

UNIVERSIDAD: Universidad Nacional de La Plata.

NÚCLEO DISCIPLINARIO: Virología Molecular.

TÍTULO: **TERAPIA GENICA CON GDNF MEDIANTE VECTORES ADENOVIRALES RECOMBINANTES EN UN MODELO MURINO DE NEURODEGENERACION DOPAMINERGICA SENIL**

AUTOR: Gustavo Morel.

CORREO ELECTRÓNICO DEL AUTOR: gustavmorel@hotmail.com

PALABRAS CLAVES: Neurodegeneración, terapia génica, GDNF.

INTRODUCCION

El envejecimiento está asociado a un progresivo aumento de la incidencia de enfermedades neurodegenerativas tanto en animales de laboratorio como en seres humanos. En el sistema nervioso central (SNC), las neuronas dopaminérgicas (DA) están entre las células más susceptibles a los efectos deletéreos de la edad. En el hombre, la enfermedad de Parkinson, una degeneración de las neuronas nigroestriatales DA que afecta al 0.1-0,5 % de la población, es el reflejo más conspicuo de la vulnerabilidad de las neuronas DA al envejecimiento. En la rata, el envejecimiento trae aparejada una progresiva degeneración y pérdida de otro grupo de neuronas DA centrales a saber, las neuronas DA tuberoinfundibulares (TIDA) las cuales ejercen un control inhibitorio tónico sobre la secreción de prolactina (PRL) y la proliferación lactotropa en la adenohipófisis **(1)**. La pérdida excesiva de neuronas TIDA durante el envejecimiento normal está asociada, en la rata hembra, con una progresiva hiperprolactinemia **(2)** y con el desarrollo de prolactinomas hipofisarios **(3)**. Debe destacarse que a los 30 meses de edad las ratas hembras Sprague Dawley pierden un 40 % de sus neuronas DA nigrales, constituyendo de este modo un modelo animal único de neurodegeneración DA espontánea tanto a nivel hipotalámico como nigral **(4)**. Una posibilidad terapéutica de creciente interés clínico en el tratamiento de procesos neurodegenerativos es el empleo de factores neurotróficos que prevengan la degeneración y restauren la función de la población neuronal remanente.

A principios de la década de 1990, Martha Bohn y col., Northwestern University, Chicago, descubrieron que la línea celular tumoral glial B49 secreta un factor que promueve la supervivencia y diferenciación de las neuronas DA mesencefálicas **(5)**. Este nuevo factor neurotrófico, denominado factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF), resultó ser un glicopéptido de 211 aminoácidos cuyo gen ha sido clonado **(6)**. El GDNF, un miembro lejano de la superfamilia del TGF β , posee una potente y específica capacidad para promover la captación de dopamina, la supervivencia de neuronas DA embrionarias y la regeneración de neuronas DA en roedores y primates no humanos tratados con neurotoxinas DA **(7-11)**. El GDNF es efectivo para proteger no sólo las neuronas DA nigrales sino también para proteger ciertas poblaciones neuronales colinérgicas y de otro tipo, lo cual hace de esta molécula un candidato promisorio para el tratamiento de patologías neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson, Lou Gehrig y Alzheimer **(12)**.

MATERIALES Y METODOS

Transferencia génica *in vivo*

Animales

En todos los experimentos *in vivo* del presente trabajo se emplearon ratas hembras de la cepa Sprague Dawley jóvenes (5 meses) y seniles (30 meses), provenientes de la colonia

de nuestro instituto. Las ratas se mantienen en un cuarto con temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) bajo un ciclo luz/oscuridad de 12:12 hs, con alimento y agua ad libitum.

Cirugía estereotáxica

Las ratas se anestesiaron con ketamina (40 mg/kg peso corporal, i.p.) y xilazina (8 mg/kg de peso corporal, i.m.). Los animales se ubicaron en un aparato estereotáxico. Para acceder al hipotálamo, (región arcuato-periventricular) se utilizaron las siguientes coordenadas: 3 mm en el eje anteroposterior (AP), 10 mm en el dorsoventral y 0,6 mm en el lateral (**13**). Se inyectaron bilateralmente 1,5 μl de la suspensión viral apropiada. Por último, la herida de la piel se suturó y el animal fue devuelto a su jaula, donde en general se recuperan rápidamente.

