary. At the same time, the treatment of CPNs with THs induced the increase of  $TR\beta$  expression and a premature increase of Tf expression which was abolished by blocking  $TR\alpha$ .

These findings indicated that the combined actions of Tf and THs are required in order to achieve a proper OLG maturation and myelination; in addition the effects observed are the consequence of the crosstalk between the actions of both factors on OLG maturation. In agreement with this hypothesis, our results demonstrated that THs were capable of regulating Tf expression, which in turns exerted positive effects on OLG maturation and increased  $TR\alpha$  expression as part of a feedback circuit, which together with THs effects mediated by  $TR\beta$  ensured the accomplishment of an adequate OLG maturation and myelination.

**Key words:** Oligodendrocyte, Myelin, Transferrin, Thyroid Hormones, Thyroid Hormones Receptors

Parte de los resultados de esta Tesis han sido presentados en:

“Transferrin and thyroid hormone converge in the control of myelinogenesis” **Marziali**

**LN**, Garcia CI, Pasquini JM. Exp Neurol. **2015** Mar; 265:129-41.

## **ABREVIATURAS**

aTf: apo-Transferrina

bFGF: factor de crecimiento derivado de fibroblastos tipo 2

BMP: proteína morfógena derivada del hueso

CNPasa: la 2',3'-Nucleótido Cíclico 3'-Fosfodiesterasa

CNTF: factor neurotrófico ciliar

EGF: factor de crecimiento derivado del endotelio

GFAP: proteína fibrilar ácida

HTs: hormonas tiroideas (T3 y T4)

IGF-I: factor similar a la insulina tipo 1

KLF9: factor similar a Krüppel 9

MAG: glicoproteína asociada a la mielina

MBP: proteína básica de la mielina

MOG: glicoproteína oligodendroglial de la mielina

Shh: sonic hedgehog

SNC: sistema nervioso central

SNP: sistema nervioso periférico

T3: triyodotironina

T4: tiroxina

Tf: transferrina

TR $\alpha$ : receptor alfa de la hormona tiroidea

TR $\beta$ : receptor beta de la hormona tiroidea

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDGFr $\alpha$ : la subunidad alfa del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas

PLP: proteína del proteolípido

PTU: n-propiltiouracilo

OLG: oligodendrocito

OPC: precursor de oligodendrocito

ZSG: zona subgranular del giro dentado del hipocampo

ZSV: zona subventricular de los ventrículos laterales

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL</b> .....	5
1.1 El desarrollo del sistema nervioso central y sus componentes celulares.....	5
1.2 La maduración del oligodendrocito y sus moduladores .....	13
1.3 La formación de la mielina.....	17
1.4 La estructura y composición de la mielina .....	20
<b>2. LA TRANSFERRINA</b> .....	27
2.1 Generalidades .....	27
2.2 Expresión de la Transferrina en el sistema nervioso central y los oligodendrocitos.....	29
2.3 La Transferrina como factor promotor de la maduración oligodendrogial y la mielinogénesis .....	30
<b>3. LAS HORMONAS TIROIDEAS</b> .....	33
3.1 Generalidades .....	33
3.2 Los Receptores de las Hormonas Tiroideas .....	35
3.3 El metabolismo de las Hormonas Tiroideas en el SNC. ....	38
3.4 Las Hormonas Tiroideas como factores promotores de la maduración oligodendrogial y la mielinogénesis.....	41
<b>OBJETIVOS</b> .....	45
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	47
Materiales .....	47
Animales .....	48

inyección intracraneal de aTf .....	49
Modelo de hipertiroidismo .....	49
Modelo de hipotiroidismo .....	49
Inmunohistoquímica.....	50
Extracción de ARN y RT-PCR .....	51
Extracción de proteínas y western blot: .....	54
Cultivos de Células Precursoras Neurales derivadas de la Zona Subventricular .....	55
Preparación de retrovirus portadores de shARNs .....	56
Silenciamiento de la expresión del ARNm de la Transferrina .....	57
Extracción de ADN y comprobación de la integración del genoma viral en el genoma de la célula huésped.....	58
Inhibición química de los efectos del Receptor $\alpha 1$ de las Hormonas Tiroideas.....	60
Ensayo de MTT.....	60
Inmunocitoquímica .....	61
Análisis estadístico.....	61
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
<b>1. LOS EFECTOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS Y DE LA TRANSFERRINA SOBRE LA MIELINIZACIÓN .....</b>	<b>63</b>
1.1 La Transferrina y las Hormonas Tiroideas favorecen la mielinización: .....	63
1.2 La Transferrina y Las Hormonas Tiroideas: análisis de los mediadores de las Hormonas Tiroideas y la Transferrina. ....	73
1.3 Los efectos pro-mielinogénicos de las Hormonas Tiroideas y la Transferrina son independientes del eje de la Hormona de Crecimiento. ....	80

<b>2. LA INFLUENCIA DE LAS HORMONAS TIROIDEAS Y LA TRANSFERRINA SOBRE LA MADURACIÓN OLIGODENDROGLIAL. EXPERIMENTOS “IN VITRO”:</b>	
.....	82
2.1 Efecto de las Hormonas Tiroideas y la Transferrina sobre la maduración oligodendroglial <i>in vitro</i> . .....	82
2.2 La expresión de la Transferrina y de los mediadores de las Hormonas Tiroideas durante la maduración oligodendroglial <i>in vitro</i> . Efectos de la administración de T3 y aTf. ....	85
<b>3. LA CONVERSACIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS Y LA TRANSFERRINA DURANTE LA MADURACIÓN OLIGODENDROGLIAL. EXPERIMENTOS “IN VITRO”</b> .....	88
3.1 El silenciamiento de la expresión de la Transferrina disminuye la capacidad de madurar de los oligodendrocitos. Efectos compensatorios parciales de las Hormonas Tiroideas. ....	88
3.2 El tratamiento de células progenitoras neurales con un antagonista específico del receptor alfa 1 de las Hormonas Tiroideas disminuye la capacidad de madurar de los oligodendrocitos. Efectos compensatorios parciales de la apoTransferrina.....	98
<b>DISCUSIÓN</b> .....	104
1. Estudios in vivo: la Transferrina y las Hormonas Tiroideas son necesarias para que ocurra una adecuada mielinización. ....	105
2. Estudios in vitro: la Transferrina y las Hormonas Tiroideas son necesarias para que ocurra una adecuada maduración oligodendroglial.....	110
3. El Receptor alfa 1 de las Hormonas Tiroideas como vínculo entre los efectos de la Transferrina y las Hormonas Tiroideas durante la maduración oligodendroglial y la mielinización .....	112
<b>CONCLUSIONES</b> .....	124
1. La Tf y las HTs son necesarias para que ocurra una adecuada mielinización.....	124

2. La Tf y las HTs son necesarias para que ocurra una adecuada maduración oligodendroglial 124

3. Las acciones combinadas de la Tf y las HTs tienen como punto de convergencia al TR $\alpha$ 1 ... 125

**BIBLIOGRAFÍA**..... 127

# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

Hoy en día es frecuente atribuir a Rudolf Virchow el descubrimiento de la glia aunque esto no sea estrictamente correcto dado que lo que Virchow describió no fue lo que hoy en día consideramos glia. Hacia mediados del siglo XIX la concepción reinante respecto de la arquitectura del sistema nervioso señalaba que no existía tejido conectivo en el mismo. Gracias a su actividad como patólogo, Virchow fue capaz de observar que durante los procesos inflamatorios, los ventrículos cerebrales se veían afectados y comenzó a especular que el epitelio ependimal que tapiza los ventrículos era más que un sencillo acúmulo de células epiteliales. Partiendo de esa idea en los años 1856/58 publicó sus hallazgos en los que describió que el tejido conectivo no estaba únicamente por debajo de las células ependimales sino que también se encontraba a lo largo del parénquima cerebral llenando los espacios entre las células nerviosas, sus fibras y además separando al tejido nervioso de los vasos sanguíneos. Dado que el tejido conectivo descrito por Virchow no presentaba similitudes en su consistencia y apariencia con el de otros tejidos lo denominó “*nervenkitt*” o neuroglia (Somjen, 1988).

El descubrimiento de Virchow ayudó a comprender que, tal como ocurre en otros tejidos, el tejido nervioso posee tejido conectivo. Consecuentemente existieron dos teorías respecto del tejido nervioso, por un lado la “Teoría Reticular” apoyada con ligeras modificaciones por el patólogo italiano Camillo Golgi y por otro lado la teoría denominada Doctrina de la Neurona fundada por el patólogo español Santiago Ramón y Cajal. Finalmente este último utilizó la técnica de tinción histológica de impregnación de oro desarrollada por Golgi, a la que le introdujo modificaciones y llevó a cabo el primer estudio ontogenético del sistema nervioso central (SNC). Sus hallazgos lo llevaron a ganar el primer premio Nobel

compartido justamente con Golgi (el primer premio Nobel de la historia compartido) y establecer la teoría de la Doctrina de la Neurona. Aunque Ramón y Cajal logró establecer la doctrina de la neurona, transcurrieron al menos 50 años hasta que la misma fue definitivamente aceptada y aplicada dada la complejidad del tejido nervioso. Por otra parte las teorías de Ramón y Cajal exponían respecto de la sustancia blanca que la mielina funcionaba como el aislante eléctrico que impide que las señales transmitidas por distintas neuronas no se perturbaran entre sí, en regiones donde los axones estaban compactados. Finalmente del Río-Hortega, discípulo de Ramón y Cajal, fue quien logró identificar inequívocamente a los oligodendrocitos (OLGs) tanto en la sustancia blanca como en la sustancia gris en trabajos publicados en 1922 y 1942 (Somjen, 1988; De Carlos, 2007). Los hallazgos fundacionales arriba mencionados fueron los que permitieron que a partir de 1965 el estudio de los OLGs y la mielina experimentara el crecimiento exponencial que aun hoy en día presentan.

Las neuronas son las responsables de transmitir los impulsos nerviosos y de esta manera establecer una red de comunicación celular que conduce a un sin fin de funciones. El impulso nervioso representa esencialmente la propagación, a lo largo del axón neuronal, de una despolarización originada en el soma. La velocidad del impulso tiene profundas implicancias sobre los procesos que el sistema nervioso puede llevar a cabo así como la velocidad con que dichos procesos pueden ser ejecutados. Factores tales como el calibre del axón, la abundancia de canales iónicos sensibles a voltaje y la presencia o ausencia de mielina condicionan la velocidad a la que el impulso nervioso puede ser propagado. Un aspecto interesante de evaluar es el diámetro de los axones, ya que para poder transmitir un impulso nervioso a distancias mayores se necesitan axones de mayor diámetro.

Las células gliales por otra parte, se encuentran distribuidas a lo largo del SNC y el sistema nervioso periférico (SNP) en mucha mayor abundancia que las neuronas. Entre las células gliales, los OLGs en el SNC y las células de Schwann en el SNP son los responsables de producir la mielina capaz de interaccionar íntimamente con los axones de las neuronas y proveerle a estos axones aislamiento eléctrico. Esta propiedad única le permite a los axones mielinizados transmitir los impulsos nerviosos a mayor velocidad y mayores distancias sin sufrir pérdidas en comparación con aquellos axones que no se encuentran mielinizados. De esta manera se comprende fácilmente que la mielinización conduce a una propagación de los impulsos nerviosos más eficiente y con axones de menor tamaño respecto de los que serían necesarios en caso de axones no mielinizados. Esta ventaja evolutiva se hace evidente en el caso de los vertebrados dado que la inclusión del SNC dentro de huesos limita el espacio que el mismo puede ocupar en el organismo. Es por esto último que la mielinización es considerada una “invención” de los vertebrados quienes para poder desarrollar un mejor control muscular que les permita llevar a cabo conductas de depredación y supervivencia a la vez que puedan “ahorrar” espacio (Hartline y Colman, 2007).

La existencia de células que rodean a las neuronas (en algunos casos sin mielinizarlas) es algo que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, observándose este tipo de distribución en prácticamente todos los sistemas nerviosos conocidos. A consecuencia de esta particular arquitectura del sistema nervioso, es lógico pensar que el aislamiento de fibras que se encuentran eléctricamente activas tiene como objetivo evitar el entrecruzamiento de información entre dichas fibras. La existencia de células que rodean a los axones sin mielinizarlos también sugiere que la glia puede cumplir un rol de apoyo trófico, hipótesis que hoy en día es objeto de extenso estudio (Nave, 2010).

En el presente trabajo de Tesis nos proponemos demostrar que la Transferrina (Tf) y las Hormonas Tiroideas (HTs) tienen efectos sobre distintas etapas de la oligodendrogénesis y la mielinogénesis. Más aun evaluaremos si la Tf posee la capacidad de regular la expresión de mediadores requeridos para que las HTs ejerzan sus efectos pro-oligodendrogénicos y pro-mielinogénicos. Por otra parte estudiaremos si las HTs son capaces de regular la expresión de la Tf constituyendo en su conjunto este diálogo entre ambos factores un mecanismo que potencia la oligodendrogénesis y la mielinización.

# **1. EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

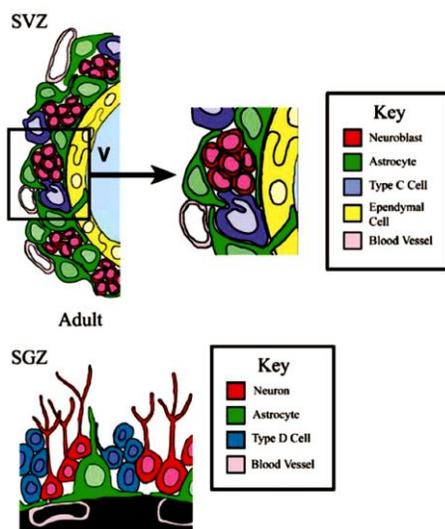
## **1.1 El desarrollo del sistema nervioso central y sus componentes celulares**

La citoarquitectura del SNC está compuesta por células derivadas del neuroepitelio: neuronas, macroglia (que comprende a los astrocitos y los OLGs) y células ependimales. Asimismo existen células de origen mesenquimal: microglia, meninges, vasos sanguíneos y células adiposas.

El desarrollo del sistema nervioso puede ser dividido en dos etapas. Una etapa es embrionaria, donde ocurre la mayor parte de la neurogénesis, la astrogénesis, la oligodendrogénesis y la microglia originada en el saco vitelino invade el tejido nervioso. En esta primera etapa destacan la formación de un patrón dorso-ventral y rostro-caudal que son influenciados por células no neuronales adyacentes y la organización de centros que darán lugar a las distintas regiones del cerebro. En la segunda etapa, que es post natal en el caso de los roedores, tiene lugar la maduración de los OLGs y la síntesis de mielina una vez que se han consolidado los circuitos neuronales. En este caso destaca la profunda influencia que tiene la actividad neuronal sobre la puesta a punto funcional de los circuitos nerviosos y la regeneración/remodelado (plasticidad neuronal).

En la etapa embrionaria las células neuroepiteliales proliferan originando por división asimétrica células denominadas glia radial. Estas células son una población heterogénea de células proliferantes que sirven de andamio a células migratorias, y son capaces de originar neuronas o células gliales (Malatesta y col., 2003; Noctor y col., 2001). Se diferencian del neuroepitelio por la expresión heterogénea de marcadores tales como GLAST, RC2 y BLBP (Pinto y Götz, 2007). Aunque la glia radial se parece en muchos aspectos al neuroepitelio se considera que a diferencia de este último, la glia radial ha progresado a lo

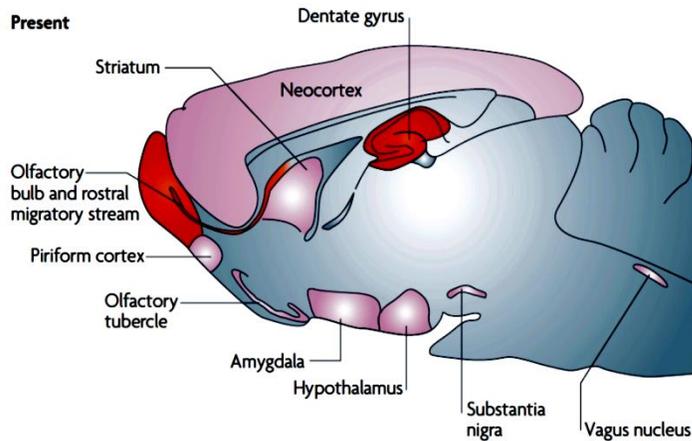
largo del esquema de diferenciación que conduce a neuronas o glia. La glia radial dará lugar a células tipo B (progenitores de amplificación transitoria) que permitirán llevar a cabo la neurogénesis y la gliogénesis en el adulto. Las células de tipo B/C pueden ser encontradas en “*nichos neurogénicos*” tales como la zona subventricular de los ventrículos laterales (ZSV) y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (ZSG) (Conover y Notti, 2008) (**Figura I1**).



**Figura I1. Citoarquitectura de la ZSV y ZSG.** Se observan células progenitoras (células tipo B o tipo C según corresponda) y acúmulos de neuroblastos que migrarán a lo largo del parénquima para generar nuevas neuronas. Los astrocitos presentes en estas estructuras conservan características y capacidades similares a las del neuroepitelio pero a pesar de ello expresan marcadores típicos de astrocitos. (Cell Tissue Res. 2008 Jan; 331(1):211-24)

### Neuronas:

Las neuronas son generadas antes del nacimiento y son incapaces de dividirse una vez que han madurado. En el adulto, sin embargo, las células tipo B o C mencionadas anteriormente generarán progenitores neurales o neuroblastos que finalmente al madurar darán lugar a nuevas neuronas constituyendo así la neurogénesis del adulto (Gould, 2010) (**Figura I2**).



**Figura I2. Neurogénesis en el adulto.** Las zonas en rojo corresponden actualmente a las regiones donde ocurre neurogénesis. Las regiones en rosa indican aquellas que hoy en día se postulan como zonas donde ocurre neurogénesis en el adulto. (Nat Rev Neurosci. 2007 Jun; 8(6):481-8.)

Clásicamente las neuronas se identifican por una morfología única en la que se pueden distinguir distintas estructuras: cuerpo estrellado, pericarión o soma, la presencia de dendritas emergiendo de uno de los polos de la célula y un axón emergiendo del polo opuesto. Aunque muchas neuronas presentan este tipo de morfología, hoy en día se reconoce que la variedad morfológica y de tamaño de las mismas es grande. Dado que las neuronas son polimórficas se las puede clasificar acorde a su forma, ubicación, función, ultraestructura o el neurotransmisor que producen. Tanto el axón como las dendritas presentan un alto grado de ramificación lo que conduce a que la arborización así generada represente entre el 95 y 99% del volumen total de la célula.

Las dendritas se ramifican en las proximidades del soma proyectándose más allá del mismo originando un árbol dendrítico; éste es considerado un campo receptivo que cuanto más grande sea implicará que la neurona podrá recibir mayor cantidad señales.

La glia comprende a las células que son morfológicamente distintas de las neuronas y que inicialmente fueron consideradas el “pegamento neuronal” de donde surge el concepto de “*nervenkitt*” o neuroglia (Somjen, 1988). Actualmente se pueden distinguir 3 tipos de células gliales: (a) microglia (derivada del mesodermo); (b) macroglia, compuesta por

astrocitos y OLGs (derivados del ectodermo como las neuronas) y (c) células endoteliales (derivadas del ectodermo). Las células gliales se diferencian de las neuronas en que no poseen la capacidad de formar contactos sinápticos aunque no son completamente ajenas a los contactos sinápticos formados entre las neuronas dada la reciente vinculación de los astrocitos y la microglia a las sinapsis neuronales establecidas o en formación (Eroglu y Barres, 2010).

#### La microglia:

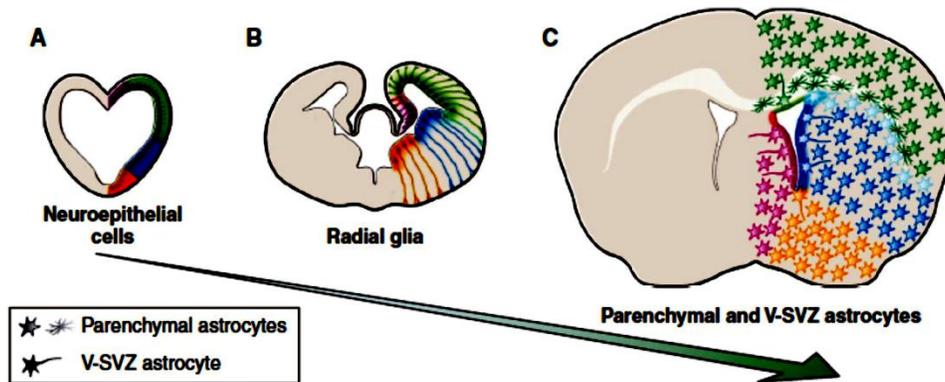
La microglia son células fagocíticas mononucleares residentes en el SNC e involucradas en la respuesta inmune innata. Estas células no tienen su origen en el neuroepitelio, son originadas en la estructura embrionaria denominada saco vitelino, durante el desarrollo embrionario e invaden el tejido nervioso y su población se mantiene de manera independiente de la producción hematopoyética (Katsumoto y col., 2014). Diversos estudios demostraron que son las únicas células mieloides presentes en el SNC sano y que responden a la injuria activándose, proliferando y movilizándose hacia la región injuriada para convertirse en macrófagos activos (van Rossum y Hanisch, 2004). A pesar de esto la microglía expresa moléculas inmunes que poseen funciones en el cerebro sano y se comporta de distinta manera a los monocitos quienes representan sus homólogos por fuera del tejido nervioso (Graeber, 2010). Entre las contribuciones de la microglia al desarrollo y homeostasis del tejido nervioso se destacan: regular la muerte celular programada (apoptosis), remoción de sinapsis, influenciar la neurogénesis y la supervivencia neuronal. Dado el papel fisiológico de la microglia, la respuesta de la misma en condiciones patológicas tiene como consecuencia una pérdida de la función protectora y de la regulación de la homeostasis, así como la ganancia de efectos tóxicos que conlleva a

comprender que los términos tradicionalmente utilizados para denominar a la microglia “activada” o “quiescente” pueden resultar no ser atinados (Katsumoto y col., 2014). La microglia fisiológica posee una morfología altamente ramificada cuyos procesos se encuentran constantemente “patrullando” el parénquima mientras que frente a la activación se pueden distinguir dos fenotipos de aspecto ameboides: uno denominado M1 estimulado por IFN $\gamma$  y otro M2 estimulado por IL-4 o IL-13.

#### La macroglia:

##### Astrocitos:

Los astrocitos se encuentran íntimamente compactados en el parénquima del SNC y esto refleja el rol crítico que cumplen en el metabolismo del tejido nervioso (Sofroniew. & Vinters, 2010). Tradicionalmente se los ha clasificado en astrocitos protoplasmáticos de aspecto estrellado, astrocitos fibrosos y glia elongada radialmente (glia de Muller en la retina) y de Bergman (en cerebelo) (Kimelberg y Nedergaard, 2010), aunque hoy en día se reconoce que existe una mayor variedad de astrocitos con capacidad de generar neuronas o células gliales (Bayraktar y col., 2014; Molofsky y col., 2014) (**Figura I3**).



**Figura I3. Heterogeneidad de astrocitos.** Los astrocitos son una población heterogénea. Esta variabilidad tiene sus orígenes durante la embriogénesis en la que los gradientes de morfógenos originan glia radial heterogénea que posteriormente genera astrocitos heterogéneos (A, B). En la vida adulta los astrocitos residentes en la ZSV, conservan la impronta impartida por los morfógenos durante la embriogénesis y consecuentemente originan astrocitos con distintas características. (Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014 Nov 20; 7(1): a020362.

Aunque los astrocitos fibrosos y protoplasmáticos tienen muchos componentes estructurales en común, sus funciones son diversas. Los astrocitos protoplasmáticos tienen tamaños de entre 10-40  $\mu\text{m}$ , generalmente se encuentran en la sustancia gris en relación con los capilares y tienen un citoplasma más claro que los astrocitos fibrosos. Los astrocitos fibrosos se encuentran en la sustancia blanca y son típicamente más pequeños. Todos los astrocitos presentan filamentos intermedios que contienen la proteína fibrilar ácida (GFAP) y microtúbulos que se extienden junto con haces de filamentos difusos a lo largo de los procesos celulares. En el caso de los astrocitos fibrosos la distribución de los filamentos intermedios es compacta mientras que en astrocitos protoplasmáticos los filamentos se encuentran menos compactados siendo individualizables. Otra característica de los astrocitos es que forman uniones estrechas (tight junctions), particularmente

desmosomas (mediados por cadherinas) y uniones comunicantes (gap junctions) mediadas por conexinas entre los procesos de astrocitos adyacentes.

La presencia de los astrocitos rodeando a las neuronas y en contacto directo con las sinapsis les permite influenciar profundamente la actividad neuronal. Entre las funciones descritas destacan: amortiguar el contenido de  $K^+$  extracelular gracias al potencial de membrana negativo que poseen (Leis y col., 2005); compensar cambios de pH y  $Na^+$  (Deitmer y Rose, 2010); contribuir a regular el flujo de sangre cerebral influenciando la disponibilidad de glucosa, lactato (necesarios para mantener la actividad neuronal) y el ingreso de agua gracias a la expresión de acuoporinas (Kimelberg y Nedergaard, 2010); contribuir a modular la actividad glutamatérgica (limitan la posibilidad de daño neuronal) y GABAérgica (contribuyen a modular las sinapsis inhibitorias) (Sattler y Rothstein, 2006; Schousboe y col., 2013).

En caso de injuria al tejido nervioso, los astrocitos proliferan, acumulan glucógeno y sintetizan grandes cantidades de filamentos que contienen GFAP. Cuando la astrogliosis alcanza gran magnitud la acumulación de filamentos conduce a la formación de una cicatriz que conduce a la imposibilidad de poder reemplazar el tejido dañado por tejido funcional (Sofroniew y Vinters, 2010).

#### Oligodendrocitos:

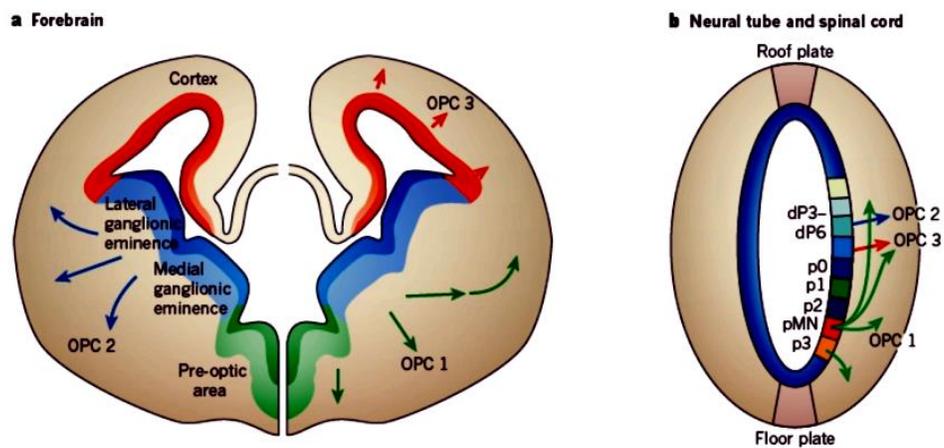
Los OLGs son las células encargadas de sintetizar la mielina aunque también existen OLGs satélite que no se encuentran directamente unidos a la mielina. Estos últimos son de ubicación perineuronal y están vinculados a la regulación del microambiente neuronal (Penfield, 1932; Ludwin, 1997). Los OLGs se distinguen morfológicamente del resto de los componentes del SNC, poseen un soma globular de entre 10–20 $\mu$ m. Son de composición

más densa que la del soma de astrocitos, los márgenes celulares son irregulares y presentan pocos procesos que son altamente ramificados. La compleja morfología requiere de una intrincada red de microtúbulos y ausencia o presencia de una pequeña cantidad de filamentos intermedios lo que los diferencia de los astrocitos. Los microtúbulos presentan distribución marginal, ocasionalmente en los procesos celulares, bucles citoplasmáticos o vainas de mielina. La presencia de desmosomas y uniones comunicantes se observa entre OLGs que mielinizan varios axones (OLGs interfasciculares).

Un OLG extiende varios procesos que contactan y envuelven repetidamente un conjunto de axones, posteriormente ocurre la compactación del citoplasma originándose la mielina. En un mismo axón los segmentos adyacentes de mielina pertenecen a distintos OLGs. El número de procesos que forman la mielina de cada OLG individual varía según la especie y el área del SNC observándose ejemplos que van desde 40 a 1 procesos por OLG (Bunge y col., 1961; Peters, 1991). Asimismo la morfología y el grosor de la mielina originada (Butt y col., 1995) o la morfología subcelular (Mori y Leblond, 1970) permiten clasificar a los OLGs.

La génesis de los OLGs se explica de manera similar a lo expuesto respecto al origen de los astrocitos. Durante la vida embrionaria el neuroepitelio experimentará la formación de patrones rostro-caudales y dorso-ventrales, luego se originará la glia radial que a su vez se diferencia en neurona o glia. Es la glia radial la que dará origen a oleadas de precursores de oligodendrocitos (OPCs) que posteriormente madurarán hasta convertirse en OLGs mielinizantes y sintetizarán los componentes estructurales de la mielina. La formación de OPCs tiene un patrón témporo-espacial específico de 3 etapas que ocurren en E12.5, E15.5 y luego del nacimiento. La primera etapa tiene su origen en células  $Olig2^+$  del tubo neural pertenecientes al dominio pMN y se trata de un proceso modulado por los morfógenos

sonic hedgehog (Shh) y las proteínas morfógenas derivadas del hueso (BMPs). En la segunda etapa los precursores se originan a partir de células Olig2<sup>+</sup> pertenecientes a los dominios dP3, dP4, dP5 y dP6 del tubo neural, en un proceso Shh independiente. Respecto de la tercera etapa aún se desconoce con certeza el origen de los OPCs (Rowitch y Kriegste, 2010) (**Figura I4**).

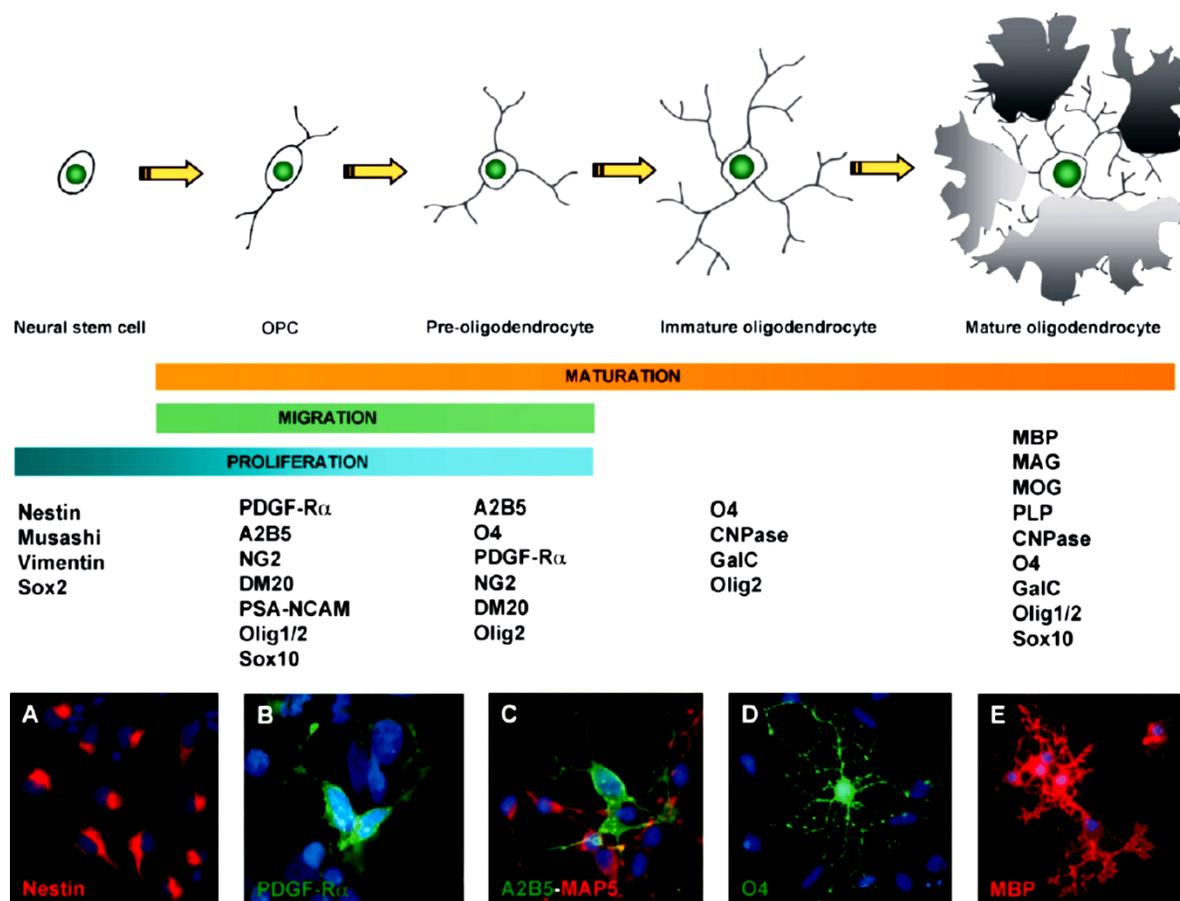


**Figura I4. Oleadas de oligodendrogénesis.** Se indican las tres oleadas de oligodendrogénesis con el color correspondiente a la región donde los OPCs son originados. Oleadas de OPCs en el prosencéfalo (A) y la médula espinal (B). (Nature. 2010 Nov 11; 468(7321):214-22)

## 1.2 La maduración del oligodendrocito y sus moduladores

Los OLGs se originan a partir de OPCs que poseen la capacidad de migrar y proliferar. Una vez que los OPCs alcanzan las zonas a mielinizar, comienzan a madurar lo cual conlleva la pérdida de la capacidad migratoria y proliferativa. La expresión secuencial de distintos marcadores madurativos, identificados mediante un panel de anticuerpos específicos,

permite dividir al proceso de maduración en distintas etapas caracterizadas fenotípicamente (Bamann y Pham-Dinh, 2001; Buchet y Baron-Van Evercooren, 2009) (**Figura I5**).



**Figura I5. Marcadores de los distintos estadios madurativos de los OLGs.** (Neurosci Lett. 2009 Jun 12; 456(3):112-9.)

Es importante destacar que el estudio de la maduración de los OLGs ha sido posible desde 1980 gracias a la posibilidad de obtener OPCs relativamente puros y cultivarlos en ausencia de neuronas (McCarthy y de Vellis, 1980). A lo largo de la maduración de los OLGs se puede reconocer un primer estadio denominado OPC temprano. Estas células son pequeñas, bipolares, redondas y poseen una gran capacidad de proliferar y migrar. Entre los factores capaces de estimular la proliferación de los OPCs destacan el factor de crecimiento

derivado de plaquetas aa (PDGF-AA) y el factor de crecimiento derivado de fibroblastos tipo 2 (bFGF) (McKinnon y col., 1993). Utilizando anticuerpos específicos se puede distinguir a los OPCs en base a la expresión de factores de transcripción tales como Olig1/2 (Lu y col., 2000; Zhou y col., 2000), Nkx2.2 (Zhou y col., 2001; Fu y col., 2002), Sox10 (Kuhlbrodty col., 1998); el gangliósido de membrana A2B5 (Eisenbarth y col., 1979), la subunidad alfa del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFr $\alpha$ ) (Pringle y col., 1992), el proteoglicano condroitin sulfato NG2 (Nishiyama y col., 1996) y la isoforma DM20 de la proteína del proteolípido (PLP) (Timsit y col., 1995). En el siguiente estadio madurativo, denominado OPC tardío, se produce la extensión de pequeños procesos y comienzan a expresarse marcadores tales como el factor de transcripción Sox17 (Sohn y col., 2006) y el sulfátido reconocido por el anticuerpo monoclonal O4 cuya expresión persiste hasta el estadio pre-mielinizante (Sommer y Schachner, 1981).

Los OLGs inmaduros u OLGs pre-mielinizantes se caracterizan por la presencia de procesos largos ramificados y la expresión del galactocerebrósido (GalC) reconocido por el anticuerpo monoclonal O1 (Sommer y Schachner, 1981); la 2',3'-Nucleótido Cíclico 3'-Fosfodiesterasa (CNPasa), DM20/PLP (Yu y col., 1994) y APC/CC-1 (adenomatous polyposis coli) (Bhat y col., 1996). Finalmente los OLGs inmaduros alcanzarán el estadio de OLG maduro extendiendo sus membranas alrededor de los axones y expresando CNPasa, la glicoproteína asociada a la mielina (MAG), la glicoproteína oligodendroglial de la mielina (MOG), PLP y la proteína básica de la mielina (MBP) (**Figura I9**).

La maduración de los OLGs es un proceso finamente regulado. Mientras que los OPCs responden al bFGF y PDGF-AA, a medida que maduran adquieren la capacidad de ser influenciados por la Hormona Tiroidea (HT), otros FGFs y el factor neurotrófico ciliar (CNTF) favoreciendo la maduración de los mismos. El factor símil a la insulina tipo 1

(IGF-I) representa un caso particular dado que favorece tanto la proliferación y supervivencia así como la maduración de los OLGs. En nuestro laboratorio hemos demostrado que la apo-Transferrina (aTf) es capaz de favorecer la maduración de los OPCs además la proliferación en la ZSV después de una lesión desmielinizante (García y col., 2004; Guardia Clausi y col., 2010; Paez y col., 2006; Silvestroff y col., 2013)

Diversos factores de transcripción y reguladores epigenéticos controlan la diferenciación de los OPCs hacia OLGs maduros (Yu y col., 2010). Estos incluyen reguladores negativos tales como la vía de Notch, la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina y las BMPs; y entre los reguladores positivos se encuentran las familias de factores de transcripción Olig y Sox. Los OPCs expresan Sox5, Sox6, Sox9, Hes5, Id2, Id4 y E2A responsables de mantener a estas células en ese estado madurativo. Posteriormente estos factores experimentan una disminución de su expresión a la vez que aumenta la expresión de Sox10 y Nkx2.2 lo que favorece la maduración de los OPCs. Olig 1 sufre la translocación al citoplasma a medida que los oligodendrocitos maduran (Arnett y col., 2004). Tcf4 junto con Sox10, Olig1 y Nkx2.2 son esenciales para que los OPCs se alcancen el estadio de OLG inmaduro. YY1, Myt1, ZFP191 y MRF son factores de transcripción necesarios para que los OLGs alcancen el estadio maduro (Emery, 2010).

