



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACEUTICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

“Aislamiento y análisis del grado de fosforilación de los neurofilamentos de líquido cefalorraquídeo de pacientes con paraparesia espástica tropical”

Memoria para optar al título de Bioquímico

Patrocinante

Dra. Lorena García Nannig
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular,
Facultad de Ciencias Químicas
y Farmacéuticas,
Universidad de Chile

Directores

Dra. Lorena García Nannig
Dra. María Antonieta Valenzuela
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular,
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas,
Universidad de Chile

CAROLINA ALEJANDRA ALBERTI CHESTA

Santiago de Chile, 2006

*Dedicada a las personas más
importantes en mi vida: mis padres,
mis hermanas y mi nonna...*

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág
INDICE GENERAL.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	iii
INDICE DE TABLAS.....	v
ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Virus HTLV-I.....	1
1.2. Paraparesia Espástica Tropical (TSP/HAM).....	4
1.3. Neurofilamentos y su relación con la desorganización y degeneración del citoesqueleto axonal.....	7
1.4. Modificaciones post-traduccionales de los neurofilamentos.....	10
1.5. Hipótesis.....	15
1.6. Objetivo general.....	16
1.7. Objetivos específicos.....	16
2. MATERIALES Y METODOS.....	17
2.1. Reactivos.....	17
2.2. Material biológico.....	18
2.2.1. Líquido cefalorraquídeo (LCR).....	18
2.3. Determinación de proteínas.....	18
2.3.1. Método del ácido bicinónico (BCA).....	19
2.3.2. Método de Lowry.....	19
2.3.3. Método de Electroforesis Capilar (EC).....	19
2.4. Obtención de controles positivos de NFs a partir de tejido cerebral de rata.....	19
2.5. Obtención de controles positivos de NFs a partir de células M4b....	20
2.6. Técnicas utilizadas para concentrar y aislar NFs de las muestras biológicas.....	20
2.6.1. Aislamiento de fosfopéptidos mediante su interacción con Ga ³⁺	21
2.6.2. Precipitación de proteínas con acetona.....	21
2.6.3. Inmunoprecipitación con proteína A/G Agarosa unida a anticuerpos.....	21
2.6.4. Inmunoprecipitación con CNBr- Sefarosa unida a anticuerpos.....	23
2.7. “Immunowestern-blot”.....	24
2.8. Análisis estadístico.....	25
3. RESULTADOS.....	26
3.1. Cuantificación de proteínas de LCR de individuos controles y patológicos.....	26

3.2. Obtención de controles positivos de NFs a partir de células M4b no diferenciadas y tejido cerebral de ratones neonatos.....	27
3.3. Detección de la proteína NF-L directamente a partir de LCR y su posterior aislamiento mediante inmunoprecipitación.....	29
3.4. Detección de proteínas de LCR fosforiladas en treonina y serina....	33
3.4.1. “Immunowestern blot” con anticuerpos policlonales contra fosfotreonina.....	33
3.4.2. “Immunowestern blot” con anticuerpos policlonales contra fosfoserina.....	33
3.5. Análisis estadístico de los niveles de proteína NF-L total y su fosforilación en treonina y serina, en individuos controles y patológicos	35
3.6. Detección de la proteína NF-M total a partir de LCR concentrado..	37
3.7. Detección de residuos fosforilados de NF-M en treonina y serina ..	38
3.8. Análisis estadístico de los niveles de proteína NF-M total y su fosforilación en treonina y serina, en individuos controles y patológicos.....	39
3.9. Detección de NF-H inmunoprecipitado a partir de LCR.....	41
4. DISCUSION.....	43
5. CONCLUSIONES.....	49
6. BIBLIOGRAFIA.....	50

INDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1: Regulación por retroalimentación de la expresión génica del HTLV-I.	2
Figura 2: Proteínas a las que da origen la traducción de los genes del HTLV-I...	3
Figura 3: Proceso de degeneración axonal acompañado de desmielinización, característico de TSP/HAM.....	6
Figura 4: Proteínas Neurofilamento (NF-H, NF-M y NF-L), subdominios y sitios de fosforilación.....	9
Figura 5: Identificación de NF-M y NF-H obtenidos de células M4b.....	28
Figura 6: Identificación de NF-L obtenido de células M4b.....	28
Figura 7: Identificación de NF-M y NF-H inmunoprecipitado de cerebro de ratón.....	28
Figura 8: Presencia de bandas inmunorreactivas usando un anticuerpo monoclonal que reconoce NF-L en el inmunoprecipitado de una preparación parcialmente purificada de cerebro de ratón.....	28
Figura 9: Presencia de bandas de NF-L en muestras de LCR sin concentrar.....	31
Figura 10: Identificación de la proteína NF-L de LCR sin concentrar e inmunoprecipitada usando CNBr-Sefarosa.....	31
Figura 11: Detección de bandas de la proteína NF-L.....	32
Figura 12: Detección de la proteína NF-L.....	32
Figura 13: Concordancia del patrón de bandas inmunorreactivas de NF-L.....	34
Figura 14: Detección de residuos fosforilados en la proteína NF-L.....	34
Figura 15: Presencia de residuos fosforilados en muestras de LCR con y sin separación por técnicas de afinidad.....	34
Figura 16: Presencia de residuos fosforilados en muestras de LCR sin concentrar e inmunoprecipitadas.....	35

Figura 17: Comparación de niveles de proteína NF-L entre individuos control y patológicos.....	37
Figura 18: Figura 18: Detección de proteína NF-M inmunoprecipitada a partir de LCR.....	38
Figura 19: Detección de proteína NF-M de 170 kDa y 150 kDa y sus respectivas fosfoformas.....	39
Figura 20: Comparación de niveles de proteína NF-M de 150 kDa entre individuos control y patológicos.....	41
Figura 21: Detección de proteína NF-H mediante inmunoprecipitación a partir de LCR.....	42

INDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla I. Cuantificación de proteínas en muestras de LCR.....	26
Tabla II. Análisis estadístico de la proteína NF-L total de 66 kDa y sus fosforilaciones en treonina y serina.....	36
Tabla III. Análisis estadístico de la proteína NF-M total de 150 kDa y sus fosforilaciones en residuos de treonina y serina.....	40
Tabla IV. Análisis estadístico de la proteína NF-M total de 170 kDa, y sus fosforilaciones en residuos de treonina y serina	40

ABREVIATURAS

Acs:	Anticuerpos
ALH:	Antígeno Leucocitario Humano
AMPc:	Adenosinmonofosfato cíclico
ATL:	Leucemia linfocitaria de células T
BCA:	Acido bicinconínico
BSA:	Albúmina sérica de bovino
CAMPKII:	Quinasa II dependiente de calmodulina
Cdk5:	Quinasa 5 dependiente de ciclina
CKI:	Caseína quinasa I
CKII:	Caseína quinasa II
CMSP:	Células mononucleares de sangre periférica
CNBr:	Bromocianógeno
CPA:	Células presentadoras de antígeno
DNA:	Acido desoxirribonucleico
EC:	Electroforesis capilar
EGTA:	Acido etilenglicoltetraacético
ELA:	Esclerosis lateral amiotrófica
EM:	Esclerosis múltiple
EMN:	Enfermedad motora neurológica
GSK3- α y - β :	Quinasa de la glicógeno sintasa 3- α y - β
H:	Horas
HSA:	Albúmina sérica humana
HTLV-I:	Virus linfotrópico humano-I
IgG:	Inmunoglobulina G
Ipp:	Inmunoprecipitado
kDa:	Kilodalton
KSP:	Lisina-Serina-Prolina
LCR:	Líquido céfalorraquídeo
LTCs:	Linfocitos T citotóxicos
LTR:	Secuencia terminal repetida larga
mAc:	Anticuerpo monoclonal
MAPK:	Proteína quinasa activada por mitógeno
MES:	Acido morfolinoestanosulfónico
Min:	Minutos
NF:	Neurofilamento
NF-H:	Neurofilamento pesado
NF-L:	Neurofilamento liviano
NF-M:	Neurofilamento mediano
NF-M+H:	Neurofilamento mediano y pesado
pAcs:	Anticuerpos policlonales
PBS:	Amortiguador fosfato salino
PKA:	Proteína quinasa A
PKC:	Proteína quinasa C

PMSF:	Fluoruro de p-metilsulfonilo
PP2A:	Fosfatasa
pSer:	Fosfoserina
pThr:	Fosfotreonina
RIPA:	Amortiguador de lisis
RNA:	Acido ribonucleico
SD:	Desviación estándar
SDS:	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
Seg:	Segundos
SEM:	Error estándar media
Ser:	Serina
SNC:	Sistema nervioso central
TBS-T:	Amortiguador Tris salino con Tween 20
T-CD8+:	Linfocitos T-CD8+
Thr:	Treonina
TSP/HAM:	Paraparesia espástica tropical asociada a mielopatía por retrovirus linfotrófico humano tipo I

RESUMEN

“Aislamiento y análisis del grado de fosforilación de los neurofilamentos de líquido cefalorraquídeo de pacientes con paraparesia espástica tropical”.

La patología neurológica conocida como paraparesia espástica tropical o TSP/HAM (“tropical spastic paraparesis/HTLV-I associated myelopathy”) se produce por la infección con el retrovirus HTLV-I. El material genético del virus se inserta mayoritariamente en el DNA de los linfocitos T-CD4+, pero no en las neuronas, desde donde produce la secreción de proteínas virales como la proteína Tax. Esta enfermedad es crónica y lentamente progresiva donde se observa una degeneración con desmielinización de los axones de las neuronas motoras superiores del haz corticoespinal. La patogenia de esta patología no está aún claramente comprendida.

Estudios en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con diversas enfermedades neurodegenerativas correlacionan el daño con la hiperfosforilación de las subunidades de los neurofilamentos (NFs), lo que provoca una alteración del ensamblaje de sus tres subunidades (NF-L, neurofilamento liviano; NF-M, neurofilamento mediano; NF-H, neurofilamento pesado). En este trabajo se plantea que productos virales podrían producir una desregulación de la fosforilación/desfosforilación de los NFs porque estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que la proteína Tax inhibe a la fosfatasa PP2A, y activa a algunas quinasas.

El objetivo central de esta investigación fue determinar si en esta patología hay cambios en los niveles de las subunidades de los NFs y su grado de fosforilación medidos en muestras de LCR de pacientes con TSP/HAM y controles. Para llevar a cabo esto se procedió a determinar mediante métodos inmunológicos los niveles de las distintas subunidades de los NFs junto con la existencia de diferencias en el grado de fosforilación de residuos de treonina y serina. Para poder hacer a futuro, análisis proteómico por Espectrometría de Masas de las formas fosforiladas de NF-L, NF-M y NF-H, se emplearon diversas técnicas de afinidad. Estas incluyeron inmunoprecipitación con anticuerpos mono y policlonales específicos para las tres subunidades y uso de columnas de Ga³⁺, las que presentan afinidad por péptidos fosforilados.

Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles/mg de albúmina de la banda de 66 kDa de NF-L en el LCR de pacientes y controles, pero sí un aumento significativo en los de una banda de 59 kDa, la cuál podría ser un producto de degradación del NF-L. No fue posible asociar la banda de 66 kDa con el nivel de fosforilación en treonina y serina por la amplia banda inmunoreactiva frente a anticuerpos contra fosfotreonina y fosfoserina. La banda de 59 kDa no mostró señal con estos anticuerpos contra residuos fosforilados, indicando que su nivel de fosforilación debe ser menor que el de la banda de mayor masa molecular. La detección de NF-M requirió la previa concentración del LCR por precipitación de proteínas con acetona, y condiciones distintas en el “immunowestern blot” que las utilizadas para el NF-L. Se observó la presencia de dos bandas de masas moleculares 170 y 150 kDa reconocidas por los anticuerpos contra NF-M. De estas dos bandas se encontró que el nivel de la de 150 kDa estaba significativamente disminuido en los pacientes, respecto a los controles. Estas dos bandas mostraron un patrón similar de fosforilación en treonina y serina, no encontrándose diferencias entre ambos grupos.

No fue posible detectar la presencia de la subunidad de NF-H ni siquiera en el LCR concentrado. Sólo se observaron bandas entre 100 y 200 kDa después de inmunoprecipitarla, dependiendo de la técnica empleada para dicho propósito.

El aislamiento de NF-L se realizó mediante dos técnicas de inmunoprecipitación con anticuerpos unidos no covalentemente a proteína A/G agarosa o unidos covalentemente a CNBr-Sefarosa, encontrándose que esta última mostraba menos proteínas contaminantes para su posterior análisis por Espectrometría de Masas. La columna de Ga^{3+} fue adecuada también, puesto que se observó un patrón de bandas reactivas contra NF-L, similar al del inmunoprecipitado.

Aplicando la técnica de inmunoprecipitación con proteína A/G agarosa para el NF-M, se obtuvo el mismo patrón de bandas inmunoreactivas utilizando anticuerpos contra NF-M, que el observado en LCR concentrado.

En resumen, estos resultados mostraron en LCR de pacientes con TSP/HAM un aumento de una banda proteica que podría corresponder a NF-L parcialmente degradado, y una disminución de la banda de menor masa molecular de NF-M. No se pudo determinar por este método inmunológico diferencias en el grado de fosforilación

del NF-L entre ambos grupos. En el caso de NF-M sí se pudo asociar las bandas correspondientes a NF-M con la presencia de fosforilaciones en treonina y serina, sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de estudio.

Para futuros análisis de proteómica se demostró en esta memoria que la inmunoprecipitación de NF-L desde LCR mediante la técnica que utiliza anticuerpos unidos covalentemente a Sefarosa evita la contaminación de los anticuerpos primarios facilitando los análisis por Espectrometría de Masas. En el caso de NF-M, por su masa molecular se podría utilizar cualquiera de las dos metodías. Por otra parte, la cromatografía de Ga^{3+} requiere de mayores estudios para determinar su aplicación en el aislamiento de NFs fosforilados.

ABSTRACT

“Isolation and analysis of the phosphorylation levels of neurofilaments in cerebrospinal fluid of patients with tropical spastic paraparesis”.

Tropical spastic paraparesis or TSP/HAM (“tropical spastic paraparesis/HTLV-I associated myelopathy”) is a neurological disorder produced by the retroviral infection with HTLV-I. The virus genetic material is mainly inserted in DNA of T-CD4+ lymphocytes, but not in neurons, releasing viral proteins from infected T-cells such as Tax protein. This is a chronic and slowly progressive disorder, with degeneration and demyelination of upper motoneuron axons of corticospinal-tract. The pathogeny of this pathology is not clearly understood so far.

Studies on cerebrospinal fluid (CSF) of patients with various neurodegenerative disorders show a correlation of the damage with the hyperphosphorylation of the neurofilament subunits (NFs), producing an alteration in the assembly of its three subunits (NF-L, neurofilament light; NF-M, neurofilament median; NF-H, neurofilament high). In this work we purpose that viral products may produce a dysregulation of the phosphorylation/desphosphorylation of NFs deduced from *in vitro* and *in vivo* studies that show the inhibitory effect of Tax protein on PP2A phosphatase, and activation of some kinases.

The central objective of this research was to determine the existence in this pathology of changes in the levels of the NF-subunits and in their phosphorylation degree, measured in CSF samples of TSP/HAM patients and controls. To carry out these purposes we measured the levels of the NF subunits by immunological methods and followed the existence of differences in the degree of phosphorylation in threonine and serine. For future proteomic analysis by Mass Spectrometry of the phosphorylated forms of NF-L, NF-M and NF-H we employed several affinity techniques including immunoprecipitation with monoclonal and polyclonal monospecific antibodies and a Ga³⁺-column with affinity for phosphorylated peptides.

Results did not show statistic significant differences in the levels/mg albumin of the 66-kDa band of NF-L in CSF of patients and controls, however significant increased

difference in the 59-kDa band was found, that probably corresponds to a degradation product. The association of the 66-kDa band with the phosphorylation level of threonine and serine was not possible. The 59-kDa band did not show signal with these antibodies against phosphorylated residues suggesting that its phosphorylation level should be lower than that at the higher molecular mass band. Detection of NF-M required the previous concentration of the CSF by protein precipitation with acetone, and immunowestern blot conditions different to those used for NF-L. Two bands of 170 kDa and 150 kDa were recognized by antibodies against NF-M. The level of the 150-kDa band was significantly reduced in patients compared with controls. The two bands showed a similar threonine/serine phosphorylation pattern without differences between groups.

The NF-H subunit was not detected even using concentrated CSF. Bands between 100 kDa and 200 kDa were observed only after immunoprecipitation, depending on the immunoprecipitation techniques used.

The NF-L isolation was performed using two immunoprecipitation techniques, one with antibodies covalently bound to CNBr-Sepharose and other with not covalently bound to protein A/G agarose. The first technique showed less protein contamination than the other for further Mass Spectrometry analysis. Also Ga^{3+} -column would be adequated due to the similar protein bands reactive against NF-L. The same pattern of immunoreactive bands with antibodies against NF-M observed in concentrated CSF was found after immunoprecipitation with protein A/G agarose.

In summary, these results showed in CSF of TSP/HAM patients an increased level of a protein band that could be a partial degradation form of NF-L, and a decrease in the NF-L of lower molecular mass. It was not possible to determine differences in the phosphorylation levels of both groups using this immunological method. In the case of NF-M, an association between phosphorylation of threonine and serine was found, but without significant differences in the groups of study.

This memory demonstrated that the NF-L immunoprecipitation with the technique where the antibodies are covalently bound to Sepharose avoid the contamination with the primary antibodies, facilitating the future proteomic analysis of these samples. With NF-M, due to its molecular mass, anyone of the immunoprecipitation techniques could

be employed. On the other hand, Ga³⁺-chromatography requires further studies for determining its application for phosphorylated NFs isolation.

1. INTRODUCCION

HTLV-I son las siglas en inglés para Human T-cell Lymphotropic Virus Type- I, o retrovirus linfotrópico humano tipo-I. Este virus pertenece a la familia Retroviridae, subfamilia *Oncoviridae* y fue el primer retrovirus aislado desde cultivo de linfocitos provenientes de un paciente con linfoma de células T (Poiesz y cols., 1980). Es el agente etiológico de la leucemia linfocitaria de células T del adulto (ATL), y de una patología neurológica no oncogénica denominada mielopatía asociada al virus linfotrópico humano tipo I o paraparesia espástica tropical (TSP/HAM o tropical spastic paraparesis/HTLV-I associated myelopathy) (Edlich y cols., 2000; Grant y cols., 2002; Matsuoka, 2003).

