

UCA-FC  
Biotecnología  
V169  
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

# **Caracterización de la Activación de la Respuesta a Proteínas Mal Plegadas (UPR) Frente a Daño por Hemisección a la Médula Espinal en Ratones**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Vicente Spiro Valenzuela Paterakis

Director de Seminario de Título: Dr. Claudio Hetz Flores

Co-Director de Seminario de Título: Dr. Felipe Court Goldsmith

Patrocinante: Dr. Álvaro Glavic Maurer



Septiembre, 2009

Santiago – Chile



### INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr.:

**VICENTE SPIRO VALENZUELA PATERAKIS**

**“CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA A  
PROTEÍNAS MAL PLEGADAS (UPR) FRENTE A DAÑO POR  
HEMISECCIÓN A LA MÉDULA ESPINAL EN RATONES”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

*Dr. Claudio Hetz Flores*  
**Director Seminario de Título**

*Dr. Felipe Court Goldsmith*  
**Co-Director**

**Comisión de Evaluación**

*Dra. Verónica Palma Alvarado*  
**Presidente Comisión**

*Dr. Alejandro Roth Metcalfe*  
**Corrector**

*Dr. Álvaro Glavic Maurer*  
**Patrocinante**



Santiago de Chile, septiembre de 2009.



## BIOGRAFÍA

Hace 26 años y un poco más empieza esta historia, en Antofagasta mi ciudad natal, para luego crecer en Arica. Mis padres profesores, Vicente y Jacqueline; mis hermanos Nicolás y Alexandro, todos son responsables de lo que hoy soy, y se los agradezco eternamente. Los Empart, la Radio el Morro, la Magisterio, el Liceo Domingo Santa María, la Escuela D-4, el Liceo A-1, los amigos, formadores, las eternas pichangas, todos testigos de los pasos que me permitieron llegar hasta acá. Llegué a Santiago con la curiosidad de estudiar una carrera que no tenía muy claro de qué se trataba, pero por su nombre sonaba interesante: Ingeniería en Biotecnología Molecular, partí por el Programa de Bachillerato, pero ya tenía decidido mi rumbo. Dentro de la carrera me di cuenta de que justamente era lo que estaba buscando: profesores con vocación, grandes amigos, tiempo para estudiar pero también para disfrutar y lo más importante, las bases sólidas que ofrece la Universidad de Chile para madurar y convertirme en lo que soy. Visité varios laboratorios en pregrado, entre pasantías y unidades de investigación: Palinología, Bioquímica, Biología Vegetal, Biología Celular y Molecular en el edificio Milenio, todas en la Facultad de Ciencias. Hasta que tocó el momento de realizar el seminario de título en el Laboratorio de Estrés Celular y Biomedicina de la Facultad de Medicina y en el Laboratorio de Neurofisiología y Biología Glial de la Universidad Católica. Este Seminario es un paso más, espero sea el comienzo de un nuevo capítulo de la hermosa vida que me ha tocado vivir.





## AGRADECIMIENTOS

Porque me permitieron estudiar en la Universidad, para los verdaderos culpables de lo que soy y hoy logro: mis padres Vicente y Jacqueline, esto es de ustedes. Mis hermanos Nicolás y Alexandro, esto es para ustedes. Mis tíos Lalo y Silvia, los primos Eduardo, Seba, Pía y Mayito, Agustín, gracias por recibirme y aguantarme. Mis tías Paty y Sofi, los tíos, primos, por ayudarme a sobrevivir y compartir preciosos momentos. Para mi abuela Margarita en Antofa, mi tía Esther, tío Carlo, primos Carlo y Paolo, sobrinos, la familia en Arica, Antofa y Santiago.

A mis amigos de la vida: Bero, Klaudio, Chelo, Toño, Vitoco, Jano, Lars, David, Franco, Carola, Andrea, Mauro, Pamela, Carla, Coté, Alejandra, mis compañeros y amigos en Arica, a todos ellos que, algunos sin darse cuenta, me enseñaron que la vida se vive a concho.

A mis compañeros de la U, por permitirme crecer con ustedes: Felipe, Pao, Gaby, Nía, Carola, Romi, Ori, Ceci, Juan Luis, Pablo, Camila, Nacho, Oscar, Pato, César, Vale, Samuel y todos los que compartieron algún momento en la U o D-31. Más amigos, porque aguantamos algunos momentos difíciles y así disfrutamos mucho más: Ginn, Dani, Pauli, Yu, Fer, Fran, Pau, Chilo, Vale, Lore, Coté, Claudia, Gaby, Christian, Paloma JV, Mati, Mario, Edu, Carlos, Javi, Vika.

A la Chara, por enseñarme que el compañerismo puede ser más que un concepto: Charlie, Tío Quarry, Daniel, el mentor Richard Kawada y todos los charistas alrededor del mundo.

A mis compañeros del lab de milenio: Kuri, Erick, Cristi, Seba, Christian; a mis padres adoptivos: Carlitos y Margarita.

A mis tutores de Seminario: Claudio y Felipe, a la comisión por recibirme, instruirme y comprenderme. A mis compañeros del lab de la PUC, por su ayuda y paciencia: Eileen, Moni, Seba, Nico, Rafa. A mis compañeros de lab en medicina, a todos por su comprensión y ayuda: Seba, Diego, Fer, Pame, Nueva, Danny, Meli, Sole, Sopi, Mónica, Juan.

A Francisca, por ayudarme a dar el último paso. Al fútbol, la música. A todos ustedes que son el motivo de mis ganas de vivir y siempre dar más. A todos los que aparecieron en algún momento de mi vida y que sin darse cuenta participaron en la elaboración del camino que estoy recorriendo, gracias, esto es de ustedes.

## FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado a través de los proyectos FONDECYT #1070444 y #1070377, FONDAP #15010006, Núcleo Milenio #P07-048-F.



## ÍNDICE



BIOGRAFÍA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
FINANCIAMIENTO.....	v
ÍNDICE.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	ix
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1. La médula espinal.....	5
3.2. El daño a la médula espinal.....	6
3.3. La evolución del DME.....	8
3.4. Estrategias terapéuticas actuales de recuperación funcional por DME y modelos experimentales de DME.....	13
3.5. El estrés del retículo endoplasmático.....	14
3.6. La UPR y su rol en enfermedades neurodegenerativas.....	18
3.7. Antecedentes relacionando el estrés de RE y el daño neurológico.....	20
4. OBJETIVO GENERAL.....	22
4.1. Objetivos Específicos.....	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
5.1. Reactivos.....	23
5.2. Animales y daño por HME.....	23
5.3. Extracción de ARN, RT-PCR y PCR en tiempo real.....	25

5.4.	Análisis de <i>Western blot</i> .....	27
5.5.	Ensayo de PCR de <i>Xbp-1</i> más digestión con <i>PstI</i> .....	28
5.6.	Análisis de tejido de la ME.....	29
6.	RESULTADOS .....	30
6.1.	Validación del modelo: HME en ratones .....	30
6.2.	Expresión temporal de <i>chop/gadd153</i> y <i>Atf4</i> después de la HME.....	31
6.3.	Expresión espacial de <i>chop/gadd153</i> y <i>Atf4</i> bajo condiciones de HME. ....	33
6.4.	Procesamiento del ARNm de <i>Xbp-1</i> luego de HME.....	35
6.5.	Expresión de chaperonas del RE y del factor pro-apoptótico Bim en la ME 6 horas post-HME. ....	40
6.6.	Niveles de ubiquitinación bajo condiciones de DME.....	43
7.	DISCUSIÓN .....	45
7.1.	Validación del método de HME en ratones.....	45
7.2.	Expresión temporal y espacial de <i>Atf4</i> y <i>chop/gadd153</i> .....	45
7.3.	Procesamiento de <i>Xbp-1</i> frente al DME.....	48
7.4.	Chaperonas de RE y reguladores de la apoptosis frente a HME .....	49
7.5.	Ubiquitinación.....	51
8.	CONCLUSIONES.....	52
9.	BIBLIOGRAFÍA .....	55





## ÍNDICE DE FIGURAS



<b>Figura 1</b>	Modelo de daño a la ME por hemisección en ratones.	12
<b>Figura 2</b>	La respuesta a proteínas mal plegadas.	16
<b>Figura 3</b>	Esquema del procedimiento realizado para estudiar la UPR bajo condiciones de daño por HME.	26
<b>Figura 4</b>	Expresión temporal de <i>Atf4</i> y <i>chop/gadd153</i> luego de daño por HME.	32
<b>Figura 5</b>	Expresión espacial de <i>chop/gadd153</i> y <i>Atf4</i> a 6 horas después de daño por HME.	34
<b>Figura 6</b>	Distribución de CHOP/GADD153 en la ME luego de 6 horas transcurrido el daño por HME.	36
<b>Figura 7</b>	Procesamiento alternativo del ARNm de <i>Xbp-1</i> frente a daño por HME.	37
<b>Figura 8</b>	Procesamiento alternativo del ARNm de <i>Xbp-1</i> en distintas zonas de la ME frente a daño local por HME.	39
<b>Figura 9</b>	Niveles de expresión de chaperonas de ratones dañados por HME 6 horas post-daño.	41
<b>Figura 10</b>	Expresión de blancos transcripcionales de la UPR frente a daño por HME 6 horas post-daño.	42
<b>Figura 11</b>	Patrón de ubiquitinación de proteínas luego de daño por HME.	44
<b>Figura 12</b>	Modelo de activación temprana de UPR mediante daño por HME, planteado por los resultados obtenidos.	54





## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>Atf4 - ATF4</b>	( <i>gen</i> – proteína) <i>Activating transcription factor 4</i>
<b>ATF6</b>	<i>Activating transcription factor 6</i>
<b>bip/grp78 - BiP/Grp78</b>	( <i>gen</i> – proteína) <i>Binding protein/Grp78</i>
<b>C/EBP</b>	<i>CCAAT-enhancer-binding proteins</i>
<b>BMS</b>	<i>Basso Mouse Scale</i>
<b>chop/gadd153</b>	( <i>gen</i> – proteína) <i>C/EBP homologous protein</i>
<b>CHOP/GADD153</b>	
<b>DME</b>	Daño a la médula espinal
<b>eIF2<math>\alpha</math></b>	Factor de inicio de la traducción eucarionte 2 alfa
<b>ERAD</b>	Degradación Asociada al RE
<b>ERSE</b>	Elementos de Respuesta al estrés de Retículo Endoplasmático
<b>grpx - GrpX</b>	( <i>gen</i> – proteína) <i>Glucose-Regulated Protein number X</i>
<b>HME</b>	Hemisección a la médula espinal
<b>IRE1<math>\alpha</math></b>	Inositol-requiring transmembrane kinase/endonuclease



<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>KDEL</b>	Secuencia de aminoácidos (Lys-Asp-Glu-Leu)
<b>ME</b>	Médula Espinal
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción de la polimerasa en cadena
<b>PERK</b>	PKR-like ER kinase
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RT PCR</b>	PCR utilizando transcriptasa reversa
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativo
<b>tm</b>	tunicamicina
<b>UPR</b>	Respuesta a proteínas mal plegadas ( <i>Unfolded Protein Response</i> )
<b>WT</b>	<i>Wild-type</i> o silvestre
<b><i>Xbp-1</i></b>	<i>X-Box binding protein-1</i> total (ARNm)*
<b><i>Xbp-1s</i></b>	<i>X-Box binding protein-1</i> procesada (ARNm)
<b><i>Xbp-1u</i></b>	<i>X-Box binding protein-1</i> no procesada (ARNm)

\* A menos que se explicita que se habla de la proteína XBP-1

## RESUMEN

El daño a la médula espinal (DME) es una de las principales causas de parálisis en el adulto e involucra ruptura de axones y muerte de motoneuronas en este tejido. Los mecanismos celulares involucrados en los efectos patológicos que llevan a la disfunción neuronal luego del DME no están completamente comprendidos en la actualidad. Estudios recientes en modelos experimentales de DME sugieren que perturbaciones en la homeostasis del retículo endoplasmático (RE) podrían estar relacionados con el proceso de pérdida motora y disfunción neuronal. El estrés de RE está asociado con la acumulación de proteínas mal plegadas en este organelo, fenómeno observado también en diversas enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, entre otras. El estrés de RE gatilla un proceso adaptativo conocido como la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). La UPR esta mediada por la inducción de la expresión de factores de transcripción como *X-Box binding protein-1 (XBP-1)*, *Activating transcription factor 4 (ATF4)*, y factores pro-apoptóticos como CHOP/GADD153. Estos factores de transcripción controlan la inducción de genes claves para aumentar el plegamiento de proteínas como es la chaperona BiP/Grp78.

El presente seminario se centra en la caracterización de la inducción de la UPR en el tiempo y espacio, mediante daño inducido por hemisección a la médula espinal como modelo de DME utilizando ratones como modelo experimental. Nuestros resultados indican mediante el uso de diferentes ensayos, la activación temporal y espacial de *Atf4* y *chop/gadd153* en la médula espinal en la zona del daño y zonas más

distales a partir de 1 hora post-DME. Asimismo, logramos observar un aumento considerable en la presencia de la forma activa de *Xbp-1* a partir de 3 horas post-DME. Estos resultados correlacionaron con un aumento en los niveles del ARNm de *bip/grp78* a 6 horas post-daño. Sin embargo, no se observó una variación en la expresión transcripcional que codifica a la chaperona Grp94 y una disminución de los niveles de ARNm de *grp58* al mismo tiempo. Consistente con un aumento en los niveles de CHOP/GADD153, logramos detectar un aumento en los niveles de expresión del gen pro-apoptótico *bim*, el cual es un blanco directo de este factor de transcripción. Finalmente, observamos un aumento en los niveles de ubiquitinación de proteínas en la zona del daño de la ME en ratones sometidos a DME lo cual sugiere la existencia de problemas en el plegamiento de proteínas en este modelo de estudio. Basado en los resultados descritos en este seminario, podemos concluir que frente al DME, existe una activación temprana de marcadores clásicos de la UPR en la ME, lo que podrían estar gatillando mecanismos asociados con adaptación a estrés y también apoptosis bajo condiciones de estrés de RE crónico. Además, logramos determinar la activación espacial de la UPR en relación a la zona de DME. Estos resultados podrían tener implicaciones en el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de la disfunción motora producto del DME.



## ABSTRACT

Spinal cord injury (SCI) is one of the most important causes of paralysis in adult human and involves axons breakage and death of motoneurons in this tissue. Currently, the cellular mechanisms involved in these pathological effects are not completely understood. Recent studies in experimental SCI models suggest that endoplasmic reticulum (ER) perturbations could be related to the loss of locomotion and neuronal dysfunction. ER stress is associated to the accumulation of misfolded proteins in this organelle, as observed in neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease, Huntington's disease, amyotrophic lateral sclerosis, among others. ER stress triggers an adaptive process known as the unfolded protein response (UPR), which is mediated by an induction in the expression of some transcription factors like the X-Box binding protein-1 (XBP-1), Activating transcription factor 4 (ATF4), and pro-apoptotic factors like CHOP/GADD153. Transcription factors that control the induction of key genes require to increase the correctly folded protein levels. A clear example of this, is the induction of BiP/Grp78 chaperone.

This seminar focuses on the characterization of UPR through time and space, in response to a SCI injury model: spinal cord hemisection in mice. Our results show a spatial and temporal differentiated expression of *Atf4* y *chop/gadd153* genes in the injury zone of the spinal cord (SC) after 1 hour post-injury and an important increase of the active form of *Xbp-1* since 3 hours post-injury. These results correlate with the increasing *bip/grp78* mRNA levels at 6 hours post-injury. However, we did not observed differences in *grp94* mRNA levels and also a decrease in the transcriptional levels of

*grp58*. Consistent with the increased levels of CHOP/GADD153, we detected an increased expression of the pro-apoptotic gene *bim*, a direct target of this activation factor. Finally, we observed increased levels of ubiquitinated proteins in the injury zone of the SC, suggesting a protein folding problem in this study model. Based in our results, we can conclude that after SC hemisection, there is an early activation of classic UPR markers in the SC that could be triggering mechanisms related to stress adaption and apoptosis under chronic ER stress conditions. Furthermore, we could determinate the spatial activation of the UPR regarding the location from the injury. These results could have implications in the development of new therapies for the treatment of motor dysfunction by SCI.

## INTRODUCCIÓN

### 3.1. La médula espinal

La médula espinal (ME) es una masa cilíndrica de tejido nervioso que, junto con el cerebro, forman el sistema nervioso central. Entre sus funciones está el transmitir hacia y desde el cerebro, las señales nerviosas sensoriales y motoras en animales vertebrados. Adicionalmente, la ME también funciona como un órgano generador de respuestas independientes del cerebro, conocidas como "actos reflejos" (Maton et al., 1993). Estructuralmente, la ME está organizada en segmentos, los cuales se asocian a las vértebras de la columna vertebral, que rodean y protegen la ME en su totalidad. La porción superior de la columna vertebral, denominada área cervical, tiene siete vértebras cervicales. La sección que sigue, la zona dorsal, incluye el área del pecho y está constituida por doce vértebras dorsales. La sección baja de la espalda es conocida como el área lumbar, donde existen cinco vértebras lumbares. Por último, la sección terminal tiene cinco vértebras sacras y es llamada el área sacra.

Los componentes estructurales de la ME son cinco e incluyen (i) los tractos (axones) de motoneuronas que transmiten señales desde el cerebro hacia diversas partes del cuerpo; (ii) los tractos de neuronas sensoriales, llamadas células del ganglio de la raíz dorsal, las cuales llevan información sensorial hacia la ME; (iii) las células gliales, las cuales se subclasifican en astrocitos y oligodendrocitos. Los astrocitos regulan la composición de los fluidos que rodean a las células nerviosas y dan sostén a los tractos neuronales; mientras que los oligodendrocitos otorgan la mielina a los axones de las neuronas para la aceleración de la transmisión nerviosa; (iv) Las

interneuronas, las cuales se disponen completamente en la ME, ayudan a integrar la información sensorial y generar señales coordinadas que controlan los músculos; y (v) la microglía, la cual en su forma activada ayuda a eliminar desechos celulares (Caspary and Anderson, 2003).