Eutanasia, perfusión y procesamiento del encéfalo

Los animales fueron anestesiados con ketamina (40 mg/kg peso corporal, i.p.) y xilazina (8 mg/kg de peso corporal, i.m.) y luego fueron perfundidos por vía intracardíaca. Se perfundió con 200 ml de fijador de Paraformaldehído en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4.

Subsecuentemente, el encéfalo se disecó cuidadosamente, se fijó en paraformaldehído durante toda la noche. Al día siguiente los cerebros se transfirieron a PBS con 30% de sacarosa manteniéndolos en ella durante un mínimo de 24 hs antes de su procesamiento. Los bloques encefálicos fueron cortados en secciones coronales de 40 μm con un micrótopo de congelación, recogiendo las secciones en una placa plástica de seis pocillos (six-well plate) en grupos de cortes no contiguos en PBS.

Inmunohistoquímica

Los cortes destinados a inmunohistoquímica fueron lavados en PBS dos veces durante 10min. Luego se les realizó el bloqueo inespecífico de los sitios de pegado de los anticuerpos, incubándose los con 4 gotas de suero normal de caballo en 20 ml de PBS-T (PBS con 0,4% de Triton X) durante 60min. Posteriormente se lavaron con PBS por 10min y se incubaron con anticuerpo primario durante 48 hs a 4 $^{\circ}\text{C}$. Con la finalidad de observar marcación de neuronas dopaminérgicas hipotalámicas se empleó como anticuerpo primario Anti Tirosina hidroxilasa (TH) monoclonal (Calbiochem cat# 657010) con una dilución 1/400 en PBS-T.

A continuación se lavaron los cortes cerebrales durante 10min con PBS y se procedió a revelar la reacción con el kit ABC (Vectastain Universal Elite ABC kit Cat# PK-6200 Vector Laboratories). Se incubaron los cortes con el Anticuerpo secundario biotinilado durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se realizaron 2 lavados de 10min en PBS. Luego se eliminó la peroxidasa endógena con H_2O_2 0,3% incubándose los cortes durante 30min.

Posteriormente se lavaron dos veces por 10 min con PBS y se incubaron en el complejo ABC durante 1 hora. A continuación se lavaron nuevamente dos veces por 10 min con PBS. El revelado de las secciones encefálicas se realizó con solución de 3,3-diaminobencidina (DAB), de acuerdo al protocolo del Kit de Vector empleado. Los cortes fueron luego incubados por tan solo 3-4 segundos en DAB hasta que los bordes tomaron un tono marrón tenue. Inmediatamente fueron sumergidos en PBS para luego ser montados sobre vidrios recubiertos previamente con una capa de gelatina al 0,6%. Se dejaron secar a temperatura ambiente por aproximadamente 48 hs. Luego se procedió a comenzar la deshidratación con etanol (EtOH) 70 % durante 30seg, luego EtOH 90 % por 1min, EtOH 96 % 1 min, EtOH 100 % 3 min, 2 pasajes por Xilol 30 seg cada uno y finalmente fueron fijados con la solución de montaje Vectamount (Vecta Mount Cat# H-5000 Vector laboratories) para la visualización microscópica.

Análisis de imágenes

Recuento de neuronas TH+

Las imágenes de las regiones dopaminérgicas hipotalámicas ARC-PeVH (A₁₂) y PaVH (A₁₄) fueron capturadas usando una video cámara digital RGB Olympus DP70 adosada a un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51; Tokio, Japón). Dichas imágenes digitales fueron luego analizadas con el empleo de un programa específico para tales fines (ImagePro Plus v5.1; Media Cybernetics, Silver Spring, MA).

Dichas imágenes fueron tomadas en formato TIFF, con una resolución de 1.360x1.024 pixeles y el campo correspondiente fue de 0,07µm/píxel para determinaciones morfométricas y 0,21 µm/píxel para conteo de células. Para lograr aislar el objeto de interés (neuronas inmunorreactivas para TH) del tejido circundante se aplicaron filtros a las imágenes. Se realizaron recuentos manuales y automáticos para verificar la confiabilidad de los datos. Solo se contaron células nucleadas. Las neuronas fueron morfométricamente caracterizadas según los siguientes parámetros: área celular (reporta el área inmunoreactiva total con DAB), el número promedio de cuerpos neuronales por sección, que se estimó dividiendo el área total por el tamaño promedio neuronal y el número total de neuronas hipotalámicas se estimó usando la siguiente ecuación (14):

$$N = \frac{d}{n \cdot s} \sum_{i=1}^n x$$

Donde, N = número total estimado de cuerpos neuronales teñidos con DAB; d = longitud (mm) del eje rostro-caudal de la región que se estudia; n = el número de secciones no contiguas contadas por región; s = espesor de la sección (40 µm); x = número de células contadas por secciones no contiguas estudiadas (de la sección # 1 a la sección # n).