ATL se caracteriza por la presencia de linfocitos anormales y linfadenopatías y se presenta principalmente en individuos mayores de 40 años, causando la muerte a los 5 ó 6 meses en los casos agudos (Matsuoka, 2003). TSP/HAM es una enfermedad que afecta al sistema nervioso central (SNC), predominante en mujeres y que comienza a desarrollarse generalmente después de los 40 años, presentando una sobrevida de hasta 30 años (Edlich y cols., 2000; Grant y cols., 2002).

1.1. Virus HTLV-I.

El blanco principal del virus, *in vivo*, son linfocitos T-CD4+ y en mucha menor cantidad T-CD8+, siendo éstos el vehículo de transmisión a través de diferentes vías (Edlich y cols., 2000; Goon y cols., 2004; Lezin y cols., 2005). Las principales son a) contacto heterosexual, que ocurre con mayor frecuencia de hombre a mujer, lo que aumenta la prevalencia con la edad observada en las mujeres; b) transmisión vertical a través de la lactancia materna, mediante linfocitos infectados en la leche y el calostro; c) transmisión por vía transplacentaria y/o perinatal; y d) por vía parenteral (Toro y cols., 2002).

El material genético del HTLV-I está constituido por dos moléculas de RNA de cadena simple, idénticas entre sí y de polaridad positiva, y una vez en el interior del linfocito T es incorporado a su DNA, quedando como provirus. En la **Figura 1** se muestra la estructura genómica del HTLV-I, la cual es similar a la de los demás

retrovirus, ya que posee las regiones genómicas conocidas como *gag*, *pol* y *env*, y las secuencias terminales repetidas largas (LTRs). Una particularidad del virus es que presenta una región adicional llamada pX. Por su parte, *Gag* codifica para las proteínas “core” p19 y p21, *pol* para una DNA polimerasa dependiente de RNA (transcriptasa reversa) y *env* para una glicoproteína de transmembrana (gp21) y una de envoltura externa (gp46) (Goon y cols., 2004). La región pX codifica para las proteínas Tax, Ref, Tof, Rof y posiblemente otras que son producto del procesamiento alternativo del mRNA (**Figura 2**) (Yoshida, 2005). Las proteínas Tax y Rex regulan la replicación viral y la expresión de proteínas virales. La primera corresponde a una fosfoproteína de 40 kDa, responsable de la activación de las secuencias LTRs virales y de la modulación de la transcripción de genes celulares que codifican para diversas interleuquinas y receptores de ellas (Mogensen y Paludan, 2001). Tax está relacionada también con el aumento en la expresión de factores de transcripción y proto-oncogenes, y con la represión de la expresión de genes que participan en la reparación del DNA y apoptosis, generando un ambiente propicio para la eficiente transformación de células T (Barmak y cols., 2003; Marriott y Semmes, 2005).

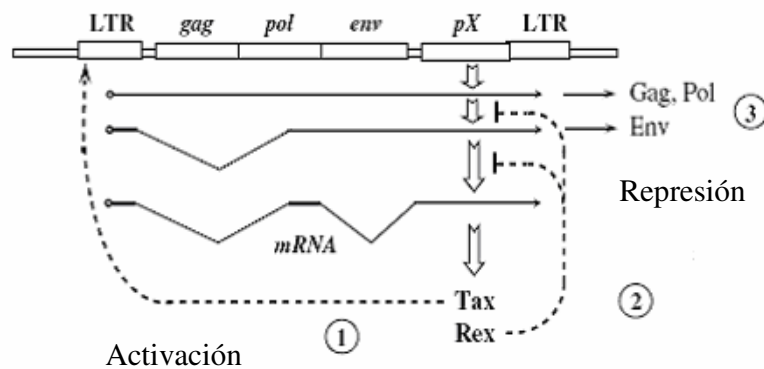


Figura 1: Regulación por retroalimentación de la expresión génica del HTLV-I. 1) Tax activa la transcripción viral. 2) Rex, que es codificada por el mismo transcrito que Tax, suprime el “splicing” del mRNA viral. 3) El mRNA acumulado, sin “splicing”, se traduce a las proteínas Gag, Pol y Env, seguido de una disminución de Tax/Rex, con el consiguiente cese de la transcripción. (Adaptado de Gotuzzo, 2006).

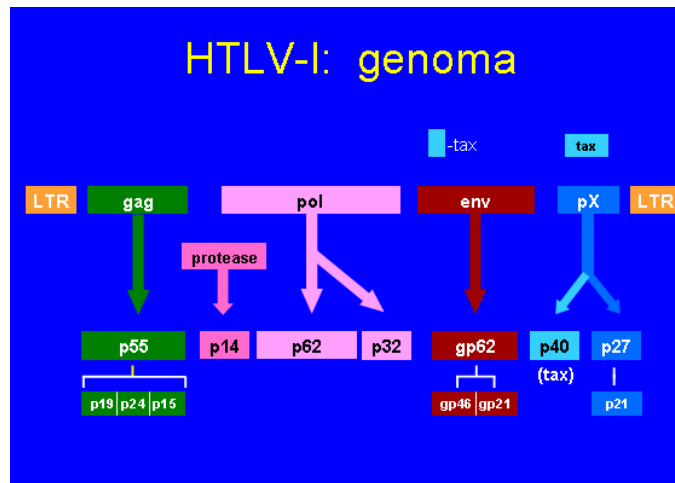


Figura 2: Proteínas a las que da origen la traducción de los genes del HTLV-I. La expresión génica de la región pX da origen a la proteína Tax y también a p21, siendo esta última probablemente producto del procesamiento alternativo del mRNA. (Adaptado de Gotuzzo, 2006).

El mecanismo de entrada del virus a la célula no se conoce muy bien. La contribución de viriones en el proceso infeccioso es mínima, ya que su producción por parte de los linfocitos naturalmente infectados es muy baja, y de estos viriones sólo 1 de cada 10^5 ó 10^6 llega a ser infeccioso. Además, se ha demostrado que el virus se transmite por medio del contacto célula-célula (entre linfocitos T) después de un evento de polarización de componentes del citoesqueleto (reordenamiento de microtúbulos) en los sitios de contacto de la célula infectada. El evento posterior es la transferencia del genoma viral a la célula receptora (Daenke y Booth, 2000; Derse y cols., 2001; Igakura y cols., 2003).

Una vez que el virus se integra puede permanecer silente integrado en la célula, en forma de provirus, o replicarse en forma activa (Azran y cols., 2004). Estudios recientes han sugerido que hay una fase de replicación activa del HTLV-I hasta el desarrollo de la respuesta inmunológica contra productos virales que son expresados en las células en las que se está transcribiendo el virus (Mortreux y cols., 2003).

Teniendo en cuenta estos antecedentes acerca del HTLV-I surgen interrogantes como, ¿qué determina que algunos individuos desarrollen ATL, TSP/HAM, o que sean en su gran mayoría individuos asintomáticos? o ¿cuáles son las diferencias en los

procesos patogénicos que llevan a una y no a otra enfermedad?. Para responder estas preguntas se ha planteado que en el desarrollo de la enfermedad están involucrados factores virales y asociados al hospedero, como cepa del virus, haplotipo ALH (antígeno leucocítico humano), carga y ruta de la infección viral primaria (Aboud y cols., 1993).

En relación a la ruta de la infección, la exposición de las mucosas al HTLV-I ha sido relacionada con casos de ATL, mientras que una infección basada en sangre periférica se la ha correlacionado con una progresión a TSP/HAM. Ahora bien, siendo esta última la enfermedad de interés para el desarrollo de este trabajo, cabe destacar que en el año 2003 Barmak y cols., propusieron un modelo de la progresión de la misma basados en la ruta de infección viral primaria. En ésta se plantea una invasión del virus vía sangre periférica, infectando primeramente la población de linfocitos por la que el virus presenta un fuerte tropismo, es decir los T-CD4+. De esta manera los linfocitos se activan y migran hacia la médula ósea como parte de una señal normal de alerta al sistema inmune. En segundo lugar, el virus infecta a células CD34+ progenitoras, residentes en la médula, en las que el HTLV-I mantiene una infección latente. La migración y posterior diferenciación celular activan la transcripción de genes virales y la transactivación mediada por Tax. La diferenciación de las células progenitoras infectadas en células presentadoras de antígenos (CPAs) como monocitos y células dendríticas, entre otras, resulta en una sobreestimulación de linfocitos T-citotóxicos (LTCs) Tax-específicos, hecho característico de TSP/HAM. Paralelo a esto, la población de células progenitoras seguirá originando CPAs infectadas, lo que exacerbará aún más la respuesta citotóxica. Esta gran población linfocitaria LTCs-Tax específico podría migrar al SNC ocasionando daño a nivel del cerebro y la médula espinal debido a la lisis, tanto de las células infectadas, como de aquellas libres del virus. Esto último es consecuencia de la reactividad cruzada producto de la semejanza molecular de determinantes antigénicos en aquellas células que son reconocidas por los LTCs Tax-específicos (Mor-Vaknin y cols., 1998).

1.2. Paraparesia Espástica Tropical (TSP/HAM).

En la sección anterior se estudió la relación del virus HTLV-I como agente etiológico de TSP/HAM, explicándose los posibles eventos celulares y moleculares que

llevan al desarrollo de la misma. Es menester ahora, analizar las características principales de la enfermedad en cuanto a su sintomatología, zona del SNC comprometida y posible criterio diagnóstico.

Chile es uno de los países con más alta seroprevalencia de TSP/HAM en el mundo, estando en el rango de 0,74% al 2% de la población. De ésta, los individuos infectados que desarrollan la enfermedad corresponden a un 0,25 – 3% (Cartier y cols., 1992, 1997). Esta neuromielopatía degenerativa comienza normalmente en la cuarta década de vida y predomina en mujeres. Considerando que la infección viral puede ser a través del calostro y la leche materna, y que la mielopatía aparece aproximadamente a los 40-50 años de edad, puede deducirse que el período de incubación es de varias décadas, a diferencia de una infección por transfusión sanguínea, donde la mayor carga viral reduce este período a unas pocas semanas o meses (Edlich y cols., 2000).

La enfermedad se caracteriza por ser lentamente progresiva y crónica, causando degeneración y desmielinización (degeneración axomiélnica) de las neuronas motoras corticales que hacen sinapsis a nivel de la médula dorso-lumbar (**Figura 3**). Los pacientes presentan espasticidad en los músculos proximales de las extremidades inferiores (Buczynski y cols., 2001; Zaninovic, 2001; Kettlun y cols., 2003), conservan la movilidad de manos y brazos muchos años después de la pérdida de la marcha, lo que implica un patrón distal en el compromiso axonal. Estudios histológicos revelan lesiones relativamente simétricas en el haz piramidal con pérdida de axones y mielina, agudizándose hacia las regiones dorsales y lumbares. El signo de Babinski y vejiga neurogénica (síndrome piramidal) entre otros, también son característicos de esta enfermedad (Cartier y cols., 1999; Godoy y cols., 1995). El líquido cefalorraquídeo (LCR) es normal en el 65% de los individuos con TSP/HAM, viéndose en sólo el 35% de ellos un aumento de linfocitos (Nakagawa y cols., 1995).

Un estudio realizado en nuestro país el año 2003, orientado a la detección del provirus HTLV-I en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con paraparesia espástica progresiva, propuso la presencia de un provirus HTLV-I deficiente en algunos pacientes seronegativos. Esto último, debido a la amplificación de productos génicos de tax y env/tax, lo que sugiere un rol patogénico del mismo (Ramírez y cols., 2003). Por otro lado se propone una mayor carga proviral HTLV-I en LCR que

en CMSP, exclusivamente en pacientes con TSP/HAM, a diferencia de portadores asintomáticos, lo que podría servir como un nuevo criterio para el diagnóstico de la enfermedad (Lezin y cols., 2005). Sin embargo, a pesar de la información y el nivel de conocimiento que actualmente se tiene de esta patología, su patogénesis no está totalmente comprendida. Un estudio de autopsia de 10 casos de TSP/HAM hecho en Japón (Iwasaki, 1990), describió tres estados histopatológicos en la evolución de los pacientes: **1)** de 0 a 3 años se producen cambios inflamatorios considerables, además del panorama degenerativo que se observa; **2)** de 4 a 6 años se presentan, predominantemente, cambios degenerativos, con un pequeño número de células inflamatorias; **3)** de 9 a 28 años sólo se aprecia una degeneración monótona de la sustancia blanca con ausencia de células inflamatorias, siendo esta última aseveración discutida por algunos autores como de Castro-Costa y cols. (2002), Umehara y cols. (1993), Wu y cols. (1993), Cartier y cols. (1997) y Aye y cols. (2001), los que han encontrado niveles bajos de dichas células en casos de larga evolución de la enfermedad.

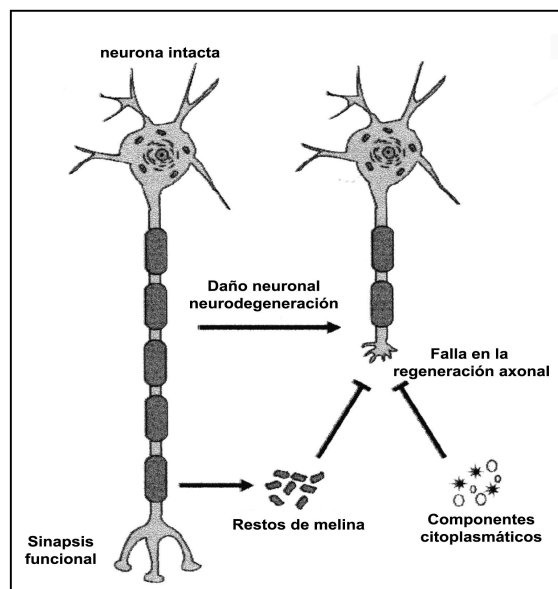


Figura 3: Proceso de degeneración axonal acompañado de desmielinización, característico de TSP/HAM. La neurodegeneración se produce en neuronas del haz córtico-espinal que hacen sinapsis a nivel de la médula dorso-lumbar. (Adaptado de Strittmatter, 2002).

La identificación y caracterización de proteínas derivadas del SNC en el LCR, se ha considerado de importancia diagnóstica debido a evidencias de cambios en su concentración en enfermedades que afectan el sistema nervioso. En procesos patogénicos de diferentes tipos de desórdenes neurodegenerativos, se han encontrado proteínas específicas de cerebro en concentraciones anormales en el LCR. Ejemplos de éstas son la proteína Tau (proteína axonal que se asocia a microtúbulos y se relaciona con la mantención de la estructura e integridad del axón) en pacientes con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y en pacientes con Alzheimer (Green, 2002). Además de Tau, se han encontrado otras proteínas importantes en la mantención de la integridad del axón, como los neurofilamentos (NFs) en esclerosis lateral amiotrófica (Rosengren y cols., 1996; Julián, 1999).

1.3. Neurofilamentos y su relación con la desorganización y degeneración del citoesqueleto axonal.

El citoesqueleto axonal es un sistema altamente regulado, cuya función es mantener la integridad de dicha estructura mediante la participación de diferentes filamentos interconectados, entre los que se encuentran: microfilamentos de actina de 6 nm de diámetro, microtúbulos de 3 nm de diámetro y NFs de 10 nm de diámetro. Todos éstos en conjunto se encargan de mantener la forma y calibre axonal, así como también el transporte de nutrientes y organelos. Además de esto, definen dominios de membrana especializados y regulan el crecimiento axonal y las adhesiones focales (Chang y Goldman, 2004). Los filamentos de actina participan en el crecimiento y orientación axonal, y en la formación y elongación de neuritas, entre otros procesos. A los microtúbulos se les adjudica la mantención del crecimiento y morfología axonal y el hecho de proveer un conducto para el transporte axonal rápido de organelos y proteínas (Stokin y Goldstein, 2006). Por último, los NFs (que corresponden al tema central de este trabajo) pertenecen a la clase IV de filamentos intermedios junto con la α -internexina y la periferina (Chang y Goldman, 2004). Se clasifican en 3 tipos según su tamaño: liviano (NF-L) de 61 kDa, mediano (NF-M) de 90 kDa y pesado (NF-H) de 115 kDa (Grant y Pant, 2000). Corresponden a las proteínas más abundantes del citoesqueleto de los grandes axones mielinizados y tienen la función de mantener el

calibre axonal (en especial el NF-L) y regular el transporte al interior de esta estructura (Ruiz-Ederra y Vecino, 2001; Semra y cols., 2002).

Ahora bien, es fundamental hacer una descripción detallada de los NFs y de los procesos en que éstos participan, comenzando por el hecho de que conforman un sistema de tubos increíblemente estables. Su síntesis se lleva a cabo en el soma neuronal, constituyéndose en las proteínas principales del citoesqueleto de dichas células (más del 85% del total de proteínas aproximadamente). El daño de éstas implica una liberación de los NFs al LCR y, por lo tanto, su detección extracelular es un indicativo de daño neuronal ya que son neurona-específicos (Shaw y cols., 2005).

El transporte de los NFs a lo largo del axón es de tipo retrógrado y anterógrado, con un balance neto hacia este último y a una velocidad de 1,3 $\mu\text{m}/\text{seg}$. Los NFs, *in vivo*, constituyen obligadamente heteropolímeros conformados por las 3 subunidades mencionadas anteriormente. La expresión génica de dichas proteínas está regulada durante el desarrollo neuronal, siendo el NF-L expresado en etapas tempranas del mismo, el NF-M al comienzo de la formación de las neuritas y NF-H durante el desarrollo post-natal (Julien y cols., 1987).