### **3.2. El daño a la médula espinal**

El daño a la médula espinal (DME) es un evento que puede generar alteraciones motoras y/o sensoriales, llegando en muchos casos a producir parálisis de por vida. El DME se origina generalmente con un golpe repentino y traumático en la columna que causa fractura o dislocación de las vértebras. El daño al tejido se inicia desde el momento de la lesión, cuando los fragmentos de hueso son desplazados y el material de los discos o ligamentos rasgan el tejido de la ME. Producto de la fuerza mecánica, los axones se cortan y se rompen las membranas celulares. Además, los vasos sanguíneos pueden romperse producto de la contusión, causando hemorragia intensa en la zona interna de la ME, la cual puede propagarse a otras áreas de la ME a las pocas horas post-daño. La gravedad del daño dependerá tanto del grado de ruptura de las fibras nerviosas como de la localización del daño en la ME. Por ejemplo, puede ocurrir ruptura completa de las fibras nerviosas de la ME, lo cual es llamado transección medular; o también puede suceder un daño parcial a la médula o daño incompleto. El número de casos de accidentes con daño incompleto a la ME ha cambiado gradualmente a través de los años, de manera que recientemente más de la mitad, 55 por ciento, son daños incompletos. Se sugiere que este cambio es debido a una mejoría en el manejo por parte de servicios médicos de emergencia más



organizados y coordinados (National Spinal Cord Injury Statistical Center, 2001). En términos de la ubicación espacial del DME y sus consecuencias, se definen dos conceptos: paraplejía y tetraplejía. La paraplejía corresponde a la pérdida sensitiva e inmovilidad de las extremidades inferiores del organismo. Estos casos se presentan cuando la lesión ocurre en el área dorsal, lumbar o sacra. La tetraplejía corresponde a una pérdida sensomotora tanto de las extremidades superiores como inferiores del organismo. Esta lesión es debido al DME en el área cervical.

Además del daño físico, el DME genera grandes problemas económicos y sociales tanto a la persona que lo padece como a las personas que lo rodean. Actualmente en los Estados Unidos existen aproximadamente 250.000 personas que padecen de esta alteración física, y 10.000 nuevos casos cada año. El 38,5 por ciento de todas las lesiones de la ME ocurren durante accidentes automovilísticos. Casi un cuarto de esta cifra, el 24,5 por ciento, es causada por daños relacionados con actos de violencia, que, a menudo, involucran armas de fuego y cuchillos. El resto de los casos de DME se debe a accidentes deportivos, caídas y accidentes laborales. Más del 80 por ciento de los pacientes con lesiones de la ME son hombres. Por otro lado, la zona de mayor incidencia en DME comprende las vértebras cervicales 4 y 6 (C4-C6) y la segunda zona de mayor incidencia se ubica entre las vértebras torácica 12 (T12) y lumbar 1 (L1) (National Spinal Cord Injury Statistical Center, 2001).

Durante los últimos 50 años se han realizado grandes esfuerzos terapéuticos para tratar a los pacientes afectados por DME y así recuperar la movilidad. Además, investigadores de todo el mundo han publicado una gran cantidad de artículos, con intenciones de encontrar una solución a este problema, pese a esto, los esfuerzos han

sido insuficientes y actualmente no existe un método para reparar el DME. Actualmente el único medicamento utilizado para tratar las lesiones a la ME es el uso de corticoides como dexametasona o metilprednisolona 8 horas post-daño para reducir la inflamación (NIH publication, 1997). Por esta razón, es fundamental comprender los mecanismos moleculares que explican el DME y el proceso de degeneración del tejido de la ME asociada a esta condición.

### 3.3. La evolución del DME

El daño físico directo a la ME es conocido como **daño primario**, el cual ocurre inmediatamente después del evento traumático (McDonald y Sadowsky, 2002) produciendo daño al tejido y por ende, modificación de la capacidad sensitiva y locomotora. El aplastamiento y rasgamiento de los axones es sólo el inicio de los fenómenos que ocurren en la ME lesionada, y que continúan durante varios días. El trauma físico inicial al DME provoca una serie de sucesos bioquímicos y celulares que producen desmielinización, con la consiguiente muerte celular de oligodendrocitos y neuronas; y la activación de la respuesta inflamatoria. Estos fenómenos que ocurren horas, días o incluso meses después del DME, son conocidos como el **daño secundario** a la ME (Tator and Fehlings 1991; Lu et al. 2000), cuyas consecuencias son un aumento de la neurodegeneración y la formación de la cicatriz glial, la cual inhibe la regeneración axonal de las fibras dañadas.

Algunos de los eventos asociados a la generación del daño secundario son por lo menos seis, enumerados a continuación. (i) El edema y la inflamación local, con la

consecuente liberación de electrolitos como el potasio al medio extracelular y un aumento en los niveles de sodio e iones cloruro en el medio intracelular (Tator and Fehlings, 1991). (ii) Procesos de isquemia debidos a la hipoperfusión de los vasos sanguíneos de la zona, enlenteciendo o bloqueando los potenciales de acción de los axones (Martin et al, 1998). (iii) La liberación de radicales libres como el superóxido y el óxido nítrico, los cuales destruyen las membranas celulares con la consiguiente necrosis celular (Sandler y Tator, 1976; Selzer, 2003; Amar y Levy, 1999). Los radicales libres, además, dañan la integridad del tejido nervioso vascular, proteínas y ácidos nucleicos (Bregman et al, 1997). (iv) La acumulación de neurotransmisores excitatorios como el glutamato, el cual es responsable de la acción sobre receptores de NMDA (N-Metil-D- Aspartato) y no-NMDA en neuronas y en células gliales. La activación de estos receptores, proceso conocido como excitotoxicidad facilitaría la entrada masiva de calcio a la célula, el cual es un factor esencial en la consiguiente muerte celular (Tator, 1998; Amar y Levy, 1999). El exceso de liberación de glutamato en condiciones de DME produce hiperexcitación de las células vecinas (McDonald y Sadowsky, 2002), desencadenando una serie de eventos destructivos que culminan con la muerte celular y la consiguiente liberación de radicales libres. (v) La liberación de inhibidores de factores de crecimiento, que actuarían en el terminal neuronal dañado inhibiendo la regeneración (Selzer, 2003). (vi) La respuesta inmunológica local post-DME. En condiciones normales, la barrera hematoencefálica evita que las células del sistema inmunológico entren al sistema nervioso central. Sin embargo, cuando se rompe esta barrera debido al aumento de la permeabilidad vascular en el tejido de la ME, las células del sistema inmunológico que circulan normalmente en la sangre, principalmente leucocitos, pueden invadir los tejidos dañados y desencadenar una respuesta inflamatoria. El proceso inflamatorio asociado a DME se caracteriza por la

acumulación de fluidos y la afluencia de células del sistema inmune, como neutrófilos, linfocitos T, macrófagos y monocitos, proceso que está bien caracterizado temporalmente luego del DME (Donnelly and Popovich, 2007). El DME también estimula a los astrocitos en reposo a producir proteoglicanos que participan en la formación estructural de tejido cicatricial al interior de la ME, más conocida como cicatriz glial (Silver et al, 2004). Las células gliales se agrupan en la zona cercana al DME para formar esta cicatriz (Windle, and Chambers, 1950; Windle et al, 1952; Jones et al, 2003), lo que crea una barrera que evita la regeneración axonal eficiente a través de esta región.

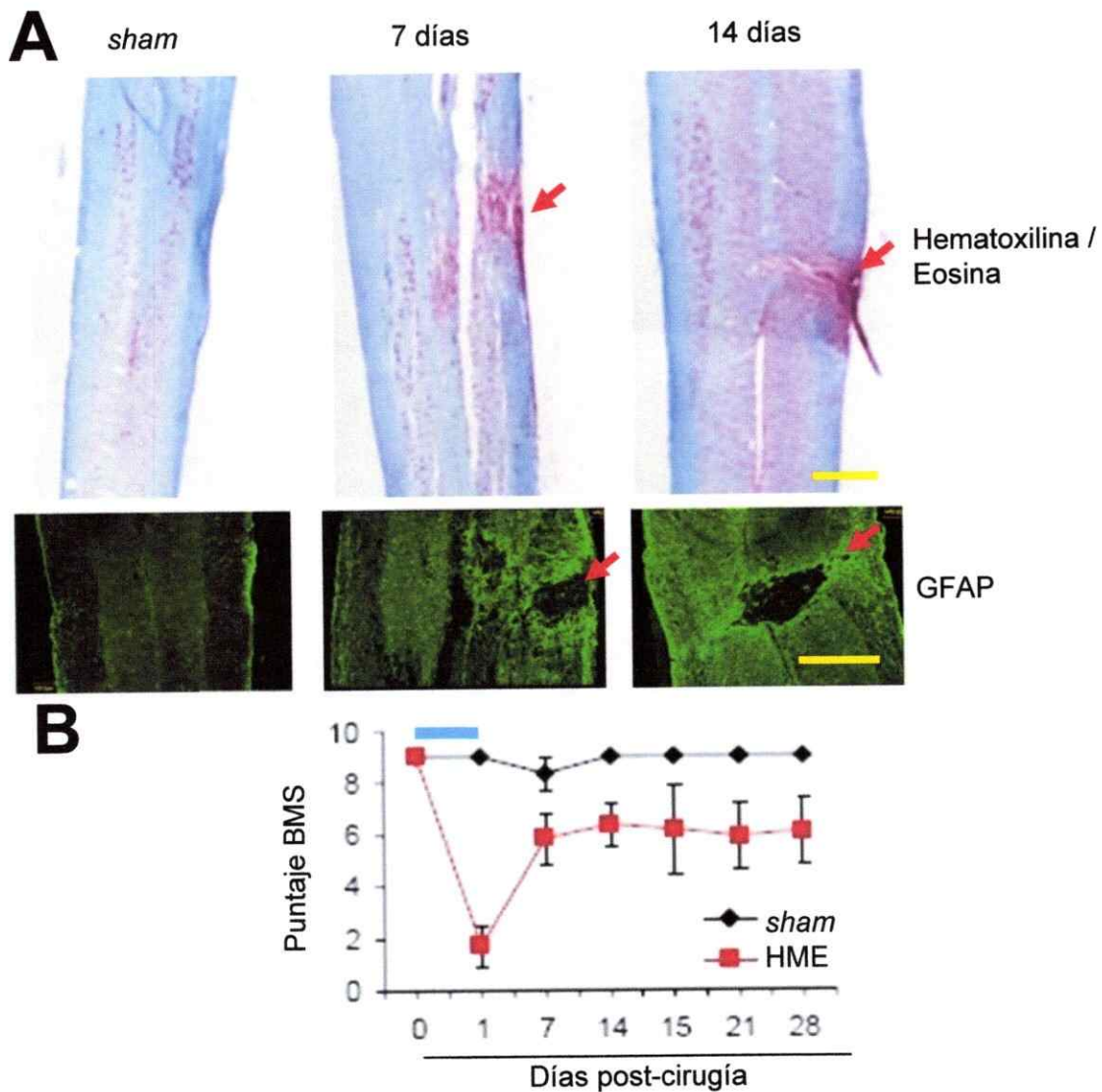
Otra consecuencia de daño secundario producida por los eventos antes mencionados es la activación de mecanismos celulares de respuesta a estrés relacionados con la adaptación o bien, mecanismos de muerte celular cuando el daño a la célula es irreversible. Varios estudios han sugerido que la muerte celular programada por medio de la apoptosis juega un rol determinante en este daño secundario en modelos animales y estudios descriptivos en tejido humano post-mortem (Kato et al. 1996; Li et al. 1996; Crowe et al. 1997; Liu et al. 1997; Shuman et al. 1997; Emery et al. 1998; Park et al, 2004). La activación de la apoptosis está bien descrita en modelos de DME y se ha observado en otros modelos de daño al sistema nervioso como son la isquemia, varias enfermedades inflamatorias y en lesiones por trauma mecánico (Namura et al, 1998; Yakovlev et al, 1997; Springer et al, 1999; entre otros). Todas estas publicaciones dan cuenta de los mecanismos de activación final que conllevan a la apoptosis, como son la activación de caspasas pro-apoptóticas, la inducción de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, liberación de citocromo c desde la mitocondria al citosol, entre otros. De hecho, se ha demostrado que durante el



DME en modelos murinos se activan los receptores de la vía extrínseca de la apoptosis como Fas/CD95 (Ackery et al, 2006, Yu et al, 2009). Estudios en humanos revelan que células apoptóticas pueden ser detectadas entre las 3 horas y las 8 semanas después del DME mediado por trauma (Emery et al, 1998).

A nivel celular, las neuronas y los oligodendrocitos son específicamente y severamente afectados por el daño secundario después del DME. En contraste con esto, los astrocitos sobreviven e incluso proliferan después del DME, volviéndose reactivos (Baldwin et al. 1998; Eng et al. 2000), favoreciendo la formación de la cicatriz que aísla el área dañada, inhibiendo la regeneración axonal (McKeon et al. 1991; Fawcett and Asher 1999). Estas diferencias en términos de los tipos celulares afectados en el DME sugiere que podrían existir mecanismos de modulación que determinan cada destino celular específico en la ME.

Días, o incluso semanas después del daño secundario, el área de destrucción crece en tamaño (Figura 1A), y algunas veces puede abarcar hasta varios segmentos de la ME por encima y por debajo de la zona del daño original. Sin embargo, también se ha observado que en condiciones de daño parcial a la ME, ocurre un fenómeno de recuperación de la capacidad locomotora luego de DME en monos (Courtine et al, 2005) y ratones (Basso et al, 2006) (Figura 1B). Estos estudios se realizaron previamente al inicio de este seminario utilizando ensayos de locomoción. Los resultados obtenidos confirman que, además de los efectos negativos que podría estar produciendo el daño secundario, existe un fenómeno de plasticidad que está llevando a cierta recuperación funcional del sistema nervioso central después del DME. Es de especial interés y necesidad comprender los mecanismos que producen el daño secundario, ya que al entender y desarrollar una terapia para detenerlo o modularlo,



**Figura 1. Modelo de daño a la ME por hemisección en ratones.** Algunos efectos del daño secundario por HME son la desmielinización asociada a muerte celular y proliferación celular de astrocitos. Sin embargo después del DME se ha observado una relativa recuperación de la capacidad locomotora. **(A)** Ratones silvestres se sometieron a cirugía. La imagen muestra cortes longitudinales de ME de ratones *sham* (control), o de 7 y 14 días post-HME. Los cortes superiores se tiñeron con Hematoxilina/Eosina y se observaron por microscopía óptica. Abajo se muestra una inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo contra el marcador de astrocitos GFAP en muestras de ME derivadas de ratones *sham*, o de 7 días y 14 días post-HME respectivamente. El tejido luego se observó en un microscopio de epifluorescencia. Las flechas rojas indican la zona donde se realizó la HME. La barra amarilla representa 0,4 mm. **(B)** La locomoción de los animales lesionados por HME se analizó en el tiempo usando el ensayo de campo abierto utilizando la escala BMS y se comparó con animales control *sham*. Los datos representan el promedio y el error estándar de 7 animales por grupo. La barra celeste indica el tiempo que se realizarán la mayoría de los estudios. Figura modificada del trabajo de Collyer en el laboratorio de Neurobiología de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

podría rescatar la funcionalidad de los axones, y reducir así los efectos degenerativos posteriores. Esto podría marcar una gran diferencia en el potencial de recuperación de los pacientes afectados por DME. Pese a todas estas evidencias indicando la activación de la apoptosis, no están completamente definidos los mecanismos que dan cuenta de las vías de transducción de señales río arriba, inducidas por el daño primario, que regulen o modulen la apoptosis.

#### **3.4. Estrategias terapéuticas actuales de recuperación funcional por DME y modelos experimentales de DME.**

Diversas estrategias se han usado para tratar de restablecer el circuito neuronal afectado en condiciones de DME. Algunos estudios incluyen la regeneración axonal mediada por el trasplante de tejido de ME (Howland et al, 1995), y la terapia celular (Zietlow et al, 2008; Willerth and Sakiyama-Elbert, 2008; Diener and Bregman 1998; Bregman et al, 2002; Coumans et al, 2001). El uso de células madre embrionarias de ME y de otros orígenes ha sido también utilizada (Kim et al, 2009; Moreno-Manzano et al, 2009); aparatos estimuladores de regeneración (Olson et al, 2009), entre otras estrategias.

Para realizar estudios de DME se utilizan modelos animales como son los monos, gatos, conejos, y ratas. Últimamente se están utilizando ratones debido a su potencial para modular genéticamente el sistema nervioso (Guertin, 2005). Como modelos de DME se utilizan diferentes métodos, como es el método de la contusión/compresión (Shuman et al, 1997), de isquemia (Lang-Lazdunski et al, 2000), y la hemisección a la médula espinal (HME), el cual simula un daño incompleto a la ME (Zheng et al, 2002;

Courtine et al, 2008; Goldshmit et al, 2008). Se ha observado que existe una recuperación relativa de la locomoción durante la HME, la cual correlaciona con la recuperación anatómica existente frente a un daño incompleto (Schucht, 2002). Para analizar esta recuperación locomotora se utilizan varios ensayos, siendo uno de los más empleados el ensayo de “Basso-Beattie-Bresnahan” para ratas (Basso et al., 1995), creándose recientemente una variante para ratones, el BMS (Basso et al, 2006). Este ensayo tiene un potencial importante debido a los modelos genéticos de ganancia y pérdida de función que actualmente existen y se están desarrollando en ratones que pueden ser utilizados para estudiar las bases moleculares del DME (Guertin, 2005).

### **3.5. El estrés del retículo endoplasmático**

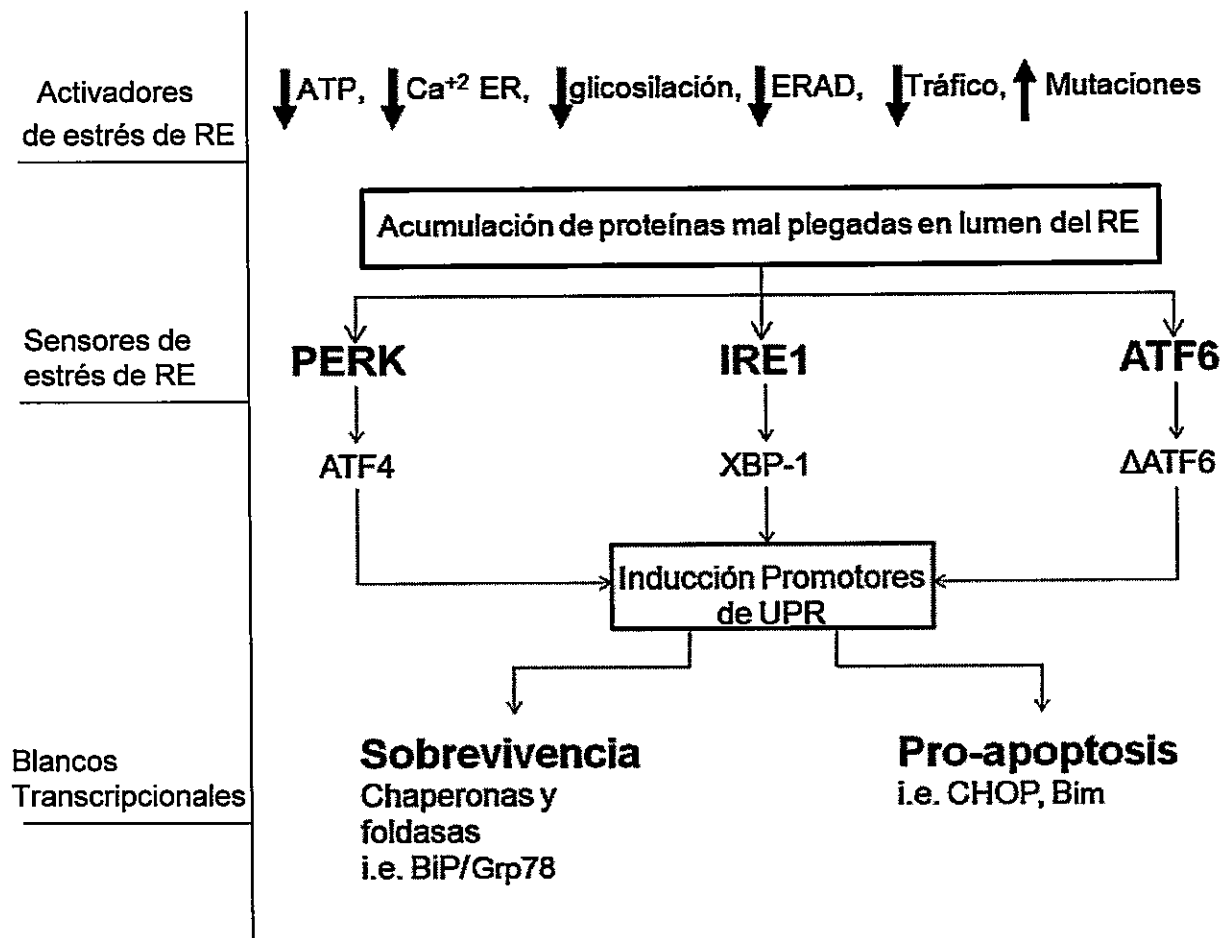
Bajo condiciones de estrés de retículo endoplasmático (RE), una compleja vía de transducción de señales es activada la cual es conocida como “Respuesta a proteínas mal plegadas” (UPR del inglés *Unfolded Protein Response*). La UPR transmite la información sobre el estado de plegamiento de proteínas desde el lumen del RE hacia el núcleo y citosol, promoviendo así un aumento en la capacidad de plegamiento, recuperando la homeostasis celular en situaciones de acumulación de proteínas mal plegadas (Schroder and Kaufman, 2005).

