

2016 Mayo, 6(2): 1-1

EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DE HIPOCAMPO EN UN MODELO DE ENVEJECIMIENTO CEREBRAL TRATADO CON TERAPIA GÉNICA DE LARGO PLAZO

Pardo J; Abba M; Lacunza E; Schwerdt JI; Cónsole, GM; Outeiro TF; Morel GR; Goya RG

INIBIOLP, CINIBA, FCM, UNLP. 1900. joaquin_p88@hotmail.com

Introducción

En el sistema nervioso central las neuronas dopaminérgicas (DA) y colinérgicas (Ch) son las células más susceptibles a los efectos deletéreos de la edad. De este modo, en el hombre, la enfermedad de Parkinson y el mal de Alzheimer son un reflejo de la vulnerabilidad de las neuronas DA y Ch, respectivamente, al envejecimiento. Este tipo de patologías está asociada a una marcada pérdida de la memoria. En este marco, el continuo crecimiento de la población de la tercera edad en las zonas urbanas conlleva la creciente incidencia de estas patologías. Desafortunadamente, el aumento de la incidencia de enfermedades neurológicas de la vejez no ha sido acompañado por la inversión en la implementación de programas de investigación biomédica básica que apunten a fortalecer el desarrollo de tecnologías de última generación para abordar el problema. En particular, la investigación y desarrollo de herramientas terapéuticas de avanzada, tales como la terapia génica, para el abordaje de las patologías neurodegenerativas se mantienen escasamente desarrolladas en Argentina.

Objetivos

- 1) Implementar terapia génica a largo plazo con un adenovector helper-dependent (HD) de última generación que expresa el gen del insulin-like growth factor I (IGF-I) en ratas viejas, las cuales se caracterizan por un significativo déficit cognitivo, a fin de restaurar su memoria espacial.
- 2) Analizar el transcriptoma hipocampal de animales viejos tratados, viejos controles y jóvenes controles comparando los diferentes perfiles de expresión génica a fin de detectar cambios asociados a la edad y al tratamiento con IGF-I transgénico.

Materiales y métodos

Sujetos experimentales: Se utilizaron 30 ratas hembra de 24 meses, las cuales fueron divididas aleatoriamente en 3 grupos: intactas, IGF-I (inyectadas con vector para IGF-I), DsRed (inyectadas con un vector placebo). Los animales fueron evaluados en el laberinto de Barnes antes del tratamiento y a diferentes tiempos post-inyección del adenovector correspondiente. Cuatro ratas hembra jóvenes (2 meses) fueron utilizadas sólo para el análisis de transcriptoma hipocampal.

-Inyección estereotáxica intracerebroventricular (icv) de adenovirus recombinantes: de acuerdo al grupo experimental, se inyectaron $1,69 \times 10^{12}$ partículas virales del adenovector HD para IGF-I, un adenovirus de alta capacidad codificante para el cDNA del IGF-I, o del HD-DsRed, idéntico al anterior pero codificante para la proteína fluorescente DsRed (placebo).

Análisis de memoria espacial de corto plazo: se utilizó una versión modificada del laberinto de Barnes, un paradigma que se basa en la tendencia de la rata a escapar de un espacio abierto iluminado. Este laberinto consiste en una plataforma circular con 20 agujeros periféricos, estando debajo de uno una caja de escape en una posición fija. Después de un período de aprendizaje de igual duración para todos los animales, se retira la caja de escape y se evalúa en ensayos de retención de memoria espacial (probe trials, PT) cuántas veces explora cada animal el agujero de escape (ahora sin la caja de escape) en 90 segundos. Nuestro protocolo consistió en entrenar a los animales durante 9 días, con un PT antes de la cirugía, y luego sometiéndolos a una serie evaluadora 1 y 2 meses después de la cirugía; estas series consistieron en 9 días de entrenamiento con 1 PT cada 3 días.

Secuenciamiento de ARN hipocampal: Al momento de la eutanasia se disectó el hipocampo derecho de 4 ratas de cada grupo, elegidas al azar; y se extrajo ARN total, el cual se secuenció a lectura single read de 50 pbs con un HiSeq 2000 (Illumina). Las secuencias fueron alineadas al genoma de referencia de *Rattus norvegicus* (RGSC assembly v5.0) con el software STAR y los archivos SAM resultantes se convirtieron en BAM con el software SAM tools. Los archivos BAM fueron cargados y procesados en R, obteniéndose la matriz de expresión. Se empleó el algoritmo edgeR de Bioconductor para la obtención de los genes diferencialmente expresados (DE) entre los grupos. Se emplearon diversas herramientas bioinformáticas para el análisis funcional de estos genes.

Resultados

Los 3 grupos de ratas viejas mostraron un buen aprendizaje del paradigma de Barnes y no mostraron diferencias significativas en la preferencia por la región meta en los PT previos a la cirugía y los desafíos un mes después de la misma. Sin embargo, el grupo IGF-I mostró una significativa preferencia por la región en el último PT, dos meses después de la inyección del adenovector terapéutico. A nivel de transcriptoma, con un $FDR > 1.5$ y un $p\text{-value} < 0.05$, se encontraron 231 genes DE entre ratas jóvenes y viejas intactas, 185 entre ratas jóvenes y viejas IGF1 y 13 genes entre viejas intactas y viejas IGF-I. El análisis de enriquecimiento funcional arrojó términos asociados a respuesta inmune, morfogénesis tisular y respuesta a estímulo a hormonas esteroideas, entre otros. Algunos de los genes DE fueron validados mediante Real Time.

Conclusión

La terapia génica neuroprotectora a largo plazo con IGF-I mejora la memoria espacial de corto plazo en nuestro modelo de rata vieja según lo observado en el análisis de test cognitivos. A nivel génico esta mejora podría deberse a la expresión de genes específicos vinculados a proceso de regeneración tisular y respuesta inmune.

Palabras claves: Envejecimiento cerebral, Terapia génica, Transcriptoma