Todos los NFs tienen una organización estructural común definida por un dominio α -hélice conservado tipo varilla de 310 aminoácidos, necesario para el ensamblaje de los oligómeros. Este dominio está flanqueado en un extremo por la región N-terminal (cabeza), a la que se le ha adjudicado una función regulatoria, y en el otro por una región hipervariable C-terminal (cola), la cual forma ramificaciones laterales que se proyectan del filamento para originar interconexiones con NFs vecinos, microtúbulos y otros organelos (**Figura 4**). La hipervariabilidad en el largo y la secuencia de esta región es la que determina la formación de las diferentes subunidades de NFs. En este sentido, la existencia de repeticiones en tándem de la secuencia KSP (lisina, serina, prolina) es de gran importancia, ya que éstas constituyen el mayor sitio de fosforilación para el NF-H, con un número aproximado de 42 KSP, y 13 KSP para el NF-M. El NF-L no posee dicha secuencia en su estructura. La fosforilación del motivo KSP es la responsable de las ramificaciones que forma la región C-terminal, afectando las propiedades físicas, bioquímicas e inmunológicas de los NFs, y en especial del NF-H (Ruiz-Ederra y Vecino, 2001). En neuronas mielinizadas maduras, el NF-L forma el esqueleto central al cual

copolimerizan las cadenas más pesadas formando una fibra de 10 nm, lo que constituye un filamento intermedio. En este último estado es como viajan los NFs a través del axón, y no como subunidades independientes, encontrándose además NFs libres, producto de algún grado de desensamblaje de la estructura previo a su transporte. La asociación de los NFs define el ancho y forma del axón, y provee anclaje para otros constituyentes del citoplasma, regulando la velocidad de conducción de un impulso nervioso, proporcional al calibre del axón (Miller y cols., 2002).

El proceso de ensamblaje ocurre en cinco etapas, comenzando por el enrollamiento de los polipéptidos entre ellos para formar dímeros, los cuales se disponen en forma antiparalela para dar origen a los tetrámeros, protofilamentos y finalmente el filamento intermedio. La asociación de las protofibrillas es promovida por el dominio cabeza y terminada por el de la cola. La estequiometría de su asociación varía durante el desarrollo, pero en general, las cantidades molares relativas de cada subunidad de neurofilamento están en proporción 5:2:1 para el NF-L, NF-M y NF-H, respectivamente (Ruiz-Ederra y Vecino, 2001).

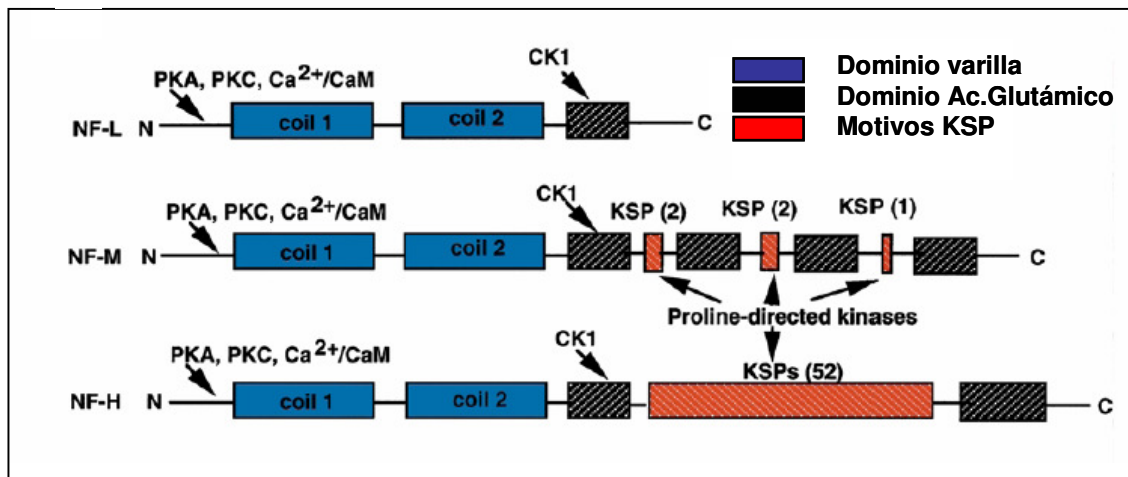


Figura 4: Proteínas Neurofilamento (NF-H, NF-M y NF-L), subdominios y sitios de fosforilación. La figura indica las quinasas específicas que fosforilan, tanto la región N-terminal (cabeza), como la C-terminal (cola). (Adaptado de Grant y Pant, 2000).

La desmielinización y pérdida axonal en TSP/HAM, se generan como consecuencia del daño tisular, principalmente a nivel torácico de la médula espinal, constituyéndose en los rasgos característicos de dichas lesiones en esta enfermedad crónica (Szymocha y cols., 2000; Ozden y cols., 2002). En relación a la liberación de proteínas neuronales debido al daño axonal, podemos decir que, por ejemplo, en una enfermedad crónica inflamatoria, el tejido cerebral contiene diferentes tipos celulares que expresa y en algunas ocasiones libera al LCR, tales como proteína Tau, diferentes formas de proteína amiloide, proteína 14-3-3, y los ya mencionados NFs (Norgren, 2004).

La elección del LCR como muestra biológica para detectar y comparar niveles de NFs en los 2 grupos estudiados en esta memoria, radica en características propias de su síntesis y distribución. El LCR está en contacto directo con el fluido intersticial que rodea las células del SNC, de manera que el 20% de su contenido proteico se origina en el SNC (Hu y cols., 2005). De hecho, una característica común de las proteínas del SNC es su alta concentración en el LCR comparada con la de la sangre (Reiber, 2003).

Los antecedentes anteriores se correlacionan con el hecho de que la liberación al medio extracelular de productos de síntesis interna, propios del SNC, en estados patológicos que involucren degeneración o daño agudo del mismo, se ve reflejada primeramente en el LCR. Esto último constituye un factor de gran importancia debido a la necesidad de diagnosticar tempranamente una enfermedad neurodegenerativa, o el grado de avance de la misma, considerando en este caso a los NFs como posibles marcadores del proceso de degeneración axomielínica.

1.4. Modificaciones post-traduccionales de los neurofilamentos.

Los NFs, una vez sintetizados, sufren modificaciones pos-traduccionales como glicosilaciones y fosforilaciones, las que dan cuenta de la distinta movilidad electroforética al determinar sus masas moleculares por SDS-PAGE. El NF-L puede variar de 61 kDa a 68 kDa, el NF-M puede migrar a 150 kDa y el NF-H hasta 210 kDa, debido a las diferentes fosfoformas que posee (Grant y Pant, 2000; Petzold, 2005).

En cuanto a las modificaciones postraduccionales de las que son objeto los NFs, la fosforilación es la más importante, encontrándose topográficamente regulada. El

proceso comienza en el soma neuronal, donde el dominio N-terminal del NF-L se fosforila transcientemente en Ser55 y el del NF-M Ser44, con el propósito de evitar su ensamblaje en esta zona (Betts y cols., 1997; Grant y cols., 1999). Además, el nivel de fosforilación varía entre los tipos axonales y tractos nerviosos. Acorde con esta aseveración se tiene que en axones de gran diámetro el NF-H está altamente fosforilado, a diferencia de los axones de menor calibre donde, o bien no se encuentra NF-H, o simplemente poseen un muy bajo nivel de fosforilación (Grant y cols., 2001). El proceso continúa durante el transporte axonal constituyéndose, cada una de las subunidades, en las proteínas más fosforiladas del SNC, siendo la forma fosforilada el estado nativo de los NFs, a diferencia del soma neuronal donde se encuentran hipofosforilados (Miller y cols., 2002).

Análisis de las secuencias aminoacídicas mediante bases de datos arrojan la existencia de otros sitios susceptibles a ser fosforilados en serina, independientes de KSP, habiendo para el NF-H alrededor de 30, 49 para NF-M y 33 para NF-L. Ahora bien, de los aminoácidos restantes con capacidad de fosforilarse, es decir, tirosina y treonina, se encuentran 2 y 15 para el NF-H, respectivamente, 5 y 13 para el NF-M y por último, 6 y 8 para el NF-L. Esto se correlaciona con el hecho de que, en general, aproximadamente el 90% de los eventos de fosforilación ocurren en serina, el 10% en treonina y menos del 1% en tirosina (Yuan y Desiderio, 2003). En NFs axonales principalmente, todas las serinas están fosforiladas. Se ha estimado que el NF-H posee 108 grupos fosfato, el NF-M 24 y el NF-L tiene sólo 3. La fosforilación en la dinámica de los NFs trae como consecuencia subunidades más resistentes a la proteólisis, por lo que probablemente el NF-L, que tiene la capacidad de polimerizar por sí solo *in vivo*, es susceptible a la acción de proteasas, ya que de otra forma se produciría su acumulación (Pant y cols., 1997). La fosforilación es responsable además, de aumentar el espaciado entre los NFs y por ende el calibre axonal (Nixon y cols., 1994), disociándolos de las proteínas motoras quinesinas, que realizan el transporte anterógrado (de soma a axón) de los mismos, trayendo como consecuencia una disminución de la velocidad del transporte axonal, entre otras (Yabe y cols., 2001; Sánchez y cols., 2000).

La fosforilación, *in vivo*, es un proceso lento y orquestado por un amplio rango de proteínas del tipo quinasas que se dividen en 2 grupos; el primero de ellos considera a

las quinasas **no-prolina dirigidas**, entre las que se encuentran: quinasas dependientes de AMPc como PKA, PKC y CAMK II que fosforilan el N-terminal de todos los NFs, y las independientes de AMPc como caseína quinasa I y II (CK I y II), las cuales fosforilan la región C-terminal. El segundo grupo involucra a las **prolina dirigidas**, donde encontramos a la glicógeno sintasa quinasa (GSK)-3 α y 3 β , y la proteína quinasa activada por estrés (SAP), las cuales presentan una baja actividad. Dentro de este último grupo, las dos familias principales involucradas en la fosforilación de los sitios KSP de la región C-terminal de las proteínas NF-H y NF-M son la ciclina dependiente de quinasa (Cdk5) y la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK). Esta última es muy importante, ya que media la neurogénesis y diferenciación celular al ser activada por factores de crecimiento epidermal y nervioso, respectivamente (Vaudry y cols., 2002; Chang y cols., 2004).

Debido a que la fosforilación anormal de proteínas del esqueleto axonal ha sido implicada en la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas, se han llevado a cabo estudios tendientes a explicar las consecuencias en las interacciones de los NFs al sobreexpresar o inhibir la función de diferentes proteínas quinasa. Uno de ellos ha propuesto que Cdk5 y MAPK podrían tener un rol opuesto en el transporte axonal, ya que esta última promueve el transporte anterógrado, a diferencia de Cdk5, cuya hiperactivación lleva a una hiperfosforilación de los NFs confinándolos al soma., lo que es causal de acumulación y posterior degeneración neuronal. Debido a que los 2 grupos de quinasas (prolina dirigidas y no prolina dirigidas), median aspectos separados en la dinámica de los NFs, es que los resultados anteriores podrían ser indicativos de que su fosforilación en distintos sitios, llevada a cabo por múltiples quinasas, podría tener efectos aditivos u opuestos en su transporte, hecho que pone de manifiesto la complejidad y fina regulación del proceso (Veeranna y cols., 1998; Shea y cols., 2003; Shea y cols., 2004).

Además de quinasas que participan en la regulación de este proceso dinámico, existen fosfatasa, cuya función es mantener el equilibrio en el grado de fosforilación de las proteínas del citoesqueleto. Anteriormente fue mencionado el hecho de que la fosforilación otorga resistencia de los NFs a la proteólisis, razón por la cual, en los terminales nerviosos se encuentra la calcineurina, una fosfatasa dependiente de calcio-

calmodulina, cuya función es desfosforilar a los NFs para permitir su digestión por proteasas. Otra de las características que confería la fosforilación a los NFs era el desensamblaje y disociación de los mismos *in vivo* e *in vitro*. Es por esto que debido a que en su estado nativo los NFs están abundantemente fosforilados, las fosfatasa pueden ser importantes en etapas iniciales del transporte axonal al mantener desfosforilada la cabeza del NF-L, permitiendo su ensamblaje con las restantes subunidades y, por consiguiente, la formación del filamento intermedio. A este respecto cabe mencionar la participación de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), una holoenzima dimérica formada por una subunidad catalítica de 38 kDa y una regulatoria de 65 kDa. A esta enzima se le adjudica el 75% de la actividad fosfatasa endógena al analizar la fracción de NFs aislada de una muestra de médula espinal bovina. La función de PP2A es mantener la estructura del filamento intermedio, regulando la fosforilación en la región N-terminal, así como también la desfosforilación de los sitios KSP en NF-H y NF-M, fosforilados por Cdk5.

La desregulación de la actividad quinasa/fosfatasa se correlaciona directamente con patologías de los NFs, las cuales han sido clasificadas en desórdenes de su síntesis, fosforilación, estequiometría, distribución por transporte axonal y su degradación, con el consiguiente deterioro de la célula neuronal. Ahora bien, la relación que se plantea en el próximo punto entre una desregulación en la fosforilación de los NFs y el desarrollo de TSP/HAM producto de la infección por HTLV-I, radica en que estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la proteína Tax interacciona directamente con la subunidad catalítica de PP2A y, más aún, de ensayos *in vitro* se concluyó que corresponde a un inhibidor no competitivo de esta enzima (Saito y cols., 1995). Debido a que PP2A corresponde a la principal serina/treonina fosfatasa, su acción es crucial para la regulación de procesos como la desfosforilación de los NFs para permitir su correcto ensamblaje. Si a esto se suma el hecho de que PP2A está asociada a las quinasas PKA y CAMK, las cuales, como se mencionó anteriormente, están relacionadas con la fosforilación de la región N-terminal, podría considerarse la probabilidad de una desregulación de la dinámica de los neurofilamentos debido a un desbalance de la actividad quinasa/fosfatasa producto de la interacción de Tax con alguna de estas proteínas (Fu y cols., 2003). Estudios recientes han revelado que los residuos 1- 40 de la

región N-terminal de la proteína Tax tendrían participación en el aumento de la actividad quinasa de Cdk4, ciclina involucrada en la regulación del ciclo celular (transición de la fase G1 a la S), cuya hiperactivación llevaría a la inmortalización de las células infectadas por el virus, en este caso linfocitos T CD4+ por excelencia (Li y cols., 2003).

1.5. Hipótesis.

El presente marco teórico hace referencia por una parte, a un proceso de desmielinización y consecuente degeneración de los axones del haz córtico-espinal, y por otra, se hace alusión a un posible desbalance de la actividad quinasa y fosfatasa, donde la proteína Tax jugaría un papel preponderante, aumentando e inhibiendo la actividad de dichas enzimas, respectivamente. La recopilación de estos antecedentes permite postular la siguiente hipótesis:

“La retracción y pérdida axonal que se observa en los haces córtico-espinales de pacientes infectados con HTLV-I que desarrollan TSP/HAM, se relaciona con un aumento en la fosforilación de las proteínas constituyentes de los neurofilamentos del citoesqueleto axonal (NF-L, NF-M y NF-H)”.

Esta proposición se basa en estudios preliminares del laboratorio que sugieren que en cultivos celulares de la línea M4b co-cultivadas con linfocitos infectados con HTLV-I, hay proteínas de masas moleculares semejantes al NF-L con mayor grado de inmunorreactividad frente a anticuerpos contra fosfoserina.

1.6. Objetivo general.

- Evidenciar la presencia de las proteínas NF-L, NF-M y NF-H en líquido cefalorraquídeo de individuos controles y patológicos, y determinar posibles modificaciones en el grado de fosforilación de estas proteínas.

1.7. Objetivos específicos.

- Estandarizar y optimizar técnicas de inmunoprecipitación y precipitación de proteínas del LCR para cada una de las subunidades de neurofilamentos (NF-L, NF-M y NF-H), debido a las diferentes concentraciones que éstas poseen en dicha muestra biológica, para futuros estudios de proteómica.
- Estandarizar protocolos de “immunowestern blot” selectivos, de manera de visualizar las bandas inmunorreactivas específicas para cada proteína NF, obtenida ya sea por inmunoprecipitación o precipitación de proteínas.
- Comparar en LCR control y patológico el grado de inmunoreactividad frente a anticuerpos contra fosfoserina y fosfotreonina para cada uno de los NFs.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos.

Biorad, Hércules, CA, USA: Membrana de nitrocelulosa.

Chemicon Internacional, Temecula, CA, USA: Anticuerpos policlonales para: neurofilamento liviano (68 kDa) (Cat. AB1983), neurofilamento mediano (150 kDa) (Cat. AB1981), neurofilamento pesado (200 kDa) (AB 1982), neurofilamento liviano (68-70 kDa) (Cat. AB9568), fosfoserina (Cat. AB1603), y fosfotreonina (Cat. AB1607); solución para deshibridización Re-Blot Plus 10x Mild (Cat. 2500); solución para bloqueo de membranas de nitrocelulosa “Quick blocker” (Cat. B2080).

Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA: Película BIOMAX MR.

Pierce, Il, USA: Anticuerpo secundario contra conejo conjugado con peroxidasa (Cat. 31462), anticuerpo secundario contra ratón conjugado con peroxidasa (Cat. 31452), CLXposure film XR-B, Micro BCATM Protein Assay Reagent Kit, Super Signal West Femto Chemiluminescent Substrate, CNBr-Sefarosa, Phosphopeptide Isolation Kit.

Santa Cruz Biotechnology, Ca, USA: Proteína A/G agarosa (Cat. sc-2003).

Sigma Chemical Co, S Louis, Mo, USA: Trizma base, NaCl, glicina, acrilamida, bisacrilamida, persulfato de amonio, Tween 20, azul de Coomassie R, azul de Coomassie G250.

Merck, Darmstadt, Alemania: Metanol, ácido acético, etanol.

Zymed Laboratorios Inc.: Anticuerpo monoclonal para: neurofilamento pesado+mediano (160/200 kDa) (Cat. mAB13-1300) y neurofilamento liviano (68 kDa) (Cat. mAB13-0400).

2.2. Material biológico.

El material biológico utilizado consistió en muestras de LCR de individuos controles y patológicos, además de tejido cerebral de rata y lisados celulares.

2.2.1. Líquido cefalorraquídeo.

Las muestras de LCR fueron obtenidas del Departamento de Ciencias Neurológicas del Hospital del Salvador, mediante punción lumbar atraumática, como parte de un proceso de diagnóstico, con un fin particular para cada grupo en estudio. Dichas muestras se centrifugaron para eliminar células, se alicuotaron y almacenaron a -20 °C. Esta investigación contó con la completa aprobación de cada uno de los pacientes que libremente accedieron a participar mediante una carta de consentimiento, constituyéndose 2 grupos de estudio:

a) Grupo CONTROL. Incluyó a individuos libres del virus HTLV-I que pertenecieron al área de ginecología, o bien que presentaron otro tipo de enfermedades neurológicas o patologías no inflamatorias, los cuales necesitaron anestesia raquídea con fines diagnósticos. El rango etario de los individuos abarcó desde los 52 a 69 años, con un promedio de 59 años y una SD \pm 6,3. El número de muestras de LCR, correspondiente a cada individuo en estudio, fue igual a 6.

b) Grupo TSP/HAM. Incluyó a individuos portadores del HTLV-I, cuyo TSP/HAM se definió por el cuadro clínico, estudio radiológico, inmunológico y electrofisiológico. El rango etario comprendió desde 47 a 65 años, siendo el promedio 57 años, y la SD \pm 9,3. El número de muestras de LCR analizadas para este grupo fue igual a 6.

