



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**EFFECTO DE AGONISTAS PPAR_s E IGF1 EN MODELOS *IN VITRO* DE
LEUCODISTROFIAS**

JENNY ANDREA JARAMILLO GÓMEZ

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

BOGOTÁ D.C., 2019

**EFFECTO DE AGONISTAS PPARs E IGF1 EN MODELOS *IN VITRO* DE
LEUCODISTROFIAS**

JENNY ANDREA JARAMILLO GÓMEZ

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ciencias Biomédicas

Director:

GONZALO H. ARBOLEDA BUSTOS, MD, MSc, PhD.

Grupo de Muerte Celular

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

BOGOTÁ D.C., 2019

DEDICATORIA

A mi familia, quienes me han enseñado con su ejemplo, amor e integridad a no desfallecer a pesar de los obstáculos, quienes me han acompañado en los momentos más difíciles, me han brindado su apoyo incondicional y me han ayudado a entender que soy capaz y que vale la pena vivir, soñar y luchar.

Gregoria Bolivar (Q.E.P.D.)

Lucia Jaramillo (Q.E.P.D.)

Germán Alberto Jaramillo

Hilda Gómez Bolívar

Tatiana Jaramillo Gómez

Alejandra Jaramillo Gómez

David Jaramillo Gómez

Felipe Jaramillo Gómez

AGRADECIMIENTOS

A COLCIENCIAS por el programa bicentenario doctorados nacionales (convocatoria 511) y el programa de fortalecimiento en ciencia y tecnología (convocatoria 519).

A la Universidad Nacional de Colombia, especialmente a la Facultad de Medicina y al Doctorado en Ciencias Biomédicas.

A la Universidad Médica de Carolina del Sur en Estados Unidos (Medical University of South Carolina) por darme la oportunidad de realizar la pasantía en el grupo de Neurogenética y desarrollo dirigido por el Dr. Inderjit Singh.

Al Dr. Gonzalo Arboleda Bustos por su colaboración y apoyo en el desarrollo y dirección de mi trabajo de grado.

Al Dr. Inderjit Singh, por abrirme las puertas de su laboratorio y grupo de investigación, por su apoyo incondicional, confianza, enseñanzas y paciencia. También, a todos los integrantes del grupo de Neurogenética y desarrollo, Dr. Khan, Dr. Won, Dr. Tajinder, Dr. Baarine, Sarah, Dr. Choj, Dr. Nisha, Dra. Avtar K. Singh, Dr. Dasgupta y Joyce Bryan por su colaboración a nivel científico, técnico y académico y por compartir conmigo sus conocimientos y valiosas experiencias.

A David Martínez, Luna Buitrago, Stella Lozano, Diana Gallego, Edwin Bautista y Keydy Vásquez por su valioso trabajo y apoyo en la realización del proyecto.

VIII

Al Dr. Carlos Clavijo, Dr. Carlos Parra, Dra. María Clara Echeverri. Dr. Juan José Yunis, Dr. Humberto Arboleda, Dr. Jhon Sutachán, Dra. Zulma Dueñas y Dr. Jean Paul Vernot por su apoyo y tiempo dedicado a mi proyecto y trabajo de tesis.

A María José Contreras Zárate, José Contreras y María Luisa Zárate por su confianza, apoyo incondicional, palabras de ánimo y por todo el amor que me han brindado.

A mis amigos, Deiry Riveros, Rita Baldrich, Blanca Schröder, Magda López, Óscar Urrego, Andrés Camargo, Manuel Hoyos, Stella Rodríguez, Catalina Palacios, Hernán Hernández, Lina María Pedraza, Martín Pilonieta, Luis Carlos Morales, Iván Páez, María Fernanda Mahecha y Henry Rodríguez por su apoyo incondicional, los momentos compartidos y sobre todo por alegrar mi vida con todas sus genialidades.

A Magda López, Vladimir Alexander Castro, Adriana Ortiz y Yolanda Cárdenas por su colaboración a nivel administrativo y técnico.

A mis amigos en Charleston, Maricela Villalobos, Padre Gabriel Cruz, Iveth Piña, Leticia Reyes, Ricardo Moreno, Linda Cordero, Mónica Gualtero, Jonathan Santana, Carmén Rivera, Victoria Avila, Miriam Espinosa, Gloria Estevez, Marisol Valbuena, por toda su ayuda, por brindarme su amistad y cariño y hacerme sentir como en casa.