En primera instancia, la UPR consiste en una respuesta adaptativa y de pro-sobrevivencia frente a condiciones de estrés de RE. Sin embargo, si la acumulación de proteínas mal plegadas es persistente y el estrés celular no puede ser disminuido, la UPR gatilla procesos pro-apoptóticos para eliminar a la célula irreversiblemente dañada (Szegezdi et al., 2006). Muchos mecanismos han sido propuestos como un

vínculo entre el estrés de RE y la muerte celular, incluyendo la activación de proteasas de la familia de las caspasas, quinasas, factores de transcripción y proteínas de la familia Bcl-2 (Hetz and Glimcher, 2007).

La UPR está mediada por lo menos por tres proteínas que detectan el estrés en el RE: los sensores *PKR-like ER kinase* (PERK), *Activating transcription factor 6* (ATF6) e *Inositol-requiring transmembrane kinase/endonuclease* (IRE1) (Ron and Walter, 2007). Bajo condiciones de estrés de RE estas proteínas sensoras son activadas producto de una homo-dimerización, desencadenándose luego el proceso de transducción de señales de la UPR (Figura 2).

(i) PERK, es una quinasa que bajo condiciones de estrés de RE dimeriza, promoviendo su autofosforilación y activación. Una vez activado, PERK fosforila al factor de la iniciación de la traducción eIF2 $\alpha$ , lo cual lleva a la inhibición de la traducción general de proteínas hacia el lumen del RE, fomentando así la sobrevivencia celular por una disminución de la sobrecarga de proteínas nacientes que arriban al RE. Sin embargo, esta atenuación de la traducción es selectiva dado que la fosforilación de eIF2 $\alpha$  activa la traducción específica del factor de transcripción ATF4. ATF4 induce la expresión de genes involucrados en el metabolismo de aminoácidos, plegamiento de proteínas, respuestas antioxidantes y apoptosis. ATF4 es un regulador positivo de genes esenciales de la UPR como *chop/gadd153* (Chen et al., 2005) y *bip/grp78* (Luo et al., 2003). CHOP/GADD153 es una pequeña proteína nuclear que dimeriza con miembros de la familia de factores de transcripción C/EBP (Ron and Habener, 1992). En condiciones normales es indetectable. Ésta es expresada a altos niveles cuando las células son expuestas a condiciones que perturban el plegamiento proteico en el RE



**Figura 2. La respuesta a proteínas mal plegadas.** La acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE gatilla una reacción de estrés conocida como la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). En células bajo condiciones de estrés de RE, la activación del sensor de estrés PERK incrementa los niveles del factor de transcripción ATF4 que favorece la expresión de *chop/gadd153*, el que se relaciona con el metabolismo de aminoácidos, respuesta antioxidante y apoptosis. Por otro lado, la autofosforilación de IRE1 lleva a la activación de su actividad endonucleasa. Esta actividad media el procesamiento del ARNm de *Xbp-1*, cuyo producto proteico es un factor de transcripción que regula positivamente genes relacionados con la UPR, incluyendo genes relacionados con plegamiento, biogénesis de organelos y proteínas de control de calidad de proteínas. Por otro lado, una tercera vía es iniciada por ATF6, una proteína transmembrana de RE tipo II que contiene en un dominio un factor de transcripción tipo bZIP. La activación de ATF6 gatilla el clivaje de este dominio ( $\Delta$ ATF6), favoreciendo su actividad como factor de transcripción, el que regula la expresión de algunas chaperonas de RE.



(Wang et al., 1998). BiP/Grp78 es una chaperona que en condiciones normales interactúa con los sensores de la UPR (Bertolotti et al., 2000) y que en condiciones de estrés de RE se disocia de los sensores y a su vez se ven aumentados sus niveles de expresión (Hetz et al., 2007). Además, la expresión de *chop/gadd153* induce la transcripción de proteínas pro-apoptóticas como *bim* (Lin et al., 2007; Marciniak et al., 2004; McCullough et al., 2001).

(ii) Por otra parte, bajo condiciones de estrés del RE, ATF6 dimeriza y luego es transportado al aparato de Golgi donde es procesado por las proteasas S1 y S2, liberándose al citoplasma un fragmento que funciona como un factor de transcripción activo, el cual posteriormente se transloca al núcleo induciendo la expresión de genes que presentan secuencias ERSE (Elementos de Respuesta a Stress del RE) en sus secuencias promotoras, tales como los que codifican a algunas chaperonas del RE como BiP/Grp78, Grp58, Grp94 y el factor de transcripción XBP-1 (X-Box binding protein-1) (YanJun and Hendershot, 2001), las cuales favorecen el correcto restablecimiento del plegamiento de las proteínas mal plegadas producto del estrés de RE.

(iii) IRE1 es el sensor de estrés de RE más conservado en la evolución y contiene un dominio serina-treonina quinasa en su región citoplasmática, seguido por un dominio con actividad endorribonucleasa (Cox and Walter, 1996; Gonzalez and Walter, 2001; Shamu and Walter, 1996; Shamu and Walter, 1996; Sidrauski and Walter, 1997). Se han descrito dos isoformas de IRE, denominadas IRE1 alfa (IRE1 $\alpha$ ) expresada en forma ubicua e IRE1 beta (IRE1 $\beta$ ) expresada en el epitelio intestinal, siendo IRE1 $\alpha$  la más estudiada. La activación de IRE1 $\alpha$  también depende de su dimerización y

fosforilación. Este evento de fosforilación gatilla su actividad endorribonucleasa, iniciando el procesamiento no convencional del ARNm que codifica para el factor de transcripción *Xbp-1* (Calfon et al., 2002). En células de mamífero, la remoción de 26 nucleótidos de un intrón del ARNm de *Xbp-1* produce un cambio en el marco de lectura que convierte la proteína traducida inicialmente de 267 aminoácidos (XBP-1u) en la forma procesada de XBP-1 (XBP-1s), de 371 aminoácidos y que contiene el dominio original de unión a ADN, más un potente dominio de transactivación en el extremo C-terminal del ARNm de *Xbp-1*. XBP-1s es un factor de transcripción bZIP que regula múltiples genes de la UPR (Figura 2) (Lee et al., 2003). Funcionalmente, XBP-1 es un participante esencial en la respuesta adaptativa a las condiciones de estrés de RE debido a que ésta media a la regulación positiva de genes asociados al plegamiento, la secreción, la biogénesis del RE y Golgi, degradación de proteínas asociada al RE (ERAD), entre otras funciones (Matus et al, 2008; Hetz and Glimcher, 2008) (Figura 2). Varios genes involucrados exclusivamente en el ERAD requieren la vía IRE1/XBP-1 para su inducción, incluyendo genes como *edem*, *hrd1*, y *uggt*. Estudios recientes han propuesto que la activación prolongada de las vías de PERK promoverían la apoptosis, mientras que la activación de ATF6 e IRE1 $\alpha$  conducirían principalmente a adaptación celular y supervivencia (Wu et al., 2007; Lin et al., 2007, Lin et al., 2008, Lisbona et al., 2009).

### **3.6. La UPR y su rol en enfermedades neurodegenerativas**

Muchas enfermedades neurológicas tales como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la isquemia cerebral, están asociadas directa o

indirectamente a una disfunción del RE, lo que podría culminar en la muerte celular (Schroder and Kaufman 2005). Todas estas enfermedades presentan la característica de desórdenes de mal plegamiento de proteínas y acumulación de agregados proteicos en el cerebro (Matus et al., 2008). Se ha postulado también a la UPR como un mecanismo celular para restablecer la homeostasis frente a condiciones de estrés de plegamiento de proteínas producida en estas enfermedades. (Boyce and Yuan, 2006).

Existen antecedentes que asocian enfermedades de desorden siquiátricos con la activación de la UPR. A modo de ejemplo, se ha observado una relación genética entre un polimorfismo del promotor de *Xbp-1* y la ocurrencia de trastornos bipolares, esquizofrenia y trastornos de personalidad en Japón (Kusumi, 2005). Por otro lado, una evidencia directa que relaciona el estrés de RE con neurodegeneración es el caso de la caracterización del ratón mutante *Woody*, el cual presenta una mutación en una cochaperona de BiP/Grp78, gatillando disfunción neuronal asociada con la agregación espontánea de proteínas en el cerebro (Zhao et al, 2005). A pesar de existir una correlación clara entre varios desórdenes neurológicos y la activación de la UPR, el posible rol causal de la UPR en estas enfermedades no está claro. Es necesaria la manipulación genética o farmacológica de esta vía *in vivo* para así otorgar resultados confiables y potencialmente aplicables para una terapia (Galleguillos et al, 2009).

Recientemente, se ha postulado que los fenómenos de daño neuronal físico también podrían estar llevando a cabo esta respuesta (ver más adelante) (Paschen et al, 2003 y 2004), lo que postula a la UPR como un posible modulador de la respuesta celular a los efectos producidos por daño neurológico.

### 3.7. Antecedentes relacionando el estrés de RE y el daño neurológico.

Existen pocos trabajos que relacionen directamente la UPR con el daño neurológico, siendo los estudios publicados mayormente enfocados al análisis del cerebro, utilizando técnicas como la isquemia cerebral y el trauma por contusión. Paschen y cols, por ejemplo, estudiaron la expresión de *Xbp-1s* y de *bip/grp78* luego de realizar isquemia cerebral transiente, mostrando una clara inducción de estos marcadores (Paschen et al., 2004). Asimismo, los autores obtuvieron resultados similares en modelos de trauma cerebral por contusión (Paschen et al, 2003). En otro trabajo utilizando isquemia transiente frontal en el roedor gerbo, se obtuvo el mismo resultado, pero también describieron un aumento en los niveles transcripcionales y traduccionales de *chop/gadd153* (Oida et al, 2008), aumento no encontrado en el trabajo anterior. Otro trabajo utilizando la contusión en cerebro como modelo de daño, mostró un aumento de los niveles de las chaperonas BiP/Grp78 y Hsp70 en la zona afectada (Truettner et al, 2009).

Existen sólo cinco artículos publicados relacionando la UPR y el DME, siendo el más destacado el trabajo de Penas y cols, en donde, mediante uso de un modelo de contusión en las vertebras T7-T9 de ratas, se observó la activación transcripcional y traduccional de marcadores clásicos de UPR como el procesamiento de ATF6, la fosforilación de eIF2 $\alpha$  desde la primera hora después de HME, y el procesamiento del ARNm de *Xbp-1* desde las 6 horas después del HME (Penas et al., 2007). Además, se demostró la expresión de *chop/gadd153* a partir de las 6 horas post-DME en motoneuronas y en oligodendrocitos, no así en los astrocitos. En un artículo publicado por Aufenberg y cols se mostró un aumento en los niveles del ARNm de *Xbp-1s* a las 6 horas post-DME mediante un modelo de contusión. Resultados similares se

describieron mediante el uso del modelo de HME en la zona T11 (Aufenberg et al, 2005).

Estos estudios dan cuenta de la variabilidad de los sistemas experimentales, y de la importancia de la técnica de daño al sistema nervioso y el modelo animal a utilizar. Por ejemplo, en el caso de un daño inducido por contusión severa en la ME, las propias vértebras pueden producir la ruptura de los tractos neuronales, lo cual es muy difícil de evaluar. Ante esta problemática, el modelo de la HME aparece como un buen candidato como modelo experimental para estudiar el DME. Éste es un modelo práctico ya que al generar daño sólo hacia un costado de la ME, la discapacidad motora se puede producir sólo en una extremidad, dependiendo de la altura de la ME que se realiza el daño. Este fenotipo visual además es útil para verificar la correcta realización del protocolo quirúrgico por simple observación. El modelo de HME se ha utilizado comúnmente en gatos y ratas, y últimamente también ha sido utilizado en ratones (Zhang et al, 1998; Goldshmit et al, 2008).

El presente seminario de título pretende estudiar y caracterizar la posible participación de la UPR en la respuesta celular temprana frente al DME producido por la hemisección de ésta, utilizando como modelo ratones silvestres. Este trabajo, más bien metodológico, está pensando para estudiar en el futuro el potencial de la utilización de modelos genéticos para manipular la UPR *in vivo*, lo cual permitirá definir en más detalle un posible rol causal del estrés en el RE en esta patología, y así definir si la UPR es o no un blanco terapéutico interesante para tratar el DME.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar los niveles de activación de la UPR, en el tiempo y el espacio, luego de la hemisección a la médula espinal.

### **4.1. Objetivos Específicos**

- Desarrollar un modelo experimental de daño por hemisección de la médula espinal en ratones.
- Determinar los niveles de activación de marcadores de la UPR luego de una hemisección a la médula espinal en diferentes regiones de este tejido.
- Determinar la cinética de activación de la UPR en la médula espinal luego de efectuada una hemisección a este tejido.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Reactivos**

Las sales, ácidos, bases, detergentes, bromuro de etidio y solventes utilizados de grado analítico o de biología molecular, se obtuvieron en Merck y Sigma. La agarosa ultrapura-1000, ADN estándar, enzimas Taq ADN polimerasa, se obtuvieron de Invitrogen, New England Biolabs y Promega, respectivamente. El reactivo Micro BCA para cuantificar proteínas y sustrato para quimioluminiscencia se obtuvo en Pierce. Las películas fotográficas de radiografía se obtuvieron de Fuji. La enzima PstI y su respectivo Buffer se obtuvo de Fermentas. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-ATF4 (sc-200), anti-Bim (sc-8267), anti-CHOP/GADD153 (sc-7351), anti-Hsp90 (sc-7947) y anti-Ub (sc-8017), todos de Santa Cruz Biotechnology; anti-BiP/Grp78 (StressGene). Los anticuerpos secundarios conjugados a HRP se obtuvieron de Zymed.

### **5.2. Animales y daño por HME.**

Los ratones de la cepa C57BL/6j se utilizaron como modelo animal, usando machos y hembras indistintamente de 8 semanas y 25 g aproximadamente. Éstos provinieron del Vivero Central de la Pontificia Universidad Católica. Previo a la cirugía, la movilidad del animal se registró en video. Se utilizaron animales control sin ningún tipo de intervención más animales operados. Los animales operados se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de avertina (0,3 mg/g peso), la temperatura se controló a lo largo del procedimiento operatorio. Una incisión se realizó en la línea



media de la espalda del animal, exponiendo los procesos espinales a la altura de la vértebra torácica 12 (T12). Los músculos paravertebrales se separaron y se removieron tanto la apófisis espinosa como la lámina derecha para exponer la ME (laminectomía unilateral). Luego, el lado derecho de la ME se dañó transversalmente con una tijera de iridectomía (hemisección a la médula espinal, HME). Finalmente, el hueso extraído se reemplazó por gelita absorbente (Gelfoam®), el músculo se suturó y la piel se cerró con *clips* de metal. Los animales se mantuvieron bajo una fuente de calor controlado hasta la recuperación total de la anestesia de los ratones. Para el bienestar del animal, antibiótico (enrofloxacino 10%) y antiinflamatorio (ketoprofeno 2 mg/ Kg) se administró para el cuidado post-operatorio, sólo en los casos requeridos. Algunos ratones recibieron sólo la laminectomía, es decir, sin incluir la intervención con la tijera, estos corresponden a los ratones denominados *sham*.