2.3. Determinación de proteínas.

La cuantificación de proteínas de las muestras biológicas se llevó a cabo mediante 3 métodos diferentes, con el objetivo de comparar y corroborar las mediciones realizadas.

2.3.1. Método del ácido bicinónico (BCA).

La determinación de proteínas mediante el kit Micro BCA™ Protein Assay Reagent se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

2.3.2. Método de Lowry.

La cuantificación se realizó según lo descrito por Lowry y col. (1951), utilizando BSA como estándar.

2.3.3. Método de Electroforesis Capilar (EC).

Este análisis se realizó utilizando un equipo de Electroforesis Capilar Ion Analyzer (Waters Quanta 4000) con software Millennium (Waters) para el manejo de la información. Se utilizó un capilar de sílica fundida (68 cm de distancia al detector y 50 µm de diámetro interno), una solución de electrolito de corrida consistente en H₃PO₄ 150 mM, pH 1,5. La detección ultravioleta se llevó a cabo a 185 nm y la separación se realizó a 18 kV y 25 °C con inyecciones de muestra de 10 seg. Entre cada muestra la columna capilar se lavó en forma secuencial con inyecciones de 3 min cada una de NaOH 0,5 M, agua destilada y solución de electrolito de corrida. El estándar utilizado fue HSA 2 mg/mL

2.4. Obtención de controles positivos de NFs a partir de tejido cerebral de rata.

El tejido cerebral correspondió al de ratas de 3 días de nacimiento. Este fue donado gentilmente por el Dr. Sergio Lavandero del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. El objetivo del trabajo con este material, no fue otro que la obtención de controles positivos para la detección de las tres subunidades de NFs libres de proteólisis. El proceso de purificación se llevó a cabo según el protocolo descrito por Moon y cols., 1981, de acuerdo a esto se homogenizaron 4 g de tejido cerebral en amortiguador A que contenía MES 0,1M, pH 7,0, EGTA 1 mM y MgCl₂ 1mM. El homogenizado se centrifugó a 100.000 x g por 1 h, a 4°C. Al sobrenadante obtenido se le agregó una mezcla de inhibidores de proteasas compuesto por PMSF 1 µmol/mL, aprotinina 2 µg/mL, pepstatina 2 µg/mL y leupeptina 20 µg/mL. Además se adicionó

inhibidor de fosfatasa vanadato de sodio 1 mM. Posteriormente se trató con glicerol 4 M y se incubó por 2 h a 4° C para prevenir la asociación de microtúbulos, pero dejando que los NFs formaran una malla reticulada. Pasado este tiempo se realizó una centrifugación en las mismas condiciones anteriores, y esta vez el precipitado obtenido se homogenizó nuevamente en amortiguador A y posteriormente se llevó a cabo una centrifugación como las descritas anteriormente. Finalmente, de este precipitado, se obtuvieron las proteínas NFs, y cada fracción obtenida se guardó a -20 °C para su posterior análisis.

2.5. Obtención de controles positivos de NFs a partir de células M4b.

El lisado celular obtenido a partir de la línea de células M4b se utilizó como punto de partida para la obtención de controles positivos de NFs. Las células se lavaron con solución amortiguador de fosfato salino (PBS), compuesta por fosfato de sodio 0,1 M, y NaCl 0,15 M, y se centrifugaron en microfuga a 6.000 rpm por 5 min a 4° C. Luego de esto se agregaron 400 µL de amortiguador RIPA 1X (0,44 gramos de NaCl, 0,5 mL SDS 10%, 0,5 mL NONIDET 100%, 0,5 g desoxicolato de sodio, 0,5 mL EDTA 500 mM, 12,5 mL Tris Base 200 mM, aforado a un volumen de 50 mL), además de 10 µL de leupeptina 20 µg/mL y 10 µL de PMSF 0,1 M, incubándose en hielo por 45 min. Luego se sonicaron las células por 30 seg, se repitió la centrifugación anterior y se midieron las proteínas del sobrenadante obtenido mediante el método del ácido bicinconínico (BCA), para finalmente guardarlo a -20° C hasta su uso.

2.6. Técnicas utilizadas para concentrar y aislar NFs de las muestras biológicas.

En esta sección se describen las diferentes técnicas aplicadas a las muestras biológicas en estudio (LCR, NFs aislados de tejido y células M4b). Con el propósito de concentrar los NFs presentes en las mismas se utilizaron: aislamiento de fosfopéptidos mediante columnas de afinidad con Ga³⁺, precipitación de proteínas con acetona, e inmunoprecipitación (Ipp). Esta última además tiene la capacidad de concentrar y aislar los NFs producto de la afinidad de anticuerpos específicos hacia zonas definidas de dichas proteínas. Todo esto como primera etapa de un procedimiento tendiente, por una parte, a la detección de los NFs mediante una técnica que involucra reacciones

inmunológicas como es el “immunowestern blot”, y por otra, a su identificación futura a través de espectrometría de masas, la cual permitiría la secuenciación de las tres proteínas NFs.

2.6.1. Aislamiento de fosfopéptidos mediante su interacción con Ga³⁺.

El aislamiento de fosfopéptidos se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del kit comercial “Phosphopeptide Isolation Kit”, consistente en columnas “Mini-spin SwellGel[®] Gallium-Chelated Disc”, con la capacidad de unir grupos fosfato, y específicamente 150 µg de fosfopéptidos por columna. La primera etapa involucra una unión fosfopéptido-SwellGel[®] a pH 2,0-5,5 (5% ácido acético), seguida de dos lavados consecutivos a pH 2,0-3,5 (lavado 1: 0,1% ácido acético; lavado 2: 0,1% ácido acético y 10% acetonitrilo, pH 3,0) para, finalmente, eluir los fosfopéptidos de la columna a un pH superior a 6,0 (0,1M bicarbonato de amonio), llegando a ser cercano a pH 10 para aquellos péptidos multifosforilados.

2.6.2. Precipitación de proteínas con acetona.

La precipitación de proteínas con este solvente orgánico se realizó a bajas temperaturas, por lo que se prescindió de inhibidores de proteasas, debido a que éstas se encuentran inactivas en dichas condiciones. El protocolo utilizado consistió en agregar 200 µL de muestra a 400 µL de acetona, previamente enfriada a -20°C por 2 h. La mezcla se mantuvo a esta misma temperatura toda la noche y pasado este tiempo el precipitado se centrifugó a 20.000 x g por 20 min y a 4°C. El sobrenadante fue removido, la pella obtenida se secó por centrifugación al vacío durante 30 min y la muestra obtenida se resuspendió en 35 µL de amortiguador Laemmli.

2.6.3. Inmunoprecipitación con proteína A/G Agarosa unida a anticuerpos.

La inmunoprecipitación de los 3 NFs con proteína A/G agarosa unida a anticuerpos se llevó a cabo por 2 protocolos diferentes, variando la cantidad de muestra, es decir, los mg totales de proteína inmunoprecipitada, así como también el volumen y tiempo de tratamiento con la proteína A/G Agarosa. En cualquiera de los 2 casos, todas las muestras se trabajaron en presencia de inhibidores de proteasas (PMSF 1 µmol/mL,

aprotinina 2 µg/mL, pepstatina 1 µg/mL, leupeptina 20 µg/mL) e inhibidor de fosfatasa (vanadato de sodio 1 mM).

Protocolo 1: Para cada NF se utilizó el mismo procedimiento, variando el anticuerpo unido a la proteína A/G agarosa, según correspondiese con la subunidad a inmunoprecipitar (NF-L, NF-M ó NF-H). En los 3 casos el anticuerpo primario fue de naturaleza policlonal.

a) NF-L y NF-M: El protocolo consistió en incubar 60 µL de muestra con 1 µL de anticuerpo policlonal contra NF-L o NF-M, según correspondiese. Esta mezcla se incubó toda la noche a 4°C y posteriormente se agregaron 40 µL de proteína A/G agarosa previamente ambientada (4 lavados) en amortiguador de Ipp que contiene Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 y NaCl 150 mM. La mezcla final se incubó 2,5 h a T° ambiente. Pasado este tiempo se centrifugó en microfuga a 3.000 rpm durante 1 minuto, la pella obtenida se lavó 5 veces con amortiguador de Ipp y finalmente se resuspendió en 40 µL de amortiguador Laemmli. Se guardó a -20 °C hasta su uso.

b) NF-H: El protocolo consistió en incubar 60 µL de muestra con 2 µL de anticuerpo policlonal contra NF-H. Esta mezcla se incubó toda la noche a 4°C y posteriormente se agregaron 40 µL de proteína A/G agarosa previamente ambientada (4 lavados) en amortiguador de Ipp que contiene Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 y NaCl 150 mM. La mezcla final se incubó 2,5 h a T° ambiente. Pasado este tiempo se centrifugó en microfuga a 3.000 rpm durante 1 minuto, la pella obtenida se lavó 5 veces con amortiguador de Ipp y finalmente se resuspendió en 40 µL de amortiguador Laemmli. Se guardó a -20 °C hasta su uso.

El segundo conjunto de inmunoprecipitados se obtuvo trabajando con 2 anticuerpos monoclonales, contra NF-L y contra NF-M+H, haciendo uso del **protocolo 1**. En este caso los volúmenes de anticuerpos utilizados fueron: 2,4 µL de mAc contra NF-L y 4,5µL de mAc contra NF-M+H.

Protocolo 2: Consistió en agregar un volumen de 60 µL de proteína A/G agarosa ambientada en amortiguador de Ipp a 1 mL de muestra de LCR. La mezcla se incubó 1 h a 4°C con el objeto de limpiar el sistema de las inmunoglobulinas (IgG principalmente) presentes en el LCR, optimizando la cantidad de anticuerpo presente para reaccionar con el antígeno de interés, en este caso, las proteínas NF-M y NF-H. A continuación se

centrifugó 5 min a 11.000 rpm, a 4°C y el sobrenadante se mezcló con 4,5 µL de anticuerpo contra NF-M+H. Se incubó 1 h a 4°C, y se agregaron 62,5 µL de proteína A/G agarosa. Esta mezcla se dejó reaccionar por 3 h a 4°C. Luego de centrifugar en las mismas condiciones descritas anteriormente, la pella se lavó con amortiguador de Ipp, se resuspendió en 35 µL de amortiguador Laemmli y se guardó a -20 °C hasta su uso.

2.6.4. Inmunoprecipitación con CNBr-Sefarosa unida a Anticuerpos.

Esta técnica se escogió dada la necesidad de eliminar, específicamente, el anticuerpo residual utilizado para inmunoprecipitar el NF-L. Lo anterior tuvo su fundamento en la similitud de la masa molecular de la cadena pesada de IgG con la del NF-L, resultando en una posible superposición de bandas inmunorreactivas detectadas en el “immunowestern-blot”.

El protocolo consistió, en una primera etapa, en activar la Sefarosa con HCl 1 mM y acoplar el anticuerpo a utilizar. En relación a esto último, se realizaron 2 experimentos paralelos para inmunoprecipitar la proteína NF-L. En un caso se acopló un anticuerpo monoclonal contra NF-L (Chemicon mAB-13-0400), y en el otro, policlonales contra NF-L (Chemicon AB-9568). Para llevar a cabo el acoplamiento se hidrataron 0,1 g de resina seca en solución HCl 1 mM y se dejó 15 min a T° ambiente. Luego de esto la resina se lavó 4 veces con dicha solución, centrifugando cada vez en microfuga a 6.000 rpm por 5 min. Posteriormente se agregaron 300 µL de amortiguador de acoplamiento (NaHCO₃ 0,1 M pH 8,3, NaCl 0,5 M), se centrifugó inmediatamente la resina y se removió el sobrenadante, ya que en esta etapa hay una rápida reacción del agua con la CNBr-Sefarosa a medida que aumenta el pH. Luego, en la misma solución anterior se agregó el anticuerpo a acoplar (5 µL para anticuerpo monoclonal NF-L y 3,5 µL para anticuerpo policlonal NF-L), y se dejó incubar con la resina en agitación orbital toda la noche a 4 °C. Pasado este tiempo la resina se centrifugó y se guardó el sobrenadante para analizar si el acoplamiento fue exitoso. La Sefarosa se resuspendió en 500 µL de solución Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 para bloquear los grupos reactivos remanentes, durante un período de 5 h o toda la noche, en rotor y a 4°C. Luego se centrifugó nuevamente y la resina se lavó 3 veces con amortiguador de inmunoprecipitación (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 y NaCl 150 mM). Inmediatamente se

agregó la muestra de proteínas, en este caso LCR (50 µL de LCR concentrado 4 veces, en todos los casos), y se dejó en rotor toda la noche a 4 °C. La etapa siguiente consistió en eluir del sistema resina-anticuerpo-LCR exclusivamente la proteína de interés que fue inmunoprecipitada, y para esto se incubó la resina durante 10 min con amortiguador glicina 0,2M pH 2,5 con 150 mM NaCl, sin agitación y a T° ambiente. Finalmente se centrifugó la resina y el sobrenadante se resuspendió en 20 µL de amortiguador Laemmli. La resina con el anticuerpo acoplado se resuspendió en solución de inmunoprecipitación y se guardó a 4 °C, con la posibilidad de ser reutilizada.

2.7. "Immunowestern-blot".

Se realizó una electrotransferencia según Towbin (1979), utilizando geles SDS/PAGE de 0,75 mm 7,5 % para separar las proteínas NF-H y NF-M, y al 10% para separar la proteína NF-L, según Laemmli (1970). Posterior a esto, se realizaron electrotransferencias en diferentes condiciones, donde las proteínas del gel de poliacrilamida pasan a una membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro 0,45 µm siendo, en general, una etapa crítica en este proceso la ambientación del gel y la membrana en la solución de electrotransferencia a utilizar. Para el desarrollo de esta técnica se utilizó una solución de electrotransferencia que contenía 25 mM Tris, 190 mM glicina, y metanol. Las concentraciones de metanol fueron de 5% para electrotransferir las proteínas NF-M y NF-H, y de 20% cuando se trató de la proteína NF-L. La electrotransferencia se hizo a amperaje constante (200 mA), y se utilizó una fuente de poder LABCONCO por 3 h, a 4°C. Transcurrido el tiempo de electrotransferencia la membrana se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución al 6% p/v de leche descremada en polvo (para NF-L y NF-H), o solución de Quick-Blocker al 6% p/v (para NF-M), ambas disueltas en TBS-T (amortiguador compuesto de Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, Tween-20 al 0,1%, pH 7,6). Pasado el período de bloqueo, se incubó con el anticuerpo primario respectivo, diluido en TBS-T, durante 12 h a 4°C. Los anticuerpos utilizados en cada caso fueron: anticuerpos policlonales contra NF-L (1:7.500), anticuerpos policlonales contra NF-M (1:6.500), anticuerpos policlonales contra NF-H (1:4.000), anticuerpo monoclonal contra-NF-M+H (1:740), anticuerpo monoclonal contra-NF-L (1:1.600), anticuerpos policlonales contra

fosfoserina (1:5.000) y contra fosfotreonina (1:5.000). Posteriormente, la membrana se lavó con TBS-T (3 lavados de 10 min cada uno), y se incubó por 1 h a temperatura ambiente, ya sea con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa, contra-IgG de ratón (1:5.000), en el caso de los anticuerpos primarios monoclonales, o con anticuerpos policlonales conjugados a peroxidasa contra-IgG de conejo (1:25.000), en el caso de los anticuerpos primarios policlonales. Una vez finalizada esta incubación se repitieron los lavados con TBS-T y la reacción se identificó con el método de quimioluminiscencia, utilizando luminol y peróxido de hidrógeno como sustratos de la enzima. La membrana se expuso frente a una placa fotográfica Kodak por tiempos variables y las bandas obtenidas se escanearon y cuantificaron mediante el programa “Uni-Scan-It Automated Digitizing System (USA)”. Se realizaron controles en ausencia de anticuerpo primario para descartar falsos positivos por inmunoreactividad del anticuerpo secundario con proteínas de la muestra (LCR, NFs aislados de tejido, y NFs aislados de células M4b).

2.8. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos de los “immunowestern blots” fueron analizados estadísticamente utilizando el programa SPSS (Statistical Package for the Social Science). Las diferencias entre los grupos control y TSP/HAM fueron evaluadas usando la prueba t para 2 muestras independientes. La significancia estadística fue definida como $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Cuantificación de proteínas de LCR de individuos controles y patológicos.

La cuantificación de proteínas mediante los 3 métodos descritos en la sección 2.3 de Materiales y Métodos arrojó los resultados que se resumen la **Tabla I**:

Tabla I: Cuantificación de proteínas de muestras de LCR.

Nº de muestra	Electroforesis Capilar (EC) (µg/ µL)	Micro BCA (µg/ µL)	Método de Lowry (µg/ µL)
486 c	0,40	0,48	0,42
464 c	0,28	0,32	0,30
419 c	0,20	0,22	0,30
413 c	0,30	0,40	0,45
511 c	0,30	0,42	0,33
485 c	0,32	0,35	0,29
Promedio ± SEM	0,3 ± 0,06	0,36 ± 0,09	0,35 ± 0,07
444 p	0,12	0,10	0,12
509 p	0,21	0,28	0,21
607 p	0,24	0,28	0,28
609 p	0,25	0,21	0,22
644 p	0,27	0,27	0,23
651 p	0,37	0,36	0,32
Promedio ± SEM	0,24 ± 0,08	0,25 ± 0,09	0,23 ± 0,07

*c: control; p: patológico

* valor de referencia en LCR: 0,10 a 0,45 µg/µL

Los resultados indican que para los tres métodos, los valores promedio de concentración de proteínas en el LCR están dentro del rango normal, y son bastante reproducibles para los dos grupos en estudio, no encontrándose diferencias significativas entre las determinaciones por los distintos métodos.

Se eligieron los valores de la EC como representativos de la concentración de proteínas de cada muestra de LCR, debido a las siguientes razones:

- El estándar utilizado para medir proteínas, el cual correspondió a HSA, dado que ésta representa el 80% de las proteínas del LCR.
- La manipulación de las muestras fue menor.

c) El método *per se* presenta menores imprecisiones, ya que la medición la realiza el equipo, y el error humano se ve disminuido.