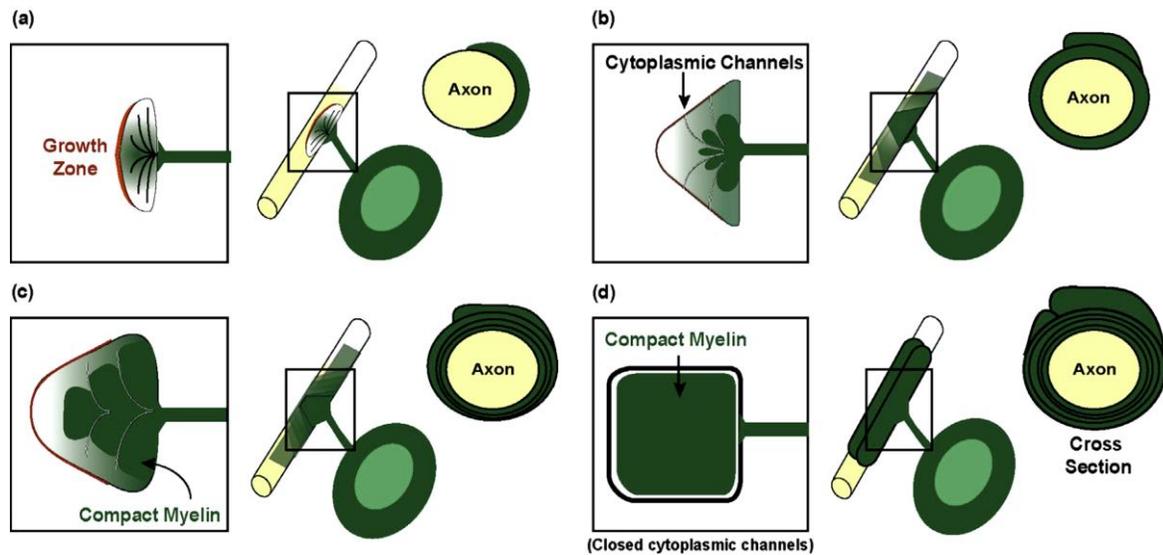
Los mecanismos de regulación epigenética son objeto de intenso estudio. Particularmente la acetilación/desacetilación de las histonas han mostrado influenciar la maduración oligodendroglial y la mielinización (Yu y col., 2010). Otros moduladores epigenéticos incluyen a los microARN (miARN) distinguiéndose los miR219 y miR338 que son represores de la expresión de reguladores negativos de la maduración de los OLGs (Dugas y col., 2010; Zhao y col., 2010).

### **1.3 La formación de la mielina**

La mielinización ocurre durante el desarrollo del SNC/SNP y es esencial para el normal funcionamiento de los mismos. Ontogenéticamente se observa que la mielinización ocurre primero en el SNP seguido por la médula espinal y finalmente el cerebro. En el caso de los roedores la mielinización del cerebro ocurre en la etapa post natal del desarrollo y se encuentra completa a los 60 días de vida, aunque la mielinización perdura toda la vida. Alrededor de los 10 días de vida, en el cerebro se observa la mayor tasa de proliferación (principalmente debida a OPCs). La formación de la mielina comienza a los 10-12 días de vida, alcanza su pico máximo de acumulación a los 20 días de vida (alrededor de 3.5 mg/día de mielina) y aunque la síntesis de mielina perdura hasta la adultez la tasa de acumulación disminuye gradualmente (Morell, 1984).

Las primeras evidencias del mecanismo por el cual los OLGs y las células de Schwann forman la mielina surgieron a partir de análisis de microscopía electrónica realizados en la década del 50 (De Robertis y col., 1958; Geren y Schmitt, 1954). Aunque el modelo propuesto en ese momento resultó ser acertado, la evidencia que confirmó la validez del mismo no llegó hasta la publicación del trabajo de Snaidero y col., (2014). Dicho trabajo demostró que la mielinización ocurre cuando el OLG extiende su membrana en forma de lengüeta que se enrolla de forma espiralada alrededor del axón y que además se expande lateralmente para formar los paranodos. El enrollamiento de las sucesivas capas de membranas es dependiente de la presencia de canales citoplasmáticos en la membrana naciente que permiten la comunicación entre las capas internas y externas de la mielina que se encuentra en formación. La expansión lateral es dependiente de la expresión de

moléculas de adhesión que van modificando la estructura axonal conforme avanza la mielinización (**Figura I6**).



**Figura I6. Formación de la mielina.** (a) El OLG extiende su membrana y al entrar en contacto con el axón se genera una zona de crecimiento. (b) La lengüeta interna se extiende alrededor del axón por debajo de la lengüeta externa para generar mielina compactada (color verde oscuro). (c) Se genera más mielina compactada. (d) Los canales citoplasmáticos se cierran luego que se ha generado la cantidad adecuada de capas de mielina. (Dev Cell. 2015 Feb 23; 32(4):447-58).

La compactación del citoplasma del OLG comienza tempranamente en la lengüeta externa de la membrana del OLG (Readhead y col., 1987). El proceso de compactación es inducido por las MBPs que cuando se encuentran en contacto con dos superficies citoplasmáticas comienzan a polimerizarse formando una red fibrosa que proporciona gran resistencia mecánica (Aggarwal y col., 2013).

Las dos proteínas mayoritarias de la mielina, la PLP y la MBP, ingresan a la mielina por dos rutas distintas. La PLP es sintetizada en poli-ribosomas ubicados en el soma y posteriormente transportada hacia los procesos oligodendrogliales, vía vesículas. En cambio las MBPs son sintetizadas en ribosomas libres ubicados en las cercanías de los extremos de los procesos oligodendrogliales que se encuentran formando la mielina, para

lo cual es necesario que los ARNm de las MBPs sean transportados desde el soma hacia los procesos (Brown y col., 1993; Trapp y col., 2004a). Otras proteínas, tales como MAG y MOG, son transportadas a destinos intracelulares específicos por mecanismos que son poco conocidos (Kroepfl y Gardinier, 2001).

El proceso de mielinización se encuentra finamente regulado. Es ampliamente reconocido que el diámetro de los axones influye sobre el grosor de la mielina aunque la señalización y actividad eléctrica axonal también contribuyen a dicha regulación. En el caso del SNP es sabido que la señal axonal mediada por la Neurogulina 1 tipo III y sus receptores ErbB2/3 en la célula de Schwann instruyen a esta última a mielinizar el axón (Taveggia y col., 2005). En el caso del SNC se desconoce cuál/es es/son las señales que cumplen dicha función en los OLGs. A pesar de esto, sí son conocidas las vías de señalización intracelulares del OLG que regulan la mielinización en el SNC. La vía de señalización Akt/PI3Kinasas, que conduce a la activación de mTOR, regula la diferenciación de los OPCs hacia OLGs inmaduros *in vitro* (Tyler y col., 2009). También la vía de Erk-2 influye en la maduración de los OLGs *in vivo* (Fyffe-Maricich y col., 2011).

Un aspecto clave de la formación de la mielina es la síntesis de lípidos. La mielina es una membrana que contiene grandes cantidades de colesterol, el cual es sintetizado localmente (Jurevics y Morell, 1995). Algunos de los lípidos y proteínas de la mielina se encuentran asociados con dominios semejantes a “*rafts*” lipídicos enriquecidos en colesterol, glicoesfingolípidos y proteínas conjugadas a glicofosfatidilinositoles (Taylor y col., 2004). Estos “*rafts*” lipídicos se encuentran relacionados con el transporte de membrana y transducción de señales necesarias para el ensamblaje de la mielina.

La mielina no es una estructura estática, esto fue demostrado por experimentos con trazadores radioactivos que mostraron la existencia de componentes cuya vida media es de

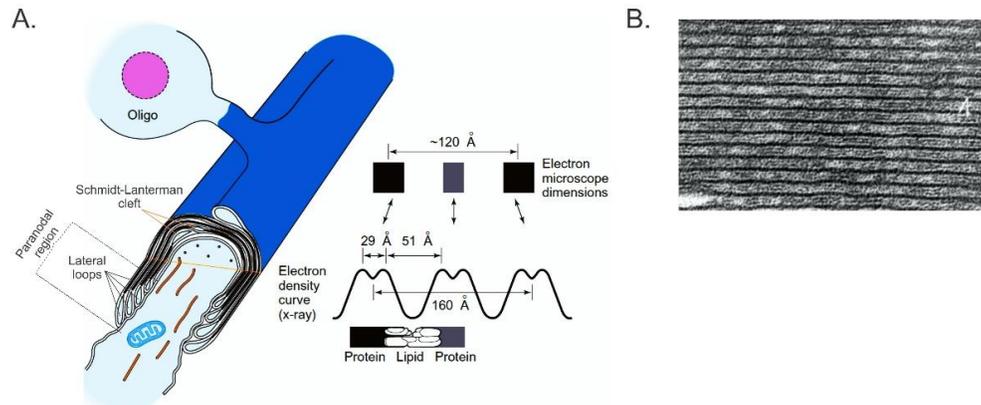
varios meses (colesterol, cerebrósidos, sulfátidos y proteínas de la mielina compacta) (Morell, 1984). Por otra parte existen procesos de “*turn over*” que ocurren en minutos tales como la hidrólisis de fosfatidil-inositoles o grupos fosfato de las MBPs que se encuentran vinculados a la transducción de señales (Eichberg e Iyer, 1996; Taylor y col., 2004; Trapp y col., 2004).

#### **1.4 La estructura y composición de la mielina**

La vaina de mielina es un tejido especializado que resulta de la extensión de la membrana de los procesos oligodendrogiales (SNC) o de células de Schwann (SNP) alrededor de los axones de manera espiralada, seguida por la compactación y exclusión del citoplasma de la célula mielinizante. Los OLGs tienen la capacidad de mielinizar varios axones mientras que las células de Schwann solo mielinizan un axón. En ambos casos la mielina recubre los axones de manera discontinua o segmentaria, delimitando zonas de axón desnudo denominadas “*nodos de Ranvier*”.

Al analizar la mielina mediante microscopía de luz polarizada se puede observar la birrefringencia causada por lípidos y proteínas, que están organizados en forma estratificada: proteína-lípido-proteína-lípido-proteína. Estas capas originan un patrón de bandas denominadas línea densa principal y línea intraperiódica de menor densidad que las anteriores. La primera representa las capas de proteínas de la membrana celular interna fusionadas y la segunda las capas de proteínas de la membrana celular externa fusionadas. La región contigua al *nodo de Ranvier* es denominada paranodo y al igual que las cisternas de Schmidt-Lanterman (poco frecuentes en el SNC y distribuidas a lo largo de la mielina)

son regiones donde la mielina no es compacta observándose sólo en el paranodo la presencia de la línea densa mayor de la mielina (Kirschner y Blaurock, 1992) (**Figura I7**).



**Figura I7. Estructura de la mielina.** (A) Diagrama esquemático de la estructura de la mielina. (B) Imagen de microscopía electrónica de un corte longitudinal de la mielina, 350.000X. (Basic Neurochemistry, 8<sup>va</sup> Edición)

La mielina es un aislante eléctrico y sus funciones principales son las de facilitar la transmisión del impulso nervioso así como de producir factores tróficos para el axón (Nave, 2010). En axones no mielinizados el impulso nervioso se propaga como consecuencia de corrientes locales de iones que alteran el potencial de membrana de zonas adyacentes a la membrana, induciendo nuevas corrientes locales de iones y dando como resultado el desplazamiento espacial del estímulo inicial. En el caso de los axones mielinizados las corrientes iónicas se inducen únicamente en los *nodos de Ranvier*, gracias a la presencia de gran cantidad de canales de sodio voltaje dependientes (junto con otros canales iónicos) y la gran resistencia al pasaje de corriente que aporta la mielina, lo que hace que la corriente fluya hasta el siguiente *nodo de Ranvier* originando una conducción saltatoria. La mayor velocidad de conducción del impulso nervioso en axones mielinizados se explica por la alta densidad de canales iónicos dependientes de voltaje en el *nodo de Ranvier* (alta

capacitancia) así como la ausencia de dichos canales en la mielina (baja capacitancia). La necesidad de producir la despolarización de la membrana en el nodo hace que exista una alta densidad de canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje. Estos canales iónicos permanecen restringidos y estabilizados en el nodo gracias a proteínas vinculadas al citoesqueleto de espectrina-actina tal como la AnquirinaG (Trapp y Kidd, 2004).

Entre las ventajas que presenta un axón mielinizado en comparación con uno no mielinizado se destacan: la necesidad de menores flujos de  $\text{Na}^+$  para realizar la conducción del impulso nervioso (consecuente menor gasto de energía en restaurar el contenido de sodio principalmente por la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa) y fibras mielinizadas de menor diámetro para alcanzar las mismas velocidades de conducción que en las fibras no mielinizadas (la relación diámetro/velocidad de conducción es lineal en fibras mielinizadas mientras que es exponencial en fibras no mielinizadas) (Waxman y Bangalore, 2004).

La composición de la mielina está bien caracterizada dado que puede ser aislada con buenos rendimientos y pureza. Los procedimientos de obtención de mielina se basan en el concepto que cuando el tejido nervioso es homogenizado en un medio con baja fuerza iónica, la mielina se despega de los axones formando vesículas de gran tamaño que varían entre el del núcleo y las mitocondrias (Norton y Poduslo, 1973; Morell, 1984). El contenido de agua de la mielina es de alrededor de un 40% y su peso seco se compone de 70-85% de lípidos y un 15-30% de proteínas (Kirschner y Blaurock, 1992).

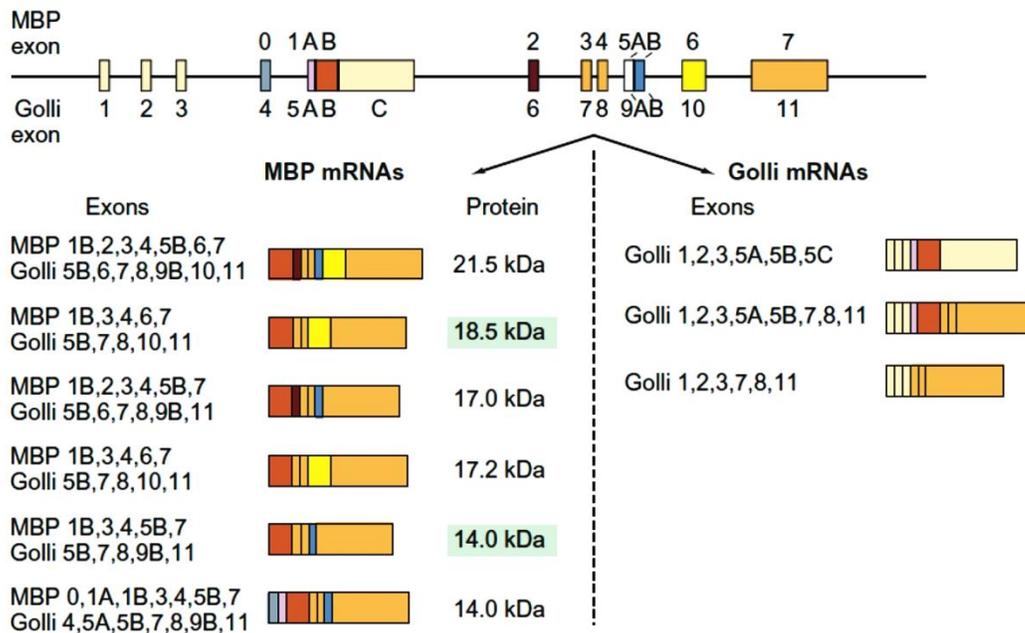
Aunque no existen lípidos únicos de la mielina, el cerebrósido galactosil ceramida es un típico componente de la mielina y durante el desarrollo temprano del SNC la concentración de dicho cerebrósido es directamente proporcional al contenido de mielina. Alrededor de la quinta parte de los galactolípidos son sulfátidos en los cuales el motivo 3-hidroxilado predomina. Estudios con ratones transgénicos demostraron que los sulfátidos cumplen un

papel central en la organización de la mielina dado que los animales que carecen de la capacidad de sintetizarlos evidencian defectos en la mielina tales como: presencia de paranodos desorganizados, distribución anormal de canales de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, defectos en la maduración de los oligodendrocitos (Marcus & Popko, 2002; Taylor et al., 2004). Otros componentes vitales de la fracción lipídica de la mielina son el colesterol y los fosfolípidos. La composición lipídica de la mielina contiene relaciones 4:3:2 y 4:2:2 de colesterol:fosfolípidos:galactolípidos. Es destacable que la mielina contiene cantidades significativamente mayores de colesterol en comparación con el resto de los tejidos.

La composición proteica de la mielina es simple en comparación con otros tejidos, la MBP junto con la PLP son los componentes mayoritarios y representan entre el 70- 80% del contenido proteico. Otros componentes glicoproteicos indispensables para la mielina son: la CNPasa, la isoforma DM20 del PLP, la MAG y la MOG.

La PLP es también conocida como proteína de Folch-Lees y tiene propiedades únicas de solubilidad en solventes orgánicos. Su peso molecular es de 30 kDa y es una proteína de membrana que posee 4 segmentos de transmembrana con sus extremos amino (N-terminal) y carboxilo (C-terminal) terminal ubicados en la cara citoplasmática de la membrana. Esta proteína cumple una función crucial en la compactación de la mielina y en la formación de la línea intraperiódica (Campagnoni & Skoff, 2001). Existe una variante de la PLP que surge por “*splicing alternativo*” denominada DM20 por su peso molecular (20 kDa), que es de expresión temprana durante el desarrollo y se ha sugerido que puede estar involucrada en la migración y diferenciación de los OLGs (Greer y Lees, 2002; Hudson, 2004). Tanto la PLP como la DM20 contienen alrededor de 3 moles de ácidos grasos (principalmente palmitato, oleato y estearato) por mol de proteínas que se encuentran esterificados a cisteínas.

Las MBPs pueden ser extraídas con soluciones ácidas o salinas a partir de la mielina o de la sustancia blanca y una vez extraídas son muy solubles en agua. La MBP es parte de un gen denominado Golli (gen del linaje oligodendroglial) que tiene una longitud de aproximadamente 100 kb. Este gen tiene 3 sitios de inicio de la transcripción, dos de los cuales son utilizados para transcribir los ARNm de las MBPs mientras que el tercer sitio de ubicación más cercana al extremo 5' transcribe los ARNm de golli. A diferencia de las MBPs, Golli se expresa en neuronas, OLGs y células T del sistema inmune durante el desarrollo y su distribución subcelular es variada incluyendo el núcleo, citoplasma y los procesos celulares. El ARNm de MBP experimenta distintos “*splicing alternativos*” que originan una gran variedad de isoformas (Aruga y col., 1991; Campagnoni y Skoff, 2001; Campagnoni y Campagnoni, 2004) (**Figura 18**). La MBP clásica contiene 6 exones que codifican para una proteína completa de 21.5 kDa aunque es uno de los componentes minoritarios en la mielina. Las otras 4 isoformas se diferencian en poseer o no los exones 2, 5B y 6. En el caso de roedores las isoformas de 18.5 kDa y 14 kDa son las más abundantes mientras que dos isoformas de 17 kDa son las minoritarias. Esta proteína cumple un papel crucial en la compactación de la mielina y en la formación de la línea densa mayor de la mielina. Se la ha logrado identificar en la cara exterior de la membrana celular donde formaría dímeros que interactúan con lípidos cargados negativamente. Las MBPs presentan modificaciones post-transcripcionales tales como fosforilación, pérdida de la arginina en el C-terminal y desaminación que conduce a una microheterogeneidad en la electroforesis en condiciones alcalinas. Aunque no se ha demostrado fehacientemente, se especula que el “*turnover*” de los grupos fosfato influye y regula la capacidad de las MBPs de interactuar con las membranas celulares (Eichberg y Iyer, 1996).



**Figura I8. Splicing alternativo del gen de la MBP y sus distintas isoformas.**  
(Basic Neurochemistry, 8va Edición)

Como ya se indicó, la mielina contiene otras proteínas además de PLP/DM20 y las MBPs. Una dupla de 46 kDa y 48 kDa es un componente abundante y ha sido caracterizada por su actividad enzimática 3'-fosfodiesterasa de 2',3'-Nucleótidos Cíclicos. El gen de la CNPasa origina dos isoformas que se diferencian en 20 aminoácidos en el extremo N-terminal aunque ambas isoformas se encuentran isopreniladas en sus extremos C-terminal. Las enzimas poseen actividad catalítica específica para los sustratos 2',3'-cAMP, cGMP, cCMP y cUMP originando los correspondientes isómeros 2'. Aunque se ha demostrado que los isómeros 3',5' cíclicos poseen actividad biológica, experimentos realizados en células no neuronales demostraron la existencia de interacciones entre la CNPasa y el citoesqueleto de F-actina/tubulina así como el vínculo directo de la actividad CNPasa con la capacidad de extender procesos celulares (Braun y col., 2004).

Dos glicoproteínas son componentes vitales, aunque minoritarios, de la mielina: la MAG y la MOG. La MAG es una glicoproteína de 100 kDa que representa alrededor del 1% del contenido proteico de la mielina. El gen de MAG origina por “*splicing alternativo*” dos isoformas que difieren en su segmento intracelular C-terminal. Estas dos isoformas se denominan L-MAG y S-MAG por la presencia de un dominio intracelular largo o corto, siendo L-MAG de expresión temprana durante el desarrollo en comparación con S-MAG. Las MAGs son proteínas transmembrana que poseen un único segmento que atraviesa la membrana, un dominio extracelular altamente N-glicosilado que posee 8/9 motivos semejantes a Inmunoglobulinas y un segmento intracelular. La ubicación periaxonal sugiere que MAG cumple funciones de adhesión dada la capacidad de interactuar con moléculas de adhesión como la molécula de adhesión neuronal (N-CAM) y funciones de señalización entre la mielina que se está formando y el axón ya que el dominio intracelular es capaz de interactuar con la vía de señalización de Fyn quinasa (Quarles, 2002).

Por otro lado la MOG, que también es una proteína de transmembrana de 26 kDa, contiene un dominio semejante a Inmunoglobulinas, un sitio de N-glicosilación y expresa el epítopo de adhesión celular HNK-1. Su rol fisiológico se encuentra vinculado a la transducción de señales desde la mielina y la matriz extracelular al interior del OLG (Pham-Dinh y col., 2004).

## 2. LA TRANSFERRINA

### 2.1 Generalidades

La Tf es una glicoproteína de 80 kDa y posee dos sitios de alta afinidad por la forma trivalente del hierro a pH 7.4 (Aisen y col., 1978) lo que la convierte en la principal transportadora de hierro en el organismo humano. La unión/liberación de hierro por parte de la Tf es influenciada por factores tales como el pH, la temperatura, presencia de agentes quelantes y la fuerza iónica. Aniones tales como carbonato y cloruro afectan la capacidad de unión a hierro de manera pH dependiente (He y col., 2000). La vida media de la Tf es de aproximadamente 8 días *in vivo* (Van Campenhout y col., 2003), y aunque el hígado es el mayor productor de Tf, los OLGs, las células endoteliales del plexo coroideo y las células de Sertoli también producen pequeñas cantidades (Bloch y col., 1985; Bloch y col., 1987). Los animales  $\text{Trf}^{\text{hpx/hpx}}$  presentan una mutación espontánea en el gen de la Tf y es en estos animales que se evidencia que la Tf es indispensable para el desarrollo dado que los animales  $\text{Trf}^{\text{hpx/hpx}}$  mueren al poco tiempo de nacer a causa de una anemia severa a menos que se les administre Tf exógena a diario o reciban transfusiones de glóbulos rojos (Trenor y col., 2000).

El hierro es necesario para una gran variedad de funciones biológicas que incluyen el transporte de oxígeno, la transferencia de electrones en la mitocondria y la síntesis de ADN. El rol de la Tf como transportador de hierro se hace evidente teniendo en cuenta que este último es insoluble a pH fisiológico y al reaccionar con oxígeno genera radicales libres (Reacción de Fenton y Haber–Weiss) que pueden inducir peroxidación lipídica de componentes de la membrana celular y otros componentes celulares (Fraga y Oteiza, 2002). A consecuencia de esto último, en el organismo, el hierro se encuentra formando parte de

dos compartimientos: uno funcional y otro de depósito. El transporte de hierro unido a Tf permite el intercambio del metal entre ambos compartimientos mientras que su exceso se deposita intracelularmente como ferritina o hemosiderina.

La holoTf se une a su receptor (TfR-CD71) en la membrana de las células que se encuentran dividiéndose activamente y el complejo TF-TfR es internalizado por vesículas recubiertas de clatrina. Estas vesículas se fusionan con endosomas tempranos donde bombas de protones introducen activamente  $H^+$  hasta alcanzar un pH de 5,5. Este valor de pH induce un cambio conformacional en la Tf que permite la liberación del hierro transportado mientras que la apoTransferrina permanece unida al receptor hasta que el receptor es reciclado hacia la membrana, donde finalmente la apoTf se disocia y queda disponible para transportar más hierro dentro de la célula (Perez y col., 2013; Hémadi y col., 2004; Paterson y col., 1984).

Existen dos tipos distintos de receptores a los que se une la Tf, el TfR1 y el TfR2. En este caso, los animales “*knock out*” para los TfRs mueren durante el estadio embrionario del desarrollo a consecuencia de defectos profundos de la eritropoyesis y del desarrollo neurológico (Levy y col., 1999). Ambos receptores median la incorporación de hierro transportado por la Tf y se diferencian por poseer distintas afinidades de unión a ligando, distribución tisular y la capacidad del contenido de hierro libre de regular la expresión de sus respectivos ARNm. El TfR2 posee baja afinidad por su ligando y realiza un transporte no saturable; se expresa en hepatocitos, en enterocitos del intestino delgado y en precursores eritroides; la expresión de su ARNm es independiente del contenido de hierro libre y se ha señalado que su función es la de sensar los niveles de hierro circundantes. Por otra parte el TfR1 posee una alta afinidad por su ligando y realiza un transporte saturable; se expresa en glóbulos rojos, hepatocitos, microvasculatura del SNC y células del tejido

nervioso y su expresión es regulada por el contenido intracelular de hierro. La regulación de la expresión del TfR1 ocurre a nivel traduccional. El ARNm del TfR1 posee en la región 3' no traducida (UTR-3') secuencias denominadas elementos de respuesta a hierro (IRE) que forman bucles y son capaces de interactuar con las proteínas reguladoras de hierro de unión al ARN (IRPs). Las IRPs son capaces de unirse a al ARNm del TfR1 en presencia de bajos niveles de hierro conduciendo a una estabilización del ARNm y consecuente incremento del contenido de TfR1 (Pantopoulos, 2004).

## **2.2 Expresión de la Transferrina en el sistema nervioso central y los oligodendrocitos**

La presencia del ARNm de la Tf en el SNC demuestra que existe síntesis endógena en las células nerviosas, pero este no es el único origen de la glicoproteína. Los experimentos en los que se inyectó un pulso de  $^{125}\text{I-Tf-}^{59}\text{Fe}$  demostraron que aproximadamente el 50% del trazador radioactivo es incorporado al cerebro. Se ha sugerido que este ingreso de la Tf al SNC ocurre mediante transcitosis mediada por su receptor. Este mecanismo requiere que la Tf se una a su receptor seguido por la endocitosis acoplada a exocitosis. Durante la transcitosis la vía de degradación lisosomal es evitada aunque el ambiente relativamente ácido del endosoma (pH 6.0–6.8), permite que el hierro transportado por la Transferrina pueda ser liberado e incorporado al tejido nervioso (Fishman y col., 1987). En el caso de los astrocitos, no se ha detectado ni el ARNm ni la proteína Tf *in vivo*. El TfR1 ha sido detectado únicamente *in vitro* razón por la que se cree que la incorporación de hierro por parte de los astrocitos no es mediada por la Tf. Las neuronas tampoco expresan Tf pero la misma es detectada en distintos compartimentos celulares gracias a la endocitosis mediada

por TfR1. Respecto de la microglia tampoco se observa la expresión de la Tf y experimentos *in vitro* de incorporación de <sup>59</sup>Fe mostraron que estas células son capaces de incorporar hierro de manera independiente de la Transferrina (Leitner y Connor, 2012).

Los OLGs son las células en las que se encuentra la mayoría de la Tf contenida en el SNC. Distintos estudios demostraron que la síntesis de la Tf comienza poco tiempo antes del comienzo de la mielinización (Bloch y col., 1985; Espinosa de los Monteros y col., 1994) y a partir del día 14 de vida la presencia del ARNm de la Tf se restringe solamente a la sustancia blanca (Connor y Menzies, 1996).

### **2.3 La Transferrina como factor promotor de la maduración oligodendroglial y la mielinogénesis**

La Tf es indispensable para que ocurra una mielinización adecuada (Espinosa de los Monteros y col., 1999) y los animales que la sobreexpresan presentan un mayor grado de mielinización que animales de tipo salvaje (Saleh y col., 2003).

Nuestro grupo ha realizado estudios sobre la Tf desde hace aproximadamente 20 años. Experimentos *in vivo* mostraron que la inyección intracranreal de apoTf a ratas de entre 2 y 5 días de edad acelera la maduración de los OLGs, produce una mielinización prematura y conduce a un incremento en la expresión de los ARNm de proteínas de la mielina tales como la MBP y la CNPasa sin afectar la expresión de la PLP (Escobar Cabrera y col., 1994; Escobar Cabrera y col., 1997; Marta y col., 2003). Es importante remarcar que estos efectos sólo se observan si la administración de apoTf se efectúa entre los días 2 y 5 de vida lo que sugiere que existe una ventana temporal de acción de la Tf (Marta y col., 2000, Garcia y col., 2003, 2004). Esta idea es reforzada por el hecho que los OLGs experimentan

una caída en la expresión del TfR a medida que maduran no detectándose la presencia del TfR en OLGs de animales de 20 días de vida (Escobar Cabrera y col., 1994).

Estudios *in vitro* demostraron que la presencia de apoTf en el medio de cultivo de OPCs tiene efectos positivos sobre la maduración de los mismos induciendo además la salida prematura del ciclo celular y disminuyendo la capacidad migratoria de los precursores (Paez y col., 2002; Paez y col., 2006). Estos efectos son mediados por un incremento en la producción de AMPc, la fosforilación de la proteína que se une al elemento de respuesta a AMPc (CREB) y un incremento de la capacidad de unión al ADN de factores de transcripción que responden a AMPc (García y col., 2004).

Con el objeto de profundizar el conocimiento sobre los factores de transcripción involucrados en los efectos descritos de la Tf se estudiaron dos líneas celulares oligodendrogiales denominadas N19 y N20.1. Estas líneas celulares se corresponden con células oligodendrogiales que han sido inmortalizadas en distintas etapas de la maduración de las mismas; la línea N19 representa un estadio más inmadura que la línea N20.1 (Verity y col., 1993). Los principales hallazgos de estos experimentos fueron que la administración de apoTf induce la maduración de ambas líneas celulares, y aunque se produce el incremento de la expresión de la MBP en ambas líneas, solo se observan incrementos de AMPc y fosforilación de CREB en las células más inmaduras (N19). El estudio de los mecanismos por los cuales la Tf induce la maduración de ambas líneas mostró que se produce el incremento de la expresión de los receptores de las hormonas tiroideas (TRs), el factor de transcripción Sp1 y del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (Paez y col., 2006b). Posteriormente se exploraron las vías de señalización que estaban involucradas en los efectos observados. Utilizando OPCs se observó que como consecuencia de la interacción

de la Tf con su receptor se produce la activación de Fyn quinasa y las vías de señalización de Fyn/MEK/ERK así como PI3/AKT (Perez y col., 2013).

El estudio de la Tf producida en los OLGs mostró que carece del péptido señal para su secreción (de Arriba Zerpa y col., 2000) y se observan grandes cantidades de Tf en OLGs a lo largo de las distintas etapas madurativas de ellos. Dado que los OPCs expresan Tfr1 cabe preguntarse si la Tf sintetizada que no puede ser secretada por la célula oligodendroglial posee algún efecto sobre la maduración de las células inmaduras. Para ello se realizaron experimentos con las líneas celulares N19 y N20.1 en las que se sobreexpresó la Tf humana. Los resultados mostraron que las células que sobreexpresan Tf presentan una cantidad mayor de células maduras respecto de los controles evidenciado por el mayor número de células inmunomarcadas con O4, O1 y MBP. Sumado al mayor grado de maduración obtenido en células que contienen mayores niveles de Tf, también se observó una mayor potencial mielinogénico en co-cultivos con neuronas corticales y un incremento de la expresión de proteínas asociadas a la adhesión glia-axón tales como N-CAM, and F3/Contactina (Paez y col., 2005).

Finalmente se estudió si la Tf ejercía efectos sobre los progenitores neurales derivados de la zona subventricular. Estos estudios mostraron que la administración de apoTf a progenitores neurales ejerce un doble efecto aumentando la tasa de proliferación de las mismas, favoreciendo la inducción hacia linaje oligodendroglial y la subsecuente maduración de los OLGs inmaduros (Silvestroff y col., 2012; Silvestroff y col., 2013).

### **3. LAS HORMONAS TIROIDEAS**

#### **3.1 Generalidades**

Fue en el año 1888 que por primera vez que la Sociedad Clínica de Londres estableció de forma irrefutable que la pérdida de la función tiroidea tenía profundos efectos deletéreos sobre el desarrollo y la homeostasis, acuñándose el término hipotiroidismo (Ord, 1888). Posteriormente, en 1915 Harrington fue capaz de aislar el componente activo de los extractos tiroideos, dilucidar su estructura, sintetizarla y finalmente denominarla tiroxina (Harrington y Barger, 1927).

La glándula tiroidea es uno de los primeros órganos endócrinos en formarse durante el desarrollo embrionario a partir del ectodermo (Sgalitzer, 1941). Las funciones secretorias de la glándula tiroidea se encuentran reguladas por la hormona estimulante de la tiroides (TSH) producida en la glándula hipofisaria y volcada al sistema circulatorio a través del sistema portal hipofisario. A su vez la secreción de TSH es estimulada por la hormona liberadora de tirotrófina (TRH) que es producida en el hipotálamo el cual sensa los niveles de circulantes de las HTs que tienen efectos inhibitorios sobre la secreción hipotalámica de TRH (Stathatos, 2012).

La unidad funcional de la glándula tiroidea es el folículo tiroideo donde se puede distinguir el folículo propiamente dicho y las células foliculares que se caracterizan por incorporar grandes cantidades de yodo (Levy y col., 1997). En el interior del folículo se puede encontrar una glicoproteína de gran peso (660 kDa) denominada tiroglobulina (Tg) cuyos residuos de tirosina son iodados principalmente por la tiroperoxidasa (TPO). La Tg es el sustrato para la síntesis de las hormonas tiroideas lo cual ocurre tras la estimulación de la glándula tiroidea por la TSH. Cuando esto ocurre la Tg es endocitada y clivada para obtener

triodotironina (T3; 3,5,3' tri-yodo-L-tironina) y tiroxina (T4; 3,5,3',5' tetrayodo-L-tironina) que finalmente serán vertidas a la circulación por exocitosis. Las HTs comprenden a T3 como a T4 y se diferencian por la cantidad de átomos de yodo que tienen unidos (3 o 4 respectivamente). Bajo condiciones normales la glándula tiroidea secreta 90% de T4 y 10% de T3 (Stathatos, 2012).

Las hormonas tiroideas son liposolubles y es por esto que se cree que uno de los mecanismos por los que ingresan a las células es la difusión simple a través de la membrana celular. A pesar de esto, se han descrito varios transportadores de membrana capaces de facilitar el ingreso de las HTs a las células. Estos transportadores incluyen: el transportador de monocarboxilatos 8 (MCT8), MCT10 y el polipéptido transportador de aniones orgánicos 1C1 (OATP1C1) (Bernal y col., 2015).

Una vez dentro de las células, las hormonas tiroideas sufren una serie de transformaciones que son llevadas a cabo por un grupo de selenoproteínas denominadas deionidasas. Existen 3 isoformas de las deionidasas (D1, D2 y D3) que realizan la remoción de átomos de yodo del precursor T4 para originar formas activas o inactivas de las HTs y de esta manera regular los efectos de dichas hormonas en los distintos órganos diana. Cada una de las deionidasas posee un rol específico, D1 remueve átomos de yodo de la T4 para originar formas inactivas y activas de manera equimolar; la D2 genera la T3 a partir de la T4; la D3 inactiva la T3 y evita que la T4 se transforme en la forma activa (Bianco y Kim, 2006).

Las HTs ejercen su acción a nivel nuclear, citoplasmático, de la membrana celular y de la mitocondria. Los efectos biológicos a través de los receptores nucleares se relacionan con la capacidad de las HTs de modificar la expresión de genes diana. De manera similar, la presencia de los receptores de las HTs (TRs) en la mitocondria permite que dichas hormonas modulen la transcripción del ADN mitocondrial. Por último, una serie de efectos

no desencadenados por la unión de las HTs a sus receptores nucleares han sido denominados efectos no genómicos. Estos ocurren como consecuencia de la interacción de las HTs con proteínas de membrana, entre las que se ha reconocido como ligando a la integrina  $\alpha\beta3$  que desencadena la activación de la vía de señalización de las quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2) (Cheng y col., 2010).

### **3.2 Los Receptores de las Hormonas Tiroideas**

Usando aislamientos nucleares de hígado de rata, Tata y Windell demostraron por primera vez en 1966 que la T3 estimula la actividad transcripcional dependiente de ADN para aumentar la síntesis de nuevos ARNm (Tata y Widnell, 1966). Aunque se realizaron algunos estudios con el objeto de caracterizar a los TRs, no fue sino hasta mediados de la década del 80 que el clonado de los receptores permitió llevar a cabo la caracterización molecular y estudiar como los TRs regulan la actividad transcripcional de los genes diana de las HTs.

Los TRs pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares y funcionan como factores de transcripción dependientes de la unión a HTs, principalmente a la T3. Esta superfamilia de receptores se caracteriza por poseer una estructura modular en la que se pueden distinguir dominios con funciones específicas: una región N-terminal variable (A/B), un dominio conservado de unión a ADN (DBD) y una región conservada que contiene el dominio de unión a ligando (LBD) (Aranda y Pascual, 2001).

Los genes que expresan a los TRs son el *THRA* y el *THRB*. El gen *THRA* origina una variante que posee capacidad de unión a T3 denominada TR $\alpha$ 1 y dos variantes originadas por “*splicing alternativo*” de la anterior, que carecen de capacidad de unión a T3

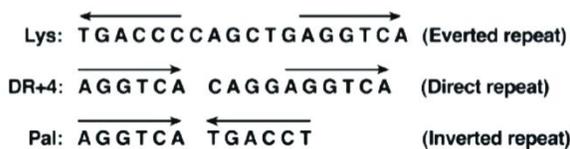
denominadas TR $\alpha$ 2 y TR $\alpha$ 3. También se han descrito productos truncados del gen *THRA* que carecen del dominio de unión al ADN pero que conservan la capacidad de unirse a la T3 (TR $\Delta\alpha$ 1 y TR $\Delta\alpha$ 2) (Mitsubishi y col., 1988; Plateroti y col., 2001). El gen *THRB* codifica para tres variantes que tienen capacidad de unirse a la T3 (TR $\beta$ 1, TR $\beta$ 2, y TR $\beta$ 3). De manera semejante al gen *THRA*, el gen *THRB* origina una variante truncada que carece del dominio de unión al ADN (TR $\Delta\beta$ 3) (Williams, 2000).

Los dominios de unión al ADN permiten que los TRs se unan a los promotores de los genes diana de las HTs e influyan sobre la expresión de los mismos. Las secuencias de ADN a las que se unen los TRs se denominan elementos de respuesta a la hormona tiroidea (TRE) y el núcleo de la secuencia consenso contienen un hexanucleótido “*half-site*” (A/G)GGT(C/A/G)A. Este motivo “*half-site*” puede encontrarse orientado de distintas formas: repetición evertida, repetición directa o repetición invertida-palíndromo (**Figura I9**) (Cheng y col., 2010).