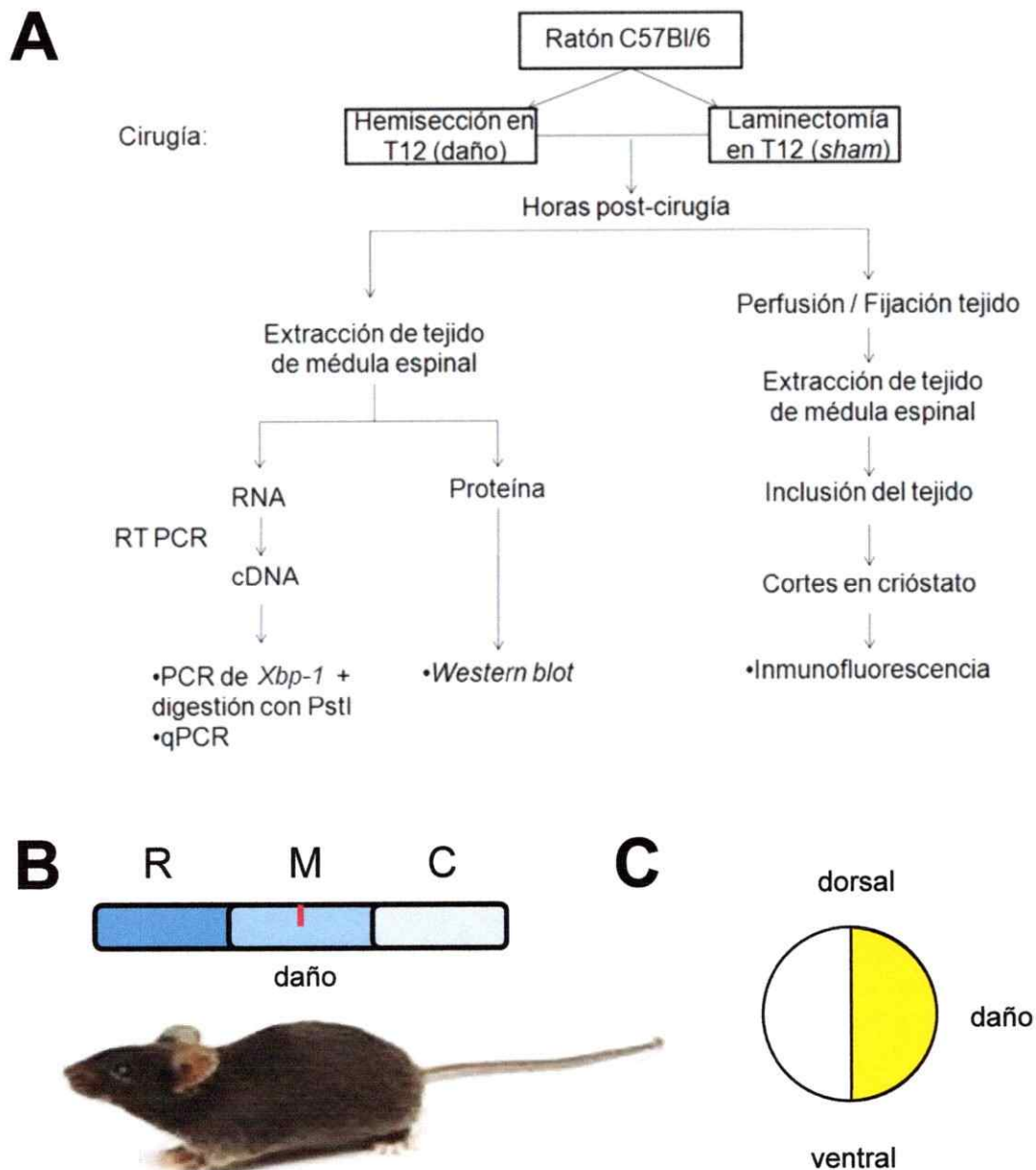
Según el tiempo que corresponda: 1, 3, 6, 12 y 24 horas post-cirugía, el animal se devolvió a la sala de operaciones. Se registró un video de su movilidad. Luego el animal se sacrificó con sobredosis de anestesia. Inmediatamente se llevó al mesón de operaciones donde se retiró la ME completa. La ME se dividió en 3 zonas, la zona rostral (R), la zona media, donde se realiza el daño (M); y la zona caudal (C). (Figura 3B). Los tejidos se traspasaron a tubos de 1,5 mL y éstos se congelaron inmediatamente en un termo que contiene nitrógeno líquido. Los tubos con tejidos se almacenaron a -20°C para su posterior análisis. Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con los procedimientos aprobados por el *Institutional Review Board's Animal Care and Use Committee of Harvard School of Public Health* (protocolo aprobado # 04137), la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (protocolo aprobado # 0208 FMUCH) y la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia

Universidad Católica de Chile. Como control positivo se utilizaron ratones los cuales recibieron una inyección intraperitoneal (IP) y directamente en la superficie de la zona Media de la médula, previa laminectomía, de tunicamicina (1µg/g peso).

### **5.3. Extracción de ARN, RT-PCR y PCR en tiempo real**

El tejido correspondiente a un tercio de la ME de ratón se homogenizó mecánicamente en 100 µL de solución PBS. Luego 50 µL de este volumen se trasladaron a un tubo nuevo el cual se utilizó para la extracción de ARN, el resto del volumen se utilizó para extracción de proteínas. El ARN total se preparó a partir de los extractos de la ME antes mencionados utilizando TRIzol<sup>®</sup> según el protocolo del fabricante. La concentración de ARN se midió con un espectrofotómetro (Jenway). 1 µg de ARN se cargó en un gel de agarosa al 1% preteñido con bromuro de etidio y el contenido fue separado por carga mediante 100 V para observar la calidad de la extracción observando las bandas correspondientes al ARN ribosomal. A partir de los ARN aprobados por el método de selección anterior, el ADNc se sintetizó con el kit *iScript cDNA Synthesis* de BIORAD con 1 µg de ARN, el siguiente programa se utilizó: 5 min a 25 °C, 45 min a 44 °C y 5 min a 85 °C.

Reacciones cuantitativas de PCR en tiempo real (qPCR) se realizaron utilizando el reactivo fluorescente SYBRgreen y la enzima ADN polimerasa GO Taq<sup>®</sup> Flexi (Promega) en un sistema ABI PRISM 7700 de Applied Biosystems. Las cantidades relativas de ARNm se calcularon a partir de los valores del ciclo umbral comparativo usando actina como control interno. Los partidores se diseñaron utilizando el software Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA) u obtenidos de la base de datos



**Figura 3. Esquema del procedimiento realizado para estudiar la UPR bajo condiciones de daño por HME. (A)** Los ratones silvestres de la cepa C57BL/6 se hemisectaron en la vértebra torácica 12 (T12). Los ratones *sham* (controles) sólo se sometieron a la laminectomía, es decir, exposición de la ME en la zona del daño, sin llegar a realizar la hemisección. Luego del tiempo definido se preparó el tejido según el experimento a realizar. **(B)** Esquema que muestra la división longitudinal de la ME para el posterior análisis, la cual fue dividida en 3 zonas: rostral (R); media (M); y caudal (C). La HME es realizada en M (Línea roja). **(C)** Esquema de un corte transversal de ME. En amarillo se muestra la zona donde se realiza la HME.

de partidores, BiP/Grp78: *sense* mBiP/Grp78 SN (5'-TCATCGGACGCACTTGGAA-3')  
*antisense* mBiP/Grp78 AS (5'-CAACCACCTTGAATGGCAAGA-3'); CHOP/GADD153:  
*sense* mCHOP/GADD153-SN-rt (5'-TGGAGAGCGAGGGCTTTG-3') *antisense*  
mCHOP/GADD153-AS-rt (5'-GTCCCTAGCTTGGCTGACAGA-3'); Grp58: *sense*  
mGrp58 (5'-GTTGGCAGTGCAATCCACC-3') *antisense* (5'-  
GAGGCTTGCCCCTGAGTATG-3'); Grp94: *sense* mGrp94 (5'-  
TGTATGTACGCCGCGTATTCA-3') *antisense* mGrp94 (5'-  
TCGGAATCCACAACACCTTTG-3'). Más información en  
<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>.

#### 5.4. Análisis de *Western blot*.

El resto del volumen de homogenizado de tejido se sonicó en *buffer* RIPA en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche). La concentración de proteínas se determinó mediante el ensayo Micro-BCA (Pierce) en un espectrofotómetro (Biotek instruments). El equivalente a 50µg de proteína total se cargó en geles de 8 o 12 % de poliacrilamida preparados según la necesidad (Laemmli, 1970).

Los siguientes anticuerpos y diluciones se utilizaron: anti-ATF4 1:2000, anti-Bim 1:1000, anti-CHOP/GADD153 1:2000, anti-BiP/Grp78 1:2000, anti-Ub 1:4000. Los anticuerpos secundarios conjugados a HRP se utilizaron a una dilución de 1:4000.

### 5.5. Ensayo de PCR de *Xbp-1* más digestión con PstI

Una PCR para *Xbp-1* total se realizó a partir del ADNc proveniente de ratones operados a 3 y 6 horas post-cirugía, utilizando los partidores *sense* mXBP1.3S (5'-AAACAGAGTAGCAGCGCAGACTGC-3') y *antisense* mXBP1.2AS (5'-GGATCTCTAAACTAGAGGCTTGGTG-3') utilizando el siguiente programa: 4 min a 94°C; 30 seg a 94°C, 1 min a 55°C, 45 seg a 72°C, estos 3 últimos por 35 ciclos; finalmente 10 min a 72°C (Calfon et al., 2002). El producto amplificado fue de 600 pb. El producto de PCR se incubó a 37°C con 1 U de la enzima PstI (Fermentas) en Buffer O por 2 horas. Esta digestión se produce sólo en la variante no procesada de *Xbp-1* (*Xbp-1u*), por lo tanto esta forma se observó en un gel de agarosa como una banda de 300 pb. Transcurrido el tiempo de incubación, se inactivó la enzima incubando los tubos a 80°C por 10 minutos. Luego las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 1% preteñido con bromuro de etidio y se separaron por carga mediante electroforesis a 80 V. El análisis densitométrico se normalizó con un control de PCR de actina en su tasa de amplificación máxima (comprobado por qPCR), el cual fue el ciclo 28 (dato no mostrado). Los partidores para actina fueron *sense* mActin actb 1083rt (5'-CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT-3') y *antisense* mActin actb 987rt (5'-TACCACCATGTACCCAGGCA-3'). Las imágenes se registraron con el *software* Quantity One de Biorad y se analizaron para densitometría por el *software* ImageJ (Wayne Rasband, NIH, USA).

El análisis estadístico que se realizó: prueba *t* de Student pareado o ANOVA de una vía más un post-test de Student-Newman-Keuls cuando se estimó necesario.

## **5.6. Análisis de tejido de la ME.**

Luego de 6 horas post-DME, los ratones se anestesiaron, perfundieron con PBS 0,1 M y finalmente se fijaron por perfusión con una solución de paraformaldehído 4% en PBS 0,1 M. La ME se extrajo (aproximadamente 3 cm que comprenden desde el segmento cervical 1 (C1) hasta el segmento lumbar 6 (L6)), la cual se fijó a una barra de cera de dentista para evitar que se curve, y se post-fijó por 1 hora. Los tejidos se criopreservaron en sacarosa 30%, y fueron posteriormente incluidos en O.C.T. Cuatro zonas de la ME se seleccionaron para estudios posteriores, sólo la zona media se utilizó en este trabajo. Cortes transversales de la ME de 15  $\mu$ m de grosor se realizaron en crióstato los cuales se montaron en portaobjetos y fueron congelados a -20°C para su posterior inmunotinción.

Los anticuerpos utilizados para la inmunofluorescencia en tejido fueron anti-CHOP/GADD153 1:100 (Santa Cruz) y anti-KDEL 1:500 (Stressgen). Los anticuerpos secundarios utilizados estaban conjugados a fluoróforos Alexa (Molecular Probes) para su posterior análisis mediante microscopía confocal.

## RESULTADOS

### 6.1. Validación del modelo: HME en ratones

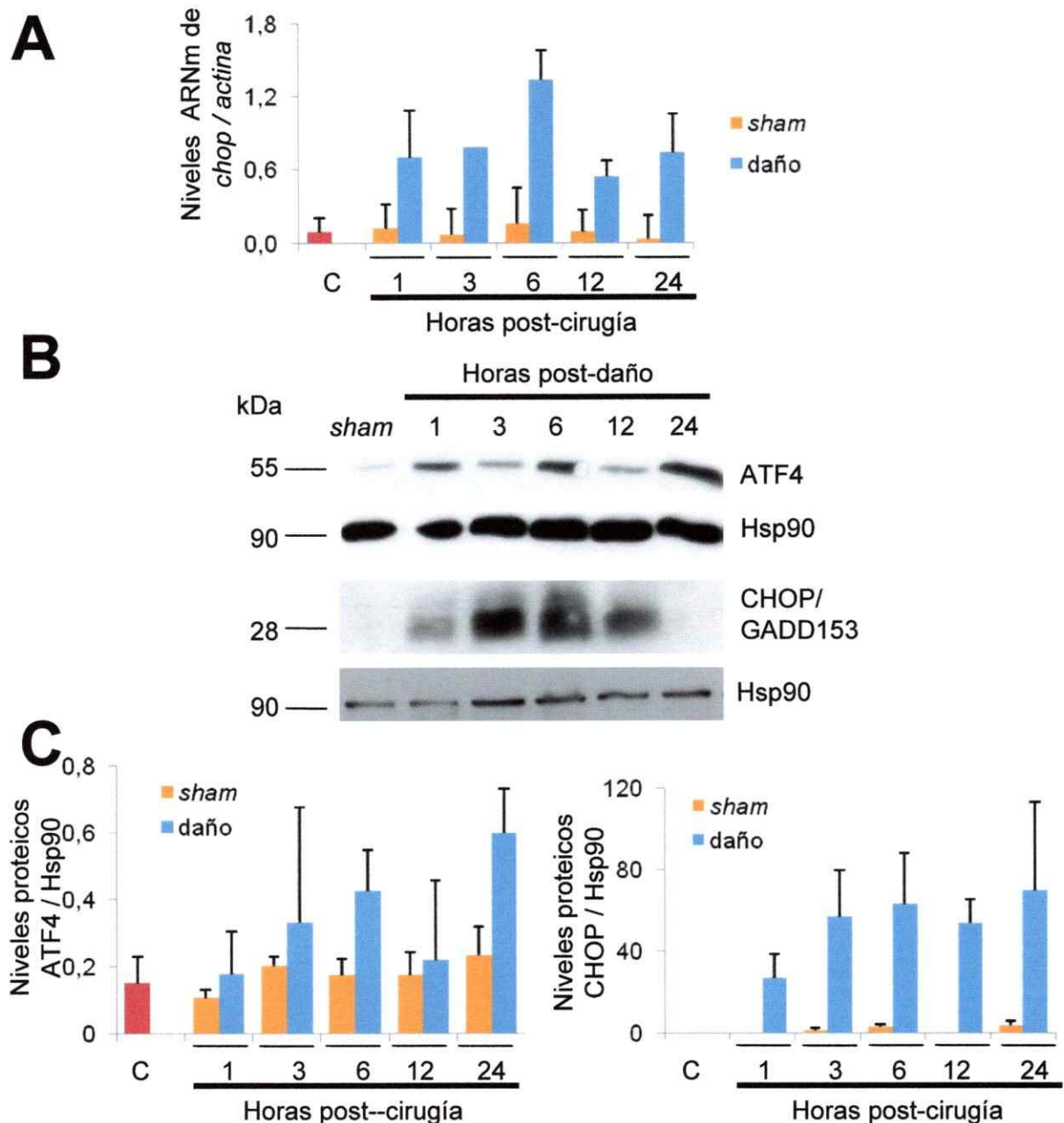
Primeramente el método de la HME se validó en nuestro laboratorio. Para esto, la técnica se realizó bajo la supervisión de Eileen Collyer y el Dr. Felipe Court, quienes manejan el modelo. Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurobiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica. Se realizaron dos series de lesiones: en la primera una hemisección de 15 ratones C57BL/6 se realizó, y se colectó la ME a distintos tiempos post-HME: 1, 3, 6, 12 y 24 horas, (N=3), más los animales controles *sham* correspondientes. En la segunda serie, se realizaron 12 DME y se colectó el tejido a 3 y 6 horas post-cirugía, más sus controles *sham*, haciendo un total de 27 lesiones efectivas. La movilidad de los ratones se registró en video antes y después de la cirugía, es decir, al momento previo de ser sacrificados (material adicional). Los videos se analizaron y se corroboró una reproducibilidad del método. En una HME realizada correctamente, la inmovilidad de la pata posterior derecha y una movilidad normal del resto de las patas se apreció perfectamente (material adicional). Dos tipos de lesiones no adecuadas experimentalmente se observaron: el DME completo, en donde el ratón dejó de mover completamente las 2 patas posteriores; y el DME incompleto, en donde el animal pudo mover su pata trasera derecha (ver material adicional). De acuerdo a estos parámetros, se obtuvo una eficiencia de 81,4% de HME con este método quirúrgico. El resto correspondió a un 14,8% de DME completa y 3,7% de DME incompleta. En conclusión, se logró establecer un método detectable y reproducible de la HME en ratones en el laboratorio utilizando ratones como modelo. Además, como se aprecia en los videos, los animales *sham* no presentaron variaciones



en la movilidad con respecto a un animal control. De hecho, no se apreciaron diferencias evidentes en los niveles de expresión de los marcadores de la UPR a estudiar entre ratones *sham* y ratones sin tratamiento (dato no mostrado) como ya se ha comprobado en otros trabajos (Penas et al., 2007).

## **6.2. Expresión temporal de *chop/gadd153* y *Atf4* después de la HME**

Como primer paso en el estudio de marcadores de estrés de RE bajo condiciones de HME, decidimos determinar la expresión de dos marcadores clásicos de la UPR que están relacionados con la vía PERK, CHOP/GADD153 y ATF4. Este análisis se realizó, a distintos tiempos post-HME incluyendo 1, 3, 6, 12 y 24 horas mediante *Western blot* y utilizando extractos totales de proteínas derivadas de la ME. Después del tiempo post-HME, la ME se dividió en 3 zonas, la rostral (R), la zona media, la cual es la zona donde se realiza el daño (M), y la zona caudal (C). Esta distribución se esquematiza en la figura 3B. Las muestras de tejido luego se analizaron en el Laboratorio de Estrés Celular y Biomedicina de la Universidad de Chile para el análisis Bioquímico y Molecular. Una extracción de ARN y de proteínas de la misma muestra de tejido se realizó, y se analizó por medio de RT PCR y posterior qPCR. Los resultados indican que los niveles del ARNm de *chop/gadd153* son incrementados a partir de una hora después del DME (Figura 4A) con respecto a animales *sham*. Este resultado se corroboró mediante el análisis de los niveles de expresión proteico de *chop/gadd153*, en donde también la expresión de esta proteína se observó a partir de transcurrida la primera hora post-HME, alcanzando niveles de expresión similares en el resto de los tiempos estudiados (Figura 4B). La figura sólo muestra un ratón *sham*,