3.2. Obtención de controles positivos de NFs a partir de células M4b no diferenciadas y tejido cerebral de ratones.

En el caso de los controles positivos provenientes de células M4b, las muestras no fueron sometidas a inmunoprecipitación debido, por una parte, a la gran concentración de proteínas del lisado, y por otra, a la selectividad del reconocimiento del anticuerpo monoclonal. El “immunowestern-blot” para estas muestras con anticuerpo monoclonal contra NF-M+H dio como resultado proteínas con masas moleculares aproximadas de 220 kDa y 140 kDa (**Figura 5**), mientras que el reconocimiento con anticuerpo monoclonal contra NF-L mostró la presencia de bandas de alrededor de 64 kDa y 62 kDa (**Figura 6**).

El “immunowestern blot” de los NFs aislados e inmunoprecipitados de tejido cerebral de ratones dio como resultado diferentes bandas inmunorreactivas al utilizar anticuerpos monoclonales contra NF-L y NF-M+H. En un primer caso, la fracción inmunoprecipitada con anticuerpo monoclonal contra NF-M+H mostró la aparición de 2 bandas de 200 kDa y 150 kDa (**Figura 7**). Por otro lado, la muestra inmunoprecipitada y reconocida con anticuerpo monoclonal contra NF-L dio como resultado la presencia de 2 bandas de 64 kDa y 62 kDa aproximadamente (**Figura 8**).

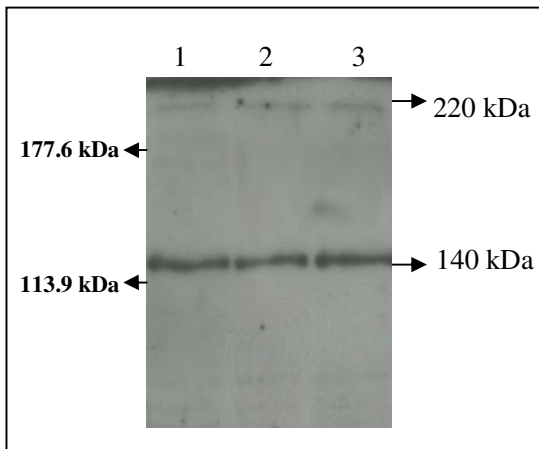


Figura 5: Identificación de NF-M y NF-H obtenidos de células M4b. La identificación se realizó por “immunowestern blot” con un anticuerpo primario monoclonal que reconoce a NF-M y NF-H. Los carriles 1, 2 y 3 representan una muestra de LCR en triplicado. En cada carril se cargaron de 4,5 μ g de proteínas. (A la izquierda se indica el estándar de masa molecular).

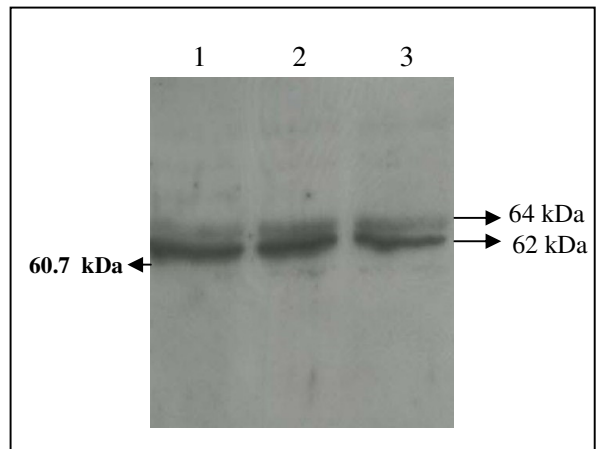


Figura 6: Identificación de NF-L en un lisado de células M4b. La identificación se realizó por immunowestern blot con un anticuerpo primario monoclonal que reconoce a NF-L en dilución 1:600. Los carriles 1, 2 y 3 representan una muestra de LCR en triplicado. En cada carril se cargaron 4,5 μ g de proteínas. (a la izquierda se indica el estándar de masa molecular).

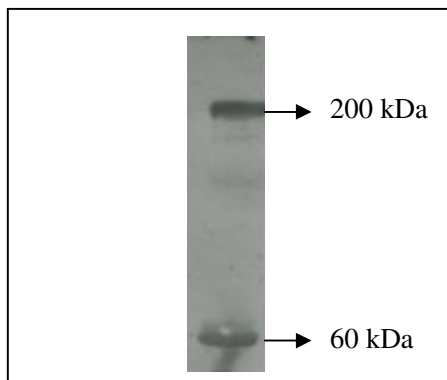


Figura 7: Identificación de NF-M y NF-H inmunoprecipitado de cerebro de ratón. La inmunoprecipitación se realizó con proteína A/G agarosa y un anticuerpo monoclonal que reconoce ambos neurofilamentos. La identificación se realizó por immunowestern blot utilizando el mismo anticuerpo monoclonal en dilución 1:740.

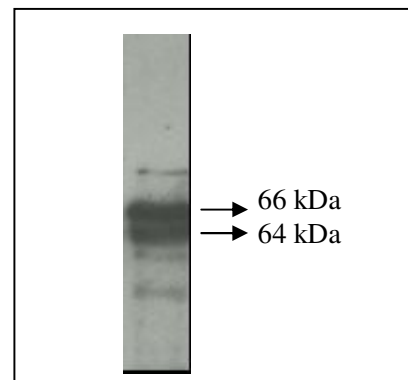


Figura 8: Presencia de bandas inmunorreactivas en Ipp de NF-L, parcialmente purificado de cerebro de ratón. La inmunoprecipitación se hizo usando mAc contra NF-L, acoplado a proteína A/G agarosa. Para el reconocimiento se usó mAc contra NF-L en dilución 1:1.600.

3.3. Detección de la proteína NF-L total, directamente a partir de LCR y su posterior aislamiento mediante inmunoprecipitación.

Una vez aislados e identificados los controles positivos de NFs, se procedió a estudiar su presencia en el LCR de los individuos en estudio. La detección del NF-L se centró en identificarlo, primero, utilizando LCR sin concentrar, y luego a partir de su aislamiento, precipitándolo del LCR con Acs contra NF-L.

El “immunowestern blot” de LCR sin concentrar dio como resultado 2 bandas de masas moleculares aproximadas de 66 kDa y 59 kDa (**Figura 9**). Para avalar dicho resultado fue necesario inmunoprecipitar la proteína y analizar la concordancia de las bandas de los inmunoprecipitados con las del LCR sin concentrar. La inmunoprecipitación de la proteína NF-L del LCR se realizó utilizando tanto un tipo de anticuerpo monoclonal (Zymed mAB13), como 2 policlonales (Chemicon AB1983 y Chemicon AB9568), según las técnicas descritas en la sección (2.6.3 y 2.6.4). Dichos anticuerpos se usaron además para el reconocimiento de las bandas inmunorreactivas en los “immunowestern blot”.

Se analizó la coimmunoprecipitación de las proteínas NF-M y NF-H por 2 protocolos de inmunoprecipitación (con CNBr-Sefarosa y proteína A/G agarosa), utilizados anteriormente para el NF-L. El resultado de este experimento mostró ausencia de coimmunoprecipitación, dando cuenta de la selectividad de los protocolos de inmunoprecipitación utilizados.

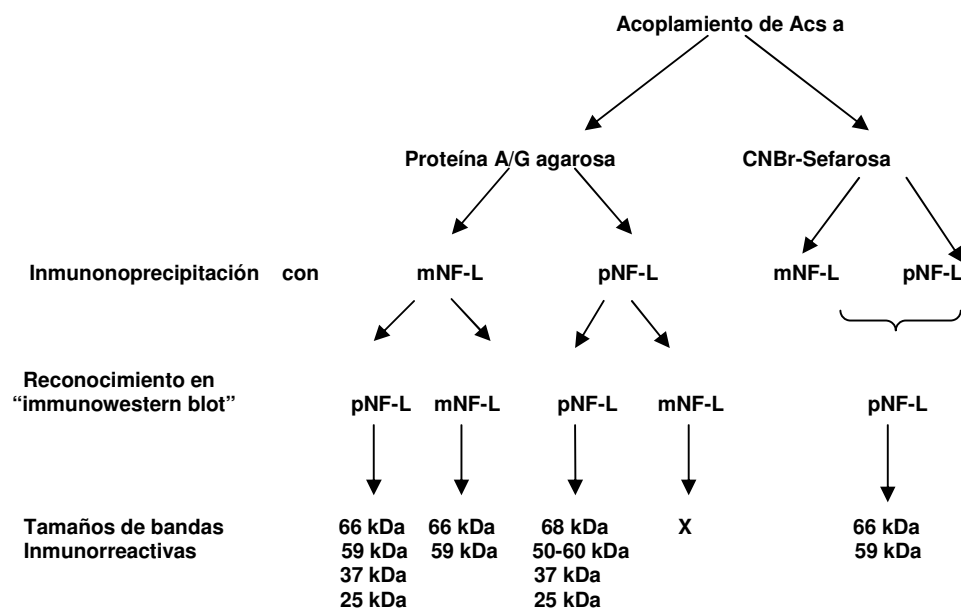
Con la técnica de inmunoprecipitación con CNBr-Sefarosa se realizaron 2 experimentos paralelos. En un caso la CNBr-Sefarosa se acopló al anticuerpo monoclonal contra NF-L, y en el otro a anticuerpos policlonales contra NF-L. Estos últimos fueron utilizados también para el reconocimiento en el “immunowestern blot”. Como resultado, se obtuvieron las mismas bandas anteriores de 66 kDa y 59 kDa (**Figura 10**).

Al inmunoprecipitar con proteína A/G agarosa acoplada al anticuerpo monoclonal contra NF-L, usando el mismo Ac para el reconocimiento, resultado fue la aparición de 2 bandas de 64 kDa y 62 kDa aproximadamente (**Figura 11**). Siguiendo este mismo protocolo, pero ahora con anticuerpos policlonales, se obtuvo una banda de

66 kDa, con una zona de alta densidad de señal en el rango de 50 a 60 kDa, lo que hizo imposible cualquier tipo de análisis densitométrico.

Al realizar los controles sin primer anticuerpo, sólo en el protocolo de inmunoprecipitación utilizando CNBr-Sefarosa **no** se observó la presencia de un excedente del anticuerpo utilizado para inmunoprecipitar, ni de cualquier otra banda inmunorreactiva. Esto sí ocurrió en el caso del protocolo de inmunoprecipitación con proteína A/G agarosa acoplada a anticuerpos policlonales contra NF-L.

La descripción de los experimentos de inmunoprecipitación realizados se detalla en el siguiente esquema:



En resumen, con el protocolo utilizando CNBr-Sefarosa acoplada, ya sea a anticuerpos policlonales como a monoclonales, se obtuvieron los siguientes resultados:

- ausencia de reacción sin utilizar primer anticuerpo, es decir, revelando el "immunowestern blot" sólo con anticuerpo secundario. La ausencia de esta interferencia se demostró además por SDS/PAGE teñido con azul de Coomassie coloidal (resultado no mostrado).
- ausencia de coimmunoprecipitación de las subunidades NF-H y NF-M.

- concordancia entre bandas de LCR sin concentrar y bandas de los inmunoprecipitados.

Estos factores determinaron que se eligiera el protocolo de inmunoprecipitación con CNBr-Sefarosa para aislar la proteína NF-L a partir del total de muestras de LCR analizadas en esta memoria. La **Figura 12** muestra la comparación entre las muestras de LCR sin concentrar y sus respectivos inmunoprecipitados.

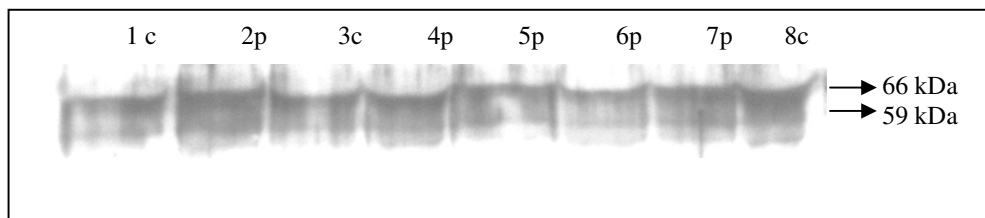


Figura 9: Presencia de bandas de NF-L en muestras de LCR sin concentrar. La detección se realizó con pAcs contra NF-L en dilución 1:7.500. En cada carril se cargaron 4.5 μ g de proteína de las siguientes muestras de LCR: 1) 413, 2) 509, 3) 419, 4) 444, 5) 607, 6) 464, 7) 609, 8) 511. (c: control, p: patológico).

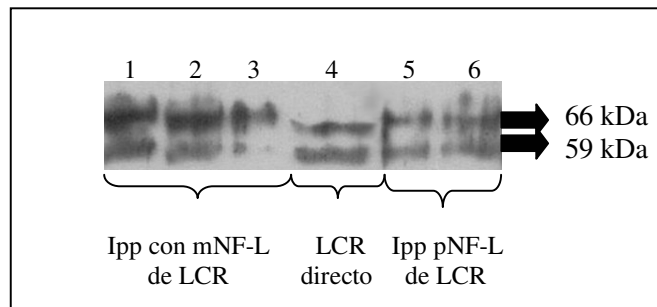


Figura 10: Identificación de la proteína NF-L de LCR sin concentrar e inmunoprecipitada usando CNBr-Sefarosa. Los carriles del 1 al 6 representan una muestra de LCR control en las siguientes condiciones: carril (1-3) inmunoprecipitación con Ac monoclonal contra NF-L; carril (4) LCR sin concentrar; carril (5-6) inmunoprecipitación con pAcs contra NF-L. La detección se realizó con pAcs contra NF-L en dilución 1:7.500

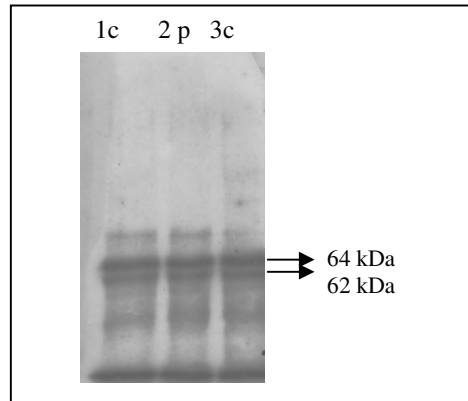


Figura 11 : Detección de bandas de la proteína NF-L. La inmunoprecipitación se hizo utilizando mAc contra NF-L acoplado a proteína A/G Agarosa. El reconocimiento se realizó usando mAc contra NF-L en dilución 1:1.600. Las muestras se presentan en el siguiente orden: 1) 413c, 2) 509c, 3) 511c. En cada caso se utilizaron 32 µg totales de proteína para inmunoprecipitar.

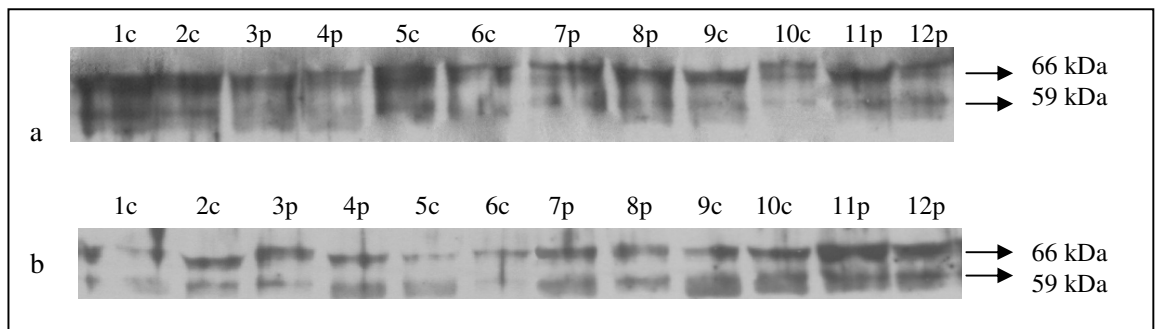


Figura 12: Detección de la proteína NF-L en LCR sin concentrar e inmunoprecipitada. a) “Immunowestern blot” de LCR sin concentrar, utilizando pAcs contra NF-L en dilución 1:7.500.; b) “Immunowestern blot” de LCR inmunoprecipitado según protocolo CNBr-Sefarosa acoplada a mAc contra NF-L. En ambos casos (a y b) las muestras de LCR se presentan en el siguiente orden: 1)486, 2)464, 3)444, 4)509, 5)419, 6)413, 7)607, 8)609, 9)511, 10)485, 11)64912)651. (c: control, p: patológico)

3.4. Detección de proteínas de LCR fosforiladas en treonina y serina

Para el análisis de los posibles residuos fosforilados de la proteína NF-L en serina y treonina, se realizó una comparación mediante “immunowestern blot” entre las bandas inmunorreactivas correspondientes a una muestra de LCR sin concentrar, LCR eluído a partir de columnas de Ga^{3+} , con capacidad de aislar péptidos fosforilados, y un inmunoprecipitado de LCR obtenido del protocolo con CNBr-Sefarosa acoplada a anticuerpo monoclonal contra NF-L. Para el reconocimiento se utilizaron anticuerpos policlonales contra NF-L (Chemicon AB9568). Como resultado se obtuvieron 2 bandas, 66 kDa y 59 kDa, en los 3 casos analizados (**Figura 13**). Se hizo el mismo experimento, usando anticuerpos policlonales contra fosfoserina y fosfotreonina para el reconocimiento. El resultado fue una banda inmunorreactiva de 69 kDa en ambos casos, observándose ausencia de la proteína de 59 kDa (**Figura 14**).

3.4.1. “Immunowestern blot” con anticuerpos policlonales contra fosfotreonina

Al igual que en la sección anterior se hizo una comparación entre las bandas del LCR sin concentrar correspondientes a NF-L, y sus respectivos inmunoprecipitados. El primer caso fue poco selectivo observándose bandas de 69 kDa y 59 kDa (**Figura 15, a**), a diferencia de la inmunoprecipitación, la cual resultó en una única banda inmunorreactiva de 69 kDa, con ausencia de la proteína de 59 kDa. (**Figura 15, b**).

3.4.2. “Immunowestern blot” con anticuerpos policlonales contra fosfoserina

En este caso, se deshibridizaron las membranas anteriores (15a y 15b), y se trataron con anticuerpos contra fosfoserina.