**a. Consensus TRE half-site**



**b. TREs**



**Figura I9. Elementos de respuesta a la hormona tiroidea (TRE).** (a) núcleo de la secuencia consenso de los TREs. (b) Orientaciones en las que se puede encontrar la secuencia consenso “*half-site*”. (Endocr Rev. 2010 Apr; 31(2): 139-70.)

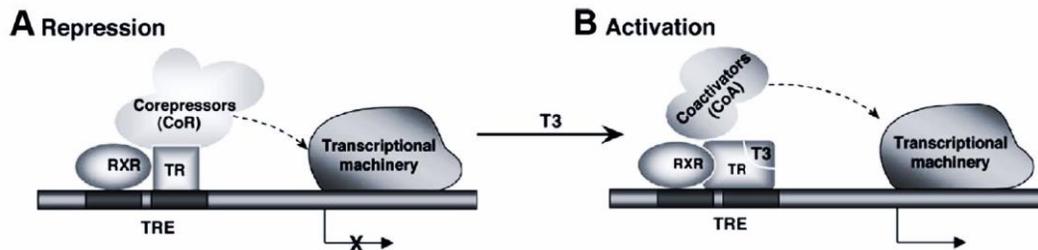
La presencia de dos secuencias consenso en los TREs hace posible que los TRs se unan en forma de dímeros. Estos dímeros pueden ser homo o heterodímeros entre las distintas isoformas de los TRs u otros integrantes de la superfamilia de receptores nucleares y los TRs. La formación de heterodímeros entre los TRs y los receptores del ácido retinoico

(RXRs) se encuentra bien documentada, conduce a un incremento de la afinidad de los TRs por los TREs y el consecuente incremento de la respuesta a la T3 (Zhang y Kahl, 1993).

Como se indicó previamente, los TRs ejercen efectos regulatorios sobre la expresión génica. Esto es posible gracias a la capacidad de los TRs de interactuar y unirse a proteínas co-reguladoras que ejercen efectos positivos sobre la expresión génica (Co-activadores/CoA) o que ejercen efectos negativos sobre la expresión génica (Co-represores/CoR). El primero de los CoA clonados fue el CoA del receptor de las hormonas esteroideas (SRC-1), le siguieron el SRC-2, el factor intermediario de la transcripción 2 (TIF2), la proteína que interactúa con el receptor de glutamato 1 (GRIP1), el SRC-3, la molécula activadora del receptor de la hormona tiroidea (TRAM-1), el CoA asociado al receptor 3 (RAC3), el activador del receptor de la hormona tiroidea (ACTR) y la proteína asociada al co-integrador p300/CBP (pCIP). Estos CoA poseen motivos LXXLL que les permiten interactuar con los TRs y otras proteínas tales como acetiltransferasas de las histonas que modifican la estructura de la cromatina facilitando la actividad transcripcional (Darimont y col., 1998). Entre los CoRs se puede encontrar a: el CoR del receptor nuclear (NCoR), el mediador de los efectos silenciadores de los receptores de la hormona tiroidea y el ácido retinoico (SMRT), la proteína Hairless, Alien, RIP-140 y SUN-CoR. Los CoRs interactúan a través de motivos (I/L)XX(I/V)I con los TRs y desacetilasas de histonas (HDAC3) que modifican la estructura de la cromatina compactándola y limitando la actividad transcripcional (Lazar, 2003).

Globalmente los efectos de las HTs se pueden explicar a través de la acción de sus receptores en ausencia o presencia de ligando. En el caso de existir interacción T3-TR una serie de CoA reclutarán proteínas que facilitarán la expresión génica mientras que en

ausencia de ligando serán los CoR los que interactuarán con proteínas accesorias que limitarán la expresión génica (**Figura I10**).



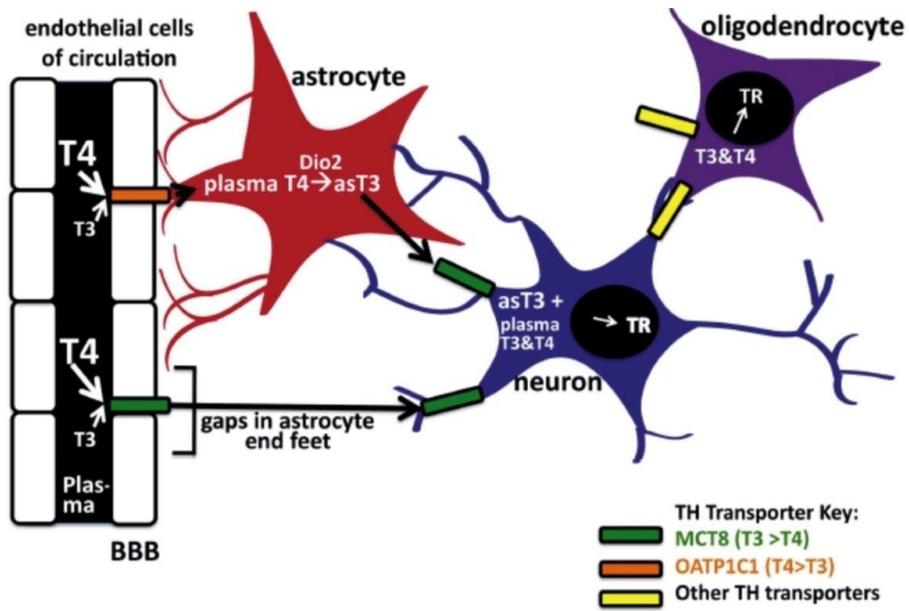
**Figura I10. Efectos ligando dependiente de los TRs sobre la expresión génica.** (A) En ausencia de ligando los TRs se encuentran unidos a los TREs y la interacción con CoR conduce al reclutamiento de proteínas accesorias que reprimen la expresión génica (B) En presencia de ligando la interacción TRs-T3 favorece la disociación de los CoR y la unión a CoA, los que a su vez reclutan proteínas accesorias que favorecen la expresión génica. (Endocr Rev. 2010 Apr; 31(2):139-70.)

### 3.3 El metabolismo de las Hormonas Tiroideas en el SNC.

Las HTs son indispensables para el normal desarrollo y funcionamiento del SNC, es por esto que los vertebrados han desarrollado múltiples mecanismos para asegurar que el contenido de las HTs en el SNC sea el adecuado. Entre estos mecanismos puede citarse: la regulación de la producción de HTs por la glándula tiroidea, la presencia de proteínas que unen HTs y regulan la concentración libre de hormona, la expresión celular característica de los distintos transportadores de membrana y de las deionidasas (Schroeder y Privalsky, 2014).

La barrera hemato-encefálica limita la libre difusión de las HTs hacia el interior del SNC. Consecuentemente las HTs deben ser transportadas por las células endoteliales de la

vasculatura nerviosa y posteriormente son volcadas al parénquima nervioso donde pueden difundir o a su vez ser rápidamente captadas por los astrocitos que se encuentran en estrecho vínculo con la vasculatura nerviosa. Este proceso ocurre gracias a la presencia de los transportadores anteriormente mencionados en las células endoteliales y astrocitos. La D2 (sintetiza T3 a partir de T4) se expresa en astrocitos y tanacitos (Tu y col., 1997), siendo los primeros los responsables de sintetizar y exportar la mayor parte de la T3 que se encuentra en el SNC. La presencia de la D2 en astrocitos junto con el hecho que los transportadores de HTs expresados por estos poseen mucha mayor afinidad por T4 que por T3 (Bernal y col., 2015) explicarían el papel central de los astrocitos como productores de T3 en el SNC. Por otra parte la D3 (sintetiza formas inactivas de las HTs a partir de T3) se expresa exclusivamente en neuronas, donde se cree que la acción inactivadora de la D3 protege al SNC de niveles suprafisiológicos de T3. En su conjunto la acción de neuronas y astrocitos ha sido postulada como un mecanismo de regulación de los niveles de T3 que previene de los efectos deletéreos que pueden causar el exceso o déficit de las HTs (Morte y Bernal, 2014) (**Figura I11**).



**Figura I11. Metabolismo de las hormonas tiroideas en el SNC.** (Front Endocrinol (Lausanne). 2014 Mar 31; 5: 40)

### **3.4 Las Hormonas Tiroideas como factores promotores de la maduración oligodendroglial y la mielinogénesis**

Como se indicó previamente las HTs son esenciales para que se produzca el correcto desarrollo y el funcionamiento adecuado del SNC. Es así que el desequilibrio del eje tiroideo tiene consecuencias negativas sobre el SNC y recientemente se ha vinculado a la glia con los efectos observados como consecuencia de las alteraciones del eje tiroideo (Noda, 2015).

El inicio de la maduración de los OPCs se encuentra regulado por una serie de factores extrínsecos que actúan promoviendo la maduración o por el contrario evitando que ésta ocurra. Consecuentemente, la remoción de un factor extrínseco que evita la maduración (Por ejemplo: PDGF-AA/bFGF) o el agregado de algún factor que la promueva (Por ejemplo: las HTs/Tf) tiene como resultado que los OPCs comiencen a expresar genes de la mielina y se conviertan en OLGs maduros. Aunque las HTs no son necesarias para que ocurra la maduración de los OPCs *in vitro*, el agregado de las HTs produce un incremento drástico en el número de OLGs maduros obtenidos *in vitro* (Barres y col., 1994; Ibarrola y col., 1996) lo cual pone en evidencia el rol de las HTs como inductores de la maduración de los OPCs. Los efectos de las HTs sobre la proliferación de los OPCs han sido objeto de debate durante años, sin embargo Barres y col., (1994) postularon que la proliferación y la diferenciación de los OPCs se encuentran reguladas por un mecanismo de reloj interno con dos componentes claros, uno de los cuales, es responsable de frenar la proliferación y tiene como efector a las HTs.

Estudios de microarray de ARNm mostraron que cuando las HTs inducen la maduración de los OPCs se produce el cambio en la expresión de una gran variedad de genes entre los que

se pueden nombrar genes de la mielina, factores de transcripción, genes relacionados al ciclo celular y a las histonas (Dugas y col., 2006). Dado que las HTs ejercen algunos de sus efectos a través de sus receptores nucleares, la presencia de TREs en los promotores de los genes diana explicarían los cambios observados en los niveles de ARNm de los genes diana. Experimentos de mapeo de los promotores de las proteínas de la mielina permitieron identificar la presencia de TREs únicamente en el gen de MBP (Farsetti et al., 1992), de lo que se deduce que existe una vía indirecta a través de la cual las hormonas tiroideas regulan la expresión génica. El trabajo de Dugas y col., (2012) demuestra que una de las vías indirectas de regulación de la expresión génica mediada por las hormonas tiroideas es a través del factor de transcripción similar a Krüppel 9 (KLF9). Los resultados de ese trabajo muestran que el KLF9 rápidamente inducido luego del tratamiento con T3, es necesario para que ocurra la maduración adecuada de los OPCs *in vitro* y disminuye el impacto sobre la pérdida de la mielina en el modelo de desmielinización inducida por cuprizona.

La maduración de los OLGs requiere de la acción de los TRs. Billion y col., (2002) demostraron que el TR $\alpha$ 1 es necesario para que ocurra una maduración adecuada. Sin embargo, recientemente Baxi y col., (2014) mostraron que un agonista selectivo para el TR $\beta$  es capaz de favorecer la maduración oligodendroglial *in vitro*, *in vivo* y acelerar la mielinización.

Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que en animales hipertiroideos se observa una mielinización acelerada (Adamo et al., 1990; Marta et al., 1998); probablemente como consecuencia de que las HTs inducen la maduración prematura de los OPCs. En estos animales se observó un a P10 un incremento de los ARNm de la CNPasa, la PLP y la MBP junto un el drástico incremento del ARNm de la Tf, que posteriormente experimentó una caída sustancial. Estos resultados muestran que la mielinización prematura

requiere que el contenido de Tf también se incremente prematuramente, lo que sugiere que la Tf podría ser inducida por las HTs como parte de una red de mecanismos que conducen a favorecer la maduración de los OLGs y subsecuente síntesis de la mielina.

## OBJETIVOS

## OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo fue investigar el papel combinado de la Tf y las HTs sobre la mielinización así como sobre la maduración oligodendroglial. Consecuentemente planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar *in vivo* los efectos de las HTs y la Tf sobre la mielinización así como la capacidad de la última de revertir los efectos deletéreos que el hipotiroidismo ejerce sobre la mielinización.
2. Evaluar los efectos de la Tf y las HTs sobre los mediadores de los efectos de las HTs durante la mielinización.
3. Evaluar la capacidad de la HT de ejercer efectos positivos sobre la maduración de los OPCs *in vitro* cuando se ha silenciado la expresión de la Tf.
4. Evaluar la capacidad de la Tf de ejercer efectos positivos sobre la maduración de los OPCs *in vitro* cuando se han bloqueado a TR $\alpha$ 1.
5. Evaluar el efecto del silenciamiento del ARNm de la Tf y el bloqueo del TR $\alpha$ 1 sobre la expresión de los mediadores de los efectos de las HTs y establecer si existe una relación causal entre ambos factores.

## MATERIALES Y MÉTODOS

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

Las siguientes drogas y reactivos fueron adquiridas en Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, Missouri, USA): apotransferrina humana (T1147, powder, BioReagent, suitable for cell culture,  $\geq 98\%$ ), apotransferrina de rata (T6013, apo-Transferrin from rat,  $\sim 98\%$ ), Tiyodotironina (T2752 3,3',5-Triiodo-L-thyronine sodium salt,  $\geq 95\%$  (HPLC)), poli-L-ornitina (P3655, Poly-L-ornithine hydrobromide, mol wt 30,000-70,000), N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) (T9281, BioReagent, suitable for electrophoresis,  $\sim 99\%$ ), dodecil sulfato de sodio (SDS), acrilamida, bis-acrilamida, azul de bromofenol, glicina, (hidroximetil) aminobutano (Tris), Coomasie brillant blue R-250, Triton X-100, Tween 20, paraformaldheído, bisBenzamida H 33258 (Hoescht), daminobencidina (DAB) (D8001, 3,3'-Diaminobenzidine,  $\geq 99\%$  HPLC), sulfato de níquel y amonio, MTT (bromuro de 3-(4,5-Dimetil-2-thiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazoilo) (M2128, 98%), penicilina, estreptomycin, glutamina, proteinasa K, 6-n-propil tiouracilo (PTU) (SIGMA - P3755 - 6-Propyl-2-thiouracil), hidróxido de sodio, N-[2-hidroxiethyl]piperazo-N'[2-ácido etano sulfónico] (HEPES), cloruro de calcio, "polybrene" (Polybrene®, SIGMA, 1,5-dimethyl-1,5-diazaundecamethylenepolymethobromide, hexadimethrine bromide), ácido etilendiamino tetracético (EDTA), fenol, cloroformo, alcohol isoamílico, dimetil sulfóxido (D2650, Dimethyl sulfoxide, Hybri-Max™, sterile-filtered, BioReagent, suitable for hybridoma,  $\geq 99.7\%$ ), Dimetilformamida.

Otros reactivos utilizados fueron: antagonista del TR $\alpha$ 1 (609315 | Thyroid Hormone Receptor Antagonist, 1-850 - CAS 251310-57-3 – Calbiochem), DMEM/F-12 (mezcla 1:1), HEPES [Gibco®] (Thermo Fisher Scientific, Cat: 11330032), suplemento B27 (B-

27<sup>®</sup> Supplement (50X), serum free, Gibco<sup>™</sup>, Thermo Fisher Scientific, Cat: 17504044), Mowiol<sup>®</sup> 4–88 (475904 | MOWIOL<sup>®</sup> 4-88 Reagent, Merck-Millipore), inhibidores de proteasas (Complete<sup>™</sup>), EGF (PeproTech Inc.), PDGF-AA (PeproTech Inc.), bFGF (Generosamente donado por el Dr. Baldi, IByME, Bs As), puromicina (Puromycin, InvivoGen), TRIzol<sup>®</sup> (Ambion<sup>®</sup>, Life Technologies, Invitrogen<sup>™</sup>), Quant-iT<sup>™</sup> OliGreen<sup>®</sup> ssDNA (Invitrogen<sup>™</sup>).

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-MBP (Generosamente cedido por el Dr. Campagnoni, UCLA, Estados Unidos), anti Anhidrasa Carbónica Tipo II (CAII) (Generosamente cedido por la Dra. W. Cammer, Albert Einstein College of Medicine, USA), anti-PDGFR $\alpha$  (Neuromics), anticuerpo anti OLG (RIP) (Millipore), Deshidrogenasa del Gliceraldehído-3-Fosfato (GAPDH) (abcam<sup>®</sup>), anti-Tf (GeneTex Inc., Serotransferrin antibody), anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa o flouoroforos (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.), anti- adenomatous polyposis coli (APC-CC1, abcam<sup>®</sup>)

## **Animales**

Se utilizaron ratas Wistar de entre 10 y 20 días de vida (P10-P20) y crías de entre 0 y 2 días de vida de las mismas. Para evaluar la expresión de la Tf en OLGs *in vivo*, se utilizaron ratones C57BL6J CNP::EGFP, de P5 a P15 (Cepa B6;FVB-Tg (CNP-EGFP/Rpl10a)JD368Htz/J) los cuales expresan la proteína verde fluorescente (EGFP) bajo el promotor de la CNPasa conduciendo de esta forma a la identificación de los OLGs como aquellas células que poseen fluorescencia verde (estos ratones fueron cedidos generosamente por el Dr. Vitorio Gallo, Center for Neuroscience Research, USA).

## **Inyección intracraneal de aTf**

Se utilizó una jeringa Hamilton de 10 µl con una aguja G28 personalizada para que no penetre más allá de 3 mm de profundidad. La inyección se realizó ligeramente por encima y entre los ojos (Bregma) a una dosis de 350 ng de aTf de rata/cerebro en un volumen de 5 µl de solución salina a pH 7,4. La inyección se realizó lentamente manteniendo la jeringa en su posición durante 1 minuto para evitar el reflujo de la aTf administrada y de acuerdo a protocolos previamente descritos (Escobar Cabrera y col, 1994).

## **Modelo de hipertiroidismo**

Se utilizó un modelo de hipertiroidismo neonatal previamente validado en el laboratorio (Marta y col., 1998). La triiodotironina (T3) se disolvió en solución fisiológica junto con el agregado de NaOH 0.1M, posteriormente se llevó la solución a pH 7,4. Los animales fueron inyectados subcutáneamente con 50 µl de solución según el siguiente esquema: el día del nacimiento los animales recibieron 5 µg de T3, el segundo día 2,5 µg de T3 y se alternó la administración de 0,5 µg de T3 los días de vida impares o 1,5 µg de T3 los días pares hasta el final del experimento.

## **Modelo de hipotiroidismo**

Se utilizó un modelo de hipotiroidismo neonatal, para ello se realizaron apareos de animales y se determinó la fecha de comienzo de la gestación evaluando la presencia de espermatozoides en hisopados vaginales. A partir del día gestacional 18 (G18) se administró PTU disuelto en el agua de bebida la que se ofreció *ad libitum* y fue renovada cada 2/3 días hasta el final del experimento (Gilbert y col., 2003). La elección del agente

anti-tiroideo PTU fue realizada en base a la capacidad del mismo de atravesar la circulación placentaria (Marchan y col., 1977) así como, de ser secretado en la leche materna (Gravina y col., 2007).

## **Inmunohistoquímica**

Los animales fueron anestesiados con ketamina 75 mg/kg y xilacina 10 mg/kg, recibieron 6000 UI/kg de heparina sódica y posteriormente fueron perfundidos a través del ventrículo izquierdo secuencialmente con PBS 1X y paraformaldehído 4% (PFA 4%)/PBS 1X. Los cerebros fueron disecados y fijados en PFA 4% durante toda la noche a 4°C. La criopreservación se llevó a cabo mediante la inmersión en sacarosa 30% p/v. A continuación se realizaron cortes coronales de 40 µm de espesor de los cerebros en un criostato Leica CM1850. La región anatómica a analizada corresponde a 0.84 mm respecto de Bregma según el Atlas Estereotáxico de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 1986).

Los cortes de tejido se lavaron con PBS 1X (pH 7.4), posteriormente se bloqueó durante 2 horas a temperatura ambiente (T.A.) con una solución compuesta por suero fetal bovino (SFB) 5%/Tritón X-100 0,3%/PBS 1X. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS 1X y se realizó la incubación con los anticuerpos primarios disueltos en SFB 2%/Tritón X-100 0,1%/PBS 1X durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-MBP (1:2000), anti-CAII (1:500), anti-PDGFr $\alpha$  (1:200) y anticuerpo RIP (1:400). Luego de 3 lavados se incubó con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con fluoróforos durante 2 horas a TA junto con el agente intercalante Hoechst 33258 (1 mg/ml). Los especímenes se montaron en portaobjetos con una solución del agente preservante de la fluorescencia Mowiol® 4–88 y se examinaron por microscopia de

epifluorescencia (Olympus BX50, Olympus, Japón) o confocal (Olympus FluoView™FV1000, Olympus, Japón).

En el caso del análisis de imágenes obtenidas por microscopía confocal, se utilizó el coeficiente de Manders para evaluar la co-localización (Manders y col., 1993). Este coeficiente arroja dos resultados (M1 y M2) comprendidos entre 0 y 1, correspondientes al grado de superposición de dos imágenes. Cada uno de estos coeficientes utiliza como molde inicial una de las imágenes y evalúa la superposición que presenta con la otra imagen. Valores de M1 y/o M2 superiores a 0.8 indican co-localización.

## **Extracción de ARN y RT-PCR**

En el caso de los experimentos realizados *in vivo*, se procedió a anestesiarse a los animales de la manera en que fue mencionada anteriormente y se realizó la perfusión a través del ventrículo izquierdo únicamente con PBS 1X. Se extrajeron los cerebros y se los dividió en sus dos hemisferios, uno de ellos se utilizó para la obtención de proteínas y el otro para ARN. En el caso de experimentos *in vitro*, se realizó la extracción de ARN directamente a partir de los pocillos de las placas en las que fueron cultivadas las células como se indicará más adelante.

La extracción de ARN se realizó con TRIzol® de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La cuantificación se realizó de manera espectrofotométrica con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Posteriormente se examinó la integridad del ARN en geles de agarosa (Masek y col., 2005). A continuación se llevó a cabo la retrotranscripción de los ARNm utilizando la retrotranscriptasa del Virus de la Leucemia Murina (M-MLV) y “Oligo d(T)” como cebadores.

Se utilizó 1 µg de ARN y se lo incubó según las recomendaciones del fabricante (M-MLV, Promega, Madison, Estados Unidos). Las muestras de ADN copia (ADNc) fueron sometidas a la degradación del ARN y precipitación del ADNc; mediante la incubación de las muestras de ADNc con NaOH 1M a 65°C durante 30 min seguido de neutralización con HEPES 2M y finalmente precipitación con etanol. El ADNc fue cuantificado espectrofluorométricamente con el reactivo Quant-iT™ OliGreen® ssDNA (Invitrogen™). Las muestras de ADNc fueron utilizadas para evaluar la expresión de distintos genes. Esto se llevó a cabo de manera cuantitativa y semi-cuantitativa. Para el caso de las reacciones cuantitativas se realizó una PCR en tiempo real utilizando 10 ng de ADNc en un termociclador “Stratagene Mx3005P qPCR System” (Stratagene Corp.). Las muestras se incubaron con 0.4 µM de los cebadores correspondientes, 1.25 U de Platinum® TaqDNA polymerase (Invitrogen™), 0.3X SYBR® Green I Nucleic Acid GelStain (Invitrogen™), 0.05X ROX “Reference Dye” (Invitrogen™), mezcla de dNTPs 0.3 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM y con las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización inicial 4 min a 94°C y 40 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 60°C, 30s a 72°C seguidos de una elongación final 3 min a 72°C. Los resultados fueron analizados por el método de los C<sub>T</sub> comparativos utilizando como gen para la normalización a HPRT con el software asociado Mx Pro-Mx3005P v 4.10 (Stratagene Corp.).

En el caso de reacciones semi-cuantitativas se realizó PCR a punto final utilizando 30 ng de ADNc y las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler Personal 5332 en presencia de 0.5 µM de los cebadores correspondientes, 1.25U GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison, Estados Unidos), mezcla de dNTPs 0.3 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM con las siguientes condiciones de ciclado: Desnaturalización inicial 4 min a 94°C y 40 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 60°C, 30s a 72°C seguidos de una elongación final 3

min a 72°C. Una vez realizadas las reacciones de PCR, los productos fueron separados en geles de agarosa al 2% teñidos con Bromuro de Etidio 0.5 µg/ml. Los geles fueron fotografiados la D.O. analizada con el software Gel Pro 4 software (Media Cybernetic, Bethesda, MD, USA).

Los cebadores específicos utilizados fueron los siguientes: Deshidrogenasa del Gliceraldehído 3 fosfato (GAPDH. NM\_017008.4): Directo CTTACTCCTTGGAGGCCATG, Reverso TTAGCCCCCCTGGCCAAGG. Hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HPRT. NM\_012583.2): Directo TTCCTCCTCAGACCGCTTTTC, Reverso GGA CTGAGGGTTCGACATGACA. IGF-I (NM\_001082477.2, NM\_178866.4, NM\_001082478.1, NM\_001082479.1): Directo TGTTCCCTCGGGAGGCTCCTCCTA; Reverso CGCTCTTCAGTTCGTGTGTGGACC. Receptor del Factor de Crecimiento Símil a Insulina I (IGF-IR, NM\_052807.2): Directo CCAGGGCCTGTCCAACGAGC; Reverso CGGAGAACCAGCACGCCAGG. KLF9 (NM\_057211.1) previamente descrito por Dugas y col., 2012: Directo TCCGGAACTTTCAAACCTTG; Reverso GTGTGCCAAACAGAATGTTCG. Tf (NM\_001013110.1): Directo CCTCAAAGTGGCTCAGGAACA; Reverso AGGAGAGCCGAACAGTTGGA; TRα1 (NM\_001017960.1): Directo TTCAGCGAGTTTACCAAGATCATCAC; Reverso TTAGACTTCCTGATCCTCAAAGACCT. TRβ1/TRβ2 (NM\_012672.3/NM\_001270854.1): Directo AAGTTGCCCATGTTTTGTGAG; Reverso TCACTGCCATTTCCCATTC. Los genes utilizados para realizar la normalización, según se indicará en cada caso, fueron GAPDH o HPRT.

## **Extracción de proteínas y western blot:**

Para obtener proteínas en los experimentos *in vivo*, se sacrificó a los animales de la manera previamente indicada y se los perfundió únicamente con PBS 1X para posteriormente disecar el cerebro. Un hemisferio por animal fue utilizado para extraer proteínas procediendo a la disgregación y homogenización del mismo en buffer “Totex” (HEPES 20mM pH 7.4, NaCl 350 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, EDTA 0.5 mM, Igepal 1%, Glicerol 20%, DTT 5 mM) junto con el agregado de inhibidores de proteasas. En los experimentos *in vitro* las células fueron enjuagadas con PBS 1X, luego se agregó buffer “Totex” con inhibidores de proteasas y se colectó la suspensión. Las suspensiones obtenidas se incubaron en hielo durante 30 min con agitación cada 5 min y luego fueron centrifugadas durante 10 min a 10.000 r.p.m. El contenido proteico se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Los distintos extractos proteicos (entre 10 y 40 µg de proteína) fueron sometidos a SDS-PAGE y posteriormente electrotransferidos a membranas de PVDF. Se llevó a cabo el bloqueo durante toda la noche a 4°C con una solución al 5% de leche descremada en buffer tris-salino (TBS)/0.1% Tween 20. Al día siguiente las membranas se incubaron 2 horas a temperatura ambiente en agitación con las diluciones de los distintos anticuerpos primarios en solución de bloqueo. Luego de 3 lavados con TBS durante 5 minutos cada uno, las membranas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente en agitación con las diluciones de los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con la peroxidasa del rábano picante (HRP) en solución de bloqueo. Luego de 3 lavados con TBS durante 5 minutos cada uno, se procedió al revelado colorimétrico. La reacción colorimétrica se llevó a cabo sumergiendo la membrana en una solución conteniendo 3-3´diaminobencidina (DAB) 0.05%, NiSO<sub>4</sub> 1%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1% en buffer acético/acetato 0.1 M

pH 5.5. Posteriormente las membranas fueron enjuagadas con TBS, secadas y digitalizadas ópticamente. La determinación de las densidades ópticas se realizó con el software Gel-Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics Inc.) utilizando como proteína de normalización de carga a GAPDH.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-GAPDH (1:10000), anti-Tf (1:1000) y anti MBP (1:4000). Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa se utilizaron en una dilución 1:5000 (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.)

## **Cultivos de Células Precursoras Neurales derivadas de la Zona Subventricular**

Estos cultivos se prepararon a partir de crías de rata Wistar de hasta dos días de vida a las que se sacrificó por decapitación previa anestesia y se removió el cerebro. Posteriormente se disecó y disgregó mecánicamente la ZSV en DMEM/F-12 (mezcla 1:1), suplementado con B27 1X y glutamina 30µg/ml utilizando 2 cerebros por ml de medio. Una vez disgregadas las ZSV, fueron cultivadas en botellas T25 (Greiner Bio-One (GBO)) a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% en el medio indicado suplementado con los mitógenos EGF 10 ng/ml y bFGF 10 ng/ml durante 7 días hasta la aparición de esferas. En ese momento se procedió a la disociación mecánica de las esferas y se cultivó durante 7 días adicionales en las condiciones indicadas. Posteriormente las células fueron disociadas y sembradas acorde a los requerimientos de cada experimento plateando en cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro así como en placas pocillos múltiples previamente tratadas con poli-L-ornitina 0.1 mg/ml como sustrato de adhesión. Luego de la siembra, las células fueron cultivadas durante 48 hs en DMEM/F-

12 (mezcla 1:1), suplementado con B27 1X, glutamina 30µg/ml, bFGF 10 ng/ml y PDGF-AA 10 ng/ml y utilizadas en diversos ensayos.

## **Preparación de retrovirus portadores de shARNs**

El silenciamiento de la expresión del ARNm de la Tf se llevó a cabo mediante shARNs. Los shARNs fueron diseñados por complementariedad con distintas regiones del ARNm de la Tf de rata (NM\_001013110.1). Secuencias de 19 nt fueron clonadas dentro del vector pSUPER.retro.puro (OligoEngine<sup>®</sup>, Inc.) que posee un gen que confiere resistencia al antibiótico aminonucleósido Puromicina para poder seleccionar mediante el agregado de dicho antibiótico aquellas células que hayan incorporado el vector y consecuentemente la secuencia codificante para los distintos shARNs. Para identificar aquellos vectores que habían incorporado los oligonucleótidos, se transformaron bacterias DH5α competentes y se realizaron PCRs a partir de las distintas colonias obtenidas. Mediante PCR y utilizando los cebadores indicados por el fabricante, se pudo seleccionar aquellas colonias que contenían los plásmidos que habían incorporado los oligonucleótidos. Posteriormente se secuenciaron dichos plásmidos y se corroboró que los oligonucleótidos hayan sido incorporados de manera correcta además de no presentar mutaciones.

La transferencia de los vectores codificantes para los distintos shARNs se realizó mediante infecciones con retrovirus. Se utilizaron dos secuencias que presentan homología con el ARNm de la Tf de rata: Secuencia 1 (Sec1) GCTCCGAACAACAGAGAGG, Secuencia 2 (Sec2) GGCTGACAGGGATCAATAT y una secuencia que carece de homología con ningún ARNm de rata, Control negativo o “Scramble” (Scr) GAAACTGCTGACCGTTAAT.

Para obtener las partículas retrovirales portadoras de los distintos shARNs, se utilizó la línea celular “empaquetadora” HEK293T (ATCC® CRL-3216™) y un sistema de empaquetamiento de segunda generación introduciendo de manera simultánea cada uno de los plásmidos portadores de shARNs junto con los plásmidos pGAG (empaquetador) y pVSV-G (plásmido que codifica la proteína de la envoltura). Las células fueron cultivadas en DMEM F-12/SFB10% hasta alcanzar 100% de confluencia y posteriormente sembradas a un 70% de confluencia. Se preparó una mezcla conteniendo 10 µg de pSUPER.retro.puro, 8µg de pGAG y 5 µg de pVSV-G en un volumen de 438 µl a los que se les agregó 62 µl de CaCl<sub>2</sub> 2M; posteriormente se agregó con agitación constante 500 µl de HBSS 2X y se dejó reposar durante 5 min a TA. La mezcla de reacción fue agregada a las células que fueron cultivadas a 37°C y CO<sub>2</sub> 5% durante 16 hs, momento en que el medio de cultivo fue renovado. Los sobrenadantes conteniendo partículas retrovirales fueron cosechados a las 24, 48,72 hs después del agregado de medio fresco y las partículas virales presentes en los sobrenadantes concentradas mediante ultracentrifugación (2 h a 25,000 r.p.m. en un rotor SW28 (82,700g) y 4°C) de acuerdo al protocolo publicado por Kutner y col., (2009) obteniéndose concentrados virales de  $1-2 \times 10^{10}$  TU/ml.

### **Silenciamiento de la expresión del ARNm de la Transferrina**

Se realizaron cultivos de CPNs como se describió previamente. Las células fueron disociadas a los 7 días y colocadas en placas de 6 pocillos múltiples ( $5 \times 10^5$  células/pocillo) para la transducción. A continuación se agregó el polímero con carga positiva que favorece la adhesión de las partículas virales a las células “polybrene” en una concentración de 1 µg/ml. Se agregó 1 µl de cada uno de los concentrados virales y se cultivaron las células a

37°C y CO<sub>2</sub> al 5% en DMEM F-12/B27 suplementado con EGF 10 ng/ml y bFGF 10 ng/ml. A las 24 hs se realizó una segunda infección con 1 µl de los concentrados virales y se cultivó como ya se indicó durante 24 hs. Pasadas las 24 hs del segundo pulso de transducción se renovó el medio de cultivo, se agregó puromicina 1 µg/ml y se cultivaron las células durante 3 días a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% en DMEM F-12/B27 1X suplementado con EGF 10 ng/ml y bFGF 10 ng/ml. Posteriormente se disociaron las células, se sembraron en placas multipocillo o cubreobjetos circulares previamente tratados con poli-L-ornitina 0.1 mg/ml, se cultivaron a 37°C/CO<sub>2</sub> 5% en DMEM/F-12/B27, glutamina 30µg/ml, bFGF 10 ng/ml y PDGF-AA 10 ng/ml durante 48 hs. Adicionalmente las células se cultivaron durante 3 días a 37°C/CO<sub>2</sub> 5% en medio libre de mitógenos.

### **Extracción de ADN y comprobación de la integración del genoma viral en el genoma de la célula huésped**

Dado que los retrovirus con los distintos shARNs de la Tf integran su genoma en el genoma del huésped, se evaluó la presencia del ADN viral en el ADN de las CPNs luego de haber realizado las infecciones y cultivado las células durante 8 días. Para extraer el ADN genómico se utilizó el protocolo propuesto por Current Protocols in Molecular Biology, sección 2.2.1 con ligeras modificaciones. Se sembraron 5 10<sup>5</sup> células/pocillo en una placa de 6 pocillos múltiples y se cultivaron como se indicó en el apartado anterior. Se realizaron lavados con PBS 1X y se colectaron las células en 0.3 ml de buffer de digestión (NaCl 100 mM, Tris·Cl 10 mM pH 8, EDTA 25 mM pH 8, SDS 0.5% y Proteinasa K 0.1 mg/ml). Se incubó en agitación a 50°C durante 1 hs, se agregó 0.3 ml de una mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) y se centrifugó 10 min a 1700 x g.

Luego se precipitó el ADN de la fase acuosa por agregado secuencial de acetato de amonio y etanol 100%. A continuación se degradó química/térmicamente el ARN como se indicó en el apartado de “**Extracción de ARN y RT-PCR**” y se procedió a realizar la cuantificación espectrofotométrica del ADN con un espectrofotómetro NanoDrop 2000.

Una vez obtenido y cuantificado el ADN genómico de las CPNs se procedió a analizar la presencia del genoma viral en el mismo. Para ello se realizó PCR a punto final con cebadores específicos para el vector pSUPER.retro.puro que poseen homología con secuencias que se encuentran comprendidas dentro secuencias largas repetidas en tándem (LTRs) utilizadas por los virus como señales de integración al genoma del huésped. La secuencia de los cebadores fue: Directo GGAAGCCTTGGCTTTTG, Reverso CGAACGCTGACGTCATC. Se utilizaron 10 ng de ADN y las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler Personal 5332 en presencia de 0.5µM de los cebadores correspondientes, 1.25U GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison, Estados Unidos), mezcla de dNTPs 0.3 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM con las siguientes condiciones de ciclado: Desnaturalización inicial 4 min a 94°C y 40 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 60°C, 30s a 72°C seguidos de una elongación final 3 min a 72°C. Una vez realizadas las reacciones de PCR, los productos fueron separados en geles de agarosa al 2% teñidos con Bromuro de Etidio. Los geles fueron fotografiados la D.O. analizada con el software Gel Pro 4 software (Media Cybernetic, Bethesda, MD, USA).

## **Inhibición química de los efectos del Receptor $\alpha 1$ de las Hormonas Tiroideas**

Se utilizó el inhibidor del receptor alfa de las HTs (1-850), el cual es soluble en DMSO. En primera instancia se llevó a cabo la evaluación de la toxicidad del DMSO sobre las CPNs, Para ello, CPNs disociadas se sembraron en placas de 48 pocillos múltiples previamente tratadas con poli-L-ornitina 0.1 mg/ml. A continuación se cultivó las CPNs durante 6 días a 37°C/CO<sub>2</sub> 5% en DMEM F-12/B27 1X, glutamina 30µg/ml en presencia de distintas concentraciones de DMSO y se evaluó mediante MTT el efecto sobre la viabilidad celular como se explica en el siguiente apartado.

En una segunda etapa se evaluó el efecto del inhibidor del TR $\alpha 1$  sobre la maduración oligodendroglial. Para ello se realizaron cultivos de CPNs, luego de 14 días se disociaron las células y se sembraron en placas 6 pocillos múltiples o cubreobjetos circulares previamente tratados con poli-L-ornitina 0.1 mg/ml. Las células fueron cultivadas en presencia del inhibidor del inhibidor 1-850 3 µMa 37°C/CO<sub>2</sub> 5% en DMEM F-12/B27 1X, Glutamina 30µg/ml durante 6 días, renovando el medio cada 2 días.

### **Ensayo de MTT**

El ensayo de MTT se realizó de acuerdo con el protocolo publicado por Hansen y col., 1989. Para ello se cultivaron CPNs y se sembraron en placas de 48 pocillos múltiples previamente tratadas con poli-L-ornitina 0.1 mg/ml. Las células se incubaron con MTT 1 mg/ml durante 2 hs a 37°C y CO<sub>2</sub> 5%. A continuación se extrajeron los cristales de Formazan insolubles con una solución de Dimetilformamida 50%/SDS 20% pH 4.8 durante 15 minutos. Posteriormente se transfirió el contenido de cada pocillo a una placa

de 96 pocillos múltiples y se midió la D.O. a 570 nm en un lector de placas Amersham Biotrack™ II Visible Plate Reader.