Radioinmunoensayo (RIA)

Los niveles de Prolactina (PRL) fueron determinados mediante RIA. Para los dosajes de PRL sérica se emplearon materiales provistos por Dr. A. F. Parlow, Pituitary Hormones and Antisera Center, Harbor-UCLA Medical Center, Torrance CA.

La marcación con ^{125}I de PRL para llevar a cabo los RIA se realizó por el método del iodógeno (1,3,4,6-tetracloro-3 α , 6 α -difenilglicourilo; Iodogen®, Pierce Chemicals, Ltd.) (Fraker Pamela J. and Speck John C. Jr., 1978).

Las curvas de referencia se realizaron con concentraciones de estándares de: 200ng/ml; 100ng/ml; 50ng/ml; 25ng/ml; 12,5ng/ml; 6,25ng/ml; 3,13ng/ml; 1,56ng/ml y 0,78ng/ml; (tanto para GH como para PRL).

Análisis estadístico

Para evaluar las diferencias entre grupos de estudio, se emplearon adecuadamente el t-test o análisis de varianza (ANOVA). El método Tukey's fue elegido como post hoc test. Diferencias significativas entre áreas hipotalámicas de grupos de ratas fueron definidas a aquellas con $P < 0,05$ (*). Diferencias altamente significativas fueron definidas a aquellas que presentaron un valor de $P < 0,01$ (**).

RESULTADOS

A los animales se les practicó cuatro sangrías, en las cuales los animales seniles se mostraban hiperprolactinémicos al día -3, antes de la estereotaxia. En las sangrías intermedias se observó una tendencia a una caída de los niveles de PRL. Y en la última sangría (día +17) se observó una reducción parcial de los niveles de PRL a valores casi normales. (Figura1)

En el análisis del recuento del número de neuronas TH+, se procedió a estudiar las tres regiones con poblaciones DA del hipotálamo medio basal por separado, paraventricular, periventricular y arcuato (PaVH, PeVH y ARC). Se observó una neurodegeneración parcial en el PaVH y PeVH en animales seniles, sin haber cambio en el número de neuronas TH+ en el ARC tanto en animales jóvenes como en seniles. Esta neurodegeneración parcial no se vio revertida por el tratamiento con RAd-GDNF. (Figura 2).

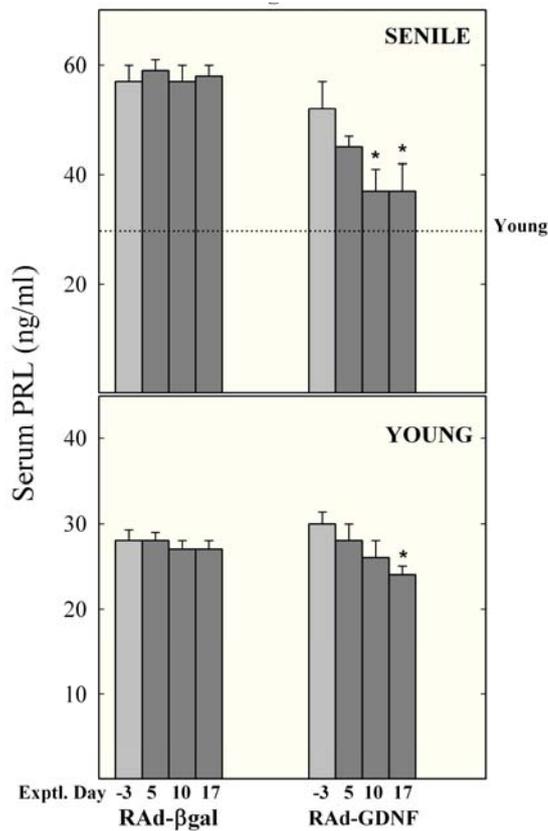


Figura 1: Niveles de PRL en animales seniles controles (RAd-bgal) con una hiperprolactinemia crónica en comparación con los animales seniles tratados (RAd-GDNF), que recuperaron parcialmente los niveles de PRL, casi a niveles normales en ratas jóvenes (líneas de puntos).