En el caso de las muestras de LCR sin concentrar, se evidenciaron 2 bandas inmunorreactivas principales de 69 kDa y 60 kDa (**Figura 16, a**). En cuanto a los inmunoprecipitados, el resultado fue una banda de 69 kDa (**Figura 16, b**).

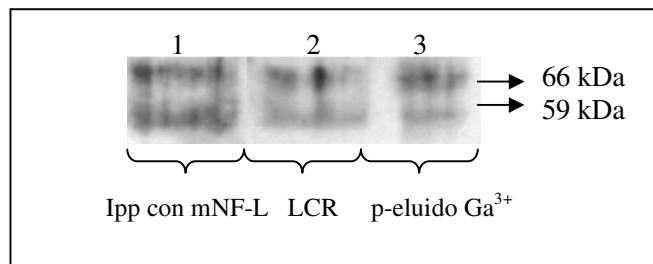


Figura 13 : Concordancia del patrón de bandas inmunoreactivas de NF-L. La inmunoprecipitación de NF-L de LCR usando CNBr-Sefarosa acoplada a mAcS contra NF-L, fue concordante con el LCR sin concentrar. Carril (1) NF-L Ipp de LCR, carril (2) LCR sin concentrar y carril (3) fosfopéptidos de LCR aislados mediante Ga^{3+} . Para la detección se usaron pAcS mono-específicos contra NF-L en dilución 1:7.500.

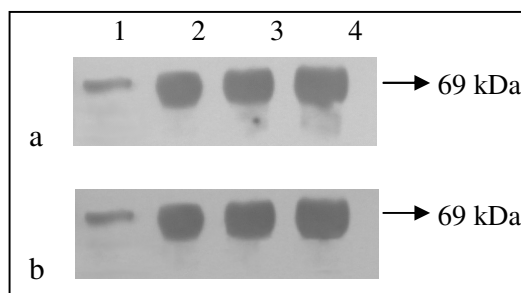


Figura 14 : Detección de residuos fosforilados en la proteína NF-L. a y b muestran comparación de bandas inmunorreactivas entre: Carril (1) inmunoprecipitado de NF-L a partir de LCR usando CNBr-Sefarosa acoplada a mAC contra NF-L, (2-3) fosfopéptidos aislados con Ga^{3+} y (4) LCR sin concentrar. En (a) la detección se hizo con pAcS contra fosfoserina en dilución 1:5.000 y (b) pAcS contra fosfotreonina en dilución 1:5.000.

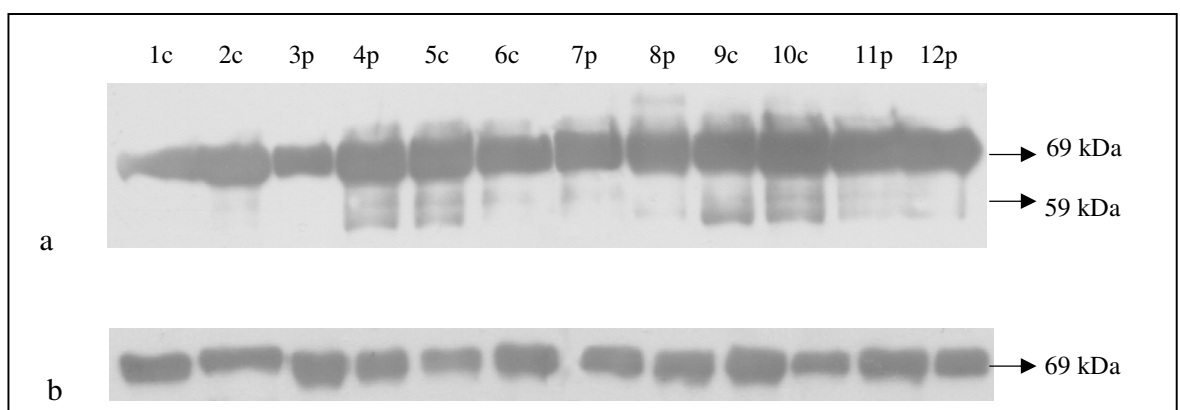


Figura 15: Presencia de residuos fosforilados en muestras de LCR con y sin separación por técnicas de afinidad a) Detección de bandas inmunorreactivas de proteínas fosforiladas de LCR sin concentrar; b) Reconocimiento de bandas inmunorreactivas de inmunoprecipitados de NF-L obtenidos de las muestras detectadas en a). En a y b la detección fue con pAcS contra fosfotreonina (1:5.000) (c:control, p: patológico).

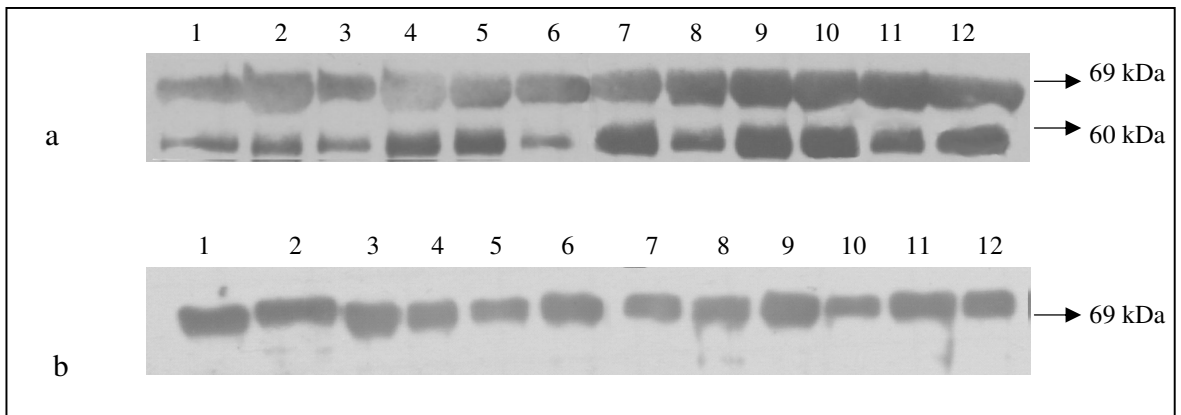


Figura 16: Presencia de residuos fosforilados en muestras de LCR sin concentrar e inmunoprecipitadas. a) Detección de bandas inmunorreactivas de proteínas fosforiladas a partir de LCR sin concentrar; **b)** Reconocimiento de bandas inmunorreactivas de inmunoprecipitados de NF-L obtenidos de las muestras detectadas en a). En ambos casos la detección fue con pAcs contra fosfoserina en dilución 1:5.000. (c:control, p: patológico).

3.5. Análisis estadístico de los niveles de proteína NF-L total y su fosforilación en treonina y serina, en individuos controles y patológicos.

Para este análisis los pixeles correspondientes a cada caso estudiado, fueron normalizados por μg totales de proteína utilizados para inmunoprecipitar. En el caso del NF-L total detectado en LCR sin concentrar, la normalización se hizo por μg de proteína cargados en el gel. No se realizó análisis de fosforilaciones en este caso (LCR sin concentrar) debido a la inespecificidad de los anticuerpos contra fosfoserina y fosfotreonina frente a la gran cantidad de proteínas fosforiladas en el LCR.

La **Tabla II** resume los valores obtenidos de los experimentos en los que se analizaron comparativamente los niveles de NF-L total y los residuos fosforilados en serina y treonina entre ambos grupos. En la **Figura 17** se analizaron independientemente los niveles de las proteínas de 59 kDa y 66 kDa para los grupos control y patológico.

Tabla II: Análisis estadístico de la proteína NF-L total de 66 kDa, y sus fosforilaciones en serina y treonina. La proteína de 59 kDa no presentó inmunorreactividad frente a anticuerpos contra fosfoserina y treonina.

*Los valores se presentan como el promedio \pm SEM; $p < 0,05$

EPITOPOS ANALIZADOS	CONTROLES (píxel/μg HSA total)	PATOLÓGICOS (píxel/μg HSA total)	VALOR p
Proteína NF-L total de LCR sin concentrar (59 kDa)	3.310 \pm 150 n = 6	8.930 \pm 830 n = 6	0,014
Proteína NF-L total de LCR sin concentrar (66 kda)	9.810 \pm 220 n = 6	16.300 \pm 830 n = 6	0,073
Proteína NF-L total Ipp de LCR (59 kda)	560 \pm 164 n = 6	1.188 \pm 128 n = 6	0,013
Proteína NF-L total Ipp de LCR (66 kda)	5.344 \pm 431 n = 6	7.110 \pm 756 n=6	0,066
Fosforilación en Thr (66 kda)	4.702 \pm 244 n = 6	4.418 \pm 488 n = 6	0,616
Fosforilación en Ser (66 kda)	2.966 \pm 795 n = 6	3.771 \pm 434 n = 6	0,400

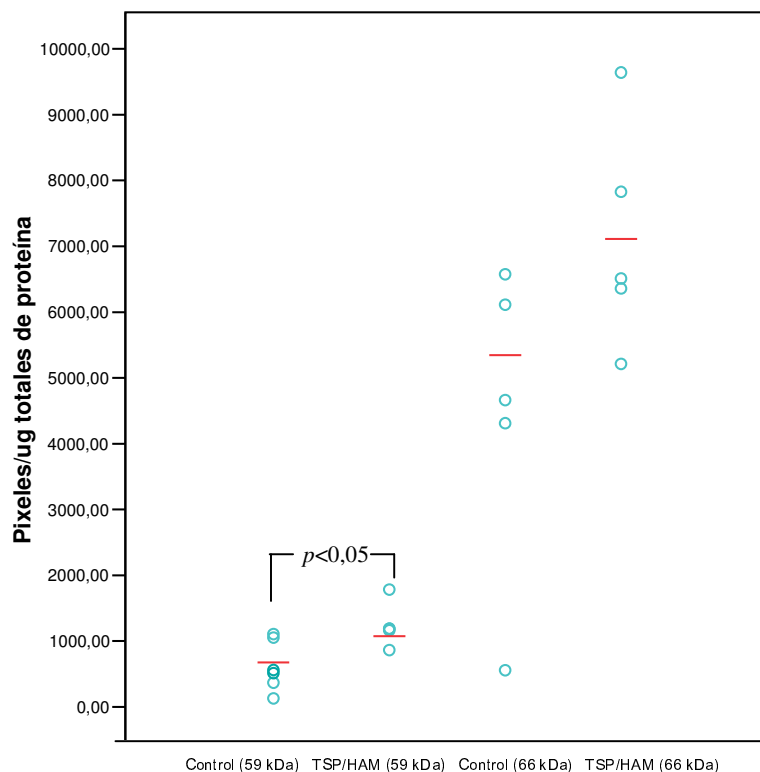


Figura 17 : Comparación de niveles de proteína NF-L Ipp de LCR, entre individuos control y patológicos. Los 2 primeros grupos corresponden al análisis de la proteína de 59 kDa, mientras que los 2 restantes se refieren a la proteína de 66 kDa. La línea transversal indica el promedio para cada conjunto de datos.

3.6. Detección de la proteína NF-M total a partir de LCR, concentrada con acetona.

La identificación del NF-M a partir de LCR sin concentrar no fue posible, por encontrarse fuera del límite de detección de la técnica. A su vez, los resultados de inmunoprecipitación del LCR fueron poco resolutivos, así como también muy poco reproducibles, observándose bandas poco definidas y aleatorias según las muestras utilizadas. Para esto se utilizó un protocolo de inmunoprecipitación con proteína A/G agarosa acoplada a anticuerpos policlonales contra NF-M. Las condiciones de electrotransferencia e “immunowestern blot” se optimizaron para detectar en forma específica el NF-M en LCR. El resultado mostró 3 bandas inmunorreactivas principales a la altura de 180 kDa, 170 kDa y 150 kDa (**Figura 18**). Como se mencionó recién, debido a la poca reproducibilidad de la técnica de inmunoprecipitación, los resultados

obtenidos fueron útiles sólo para analizar la concordancia entre estas bandas inmunorreactivas y las obtenidas mediante concentración de proteínas del LCR por precipitación con acetona. En este caso, el resultado fue la aparición de 2 bandas de 170 kDa y 150 kDa aproximadamente, viéndose en algunas muestras de LCR una banda inmunorreactiva de 180 kDa aproximadamente (**Figura 19**).

3.7. Detección de residuos fosforilados de NF-M en treonina y serina.

Para analizar los residuos fosforilados en serina y treonina, se deshibridizó secuencialmente la membrana tratada con anticuerpo contra NF-M. En cualquiera de los dos casos las bandas detectadas correspondieron a los tamaños indicados en el párrafo anterior de 170 kDa y 150 kDa, más una banda de alrededor de 180 kDa.

Se realizó un control utilizando anticuerpos policlonales contra NF-H para detectar algún tipo de inmunoreactividad dando como resultado ausencia completa de señal.

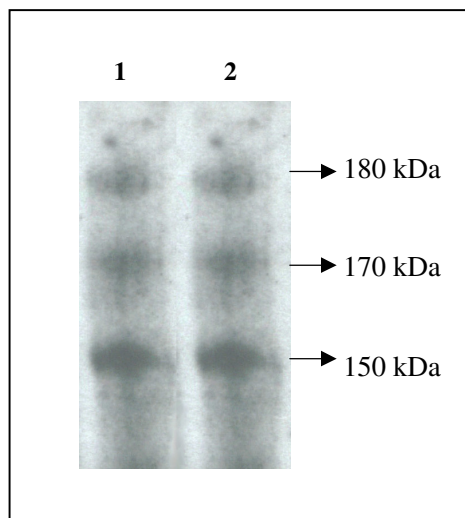


Figura 18: Detección de proteína NF-M inmunoprecipitada a partir de LCR. La inmunoprecipitación se realizó con pAcs contra NF-M acoplados a proteína A/G Agarosa. Carril (1-2) Ipp de LCR en duplicado de muestra 413c. El reconocimiento se hizo utilizando pAcs contra NF-M en dilución 1:5.000

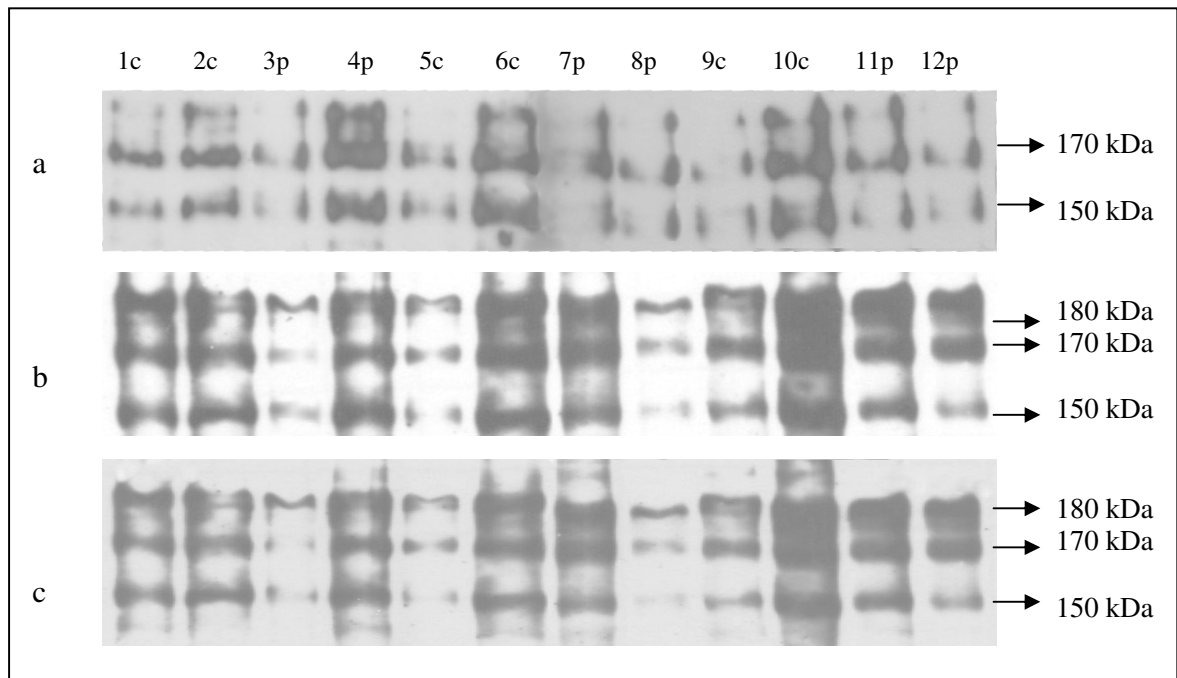


Figura 19: Detección de proteína NF-M de 170 kDa y 150 kDa y sus respectivas fosfoformas a) “Immunowestern blot” utilizando pAcs contra NF-M 1:5.000; **b)** “Immunowestern blot” utilizando pAcs contra pThr (1:5.000); **c)** “Immunowestern blot” utilizando pAcs contra pSer (1:5.000). En los 3 casos las muestras se presentan en el siguiente orden: 1) 486, 2) 464, 3) 444, 4) 509, 5) 419, 6) 413, 7) 607, 8) 609, 9) 511, 10) 485, 11) 649, 12) 651. (c: control, p: patológico).

3.8. Análisis estadístico de los niveles de proteína NF-M total y su fosforilación en treonina y serina, en individuos controles y patológicos.

Las **Tablas III** y **IV** detallan los valores para los grupos control y patológico. La relación entre NF-M fosforilado y NF-M total (pNF/NF) se muestra para ambos residuos fosforilados. Este análisis se hizo para la proteína de 170 kDa y para la de 150 kDa. No se realizó análisis estadístico para la banda de 180 kDa ya que ésta fue débilmente reconocida por los pAcs contra NF-M.

Tabla III: Análisis estadístico de la proteína NF-M de 150 kDa, y sus fosforilaciones en serina y treonina. Los valores se presentan como el promedio \pm SEM; $p < 0,05$.

EPITOPO ANALIZADO	CONTROL (píxel/ μ g proteína cargados)	PATOLÓGICO (píxel/ μ g proteína cargados)	VALOR p
NF-M 150 kDa	45.008 \pm 5.567 n = 6	23.623 \pm 3780 n = 6	0,013
RESIDUOS FOSFORILADOS EN Thr	57.687 \pm 1.473,4 n = 6	47.015 \pm 1135,2 n = 6	0,579
RESIDUOS FOSFORILADOS EN Ser	24.583 \pm 4.993 n = 6	35.326 \pm 6102 n = 6	0,210
pThr-NF-M/NF-M	0,48 \pm 0,24 n = 6	0,53 \pm 0,36 n = 6	0,331
pSer-NF-M/NF-M	0,65 \pm 0,30 n = 6	1,1 \pm 0,21 n = 6	0,270

Tabla IV: Análisis estadístico de la proteína NF-M de 170 kDa, y sus fosforilaciones en serina y treonina. Los valores se presentan como el promedio \pm SEM; $p < 0,05$.