## **Inmunocitoquímica**

Se realizó en células cultivadas en cubreobjetos circulares previamente tratados con poli-L-ornitina 0.1 mg/ml. Las mismas fueron fijadas con solución tamponada de PFA 2% durante 20 min. Los cubreobjetos se lavaron con PBS 1X (pH 7.4), posteriormente se bloqueó durante 2 horas a TA con una solución compuesta por suero fetal bovino (SFB) 5%/Triton X-100 0,3%/PBS 1X. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS 1X y se realizó la incubación con los anticuerpos primarios disueltos en SFB 2%/Triton X-100 0,1%/PBS 1X durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-MBP (1:400), anti-PDGFR $\alpha$  (1:200), anti-APC (CC-1) (1:200). Luego de 3 lavados se incubó con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con fluoróforos durante 2 horas a TA junto con el agente intercalante Hoechst 33258 (1 mg/ml). Los especímenes se montaron en portaobjetos con una solución del agente preservante de la fluorescencia Mowiol® 4–88 y se examinaron por microscopia de epifluorescencia (Olympus BX50, Olympus, Japón).

## **Análisis estadístico**

El análisis entre más de dos grupos fue realizado mediante Análisis de la Varianza (ANOVA) seguido por análisis posterior de Newman-Keuls. En el caso de comparaciones entre dos grupos se realizó test t de Student. Los resultados se expresan como el promedio de por lo menos 3 experimentos  $\pm$  el desvío estándar.

## RESULTADOS

## **RESULTADOS**

### **1. LOS EFECTOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS Y DE LA TRANSFERRINA SOBRE LA MIELINIZACIÓN**

#### **1.1 La Transferrina y las Hormonas Tiroideas favorecen la mielinización:**

Estudios previos de nuestro laboratorio establecieron que en un modelo de hipertiroidismo perinatal se produjo el incremento prematuro de la expresión de distintos ARNm de proteínas de la mielina y del ARNm de la Tf (Marta y col., 1998), sugiriendo que la Tf podría ser un mediador de los efectos positivos de las HTs sobre la milinización. Para profundizar en este estudio se evaluó el efecto de la Tf durante el estado de hipotiroidismo. Los modelos experimentales utilizados fueron: animales a los que se les indujo hipertiroidismo perinatal (Hiper), hipotiroidismo perinatal (Hipo), administración intracraneal de 350 ng de apoTf a los 3 días de edad (P3) a animales eutiroideos (aTf<sub>ic</sub>) e hipotiroideos (Hipo + aTf<sub>ic</sub>). Los animales Control (Ctrol) recibieron a P3 una inyección intracraneal se solución salina.

Inicialmente se evaluó el peso de los cerebros, el peso corporal y el contenido sérico de T3 a los 10 (P10) y 20 (P20) días de vida. En animales P10 no existieron diferencias en los pesos corporales entre de los distintos grupos experimentales pero si se registraron diferencias en los pesos de los cerebros, mostrando los animales Hiper una disminución del 15% y los animales Hipo un incremento del 9% al comparar ambos grupos con animales Ctrol. El incremento observado en animales Hipo no fue revertido por la administración intracraneal de aTf. En el caso de animales P20 se observaron diferencias en los pesos corporales y los pesos de los cerebros entre los distintos grupos experimentales. Los animales Hiper mostraron una disminución del 19% del peso corporal en comparación con

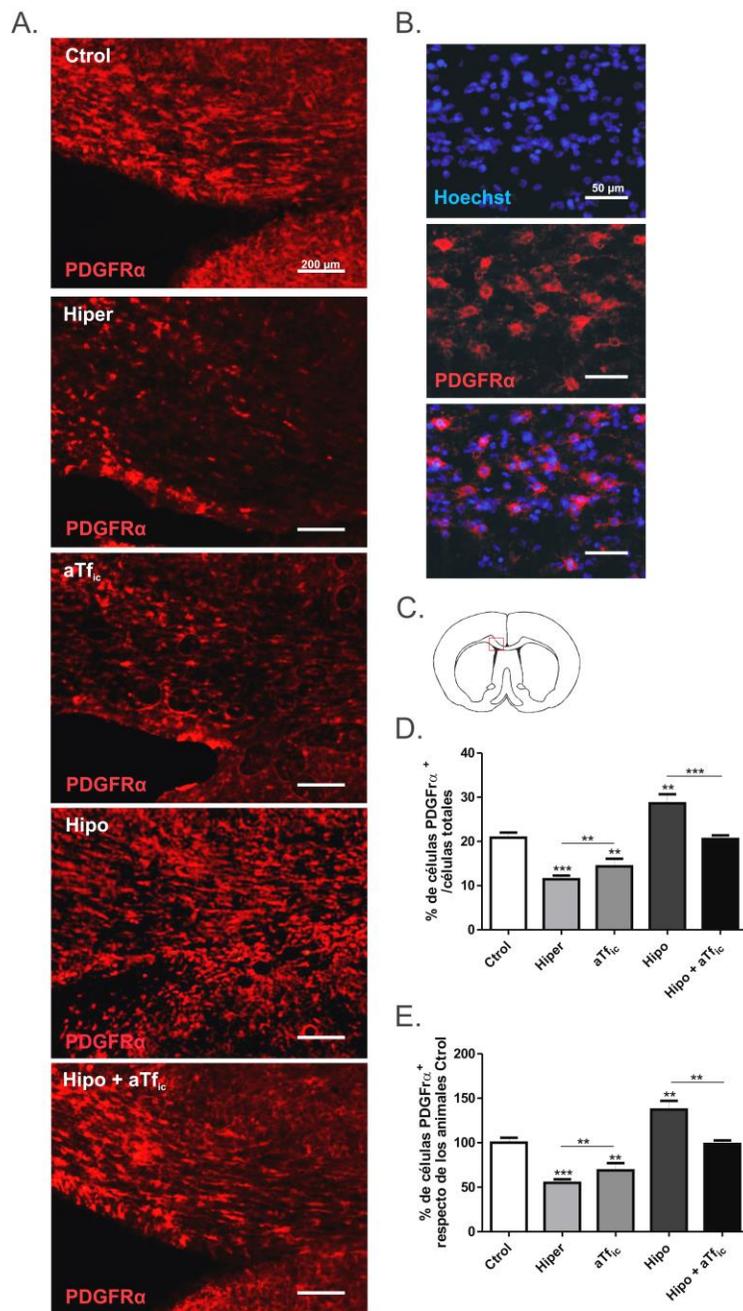
animales Ctról y los animales Hipo una disminución del 13% en comparación con animales Ctról. El análisis del peso de los cerebros a P20 mostró que los animales Hiper presentaban una disminución del 12% en comparación con los animales Ctról y los animales Hipo un incremento del 18%, no siendo este último incremento revertido por la administración intracraneal de aTf. El análisis de los niveles séricos de T3 mostró que tanto a P10 como a P20 los animales Hiper presentaban un incremento de dichos niveles en comparación con los animales Ctról (incremento de 4.9 veces en P10 y 3.4 veces en P20), así como a las mismas edades los animales Hipo presentaban una disminución en comparación con los animales Ctról (disminución de 2.3 veces en P10 y 3.3 veces en P20) (**Tabla 1**).

**Tabla1.** Pesos corporales, pesos de los cerebros y contenido sérico de triiodotironina (T3). Comparaciones realizadas respecto de animales Ctról. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

Grupo	T3 total (ng/ml)		Peso corporal (gr)		Peso de los cerebros (gr)	
	P10	P20	P10	P20	P10	P20
Ctról	121.8±1.7	176.8±2.6	20,1±1,7	37, 9±2,4	0,878 ± 0,039	1,090±0,043
Hiper	600 ***	600 ***	19,4±2,4	30, 9±1,7***	0,772 ±0,048**	0,932±0,032***
Hipo	52.7±2.2 ***	53.3±1.7 ***	20,0±0,7	33,0±2,0***	1,044 ± 0,033***	1,196±0,025***
Hipo + aTf <sub>ic</sub>			19,7±1,5	31,7±1,7***	1,028 ± 0,066***	1,136±0,037**

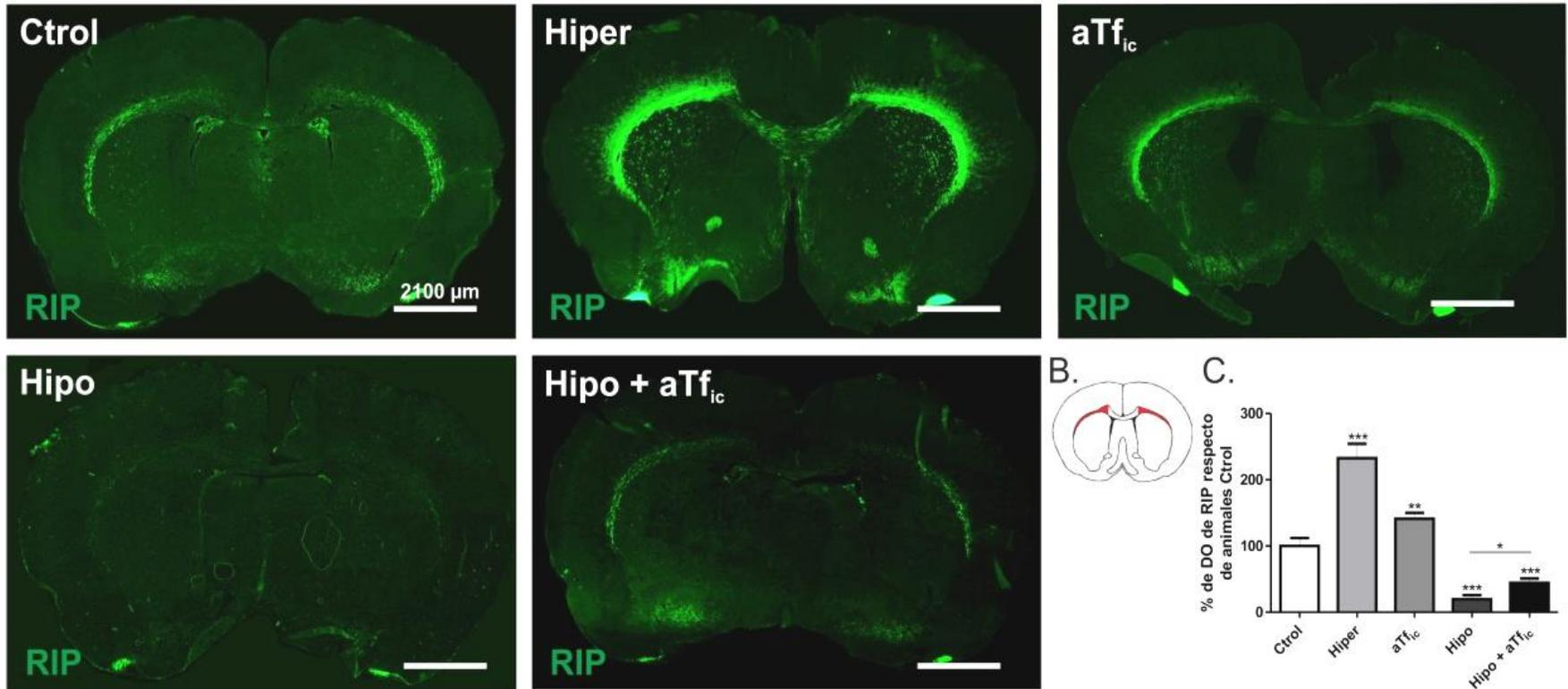
El estudio de la mielinización en los distintos grupos experimentales se llevó a cabo mediante inmunohistoquímica con anticuerpos que reconocen marcadores celulares característicos de distintos estadios madurativos de los OLGs. La estructura utilizada para el estudio fue el cuerpo calloso dado que es rico en mielina y por ende OLGs. Inicialmente se estudió el grado de mielinización de animales P10. Se evaluó la cantidad de OPCs PDGF $\alpha^+$  presentes en el cuerpo calloso de los distintos grupos de experimentales y se observó que los animales Hiper y aTf<sub>ic</sub> presentaron una disminución en el número de

células inmaduras respecto de los animales Ctról (40% y 25% respectivamente). Contrariamente, los animales Hipo mostraron un incremento del 25% en el contenido de OPCs en comparación con los animales Ctról. En el caso de animales hipotiroideos la administración intracraneal de 350 ng aTf (Hipo + aTf<sub>ic</sub>), afectó el número de OPCs presentes en el cuerpo calloso en comparación con animales Hipo, dando lugar a cantidades similares de OPCs entre animales Hipo + aTf<sub>ic</sub> y Ctról (**Figura R1**). Posteriormente se estudió la presencia de OLGs inmaduros en el cuerpo calloso mediante la inmunomarcación de los mismos con el anticuerpo RIP. Se observó un incremento de la inmunomarcación de RIP en el cuerpo calloso de animales Hiper y aTf<sub>ic</sub> (132% y 35% respectivamente) en comparación con animales Ctról. En el caso de animales Hipo se observó una disminución del 56% de la marcación con el anticuerpo RIP en comparación con animales Ctról. La dramática caída en la inmunomarcación con el anticuerpo RIP de animales Hipo fue parcialmente revertida por la administración intracraneal de aTf, siendo la intensidad de la inmunomarcación para RIP en cuerpo calloso un 24% superior en animales Hipo + aTf<sub>ic</sub> en comparación con animales Hipo (**Figura R2**).



**Figura R1. Inmunomarcación de OPCs PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> en cuerpo calloso de animales P10.** (A) Imágenes representativas de cada una de las condiciones experimentales. (B) Imágenes en alta magnificación de células PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>. (C) Esquema representativo de la zona analizada en las inmunomarcaciones. (D) Cuantificación de las células PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>. (E) Cuantificación del cambio porcentual respecto del grupo Ctrl. Los asteriscos representan la significancia estadística respecto del grupo Ctrl y las barras indican comparaciones entre grupos. \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ .

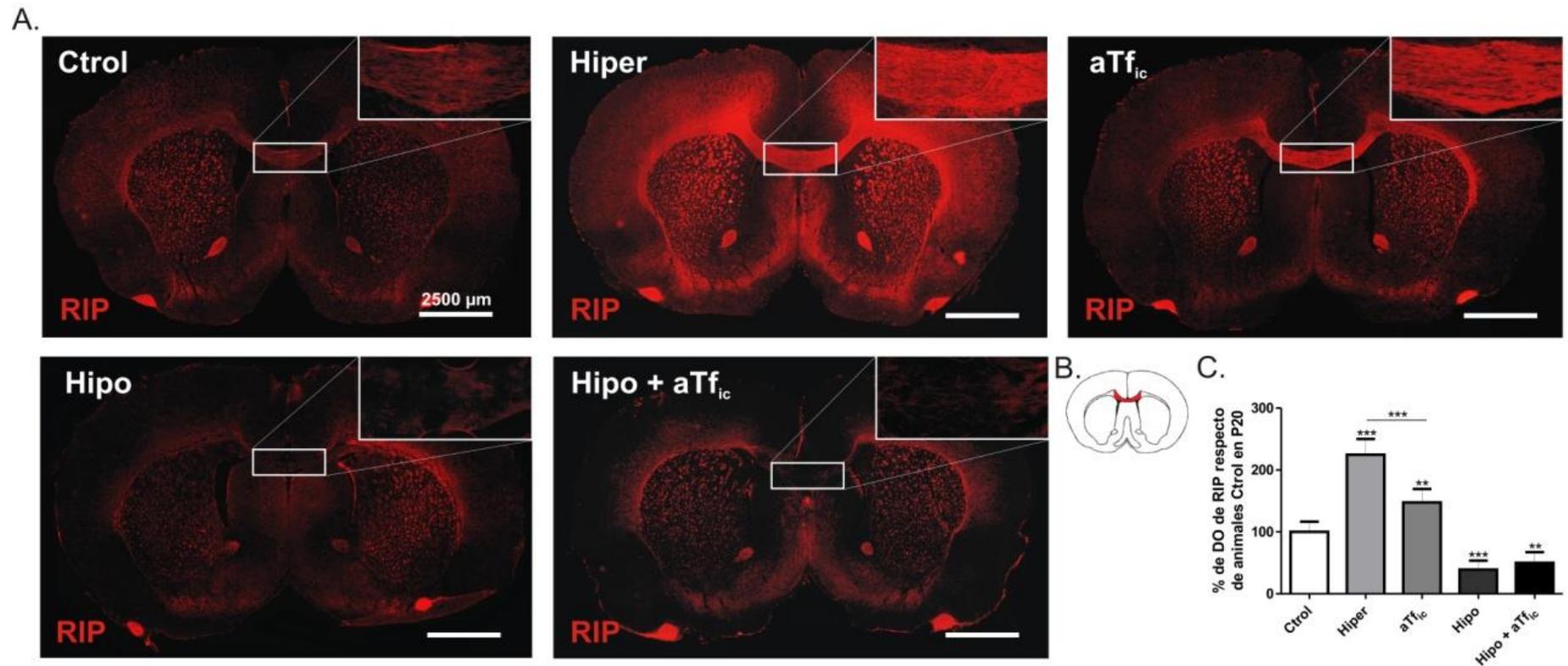
A.



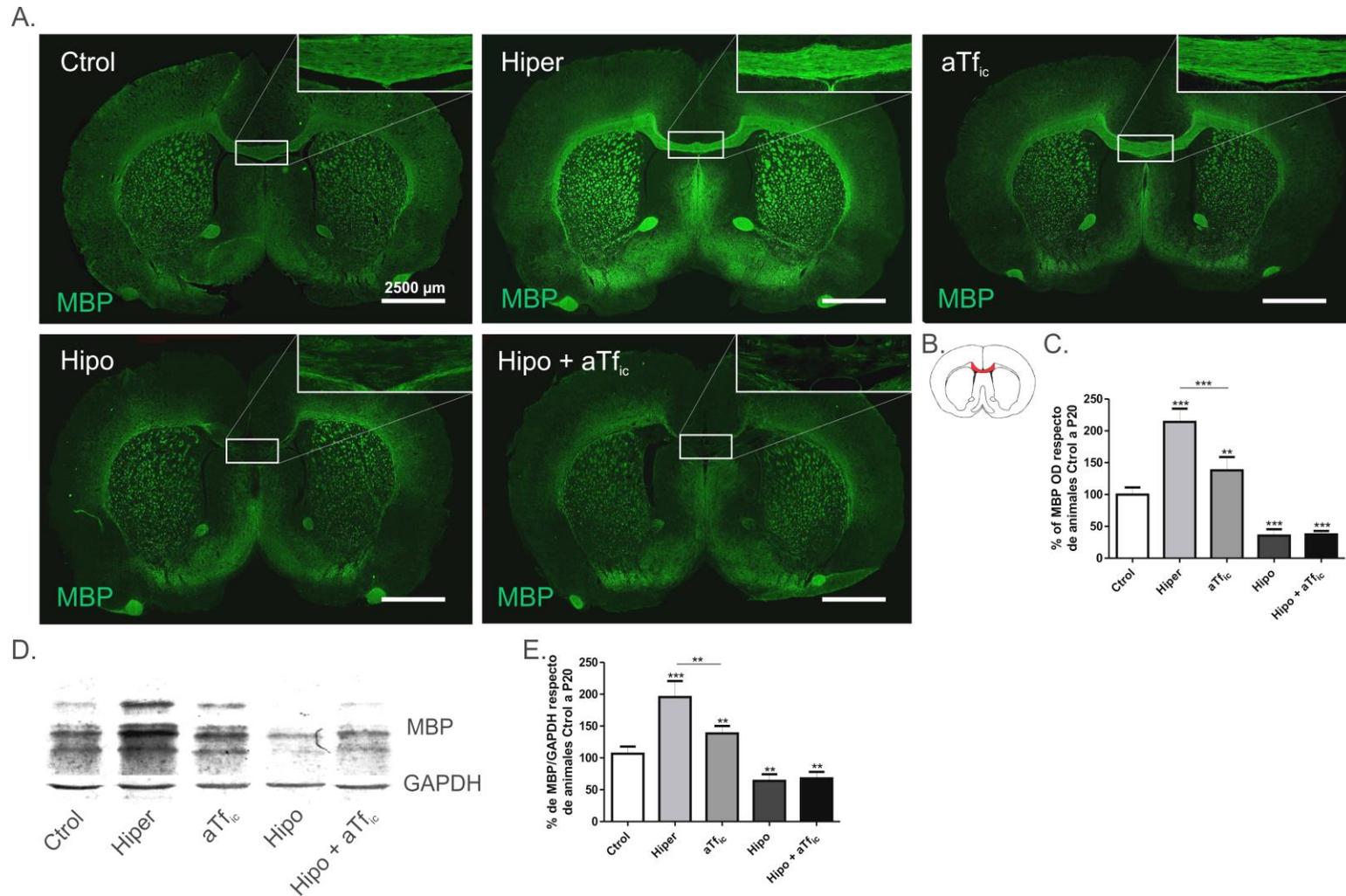
**Figura R2. Immunomarcación de OLGs en cuerpo calloso de animales P10 utilizando el anticuerpo RIP.** (A) Imágenes representativas de cada una de las condiciones experimentales. (B) Esquema representativo de la zona analizada en las inmunomarcaciones. (C) Cuantificación de la intensidad de densidad óptica IOD de la marcación con RIP expresada como porcentaje respecto de los animales Ctrol. Los asteriscos representan la significancia estadística respecto del grupo Ctrol y las barras indican comparaciones entre grupos. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ .

Posteriormente evaluamos el grado de mielinización del cuerpo calloso en animales P20 con el anticuerpo RIP y anticuerpos que reconocen estadios madurativos avanzados de los OLGs tales como MBP y CAII. Con el anticuerpo RIP se observó que los animales Hiper y aTf<sub>ic</sub> presentaban un incremento en la intensidad de la inmunomarcación (128% y 48% respectivamente) en comparación con los animales Ctr<sub>ol</sub>. El mismo tipo de análisis mostró que los animales Hipo presentaban una caída del 61% en la intensidad de la inmunomarcación de RIP y en este caso la administración intracraneal de aTf fue incapaz de revertir el déficit en la inmunomarcación de RIP observado en animales Hipo (**Figura R3**). A continuación se evaluó el grado de mielinización del cuerpo calloso y el cerebro entero de los animales pertenecientes a los distintos grupos experimentales usando inmunomarcaciones con un anticuerpo anti MBP y western blot con el mismo anticuerpo. La intensidad de la inmunomarcación de MBP se encontró incrementada (114% y 38% respectivamente) en el cuerpo calloso de animales Hiper y aTf<sub>ic</sub> en comparación con animales Ctr<sub>ol</sub>. Contrariamente, en animales Hipo la intensidad de la inmunomarcación para MBP en el cuerpo calloso se encontró disminuida un 64% en comparación con animales Ctr<sub>ol</sub> y la administración intracraneal de aTf a animales hipotiroideos no mostró cambios significativos en la intensidad de la inmunomarcación de respecto de animales Hipo (**Figura R4-ABC**). El análisis por western blot del contenido de MBP de cerebros totales mostró el mismo patrón de cambios observados mediante inmunomarcación en cuerpo calloso. Los animales Hiper y aTf<sub>ic</sub> mostraron un incremento del contenido de MBP (68% y 38% respectivamente), mientras que en los animales Hipo se observó una disminución del 42% en el contenido de MBP en comparación con animales Ctr<sub>ol</sub> y no se observaron diferencias significativas del contenido de MBP entre animales Hipo e Hipo + aTf<sub>ic</sub> (**Figura R4-DE**). Por último se determinó la cantidad de OLGs maduros en el cuerpo

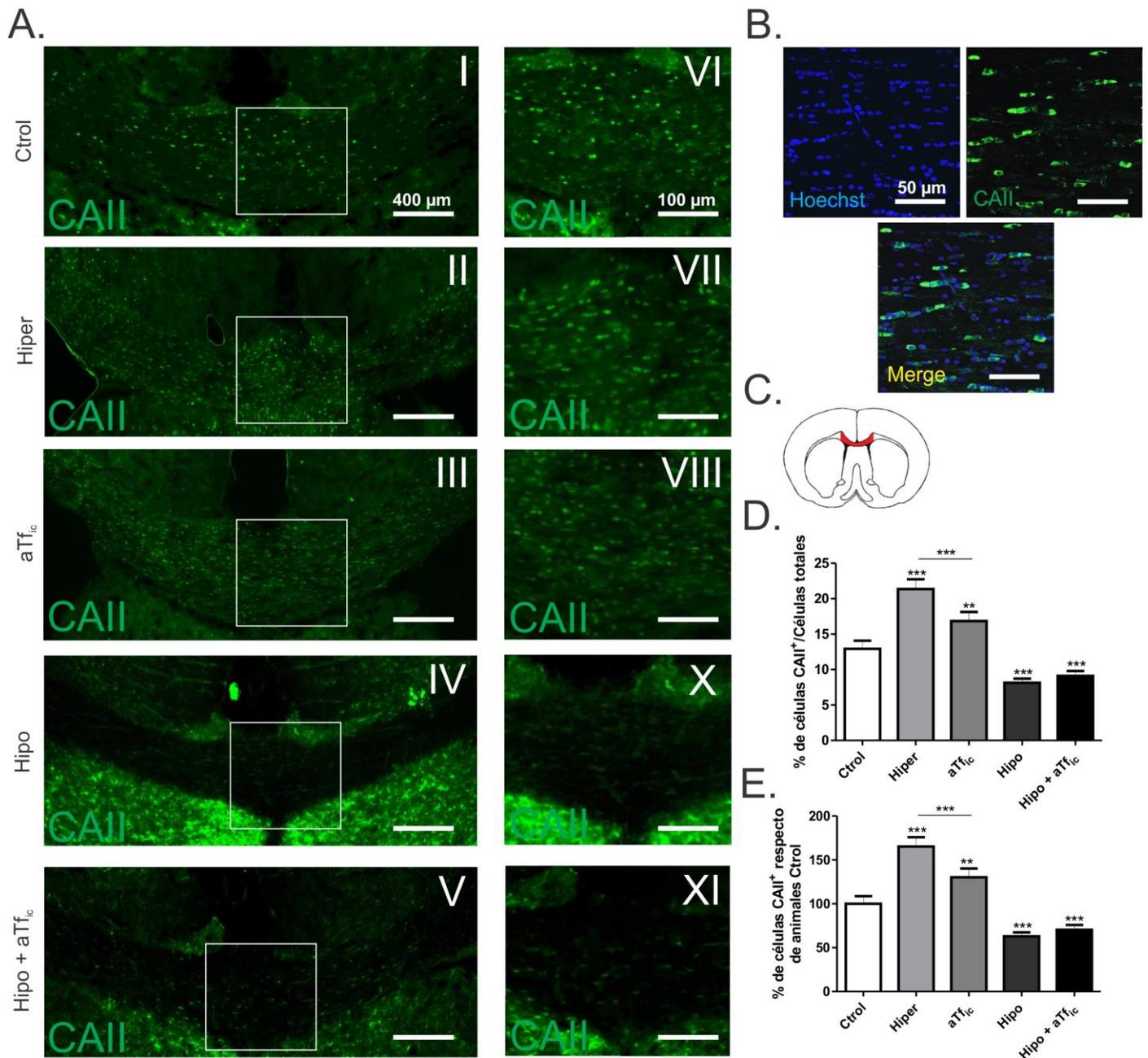
caloso de animales pertenecientes a los distintos grupos mediante la inmunomarcación de estas células con el anticuerpo anti CAII. Estos estudios mostraron que en los animales Hiper y aTf<sub>ic</sub> se aprecia un incremento de cantidad de OLGs maduros (65% y 40% respectivamente) en el cuerpo caloso en comparación con animales Ctrol. En el caso de los animales Hipo se observó una disminución del 38% en el contenido de OLGs maduros en comparación con animales Ctrol. Finalmente, no se observaron diferencias significativas en la cantidad de OLGs maduros entre animales Hipo e Hipo + aTf<sub>ic</sub> (**Figura R5**). En su conjunto, lo observado muestra que la aTf posee la capacidad de favorecer la maduración de los OPCs y compensar parcialmente el déficit en la maduración de los mismos inducido por el hipotiroidismo.



**Figura R3. Immunomarcación de OLGs en cuerpo calloso de animales P20 utilizando el anticuerpo RIP.** (A) Imágenes representativas de cada una de las condiciones experimentales. (B) Esquema representativo de la zona analizada en las inmunomarcaciones. (C) Cuantificación del IOD de la marcación con RIP expresada como porcentaje respecto de los animales Ctrol. Los asteriscos representan la significancia estadística respecto del grupo Ctrol y las barras indican comparaciones entre grupos. \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ .



**Figura R4. Immunomarcación de OLGs maduros MBP<sup>+</sup> en cuerpo calloso de animales P20 y cuantificación por western blot del contenido de MBP en cerebro total.** (A) Imágenes representativas de cada una de las condiciones experimentales. (B) Esquema representativo de la zona analizada en las inmunomarcaciones. (C) Cuantificación del IOD de la marcación con MBP expresada como porcentaje respecto de los animales Ctrl. (D) Western blot de MBP representativo de las distintas condiciones experimentales. (E) Cuantificación del IOD de la cantidad de MBP expresada como porcentaje respecto de los animales Ctrl. Los asteriscos representan la significancia estadística respecto del grupo Ctrl y las barras indican comparaciones entre grupos. \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ .

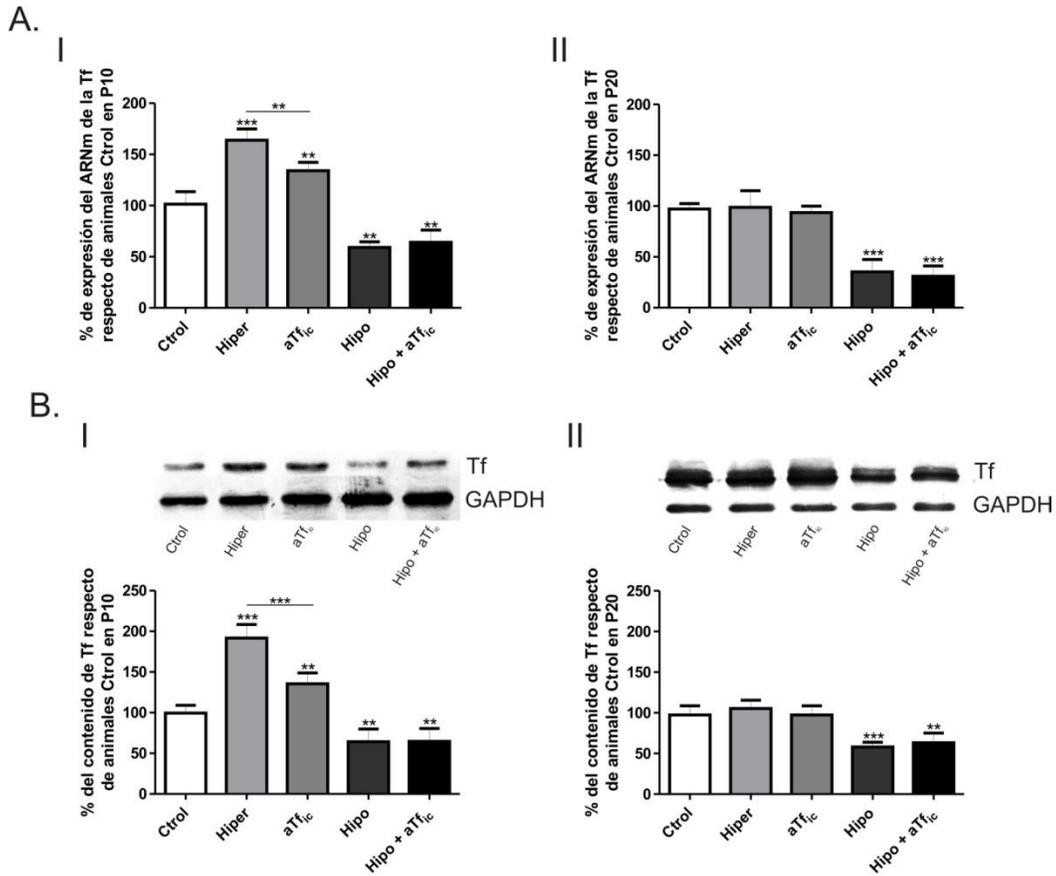


**Figura R5. Immunomarcación de OLGs maduros CAII<sup>+</sup> en cuerpo calloso de animales P20.** (A) Imágenes representativas de cada una de las condiciones experimentales. (B) Imágenes en alta magnificación de las células CAII<sup>+</sup>. (C) Esquema representativo de la zona analizada en las inmunomarcaciones. (D) Cuantificación de las células CAII<sup>+</sup>. (E) Cuantificación del cambio porcentual respecto del grupo Ctrl. Los asteriscos representan la significancia estadística respecto del grupo Ctrl y las barras indican comparaciones entre grupos. \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ .

## **1.2 La Transferrina y Las Hormonas Tiroideas: análisis de los mediadores de las Hormonas Tiroideas y la Transferrina.**

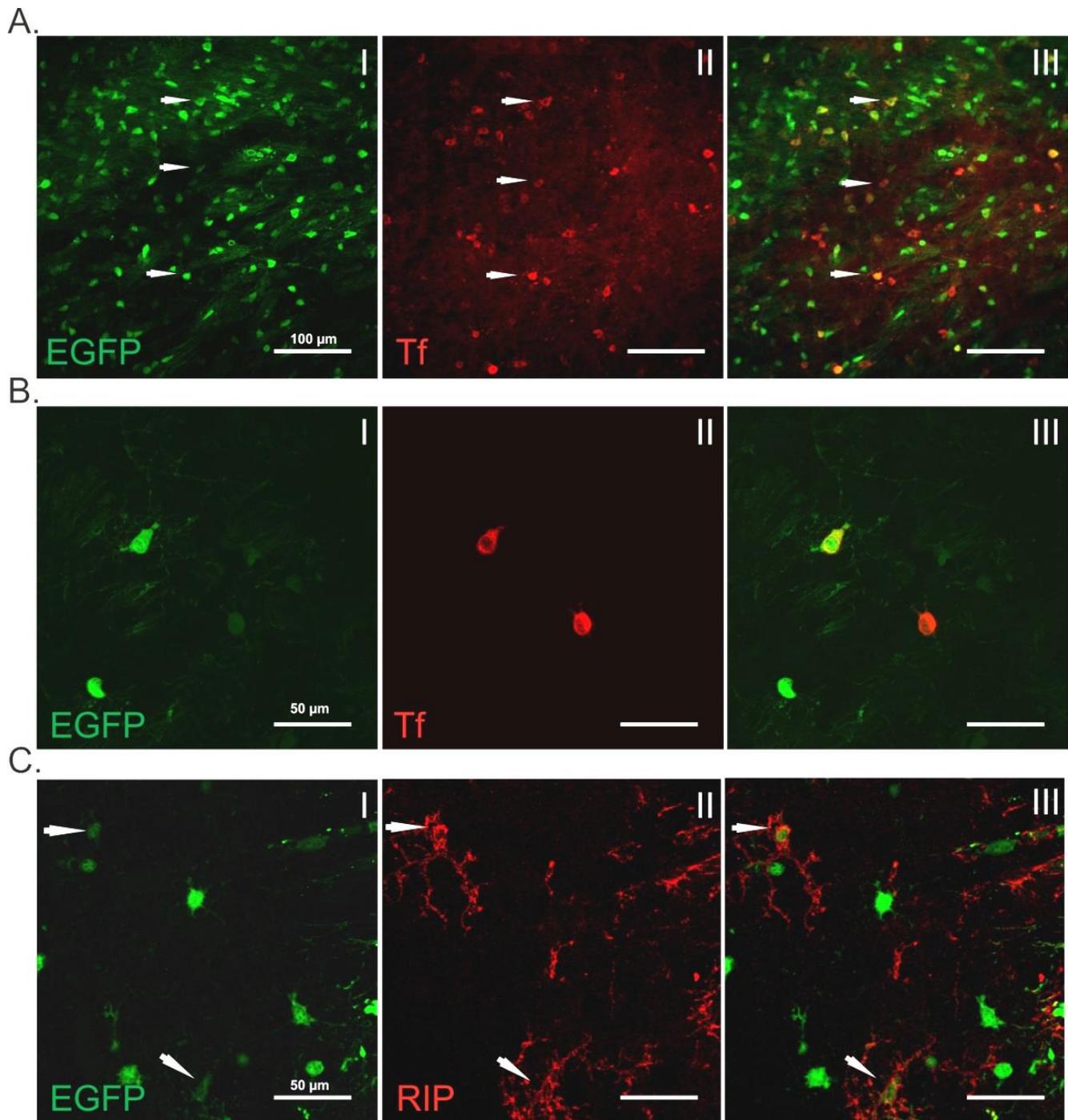
Se evaluaron los efectos regulatorios que poseen la Transferrina y las Hormonas Tiroideas sobre la expresión de la propia Transferrina y de los mediadores de los efectos de las Hormonas Tiroideas. Para esto se utilizaron animales a P10 y P20 Hiper, aTf<sub>ic</sub>, Hipo e Hipo + aTf<sub>ic</sub> de los que se extrajo proteínas y ARN del homogeneizados de cerebro total. Con estas muestras se realizaron estudios de Western blot y RT-PCR cuantitativa de la Tf, el KLF9, el TR $\alpha$  y el TR $\beta$ .

A P10 los animales Hiper mostraron un incremento de la expresión del ARNm y del contenido de la Tf (55% y 87% respectivamente) en comparación con los animales Ctrol. En un sentido opuesto los animales Hipo mostraron una caída del 25% en la expresión del ARNm y del contenido de la Tf. De un modo similar a los animales Hiper, los animales aTf<sub>ic</sub> mostraron un incremento del 32% en la expresión del ARNm y contenido de la Tf en comparación con los animales Ctrol. A pesar de esto, la administración intracraneal de aTf a animales hipotiroideos no fue suficiente para revertir la caída del nivel de expresión y contenido de Tf observado en animales Hipo (**Figura R6 aI y bI**). El estudio de la expresión de la Tf a P20 reveló que los animales Hiper y aTf<sub>ic</sub> no presentaron diferencias significativas en la expresión del ARNm y contenido de la Tf en comparación con animales Ctrol. En el caso de los animales Hipo e Hipo + aTf<sub>ic</sub> persistió la caída de la expresión del ARNm y contenido de Tf (25% y 40% respectivamente) respecto de animales Ctrol sin observarse en ningún caso diferencias significativas entre los grupos Hipo e Hipo + aTf<sub>ic</sub> (**Figura R6 AII y BII**).



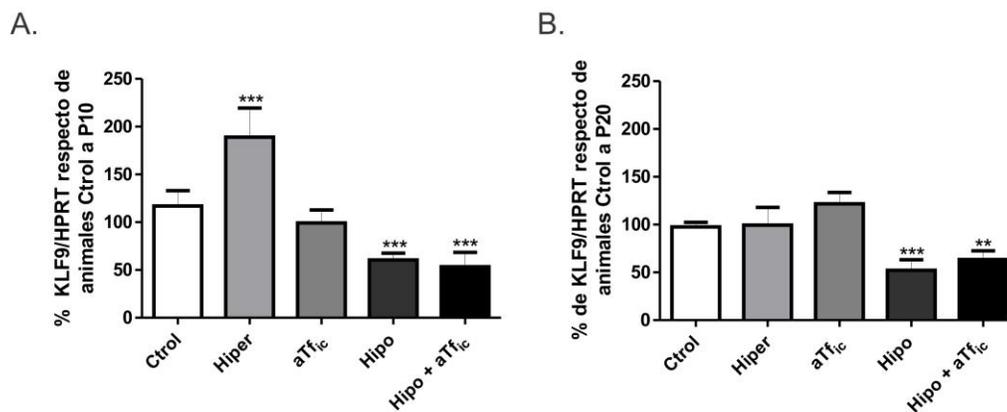
**Figura R6. Determinación del contenido de Tf y su ARNm en cerebro entero.** (A) Análisis de la expresión del ARNm de la Tf mediante RT-qPCR. Se utilizó como gen de normalización HPRT. Los resultados se expresaron como porcentajes respecto de los animales Ctrl a P10 (I) y P20 (II). (B) Imágenes representativas y cuantificaciones de los western blots para Tf. El contenido de Tf se normalizó utilizando como proteína de referencia GAPDH y los resultados se expresaron como porcentajes respecto de los animales Ctrl a P10 (I) y P20 (II). Los asteriscos representan la significancia estadística respecto del grupo Ctrl y las barras indican comparaciones entre grupos. \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ .