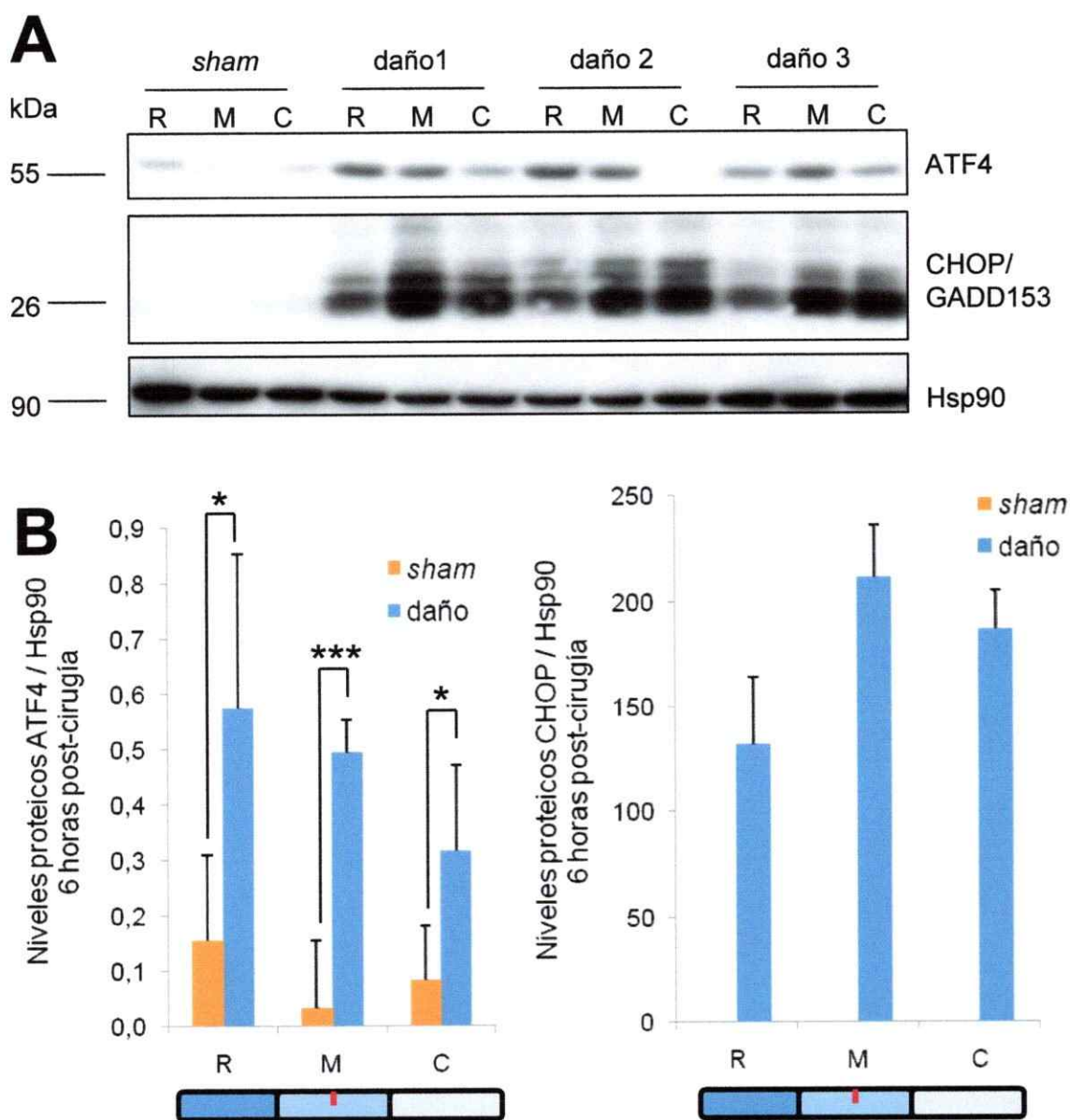
**Figura 4. Expresión temporal de *Atf4* y *chop/gadd153* luego de daño por HME.** Para determinar los niveles de expresión de *Atf4* y *chop/gadd153*, se operaron ratones, *sham* y hemisectados, y luego se colectaron tejidos a 1, 3, 6, 12 y 24 horas post-cirugía. Los tejidos se procesaron para observar niveles de ARN y proteínas. (A) La expresión relativa del ARNm de *chop/gadd153* se analizó en el tiempo después de HME mediante PCR cuantitativo utilizando ADNc total. Los datos representan el promedio y desviación estándar de una muestra en duplicado. Los niveles de expresión están normalizados con la expresión de actina. (B) Análisis de *Western blot* mostrando una cinética de los niveles relativos de las proteínas ATF4, CHOP/GADD153 y Hsp90. (C) Las intensidades de las bandas de las proteínas ATF4 y CHOP/GADD153 de todas las muestras analizadas en triplicado, se cuantificaron y normalizaron respecto a la intensidad de la proteína control Hsp90 para determinar la variación de la expresión. Se utilizó como control negativo tejido de ME de ratones sin ningún tipo de intervención (letra C).

pese a esto, éste resultado es representativo de un total de 15 ratones control (datos no mostrados). Para el caso de *Atf4*, se obtuvo una cinética de expresión bastante variable, siendo los datos de la figura 4B los más representativos encontrados. Aún así, un aumento considerable de este marcador es apreciado a partir de la primera hora post-HME. Ambas cinéticas de expresión se cuantificaron por densitometría, cuyos valores confirman la interpretación anterior (Figura 4C). Debido a que se obtuvo niveles de activación de la UPR, decidimos analizar en profundidad los tiempos correspondientes a 3 y 6 horas post-HME.

### **6.3. Expresión espacial de *chop/gadd153* y *Atf4* bajo condiciones de HME.**

La expresión de *chop/gadd153* y *Atf4* se comparó en la zona media (la zona del daño) con respecto a otras zonas de la ME. Para esto se realizó *Western blot* de extractos proteicos de ME de ratones operados luego de 6 horas comparados con ratones *sham*, pero esta vez se analizaron proteínas de las 3 zonas de la ME antes descritas. La figura 5A muestra que la expresión de *Atf4* se concentra en la zona rostral y la del daño en comparación con la zona caudal, no así para el marcador CHOP/GADD153, el cual se concentró en la zona media, y además en la zona caudal. El análisis densitométrico de las bandas proteicas confirmó esta localización espacial diferenciada de ATF4 y CHOP/GADD153 (Figura 5B).

Para profundizar el análisis de la distribución espacial de CHOP/GADD153, una inmunofluorescencia se realizó utilizando un anticuerpo contra este marcador en cortes transversales de ME en la zona media. Análisis de muestras 6 horas post-HME permitieron observar la presencia de CHOP/GADD153 en la zona cercana a la del



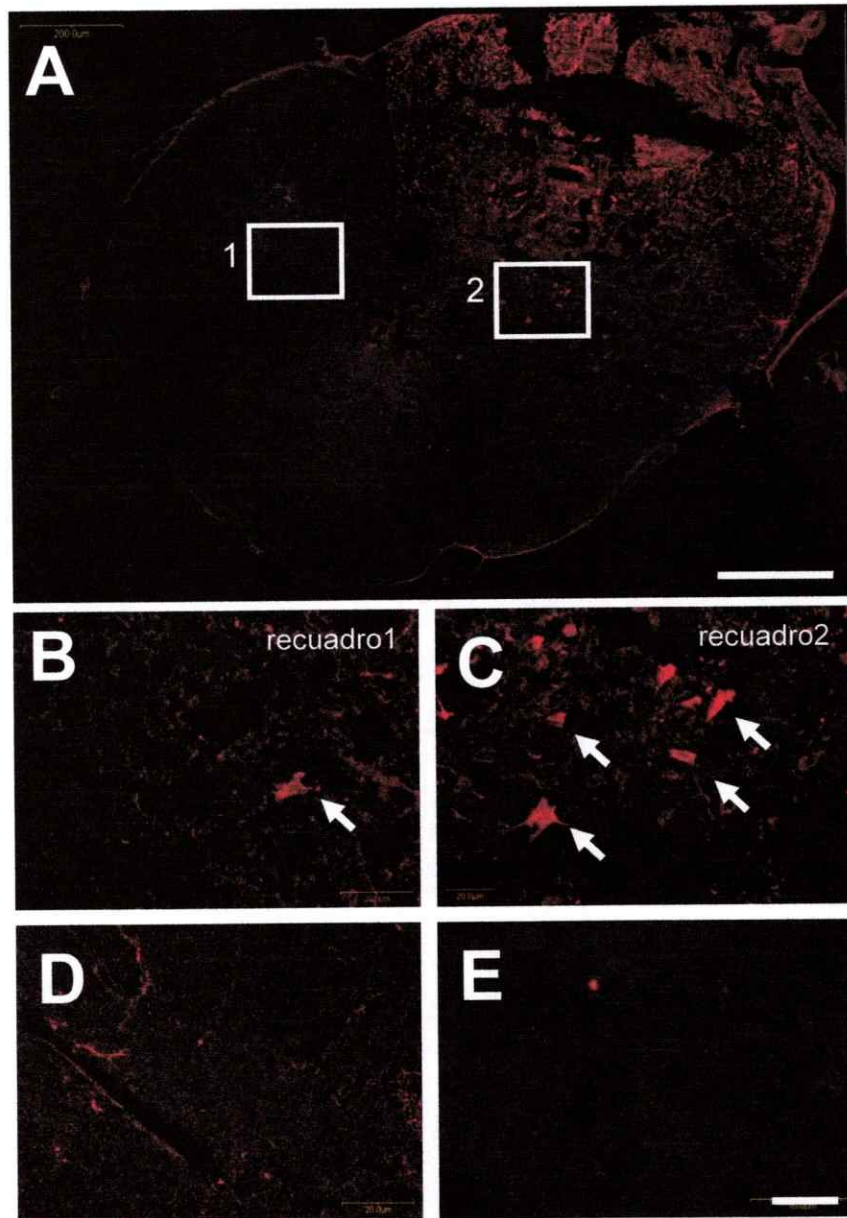
**Figura 5. Expresión espacial de *chop/gadd153* y *Atf4* a 6 horas después de daño por HME.** Ratones se operaron en la T12 (daño y *sham*) y la ME se colectó 6 horas post-cirugía. Las ME se dividieron en 3 zonas: rostral (R), media (M) y caudal (C) para el posterior análisis. El tejido se procesó para obtener proteínas y realizar *Western blot*. (A) El patrón de expresión de las proteínas ATF4, CHOP/GADD153 y Hsp90 se analizó a lo largo de la ME mediante *Western blot* luego de 6 horas post-HME de 3 ratones post-HME. (B). Las intensidades de las bandas correspondientes a las proteínas ATF4 y CHOP/GADD153 se cuantificaron y normalizaron con la expresión del control Hsp90 para determinar la variación de la expresión. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de 3 muestras por grupo. Se realizó test t de Student. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .

daño (lado derecho, figura 6A) comparado al lado no lesionado (izquierdo), en el cual se observa algo de marcaje.

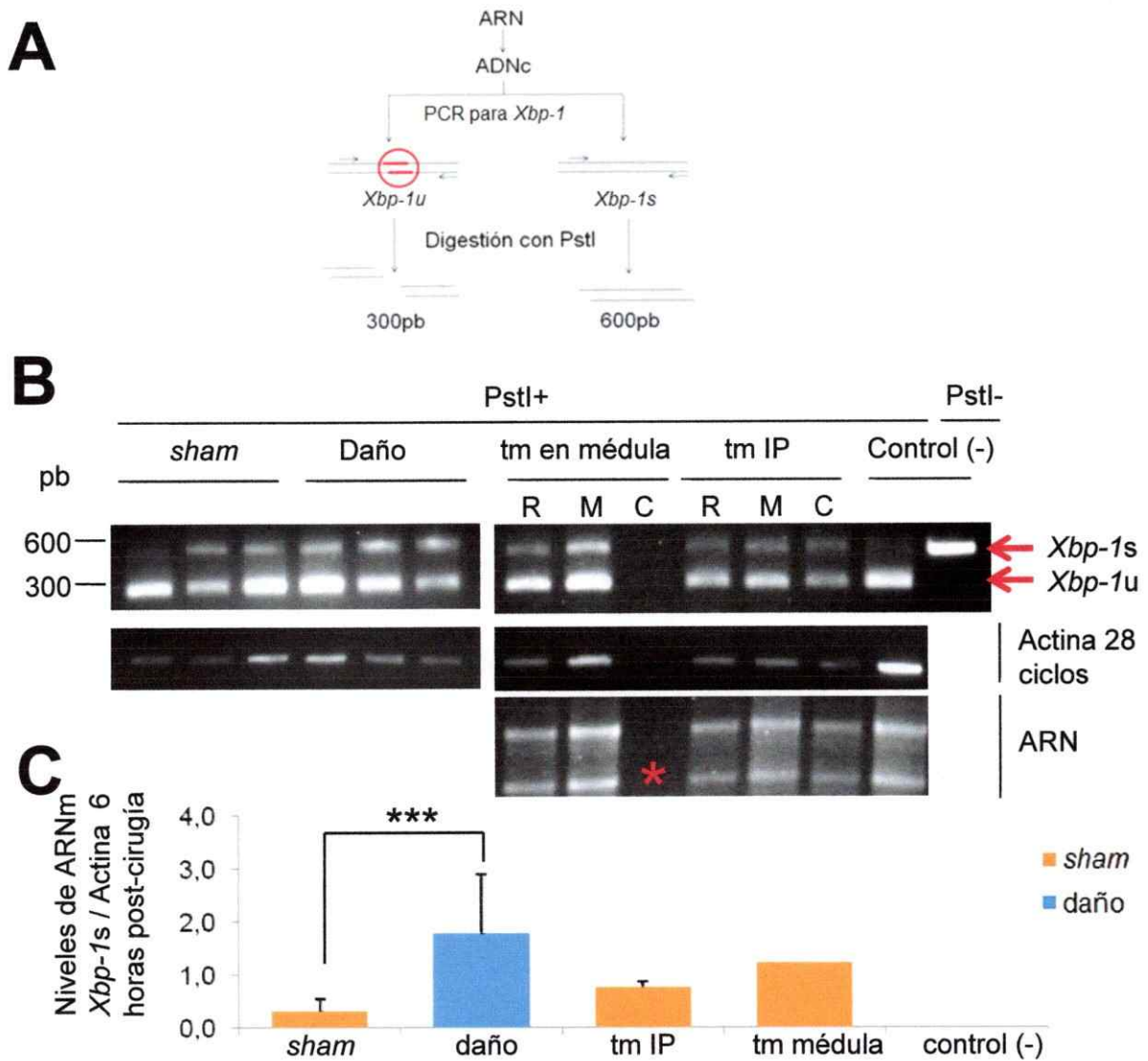
#### **6.4. Procesamiento del ARNm de *Xbp-1* luego de HME**

Para corroborar la activación de la UPR en condiciones de HME, decidimos estudiar la vía IRE1 mediante el monitoreo del procesamiento alternativo del ARNm del factor de transcripción *Xbp-1*. Publicaciones anteriores mostraron que los niveles de del ARNm de *Xbp-1* bajo estrés de RE en tejidos son bastante bajos (Penas et al, 2007). En nuestros experimentos, una variante del ensayo antes citado se realizó para observar el procesamiento del ARNm de *Xbp-1*, el cual utiliza un par de partidores que amplifican indistintamente las formas del ADNc de *Xbp-1* (Calfon et al, 2002). Luego de la amplificación se realizó una digestión de los amplicones con la enzima de restricción PstI, la cual sólo corta el ADNc correspondiente a la variante no procesada de *Xbp-1*, *Xbp-1u*, dejando fragmentos de 300 pb para esta variante. Por otro lado, el ADNc correspondiente a la forma procesada, *Xbp-1s*, es resistente al corte por la enzima, conservando los 600 pb (Figura 7A). El ensayo de *splicing* antes mencionado se realizó para muestras de ratones de luego de 6 horas post-cirugía, observándose un aumento importante de la variante procesada en los ratones hemisectados con respecto al control *sham*. Como control positivo se utilizó ARN proveniente de un ratón que fue inyectado de forma directa en la superficie de la zona media de la ME con tunicamicina (1 µg/g peso), más otro ratón que se le inyectó tunicamicina (1µg/g de peso) intraperitoneal (IP). (Figura 7B). Luego de 6 horas de tratamiento, los animales se sacrificaron para analizar los niveles de expresión de marcadores de UPR en la ME.





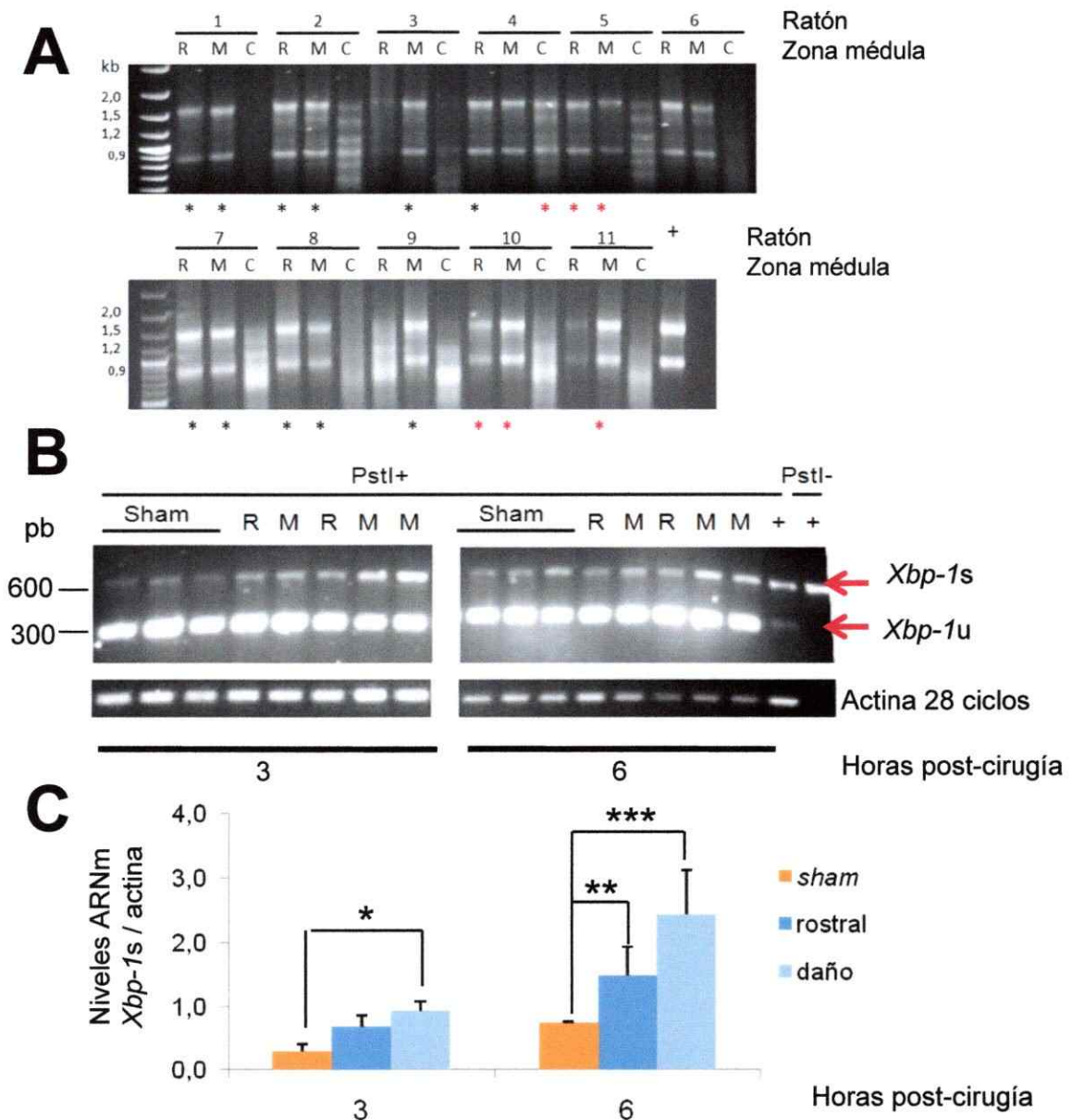
**Figura 6. Distribución de CHOP/GADD153 en la ME luego de 6 horas transcurrido el daño por HME.** Ratones silvestres se operaron y sacrificaron 6 horas post-cirugía, para luego perfundir y fijar la ME. La zona media (M) se seleccionó para el análisis, incluyó y laminó transversalmente en un crióstato. Los cortes se inmunomarcaron con anticuerpo anti-CHOP/GADD153 y se observaron por microscopía confocal. (A) Corte transversal de la zona media de la ME de un ratón silvestre dañado por HME 6 horas post-daño inmunomarcado con un anticuerpo anti-CHOP/GADD153. Los recuadros corresponden a las dos figuras siguientes. Barra 200  $\mu\text{m}$ . (B) y (C) Imágenes mostrando ampliaciones de los recuadros 1 y 2 de la imagen (A), donde (C) corresponde al lado donde se produjo la HME. Las flechas indican células positivas para el marcador. (D) Imagen representativa de corte transversal de ME de animal *sham* inmunomarcado con un anticuerpo anti-CHOP/GADD153. (E) Imagen representativa de control con sólo anticuerpo secundario. Barra equivalente para imágenes B, C, D y E: 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 7. Procesamiento alternativo del ARNm de *Xbp-1* frente a daño por HME.** (A) Esquema que muestra la metodología experimental utilizada para determinar los niveles de procesamiento del ARNm de *Xbp-1*. Mediante PCR se amplificó un fragmento del ADNc de *Xbp-1* flanqueando la zona de corte por IRE1. Luego el producto de PCR se digirió con la enzima de restricción PstI, la cual sólo digiere la forma no procesada del ADNc de *Xbp-1* (en círculo rojo), obteniéndose en un gel 2 bandas diferenciables las cuales corresponden a las dos formas de *Xbp-1*. (B) Resultado del ensayo de RT-PCR de *Xbp-1*. Ratones silvestres fueron operados, sham o hemisectados (daño) y luego de 6 horas se extrajo el ARN y se sintetizó ADNc. Luego se realizó el ensayo de procesamiento alternativo de *Xbp-1*. Como control positivo se inyectaron ratones con tunicamicina (1 µg/g) en la superficie de la zona media de la ME, o ratones con inyección intraperitoneal de tunicamicina (1 µg/g). Se observaron las 3 zonas de la ME de estos ratones. Se utilizó como control de expresión del gen de actina a 28 ciclos y como control negativo (-) células MEF sin tratamiento. El asterisco rojo señala un resultado no esperado de la extracción de ARN. (C) La intensidad de la banda correspondiente a *Xbp-1s* se cuantificó y se normalizó con la intensidad de la banda de un PCR de actina a 28 ciclos. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de 3 muestras por grupo. Se realizó test t de Student. \*\*\*,  $p < 0,001$ .