Epitopo analizado	CONTROL (píxel/ μ g proteína cargados)	PATOLÓGICO (píxel/ μ g proteína cargados)	p value
NF-M 170 kDa	37.097 \pm 4.905 n = 6	46.560 \pm 9.073 n = 6	$p = 0,386$
Residuos Fosforilados en Thr	17.174 \pm 2.980 n = 6	18.791 \pm 4.428 n = 6	$p = 0,770$
Residuos fosforilados en Ser	29.481 \pm 2.393 n = 6	21.549 \pm 3.707 n = 6	$p = 0,110$
pThr-NF-M/NF-M	0,55 \pm 0,16 n = 6	0,51 \pm 0,16 n = 6	$p = 0,860$
pSer-NF-M/NF-M	0,93 \pm 0,32 n = 6	0,61 \pm 0,14 n = 6	$p = 0,160$

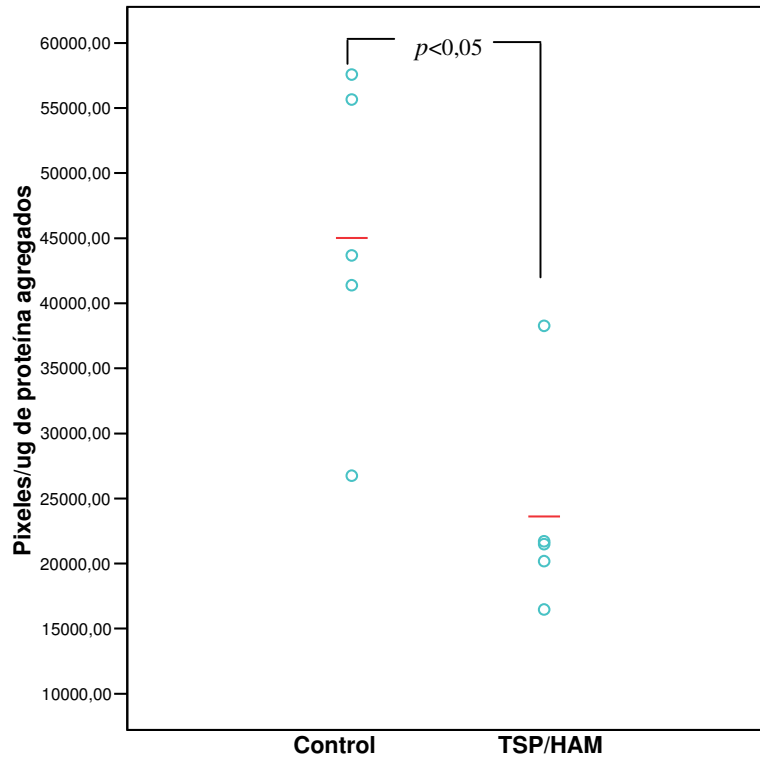


Figura 20: Comparación de niveles de proteína NF-M de 150 kDa entre individuos controles y patológicos. La línea transversal indica el promedio para cada conjunto de datos.

3.9. Detección del NF-H inmunoprecipitado a partir de LCR

Para la realización de este experimento se trabajó con el protocolo 1 y 2 de inmunoprecipitación descrito en la sección 2.6.3. Para detectar NF-H en LCR, al igual que para el NF-M se optimizaron las condiciones de electrotransferencia y técnica inmunológica. La inmunoprecipitación con un anticuerpo monoclonal contra NF-M+H acoplado a proteína A/G agarosa, dio como resultado 2 bandas, la primera superior a 180 kDa y la segunda de 170 kDa (Figura 21-a). En el caso de la inmunoprecipitación con anticuerpos policlonales contra NF-H, acoplados a proteína A/G Agarosa, el resultado

mostró la presencia de bandas de 200 kDa, 170 kDa y 100 kDa. En ambos casos el anticuerpo primario utilizado correspondió a anticuerpos policlonales contra NF-H.

El protocolo 1 de Inmunoprecipitación con proteína A/G-Agarosa fue menos reproducible que el protocolo 2. La diferencia principal entre estos dos protocolos fue la cantidad de muestra de LCR utilizada para inmunoprecipitar, siendo considerablemente mayor en este último.

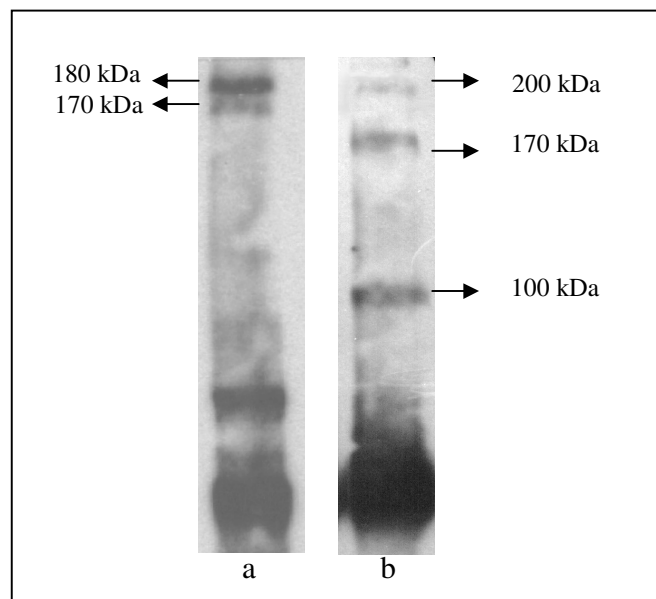


Figura 21: Detección de proteína NF-H mediante inmunoprecipitación a partir de LCR. a) “Immunowestern blot” de proteína NF-H inmunoprecipitada utilizando protocolo 1 (sección 2.6.3). La detección se realizó con pAcs contra NF-H en dilución 1:3.000; **b)** “Immunowestern blot” de proteína NF-H inmunoprecipitada utilizando protocolo 2 (sección 2.6.3). La detección se realizó con pAcs contra NF-H en dilución 1:3.000

4. DISCUSSION

En esta memoria se evidenció la presencia de la proteína NF-L directamente a partir del LCR de individuos controles y pacientes con TSP/HAM. En el caso de las proteínas NF-M y NF-H, la detección se produjo luego de que fueron concentradas del LCR, lo que concuerda con sus menores niveles, comparados con los del NF-L. La detección, como primera etapa, fue necesaria para comprobar la presencia de los 3 NFs, ya que las concentraciones en el LCR en condiciones normales están descritas para el NF-L y NF-H. Sin embargo, dado que la determinación de modificaciones en su estado de fosforilación en individuos con TSP/HAM implicó un estudio comparativo de estas proteínas en los 2 grupos en estudio, se requirió necesariamente de su cuantificación. Para esto se debieron estandarizar y optimizar técnicas de inmunoprecipitación y concentración de proteínas del LCR, así como también los “immunowestern blots” en forma particular para cada neurofilamento, debido a las diferencias en sus masas moleculares. De sus respectivas concentraciones en el LCR se deduce que si la relación de asociación es de aproximadamente 5:2:1 (NF-L:NF-M:NF-H), su liberación al medio extracelular producto de un daño axonal sería proporcional a estas cantidades. Lo anterior se comprueba con estudios en los que, mediante ELISA, han medido las concentraciones de la proteína NF-L y NF-H en el LCR, resultando en valores de alrededor de 250 ng/L y 260 ng/L, respectivamente (Gisslén y cols., 2005; Shaw y cols., 2005). El cálculo de las razones molares con estas cantidades da cuenta de una relación de 4:1 (NF-L:NF-H), bastante cercana a la descrita en la literatura. En la práctica, los “immunowestern blots” para detección de las respectivas proteínas totales dan cuenta de aquello, ya que en el caso del NF-L no se requirió concentrar la proteína, siendo posible su detección directa en el LCR.

En relación al LCR, su idoneidad para el análisis de procesos neurodegenerativos radica en características propias de su síntesis y distribución, ya que por circular en el espacio subaracnoideo, fuera del cerebro y la médula espinal, se encuentra en contacto directo con el fluido intersticial del SNC. De esta manera, es posible esperar que cambios bioquímicos en los haces corticoespinales se vean reflejados en el LCR, más aun si se está llevando a cabo un proceso degenerativo e incluso desmielinizante. Estos

cambios pueden traducirse en biomarcadores característicos de ciertas patologías, permitiendo su diagnóstico. La correcta evidencia de los mismos en una población afectada por una enfermedad neurodegenerativa, con respecto a una control, debe ser avalada por la presencia, ausencia o invariabilidad del marcador en este último grupo. Es así como en el año 2005 se realizó un estudio tendiente a analizar comparativamente el perfil proteómico intra e interindividuos en muestras de LCR. En el caso del grupo de individuos control, no se observaron diferencias significativas en los niveles de proteínas neurofilamento (intra e interindividuos), no así en el caso de la β_2 -microglobulina y tiorredoxina, entre otras, las cuales presentaron fluctuaciones considerables. Esto último respalda el trabajo con LCR para analizar cambios en los niveles de las proteínas neurofilamento en pacientes con TSP/HAM (Hu y cols., 2005)

Ahora bien, el “immunowestern blot” fue la técnica de elección para la comparación de los niveles de las fosfoformas de los NFs entre los dos grupos en estudio, debido a que presenta una serie de ventajas cuando se compara con el análisis por ELISA, comúnmente utilizado para medir concentración de neurofilamentos en LCR. Además de ser más económico, permite el análisis de las fosforilaciones en serina y treonina, específicamente en las proteínas de interés aisladas del LCR, dando cuenta a cabalidad de la presencia o ausencia de inmunorreactividad cruzada debido a la posibilidad de comparar las masas moleculares.

En el caso del NF-L, a pesar de su detección en el LCR sin concentrar, fue igualmente aislado utilizando inmunoprecipitación con CNBr-Sefarosa, la que eliminó la interferencia del anticuerpo usado para precipitar el NF-L. Se ha descrito que la masa molecular de la cadena pesada de las inmunoglobulinas puede variar de 45 kDa a 66,2 kDa (Daley y cols., 2005). Al detectar el NF-L directamente del LCR, las masas moleculares de las bandas inmunorreactivas fueron de aproximadamente 66 kDa y 59 kDa, según lo indica la **Figura 9**. Por lo tanto, la necesidad de eliminar el anticuerpo precipitante se basó en su diferencia, de unos pocos Daltons, con respecto al NF-L. Con esta técnica fue posible cuantificar los niveles de esta proteína para la banda de 59 kDa en todas las muestras de LCR. No se obtuvieron datos de fosforilación para esta proteína, debido a que no presentó inmunorreactividad frente a anticuerpos contra fosfoserina o fosfotreonina, lo cual resulta muy interesante, considerando la

susceptibilidad de los 3 NFs frente a la acción de proteasas, al encontrarse desfosforilados. De lo anterior podría deducirse que la banda de 59 kDa corresponde a un producto de degradación de una proteína de 66 kDa, que al encontrarse desfosforilada fue un buen sustrato para proteasas, generando además un péptido de aproximadamente 7 kDa. Un futuro experimento podría ser detectar con Acs contra NF-L la existencia de dicho péptido a partir de NF-L inmunoprecipitado de LCR, ya que los anticuerpos utilizados para dicho fin reconocen un epitopo independiente de fosforilación. Un segundo experimento para analizar una posible fosforilación del péptido debería arrojar un resultado negativo, lo que ayudaría a explicar el hecho de la proteólisis de la proteína de 66 kDa. No se puede suponer una ausencia completa de fosforilación en la proteína de 59 kDa, sino que más bien la técnica utilizada para aislar la proteína (inmunoprecipitación) y las condiciones en las que fueron realizados los “immunowestern blots” no mostraron fosforilaciones en serina y treonina. Sin embargo, el “immunowestern blot” de un eluido de LCR obtenido mediante tratamiento con columnas de Ga^{3+} , las que permiten un aislamiento selectivo de péptidos fosforilados, y reconocido con pAcs contra NF-L, mostró bandas inmunorreactivas de 66 kDa y 59 kDa. Si bien la banda de 59 kDa concuerda con la del NF-L inmunoprecipitado, no podemos relacionarlas, ya que además de la gran variedad de proteínas presentes en el LCR, un gran porcentaje de ellas encuentra fosforilado.

No se realizó un análisis estadístico de fosforilaciones en serina y treonina para la proteína de 66 kDa, ya que no se descarta una contaminación con HSA en los inmunoprecipitados. Esta proteína al encontrarse fosforilada resulta en falsos positivos, reaccionando con pACs contra treonina y serina fosforiladas, los cuales son muy inespecíficos.

La significancia estadística en los niveles de la proteína de 59 kDa total entre controles y patológicos, detectada en LCR sin concentrar así como también en inmunoprecipitados, podría ser un hecho indicativo del aumento en la degradación del NF-L en los individuos con TSP/HAM. Su aumento en este último grupo podría relacionarse con el proceso de degeneración axonal que se está llevando a cabo, ratificando la elevación característica que se ha descrito para el NF-L total en otras enfermedades neurodegenerativas.

En cuanto al NF-M, su detección mediante inmunoprecipitación fue un tanto aleatoria. Los experimentos presentaron mucho fondo, lo que se tradujo en un sistema poco limpio. Este resultado cambió cuando la selectividad del ensayo dependió de las condiciones de la electrotransferencia, reduciéndose la concentración de metanol a un 5%. Una menor concentración de metanol implica la transferencia de proteínas de mayor masa molecular debido a un aumento en el tamaño del poro del gel. Sumando a esto la especificidad del reconocimiento del anticuerpo primario (pAcs contra NF-M), y la precipitación de la proteína del LCR, se logró una detección muy limpia, con masas moleculares concordantes con la proteína NF-M.

El análisis estadístico para los niveles de la proteína NF-M total de 150 kDa mostró una diferencia significativa entre el grupo control y TSP/HAM, viéndose disminuida en este último caso. La proteína NF-H, dada su baja concentración en el LCR, fue posible detectarla sólo mediante inmunoprecipitación, donde el protocolo más efectivo consistió en utilizar 1 mL de LCR. El gran volumen requerido hizo imposible su cuantificación considerando el reducido volumen que se obtiene de cada punción lumbar.

Para las proteínas NF-L y NF-M, la posibilidad de deshibridizar las membranas de nitrocelulosa utilizadas en cada ensayo, permitió obtener resultados altamente reproducibles y repetibles, permitiéndonos hacer comparaciones de masas moleculares de proteínas detectadas con diferentes anticuerpos.

Tomando en consideración los aspectos analizados hasta este punto, lo que se buscó con la estandarización de las técnicas mencionadas, fue un acercamiento preliminar hacia la patogenia de TSP/HAM. El hecho de que sea preliminar radica en la naturaleza semicuantitativa de la técnica de “immunowestern blot”, así como también en el bajo número de muestras analizadas. Aumentar el número de datos en cada grupo podría resultar en diferencias estadísticamente significativas en casos como el de la proteína NF-L total de 66 kDa. Los niveles de esta proteína fueron mayores en el grupo TSP/HAM, con un valor de $p = 0,07$ en el LCR sin concentrar, y un $p = 0,06$ para la proteína inmunoprecipitada. Ambos valores fueron cercanos al valor p definido como significativo ($p < 0,05$).

Ahora bien, TSP/HAM es una enfermedad de las neuronas motoras superiores, que afecta primeramente las extremidades inferiores. Durante mucho tiempo se ha vinculado a los neurofilamentos en la patogénesis de varias enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple (EM) y la esclerosis lateral amiotrofica (ELA) o enfermedad de las motoneuronas (EMN), entre otras (Ruiz-Ederra y Vecino, 2001; Teunissen y cols., 2005). Todas ellas tienen características neuropatológicas comunes, como degeneración axonal y desmielinización de las motoneuronas. Diversas investigaciones se han centrado en el estudio del desensamblaje y acumulación de los neurofilamentos en los somas y axones de las motoneuronas, debido a una desregulación en la maquinaria que participa en la fosforilación de las subunidades NF-H y NF-M, principalmente. Esta hipótesis se basa en el hecho de que una hiperfosforilación aumenta la carga neta negativa de los neurofilamentos, incrementando las fuerzas de repulsión entre ellos. Esto último traería como consecuencia un desensamblaje del filamento intermedio, con la consiguiente degeneración axonal. Sin embargo, contrario a este planteamiento se ha visto un aumento en la inmunorreactividad hacia la forma no fosforilada de los neurofilamentos en ratones y primates con EM (Teunissen y cols., 2005). De la misma manera, un estudio realizado con muestras de LCR de pacientes con EMN demostró la neurotoxicidad de este fluido frente a un cultivo neuronal primario produciendo los siguientes efectos: aumento de los niveles de apoptosis, inducción de acumulación de neurofilamentos no fosforilados y reducción de los niveles de fosforilación de los neurofilamentos en el soma neuronal (Tikka y cols., 2002). Sumado a estos antecedentes, trabajos previos han correlacionado la mielinización con un aumento en los niveles de fosforilación de NFs, y viceversa, contraponiéndose al modelo hiperfosforilado en las enfermedades desmielinizantes (Lucchinetti y cols., 2000). En relación a la integridad de los NFs en el LCR producto de la degeneración axonal, estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la desfosforilación sensibiliza a los neurofilamentos, haciéndolos más susceptibles a la acción de proteasas como la calpaína.

La importancia de los resultados obtenidos en esta memoria radica, en primera instancia, en que la medición de los niveles de NFs y sus fosfoformas mediante “immunowestern blot” no había sido descrita, y dentro de este contexto, no se tenían

referencias de estudios previos para el NF-M que correlacionaran un aumento o disminución de sus niveles en patologías neurodegenerativas. Este estudio preliminar ayuda a sentar un precedente de que efectivamente podría estar ocurriendo una desorganización del citoesqueleto axonal, dada aparentemente por un desbalance en los niveles de los NFs totales, ya que los análisis de fosforilaciones en serina y treonina no arrojaron diferencias significativas entre individuos controles y TSP/HAM. Una alternativa al modelo de hiperfosforilación propuesto muchas veces como la patogenia de ciertas enfermedades neurodegenerativas, sería que la presencia de inmunorreactividad frente a neurofilamentos hiperfosforilados podría explicarse como un mecanismo adaptativo de sobrevida neuronal, y no como el factor que desencadena el desensamblaje del filamento intermedio, trayendo como consecuencia una degeneración axonal.