Para complementar el estudio de la expresión de la Tf en los distintos modelos animales evaluamos la presencia de la Tf en los OLGs. Para realizar estos ensayos se utilizaron ratones transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor del gen de la CNPasa (Ratones CNP::EGFP). Dado que esta proteína es de expresión exclusiva en OLGs dentro del SNC, los mismos serán distinguibles en base a la presencia de fluorescencia verde. En cortes coronales de cerebros de animales CNP::EGFP se realizaron estudios de inmunohistoquímica con un anticuerpo anti Tf. El análisis de la distribución de la inmunomarcación de la Tf respecto de la presencia de EGFP en el cuerpo calloso de animales P15 se llevó a cabo mediante microscopia confocal y análisis de superposición fraccional según Manders. Este análisis arrojó valores para el coeficiente de Manders de entre 0.877 y 0.994, lo cual indica que gran parte de la inmunomarcación de la Tf co-localiza con la presencia de EGFP (**Figura R7A**). Las células con baja intensidad de EGFP se analizaron a mayor magnificación y en este caso se observó que tanto las células con baja como alta intensidad de GFP expresaban Tf (**Figura R7B**). Finalmente para determinar que aquellas células con baja intensidad de GFP eran OLGs se realizó la inmunomarcación de los cortes coronales de cerebro de animales CNP::EGFP en P15 con el anticuerpo RIP y se corroboró que dichas células eran OLGs (**Figura R7C**).



**Figura R7. Inmunomarcación de Tf en el cuerpo calloso de animales CNP::EGFP a P15.** (A) Imágenes de la inmunomarcación con anticuerpo anti Tf del cuerpo calloso de animales CNP::EGFP P15. Las flechas indican OLGs que expresan Tf. (B) Imágenes en alta magnificación de la inmunomarcación con anticuerpo anti Tf del cuerpo calloso de animales CNP::EGFP P15. Se observó la presencia de la Tf en células que presentan alta y baja intensidad de fluorescencia verde. (C) Imágenes de alta magnificación de la inmunomarcación con anticuerpo anti CNPasa (RIP) del cuerpo calloso de animales CNP::EGFP P15. Las flechas señalan OLGs que poseen baja intensidad de fluorescencia verde y que expresan CNPasa.

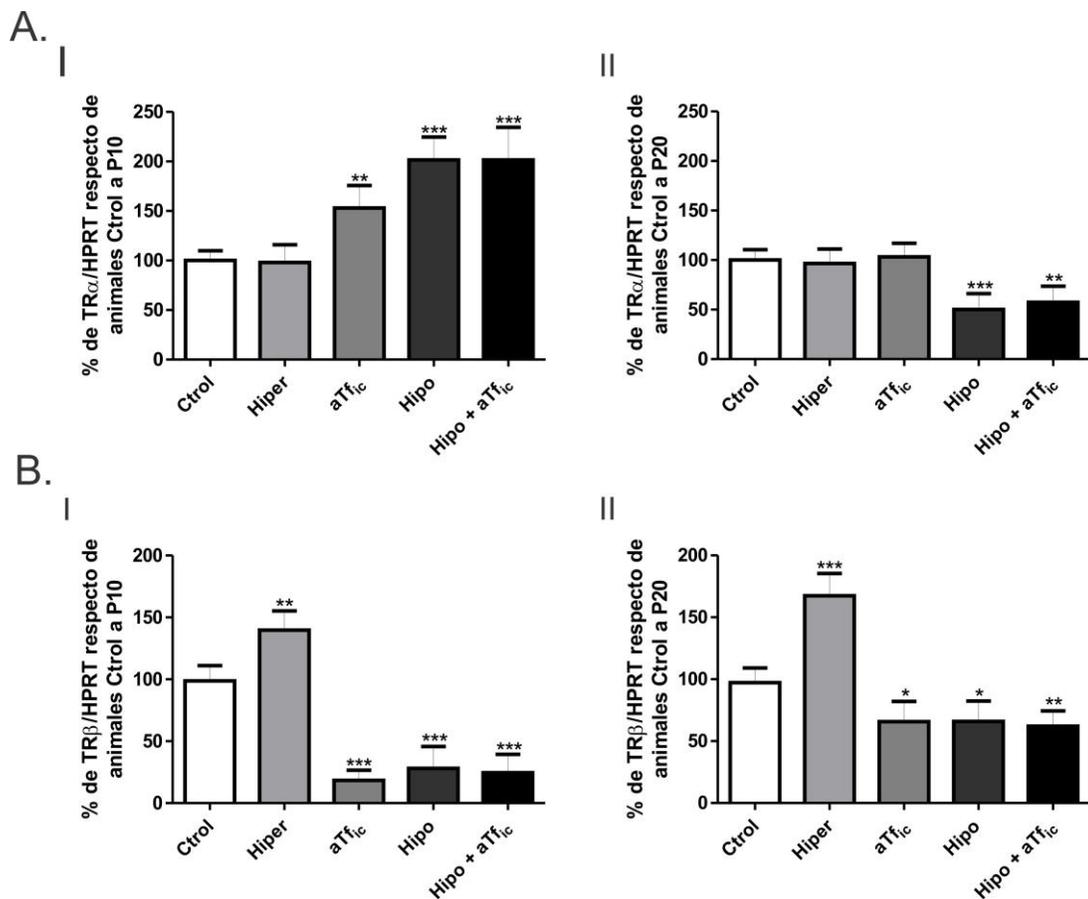
Estudios recientes de Dugas y col., (2012) demostraron que el KLF9 es un factor de transcripción capaz de regular la expresión de genes río abajo de las HTs y necesario para que las mismas ejerzan sus efectos pro-oligodendrogénicos y fomenten la remielinización. A P10 los animales Hiper mostraron un incremento del 90% en los niveles del ARNm del KLF9 respecto de los animales Ctrol. Contrariamente en animales Hipo se observó una caída del 57% de los niveles de dicho ARNm. En el caso de la aTf, su administración no modificó los niveles de ARNm del KLF9 en el grupo aTf<sub>ic</sub> en comparación con animales Ctrol así como en el grupo Hipo + aTf<sub>ic</sub> en comparación con animales Hipo (**Figura R8A**). A P20 se observó que el grupo Hiper no presentaba diferencias significativas en los niveles de ARNm del KLF9 en comparación con animales Ctrol, y por otra parte persistió una caída del 45% en los niveles del ARNm del KLF9 en animales Hipo. Nuevamente la administración intracraneal de aTf<sub>ic</sub> mostró no afectar los niveles del ARNm del KLF9 en animales eutiroideos e hipotiroideos (**Figura R8b**).



**Figura R8. Cuantificación del ARNm del KLF9 en cerebro entero a P10 y P20.** Análisis de la expresión del ARNm del KLF9 mediante RT-qPCR. Se utilizó como gen de normalización HPRT. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto de los animales Ctrol a P10 (A) y P20 (B). Los asteriscos representan la significancia estadística respecto del grupo Ctrol. \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ .

Por último se analizaron los niveles de la expresión de los ARNm de TR $\alpha$  y TR $\beta$ . Los resultados para TR $\alpha$  revelaron que a P10 los animales Hiper no presentaban diferencias significativas en comparación con animales Ctrol mientras que los animales aTf<sub>ic</sub> mostraron un incremento del 53% en los niveles del ARNm del TR $\alpha$ . En el caso de animales Hipo se observó un incremento del 100% en los niveles del ARNm del TR $\alpha$  en comparación con animales Ctrol, pero la administración intracraneal de aTf no mostró efectos sobre la expresión del ARNm del TR $\alpha$  en estos animales (**Figura R9A, I**). A P20 no se observaron diferencias significativas entre los animales Hiper, aTf<sub>ic</sub> y Ctrol, pero por el contrario, en animales Hipo se observó una disminución del 50% en los niveles de TR $\alpha$  en comparación con animales Ctrol. Nuevamente la administración intracraneal de aTf no afectó los niveles de ARNm de TR $\alpha$  de animales hipotiroideos (**Figura R9A, II**).

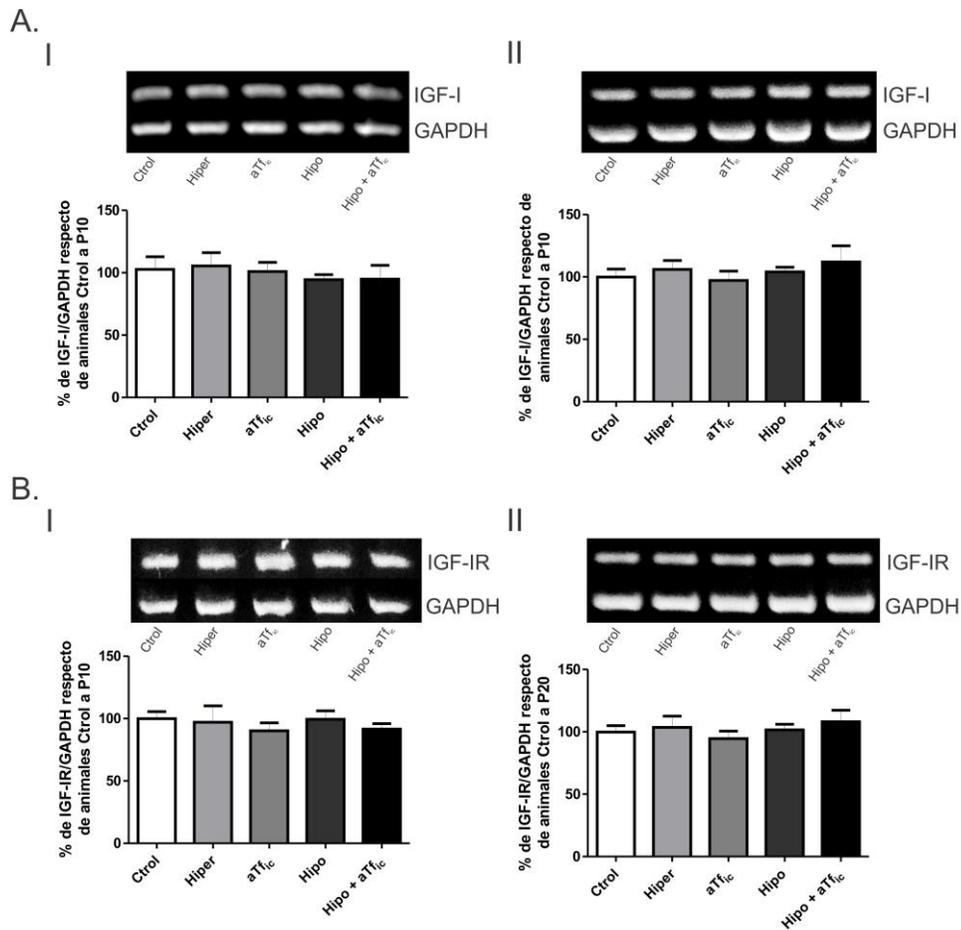
El análisis de la expresión del ARNm del TR $\beta$  mostró a P10 que los animales Hiper presentaban un incremento del 43% en los niveles de del ARNm del TR $\beta$  en comparación con animales Ctrol. Los animales aTf<sub>ic</sub>, Hipo e Hipo + aTf<sub>ic</sub> no presentaron diferencias significativas entre si, pero si una disminución en los niveles del ARNm del TR $\beta$  (80%, 70% y 74% respectivamente) en comparación con animales Ctrol (**Figura R9B, I**). El estudio de animales a P20 mostró el mismo patrón en los cambios de expresión del ARNm del TR $\beta$  observado a P10. En este caso al comparar con animales Ctrol se observó que los animales Hiper experimentaron un incremento del 68% y no se observaron diferencias significantivas entre los animales de los grupos aTf<sub>ic</sub>, Hipo e Hipo + aTf<sub>ic</sub>, que presentaron una disminución de los niveles del ARNm del TR $\beta$  (31%, 31% y 34% respectivamente) (**Figura R9B, II**).



**Figura R9. Cuantificación del ARNm del TR $\alpha$ 1 y TR $\beta$  en cerebro entero a P10 y P20.** (A) Análisis de la expresión del ARNm del TR $\alpha$ 1 mediante RT-qPCR. Se utilizó como gen de normalización HPRT. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto de los animales Ctrl a P10 (I) y P20 (II). (B) Análisis de la expresión del ARNm del TR $\beta$  mediante RT-qPCR. Se utilizó como gen de normalización HPRT. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto de los animales Ctrl a P10 (I) y P20 (II). Los asteriscos representan la significancia estadística respecto del grupo Ctrl. \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ .

### **1.3 Los efectos pro-mielinogénicos de las Hormonas Tiroideas y la Transferrina son independientes del eje de la Hormona de Crecimiento.**

La mielinización ocurre en la rata durante las primeras semanas de vida, etapa en la que la Hormona de Crecimiento (HC) ejerce efectos profundos sobre el desarrollo de los órganos y el metabolismo. Distintos grupos han demostrado la existencia del vínculo entre las HTs y la HC, así como con los mediadores de los efectos de esta última. Este vínculo implica la capacidad de las HTs de influir la expresión hepática del ARNm y el contenido plasmático del IGF-I, principal mediador de los efectos de la HC durante las primeras 3 semanas de vida (Wolf y col., 1989; Pascual-Leone y col., 2003). El IGF-I es un potente regulador de la maduración oligodendroglial así como de la mielinización (Hsieh y col., 2004; Fernandez y Torres-Alemán, 2012), y siendo que nuestros modelos experimentales perturban el eje tiroideo, decidimos evaluar el contenido de los ARNm del IGF-I y su receptor (IGF-IR). Para esto se utilizaron animales (P10 y P20) Hiper, aT<sub>fic</sub>, Hipo e Hipo + aT<sub>fic</sub> a los que se les extrajo ARN de homogenatos de cerebro total. Con estas muestras se realizaron estudios de RT-PCR semi-cuantitativa los ARNm del IGF-I e IGF-IR. Los resultados no mostraron diferencias entre los distintos grupos experimentales a P10 o P20 (**FiguraR10**).

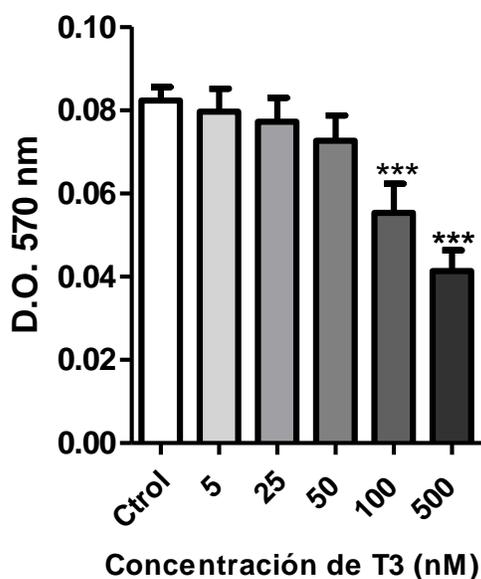


**Figura R10. Cuantificación del ARNm del IGF-I e IGF-IR.** (A) Análisis de la expresión del ARNm del IGF-I mediante RT-PCR semi-cuantitativa. Se utilizó como gen de normalización GAPDH. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto de los animales Ctrl a P10 (I) y P20 (II). (B) Análisis de la expresión del ARNm del IGF-IR mediante RT-PCR semi-cuantitativa. Se utilizó como gen de normalización GAPDH. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto de los animales Ctrl a P10 (I) y P20 (II).

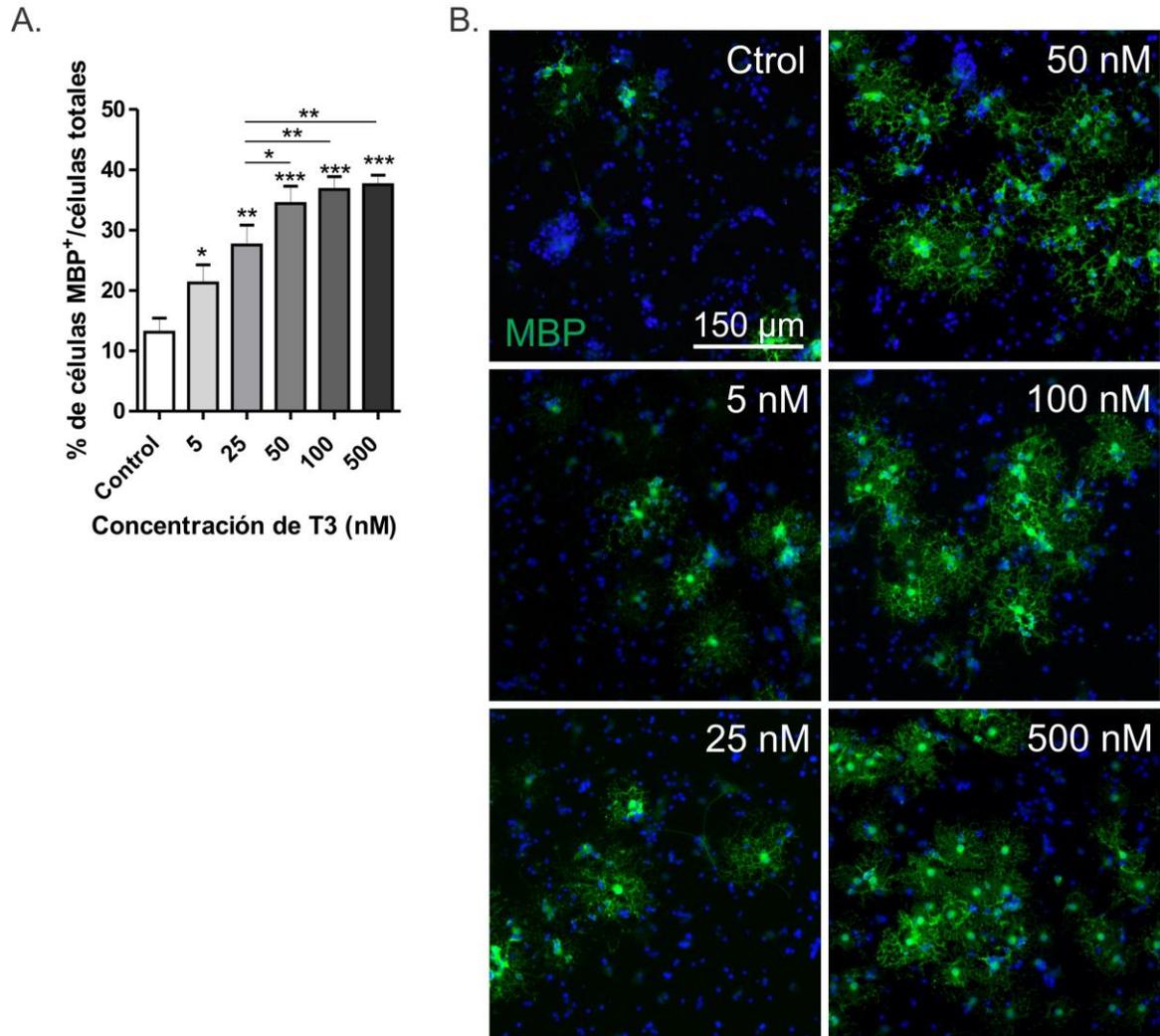
## 2. LA INFLUENCIA DE LAS HORMONAS TIROIDEAS Y LA TRANSFERRINA SOBRE LA MADURACIÓN OLIGODENDROGLIAL. EXPERIMENTOS “IN VITRO”:

### 2.1 Efecto de las Hormonas Tiroideas y la Transferrina sobre la maduración oligodendroglial *in vitro*.

Se estudió el efecto de las HTs y la Tf sobre la maduración oligodendroglial a partir de CPNs. Para esto se realizaron cultivos de CPNs, y en primera instancia se determinó la dosis de T3 a utilizar. Primeramente se evaluó el efecto de distintas dosis de T3 sobre la viabilidad celular mediante un ensayo de MTT y posteriormente determinamos la capacidad de las distintas dosis de T3 de favorecer la maduración oligodendroglial luego de cultivar las CPNs durante 6 días. Se estableció que con 50 nM de T3 se observaban mínimos efectos deletéreos sobre la viabilidad celular y el mayor efecto sobre la maduración oligodendroglial (**Figura R11 y R12**). En el caso del tratamiento con aTf, se utilizó una dosis de 100 µg/ml previamente validada por nuestro grupo (Silvestroff y col., 2013).

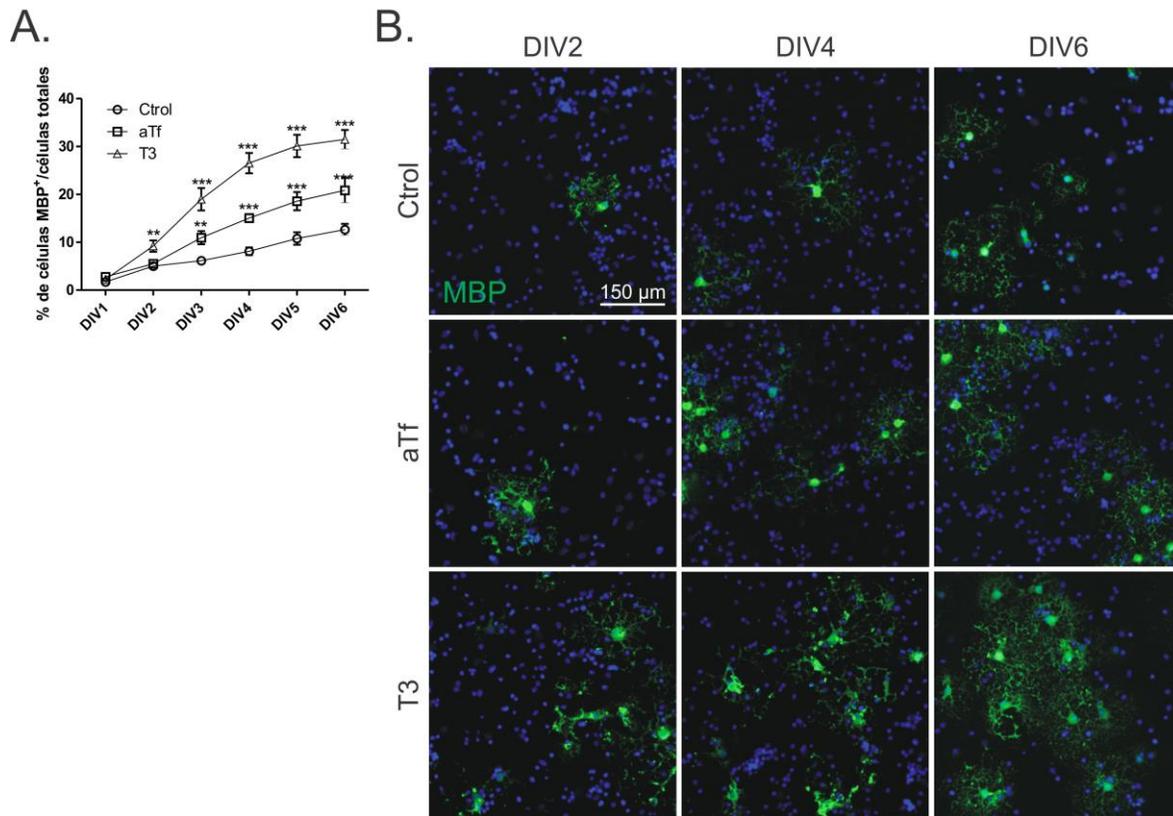


**Figura R11. Efecto de distintas dosis de T3 sobre la viabilidad celular.** Ensayo de MTT en CPNs cultivadas durante 6 días en presencia de dosis crecientes de T3. Se graficaron las DO. Los asteriscos representan la significancia estadística respecto del grupo Ctról. \*\*\* $p \leq 0.001$ .



**Figura R12. Efectos de las distintas dosis de T3 sobre la maduración oligodendroglial.** (A) Cuantificación de células MBP<sup>+</sup> respecto de células totales. (B) Imágenes representativas obtenidas luego de 2, 4 y 6 días de diferenciación *in vitro* (DIV). Los asteriscos representan la significancia estadística respecto del grupo Ctról. \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ .

El estudio de la influencia de las HTs y de la Tf sobre la maduración oligodendroglial de las CPNs, se llevó a cabo mediante inmunocitoquímica evaluando la proporción de OLGs maduros MBP<sup>+</sup> luego de diferenciar las células durante 6 días. Tanto la T3 como la aTf favorecían la maduración oligodendroglial *in vitro*, observándose mayor cantidad de OLGs positivos para MBP en comparación con células control a partir del día 2 y 3 de diferenciación respectivamente. Es importante resaltar que los efectos positivos de T3 sobre la oligodendrogenesis fueron de mayor magnitud que los observados en el caso de la aTf (Figura R13).

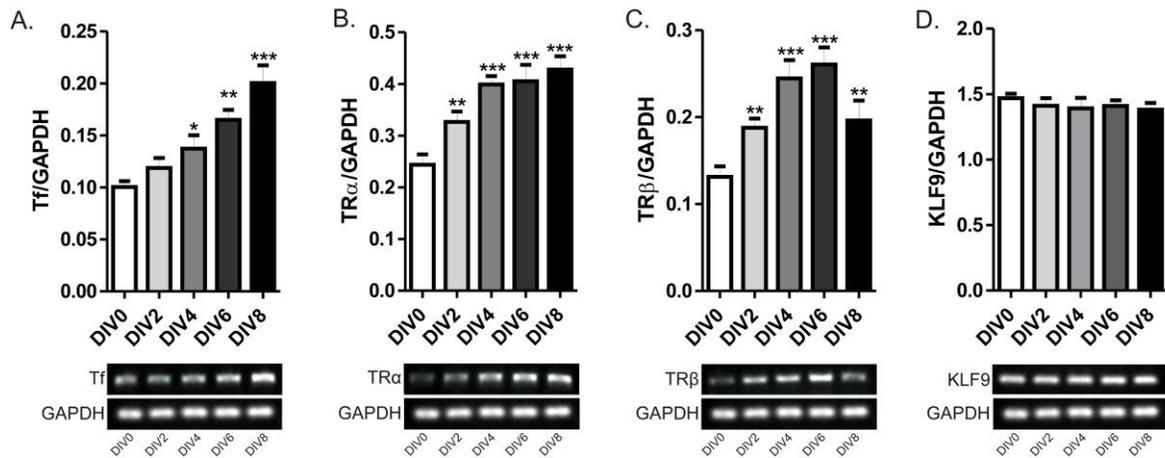


**Figura R13. Efecto de T3 y aTf sobre la maduración oligodendroglial.** (A) Porcentaje de células MBP<sup>+</sup>. (B) Imágenes representativas obtenidas luego de 2, 4 y 6 días de diferenciación *in vitro* (DIV). Los asteriscos representan la significancia estadística respecto del grupo Ctról. \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ .

## **2.2 La expresión de la Transferrina y de los mediadores de las Hormonas Tiroideas durante la maduración oligodendroglial *in vitro*. Efectos de la administración de T3 y aTf.**

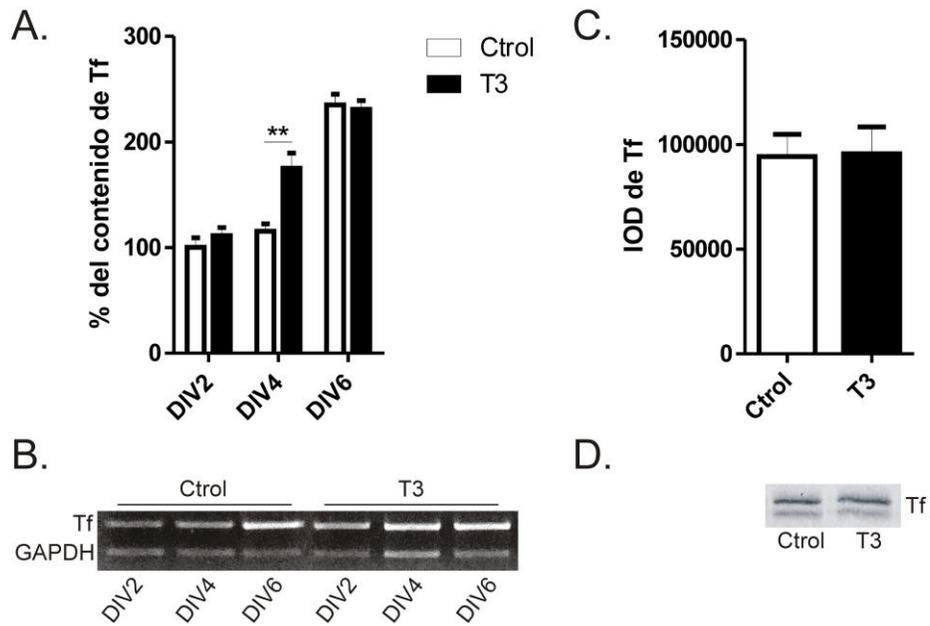
Como se mencionó anteriormente las HTs ejercen sus efectos a través de sus receptores nucleares (TR $\alpha$  y TR $\beta$ ), y recientemente se ha demostrado que un mediador temprano de los efectos positivos de las HTs sobre la maduración oligodendroglial es el factor de transcripción KLF9 (Dugas y col., 2012). Para evaluar la posibilidad de la existencia de un diálogo entre las HTs y la Tf, se estudió la expresión de los ARNm de la Tf, TR $\alpha$ 1, TR $\beta$  y KLF9 según lo indicado en el apartado metodológico en diversas condiciones experimentales.

Inicialmente se estudió como varía la expresión de dichos ARNm durante la diferenciación de las CPNs a lo largo de 8 días *in vitro*. Se observó que la expresión del ARNm de la Tf y el TR $\alpha$ 1 se incrementan conforme las CPNs se diferencian durante todo el tiempo analizado. El ARNm del TR $\beta$  experimenta un incremento hasta el día 6 y luego decae. Por último, el ARNm del KLF9 no experimentó cambios en sus niveles (**Figura R14**).



**Figura R14. Expresión de los ARNm de la Tf, TR $\alpha$ 1, TR $\beta$  y KLF9 durante la diferenciación de las CPNs.** Análisis de la expresión de los distintos ARNm mediante RT-PCR semi-cuantitativa a punto final. Se utilizó como gen de normalización GAPDH. Los asteriscos representan la significancia estadística respecto del valor observado en DIV2. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ .

Los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo* mostraron que en los animales hipertiroideos se produce un aumento prematuro de la expresión de la Tf junto con una mayor mielinización respecto de los animales Ctról. De manera similar, *in vitro* se observó que T3 aceleró la maduración oligodendroglial. Cuando evaluamos el efecto de la administración de T3 50 nM sobre la expresión del ARNm de la Tf durante la diferenciación de las CPNs *in vitro* a lo largo de 6 días observamos que la administración de T3 provocó un aumento prematuro en contenido del ARNm de la Tf alrededor del día 4 y que luego los niveles del ARNm de la Tf de las células tratadas con T3 se equipararon con los de las células Ctról. Este aumento prematuro de la expresión de la Tf podría conducir a la secreción de la misma y consecuentemente a efectos parácrinos. Por lo tanto se evaluó el contenido de Tf en el medio de cultivo a DIV4 y no se encontraron diferencias entre las células tratadas con T3 y las células Ctról (**Figura R15**), descartando esta hipótesis.



**Figura R15. Efecto de la administración de T3 sobre la expresión del ARNm de la Tf durante la diferenciación de las CPNs.** (A) Cuantificación de la expresión del ARNm de la Tf mediante RT-PCR semi-cuantitativa a punto final. Se utilizó como gen de normalización GAPDH. Resultados expresados como porcentaje respecto de células Ctrl a DIV2. (B) Imágenes representativas. (C) Cuantificación de la cantidad de Tf presente en el medio de cultivo a DIV4 e (D) imágenes representativas. Los asteriscos representan la significancia respecto del grupo Ctrl. \*\* $p \leq 0.01$ .

### **3. LA CONVERSACIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS Y LA TRANSFERRINA DURANTE LA MADURACIÓN OLIGODENDROGLIAL. EXPERIMENTOS “IN VITRO”.**

#### **3.1 El silenciamiento de la expresión de la Transferrina disminuye la capacidad de madurar de los oligodendrocitos. Efectos compensatorios parciales de las Hormonas Tiroideas.**

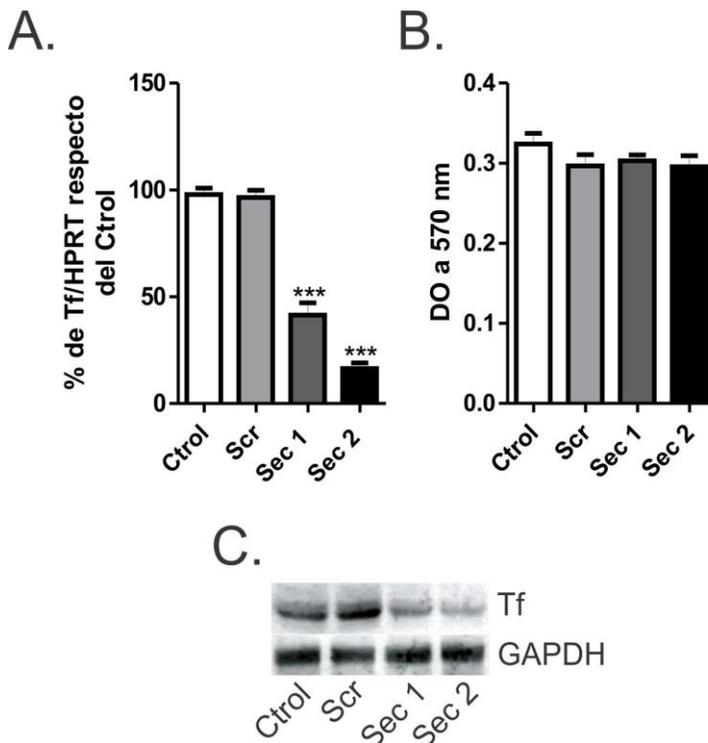
El silenciamiento de la expresión del ARNm de la Tf se llevó a cabo infectando CPNs con retrovirus portadores de secuencias codificantes para shARNs dirigidos contra el ARNm de la Tf (Sec 1, Sec 2). Como control se utilizó un shARN sin homología con ningún ARNm de rata (“Scramble”: Scr). Los shARNs fueron clonados dentro del vector pSUPER.retro.puro. Este vector se linealizó con dos enzimas de restricción cuyos sitios de corte rodean al espaciador de 1000 bp aproximadamente (“Stuffer”) el cual es reemplazado por los distintos oligonucleótidos codificantes para shARNs luego de realizar la ligación correspondiente. Como consecuencia de esto, la amplificación mediante PCR con cebadores específicos para el vector pSUPER,retro.puro originó distintos productos según se tratase del vector sin ninguna manipulación, el vector con los oligonucleótidos clonados o el vector que haya sufrido autoligado sin incorporar los oligonucleótidos. Los productos indicados según tamaño corresponden a: 1448 bp para vectores sin manipulación, 488 bp para vectores que han incorporado los oligonucleótidos y 428 bp para vectores autoligados (**Figura R16-A**).

Luego de la transducción de las CPNs se verificó la integración del genoma viral en el genoma de las CPNs, para ello se extrajo el ADN de las CPNs que habían sido infectadas con partículas retrovirales portadoras de los distintos shARNs y el ADN de células control

que no habían sido expuestas a partículas retrovirales. Se realizó PCR a punto final con los cebadores indicados en la sección metodológica y se encontró que aquellas células que habían sido transducidas con retrovirus presentaban el genoma viral integrado en su propio genoma mientras que aquellas células que nunca estuvieron en contacto con retrovirus no presentaban rastros de la presencia del genoma viral en su ADN (**Figura R16-B**). El vector pSUPER posee un gen que confiere resistencia al antibiótico puromicina para poder realizar la selección de aquellas células que hayan sido transducidas por partículas virales portadoras de shARNs. Se evaluó entonces mediante MTT la dosis mínima de puromicina necesaria para producir la pérdida de viabilidad de las CPNs control. Luego de exponer las CPNs a distintas dosis de puromicina durante 3 días se determinó que concentraciones iguales o mayores a 1 µg/ml eran suficientes para disminuir la viabilidad celular en más del 90%, consecuentemente usamos 1 µg/ml en el resto de los experimentos (**Figura R16-C**).



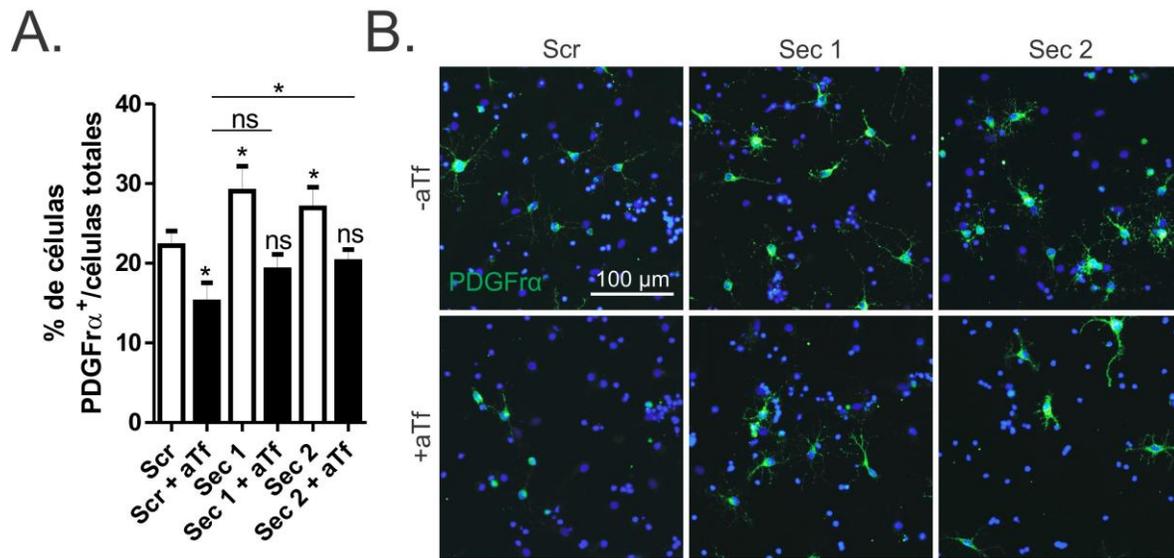
La eficiencia del silenciamiento de la Tf se evaluó a partir de muestras de ARN de CPNs que habían sido transducidas con retrovirus y seleccionadas con puromicina. Se determinó el contenido del ARNm de la Tf mediante PCR cuantitativa y se encontró una disminución de entre un 50% y 70% del mismo en células Sec 1 y Sec 2 en comparación con células Scr (**Figura R17-A**). El impacto de la disminución del ARNm de la Tf sobre el contenido proteico se confirmó mediante western blot (**Figura R17-B**). Finalmente se determinó el efecto del silenciamiento de la expresión de la Tf sobre la viabilidad celular mediante MTT y no se encontraron diferencias significativas entre las células que fueron transducidas con retrovirus portadores de los distintos shARN (**Figura R17-C**).