A mis compañeros del Instituto de Genética, Alejandro Restrepo, Andrea Niño, Tatiana Báez, Mauren Ortiz, Estefanía Valencia, Diego Ordoñez, Francly Bayona, César Cotacio, César Hernández, Eduardo Arboleda, Jenny Ortega, Adrián

Sandoval, David Gutiérrez, Belfran Carbonell, Yuly Órtiz y de manera especial a Helena Hernández por su ayuda incondicional a pesar de la distancia.

El mayor agradecimiento para mi familia, mi papá Germán Jaramillo, mi mamá Hilda Gómez, mis hermanas Tatiana y Alejandra, mis sobrinos David y Felipe y mis tías Ana Elvía Díaz y Patricia Jaramillo, por todo su amor, apoyo y confianza.

Finalmente, a Dios por permitirme vivir esta experiencia y ponerme en el camino a cada una de las personas que he conocido a lo largo de mi vida y que de muchas formas han contribuido a la realización de mi proyecto de vida.

RESUMEN

Introducción: Los oligodendrocitos (Ols) son células altamente especializadas del sistema nervioso central (SNC) encargadas de la formación de la mielina. La pérdida de la mielina causa desórdenes dismielinizantes como las leucodistrofias, por ejemplo, la adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (ALD-X), causada por mutaciones en el gen ABCD1, el cual codifica para un transportador peroxisomal de ácidos grasos de cadena muy larga; y la enfermedad de Krabbe (EK), causada por mutaciones en el gen GALC, el cual codifica para la enzima lisosomal β -galactocerebrosidasa (Galc), encargada de la degradación de Psicosisina. **Objetivo:** Evaluar el efecto de agonistas de receptores activados por el proliferador peroxisomal (PPAR) y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF1) sobre las vías de señalización PI3K/AKT, MAPK/ERK y AMPK/mTOR, y su efecto sobre la diferenciación oligodendroglial y la función mitocondrial y peroxisomal en modelos celulares de ALD-X y EK. **Metodología:** Los modelos *in vitro* de ALD-X y EK fueron establecidos en las líneas celulares MO3.13 y B12 por RNA de interferencia de los genes ABCD1 y GALC, respectivamente. Asimismo, se utilizaron cultivos primarios de Ols y Ols obtenidos a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) derivadas de pacientes con ALD-X. **Resultados:** En los modelos celulares de ALD-X y EK se demostró que los Ols presentan: 1) mayor susceptibilidad a la muerte celular, 2) disminución de marcadores de maduración oligodendroglial (CNPase, Galc, MBP), 3) alteraciones en la señalización celular, y 4) disfunción mitocondrial y peroxisomal. **Conclusión:** Los pretratamientos con agonistas PPARs (Rosiglitazona, GW0742, WY14643) e IGF1 muestran un potencial efecto neuroprotector contra la muerte de Ols inducida por la acumulación de ácidos grasos de cadena muy larga (X-ALD) y acumulación de Psicosisina (EK).

Palabras clave: Oligodendrocitos, leucodistrofias, adrenoleucodistrofia ligada a X, enfermedad de Krabbe, ABCD1, GALC, Psicosisina, agonistas PPARs, IGF1, Rosiglitazona, GW0742, WY14643, diferenciación, mielina, receptor IGF1, PI3K/AKT, MAPK/ERK, AMPK/mTOR, iPSCs, función mitocondrial y peroxisomal.

ABSTRACT

Introduction: Oligodendrocytes are highly specialized cells that form myelin sheath around nerve fibers in the central nervous system (CNS). Myelin loss causes dysmyelinating disorders or leukodystrophies, such as X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) caused by mutations in the ABCD1 gene that encodes the peroxisomal membrane protein ALDP which is involved in the transmembrane transport of very long-chain fatty acids (VLCFA); and Krabbe disease (KD) caused by mutations in the GALC gene that encodes the lysosomal enzyme β -galactocerebrosidase (Galc).