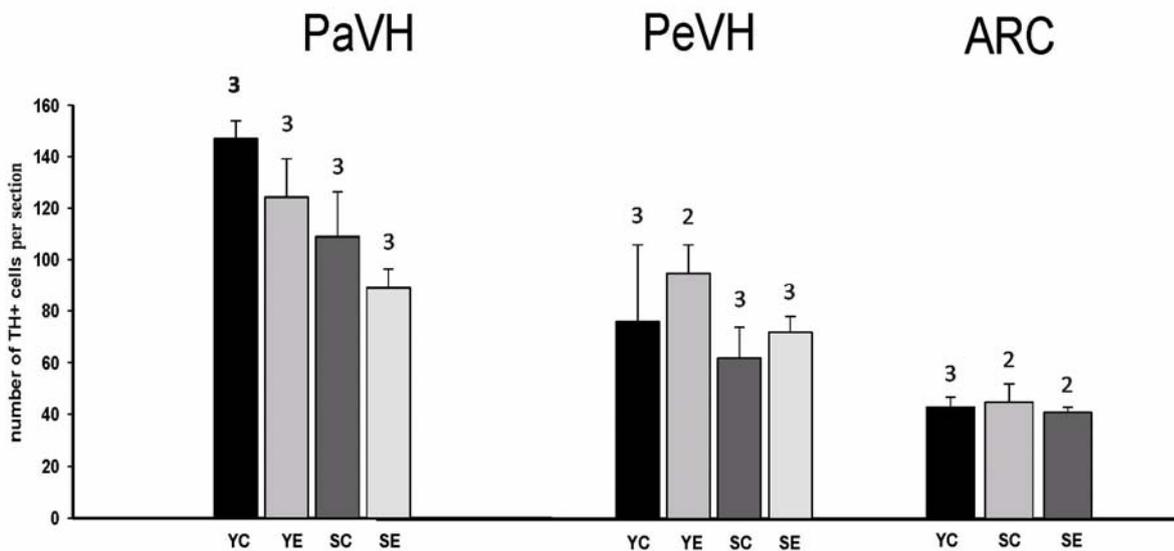


Figura 2: Número de neuronas TH+ en tres regiones hipotálamicas estudiadas (PaVH, paraventricular; PeVH, periventricular y ARC, arcuato). La neurodegeneración es parcial en el PaVH y en el PeVH, y no es evidente en el ARC. El tratamiento con RAd-GDNF no restaura el número de neuronas en los animales seniles. YC: joven control, YE: joven tratado, SC: senil control y SE: senil tratado. Los números sobre las barras de error indican el número de animales por grupo.

DISCUSION

En un estudio reciente de nuestro grupo se ha demostrado que la terapia génica con IGF-I en el hipotálamo de ratas hembras seniles con neurodegeneración DA es altamente efectiva para restaurar la función neuronal DA hipotalámica, corrigiendo de este modo la hiperprolactinemia crónica asociada a la disfunción de las neuronas TIDA en las ratas seniles (15). Se han demostrado en ratas y primates no humanos, que la inyección en el cuerpo estriado o la sustancia nigra de vectores adenovirales, lentivirales o adenoasociados (AAV) para GDNF es capaz de proteger las neuronas DA nigrales de la acción de diferentes toxinas dopaminérgicas (16-20).

Aunque no conocemos otros estudios en los que se haya implementado terapia génica restauradora con GDNF en el hipotálamo. Ahora nosotros pudimos observar una restauración parcial de la hiperprolactinemia crónica de animales seniles.

La inmunohistoquímica cuantitativa para TH reveló que en las hembras seniles la terapia génica con RAd-GDNF no indujo un aumento en el número de neuronas TH+ hipotalámicas cuando se las comparó con sus contrapartes tratadas con RAd-βgal. Sin embargo, en animales tratados con RAd-IGF1 hubo una restauración en el número de neuronas (15).

CONCLUSION

La acción del GDNF sobre la población TIDA nos sugiere que tiene una acción restaurativa parcial de la funcionalidad de estas neuronas, aunque esta mejora fisiológica no se vea reflejada directamente en el número neuronal.