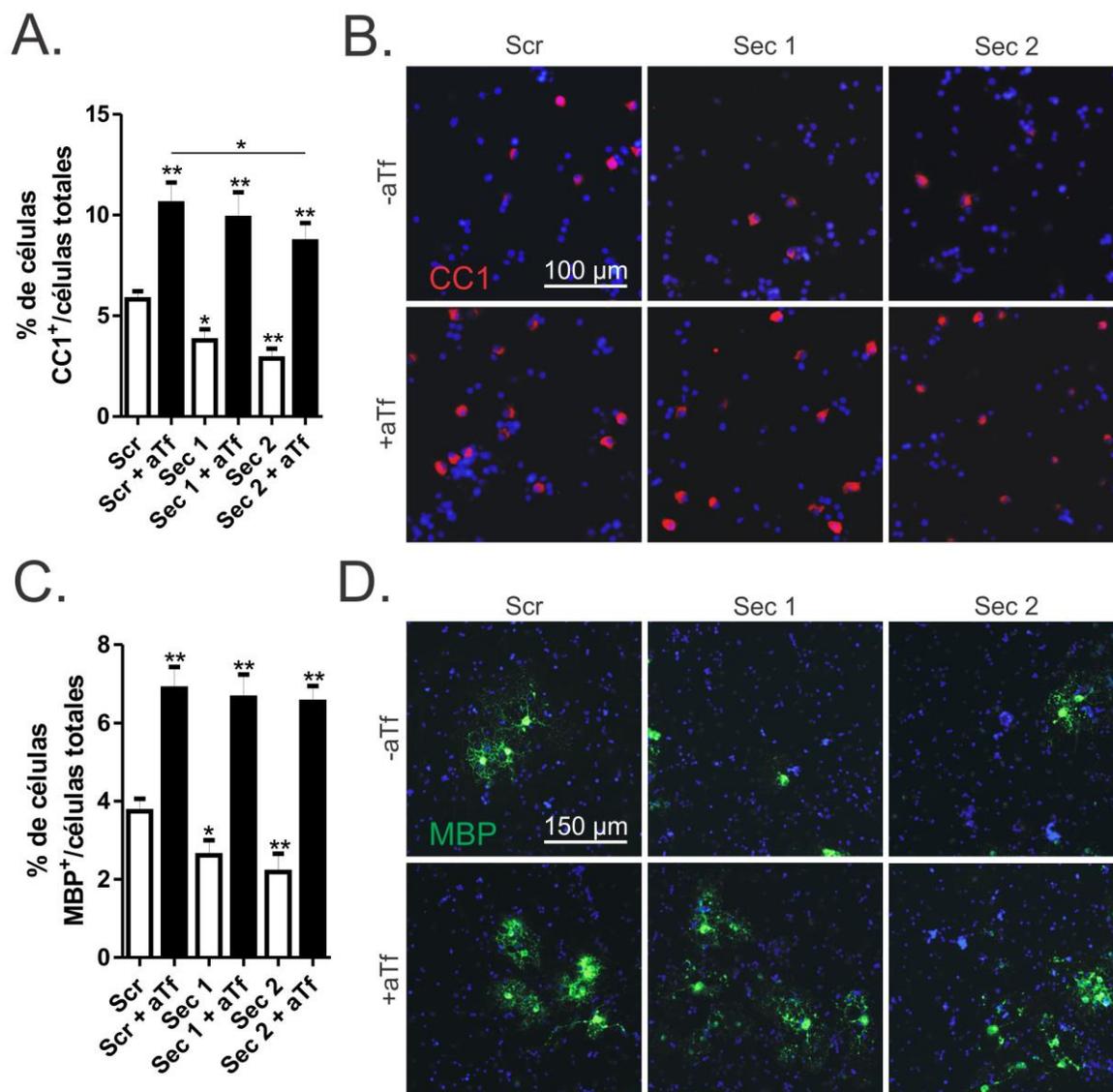
**Figura R17. Análisis de la eficiencia de silenciamiento de la expresión del ARNm de la Tf.**

(A) Análisis de la expresión del ARNm de la Tf mediante RT-qPCR. Se utilizó como gen de normalización HPRT. Los resultados se expresaron como porcentajes respecto de las células Ctrol. (B) Ensayo de MTT para células en las que se silenció la expresión del ARNm de la Tf. Se graficaron las DO. (C) Western blot representativo del efecto del silenciamiento del ARNm de la Tf sobre el contenido celular de Tf. Los asteriscos representan la significancia respecto del grupo Ctrol. \*\* $p \leq 0.01$ .

Inicialmente se evaluó el efecto del silenciamiento del ARNm de la Tf sobre el potencial oligodendrogénico de las CPNs mediante inmunocitoquímica, determinando el porcentaje de OPCs PDGFr $\alpha$ <sup>+</sup> y OLGs MBP<sup>+</sup>/CC1<sup>+</sup> luego de 3 días de diferenciación *in vitro* de células silenciadas en presencia o ausencia de aTf 100  $\mu$ g/ml. Nuestros hallazgos mostraron que el silenciamiento de la expresión del ARNm de la Tf condujo a un aumento del número de OPCs PDGFr $\alpha$ <sup>+</sup> y una disminución del número de OLGs maduros MBP<sup>+</sup>/CC1<sup>+</sup> luego de 3 días de diferenciación *in vitro* (**Figura R18-A y R19-A, barras blancas**) demostrando que la ausencia de la Tf limita la capacidad de los OPCs de madurar. La administración de aTf a células Scr mostró que la misma indujo la disminución del número de OPCs PDGFr $\alpha$ <sup>+</sup> y aumentó el número de OLGs maduros MBP<sup>+</sup>/CC1<sup>+</sup> luego de 3 días de diferenciación *in vitro* (**Figura R18-A y R19-AC, Scr vs Scr + aTf, primeras dos barras de izquierda a derecha**) evidenciando la capacidad de favorecer la maduración de los OPCs; este fenómeno también fue observado en CPNs transducidas (**Figura R18-A y R19-AC, Sec 1/2 vs Sec 1/2 + aTf, tercera vs. cuarta y quinta vs. sexta barra de izquierda a derecha**). En su conjunto se puede observar que mientras que la administración de aTf favorece la maduración de los OPCs, la disminución de la expresión de la Tf disminuye significativamente la maduración de los OPCs.

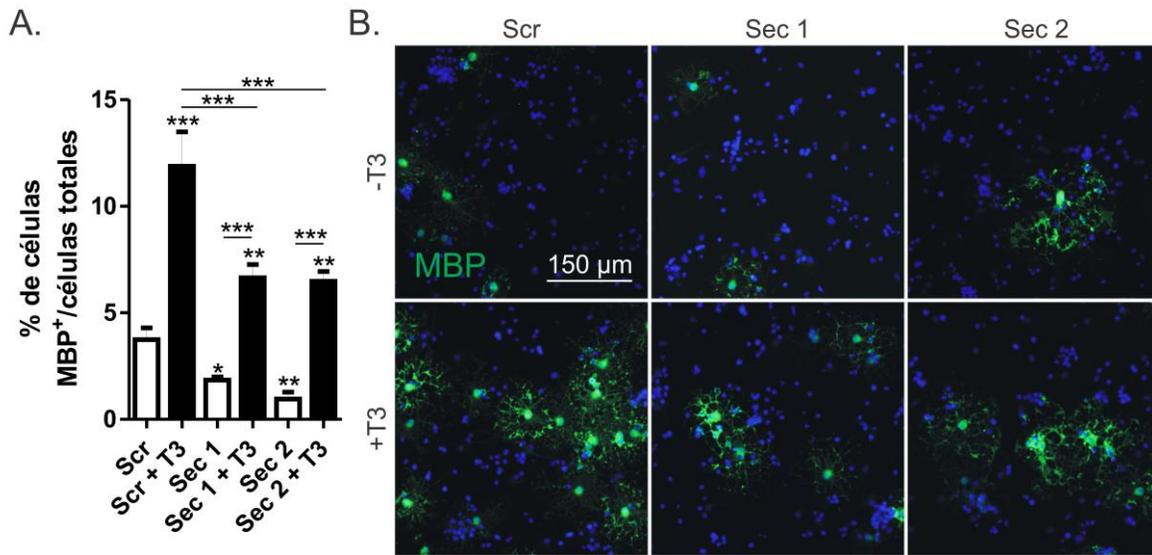


**Figura R18.** Efecto del silenciamiento de la expresión del ARNm de la Tf sobre la población de OPCs PDGFr $\alpha^+$ . (A) Cuantificación del porcentaje de células PDGFr $\alpha^+$ . (B) Imágenes representativas del efecto observado. Los asteriscos representan la significancia estadística respecto del grupo Scr y las barras indican comparaciones entre grupos. \* $p \leq 0.05$ .



**Figura R19. Efecto del silenciamiento de la expresión del ARNm de la Tf sobre la población de OLGs CC1<sup>+</sup> y MBP<sup>+</sup>.** (A) Cuantificación del porcentaje de células CC1<sup>+</sup>. (B) Imágenes representativas del efecto observado en la población CC1<sup>+</sup>. (C) Cuantificación del porcentaje de células MBP<sup>+</sup>. (D) Imágenes representativas del efecto observado en la población MBP<sup>+</sup>. Los asteriscos representan la significancia estadística respecto del grupo Scr y las barras indican comparaciones entre grupos. \*p ≤ 0.05, \*\*p ≤ 0.01.

Se estudió luego el efecto del silenciamiento de la expresión del ARNm de la Tf sobre la maduración oligodendroglial y la capacidad de las HTs de influenciar dicho proceso cuando la expresión del ARNm de la Tf se encontraba disminuida. Se contabilizó el porcentaje de células positivas para MBP luego de 3 días de diferenciación *in vitro* de las células silenciadas en presencia o ausencia de T3 50 nM. Se observó que la disminución de la expresión del ARNm de la Tf produjo una disminución del número de OLGs MBP<sup>+</sup> (**Figura R20-A, barras blancas**). La administración de T3 aumentó el número de OLGs MBP<sup>+</sup> en células Scr (**Figura R20-A, Scr vs Scr + T3, primeras dos barras de izquierda a derecha**). En células silenciadas la administración de T3 tuvo efectos positivos sobre la maduración de los OPCs (**Figura R20-A, Scr vs Scr 1/2 + T3, tercera vs. cuarta y quinta vs. sexta barra de izquierda a derecha**), pero dichos efectos estuvieron limitados probablemente por la caída de la expresión de ARNm de la Tf (**Figura R20-A, barras negras**).

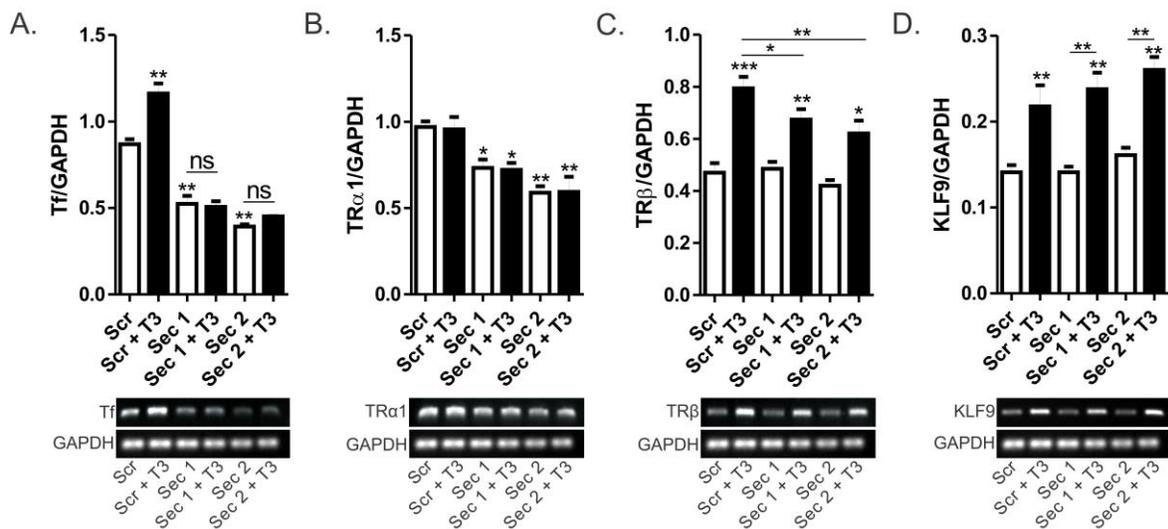


**Figura R20.** Efecto del tratamiento con T3 de células a las que se les silenció la expresión del ARNm de la Tf sobre la población de OLGs MBP<sup>+</sup>. (A) Cuantificación del porcentaje de células MBP<sup>+</sup>. (B) Imágenes representativas del efecto observado en la población MBP<sup>+</sup>. Los asteriscos representan la significancia estadística respecto del grupo Scr y las barras indican comparaciones entre grupos. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ .

Se analizó mediante PCR semi-cuantitativa a punto final los efectos del silenciamiento de la expresión del ARNm de la Tf sobre diversos intermediarios de las HTs. Para ello se evaluó la expresión de la Tf, TR $\alpha$ 1, TR $\beta$  y KLF9 luego de 3 días de diferenciación *in vitro*, en presencia o ausencia de T3. Se observó que el tratamiento con T3 induce la expresión del ARNm de la Tf en condiciones control (**Figura R21-A, Scr vs. Scr + T3, primeras dos barras de izquierda a derecha**) sin observarse diferencias significativas entre grupos tratados o no tratados con T3, cuando se silenció la expresión del ARNm de la Tf (**Figura R21-A, Sec 1/2 vs. Sec 1/2 + T3, tercera vs. cuarta y quinta vs. sexta barra de izquierda a derecha**).

El silenciamiento de la Tf provocó la disminución del contenido del ARNm del TR $\alpha$ 1, sin embargo no produjo cambios significativos en los niveles de KLF9 y el TR $\beta$  (**Figura R21-BCD, barras blancas**). En el caso del TR $\alpha$ 1, la administración de T3 no modificó el

contenido de dicho receptor en células control ni tampoco en células silenciadas (**Figura R21-B, Scr vs. Scr + T3 y Sec 1/2 vs. Sec 1/2 + T3, primera vs. segunda, tercera vs. cuarta y quinta vs. sexta barra de izquierda a derecha**). Con respecto a la expresión de TR $\beta$  y KLF9, T3 indujo el incremento de la expresión de ambos ARNm independientemente del contenido de Tf (**Figura R21-CD, Scr vs. Scr + T3 y Sec 1/2 vs. Sec 1/2 + T3, primera vs. segunda, tercera vs. cuarta y quinta vs. sexta barra de izquierda a derecha**).



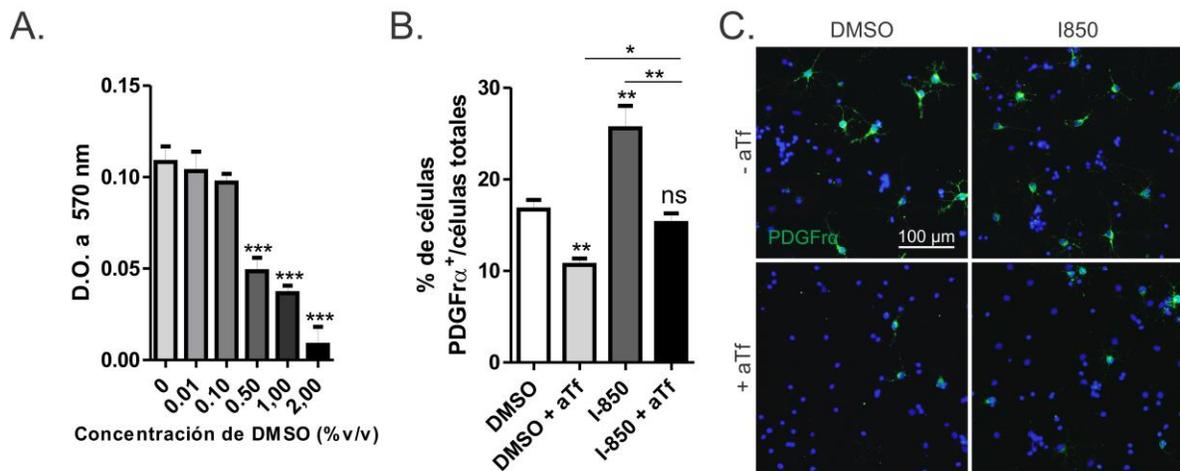
**Figura R21. Efecto del silenciamiento de la expresión del ARNm de la Tf sobre la expresión de los ARNm de la Tf, TR $\alpha$ 1, TR $\beta$  y KLF9.** Análisis de la expresión de los ARNm de la (A) Tf, (B) TR $\alpha$ 1, (C) TR $\beta$  y (D) KLF9 mediante PCR semi-cuantitativa a punto final. Se utilizó como gen de normalización GAPDH. Los asteriscos representan la significancia estadística respecto de Scr y las barras indican comparaciones entre grupos. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ .

### **3.2 El tratamiento de células progenitoras neurales con un antagonista específico del receptor alfa 1 de las Hormonas Tiroideas disminuye la capacidad de madurar de los oligodendrocitos. Efectos compensatorios parciales de la apoTransferrina.**

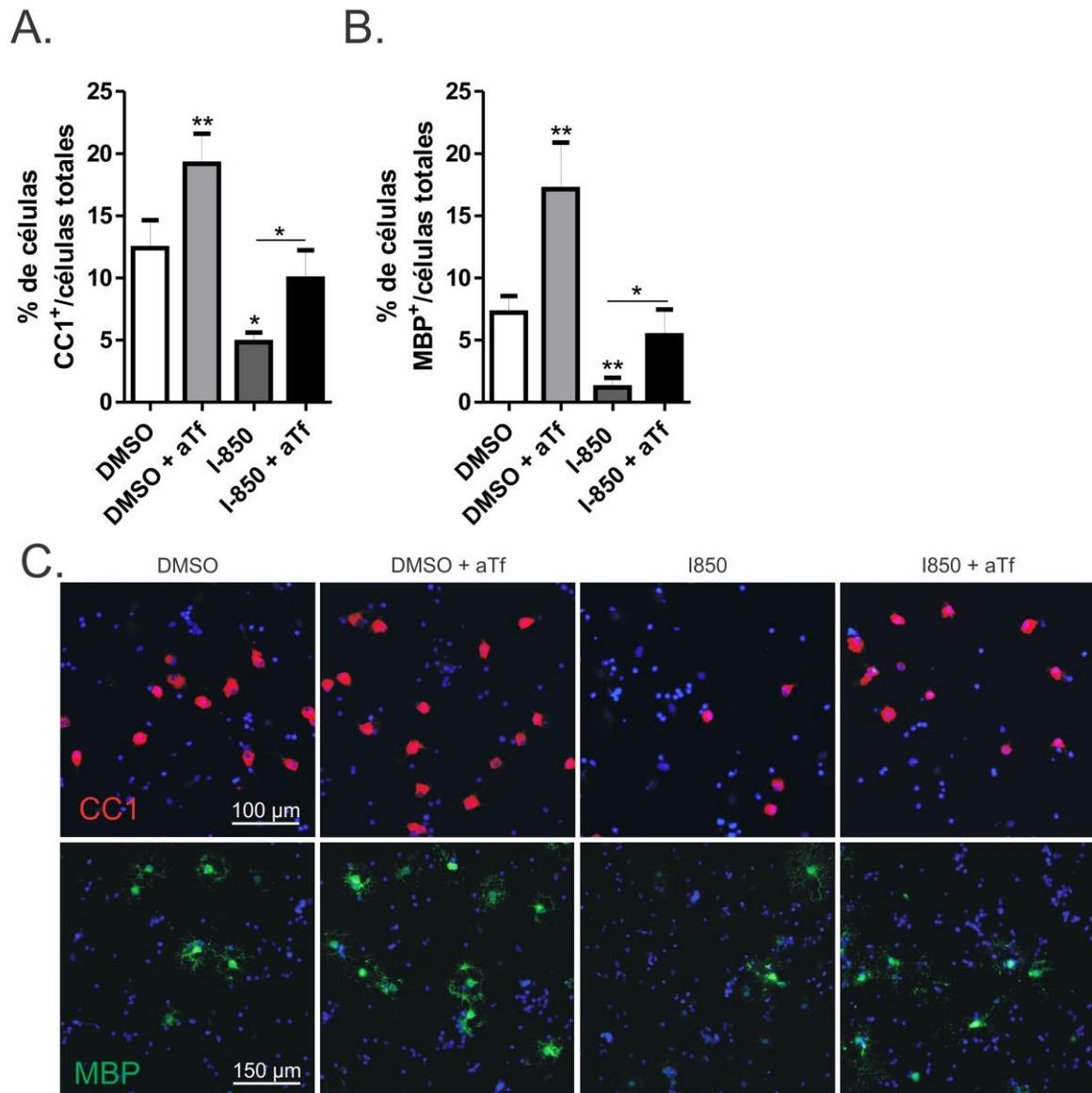
Previamente demostramos que el silenciamiento de la expresión del ARNm de la Tf condujo a una disminución de la expresión del TR $\alpha$ 1, por lo tanto decidimos analizar el efecto de la inhibición química del TR $\alpha$ 1 sobre la maduración oligodendroglial y los posibles efectos compensatorios de la administración de aTf exógena. El análisis fue realizado sobre CPNs control luego de la diferenciación *in vitro* durante 6 días en presencia o ausencia del inhibidor del TR $\alpha$ 1. Dado que el inhibidor del TR $\alpha$ 1 es soluble en DMSO se determinó mediante MTT la concentración de DMSO que no afectara la viabilidad celular ni la capacidad de los OPCs de diferenciarse hacia OLGs. Las dosis de hasta 0.1% de DMSO no afectaron ninguno de los dos parámetros (**Figura R22A**). Esta concentración se encuentra por encima del 0.03% de concentración de DMSO utilizada en los experimentos. Los grupos experimentales incluyeron células tratadas con: vehículo (DMSO), vehículo + aTf 100  $\mu$ g/ml (DMSO + aTf), inhibidor del TR $\alpha$ 1 (I850) e inhibidor del TR $\alpha$ 1+ aTf 100  $\mu$ g/ml (I850 + aTf). Inicialmente se evaluó la población de OPCs PDGFr $\alpha^+$  y se encontró que la aTf disminuyó el número de células PDGFr $\alpha^+$  en comparación con células no tratadas con aTf (**Figura R22B, DMSO vs. DMSO + aTf**). La inhibición química del TR $\alpha$ 1 produjo el efecto contrario encontrándose mayor número de células PDGFr $\alpha^+$  en comparación con células no tratadas con el inhibidor (**Figura R22B, DMSO vs. I-850**). La administración conjunta de aTf e inhibidor del TR $\alpha$ 1 mostró que la primera es capaz de revertir parcialmente los efectos del inhibidor, dado que el número de células PDGFr $\alpha^+$  fue

similar al de las células DMSO pero no alcanzó el número de células PDGFr $\alpha$ <sup>+</sup> encontrados en células DMSO + aTf (**Figura R22B, I850 vs. I-850 + aTf vs. DMSO + aTf**).

Posteriormente se analizó la población de OLGs maduros MBP<sup>+</sup>/CC1<sup>+</sup> y se encontró que la aTf incrementó el número de células positivas para ambos marcadores mientras que el inhibidor del TR $\alpha$ 1 disminuyó dicho número (**Figura R23-AB, DMSO vs. DMSO + aTf y DMSO vs. I-850**). La administración combinada de aTf e inhibidor del TR $\alpha$ 1 mostró que la primera escapaz de revertir parcialmente los efectos del inhibidor ya que condujo a un número de células MBP<sup>+</sup>/CC1<sup>+</sup> similar al de las células DMSO pero no alcanzó el número de células MBP<sup>+</sup>/CC1<sup>+</sup> encontrado en células DMSO + aTf (**Figura R23-AB, I850 vs. I-850 + aTf vs. DMSO + aTf**).

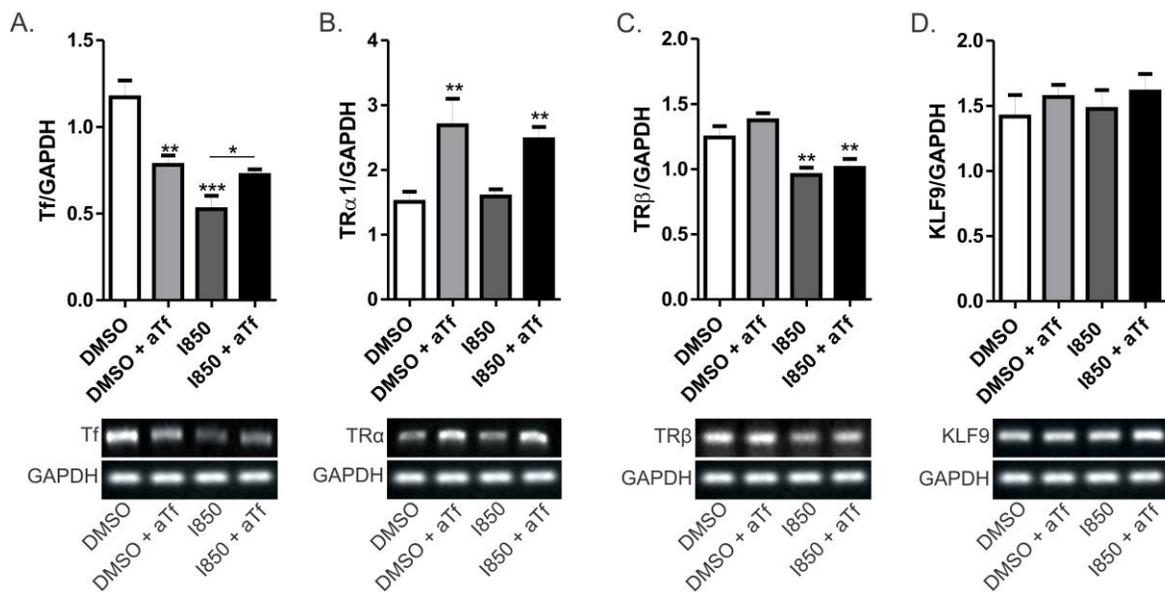


**Figura R22. Efecto del inhibidor del TR $\alpha$ 1 sobre la población de OPCs PDGFr $\alpha$ <sup>+</sup>.** (A) Ensayo de MTT para células cultivadas en presencia de concentraciones crecientes de DMSO (vehículo del inhibidor del TR $\alpha$ 1) durante 6 días. (B) Cuantificación del porcentaje de células PDGFr $\alpha$ <sup>+</sup>. (C) Imágenes representativas del efecto observado. Los asteriscos representan la significancia estadística respecto del grupo DMSO y las barras indican comparaciones entre grupos. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ .



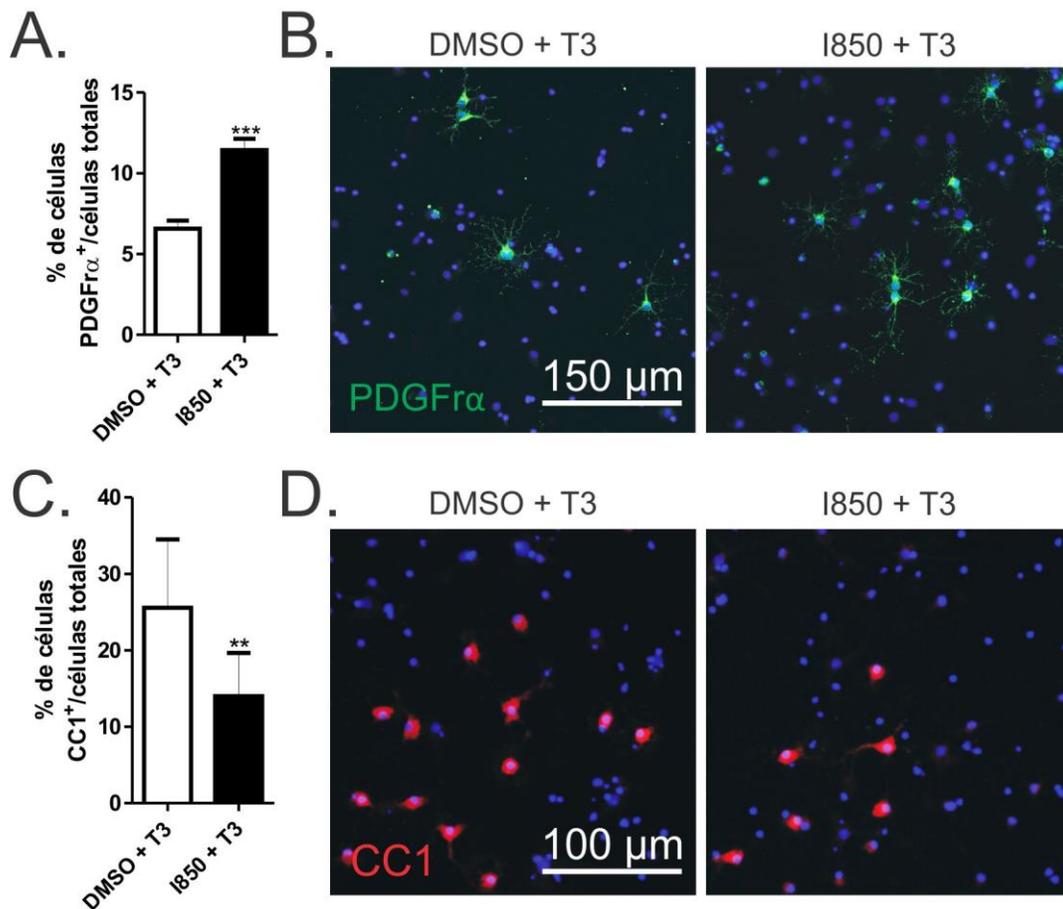
**Figura R23. Efecto del inhibidor del TR $\alpha$ 1 sobre la población de OLGs maduros CC1<sup>+</sup> y MBP<sup>+</sup>.** (A) Cuantificación del porcentaje de células CC1<sup>+</sup>. (B) Cuantificación del porcentaje de células MBP<sup>+</sup>. (C) Imágenes representativas del efecto observado en la población CC1<sup>+</sup> y MBP<sup>+</sup>. Los asteriscos representan la significancia estadística respecto del grupo DMSO y las barras indican comparaciones entre grupos. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ .

Estudiamos el efecto del inhibidor del TR $\alpha$ 1 sobre la expresión de los ARNm de la Tf, TR $\alpha$ 1, TR $\beta$  y KLF9. La RT-PCR semi-cuantitativa a punto final, a partir de muestras de ARN obtenidas luego de 6 días de diferenciación *in vitro* de células DMSO, DMSO + aTf, I850 e I850 + aTf mostró que el inhibidor del TR $\alpha$ 1 no modificó el contenido de los ARNm del TR $\alpha$ 1 y el KLF9 (**Figura R24-BD, DMSO vs. I-850**), sin embargo disminuyó los niveles del ARNm del TR $\beta$  y la Tf (**Figura R24-AC, DMSO vs. I-850**). En ausencia o presencia del inhibidor del TR $\alpha$ 1 la aTf fue capaz de incrementar los niveles del ARNm del TR $\alpha$ 1 (**Figura R24-B, DMSO vs. DMSO + aTf e I-850 vs. I-850 + aTf**) sin mostrar influencia sobre los niveles del ARNm del TR $\beta$  y el KLF9 (**Figura R24-CD, DMSO vs. DMSO + aTf e I-850 vs. I-850 + aTf**).



**Figura R24. Efecto del inhibidor del TR $\alpha$ 1 sobre la expresión de los ARNm de la Tf, TR $\alpha$ 1, TR $\beta$  y KLF9.** Análisis de la expresión de los ARNm de la (A) Tf, (B) TR $\alpha$ 1, (C) TR $\beta$  y (D) KLF9 mediante PCR semi-cuantitativa a punto final. Se utilizó como gen de normalización GAPDH. Los asteriscos representan la significancia estadística respecto del grupo DMSO y las barras indican comparaciones entre grupos. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ .

Finalmente se evaluó la capacidad de T3 de revertir los efectos del inhibidor del TR $\alpha$ 1. Se analizó la población de OPCs PDGFr $\alpha$ <sup>+</sup> y OLGs maduros CC1<sup>+</sup> luego de 3 días de diferenciación *in vitro*. Se observó que T3 fue incapaz de revertir los efectos del inhibidor del TR $\alpha$ 1 sobre la maduración de los OPCs *in vitro* (**Figura R25**).



**Figura R25.** Los efectos del inhibidor del TR $\alpha$ 1 sobre la maduración oligodendroglial no son compensados por el tratamiento con T3. (A) Cuantificación del porcentaje de células PDGFr $\alpha$ <sup>+</sup> respecto de células totales. (B) Imágenes representativas del efecto observado en la población PDGFr $\alpha$ <sup>+</sup>. (C) Cuantificación del porcentaje de células CC1<sup>+</sup> respecto de células totales. (D) Imágenes representativas del efecto observado en la población CC1<sup>+</sup>. El análisis estadístico se realizó mediante test t de Student. \*\*p  $\leq$  0.01, \*\*\*p  $\leq$  0.001.

## DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

En el SNC de los vertebrados, los OLGs forman la membrana mielina y son originados a partir de los OPCs que maduran para convertirse en OLGs mielinizantes (He y Lu, 2013; Li y col., 2009; Richardson y col., 2006). Factores de crecimiento tales como el PDGF-AA, el bFGF y el IGF-I promueven la migración, supervivencia y proliferación de los OPCs (Hsieh y col., 2004; McKinnon y col., 1993). Contrariamente las HTs, el factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ) y la Tf, entre otros, promueven la maduración de los OPCs (Barres y col., 1994; Böttner y col., 2000; Dugas y col., 2006; Garcia y col., 2004; Paez y col., 2002, 2006). Los OPCs son originados a partir de CPNs multipotentes que poseen la capacidad de diferenciarse en neuronas, astrocitos y OLGs (Rogister y col., 1999). Dichas CPNs pueden ser cultivadas *in vitro* y expandidas mediante el agregado de factores tales como el EGF y el bFGF (Reynolds y col., 1992) conduciendo a la formación de agregados celulares denominados neuroesferas. La elección de la estirpe celular originada por las CPNs es controlada por factores intrínsecos y extrínsecos, entre estos últimos se pueden destacar el PDGF-AA que induce la diferenciación a neuronas (Williams y col., 1997) mientras que altas dosis de bFGF o la exposición a T3, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, inducen el linaje oligodendroglial (Fernández y col., 2009; Johe y col., 1996; Murray y Dubois-Dalcq, 1997).

La capacidad de la Tf y de las HTs de favorecer la mielinización previamente descritos en nuestro laboratorio, podría deberse ser en parte a los efectos combinados de dichos factores sobre la maduración de los OPCs. Consecuentemente, estudiamos si existe dicha “conversación” entre las HTs y la Tf durante la mielinogénesis y la diferenciación hacia linaje oligodendroglial de las CPNs derivadas de la ZSV.

## **1. Estudios in vivo: la Transferrina y las Hormonas Tiroideas son necesarias para que ocurra una adecuada mielinización.**

Las HTs influyen profundamente el desarrollo del individuo modulando la organogénesis del aparato intestinal, corazón, huesos, piel y el sistema nervioso (Pascual y Aranda, 2013). En roedores, las HTs influyen el desarrollo del SNC durante las primeras semanas de vida como consecuencia del incremento de la expresión de la DIO2 (principal convertidora de T4 en T3), la disminución de la expresión de la DIO3 (principal convertidora de T3 en formas inactivas) (Bates y col., 1999) y el incremento de la expresión de los TRs (Perez-Castillo y col., 1985) desde el momento del nacimiento hasta los 15 días de vida. En roedores la mielinización es un proceso postnatal (Howdeshell, 2002) que tiene sus comienzos a los 10-12 días de vida, alcanza su pico máximo de síntesis a los 20 días y disminuye gradualmente al alcanzar la vida adulta (Morell, 1984). Dado el papel crucial de las HTs durante el desarrollo del SNC, el hipotiroidismo congénito produce daños irreparables que comprenden desde ligeros defectos de la visión hasta el retraso mental (Dussault y Ruel, 1987). Estudios clínicos en los que se evalúan niños con hipotiroidismo congénito sugieren un papel potencial de las HTs sobre la mielinización (Rosman, 1972). De manera similar, los ratones *hyt/hyt* (hipotiroideos congénitos), presentan una hipomielinización marcada que es parcialmente revertida por la administración oral de T4 (Noguchi y col., 1985).

En el caso de la Tf, los trabajos con animales “*knock out*” sugieren que la misma es indispensable para el desarrollo y la homeostasis del individuo (Trenor y col., 2000). Distintos estudios revelan que la síntesis de mielina y la oligodendrogénesis son procesos dependientes de la Tf (Escobar Cabrera y col., 1994, 1997; Espinosa de los Monteros y col.,

1999). En el SNC, la expresión de la Tf se produce en distintos tipos celulares a lo largo de las distintas etapas del desarrollo. Las primeras células en las que se detecta son las neuronas alrededor de E18 sosteniéndose hasta P6. Posteriormente, los OLGs comienzan a presentar reactividad para Tf (Connor y Fine, 1986), decayendo su contenido en el momento en que se cierra la barrera hemato-encefálica (BBB), hecho que ocurre alrededor de P10. En el cerebro de animales adultos, el patrón de inmunoreactividad para la Tf es nulo o casi ausente en las neuronas, mientras que es positivo en los plexos coroideos y el citoplasma de algunos OLGs en la corteza cerebral, el cerebelo y la médula espinal (Connor y Fine, 1987; Espinosa de los Monteros y col., 1989). En cultivos gliales primarios de cerebro de rata, la Tf es detectada en los OLGs y su expresión declina después de 7 días *in vitro* (DIV7), conjuntamente con un aumento en el número de células MBP<sup>+</sup> y O1<sup>+</sup> (Espinosa de los Monteros y col., 1989). En nuestro laboratorio hemos descrito que la administración intracraneal de aTf posee efectos positivos sobre la maduración oligodendroglial y la mielinización durante una “ventana temporal” de acción comprendida entre P3 y P5 (Marta y col., 2000, Garcia y col., 2003, 2004). Estos datos indicarían que la aparición de inmunoreactividad para Tf en el SNC estaría relacionada con fenotipos celulares proliferantes y/o en etapas tempranas de la diferenciación, mientras que posteriormente en el desarrollo, en el adulto, se relaciona con células que mantendrían la mielina.

Nuestros resultados previos con animales hipertiroideos indican que se produce un incremento prematuro en el contenido de los ARNm de proteínas de la mielina tales como la MBP, la PLP y la CNPasa. Simultáneamente con estos incrementos, se observa un contenido 7 veces mayor del ARNm de la Tf en comparación con animales control (Marta y col., 1998). Dado que la Tf posee efectos positivos sobre la maduración oligodendroglial

y la mielinización, el incremento de la expresión de la Tf podría representar un evento fisiológico necesario para que ocurra la progresión de la mielinización y en este marco, cabe la posibilidad de que el mayor contenido del ARNm de la Tf que se observa en animales hipertiroideos sea uno de los mecanismos que conducen a la aceleración de la mielinización observada.