En estos controles se observó que los niveles de aumento del procesamiento del ARNm de *Xbp-1* producto del tratamiento con un inductor clásico de estrés de RE como es la tunicamicina, fueron similares a los observados por HME. Incluso, la HME provocó un nivel mayor de activación de la UPR que el tratamiento con tunicamicina. Para realizar el análisis de la expresión espacial del procesamiento de *Xbp-1* en la ME después de la cirugía, se comprobó que las extracciones de ARN fuesen óptimas. Para esto, 1 µg de ARN obtenido de las 3 zonas antes descritas de la ME se analizó por electroforesis en geles de agarosa comparando muestras de 11 ratones luego de 3 y 6 horas post-HME, para observar las bandas de ARN ribosomal esperadas. En general se comprobó que las extracciones de ARN fueron exitosas, salvo en el caso de la zona caudal al daño (C), la cual no presentó el patrón electroforético esperado (Figura 8A). Se sintetizó el ADNc a partir del ARN para luego realizar el ensayo de procesamiento del ARNm de *Xbp-1* en las muestras marcadas con asterisco. Un aumento de aproximadamente 2 veces de ARNm de *Xbp-1s* se observó en los ratones dañados con respecto a los controles *sham*. Asimismo, un aumento de los niveles de la forma procesada del mARN de *Xbp-1* fue observada en la zona media con respecto a la zona rostral (Figura 8B). Estos experimentos se cuantificaron por densitometría de las bandas de PCR normalizando con los niveles de amplificación de actina para cada muestra, mostrando un aumento importante en los niveles de procesamiento del ARN de *Xbp-1* luego del DME (Figura 8C).

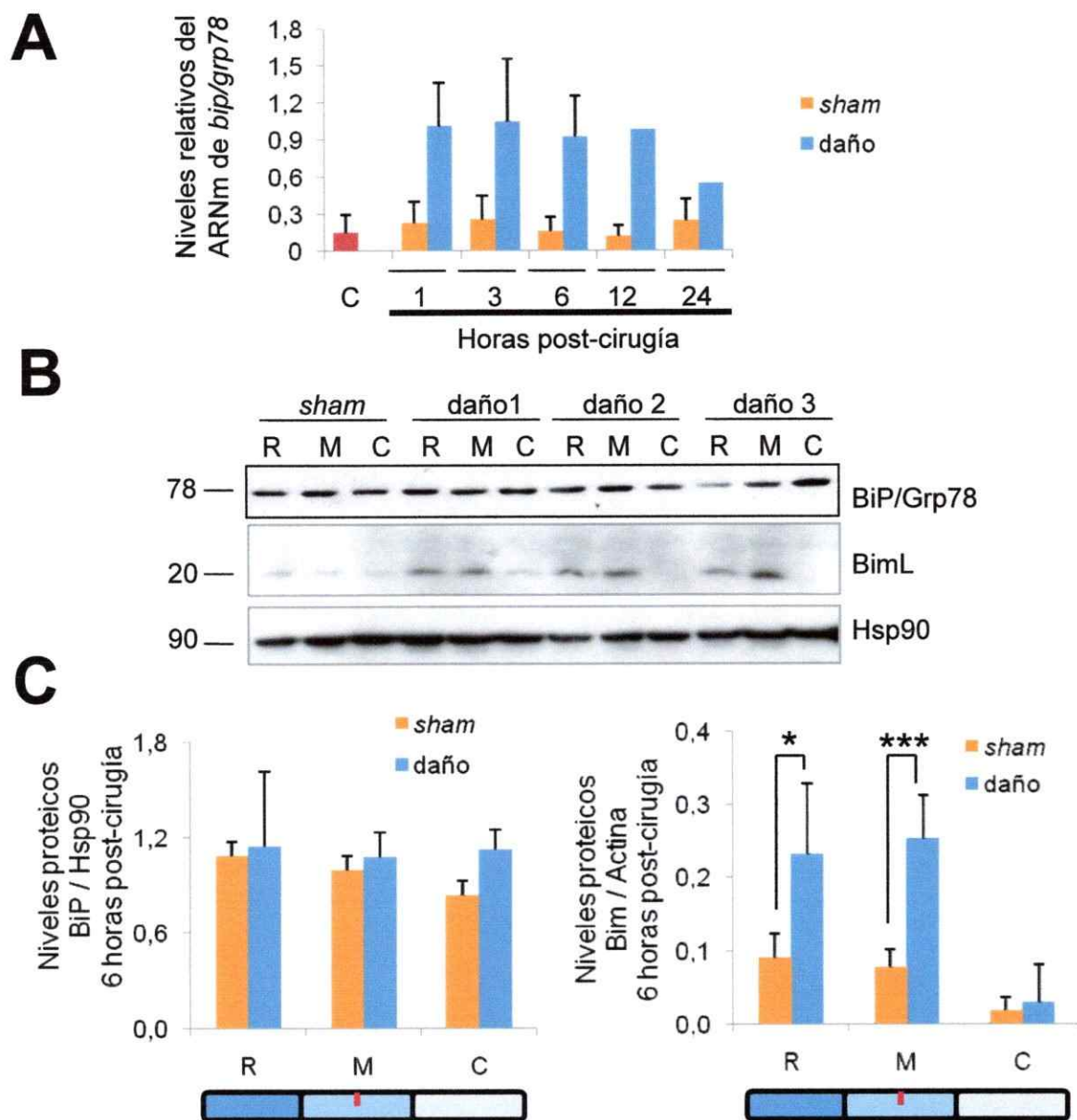


**Figura 8. Procesamiento alternativo de *Xbp-1* en distintas zonas de la ME frente a daño local por HME.** Ratones silvestres se operaron en la T12 (daño y *sham*). Luego del tiempo indicado, se retiró la ME para procesar el tejido y extraer el ARN. (A) Demostración de la extracción de ARN. 1  $\mu$ g de ARN se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa para comprobar la calidad de la extracción. El ARN de 11 ratones extraídos de 3 zonas de la ME se muestra en el análisis: rostral (R); media (M) y caudal (C). Las bandas corresponden a ARN ribosomal. Los asteriscos indican las muestras que fueron seleccionadas para el ensayo de RT-PCR para monitorear el procesamiento del ARN de *Xbp-1*. Los asteriscos rojos corresponden las muestras seleccionadas de ratones *sham*. (B) Las muestras seleccionadas anteriormente se utilizaron para realizar el ensayo de RT-PCR para monitorear el procesamiento del ARN de *Xbp-1*. (C) Las intensidades de las bandas de *Xbp-1s* se cuantificaron y normalizaron respecto al control de expresión de actina. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de las muestras seleccionadas anteriormente. Se realizó test de ANOVA de una vía más post-test Student-Newman-Keuls. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .

## 6.5. Expresión de chaperonas del RE y del factor pro-apoptótico Bim en la ME 6 horas post-HME.

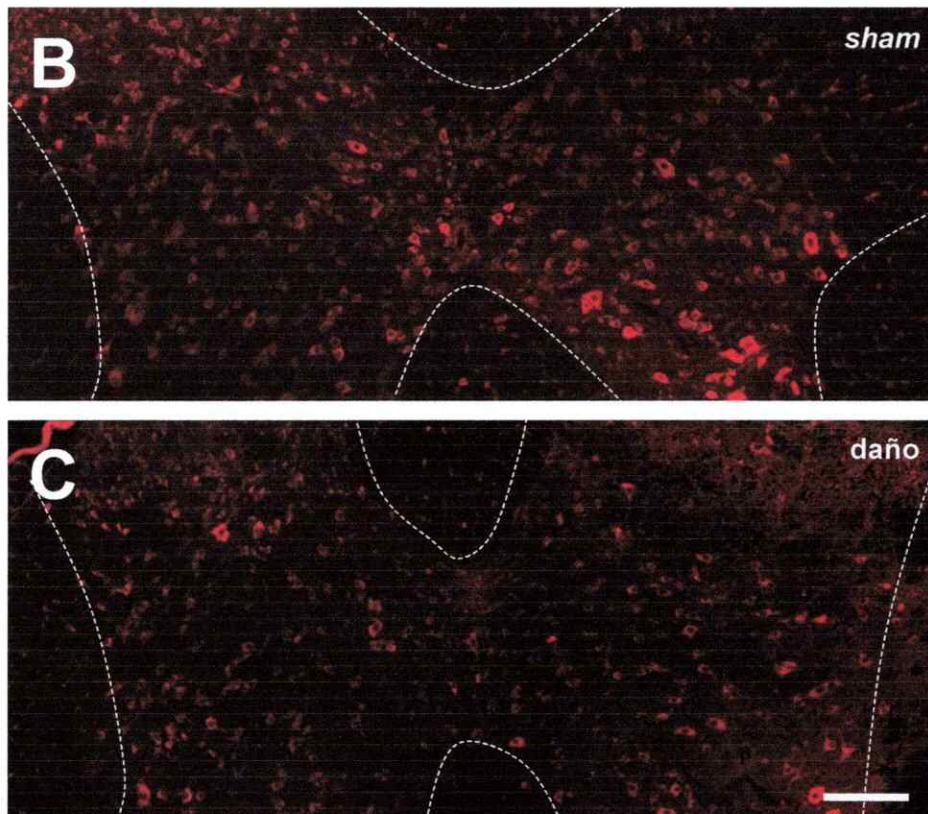
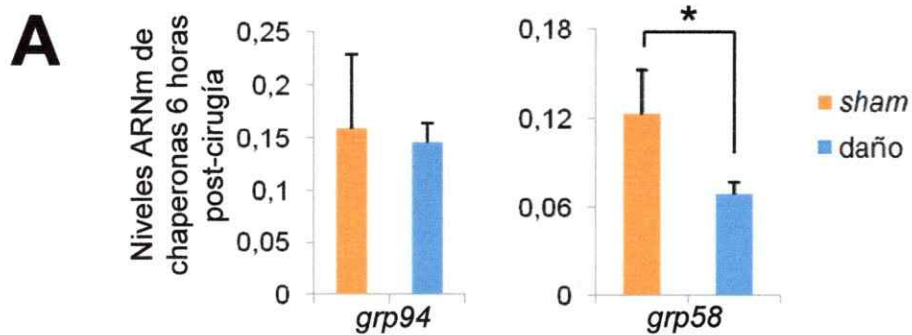
El aumento de la forma procesada del ARNm de *Xbp-1* y/o la activación de la expresión de *Atf4* y *Xbp-1* podrían dar cuenta de un aumento en los niveles de expresión de chaperonas como *bip/grp78*, *grp94* o *grp58*. Estudios por PCR cuantitativo indican un aumento relevante en los niveles transcripcionales de *bip/grp78* (Figura 9A). Además, se realizó RT qPCR para observar los niveles transcripcionales de las chaperonas *grp94* y *grp58* (Figura 10A), donde no se observó variación de los niveles de expresión de los niveles de *grp94*, y una disminución considerable en los niveles de ARNm de *grp58*. Por otro lado, a pesar de observar una clara inducción del promotor de *bip/grp78* luego del DME, no se encontraron diferencias evidentes en la expresión de BiP/Grp78 mediante análisis de *Western blot* entre las distintas zonas de la ME luego de transcurridas 6h post-cirugía (Figura 9B-C).

Para confirmar estos resultados, se realizó inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo anti-KDEL, el cual reconoce un epítipo presente en chaperonas como BiP/Grp78 y Grp94 (Figuras 10B-C). Como es de esperar, a las 6h post-DME no se apreció un aumento en los niveles de expresión de estas chaperonas en animales controles (Figura 10B) con respecto a un animal sometido a HME luego de 6 horas post-operación (Figura 10C), tampoco se encontraron diferencias evidentes entre el lado izquierdo y derecho (dañado) del animal hemisectado.



**Figura 9. Expresión de blancos transcripcionales de la UPR frente al daño por HME.** R ratones silvestres se operaron en la T12 (daño y *sham*) y la ME se colectó a distintas horas post-cirugía. La ME se dividió en 3 zonas: rostral (R), media (M) y caudal (C) para el posterior análisis. El tejido se procesó para obtener proteínas y ARN. (A) Niveles de expresión relativa del ARNm de *bip/grp78* obtenidos mediante RT qPCR a distintas horas post-HME. Los datos representan el promedio de una muestra en duplicado. Como control negativo se utilizó un ratón sin ningún tipo de intervención (Letra C). (B) Los niveles relativos de las proteínas BiP/Grp78 y BimL se analizaron mediante *Western blot* utilizando tres ratones dañados por hemisección y un ratón *sham*. (C) Las intensidades de las bandas de las proteínas de todas las muestras analizadas se cuantificaron y normalizaron con la expresión del control Hsp90 para determinar la variación de la expresión. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de 3 muestras por grupo. Se realizó test t de Student. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .



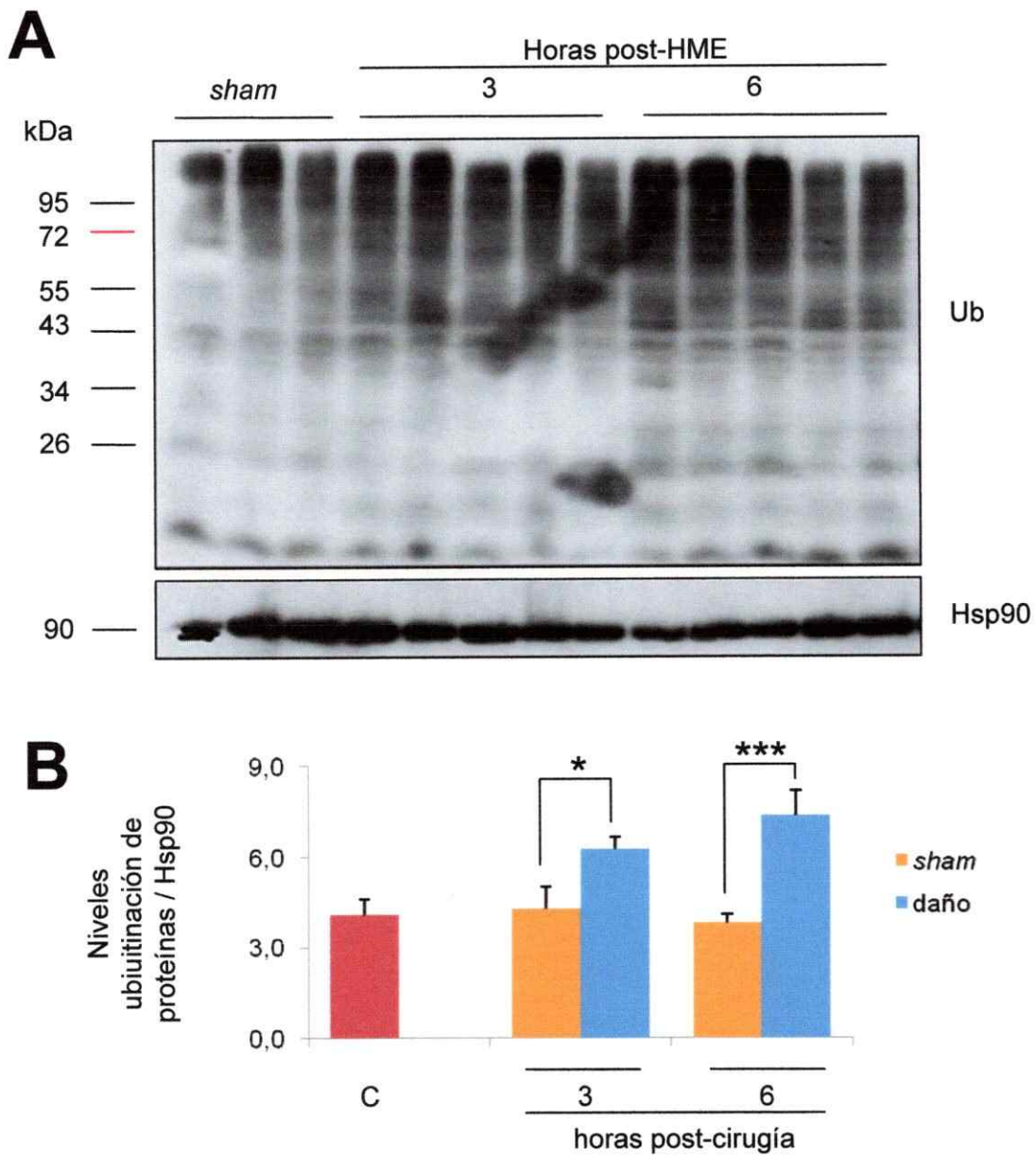


**Figura 10. Niveles de expresión de chaperonas de ratones frente al daño por HME.** Se realizó cirugía a ratones, *sham* y HME, y se colectaron tejidos a 6 horas post-operación. Por un lado, los tejidos se procesaron para observar niveles de ARN. El ARN fue convertido a ADNc para luego realizar qPCR. Por otro lado, otros ratones operados se perfundieron y fijaron 6 horas post-cirugía. Se retiró la zona de daño de la ME para incluirla y realizar cortes transversales mediante el uso de un crióstato. Los cortes de tejido se inmunomarcaron con un anticuerpo anti-KDEL y luego observados por microscopía confocal. (A) Los niveles relativos del ARNm de *grp94* y *grp58* de 3 ratones se analizaron por qPCR luego de la HME más 6 horas post-cirugía. Los datos representan el promedio y desviación estándar de una muestra en duplicado. Se realizó test t de Student. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . (B) y (C) Inmunofluorescencia utilizando anticuerpo anti-KDEL de un animal *sham* y otro de 6 horas post-HME. El daño fue realizado en el lado derecho. La línea punteada rodea la sustancia gris. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

Por otro lado, también quisimos observar los niveles de la proteína BimL, un miembro de la familia de las Bcl2 que media la apoptosis por estrés de RE (Puthalakath et al, 2007). La inducción de la isoforma BimL es indicativa de la activación de mecanismos pro-apoptóticos asociados a UPR. Al analizar la expresión de BimL en extractos de ME de animales sometidos a hemisección, se observó una inducción preferentemente en las zonas rostrales y del daño de la ME (Figura 9B). Los niveles de expresión de la proteína BimL se cuantificaron y normalizaron con respecto a los niveles de expresión de la proteína Hsp90 para confirmar este incremento (Figura 9C).