5. CONCLUSIONES

- Fue posible medir en LCR los niveles de las proteínas NF-L y NF-M mediante “immunowestern blot”, encontrándose sólo una reducción significativa de una banda de 150 kDa correspondiente al NF-M en el grupo TSP/HAM. En cambio, la proteína NF-H sólo se detectó después de inmunoprecipitación.
- El NF-L en el LCR se mostró como una proteína de 66 kDa, característica de la subunidad intacta y otra de 59 kDa, probablemente producto de degradación. Esta última no mostró inmunorreactividad frente a anticuerpos contra residuos de treonina y serina fosforilados. En el caso de la proteína de 66 kDa no fue posible determinar su grado de fosforilación por la sobreposición aparente de varias proteínas fosforiladas.
- El NF-M en el LCR concentrado se encontró como dos bandas una de 150 y otra de 170 kDa, las cuales mostraban inmunorreactividad frente a anticuerpos contra residuos fosforilados. No se observaron diferencias significativas en el grado de fosforilación de serina y treonina.
- De las técnicas de aislamiento de la subunidad liviana de NFs mediante inmunoprecipitación, se encontró que la que emplea anticuerpos unidos covalentemente a CNBr-Sefarosa sería la más adecuada para posteriores análisis de proteómica mediante Espectrometría de Masas por eliminar la interferencia con los anticuerpos usados para precipitar.
- Se requiere de mayores estudios para definir un método de aislamiento de las subunidades mediana y pesada de los NFs para los estudios de proteómica. Podría ser promisorio una previa inmunoprecipitación y posterior utilización de columnas de afinidad con iones metálicos para proteínas fosforiladas o para péptidos, posterior a la digestión triptica.

6. BIBLIOGRAFIA

- About M, Dombrovsky A, Rosner M, Feldman G, Revazova T, Strilitz-Hassan Y, Priel E, Wolfson M, Segal S, Flugel RM. (1993). Regulatory elements and leukemogenicity of HTLV-I and HTLV-II. *J Viral Diseases*. 1: 31-49
- Akizuki S, Setoguchi M, Nakazato O, Yoshida S, Higuchi Y, Yamamoto S, Okajima T. (1988). An autopsy case of human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy. *Hum Pathol*. 19: 988-990
- Arzan I, Schavinsky-Khrapunsky Y, About M. (2004). Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. *Retrovirology*. 1: 1-24
- Aye MM, Matsuoka E, Moritoyo T y cols. (2001). Histopathological análisis of four autopsy cases of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis : inflammatory changes occur simultaneously in the entire central nervous system. *Acta Neuropathol*. 100: 245-252
- Barmak K, Harhaj E, Grant C, Alefantis T, and Wigdahl B. (2003). Human T cell leukemia virus type I-induced disease: pathways to cancer and neurodegeneration. *Virology*. 308: 1-12
- Betts JC, Blackstock WP, Ward MA and Anderton BH. (1997). Identification of Phosphorylation Sites on Neurofilament Proteins by Nanoelectrospray Mass Spectrometry. *J. Biol. Chem*. 272: 12922-12927
- Buczynski J, Yanagihara R, Mora C, Cartier L, Verdugo A, Araya F, Castillo L, Gibbs CJ, Gajdusek CD, Rogers-Johnson P, Liberski PP. (2001). Tropical Spastic Paraparesis. *Folia Neuropathol*. 39: 265-269
- Cartier L, Araya F, Castillo JL, Ruiz F, Gormaz A., Tajima K. (1992). Progressive spastic paraparesis associated with human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I). *Intern. Med*. 31: 1257-1261.
- Cartier L, Cea JG, Vergara C, Araya F, Born P. (1997). Clinical and neuropathological study of six patients with spastic paraparesis associated with HTLV-I: an axomyelinic degeneration of the central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 56: 403-413.
- Cartier L, Ramirez E, Galeno H. (1999). Diagnosis of tropical spastic paraparesis by detection of Tax Gen of HTLV-I: a clinical study of 72 TSP/HAM patients. *Rev. Med. Chi*. 127: 945-952
- Castro-Costa CM, Dom R, Carton H, Goubau P, Santos Tde J, Ferreira MV, Silva Neto FU. (2002). Neuropathology of two Brazilian autopsied cases of tropical spastic paraparesis / HTLV-I associated myelopathy (TSP/HAM) of long evolution. *Arq Neuropsiquiatr*. 60: 531-536
- Chang L and Goldman RD. (2004). Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5: 601-613

- Chan WK, Dickerson A, Ortiz D, Pimenta AF, Moran CM, Motil J, Snyder SJ, Malik K, Pant HC and Shea TB. (2004). Mitogen-activated protein kinase regulates neurofilament axonal transport. *J. Cell Sci.* 117: 4629-4642
- Daenke S, Booth S. (2000). HTLV-I-induced cell fusion is limited at two distinct steps in the fusion pathway after receptor binding. *J. Cell Sci.* 113: 37-44.
- Daley L, Gagliardo F, Duffy M, Smith M, Appleton A. (2005). Application of Monoclonal Antibodies in Functional and Comparative Investigations of Heavy-Chain Immunoglobulins in New World Camelids. *CVI.* 12: 380-386.
- Derse D, Hill SA, Lloyd PA, Chung HK, Morse BA. (2001). Examining human T-lymphotropic virus type 1 infection and replication by cell-free infection with recombinant virus vectors. *J. Virol.* 75: 8461-8468.
- Edlich RF, Arnette JA, Williams FM. (2000). Global epidemic of human T-Cell lymphotropic virus type-1 (HTLV-I). *J. Emerg. Med.* 18: 109-119.
- Fu D, Kuo Y, Liu B, Jeang K, Giam Ch. (2003). Human T-lymphotropic Virus Type I Tax Activates I- κ B Kinase by Inhibiting I- κ B Kinase-associated Serine/Threonine Protein Phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* 278: 1487-1493.
- Gessain A (1996). Virological aspects of tropical spastic paraparesis/HTLV-I associated myelopathy and HTLV-I infection. *J Neurovirol.* 5: 299-306.
- Godoy AJ, Kira J, Hasuo K, Goto I. (1995). Characterization of cerebral white matter lesions of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in comparison with multiple sclerosis and collagen-vasculitis: a semiquantitative MRI study. *J. Neurol. Sci.* 133: 102-111
- Goon P, Igakura T, Hanon E, Mosley A, Barfield A, Barnard A, Kaftantzi L, Tanaka Y, Taylor G, Weber J, Bangham C. (2004). Human T Cell Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I)-Specific CD4⁺ T Cells: Immunodominance Hierarchy and Preferential Infection with HTLV-I. *J. Immunol.* 172: 1735-1744.
- Gotuzzo E. Instituto de Medicina tropical "Alexander von Humboldt". (2006) U. Peruana Cayetano Heredia.
- Grant P, Diggins M and Pant HP. (1999). Topographic Regulation of Cytoskeletal Protein Phosphorylation by Multimeric Complexes in the Squid Giant Fiber System. *J. Neurobiol.* 40: 89-102
- Grant P and Pant HC.(2000). Neurofilament protein synthesis and phosphorylation. *J Neurocytol.* 29: 843-872
- Grant P, Sharma P and Pant HP. (2001). Cyclin-dependent protein kinase 5 (Cdk5) and the regulation of neurofilament metabolism. *Eur. J. Biochem.* 268: 1534-1546
- Grant C, Barmark K, Alefantis T, Yao J, Jacobson S, Wigdahl B. (2002). Human T cell leukemia virus type I and neurologic disease: events in bone marrow, peripheral blood,

- and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. *J. Cell Physiol.* 190: 133-159.
- Gerry S, Cui Y, Ellis R, Andreson K, Mickle P, Scheff S, Pike B, Anderson D, Howland D. (2005). Hyperphosphorylated neurofilament NF-H is a serum biomarker of axonal injury. *BBRC.* 336: 1268-1277.
- Gisslén M, Rosengren L, Hagberg L, Deeks S, Price R. (2005). Cerebrospinal fluid signs of neuronal damage after antiretroviral treatment interruption in HIV-I infection. *AIDS Research and Therapy.* 2: 1-7.
- Green RC (2002). Risk assessment for Alzheimer's disease with genetic susceptibility testing: Has the moment arrived? *Alzheimer's Care Quarterly* 3:208-14
- Hu Y, Malone J, Fagan A, Townsend R, Holtzman D. (ahead of publication, 2005). Comparative analysis of intra and inter-individual variation in human cerebrospinal fluid. *Molecular and Cellular Proteomics.*
- Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor, GP, Weber JN, Griffiths GM, Tanaka, Y., Osame, M., Bangham, CR. (2003). Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science.* 299: 1713-1716.
- Iwasaki Y. (1990). Pathology of chronic myelopathy associated with HTLV-I infection (HAM/TSP). *J. Neurol. Sci.* 96: 103-123.
- Jeang K-T. (2005). Retrovirology highlights a quarter century of HTLV-I research. *Retrovirology.* 2: 1-3
- Julien J-P (1999) Neurofilament functions in health and disease. *Curr Opin Neurobiol* 9:554–560.
- Julien J, Tretjakoff P, Beaudet L, Peterson A. (1987) Expresión and assembly of a human neurofilament protein in transgenic mice provided a novel neuronal parking system. *Genes Dev.* 1: 1085-1095.
- Kettlun AM, Cartier L, García L, Collados L, Vásquez F, Ramírez E, Valenzuela MA. (2003). TIMPs and MMPs expression in CSF from patients withTSP/HAM. *Life Sciences.* 72: 2863-2876.
- Laemmli, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lezin A, Olindo S, Olière S, Varrin-Doyer M, Marlin R, Cabre P, Smadja D and Cesaire R. (2005). Human T Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) Proviral Load in Cerebrospinal Fluid: A New Criterion for the Diagnosis of HTLV-I–Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis?. *Journal of Infectious Diseases.* 191: 1830-1834.
- Li J, Li H, Tsai MD. (2003). Direct Binding of the N-Terminus of HTLV-I Tax Oncoprotein to Cyclin-Dependent Kinase 4 Is a Dominant Path To Stimulate the Kinase Activity. *Biochemistry.* 42: 6921-6928.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Marriott S, and Semmes O. (2005). Impact of HTLV-I Tax on cell cycle progression and the cellular DNA damage repair response. *Oncogene.* 24: 5986- 5995
- Matsuoka, M. (2003). Human T-cell leukaemia virus type I adult T-cell leukemia. *Oncogene.* 22: 5131-5140.
- Miller J, Ackerley S, Brownlees J, Griersonb A, Jacobsen N and Thornhi P. (2002). Axonal transport of neurofilaments in normal and disease states. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 323-330
- Mogensen TH y Paludan S. (2001). Molecular pathways in virus-induced cytokine production. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 131-150.
- Moon H, Wisniewski T, Merz P, De Martini J, Winsniewski H. (1981). Partial Purification of Neurofilament Subunits from Bovine Brains and Studies on Neurofilament Assembly. *The Journal of Cell Biology.* 89: 560-567.
- Mortreux F, Gabet A-S, Watte E. (2003). Molecular and cellular aspects of HTLV-1 associated leukemogenesis in vivo. *Leukemia.* 17: 26-38
- Mor-Vaknin N, Turgeman H, Torgeman A, Wolfson M, Huleihel M and Aboud M. (1998). Rapid Syncytium Formation Between Human T-cell Leukaemia Virus Type-I (HTLV-I)-Infected T-Cells and Human Nervous System Cells: A possible implication for Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-I associated myelopathy. *Cell Biol Int.* 22: 95-103
- Nakawaga M, Izumo S, Ijichi S, Kubota H, Arimura K, Kawabata M y cols. (1995). HTLV-I-associated Myelopathy Analysis of 213 patients based on clinical features and laboratory findings. *J Neurovirol.* 1: 50-61
- Nixon RA, Paskevich PA, Sihag RK, Thayer CY. (1994). Phosphorylation on carboxyl-terminus domains of neurofilament proteins in retinal ganglion-cell neurons in-vivo-influences on regional neurofilamento accumulation, interneurofilament spacing, and axon caliber. *J Cell Biol.* 126: 1031-1046.
- Norgren N. (2004) Neurofilament Light as a Marker for Neurodegenerative Diseases. Doctoral tesis UMEA University Medical Dissertations
- Osame M, Igata A, Matsumoto M, Tara M. (1987). HTLV-I-associated myelopathy. *Cancer and chemotherapy.* 14: 2411-2416.
- Ozden S, Seilhean D, Gessain A, Hauw JJ and Gout O.(2002). Severe Demyelinating Myelopathy with Low Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1 Expression after Transfusion in an Immunosuppressed Patient. *Clin Infect Dis.* 34: 855-860
- Pant AC, Veeranna, Pant HC, Amin N. (1997). Phosphorylation of human high molecular weight neurofilament protein (hNF-H) by neuronal cyclin-dependent kinase 5 (cdk5). *Brain Research.* 765: 259-266

- Petzold A (2005). Neurofilament phosphoforms: Surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *J. Neurol. Sci.* 233: 183 -198
- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PD, Minna JD, Gallo,RC. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 77: 7415-7419.
- Ramirez E, Fernandez J, Cartier L, Villota C, Rios M. (2003). Defective human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus in seronegative tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM) patients. *Virus Research.* 91: 231-239
- Reiber H.(2003). Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. *Restor Neurol Neurosci.* 21:79-96.
- Rosengren LE, Karlsson JE, Karlsson JO, Persson LI, Wikkelso C.(1996). Patients with amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases have increased levels of neurofilament protein in CSF. *J Neurochem.* 67: 2013–8.
- Ruiz-Ederra J and Vecino E. (2001). Neurofilaments in neurodegenerative diseases. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 12: 1-10
- Saito T, Shima H, Osawa M, Hemmings B, Kishimoto T, Hisanaga S. (1995). Neurofilament-Associated Protein Phosphatase 2A: Its Possible Role in Preserving Neurofilaments in Filamentous States. *Biochemistry.* 34: 7376-7384.
- Sánchez I, Hassinger L, Sihag R, Cleveland DW, Mohan P, Nixon RA. (2000). Local control of neurofilament accumulation during radial growth of myelinating axons in vivo: Selective role of site-specific phosphorylation. *J. Cell Biol.* 151:1013–1024
- Semra YO, Seidi OA, Sharief MK. (2002). Heightened intrathecal release of axonal cytoskeletal proteins in multiple sclerosis is associated with progressive disease and clinical disability. *J Neuroimmunol.* 122; 132-139
- Shaw G, Yan C, Ellis R, Anderson K, Parker Mickle J, Scheff S, Pike B, Anderson DK, Howland DR. (2005). Hyperphosphorylated neurofilament NF-H is a serum biomarker of axonal injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 336: 1268-1277
- Shea T, Jung B, Pant H. (2003). Does C-terminal phosphorylation regulate neurofilament transport?. Re-evaluation of recent data suggests that it does. *Trends Neurosci.*26: 397-400
- Shea T, Yabe J, Ortiz D, Pimenta A, Loomis P, Glodman R, Amin D, Pant H. (2004). CDK5 regulates axonal transport and phosphorylation of neurofilaments in cultured neurons. *J. Cell Sci.* 117: 993-941.
- Stokin GB, Goldstein LS, (2006). Axonal Transport and Alzheimer`s disease. *Annu Rev Biochem.* 75: 607-627.
- Szymocha R, Brisson C, Bernard A, Akaoka H, Belin MF and Giraudon P. (2000). Long-term effects of HTLV-1 on brain astrocytes: sustained expression of Tax-1 associated with synthesis of inflammatory mediators. *J. Neurovirol.* 6: 350-357

- Teunissen Ch, Dijkstra Ch, Polman Ch. (2005). Biological markers in CSF and blood for axonal degeneration in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 4: 32-41.
- Tikka T, Vartianinen E, Goldsteins G, Oja S, Andersen M, Marklund L, Koistinaho J. (2002) Minocycline prevents neurotoxicity induced by cerebrospinal fluid from patients with motor neurone disease. *Guarantors of Brain*. 125: 722-731.
- Toro C, Rodás B, Poveda E, Soriano V. (2002). Infecciones por Retrovirus HTLV-I/II. *Medicine*. 2: 3915-3922
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76: 4350-4354.
- Umehara F, Izumo S, Nakagawa M y cols. (1993). Immunocytochemical análisis of the cellular infiltrate in the spinal cord lesions in HTLV-I associated myelopathy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 52: 424-430.
- Veeranna, Amin ND, Ahn NG, Jaffem H, Winters CA, Grant P and Pant HC. (1998). Mitogen-Activated Protein Kinases (Erk1,2) Phosphorylate Lys-Ser-Pro (KSP) Repeats in Neurofilament Proteins NF-H and NF-M. *J. Neurosci*. 18: 4008-4021.
- Wu E, Dickson DW, Jacobson S, Raine CS. (1993). Neuroaxonal dystrophy in HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: neuropathologic and neuroimmunologic correlations. *Acta Neuropathol*. 86: 224-235
- Yabe J, Chylinski T, Wang FS, Pimenta A, Kattar SD, Linsley MD, Chan WK and Shea TB.(2001). Neurofilaments Consist of Distinct Populations That Can Be Distinguished by C-Terminal Phosphorylation, Bundling, and Axonal Transport Rate in Growing Axonal Neurites. *J Neurosci*. 21: 2195-2205
- Yabe J, Chan W, Chylinski T, Lee S, Pimenta A, Shea T. (2001). The predominant form which neurofilament subunits undergo axonal initiation, elongation and maturation. *Cell Moltility and the Cytoskeleton*. 48: 61-83
- Yoshida M. (2005). Discovery of HTLV-1, the first human retrovirus, its unique regulatory mechanisms, and insights into pathogenesis. *Oncogene*. 24: 5931-5937.
- Yuan X, Desiderio D. (2002). Proteomics Analysis of Phosphotyrosyl-Proteins in Human Lumbar Cerebrospinal Fluid. *Journal of Proteome research*. 2: 476-487.
- Zaninovic V. (2001). Similarities between Tropical Spastic Paraparesis (TSP) and neurolathyrism. *Lathyrus Lathyrism Newsletter*. 2: 11-14