En el presente trabajo de Tesis los resultados *in vivo* muestran que a P10, los animales Hiper contienen mayor cantidad de Tf y de su ARNm en comparación con animales Ctról, por el contrario, los animales Hipo contienen menor cantidad de Tf y de su ARNm en comparación con animales Ctról. En el caso de los animales aTf<sub>ic</sub>, no se observan diferencias en el contenido de Tf o su ARNm respecto de los animales Ctról. El hecho de que la administración intracraneal de aTf no afecte el contenido de la Tf ni de su ARNm sugiere un papel fundamental de las HTs sobre el control de la expresión de la Tf. Esto puede explicarse teniendo en cuenta los hallazgos realizados por Lin y col. (2003) que indican que las HTs regulan la expresión de la Tf de manera dosis/tiempo dependientes a través del TR $\alpha$ 1 y que el apoTR $\alpha$ 1 reprime la expresión de la Tf. Así, a edades tempranas, en el caso de los animales Hiper la mayor cantidad de HTs conduce a un incremento de la expresión de la Tf que podría ser mediado por el TR $\alpha$ 1, mientras que en los animales hipotiroideos el déficit de HTs, conduce a una disminución del efecto positivo sobre la expresión de la Tf mediado por la unión de las HTs al TR $\alpha$ 1, y además permite que los efectos inhibitorios del apoTR $\alpha$ 1 disminuyeran la expresión de la Tf. A P20 no se observan diferencias en el contenido de la Tf o de su ARNm excepto en los animales hipotiroideos, en los que el contenido de Tf y de su ARNm se encuentran disminuidos en comparación con el resto de los grupos. A esta edad en animales hipotiroideos el déficit de HTs y la consecuente disminución del estímulo del TR $\alpha$ 1 junto con los efectos inhibitorios del

apoTR $\alpha$ 1 podrían explicar el resultado obtenido. Los animales Hiper presentan un comportamiento interesante, mientras que a P10 posee más Tf y su ARNm que los animales Ctrol, a P20 no se observan diferencias con el grupo Ctrol. Estos datos respaldan la hipótesis previamente esbozada, según la cual, el exceso de HTs de los animales hipertiroideos conduce al incremento prematuro de la expresión de la Tf, lo que a su vez podría ser un evento necesario para que ocurra una adecuada mielinización. En este contexto, la aparición temprana de dicho incremento podría ser un elemento que aceleraría la mielinización.

Con respecto a la maduración de los OLGs, el análisis inmunohistoquímico de los animales Hiper, aTf<sub>ic</sub> e Hipo arroja resultados que se replican a P10 y P20. Estos indican que, en comparación con los animales Ctrol, los animales Hiper contienen menor cantidad de OPCs PDGFr $\alpha$ <sup>+</sup> y un incremento prematuro de la inmunoreactividad de RIP a P10, mientras que a P20 se observa un incremento de la inmunoreactividad/contenido de MBP y un mayor número de OLGs CAII<sup>+</sup>. De manera similar pero menos contundente, los animales aTf<sub>ic</sub> presentan una disminución prematura de la cantidad de OPCs y signos de una mielinización acelerada. El hecho de que los efectos de la aTf sean de una menor magnitud en comparación con los de las HTs, respalda la hipótesis de que la Tf podría ser uno de los mediadores necesarios para los efectos positivos de las HTs sobre la mielinización. Los animales Hipo presentan una hipomielinización marcada en comparación con animales Ctrol, evidenciada por el mayor número de OPCs PDGFr $\alpha$ <sup>+</sup> y la disminución de la inmunoreactividad de RIP a P10. A P20 se observa una disminución de la inmunoreactividad/contenido de MBP y un menor número de OLGs CAII<sup>+</sup>. En su conjunto estos resultados señalan que las HTs y la aTf, individualmente, producen la aceleración de la mielinización mientras que el déficit de HTs produce el efecto contrario. Las HTs son

capaces de regular la expresión de la Tf y ésta posee, *per se*, efectos positivos sobre la mielinización. Por ello evaluamos si la administración de aTf a animales hipotiroideos, en los que se observa una caída sustancial del contenido de Tf y su ARNm, es capaz de revertir la hipomielinización causada por el déficit de HTs. Encontramos que a P10 la aTf revierte parcialmente la hipomielinización observada en animales Hipo mientras que a P20 no se observan diferencias en el grado de mielinización entre animales Hipo e Hipo + aTf<sub>ic</sub>. Estos hallazgos sugieren que los efectos sostenidos en el tiempo del déficit de HTs no pueden ser soslayados por una administración de aTf, lo que implica que posteriormente a las acciones de la Tf, serían necesarios los efectos de HTs para poder alcanzar un grado adecuado de mielinización. En su conjunto estos resultados demuestran que los efectos combinados de la Tf y las HTs son necesarios para que ocurra una adecuada mielinización. La mielinización en roedores ocurre durante las primeras semanas de vida y es una etapa profundamente influenciada por el eje de la HC/IGF-I. El eje HC-IGF-I posee un papel fundamental durante el desarrollo del SNC debido a que el IGF-I es un potente regulador de la maduración oligodendroglial así como de la mielinización (Hsieh y col., 2004; Fernandez y Torres-Alemán, 2012). Aunque se ha demostrado que las HTs son reguladoras de la síntesis y la secreción de la HC en la periferia (Silva y col., 2010), se desconoce si estos efectos permisivos existen en el SNC. Tang y col., (2011) muestran una disminución importante en la expresión de la HC y su receptor en el hipocampo de ratas hipotiroideas, lo que sugiere que tal efecto existe en el SNC.

Debido a que en nuestros experimentos el eje tiroideo se encuentra alterado, decidimos evaluar si esos cambios, así como también la administración de aTf, influyen sobre la expresión del IGF-I y su receptor en el cerebro. Nuestros resultados muestran que no se producen cambios en la expresión del IGF-I o su receptor entre grupos a P10 y P20, lo que

sugiere que la interacción entre la las HTs y la Tf durante la mielinización es independiente del eje HC-IGF-I.

## **2. Estudios in vitro: la Transferrina y las Hormonas Tiroideas son necesarias para que ocurra una adecuada maduración oligodendroglial.**

Los OLGs son las células que producen la mielina en el SNC y para ello atraviesan varias etapas de diferenciación que conducen a la formación de OLGs maduros, caracterizados por la expresión de diversas proteínas de la mielina tales como la PLP, las MBPs, la MAG y la MOG (Bamann y Pham-Dinh, 2001; Buchet y Baron-Van Evercooren, 2009). Distintas metodologías permiten obtener CPNs (Johe y col., 1996) u OPCs (McCarthy y de Vellis, 1980) constituyendo herramientas invaluable para el estudio de la diferenciación/maduración de los OLGs *in vitro*. En estas condiciones tanto la Tf como las HTs son dos factores capaces de inducir la diferenciación de las CPNs hacia linaje oligodendroglial (Fernández y col., 2009; Johe y col., 1996; Silvetroff y col., 2012) así como la maduración de los OPCs (Barres y col., 1994; Dugas y col., 2006; Garcia y col., 2003, 2004; Paez y col., 2002, 2006).

Desde hace varios años nuestro laboratorio está focalizado en el estudio de los efectos de la Tf sobre la maduración de los OPCs. Entre los principales hallazgos utilizando cultivos primarios de OPCs y las líneas celulares de OLGs N19 y N20.1, destacan la capacidad de la Tf de producir la salida del ciclo celular de los OPCs y el comienzo de la diferenciación de los mismos (Garcia y col., 2004; Paez y col., 2002, 2006). Igualmente, en cultivos primarios determinamos que existe un mecanismo de acción de la Tf mediado por su receptor y que como consecuencia de la unión de la Tf al mismo, se produce la activación

de la Fin quinasa, de la vía de MEK/ERK y de la vía de Akt/PI3K (Pérez y col., 20013). En los estudios realizados con las líneas celulares de OLGs mencionadas encontramos que tanto la sobreexpresión de la Tf (Paez y col., 2005) como el agregado de aTf exógena (Paez y col., 2004) al medio de cultivo producen la maduración de las células por diversos mecanismos que involucran a los factores de transcripción Sp1, CREB y el NF- $\kappa$ B (Paez y col., 2006b). Paez y col., (2006b) demuestran, en las líneas celulares N19 y N20.1, que la aTf es capaz de regular la expresión de los TRs, sugiriendo que podría existir un vínculo entre la Tf y las HTs durante la maduración oligodendroglial *in vitro*.

El conjunto de evidencias anteriormente expuestas junto con los resultados *in vivo* de la presente Tesis nos llevaron a profundizar en el estudio de los efectos combinados de la Tf y las HTs durante la maduración oligodendroglial a partir de las CPNs derivadas de la ZSV.

Inicialmente encontramos que el tratamiento con las HTs o la aTf conducen a la producción de un mayor número de OLGs maduros MBP<sup>+</sup> y que, de forma similar a lo ocurrido *in vivo*, los efectos de la HTs son de una mayor magnitud respecto de los de la aTf. Al evaluar la expresión del ARNm de la Tf en CPNs tratadas con HTs, observamos que las mismas inducen un incremento prematuro del contenido del ARNm de la Tf. Dado que la expresión de la Tf aumenta a medida que las CPNs se diferencian en ausencia de tratamientos, estos resultados sugieren que las HTs incrementan prematuramente la expresión de la Tf, posiblemente como parte de una serie de cambios en la expresión de diversos genes que conducirían a la maduración de los OPCs.

Para dilucidar la posible interacción entre las HTs y la Tf decidimos silenciar la expresión de la Tf y evaluar la capacidad de las HTs de influenciar la maduración de los OPCs en estas condiciones. En concordancia con resultados previos del laboratorio sobre la diferenciación de las CPNs hacia linaje oligodendroglial *in vivo* e *in vitro* (Guardia Clausi y

col., 2010; Silvestroff y col., 2013), observamos que el silenciamiento de la expresión de la Tf induce una disminución de la maduración de los OLGs derivados de CPNs, evidenciado por un menor número de células  $CC1^+$  y  $MBP^+$  y un mayor número de OPCs  $PDGFr\alpha^+$ . El tratamiento con T3 de células con la expresión de la Tf silenciada (Sec 1 y2) muestra que la T3 es incapaz de promover un número de OLGs maduros similar al observado en células Scr tratados con T3, dejando en evidencia dos aspectos de la Tf y las HTs durante la maduración de los OPCs: primero, que la Tf ejerce efectos únicos sobre la maduración oligodendroglial sin observarse mecanismos compensatorios frente al silenciamiento *in vitro*; y segundo, que el incremento de la expresión de la Tf inducido por las HTs es parte del programa de cambios en la expresión génica que las HTs llevan a cabo para favorecer la maduración de los OPCs.

### **3. El Receptor alfa 1 de las Hormonas Tiroideas como vínculo entre los efectos de la Transferrina y las Hormonas Tiroideas durante la maduración oligodendroglial y la mielinización**

Durante la vida embrionaria gran parte de las HTs es provista por la circulación materna y aunque puede detectarse la presencia de los TRs, la gran actividad de la DIO3 (que transforma T3 en formas inactivas) junto con la impermeabilidad del cerebro a la T3 (Grijota-Martínez y col., 2011) sugieren la existencia de un elegante mecanismo que impide que las HTs ejerzan sus efectos antes de tiempo. La glándula tiroidea de los roedores comienza a funcionar a E17; mientras que los ARNm de los TRs se expresan en el cerebro a partir de E11.5 y E12.5 para el  $TR\alpha$  y el  $TR\beta$  respectivamente (Bradley y col., 1992). Esto sugiere que los apoTRs podrían actuar inhibiendo la expresión de sus genes diana

hasta el momento en que el cerebro es capaz de importar cantidades significativas de HTs y de producir T3 *in situ*.

Durante el desarrollo postnatal del SNC de los roedores, los efectos de las HTs son indispensables en las primeras semanas de vida, lo que conduce a un periodo de máxima vulnerabilidad a la falta de HTs comprendido alrededor de la 2/3<sup>ra</sup> semana de vida (Anderson y col., 2003). Este fenómeno sería consecuencia de que durante el periodo señalado, se produzca el aumento de la biodisponibilidad de T3 en el cerebro, así como del incremento de la expresión de los TRs que median las acciones dicha hormona, alcanzando un máximo de expresión a P6 y de unión de T3 a sus TRs a P15 (Carlson y col., 1994; Bates y col., 1999; Ferreiro y col., 1990; Perez-Castillo y col., 1985). En su conjunto estos datos sugieren que los TRs tienen un papel clave en la maduración de los OPCs para que estos promuevan la mielinización y que el incremento de la expresión de los TRs y de HTs durante la primera semana de vida sería el preludeo del inicio de la mielinización.

Las acciones de las HTs son mediadas por sus receptores nucleares cuya importancia se ha establecido, pero cuyas funciones específicas durante la mielinización y la maduración de los OPCs no han sido determinadas. Aunque la posibilidad de una redundancia entre los efectos de ambos TRs no puede ser descartada, los distintos patrones espacio-temporales de expresión de las distintas isoformas sugieren fuertemente que los TRs tendrían funciones distintas. En el SNC, la expresión del ARNm del TR $\alpha$  es ubicua desde etapas tempranas del desarrollo, mientras que el ARNm del TR $\beta$  se expresa posteriormente y está restringido a pequeñas regiones anatómicas del cerebro (Bradley y col., 1992). Parece existir un consenso respecto de que el TR $\alpha$  es expresado por OPCs y OLGs mientras que el TR $\beta$  se expresa en OLGs de manera tal que ambos receptores son co-expresados en OLGs antes de que se exprese la CNPasa (Carré y col., 1998; Bury y col., 2002).

El hecho de que los TRs son indispensables para que ocurra una adecuada maduración oligodendroglial se hace evidente por la presencia de una población de OPCs de ciclo lento en el nervio óptico de animales “*knock out*” para ambos TRs (Bass y col., 2002). Los animales “*knock out*” para el TR $\alpha$ 1 presentan un ligero retraso madurativo en los OPCs y éstos son incapaces de dejar de proliferar y madurar luego de la exposición a HT *in vitro* (Billon y col., 2002), mientras que los OPCs de animales “*knock out*” para el TR $\beta$  responden al tratamiento con HT (Billon y col., 2001). En un trabajo reciente, Baxi y col., (2014) demuestran que un agonista específico para el TR $\beta$  promueve la maduración oligodendroglial *in vitro* de OPCs de roedores y humanos. *In vivo*, este tiromimético favorece la maduración de los OPCs y el incremento de la expresión de proteínas de la mielina tales como la MBP, la CNPasa y la MAG, lo cual indica que la unión de las HTs al TR $\beta$  favorece la maduración de los OPCs para promover la mielinización en presencia de los efectos mediados por el TR $\alpha$ . Estos resultados revelan dos aspectos importantes de los efectos mediados por los TRs sobre la maduración oligodendroglial: primero, que las acciones mediadas por el TR $\alpha$ 1 son indispensables para que los OPCs dejen de proliferar y comiencen a madurar; y segundo, que el TR $\alpha$ 1 podría ejercer efectos redundantes con los efectos mediados por TR $\beta$  pero no se produciría el fenómeno inverso, o al menos no sería mediado por las HTs. Aunque los efectos de las HTs mediados por el TR $\alpha$ 1 sobre la maduración oligodendroglial son innegables, *in vivo* la evidencia no es suficientemente concluyente ya que los animales TR $\alpha$ 1<sup>-/-</sup> no reproducen los efectos observados en animales hipotiroideos sobre la mielinización y la maduración de los OPCs. Este hecho puede deberse a que los fenómenos inducidos por el hipotiroidismo sean una combinación de la ausencia de la activación de la transcripción de genes “diana” y la persistencia de los efectos regulatorios negativos de los TRs en ausencia de ligando (Bernal y Morte, 2012).

En su conjunto, esta evidencia sugiere que el TR $\alpha$ 1 podría actuar como interruptor mediando en los eventos que llevan al comienzo de la maduración de los OPCs.

Está claro que las HTs son capaces de inhibir la proliferación de las CPNs *in vitro* e inducir la diferenciación de las mismas a OLG (Chen y col., 2011; Fernández y col., 2009), aunque aún no están completamente aclarados los roles de los distintos TRs en dichos procesos. Actualmente existe consenso respecto a que ambos TRs inhiben la proliferación de las CPNs; sin embargo, la ausencia de expresión de TR $\beta$  en los progenitores de la ZSV sugiere que el TR $\alpha$ 1 sería el responsable de mediar los efectos de las HTs sobre dichos progenitores reprimiendo la expresión del factor de transcripción Sox2, responsable de la multipotencia de las CPNs, así como también de la expresión de genes vinculados a la progresión del ciclo celular como la *CiclinaD1* y *c-Myc* (Lemkine y col., 2005; López-Juárez y col., 2012; Stergiopoulos y Politis, 2013). Los resultados *in vivo* de esta Tesis están en concordancia con el papel central que se atribuye a los efectos de las HTs mediados por el TR $\alpha$ 1. A P10, tanto en animales Hiper como aTf<sub>ic</sub> se observa una mielinización acelerada y la misma podría explicarse, en parte, por los efectos positivos que las HTs ejercen a través del TR $\alpha$ 1. Los animales Hiper presentan mayor cantidad de HTs respecto de animales Ctrol, aunque los niveles de expresión del TR $\alpha$ 1 son similares entre dichos grupos. Esto conduciría a una situación de mayor cantidad de ligando disponible para cantidades similares de receptor con la posibilidad de que un mayor número de receptores estén unidos a las HTs. Los animales aTf<sub>ic</sub> exhiben mayor cantidad de TR $\alpha$ 1 respecto de los animales Ctrol, pero cantidades similares de HTs, por lo que en estas condiciones un mayor número de receptores podrían unirse a su ligando. En el caso de los animales hipotiroideos, el mayor nivel de expresión del TR $\alpha$ 1 establecería una situación en la que un mayor número de receptores se encontraría limitado de ejercer sus efectos debido al profundo déficit de HTs. Asimismo, la

presencia de mayor cantidad de TR $\alpha$ 1 como mecanismo compensatorio durante el hipotiroidismo (Constantinou y col., 2005) en un contexto de concentraciones significativamente pequeñas de HTs, daría lugar a la posibilidad de los efectos inhibitorios del apoTR $\alpha$ 1 en la expresión de genes “diana”.

Con objetivo de entender la posible función del TR $\alpha$ 1 durante la diferenciación/maduración de los OLGs realizamos experimentos *in vitro* y evaluamos la expresión del ARNm del TR $\alpha$ 1 en células sin tratar. Observamos que durante la diferenciación de las CPNs en estas condiciones se produce el incremento de OLGs maduros MBP<sup>+</sup> y de la expresión del TR $\alpha$ 1. El aumento en el número de células diferenciadas podría, en parte, explicarse por el incremento de la expresión del TR $\alpha$ 1 y la presencia de su ligando en medio de cultivo. Como se indicó previamente, el TR $\alpha$ 1 actuaría de manera dual sobre la expresión génica: por un lado reprimiendo la expresión cuando se encuentra en ausencia de ligando (como apoTR $\alpha$ 1) y por otro lado, favoreciendo la expresión génica cuando se une a su ligando (Cheng y col., 2010). Es así que para dilucidar estos efectos duales utilizamos un inhibidor químico del receptor. En estas condiciones es posible bloquear los efectos positivos sobre la expresión génica al limitar la interacción con su ligando, pero se conservan los efectos negativos sobre la expresión génica del apoTR $\alpha$ 1 a los que se atribuyen los efectos deletéreos del hipotiroidismo sobre la maduración oligodendroglial y la mielinización (Bernal y Morte, 2012). Cultivamos las CPNs en presencia de I-850, antagonista específico del TR $\alpha$ 1, y encontramos en presencia del mismo una disminución de la maduración de los OPCs junto con la disminución de la expresión de la Tf. Estos resultados indicarían que los efectos de las HTs mediados por el TR $\alpha$ 1 son necesarios para que ocurra una adecuada maduración de los OPCs mientras que las acciones del apoTR $\alpha$ 1 serían responsables de impedir dicha maduración.

Nuestros resultados *in vivo* e *in vitro*, sugieren que las HTs serían capaces de regular la expresión de la Tf durante la mielinización y la maduración oligodendroglial vía TR $\alpha$ 1. Este comportamiento podría ser similar a lo descrito por Lin y col., (2003), quienes utilizan la línea celular hepática HepG2 que no posee cantidades detectables de los TRs, a la cual que transfectan con un plásmido que contiene el gen del TR $\alpha$ 1 (HepG2-TR $\alpha$ 1) o el plásmido sin dicho gen (HepG2-Neo). El tratamiento de ambos grupos con HT muestra que en las células HepG2-TR $\alpha$ 1 se produce un incremento en la expresión del ARNm de la Tf de manera dosis-tiempo dependiente mientras que no se observan cambios en el contenido del ARNm de la Tf en células HepG2-Neo. Mediante ensayos de “*nuclear run-on*” concluyen que las HTs regulan a nivel transcripcional el contenido del ARNm de la Tf, sugiriendo que las células que sobreexpresan TR $\alpha$ 1 contienen menor cantidad de Tf y su ARNm debido a una función inhibitoria del apoTR $\alpha$ 1 sobre la expresión de la Tf. Los resultados obtenidos en esta Tesis nos permiten postular que las acciones de la Tf y las HTs sobre la maduración oligodendroglial y la mielinización, no serían efectos disociados de dos factores que favorecen dichos procesos, sino que por el contrario, existe una relación causal entre ambos factores para asegurar una adecuada maduración oligodendroglial y mielinización.

El análisis de Lin y col., (2003) demuestra que las HTs modulan la expresión de la Tf a través del TR $\alpha$ 1, mientras que los datos de nuestro laboratorio señalan que la administración de aTf produce la salida del ciclo celular y el comienzo de la maduración de los OPCs (Garcia y col., 2004; Paez y col., 2006). En conjunto, ambos resultados sugieren que las HTs podrían incrementar la expresión de la Tf mediada por el TR $\alpha$ 1 como un evento temprano en el inicio de la maduración de los OPCs. Para validar esta hipótesis decidimos evaluar si el bloqueo farmacológico del TR $\alpha$ 1 (con el antagonista I-850) junto

con el agregado de aTf exógena son suficientes para llevar a cabo una adecuada maduración oligodendroglial. Nuestros hallazgos indican que el tratamiento de las CPNs con el antagonista del TR $\alpha$ 1 conduce a una disminución de la maduración de los OPCs resaltando, como ya se indicó, el papel clave de los efectos mediados por el TR $\alpha$ 1. Al realizar el tratamiento combinado de las CPNs con I-850 y aTf observamos que los efectos del inhibidor sobre la maduración de los OPCs son parcialmente revertidos por la administración de aTf. Esto sugiere que al menos algunos de los efectos ejercidos por las HTs, a través del TR $\alpha$ 1, serían atribuibles a la aTf. Finalmente evaluamos la capacidad de las HTs de revertir los efectos del antagonista del TR $\alpha$ 1 y observamos que la administración de HTs revierte parcialmente los efectos del antagonista del TR $\alpha$ 1 sobre la maduración de los OPCs consolidando la hipótesis de que los efectos mediados por el TR $\alpha$ 1 no pueden ser compensados por los efectos mediados por el TR $\beta$ . Estos resultados junto con los obtenidos a partir del doble tratamiento de las CPNs con I-850 y aTf, sugieren que la Tf ejerce efectos únicos durante la maduración de los OPCs e independientes de los de las HTs, dado que en presencia de la inhibición de la expresión génica causada por el apoTR $\alpha$ 1 se observan las acciones positivas de la aTf sobre la maduración de los OPCs. Nuestros hallazgos sugieren que los efectos de las HTs, mediados por el TR $\alpha$ 1, involucran otros mecanismos que favorecen la maduración de los OPCs además de modular la expresión de la Tf.

Previamente se señaló que la Tf y las HTs favorecen la maduración oligodendroglial y la mielinización de manera conjunta. Además se sugirió que existiría una confluencia entre los mecanismos de acción de ambos factores en la que el TR $\alpha$ 1 podría ser el vínculo entre la Tf y las HTs. Nuestro grupo ha demostrado que los TRs no son detectados en la ZSV de animales control a P42. Sin embargo, el TR $\alpha$  es inducido en dicha región anatómica

durante la desmielinización, inducida por la intoxicación con cuprizona, y la administración de T3 en estas condiciones no provoca cambios en el contenido de dicho receptor. Por otra parte el TR $\beta$  se expresa en menor magnitud en la ZSV de animales intoxicados con cuprizona mientras que el tratamiento de estos animales con T3 induce un fuerte incremento de la expresión del TR $\beta$ , lo que sugiere en su conjunto, que la expresión de los TRs posee distintos moduladores (Franco y col., 2008). Los resultados *in vivo* obtenidos en el presente trabajo concuerdan con lo anteriormente expuesto, indicando que la modulación de la expresión del TR $\alpha$ 1 es independiente de las HTs pero su expresión es inducida por la aTf, mientras que la expresión del TR $\beta$  parece responder exclusivamente a las HTs. En el caso de los experimentos *in vitro*, el silenciamiento de la expresión del ARNm de la Tf influye negativamente sobre la maduración de los OPCs derivados de CPNs, así como también provoca una caída de la expresión del TR $\alpha$ 1, mientras que no afecta la expresión del TR $\beta$ . Esto, junto con el hecho de que la administración de aTf *in vitro* induce el incremento de la expresión del TR $\alpha$ 1, demuestra que la Tf a su vez es capaz de modular la expresión del TR $\alpha$ 1. Estos resultados se ratifican por el hecho de que la administración de HTs revierte parcialmente la limitación de los OPCs de madurar impuesta por el silenciamiento de la expresión de la Tf, a la vez que aumenta la expresión del TR $\beta$  sin modificar la expresión del TR $\alpha$ 1. De esta manera queda en claro que las HTs no pueden modular la expresión del TR $\alpha$ 1 y que se necesita de los efectos de la Tf para que esto ocurra. Todos estos datos conducen a postular al TR $\alpha$ 1 como pivote entre las acciones combinadas de la Tf y las HTs sobre la maduración de los OPCs. Puede especularse entonces que durante los estadios tempranos de la maduración de los OPCs, las HTs podrían inducir el incremento de la expresión de la Tf, la cual a su vez podría incrementar la expresión del TR $\alpha$ 1 en los precursores de la ZSV tornando a los mismos capaces de

responder a los niveles de HTs circundantes lo cual conduciría a un incremento de la expresión del TR $\beta$  y subsecuente maduración terminal de los OLGs.

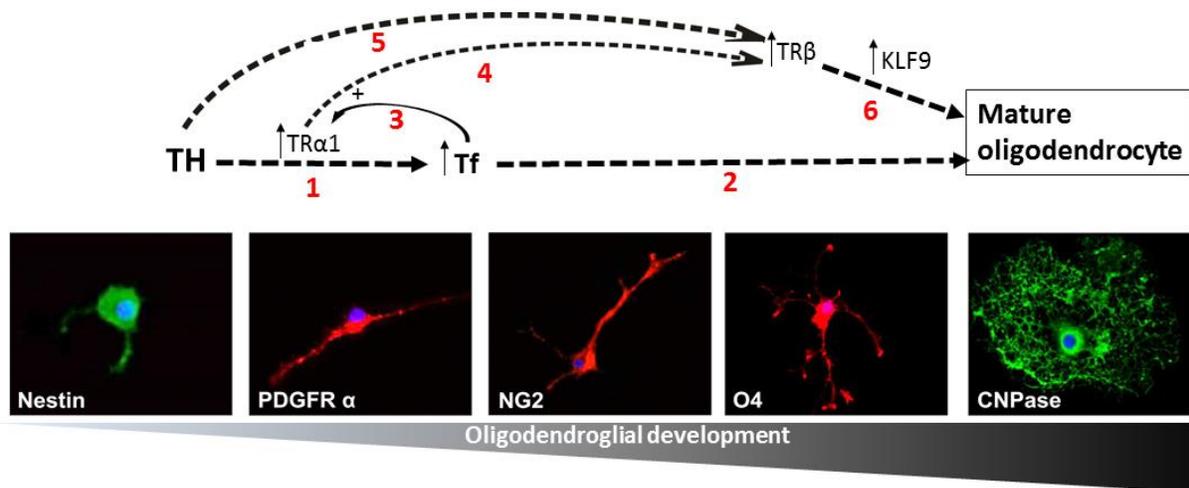
Los OPCs deben madurar para poder llevar a cabo la mielinización y este proceso de maduración depende de la inducción de una gran variedad de genes (Swiss y col., 2011).

Las HTs han demostrado inducir una variedad de factores de transcripción tales como el KLF9 (Dugas y col., 2006; Li y col., 2009; Nicolay y col., 2007). Dugas y col., (2012) demuestran que los niveles de KLF9 aumentan tempranamente luego de la exposición a HTs de OPCs *in vitro*, aunque los animales “*knock out*” para KLF9 no presentan defectos en la mielinización. Los resultados de Denver y Williamson, (2009) indican que la expresión del KLF9 presenta un incremento drástico a partir de P7 en el cerebelo e hipocampo de ratones no tratados con T3, mientras que el tratamiento con T3 produce un incremento del contenido del ARNm del KLF9 en dichas regiones anatómicas. El hecho de que el contenido del ARNm del KLF9 aumente durante el periodo del desarrollo del cerebro de los roedores en que se produce un incremento de los efectos de las HTs como consecuencia del incremento de la expresión de la DIO2, la disminución de la expresión de la DIO3 (Bates y col., 1999) y el incremento de la expresión de los TRs (Perez-Castillo y col., 1985) sugiere que el KLF9 sería un factor de transcripción dependiente del contenido de HTs. En sintonía con esta hipótesis, Denver y Williamson, (2009) analizan la presencia de TREs en el gen del KLF9 que justifiquen una regulación directa de las HTs, encontrando que existe un TRE 3.8 kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción que posee alta afinidad por ambos TRs. Utilizando la línea celular de neuroblastoma N2a[TR $\beta$ 1], que sobreexpresa TR $\beta$ 1, introducen un TRE mutado incapaz de unirse a los TRs y observan que las HTs regulan la expresión del KLF9 de manera dosis y tiempo dependientes, sugiriendo que el apoTR $\beta$ 1 ejercería efectos represores sobre la expresión del KLF9.

Nuestros experimentos *in vivo* sobre el análisis de la expresión del KLF9 muestran que el contenido de su ARNm se encuentra aumentado en animales Hiper y disminuido en animales Hipo a P10. A P20 los animales Hiper no presentan diferencias respecto de los animales Ctrol en el contenido del ARNm del KLF9 mientras que en animales Hipo persiste la disminución observada a P10. Tanto a P10 como a P20 la administración de aTf no influye la expresión del ARNm del KLF9, lo cual hace evidente que el KLF9 es un mediador exclusivo de los efectos de las HTs sobre la mielinización, pero no de la Tf. Nuestros experimentos *in vitro*, exponen el mismo fenómeno descrito *in vivo*, es decir que la expresión del KLF9 es independiente de la Tf pero es regulada por las HTs. Cuando las CPNs son tratadas con el antagonista del TR $\alpha$ 1 no se observan diferencias en el contenido del ARNm del KLF9 respecto de las células Ctrol y además en CPNs a las que se les silenció la expresión de la Tf, que conlleva una disminución de la expresión del TR $\alpha$ 1, tampoco se observan cambios en la expresión del KLF9. Estos resultados sugieren que los efectos de las HTs, mediados por el TR $\beta$ , serían los que conducirían a aumentar la expresión del KLF9 durante la maduración oligodendroglial.

En su conjunto los resultados de la presente Tesis nos permiten postular como mecanismo de acción de la Tf y las HTs, que durante la oligodendrogénesis las HTs, a través del TR $\alpha$ 1, dan inicio a la maduración de los OPCs incrementando la expresión de la Tf (**Figura D1-1**). Esta a su vez ejercería efectos propios sobre la diferenciación de los OPCs (**Figura D1-2**) e incrementaría los niveles del TR $\alpha$ 1 (**Figura D1-3**) como un mecanismo de retroalimentación positiva sobre la maduración oligodendroglial. Por su parte, las HTs podrían ejercer efectos adicionales mediados por TR $\alpha$ 1 e independientes de la Tf que inducirían un incremento en la expresión del TR $\beta$  (**Figura D1-4**). En este contexto, las HTs actuarían a través del TR $\beta$  (**Figura D1-5**) para estimular la expresión del KLF9 y favorecer

la maduración terminal de los OLGs (**Figura D1-6**). La acción combinada de la Tf y las HTs es necesaria para que ocurra una mielinización y una maduración oligodendroglial adecuadas. Nuestros resultados indican que no se trataría de dos factores que actúan independientemente para favorecer dichos procesos, sino que lo harían en forma causal y concertada y que la Tf y las HTs tendrían como punto de convergencia al TR $\alpha$ 1.



**Figura D1. Mecanismo de acción de la Tf y las HTs durante la maduración oligodendroglial.**

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

Como consecuencia de los resultados obtenidos podemos concluir que:

### **1. La Tf y las HTs son necesarias para que ocurra una adecuada mielinización**

Tanto la Tf como las HTs poseen efectos pro-mielinogénicos.

Las HTs mostraron ser capaces de regular la expresión de la Tf *in vivo*, observándose cantidades de Tf constantemente disminuidas en animales hipotiroideos.

A edades tempranas la administración aTf a animales hipotiroideos revierte parcialmente la limitación de los OPCs a madurar observada en dichos animales.

Los resultados obtenidos *in vivo*, sugieren que la Tf podría modular la expresión del TR $\alpha$ 1 conduciendo a aumentar la sensibilidad del cerebro a los efectos de las HTs.

### **2. La Tf y las HTs son necesarias para que ocurra una adecuada maduración oligodendroglial**

El silenciamiento de la expresión de la Tf conduce a una disminución en la capacidad de los OPCs de madurar mientras que la administración de HT en estas condiciones no es suficiente para lograr una adecuada maduración oligodendroglial.

El bloqueo de las acciones del TR $\alpha$ 1 conduce a una disminución en la capacidad de los OPCs de madurar mientras que la administración de aTf en estas condiciones no es suficiente para lograr una adecuada maduración oligodendroglial.

### 3. Las acciones combinadas de la Tf y las HTs tienen como punto de convergencia al

#### TR $\alpha$ 1

La administración de HT a cultivos de CPNs conduce al incremento de la maduración de los OPCs junto con el incremento prematuro de la expresión de la Tf.

Existe un vínculo entre la Tf y el TR $\alpha$ 1: el incremento de la expresión de la Tf es inducido por las acciones de TR $\alpha$ 1 dado que el antagonista de dicho receptor provoca una caída en la expresión de la Tf. Por otra parte el tratamiento de CPNs con aTf induce la expresión del TR $\alpha$ 1.

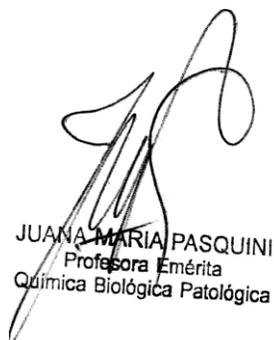
La HT es incapaz de regular la expresión del TR $\alpha$ 1, pero si produce el incremento de la expresión del TR $\beta$ /KLF9.



CORINA  
GARCIA



Leonardo  
Manziol.



JUANA MARIA PASQUINI  
Profesora Emérita  
Química Biológica Patológica

## BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

Adamo AM, Aloise PA, Soto EF, Pasquini JM. (1990). **Neonatal hyperthyroidism in the rat produces an increase in the activity of microperoxisomal marker enzymes coincident with biochemical signs of accelerated myelination.** *J Neurosci Res.* 1990 Mar; 25(3):353-9.

Aisen P, Leibman A, Zweier J. (1978). **Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin.** *J Biol Chem.* 1978 Mar 25; 253 (6):1930-7.

Aggarwal S, Snaidero N, Pähler G, Frey S, Sánchez P, Zweckstetter M, Janshoff A, Schneider A, Weil MT, Schaap IA, Görlich D, Simons M. (2013). **Myelin membrane assembly is driven by a phase transition of myelin basic proteins into a cohesive protein meshwork.** *PLoS Biol.* 2013; 11(6):e1001577. doi: 10.1371/journal.pbio.1001577. Epub 2013 Jun 4.

Anderson GW, Schoonover CM, Jones SA. (2003). **Control of thyroid hormone action in the developing rat brain.** *Thyroid.* 2003 Nov; 13(11):1039-56.

Aranda A, Pascual A. (2001). **Nuclear hormone receptors and gene expression.** *Physiol Rev.* 2001 Jul; 81(3):1269-304.

Arnett HA, Fancy SP, Alberta JA, Zhao C, Plant SR, Kaing S, Raine CS, Rowitch DH, Franklin RJ, Stiles CD. (2004). **bHLH transcription factor Olig1 is required to repair demyelinated lesions in the CNS.** *Science,* 306, 2111–2115.

Aruga J, Okano H, Mikoshiba K. (1991). **Identification of the new isoforms of mouse myelin basic protein: The existence of exon 5a.** *Journal of Neurochemistry,* 56, 1222–1226.

Baas D, Legrand C, Samarut J, Flamant F. (2002). **Persistence of oligodendrocyte precursor cells and altered myelination in optic nerve associated to retina degeneration in mice devoid of all thyroid hormone receptors.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Mar 5; 99(5):2907-11. Epub 2002 Feb 26.

Barres BA, Lazar MA, Raff MC. (1994). **A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development.** *Development.* 1994 May; 120(5):1097-108.

Bates JM, St Germain DL, Galton VA. (1999). **Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat.** *Endocrinology.* 1999 Feb; 140(2):844-51.

Baumann N, Pham-Dinh D. (2001) **Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system.** *Physiol Rev.* 2001 Apr; 81(2):871-927.

Baxi EG, Schott JT, Fairchild AN, Kirby LA, Karani R, Uapinyoying P, Pardo-Villamizar C, Rothstein JR, Bergles DE, Calabresi PA. (2014). **A selective thyroid hormone  $\beta$  receptor agonist enhances human and rodent oligodendrocyte differentiation.** *Glia.* 2014 Sep; 62(9):1513-29. doi: 10.1002/glia.22697. Epub 2014 May 24.

Bayraktar OA, Fuentealba LC, Alvarez-Buylla A, Rowitch DH.(2014).**Astrocyte development and heterogeneity**.Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014 Nov 20;7(1):a020362. doi: 10.1101/cshperspect.a020362. Review.

Bernal J, Morte B. (2012). **Thyroid hormone receptor activity in the absence of ligand: physiological and developmental implications**. Biochim Biophys Acta. 2013 Jul; 1830(7):3893-9. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.04.014. Epub 2012 Apr 24.

Bernal J, Guadaño-Ferraz A, Morte B. (2015). **Thyroid hormone transporters-functions and clinical implications**. Nat Rev Endocrinol. 2015 Dec; 11(12):690. doi: 10.1038/nrendo.2015.186. Epub 2015 Oct 20.

Bhat RV, Axt KJ, Fosnaugh JS, Smith KJ, Johnson KA, Hill DE, Kinzler KW, Baraban JM. (1996). **Expression of the APC tumor suppressor protein in oligodendroglia**.Glia. 1996 Jun; 17(2):169-74.