#### **6.6. Niveles de ubiquitinación bajo condiciones de DME.**

Otro evento que podría estar sucediendo horas después de la HME es la activación de la maquinaria degradativa de proteínas mediada por el proteosoma. Es sabido que la vías de la UPR mediadas por IRE1 y ATF6 favorecen la expresión de genes relacionados con el ERAD (Schroder y Kaufman, 2005). Dado el aumento previamente descrito de los niveles de procesamiento del ARN de *Xbp-1*, se decidió analizar si existe un cambio en los niveles de ubiquitinación de proteínas luego del DME. Efectivamente se observó un leve aumento de especies ubiquitinadas de proteínas a partir las 3 horas post-DME con respecto a los controles *sham* (Figura 11A-B).



**Figura 11. Patrón de ubiquitinación de proteínas luego de daño por HME.** R ratones silvestres se operaron en la T12 (daño y sham) y la ME se colectó 3 y 6 horas post-operación. El tejido se procesó para obtener proteínas y su posterior análisis por *Western blot*. (A) Análisis de *Western blot* mostrando los niveles relativos de ubiquitinación de proteínas (Ub), y de Hsp90 después de 3 y 6 horas después del HME, comparados con ratones sham. (B) Las intensidades de las bandas de las proteínas ubiquitinadas se cuantificaron y normalizaron con la expresión del control Hsp90 para determinar la variación de la expresión. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de 3 tratamientos por grupo. Se realizó test t de Student. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . La letra C corresponde a los valores de ratones control, sin ningún tipo de intervención.

## DISCUSIÓN

### 7.1. Validación del método de HME en ratones

A nivel general, el análisis de vídeo mostró una reproducibilidad en los efectos locomotores de los ratones dañados mediante el uso de la HME, es decir, la pérdida de movilidad completa de la pata posterior derecha, sin afectar el resto de las extremidades. Esto refleja el hecho de que es un método fácil de corroborar a diferencia de otros métodos como la inducción de isquemia o DME por trauma. Cabe destacar que todos los tiempos empleados en este estudio post-DME corresponden a tiempos previos a la recuperación parcial de la capacidad locomotora del animal (Figura 1B). Los animales *sham* no sufrieron variación de la capacidad locomotora a simple vista, correlacionando este resultado con lo observado en el análisis de locomoción mediante BMS (Figura 1B). Además, quisimos implementar este método por la potencialidad de estudios futuros relacionados con la recuperación de la capacidad locomotora por la posible formación de ramas colaterales que estarían transfiriendo señales a tractos lumbares por la sección no dañada, es decir, producto de mecanismos de transporte axonal luego del DME (Bareyre et al., 2004), los cuales podrían estar involucrados en esta recuperación parcial de la capacidad locomotora.

### 7.2. Expresión temporal y espacial de *Atf4* y *chop/gadd153*

La expresión de *chop/gadd153* no es esperable a tiempos tan tempranos después del DME. Generalmente se reporta activación de esta vía entre 1 a 3 días post-DME en



otros modelos como el de contusión o de isquemia al cerebro (DeGracia et al., 2004). Pese a esto, el trabajo de Penas y cols mostró una expresión temprana de *chop/gadd153* mediado por isquemia a la ME. La cinética de expresión de *chop/gadd153* obtenida en nuestro trabajo es similar en términos de la evolución de la expresión con respecto a referencias anteriores (Penas et al, 2007). Este incremento temprano podría deberse a que la HME es más invasiva que los otros métodos usados (trauma por golpe e isquemia), favoreciendo la activación del estrés de RE. La ruptura masiva de la barrera hematoencefálica podría estar favoreciendo de manera considerable los niveles de estrés de RE. Coincidentemente con lo mencionado en el artículo de Penas y cols., a las 6 horas post-DME no hubo translocación nuclear de CHOP/GADD153, lo cual probablemente suceda a tiempos más tardíos (Figura 6C). El aumento de los niveles de expresión de *chop/gadd153* sugiere una respuesta a estrés de RE en la ME dañada.

Para el caso del factor transcripcional ATF4, realizamos un estudio cinético de su expresión proteica bajo HME, observándose bastante variabilidad en los niveles de expresión. Este incremento es consistente con la activación de su blanco río abajo CHOP/GADD153 el que induce muerte celular por estrés de RE (Chen et al., 2007). Lamentablemente, no se puede correlacionar claramente el aumento de los niveles de expresión de *chop/gadd153* y *Atf4*, ya que a 1 hora post-HME ambos marcadores están activados, por lo cual no se puede definir cuál marcador se expresó primero. Asimismo, demostramos que la inducción de estos marcadores es bastante rápida, al menos después de una hora post-HME. Tiempos menores no fueron posibles de evaluar ya que una hora es el tiempo necesario para que el ratón se recupere completamente de la operación y para así poder comprobar que la operación fue

correctamente realizada. Por otro lado, es importante mencionar que *Atf4* puede ser activado por estrés oxidativo y otros tipos de estrés no relacionados con PERK (Harding et al., 2003), por lo tanto su expresión no es evidencia directa de la activación por estrés de RE. El próximo paso es evaluar esta metodología en ratones deficientes en la expresión de *Atf4* y así determinar si la activación de *chop/gadd153* producida por la HME es dependiente de su regulador positivo clásico ATF4. Este modelo genético está disponible en nuestro laboratorio y actualmente la colonia se encuentra en proceso de expansión. Además, se ha visto que *chop/gadd153* es activado por la vía ATF6, lo cual hace más complejo el estudio (Yoshida et al., 2000). La respuesta temprana de estos marcadores podría verse facilitada por la ruptura de la barrera hematoencefálica, la cual podría contribuir a la rápida respuesta de estos marcadores clásicos. Pese a que las lesiones fueron seleccionadas por la aparición de parálisis parcial, cabe mencionar que en unos pocos casos (3 de 22) no se observó la activación de *chop/gadd153* (Figura 11B, asteriscos), lo cual da cuenta de una posible respuesta diferenciada o pequeñas variaciones en el proceso de DME durante la cirugía.

La expresión de *chop/gadd153* y *Atf4* en zonas alejadas del daño en términos longitudinales (aproximadamente 5 mm) (Figura 5A) sugiere que existe un mecanismo por el cual esta activación es gatillada a distancias considerables de la zona afectada en tiempos muy cortos. Es sabido que en la zona caudal se observa un proceso degenerativo más intenso debido a la interrupción de tractos motores, donde posiblemente la proteína CHOP/GADD153 juega un papel en los procesos de apoptosis. Por otro lado, ATF4 como ya se mencionó, regula positivamente a la expresión de *chop/gadd153*, pero a su vez puede activar otros mecanismos que están involucrados con la regulación del metabolismo redox, lo cual sugiere también la

activación de un mecanismo de rescate en la zona rostral de la ME, para así explicar los menores niveles de la proteína CHOP/GADD153 en esa zona. La expresión de *chop/gadd153* frente a HME 6 horas post-daño se confirmó mediante inmunofluorescencia, técnica que permitió observar una concentración del marcaje en la zona dañada (Figura 6A), observándose detalladamente la expresión en el lado del daño (Figura 6C), con respecto al lado no dañado (lado izquierdo, figura 6B) mostrando la existencia de una distribución transversal de la activación de este marcador. Debido a esta localización, es probable que los fenómenos de ruptura celular –liberación de citoquinas, radicales libres, etc.- estén directamente implicados en la activación del estrés de RE, lo cual estaría activando la expresión de este marcador.

### **7.3. Procesamiento de *Xbp-1* frente al DME**

La detección de la forma procesada del ARNm de *Xbp-1* en la zona media de la ME es un hecho que sugiere que la UPR es activada por HME. Este aumento observado en los niveles de procesamiento del ARNm de *Xbp-1* sugiere la activación de vías de señalización relacionadas con adaptación frente al estrés celular asociado con un posible aumento en la expresión de chaperonas y proteínas del ERAD. Es importante mencionar que además se observó procesamiento del ARNm de *Xbp-1* en zonas alejadas al la intervención quirúrgica, como lo es la zona rostral, lo cual da cuenta de que los mecanismos relacionados con la UPR no se reducen a la zona donde ocurrió físicamente el DME. Queda por confirmar si este procesamiento del ARNm de *Xbp-1* se asocia con un aumento en los niveles de expresión de la proteína *Xbp-1s* y en una inducción de sus blancos transcripcionales. Dado el bajo nivel de activación del

procesamiento de ARN de *Xbp-1* bajo HME, decidimos realizar un control positivo utilizando un modelo clásico de estrés de RE. La correlación en el aumento de los niveles de procesamiento del ARNm de *Xbp-1* entre los animales sometidos a HME y los controles positivos de inyección con el estresor conocido de UPR, tunicamicina. Estos resultados indican que probablemente en la ME existen mecanismos que regulan diferencialmente la activación de IRE1 $\alpha$  y PERK, observando bajo presencia de un estresor fuerte de RE como es la tunicamicina altos niveles de ATF4 y bajos de *Xbp-1s*. (Figura 7C).

#### **7.4. Chaperonas de RE y reguladores de la apoptosis frente a HME**

En este trabajo se logró observar un aumento de los niveles de expresión de *bip/grp78* a nivel de ARNm por medio de RT qPCR, como fue registrado en ratas mediante el modelo de contusión a la ME (Penas et al.,2007), no así por *Western blot*. Esto podría deberse a que BiP/Grp78 es una de las proteínas más abundantes del RE, y cambios en su masa probablemente serán observados luego de un período de tiempo de estrés más prolongado. Por esto, es muy probable que 6 horas no sea el tiempo suficiente para observar variación de los niveles proteicos de chaperonas, es decir, se sugiere que este fenómeno sucede en períodos más tardíos. Además, dado el alto nivel de expresión de la proteína BiP/Grp78, fue muy difícil obtener exposiciones no saturadas en los films mediante el análisis por *Western blot*. Para corroborar estos resultados se realizó inmunofluorescencia de cortes transversales de ME en la zona media, utilizando un anticuerpo anti-KDEL, el que reconoce una secuencia específica que contienen 2 chaperonas: BiP/Grp78 y Grp94. El resultado muestra que no existen

diferencias evidentes en los niveles de expresión de estas chaperonas a las 6 horas post-HME (Figura 10B-C). Esto nuevamente puede deberse a que los niveles de expresión de estas chaperonas en condiciones basales son tan altos, que es muy difícil detectar pequeñas variaciones en la masa. Además, se encontraron niveles decrecientes del ARNm de *grp58*. Un aumento de la proteína Grp58 ha sido asociada como un factor neuroprotector frente neurodegeneración (Hetz et al., 2005). En este trabajo se observó que en modelos de enfermedades relacionadas con priones, una baja en los niveles de proteína Grp58 correlaciona directamente con una mayor efecto pro-apoptótico en la área cerebral afectada. (Hetz et al., 2005).

Por otro lado, se observó un aumento en los niveles de la isoforma BimL de la proteína pro-apoptótica Bim en zonas donde aumentan los niveles de expresión de la proteína CHOP/GADD153. Esto concuerda con evidencias recientes indicando que CHOP/GADD153 induce apoptosis mediante el control transcripcional de *bim*. (Puthalakath et al, 2007). Como siguiente paso, sería importante definir el tipo celular que está expresando estos marcadores ya que así sería posible caracterizar en mejor forma la relación entre tipos celulares y UPR bajo condiciones de HME.

En general, nuestros resultados confirman que el tiempo seleccionado para profundizar los análisis, de 6 horas post-HME, es un tiempo óptimo donde se activan mecanismos dependientes de estrés de RE. Estas respuestas podrían tener efectos adaptativos, como también pro-apoptóticos dependiendo de la intensidad y la cinética del estrés de RE. Además, es sabido que el aumento de la expresión de BiP/Grp78 induce una disminución de la apoptosis mediada por CHOP/GADD153 (Wang et al. 1998), lo cual podría darse después de las 24 horas post-HME, donde se aprecia una disminución de la expresión de la proteína CHOP/GADD153 (Figura 4B).

## 7.5. Ubiquitinación

Como es sabido, el aumento de la forma procesada de *Xbp-1* induce respuestas adaptativas relacionadas con la inducción de chaperonas, control de calidad de proteínas y degradación de éstas (ERAD) (Schroder y Kaufman, 2005). Debido a esto se decidió observar el grado de ubiquitinación de las proteínas de la zona media, 6 horas post-HME, observándose un aumento leve pero progresivo de formas ubiquitinadas. Esto podría relacionarse con una falla o alteración del proceso de plegamiento de proteínas en el RE, generando más proteínas dañadas que se eliminan mediante ubiquitinación a través del ERAD.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se demostró que el modelo de daño por HME en ratón es un método posible de aplicar y con buenas características para ser analizado. Se logró demostrar la activación de la UPR mediante HME por medio de la observación de la variación de los niveles de expresión relativos de varios marcadores clásicos de la UPR a 6 horas post-HME (Figura 12A). Además, la activación de la UPR no sólo se demostró en la zona media, sino en regiones más distales en tiempos tempranos post-HME. Esto es muy interesante, ya que es probable que los mecanismos de apoptosis y de plasticidad estén modulados por la UPR y que, el tiempo post-daño y la ubicación con respecto al daño, sean determinantes en esta modulación. Nuestros resultados muestran que a primeras horas post-daño suceden procesos activados por estrés de RE y asociados a apoptosis, sugiriéndose un mecanismo de restablecimiento del correcto plegamiento de proteínas a tiempos mayores a 6 horas (Figura 12B), los cuales podrían relacionarse con los eventos de recuperación de la capacidad locomotora en ratones lesionados.

Nuestros resultados entregan un panorama alentador para continuar con los estudios de la UPR frente a daño por HME. En el futuro planeamos estudiar el efecto de la manipulación de la UPR en el contexto de HME mediante el uso de ratones deficientes para ATF4 o *Xbp-1* presentes en nuestro laboratorio. Estos resultados servirán para demostrar por primera vez un posible rol causal de la UPR (positivo o negativo) frente al DME. Esta información es vital para definir si la UPR es un componente más de la generación del daño secundario o si está asociada con

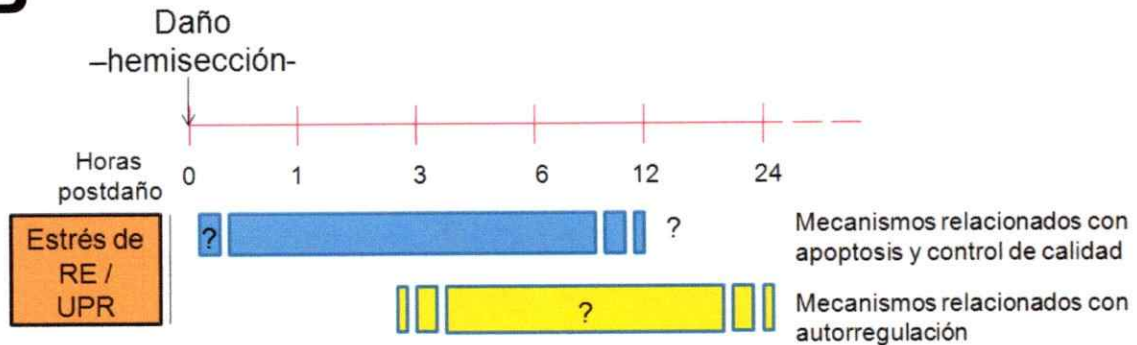
mecanismos de plasticidad para la recuperación relativa de la locomoción. Al definir esto, la UPR se convertiría en un blanco interesante para generar estrategias de terapias para el tratamiento de del DME.