REFERENCIAS

- 1) Sarkar DK, Gottschall PE, Meites J: Damage to hypothalamic dopaminergic neurons is associated with development of prolactin-secreting pituitary tumors. *Science* 218:684-686 (1982).
- 2) Goya RG, Lu JKH, Meites J: Gonadal function and pituitary and mammary pathology in the aging rat. *Mech Age Devel* 56:77-88 (1990).
- 3) Cónsole G, Gómez Dumm CL, Brown OA, Goya RG: Sexual dimorphism in the age changes of the pituitary lactotrophs in rats. *Mech Age Devel*. 95: 157- 166 (1997).
- 4) Cambiaggi V, Goya RG, Zuccolilli GO: Calbindin and nitric oxide synthase expression in the hypothalamic dopaminergic neurons of senile female rats; 12th International Congress of Endocrinology, Lisbon, Portugal, 30 Aug to 4 Sept, 2004 (Abstract)

- 5) Engele J, Bohn MC: The neurotrophic effects of fibroblast growth factors on dopaminergic neurons in vitro are mediated by mesencephalic glia. *J Neurosci* 11: 3070-3078 (1991).
- 6) Lin LFH, Doherty DH, Lile JD, Bektes S, Collins F: GDNF: A glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260:1130-1132. (1993).
- 7) Tomac A, Lindqvist E, Lin LFH, Ögrenn SO, Young D, Hoffer BJ, Olson L: Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature* 373:335-339 (1995).
- 8) Bjorklund A., Rosenblud C, Winkler C, Kirik D: Studies of neuroprotective and regenerative effects of GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 4: 186-200 (1997).
- 9) Bowenkamp KE, Hoffman A F, Gerhardt GA, Henry M A, Biddle PT, Hoffer B J, Granholm ACE: Glial cell line-derived neurotrophic factor supports survival of injured midbrain dopaminergic neurons. *J Comp Neurol* 355: 479-489 (1995).
- 10) Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, Cass WA, Yi A, Simmerman L, Russell D, Martin D, Lapchak PA, Collins F, Hoffer BJ, Gerhardt GA: Functional recovery in Parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature* 380: 252-255 (1996).
- 11) Hoffer BJ, Hoffman A, Bowenkamp K, Huettl P, Hudson J, Martin D, Lin LFH, Gerhardt GA: Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses toxin-induced injury to midbrain dopaminergic neurons in vivo. *Neurosci Lett* 182: 107-111 (1994).
- 12) Bohn MC, Choi-Lundberg DL, Chiocca EA, Breakefield XO: Gene therapies for Parkinson's disease. *Gene Therapy for Neurological Disorders and Brain Tumors*. Humana Press, Inc. pp. 377-395 (1997).
- 13) Paxinos y Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Fourth edition (2000)
- 14) Sánchez HL, Silva LB, Portiansky EL, Goya RG, Zuccolilli GO. Impact of very old age on hypothalamic dopaminergic neurons in the female rat: a morphometric study. *J Comp Neurol*. 458(4):319-25 (2003).

- 15) Hereñú CB, Cristina C, Rimoldi OJ, Becú-Villalobos D, Cambiaggi V, Portiansky EL, Goya RG; Restorative effect of Insulin-like Growth Factor-I gene therapy in the hypothalamus of senile rats with dopaminergic dysfunction; *Gene Therapy*; **14**:237-245 (2007).
- 16) Choi-Lundberg DL, Lin Q, Chang YN, Chiang YL, Hay CM, Mohajeri H, Davidson BL, Bohn MC: Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. *Science* 275:838-841 (1997)
- 17) Mandel RJ, Spratt SK, Snyder RO, Leff SE: Midbrain injection of recombinant adeno-associated virus encoding rat glial cell-derived neurotrophic factor protects nigral neurons in a progressive 6-hydroxydopamine-induced degeneration model of Parkinson's disease in rats. *Proc natl Acad Sci USA* 94:14083-14088 (1997)
- 18) Lapchak PA, Araujo DM, Hilt DC, Sheng, J, Jiao S: Adenoviral vector-mediated GDNF gene therapy in a rodent lesion model of late stage Parkinson's disease. *Brain Res* 777: 153-160 (1997)
- 19) Bilang-Bleuel A, Revah F, Colin P, Locquet I, Robert JJ, Mallet J, Horellou P: Intrastratial injection of an adenoviral vector expressing glial cell line-derived neurotrophic factor prevents dopaminergic neuron degeneration and behavioral impairment in a rat model of Parkinson disease. *Proc natl Acad Sci USA* 94: 8818-8823 (1997).
- 20) Kordower JH, Emborg ME, Bloch J, Ma, SY, Chu Y, Leventhal L, McBride J, Chen EY, Palfi S, Roitberg BZ, Brown WD, Holden JE, Pyzalski R, Taylor MD, Carvey P, Ling Z, Trono D, Hantraye P, Deglon N, Aebischer P: Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science* 290: 767-773 (2000).