Bianco AC, Kim BW. (2006). **Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action**. J Clin Invest. 2006 Oct; 116(10):2571-9.

Billon N, Tokumoto Y, Forrest D, Raff M. (2001). **Role of thyroid hormone receptors in timing oligodendrocyte differentiation**. Dev Biol. 2001 Jul 1; 235(1):110-20.

Billon N1, Jolicoeur C, Tokumoto Y, Vennström B, Raff M. (2002). **Normal timing of oligodendrocyte development depends on thyroid hormone receptor alpha 1 (TRalpha1)**. EMBO J. 2002 Dec 2; 21(23):6452-60.

Bloch B, Popovici T, Levin MJ, Tuil D, Kahn A. (1985).**Transferrin gene expression visualized in oligodendrocytes of the rat brain by using in situ hybridization and immunohistochemistry**. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 6706–6710.

Bloch B, Popovici T, Chouham S, Levin MJ,Tuil D, Kahn A. (1987).**Transferrin gene expression in choroid plexus of the adult rat brain**. Brain Res. Bull. 18 (4), 573–576.

Böttner M, Krieglstein K, Unsicker K. (2000). **The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions**. J Neurochem. 2000 Dec; 75(6):2227-40.

Bradford MM. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Anal Biochem. 1976 May 7; 72:248-54.

Bradley DJ, Towle HC, Young WS 3rd. (1992). **Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system**. J Neurosci. 1992 Jun; 12(6):2288-302.

Braun PE, Lee J, Gravel M. (2004). **2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: Structure, biology and function**.In R. A.Lazzarini (Ed.), Myelin biology and disorders (pp. 499-522). SanDiego: Elsevier Academic Press.

Brown MC, Besio Moreno M, Bongarzone ER, Cohen PD, Soto EF, Pasquini JM. (1993). **Vesicular transport of myelin proteolipid and cerebroside sulfates to the myelin membrane.** *J Neurosci Res.* 1993 Jul 1; 35(4):402-8.

Buchet D, Baron-Van Evercooren A. (2009). **In search of human oligodendroglia for myelin repair.** *Neurosci Lett.* 2009 Jun 12; 456(3):112-9. doi: 10.1016/j.neulet.2008.09.086. Epub 2009 Jan 21.

Bunge MB, Bunge RP, Ris H. (1961). **Ultrastructural study of remyelination in an experimental lesion in adult cat spinal cord.** *J BiophysBiochem Cytol* 10: 67–94, 1961.

Bury F, Carré JL, Vega S, Ghandour MS, Rodriguez-Peña A, Langley K, Sarliève LL. (2002). **Coexpression of thyroid hormone receptor isoforms in mouse oligodendrocytes.** *J Neurosci Res.* 2002 Jan 1; 67(1):106-13.

Butt AM, Ibrahim M, Ruge FM, Berry M. (1995). **Biochemical subtypes of oligodendrocyte in the anterior medullary velum of the rat as revealed by the monoclonal antibody Rip.** *Glia* 14:185–197, 1995.

Campagnoni AT, Skoff RP. (2001). **The pathobiology of myelin mutants reveal novel biological functions of the MBP and PLP genes.** *Brain Pathology*, 11, 74–91.

Campagnoni AT, Campagnoni CW. (2004). **Myelin basic protein gene.** In R. A. Lazzarini (Ed.), *Myelin biology and disorders* (pp. 387–400). San Diego: Elsevier Academic Press.

Carlson D1, Strait KA, Schwartz HL, Oppenheimer JH. (1994). **Immunofluorescent localization of thyroid hormone receptor isoforms in glial cells of rat brain.** *Endocrinology.* 1994 Nov; 135(5):1831-6.

Carré JL, Demerens C, Rodríguez-Peña A, Floch HH, Vincendon G, Sarliève LL. (1998). **Thyroid hormone receptor isoforms are sequentially expressed in oligodendrocyte lineage cells during rat cerebral development.** *J Neurosci Res.* 1998 Dec 1; 54(5):584-94.

Chen C, Zhou Z, Zhong M, Li M, Yang X, Zhang Y, Wang Y, Wei A, Qu M, Zhang L, Xu S, Chen S, Yu Z. (2011). **Excess thyroid hormone inhibits embryonic neural stem/progenitor cells proliferation and maintenance through STAT3 signalling pathway.** *Neurotox Res.* 2011 Jul; 20(1):15-25. doi: 10.1007/s12640-010-9214-y. Epub 2010 Aug 14.

Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. (2010). **Molecular aspects of thyroid hormone actions.** *Endocr Rev.* 2010 Apr; 31(2):139-70. doi: 10.1210/er.2009-0007. Epub 2010 Jan 5.

Connor JR, Fine RE. (1986). **The distribution of transferrin immunoreactivity in the rat central nervous system.** *Brain Res.* 1986 Mar 19; 368(2):319-28.

Connor JR, Menzies SL. (1996). **Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination.** *Glia.* 1996 Jun; 17 (2):83-93.

Conover JC, Notti RQ. (2008) **The neural stem cell niche.** Cell Tissue Res. 2008 Jan; 331(1):211-24. Epub 2007 Oct 6.

Constantinou C, Margarity M, Valcana T. (2005). **Region-specific effects of hypothyroidism on the relative expression of thyroid hormone receptors in adult rat brain.** Mol Cell Biochem. 2005 Oct; 278(1-2):93-100.

**Current Protocols in Molecular Biology.** Frederick M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl (eds.) Copyright © 2003 John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved. ISBN: 047150338X

Darimont BD, Wagner RL, Apriletti JW, Stallcup MR, Kushner PJ, Baxter JD, Fletterick RJ, Yamamoto KR. (1998). **Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions.** Genes Dev. 1998 Nov 1; 12(21):3343-56.

de Arriba Zerpa GA, Saleh MC, Fernández PM, Guillou F, Espinosa de los Monteros A, de Vellis J, Zakin MM, Baron B. (2000). **Alternative splicing prevents transferrin secretion during differentiation of a human oligodendrocyte cell line.** J Neurosci Res. 2000 Aug 15; 61 (4): 388-95.

de Carlos JA, Borrell J. **A historical reflection of the contributions of Cajal and Golgi to the foundations of neuroscience.** Brain Res Rev. 2007 Aug; 55(1):8-16. Epub 2007 Apr 5.

Deitmer JW, Rose CR. (2010). **Ion changes and signalling in perisynaptic glia.** Brain Research Reviews, 63(1-2), 113-129.

Denver RJ, Williamson KE. (2009). **Identification of a thyroid hormone response element in the mouse Kruppel-like factor 9 gene to explain its postnatal expression in the brain.** Endocrinology. 2009 Aug; 150(8):3935-43. doi: 10.1210/en.2009-0050. Epub 2009 Apr 9.

De Robertis E, Gerschenfeld HM, Wald F. (1958). **Cellular mechanism of myelination in the central nervous system.** J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 651-656.

Dugas JC, Tai YC, Speed TP, Ngai J, Barres BA. (2006). **Functional genomic analysis of oligodendrocyte differentiation.** J Neurosci. 2006 Oct 25; 26(43):10967-83.

Dugas JC, Cuellar TL, Scholze A, Ason B, Ibrahim A, Emery B, Zamanian JL, Foo LC, McManus MT, Barres BA. (2010). **Dicer1 and miR-219 are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination.** Neuron, 65, 597-611.

Dugas JC, Ibrahim A, Barres BA. (2012). **The T3-induced gene KLF9 regulates oligodendrocyte differentiation and myelin regeneration.** Mol Cell Neurosci. 2012 May; 50(1):45-57. doi: 10.1016/j.mcn.2012.03.007. Epub 2012 Mar 24.

Dussault JH, Ruel J. (1987). **Thyroid hormones and brain development.** Annu Rev Physiol. 1987; 49:321-34.

Eichberg J, Iyer S. (1996). **Minireview: Phosphorylation of myelin proteins: Recent advances.** Neurochemical Research, 21, 527-535.

Eisenbarth GS, Walsh FS, Nirenberg M. (1979). **Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Oct; 76(10):4913-7.

Emery B. (2010). **Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination.** Science, 330, 779–782.

Eroglu C, Barres BA. (2010). **Regulation of synaptic connectivity by glia.** Nature. 2010 Nov 11; 468(7321):223-31. doi: 10.1038/nature09612. Review.

Escobar Cabrera OE, Bongarzone ER, Soto EF, Pasquini JM. (1994). **Single intracerebral injection of apotransferrin in young rats induces increased myelination.** Dev Neurosci. 1994; 16(5-6):248-54.

Escobar Cabrera OE, Zakin MM, Soto EF, Pasquini JM. (1997). **Single intracranial injection of apotransferrin in young rats increases the expression of specific myelin protein mRNA.** J Neurosci Res. 1997 Mar 15; 47(6):603-8.

Espinosa de los Monteros A, Peña LA, de Vellis J. (1989). **Does transferrin have a special role in the nervous system?** J Neurosci Res. 1989 Oct; 24(2):125-36.

Espinosa de los Monteros A, Sawaya BE, Guillou F, Zakin MM, de Vellis J, Schaeffer E. (1994). **Brain-specific expression of the human transferrin gene. Similar elements govern transcription in oligodendrocytes and in a neuronal cell line.** J Biol Chem. 1994 Sep 30; 269(39):24504-10.

Espinosa de los Monteros A, Kumar S, Zhao P, Huang CJ, Nazarian R, Pan T, Scully S, Chang R, de Vellis J. (1999). **Transferrin is an essential factor for myelination.** Neurochem Res. 1999 Feb; 24(2):235-48.

Farsetti A, Desvergne B, Hallenbeck P, Robbins J, Nikodem VM. (1992). **Characterization of myelin basic protein thyroid hormone response element and its function in the context of native and heterologous promoter.** J Biol Chem. 1992 Aug 5; 267(22):15784-8.

Fernandez AM, Torres-Alemán I. (2012). **The many faces of insulin-like peptide signaling in the brain.** Nat. Rev. Neurosci. 13 (4), 225–239.

Fernández M, Paradisi M, Del Vecchio G, Giardino L, Calzà L. (2009). **Thyroid hormone induces glial lineage of primary neurospheres derived from non-pathological and pathological rat brain: implications for remyelination-enhancing therapies.** Int J Dev Neurosci. 2009 Dec; 27(8):769-78. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2009.08.011. Epub 2009 Aug 29.

Ferreiro B, Pastor R, Bernal J. (1990). **T3 receptor occupancy and T3 levels in plasma and cytosol during rat brain development.** Acta Endocrinol (Copenh). 1990 Jul; 123(1):95-9.

Fishman JB, Rubin JB, Handrahan JV, Connor JR, Fine RE. (1987). **Receptor-mediated transcytosis of transferrin across the blood-brain barrier.** J Neurosci Res. 1987; 18(2):299-304.  
Fraga CG, Oteiza PI. **Iron toxicity and antioxidant nutrients.** Toxicology. 2002 Oct 30; 180(1):23-32.

Franco PG, Silvestroff L, Soto EF, Pasquini JM. (2008). **Thyroid hormones promote differentiation of oligodendrocyte progenitor cells and improve remyelination after cuprizone-induced demyelination.** *Exp Neurol.* 2008 Aug; 212(2):458-67. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.04.039. Epub 2008 May 15.

Fu H, Qi Y, Tan M, Cai J, Takebayashi H, Nakafuku M, Richardson W, Qiu M. (2002). **Dual origin of spinal oligodendrocyte progenitors and evidence for the cooperative role of Olig2 and Nkx2.2 in the control of oligodendrocyte differentiation.** *Development.* 2002 Feb; 129(3):681-93.

Fyffe-Maricich SL, Karlo JC, Landreth GE, Miller RH. (2011). **The ERK2 mitogen-activated protein kinase regulates the timing of oligodendrocyte differentiation.** *Journal of Neuroscience,* 31, 843–850.

García CI, Paez P, Soto EF, Pasquini JM. (2003). **Differential effects of apotransferrin on two populations of oligodendroglial cells.** *Glia.* 2003 Jun; 42(4):406-16.

Garcia C, Paez P, Davio C, Soto EF, Pasquini JM. (2004). **Apotransferrin induces cAMP/CREB pathway and cell cycle exit in immature oligodendroglial cells.** *J Neurosci Res.* 2004 Nov 1; 78(3):338-46.

García CI, Paez PM, Soto EF, Pasquini JM. (2007). **Differential gene expression during development in two oligodendroglial cell lines overexpressing transferrin: a cDNA array analysis.** *Dev Neurosci.* 2007; 29(6):413-26.

Geren BB, Schmitt FO. (1954). **The structure of the Schwann cell and its relation to the axon in certain invertebrate nerve fibers.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 40, 863–870.

Gilbert ME, Paczkowski C. (2003). **Propylthiouracil (PTU)-induced hypothyroidism in the developing rat impairs synaptic transmission and plasticity in the dentate gyrus of the adult hippocampus.** *Brain Res Dev Brain Res.* 2003 Oct 10;145(1):19-29

Gould E. (2010). **How widespread is adult neurogenesis in mammals?** *Nat Rev Neurosci.* 2007 Jun; 8(6):481-8.

Graeber, M. B. (2010). **Changing face of microglia.** *Science,* 330(6005), 783–788.

Gravina FS, da Silveira CK, de Assis AM, Rieger DK, Guerini C, Müller AP, Farina M, Rotta LN, Perry ML. (2007). **Experimental hypothyroidism inhibits delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in neonatal rat blood and liver.** *Exp Biol Med (Maywood).* 2007 Sep; 232(8):1021-6.

Greer JM, Lees MB. (2002). **Myelin proteolipid protein—the first 50 years.** *International Journal of Biochemistry & Cell Biology,* 34,211–215.

Grijota-Martínez C, Díez D, Morreale de Escobar G, Bernal J, Morte B. **Lack of action of exogenously administered T3 on the fetal rat brain despite expression of the monocarboxylate transporter 8.** *Endocrinology.* 2011 Apr; 152(4):1713-21. doi: 10.1210/en.2010-1014. Epub 2011 Feb 8.

Guardia Clausi M, Pasquini LA, Soto EF, Pasquini JM. (2010). **Apotransferrin-induced recovery after hypoxic/ischaemic injury on myelination.** ASN Neuro. 2010 Nov 19; 2(5):e00048. doi: 10.1042/AN20100020.

Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. (1989). **Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill.**J Immunol Methods. 1989 May 12; 119(2):203-10.

Harrington CR, Barger G. (1927). **Chemistry of thyroxine: constitution and synthesis of thyroxine.** Biochem. J. 21, 169–183 (1927).

Hartline DK, Colman DR. (2007). **Rapid conduction and the evolution of giant axons and myelinated fibers.** Curr Biol. 2007 Jan 9; 17(1):R29-35.

He L, Lu QR. (2013). **Coordinated control of oligodendrocyte development by extrinsic and intrinsic signaling cues.**Neurosci Bull. 2013 Apr; 29(2):129-43. doi: 10.1007/s12264-013-1318-y. Epub 2013 Mar 13.

He QY, Mason AB, Nguyen V, MacGillivray RT, Woodworth RC. (2000). **The chloride effect is related to anion binding in determining the rate of iron release from the human transferrin N-lobe.** Biochem. J. 350, 909–915

Hémadi M, Kahn PH, Miquel G, El HageChahine JM. (2004). **Transferrin's mechanism of interaction with receptor 1.**Biochemistry 43, 1736–1745

Howdeshell KL. (2002). **A model of the development of the brain as a construct of the thyroid system.** Environmental Health Perspectives. 2002; 110 (Suppl 3):337-348.

Hsieh J, Aimone JB, Kaspar BK, Kuwabara T, Nakashima K, Gage FH (2004). **IGF-1 instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes.**J. Cell Biol. 164 (1), 111–122 (Jan 5).

Hudson LD. (2004). **Proteolipid protein gene.** In R. A. Lazzarini (Ed.), Myelin biology and disorders (pp. 401–420). San Diego: Elsevier Academic Press.

Ibarrola N, Mayer-Pröschel M, Rodriguez-Peña A, Noble M. (1996). **Evidence for the existence of at least two timing mechanisms that contribute to oligodendrocyte generation in vitro.** Dev Biol. 1996 Nov 25; 180(1):1-21.

Johe KK, Hazel TG, Muller T, Dugich-Djordjevic MM, McKay RD. (1996). **Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system.** Genes Dev. 1996 Dec 15; 10(24):3129-40.

Jurevics, H., & Morell, P. (1995). **Cholesterol for synthesis of myelin is made locally, not imported into brain.** Journal of Neurochemistry, 64, 895–901.

Katsumoto A, Lu H, Miranda AS, Ransohoff RM. (2014). **Ontogeny and functions of central nervous system macrophages.**J Immunol. 2014 Sep 15; 193(6):2615-21. doi: 10.4049/jimmunol.1400716.

Kimelberg HK, Nedergaard M. (2010). **Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets.** *Neurotherapeutics*, 7(4), 338–353.

Kirschner DA, Blaurock AE. (1992). **Organization, phylogenetic variations and dynamic transitions of myelin.** In R. E. Martenson (Ed.), *Myelin: Biology and chemistry* (pp. 3–78). Boca Raton, FL: CRC Press

Kroepfl JF, Gardinier MV. (2001). **Mutually exclusive apicobasolateral sorting of two oligodendroglial membrane proteins, proteolipid protein and myelin/oligodendrocyte glycoprotein, in Madin-Darby canine kidney cells.** *Journal of Neuroscience Research*, 66, 1140–1148.

Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M. (1998). **Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells.** *J Neurosci*. 1998 Jan 1; 18(1):237-50.

Kutner RH, Zhang XY, Reiser J (2009) **Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors.** *Nat Protoc*. 2009; 4(4):495-505. doi: 10.1038/nprot.2009.22.

Lazar MA. (2003). **Nuclear receptor corepressors.** *Nucl Recept Signal*. 2003; 1:e001. Epub 2003 Jun 12.

Leis JA, Bekar LK, Walz W. (2005). **Potassium homeostasis in the ischemic brain.** *Glia*, 50(4), 407–416.

Leitner DF, Connor JR. (2012). **Functional roles of transferrin in the brain.** *Biochim Biophys Acta*. 2012 Mar; 1820(3):393-402.

Lemkine GF, Raj A, Alfama G, Turque N, Hassani Z, Alegria-Prévot O, Samarut J, Levi G, Demeneix BA. (2005). **Adult neural stem cell cycling in vivo requires thyroid hormone and its alpha receptor.** *FASEB J*. 2005 May; 19(7):863-5. Epub 2005 Feb 23.

Levy O, Dai G, Riedel C, Ginter CS, Paul EM, Lebowitz AN, Carrasco N. (1997). **Characterization of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter with an anti-COOH terminus antibody.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 May 27; 94(11):5568-73.

Levy JE, Jin O, Fujiwara Y, Kuo F, Andrews NC. (1999). **Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system.** *Nat Genet*. 1999 Apr; 21(4):396-9.

Li H, He Y, Richardson WD, Casaccia P. (2009). **Two-tier transcriptional control of oligodendrocyte differentiation.** *Curr Opin Neurobiol*. 2009 Oct; 19(5):479-85. doi: 10.1016/j.conb.2009.08.004. Epub 2009 Sep 7.

Lin KH, Lee HY, Shih CH, Yen CC, Chen SL, Yang RC, Wang CS. (2003). **Plasma protein regulation by thyroid hormone.** *J Endocrinol*. 2003 Dec; 179(3):367-77.

López-Juárez A, Remaud S, Hassani Z, Jolivet P, Pierre Simons J, Sontag T, Yoshikawa K, Price J, Morvan-Dubois G, Demeneix BA. (2012). **Thyroid hormone signaling acts as a neurogenic switch by repressing Sox2 in the adult neural stem cell niche.** *Cell Stem Cell*. 2012 May 4; 10(5):531-43. doi: 10.1016/j.stem.2012.04.008.

Lu QR, Yuk D, Alberta JA, Zhu Z, Pawlitzky I, Chan J, McMahon AP, Stiles CD, Rowitch DH. (2000). **Sonic hedgehog--regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system.** *Neuron*. 2000 Feb; 25(2):317-29.

Ludwin SK. **The pathobiology of the oligodendrocyte.** *J NeuropatholExp Neurol* 56: 111–124, 1997.

Malatesta P, Hack MA, Harfuss E, Kettenmann H, Klinker, W, Kirschoff F. et al., (2003). **Neuronal or glial progeny: Regional differences in radial glia fate.** *Neuron*, 37, 751–764.

Manders EMM, Verbeek FJ, Aten JA. (1993). **Measurement of colocalization of objects in dual-color confocal images.** *J. Microsc. (Oxford)* 1993; 169:375–382.

Marchant B, Brownlie BE, Hart DM, Horton PW, Alexander WD. (1977). **The placental transfer of propylthiouracil, methimazole and carbimazole.** *J Clin Endocrinol Metab.* 1977 Dec; 45(6):1187-93.

Marta CB, Adamo AM, Soto EF, Pasquini JM. (1998). **Sustained neonatal hyperthyroidism in the rat affects myelination in the central nervous system.** *J Neurosci Res.* 1998 Jul 15; 53(2):251-9.

Marta CB, Escobar Cabrera OE, Garcia CI, Villar MJ, Pasquini JM, Soto EF. (2000). **Oligodendroglial cell differentiation in rat brain is accelerated by the intracranial injection of apotransferrin.** *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2000 May; 46(3):529-39.

Marta CB, Paez P, Lopez M, Pellegrino de Iraldi A, Soto EF, Pasquini JM. (2003). **Morphological changes of myelin sheaths in rats intracranially injected with apotransferrin.** *Neurochem Res.* 2003 Jan; 28 (1):101-10.

Marcus J, Popko B. (2002). **Galactolipids are molecular determinants of myelin development and axo-glial organization.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1573, 406–413.

Masek T, Vopalensky V, Suchomelova P, Pospisek M. (2005) **Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels.** *Anal Biochem.* 2005 Jan 1; 336(1):46-50.

McCarthy KD, de Vellis J. (1980). **Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue.** *Journal of Cell Biology*, 85, 890–902.

McKinnon RD, Smith C, Behar T, Smith T, Dubois-Dalcq M. (1993). **Distinct effects of bFGF and PDGF on oligodendrocyte progenitor cells.** *Glia.* 1993 Mar; 7(3):245-54.

Mitsuhashi T, Tennyson GE, Nikodem VM. (1988). **Alternative splicing generates messages encoding rat c-erbA proteins that do not bind thyroid hormone.** *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5804–5808

Molofsky AV, Kelley KW, Tsai HH, Redmond SA, Chang SM, Madireddy L, Chan JR, Baranzini SE, Ullian EM, Rowitch DH. (2014). **Astrocyte-encoded positional cues maintain sensorimotor circuit integrity.** *Nature.* 2014 May 8; 509(7499):189-94. doi: 10.1038/nature13161. Epub 2014 Apr 28.

Morell P. (1984). **Myelin.** New York: Plenum Press.

Mori S, Leblond CP. (1970) **Electron microscopic identification of three classes of oligodendrocytes and a preliminary study of their proliferative activity in the corpus callosum of young rats.** J CompNeurol 139: 1–30, 1970.

Morte B, Bernal J. (2014). **Thyroid hormone action: astrocyte-neuron communication.** Front Endocrinol (Lausanne). 2014 May 30; 5:82. doi: 10.3389/fendo.2014.00082. eCollection 2014.

Murray K, Dubois-Dalcq M. (1997). **Emergence of oligodendrocytes from human neural spheres.** J Neurosci Res. 1997 Oct 15; 50(2):146-56.

Nave KA. (2010). **Myelination and support of axonal integrity by glia.**Nature. 2010 Nov 11; 468(7321):244-52. doi: 10.1038/nature09614.

Nicolay DJ, Doucette JR, Nazarali AJ. (2007). **Transcriptional control of oligodendrogenesis.** Glia. 2007 Oct; 55(13):1287-99.

Nishiyama A, Lin XH, Giese N, Heldin CH, Stallcup WB. (1996).**Co-localization of NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells in the developing rat brain.**J Neurosci Res. 1996 Feb 1; 43(3):299-314.

Noda M. (2015). **Possible role of glial cells in the relationship between thyroid dysfunction and mental disorders.** Front Cell Neurosci. 2015 Jun 3; 9:194. doi: 10.3389/fncel.2015.00194. eCollection 2015.

Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. (2001).**Neurons derived from radial glia cells establish radial units in neocortex.** Nature, 409, 714–720.

Noguchi T, Sugisaki T, Satoh I, Kudo M. (1985). **Partial restoration of cerebral myelination of the congenitally hypothyroid mouse by parenteral or breast milk administration of thyroxine.** J Neurochem. 1985 Nov; 45(5):1419-26.

Norton WT, Poduslo SE. (1973). **Myelination in rat brain: Method of myelin isolation.** Journal of Neurochemistry, 21, 749–757.

Ord, W. M. **Report of a committee of the Clinical Society of London nominated December 14, 1883, to investigate the subject of myxoedema.**Trans. Clin. Soc. Lond. 8 (Suppl.), 21 (1888).

Paez PM, Marta CB, Moreno MB, Soto EF, Pasquini JM. (2002). **Apotransferrin decreases migration and enhances differentiation of oligodendroglial progenitor cells in an in vitro system.** Dev Neurosci. 2002; 24 (1):47-58.

Paez PM, García CI, Davio C, Campagnoni AT, Soto EF, Pasquini JM. (2004). **Apotransferrin promotes the differentiation of two oligodendroglial cell lines.** Glia. 2004 Apr 15; 46(2):207-17.

Paez PM, García CI, Campagnoni AT, Soto EF, Pasquini JM. (2005). **Overexpression of human transferrin in two oligodendroglial cell lines enhances their differentiation.** Glia. 2005 Oct; 52 (1):1-15.

Paez PM, Garcia CI, Soto EF, Pasquini JM. (2006). **Apotransferrin decreases the response of oligodendrocyte progenitors to PDGF and inhibits the progression of the cell cycle.** *Neurochem Int.* 2006 Sep; 49 (4): 359-71. Epub 2006 Apr 18.

Paez PM, García CI, Pasquini JM. (2006b). **Expression of myelin basic protein in two oligodendroglial cell lines is modulated by apotransferrin through different transcription factors.** *J Neurosci Res.* 2006 Mar; 83 (4):606-18.

Pantopoulos K. (2004). **Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update.** *Ann N Y AcadSci.* 2004 Mar; 1012:1-13.

Pascual A, Aranda A. (2013). **Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation.** *Biochim Biophys Acta.* 2013 Jul; 1830(7):3908-16. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.03.012. Epub 2012 Mar 29.

Pascual-Leone AM, Ramos S, Goya L, Alvarez C, Escrivá F, Obregón MJ, (2003). **Age dependent adaptation of the liver thyroid status and recovery of serum levels and hepatic insulin-like growth factor-I expression in neonatal and adult diabetic rats.** *Metabolism* 52 (9), 1117-25 (Sep).

Paterson S, Armstrong NJ, Iacopetta BJ, McArdle HJ, Morgan EH. (1984). **Intravesicular pH and iron uptake by immature erythroid cells.** *J. Cell.Physiol.* 120, 225–232

Paxinos G, Watson C, 1986. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.** Second Ed.AcademicPress, New York.

Penfield W. (1932) **Neuroglia: normal and pathological.** In: *Cytology and Cellular Pathology in the Nervous System*, edited by Penfield W. New York: Hoeber, 1932, vol. 2, p. 421–479.

Pérez MJ, Fernandez N, Pasquini JM. (2013). **Oligodendrocyte differentiation and signaling after transferrin internalization: a mechanism of action.** *Exp Neurol.* 2013 Oct; 248: 262-74.

Perez-Castillo A, Bernal J, Ferreiro B, Pans T. (1985). **The early ontogenesis of thyroid hormone receptor in the rat fetus.** *Endocrinology.* 1985 Dec; 117(6):2457-61.

Peters A, Palay S, Webster H DE F. (1991). **The Fine Structure of the Nervous System: the Neuron and the Supporting Cells.** Oxford, UK: Oxford Univ. Press, 1991.

Picou F, Fauquier T, Chatonnet F, Flamant F. (2012). **A bimodal influence of thyroid hormone on cerebellum oligodendrocyte differentiation.** *Mol Endocrinol.* 2012 Apr; 26(4):608-18. doi: 10.1210/me.2011-1316. Epub 2012 Feb 23.

Pinto L., y Götz M. (2007). **Radial glial cell heterogeneity: The source of diverse progeny in the CNS.** *Progress in Neurobiology,* 83, 2–23.

Pham-Dinh, D, Dautigny A, Linington C. (2004). **Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Gene.** In R. A. Lazzarini (Ed.), *Myelin biology and disorders* (pp. 469–497). San Diego: Elsevier Academic Press.

Plateroti M, Gauthier K, Domon-Dell C, Freund JN, Samarut J, Chassande O (2001). **Functional interference between thyroid hormone receptor  $\alpha$  (TR $\alpha$ ) and natural truncated TR $\Delta\alpha$  isoforms in the control of intestine development.** Mol Cell Biol 21:4761–4772.

Pringle NP, Mudhar HS, Collarini EJ, Richardson WD. (1992). **PDGF receptors in the rat CNS: during late neurogenesis, PDGF alpha-receptor expression appears to be restricted to glial cells of the oligodendrocyte lineage.** Development. 1992 Jun; 115(2):535-51.

Quarles RH. (2002). **Myelin sheaths: Glycoproteins involved in their formation, maintenance and degeneration.** Cellular and Molecular Life Sciences, 59, 1851–1871.

Readhead C, Popko B, Takahashi N, Shine HD, Saavedra RA, Sidman RL, Hood L. (1987). **Expression of amyelin basic protein gene in transgenic shiverer mice: correction of the dysmyelinating phenotype.** Cell. 1987 Feb 27; 48(4):703-12.

Reynolds BA, Weiss S. (1992). **Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system.** Science. 1992 Mar 27; 255(5052):1707-10.

Richardson WD, Kessaris N, Pringle N. (2006). **Oligodendrocyte wars.** Nat Rev Neurosci. 2006 Jan; 7(1):11-8.

Rogister B, Ben-Hur T, Dubois-Dalcq M. (1999). **From neural stem cells to myelinating oligodendrocytes.** Mol Cell Neurosci. 1999 Oct-Nov; 14(4-5):287-300.

Rosman NP. (1972). **The neuropathology of congenital hypothyroidism.** Adv Exp Med Biol. 1972; 30:337-66.

Rowitch DH, Kriegstein AR. (2010) **Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification.** Nature. 2010 Nov 11; 468(7321):214-22. doi: 10.1038/nature09611.

Saleh MC, Espinosa de los Monteros A, de Arriba Zerpa GA, Fontaine I, Piaud O, Djordjijevic D, Baroukh N, GarciaOtin AL, Ortiz E, Lewis S, Fiette L, Santambrogio P, Belzung C, Connor JR, de Vellis J, Pasquini JM, Zakin MM, Baron B, Guillou F. (2003). **Myelination and motor coordination are increased in transferrin transgenic mice.** J Neurosci Res. 2003 Jun 1; 72(5):587-94.

Sattler R, Rothstein JD. (2006). **Regulation and dysregulation of glutamate transporters.** Handb Exp Pharmacol (175), 277–303.

Schousboe A, Bak LK, Waagepetersen HS. (2013). **Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA.** Front Endocrinol (Lausanne). 2013 Aug 15; 4:102. doi:10.3389/fendo.2013.00102.

Schroeder AC, Privalsky ML. (2014). **Thyroid hormones, T3 and T4, in the brain.** Front Endocrinol (Lausanne). 2014 Mar 31; 5:40. doi: 10.3389/fendo.2014.00040. eCollection 2014.

Sgalitzer KE. (1941). **Contribution to the study of the morphogenesis of the thyroid gland.** J Anat. 1941 Jul; 75(Pt 4): 389-405.

Silva FG, Giannocco G, Luchessi AD, Curi R, Nunes MT. (2010). **T3 acutely increases GH mRNA translation rate and GH secretion in hypothyroid rats.** *Mol Cell Endocrinol.* 2010 Apr 12; 317(1-2):1-7. doi: 10.1016/j.mce.2009.12.005. Epub 2009 Dec 14.

Silvestroff L, Franco PG, Pasquini JM. (2012). **ApoTransferrin: dual role on adult subventricular zone-derived neurospheres.** *PLoS One.* 2012; 7(3):e33937.

Silvestroff L, Franco PG, Pasquini JM. (2013) **Neural and oligodendrocyte progenitor cells: transferrin effects on cell proliferation.** *ASN Neuro.* 2013 Mar 8; 5(1):e00107. doi: 10.1042/AN20120075..

Snaidero N, Möbius W, Czopka T, Hekking LH, Mathisen C, Verkleij D, Goebbels S, Edgar J, Merkler D, Lyons DA, Nave KA, Simons M. (2014). **Myelin membranewrapping of CNS axons by PI (3,4,5)P3-dependent polarized growth at the inner tongue.** *Cell* 156, 277–290.

Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). **Astrocytes: Biology and pathology.** *Acta Neuropathol,* 119(1), 7–35.

Sohn J, Natale J, Chew LJ, Belachew S, Cheng Y, Aguirre A, Lytle J, Nait-Oumesmar B, Kerninon C, Kanai-Azuma M, Kanai Y, Gallo V.(2006) **Identification of Sox17 as a transcription factor that regulates oligodendrocyte development.** *J Neurosci.* 2006 Sep 20; 26(38):9722-35.

Somjen GG. (1988) **Nervenkitt: notes on the history of the concept of neuroglia.** *Glia.* 1988; 1(1):2-9.

Sommer I, Schachner M. (1981). **Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system.** *Dev Biol.* 1981 Apr 30; 83(2):311-27.

Stathatos N. (2012). **Thyroid physiology.** *Med Clin North Am.* 2012 Mar; 96(2):165-73. doi: 10.1016/j.mcna.2012.01.007.

Stergiopoulos A, Politis PK. (2013). **The role of nuclear receptors in controlling the fine balance between proliferation and differentiation of neural stem cells.** *Arch Biochem Biophys.* 2013 Jun; 534(1-2):27-37. doi: 10.1016/j.abb.2012.09.009. Epub 2012 Oct 5.

Swiss VA, Nguyen T, Dugas J, Ibrahim A, Barres B, Androulakis IP, Casaccia P. (2011). **Identification of a gene regulatory network necessary for the initiation of oligodendrocyte differentiation.** *PLoS One.* 2011 Apr 7; 6(4):e18088. doi: 10.1371/journal.pone.0018088.

Tang H, Zhang Y, Yu X, Song J, Xu C, Wan Y. (2011). **Changes in growth hormone (GH), GH receptor, and GH signal transduction in hippocampus of congenital hypothyroid rats.** *J Neurosci Res.* 2011 Feb; 89(2):248-55. doi: 10.1002/jnr.22540. Epub 2010 Dec 8.

Tata JR, Widnell CC. (1966). **Ribonucleic acid synthesis during the early action of thyroid hormones.** *Biochem J.* 1966 Feb; 98(2): 604-20.

Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, Einheber S, Xu X, Esper RM, Loeb JA, Shrager P, Chao MV, Falls DL, Role L, Salzer JL. (2005). **Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons.** *Neuron*, 47, 681–694.

Taylor CM, Marta CB, Bansal R, Peiffer SE. (2004). **The transport, assembly and function of myelin lipids.** In R. A. Lazzarini (Ed.), *Myelin biology and disorders* (pp. 57–88). San Diego: Elsevier Academic Press.

Timsit S, Martinez S, Allinquant B, Peyron F, Puelles L, Zalc B. (1995). **Oligodendrocytes originate in a restricted zone of the embryonic ventral neural tube defined by DM-20 mRNA expression.** *J Neurosci*. 1995 Feb; 15(2):1012-24.

Trapp BD, Kidd GJ. (2004). **Structure of the myelinated axon.** In R. A. Lazzarini (Ed.), *Myelin Biology and Disorders* (pp. 3–27). San Diego: Elsevier Academic Press.

Trapp BD, Pfeiffer SE, Anitei M, Kidd G. (2004a). **Cell biology of myelin assembly.** In R.A. Lazzarini (Ed.), *Myelin biology and disorders* (pp. 29–55). San Diego: Elsevier Academic Press.

Trenor 3<sup>rd</sup> CC, Campagna DR, Sellers VM, Andrews NC, Fleming MD. (2000). **The molecular defect in hypotransferrinemic mice.** *Blood* 96 (3), 1113–1118.

Tu HM, Kim SW, Salvatore D, Bartha T, Legradi G, Larsen PR, Lechan RM. (1997). **Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone.** *Endocrinology*. 1997 Aug; 138(8):3359-68.

Tyler WA, Gangoli N, Gokina P, Kim HA, Covey M, Levison SW, Wood TL. (2009). **Activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) is essential for oligodendrocyte differentiation.** *J Neurosci*. 2009 May 13; 29(19):6367-78. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0234-09.2009.

van Campenhout A, van Campenhout CM, Lagrou AR, Manuel-y-Keenoy B. (2003). **Transferrin modifications and lipid peroxidation: Implications in diabetes mellitus.** *Free Radic. Res.* 37, 1069–1077

van Rossum D, Hanisch UK. (2004). **Microglia. Metabolic Brain Disease**, 19(3–4), 393–411.

Verity AN, Bredesen D, Vonderscher C, Handley VW, Campagnoni AT. (1993). **Expression of myelin protein genes and other myelin components in an oligodendrocytic cell line conditionally immortalized with a temperature-sensitive retrovirus.** *J Neurochem*. 1993 Feb; 60 (2):577-87.

Williams BP, Park JK, Alberta JA, Muhlebach SG, Hwang GY, Roberts TM, Stiles CD. (1997). **A PDGF-regulated immediate early gene response initiates neuronal differentiation in ventricular zone progenitor cells.** *Neuron*. 1997 Apr; 18(4):553-62.

Williams GR. (2000). **Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor  $\beta$  isoforms.** *Mol Cell Biol* 20:8329–8342

Waxman SG, Bangalore L. (2004). **Electrophysiological consequences of myelination.** In R.A. Lazzarini (Ed.), *Myelin biology and disorders* (pp. 117–141). San Diego: Elsevier Academic Press.

Wolf M., Ingbar SH, Moses AC, (1989). **Thyroid hormone and growth hormone interact to regulate insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid and circulating levels in the rat.** *Endocrinology* 125 (6), 2905–2914 (Dec).

Yu WP, Collarini EJ, Pringle NP, Richardson WD. (1994). **Embryonic expression of myelin genes: evidence for a focal source of oligodendrocyte precursors in the ventricular zone of the neural tube.** *Neuron*. 1994 Jun; 12(6):1353-62.

Yu, Y, Casaccia P, Lu QR. (2010). **Shaping the oligodendrocyte identity by epigenetic control.** *Epigenetics*, 5, 124–128.

Zhang XK, Kahl M. (1993). **Regulation of retinoid and thyroid hormone action through homodimeric and heterodimeric receptors.** *TEM* 4:156–162

Zhao X, He X, Han X, Yu Y, Ye F, Chen Y, Hoang T, Xu X, Mi QS, Xin M, Wang F, Appel B, Lu QR. (2010). **MicroRNA-mediated control of oligodendrocyte differentiation.** *Neuron*, 65, 612–626.

Zhou Q, Wang S, Anderson DJ. (2000) **Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors.** *Neuron*. 2000 Feb; 25(2):331-43.

Zhou Q, Choi G, Anderson DJ. (2001). **The bHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2.** *Neuron*. 2001 Sep 13; 31(5):791-807.