**A**

6 horas post-cirugía

		sham	Rostral	Media	Caudal
ARNm	<i>bip/grp78</i> <i>chop</i>		<i>bip/grp78</i> (?) <i>chop</i> (?)	<i>bip/grp78</i> <i>chop</i>	<i>bip/grp78</i> (?) <i>chop</i> (?)
	<i>grp58</i> <i>grp94</i> <i>Xbp-1s</i>		<i>grp58</i> (?) <i>grp94</i> (?) <i>Xbp-1s</i>	<i>grp58</i> <i>grp94</i> <i>Xbp-1s</i>	<i>grp58</i> (?) <i>grp94</i> (?) <i>Xbp-1s</i> (?)
Proteínas	ATF4 BiP/Grp78 Bim		ATF4 BiP/Grp78 Bim	ATF4 BiP/Grp78 Bim	ATF4 BiP/Grp78 Bim

**B**

**Figura 12. Modelo de activación temprana de UPR mediante daño por HME, planteado por los resultados obtenidos.** Las figuras resumen los resultados obtenidos al realizar daño por HME en ratones silvestres. Se observó un aumento de la forma procesada del ARN de *Xbp-1* demostrando la activación directa de la UPR al menos por medio del sensor IRE1. La activación temprana de marcadores clásicos de la UPR como *Atf4* y *chop/gadd153* sugiere la activación de la vía PERK, la cual está asociada con fenómenos de apoptosis. Se observó un aumento de la expresión del ARNm que codifica a la chaperona BiP/Grp78 se observó luego del HME, no así del nivel traduccional, presumiéndose que la activación de fenómenos de adaptación en tiempos posteriores a 6 horas post-HME. Un aumento de la proteína pro-apoptótica Bim se observó también en nuestro análisis. Finalmente, un aumento temporal de especies ubiquitinadas se observó luego de la HME, lo que sugiere alteraciones en la maquinaria de plegamiento de proteínas bajo esta condición patológica. (A) Esquema que muestra los niveles relativos de activación de los marcadores observados en las 3 zonas de la ME observadas a 6 horas post-HME, comparado con un ratón control. El tamaño de las letras utilizadas ejemplifica en forma proporcional los niveles relativos de expresión de cada marcador analizado luego de efectuar la HME. (B) Dibujo que esquematiza nuestros resultados respecto a la evolución temporal de la UPR luego del daño por HME por los resultados obtenidos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ackery A., Robins S., Fehlings, M.G. (2006). Inhibition of Fas-Mediated Apoptosis through Administration of Soluble Fas Receptor Improves Functional Outcome and Reduces Posttraumatic Axonal Degeneration after Acute Spinal Cord Injury. *J. Neurotrauma*, **23**(5): 604-616.
2. Amar A.P., Levy, M.L. (1999). Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery* **44**: 1027-1039.
3. Aufenberg C., Wenkel S., Mautes A., Paschen W. (2005). Spinal cord trauma activates processing of xbp1 mRNA indicative of endoplasmic reticulum dysfunction. *J. Neurotrauma* **22**: 1018–1024.
4. Baldwin S.A., Broderick R., Blades D. A., Scheff S.W. (1998). Alterations in temporal/spatial distribution of GFAP- and vimentin-positive astrocytes after spinal cord contusion with the New York University spinal cord injury device. *J. Neurotrauma* **15**: 1015–1026.
5. Bareyre F.M., Kerschensteiner M., Raineteau O., Mettenleiter T.C, Weinmann O, Schwab M.E. (2004). The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. *Nat. Neurosci.* **7**: 269–77.
6. Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C. (1995). A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotrauma* **12**: 1-21
7. Basso D.M., Fisher L.C., Anderson A.J., Jakeman L.B., McTigue D.M., Popovich P.G. (2006). Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J. Neurotrauma*. **23**: 635–659.
8. Bertolotti A., Zhang Y., Hendershot L.M., Harding H.P., Ron D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response 2. *Nat. Cell Biol.* **2**: 326-332.
9. Boyce M. and Yuan J. (2006). Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ.* **13**: 363–373.
10. Bregman B.S., Coumans J.V., Dai H.N, Kuhn P.L., Lynskey J., McAtee M., Sandhu F. (2002). Transplants and neurotrophic factors increase regeneration and recovery of function after spinal cord injury. *Prog. Brain Res.* **137**: 257–273.

11. Bregman B.S, Diener P.S., McAtee M, Dai H.N., James C. (1997). Intervention strategies to enhance anatomical plasticity and recovery of function after spinal cord injury. *Adv. Neurol.* **72**: 257–275.
12. Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the *XBP-1* mRNA. *Nature* **415**: 92-96.
13. Caspary T. and Anderson K.V. (2003). Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say, *Nat. Rev., Neurosci.* **4**: 289–297.
14. Chen C., Dudenhausen E., Chen H., Pan Y.X., Gjymishka A., Kilberg M.S. (2005). Amino-acid limitation induces transcription from the human C/EBPbeta gene via an enhancer activity located downstream of the protein coding sequence. *Biochem. J.* **391**(3): 649-58.
15. Coumans J.V., Lin T.T., Dai H.N., MacArthur L, McAtee M., Nash C., Bregman B.S. (2001). Axonal regeneration and functional recovery after complete spinal cord transection in rats by delayed treatment with transplants and neurotrophins. *J. Neurosci.* **21**: 9334-9344.
16. Courtine G., Song B., Roy R.R., Zhong H., Herrmann J.E., Ao Y., Qi J., Edgerton V.R., Sofroniew M.V. (2008). Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord injury. *Nat. Med.* **14**: 69–74.
17. Courtine G., Roy R.R., Raven J., Hodgson J., McKay H., Yang H., Zhong H., Tuszynski M.H. and Edgerton V.R. (2005). Performance of locomotion and foot grasping following a unilateral thoracic corticospinal tract lesion in monkeys (*Macaca mulatta*). *Brain.* **128**: 2338–2358.
18. Cox J.S. and Walter P. (1996). A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* **87**: 391-404.
19. Crowe M.J., Bresnahan J.C., Shuman S.L., Masters J.N., Beattie M.S. (1997). Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat. Med.* **3**(1): 73–76.
20. Diener P.S. and Bregman B.S. (1998). Fetal spinal cord transplants support growth of supraspinal and segmental projections after cervical spinal cord hemisection in the neonatal rat. *J. Neurosci.* **18**(2):779-93.

21. Donnelly D.J. and Popovich P.G. (2008). Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol* **209**: 378–388.
22. Emery E., Aldana P., Bunge M.B., Puckett W., Srinivasan A., Keane R.W., Bethea J., Levi A.D. (1998). Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J. Neurosurg.* **89**: 911–920.
23. Eng L.F., Ghirnikar R.S., Lee Y.L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). *Neurochem. Res.* **25**: 1439–1451.
24. Facts and Figures at a Glance, (2001). National Spinal Cord Injury Statistical Center ([www.spinalcord.uab.edu](http://www.spinalcord.uab.edu)).
25. Fawcett J. W. and Asher R. A. (1999) The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res. Bull.* **49**: 377–391.
26. Galleguillos D., Matus S., Valenzuela V., Valdés P., Martínez A., Nassif M., Torres M., Martínez G., Hetz C. (2009). Targeting endoplasmic reticulum stress pathways to treat neurological disorders associated with protein misfolding. E-Book by Bentham Science. In press.
27. Goldshmit Y., Lythgo N., Galea M.P., Turnley A.M. (2008) Treadmill training after spinal cord hemisection in mice promotes axonal sprouting and synapse formation and improves motor recovery. *J. Neurotrauma* **25**: 449–465
28. Gonzalez, T.N. and Walter, P. (2001). Ire1p: a kinase and site-specific endoribonuclease. *Methods Mol. Biol.* **160**: 25-36.
29. Guertin P. A. (2005). Paraplegic mice are leading to new advances in spinal cord injury research. *Spinal cord.* **43**(8):459-61.
30. Harding H.P., Zhang Y., Zeng H., Novoa I., Lu P.D., Calton M., Sadri N., Yun C., Popko B., Paules R., Stojdl D.F., Bell J.C., Hettmann T., Leiden J.M. and Ron D. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress, *Mol. Cell.* **11**: 619–633.
31. Hetz C., Russelakis, M., Wälchli S., Carboni S., Vial-Knecht E., Maundrell K., Soto, C. (2005). The disulfide isomerase Grp58 is a protective factor against prion neurotoxicity. *J. Neurosci.* **25**:2793-2802.
32. Hetz C., Bernasconi P., Fisher J., Lee A.H., Bassik M.C., Antonsson B., Brandt G.S., Iwakoshi N.N., Schinzel A., Glimcher L.H., Korsmeyer S.J. (2006). Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science* **312**: 572-576.

33. Hetz, C. and Glimcher, L., (2008). The daily job of night killers: alternative roles of the BCL-2 family in organelle physiology. *Trends Cell Biol.* **18**: 38-44.
34. Howland, D.R., Bregman B.S., Tessler A., Goldberger M.E. (1995). Transplants enhance locomotion in neonatal kittens whose spinal cords are transected: a behavioral and anatomical study. *Exp. Neurol.* **135**: 123-145.
35. Jones LL, Sajed D, Tuszynski MH. (2003). Axonal regeneration through regions of chondroitin sulfate proteoglycan deposition after spinal cord injury: a balance of permissiveness and inhibition. *J Neurosci.* **23**: 9276-9288.
36. Katoh K., Ikata T., Katoh S., Hamada Y., Nakauchi K., Sano T., Niwa M. (1996). Induction and its spread of apoptosis in rat spinal cord after mechanical trauma. *Neurosci. Lett.* **216**, 9-12.
37. Kim H.M., Hwang D.H., Lee J.E., Kim S.U., Kim B.G. (2009). *Ex Vivo* VEGF Delivery by Neural Stem Cells Enhances Proliferation of Glial Progenitors, Angiogenesis, and Tissue Sparing after Spinal Cord Injury. *PLoS ONE* **4**(3): e4987.
38. Kusumi, I., Masui, T., Kakiuchi, C., Suzuki, K., Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
39. Lang-Lazdunski L., Matsushita K., Hirt L., Waeber C., Vonsattel J.P.G., Moskowitz M.A. (2000). Spinal cord ischemia: development of a model in the mouse. *Stroke* **31**: 208-213.
40. Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Glimcher, L.H. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol. Cell Biol.* **23**: 7448-7459.
41. Li G.L., Brodin G., Farooque M., Funa K., Holtz A., Wang W.L., Olsson Y. (1996). Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55**: 280-289.
42. Lin J.H., Li H., Yasumura D., Cohen H.R., Zhang C., Panning B., Shokat K.M., Lavail M.M., Walter P. (2007). IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* **318**: 944-949.
43. Lisbona F, Rojas-Rivera D., Thielen P., Zamorano S., Todd D., Martinon F., Glavic A., Kress C., Lin J.H., Walter P., Reed J.C., Glimcher L.H., Hetz C. (2009). BAX Inhibitor-1 Is a Negative Regulator of the ER Stress Sensor IRE1 $\alpha$ . *Mol. Cell*, **33**(6): 679-691.

44. Liu X. Z., Xu X., M., Hu R., Du C., Zhang S.X., McDonald J.W., Dong H.X., Wu Y.J., Fan G.S., Jacquin M.F., Hsu C.Y., Choi D.W. (1997). Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci.* **17**: 5395–5406.
45. Lu J., Ashwell K. W., Waite P. (2000). Advances in secondary spinal cord injury: role of apoptosis. *Spine* **25**: 1859–1866.
46. Luo S., P. Baumeister, S. Yang, Abcouwer S. F., Lee A. S. (2003). Induction of Grp78/BiP by translational block: activation of the Grp78 promoter by Atf4 through an upstream ATF/CRE site independent of the endoplasmic reticulum stress elements. *J. Biol. Chem.* **278**: 37375-37385.
47. Marciniak S.J., Yun C.Y., Oyadomari S., Novoa I., Zhang Y., Jungreis R., Nagata K., Harding H.P., Ron D. (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes dev.* **18**: 3066-3077.
48. Martin L. J., Al-Abdulla N. A., Brambrink A. M., Kirsch J. R., Sieber F. E., Portera-Cailliau C. (1998). Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res. Bull.* **46**: 281 -309.
49. Maton A., Hopkins J., McLaughlin C.W., Johnson S., Warner M.Q., LaHart D., Wright J.D. (1993). *Human Biology and Health*. Englewood Cliffs, New Jersey, USA: Prentice Hall. pp. 132–144.
50. Matus S., Lisbona F., Torres M., Leon C., Thielen P., Hetz C. (2008). The stress rheostat: an interplay between the unfolded protein response (UPR) and autophagy in neurodegeneration. *Curr. Mol. Med.* **8**: 157–172.
51. McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y., Holbrook, N.J., (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 1249-1259.
52. McDonald J.W., Sadowsky C. (2002). Spinal cord injury. *Lancet* **7;360(9348)**:1883.
53. McKeon R. J., Schreiber R. C., Rudge J. S., Silver J. (1991). Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J. Neurosci.* **11**: 3398–3411.
54. Moreno-Manzano V., Rodríguez-Jiménez F.J., García-Roselló M. (2009). Activated Spinal Cord Ependymal Stem Cells Rescue Neurological Function. *Stem Cells*, **27(3)**:733-743.

55. Namura S., Zhu J., Fink K., Endres M., Srinivasan A., Tomaselli K.J., Yuan J., Moskowitz M.A. (1998). Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J. Neurosci.* **18**: 3659-3668.
56. National Institute of Neurological Disorders and Stroke (U.S.) and National Institute of Health (U.S.) (1997). Proceedings of an NIH Workshop on Spinal Cord Injury: emerging concepts, (NIH publication ; no. 97-4201, ed. National Institutes of Health, Bethesda, Md. 62 p).
57. Nozaki S., Sledge Jr. G.W., Nakshatri H. (2001). Repression of GADD153/CHOP by NF- $\kappa$ B: a possible cellular defense against endoplasmic reticulum stress-induced cell death. *Oncogene.* **20**(17): 2178-2185.
58. Oida Y., Izuta H., Oyagi A., Shimazawa M., Kudo T., Imaizumi K., Hara H. (2008). Induction of BiP, an ER-resident protein, prevents the neuronal death induced by transient forebrain ischemia in gerbil. *Brain Res.* **1208**: 217–224.
59. Olson H.E., Rooney G.E., Gross L.A., Nesbitt J.J., Galvin K.E., Knight A., Chen B.K., Yaszemski M.J., Windebank A.J. (2009). Neural Stem Cell- and Schwann Cell-Loaded Biodegradable Polymer Scaffolds Support Axonal Regeneration in the Transected Spinal Cord *Tissue Eng. Part A.* [Epub ahead of print].
60. DeGracia D.J., Montie H.L. (2004). Cerebral ischemia and the unfolded protein response. *J. Neurochem.* **91**(1): 1-8.
61. Park E., Velumian A. A., Fehlings M. G. (2004). The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *J. Neurotrauma* **21**: 754–774.
62. Paschen W., Aufenberg C., Hotop S., Mengesdorf T. (2003). Transient cerebral ischemia activates processing of xbp1 messenger RNA indicative of endoplasmic reticulum stress. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **23**: 449–461.
63. Paschen W., Yatsiv I., Shoham S., Shohami E. (2004). Brain trauma induces X-box protein 1 processing indicative of activation of the endoplasmic reticulum unfolded protein response *J. Neurochem.* **88**: 983–992.
64. Penas C, Guzmán-Lenis MS, Verdú E, Forés J, Navarro X, Casas C. (2007). Spinal cord injury induces endoplasmic reticulum stress with different cell-type dependent response. *J. Neurochem.* **102**:1242-1255.
65. Puthalakath H., O'Reilly L.A., Gunn P., Lee L., Kelly P.N., Huntington N.D., Hughes P.D., Michalak E.M., McKimm-Breschkin J., Motoyama N., Gotoh T., Akira S., Bouillet P., Strasser A., (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* **129**: 1337-1349.

66. Ron D. and Habener J. F. (1992). CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.* **6**: 439-453.
67. Ron, D., Walter, P., (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol Cell. Biol.* **8**: 519-529.
68. Sandler A.N. and Tator C. (1976). Review of the effect of spinal cord trauma on the vessels and blood flow in the spinal cord. *J. Neurosurg.* **45**: 638-46.
69. Schroder M. and Kaufman R.J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* **74**: 739-789.
70. Schucht P., Raineteau O., Schwab M.E., Fouad K. (2002). Anatomical correlates of locomotor recovery following dorsal and ventral lesions of the rat spinal cord. *Exp Neurol*, **176**:143-153.
71. Selzer M.E. (2003). Promotion of axonal regeneration in the injured CNS *Lancet Neurol.* **2**(3): 157-166.
72. Shamu C.E. and Walter P. (1996). Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J.* **15**: 3028-3039.
73. Shuman S. L., Bresnahan J. C., Beattie M. S. (1997). Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. *J. Neurosci. Res.* **50**: 798-808.
74. Sidrauski C. and Walter P. (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response 1. *Cell* **90**: 1031-1039.
75. Silver J., Miller J.H. (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**: 146-156.
76. Springer J.E., Azbill R.D., Knapp P.E. (1999). Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in spinal cord trauma. *Nat. Med.* **5**: 943-946.
77. Szegezdi E., Logue S.E., Gorman A.M., Samali A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* **7**: 880-885.
78. Talac R., Friedman J.A., Moore M.J., Lu L., Jabbari E., Windebank A.J., Currier B.L., Yaszemski M.J. (2004). Animal models of spinal cord injury for evaluation of tissue engineering treatment strategies. *Biomaterials* **25**(9):1505-10.



79. Tator C.H. and Fehlings M.G. (1991). Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J. Neurosurg.* **75**: 15-26.
80. Tator C. (1998). Biology of neurological recovery and functional restoration after spinal cord injury. *Neurosurgery.* **42**(4): 696-707.
81. Truettner J.S., Hu K., Liu C.L., Dietrich W.D., Hu B. (2009). Subcellular stress response and induction of molecular chaperones and folding proteins after transient global ischemia in rats. *Brain research.* **1249**: 9-18.
82. Wang X.Z., Kuroda M., Sok J., Batchvarova N., Kimmel R., Chung P., Zinszner H., Ron D. (1998). Identification of novel stress-induced genes downstream of chop. *EMBO J* **17**: 3619-3630.
83. Willerth S.M. and Sakiyama-Elbert S.E. (2008). Kinetic Analysis of Neurotrophin-3-Mediated Differentiation of Embryonic Stem Cells into Neurons. *Tissue Eng. Part A.* [Epub ahead of print].
84. Windle W.F. and Chambers W.W. (1950). Regeneration in the spinal cord of the cat and dog. *J Comp. Neurol.* **93**(2): 241-257.
85. Windle W.F., Clemente C.D., Chambers W.W. (1952). Inhibition of formation of a glial barrier as a means of permitting a peripheral nerve to grow into the brain. *J. Comp. Neurol.* **96**: 359-369.
86. Wu J., Rutkowski D.T., Dubois M., Swathirajan J., Saunder T., Wang J., Song B., Yau G.D., Kaufman R.J. (2007). ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress 1. *Dev. Cell* **13**: 351-364.
87. Yakovlev A.G., Knoblach S.M., Fan L., Fox G.B., Goodnight R., Faden A.I. (1997). Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. *J Neurosci* **17**: 7415-7424.
88. Yanjun Ma and Linda M. Hendershot (2002). The mammalian endoplasmic reticulum as a sensor for cellular stress. *Cell Stress Chaperones.* **7**(2): 222-229.
89. Yoshida H., T. Matsui A. Yamamoto T. Okada, K. Mori. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* **107**: 881-891.
90. Yu W.R., Liu T., Fehlings T.K., Fehlings M.G. (2009). Involvement of mitochondrial signaling pathways in the mechanism of Fas-mediated apoptosis after spinal cord injury. *Eur J Neurosci.* **29**: 114-31.

91. Zhao L., Longo-Guess C., Harris B.S., Lee J.W., Ackerman S.L. (2005). Protein accumulation and neurodegeneration in the woozy mutant mouse is caused by disruption of SIL1, a cochaperone of BiP. *Nat. Genet.* **37**: 974–9.
92. Zheng B., Lee J.K., Xie F. (2006). Genetic mouse models for studying inhibitors of spinal axon regeneration. *Trends Neurosci.* **29**: 640–646.
93. Zietlow R., Lane E.L., Dunnett S.B., Rosser A.E. (2008). Human stem cells for CNS repair. *Cell Tissue Res.* **331**(1): 301.