Aim: To evaluate the effect of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) agonists and insulin-like growth factor type 1 (IGF1) over PI3K/AKT, MAPK/ERK and AMPK/mTOR cell signaling pathways, oligodendroglial differentiation and mitochondrial and peroxisomal function in X-ALD and KD *in vitro* models. **Methods:** X-ALD and KD cell models in MO3.13 and B12 cell lines were made by RNA interference of ABCD1 and GALC genes, respectively. Furthermore, we used mouse oligodendrocytes primary cell cultures and induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from X-ALD patients. **Results:** We proved on X-ALD and KD cell models that oligodendrocytes show 1) more susceptible to cell death during oligodendroglial differentiation, 2) decreasing of mature oligodendrocyte markers (CNPase, Galc, MBP), 3) alterations in cellular signaling pathways, and 4) mitochondrial and peroxisomes dysfunction. **Conclusion:** Pretreatments with PPAR agonists (Rosiglitazone, GW0742, WY14643) and IGF1 have potential neuroprotective effect against oligodendrocytes cell death induced by accumulation of VLCFAs (X-ALD) and accumulation of Psychosine (KD).

Keywords: Oligodendrocytes, leukodystrophies, X-linked adrenoleukodystrophy, Krabbe disease, ABCD1, GALC, Psychosine, PPAR agonists, IGF1, Rosiglitazone, GW0742, WY14643, oligodendrocyte differentiation, myelin, IGF1 receptor, PI3K/AKT, MAPK/ERK, AMPK/mTOR, iPSCs, mitochondria, peroxisomes.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	VII
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XIX
ÍNDICE DE TABLAS	XXIII
ÍNDICE DE ANEXOS	XXIV
LISTA DE ABREVIATURAS	XXVII
1. CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.2 JUSTIFICACIÓN	2
1.3 HIPÓTESIS	3
1.4 OBJETIVOS	3
1.4.1 Objetivo General	3
1.4.2 Objetivos Específicos.....	3
2. CAPÍTULO 2: ESTADO DEL ARTE	5
2.1 LEUCODISTROFIAS	5
2.1.1 Adrenoleucodistrofia Ligada Al Cromosoma X	7
2.1.2 Enfermedad De Krabbe	13

Contenido

2.2	PEROXISOMAS.....	16
2.4.3	Proliferación De Peroxisomas	17
2.3	RECEPTORES NUCLEARES Y PPARs.....	18
2.4	FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA (IGF1).....	22
2.5	FUNCIÓN MITOCONDRIAL.....	24
2.6	OLIGODENDROCITOS	26
2.7	MIELINA.....	27
2.8	VÍAS DE SEÑALIZACIÓN	29
2.8.1	PI3K/AKT	30
2.8.2	MAPK/ERK	31
2.8.3	AMPK/mTOR	32
3.	CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
3.1	MODELOS BIOLÓGICOS	35
3.1.1	Línea Celular MO3.13.....	35
3.1.2	Línea Celular B12.....	36
3.1.3	Cultivo Primario Enriquecido De Oligodendrocitos Derivados De Cerebros De Ratones Un Día Postnatal.....	36
3.1.4	Oligodendrocitos Diferenciados A Partir de Células Madre Pluripotentes Inducidas.....	36
3.2	MATERIALES.....	37
3.2.1	Anticuerpos.....	37
3.2.2	Materiales	40
3.2.3	Equipos.....	41

3.2.4	Softwares.....	42
3.3	MÉTODOS	42
3.3.1	Estandarización de los modelos <i>in vitro</i> de adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma x y enfermedad de Krabbe utilizando la línea celular de oligodendrocitos humanos MO3.13.....	42
3.3.2	Determinación del efecto de agonistas PPARs y del factor de crecimiento IGF1 sobre la muerte de oligodendrocitos en los modelos analizados.....	43
3.3.3	Análisis del papel de las vías de señalización PI3K/AKT, MAPK/ERK y AMPK/mTOR en función de agonistas PPARs e IGF1	43
3.3.4	Evaluación del efecto de los agonistas PPARs e IGF1 sobre la proliferación de los peroxisomas y la función mitocondrial en los diferentes modelos.....	44
3.3.5	Determinación del efecto de agonistas PPARs e IGF1 durante el proceso de diferenciación de los oligodendrocitos.....	44
3.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
3.5	CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	45
4.	CAPÍTULO 4: RESULTADOS DEL EFECTO DE AGONISTAS PPARs E IGF1 EN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS MO3.13	46
5.	CAPÍTULO 5: RESULTADOS ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AL CROMOSOMA X	49
5.1	MODELO DE ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AL CROMOSOMA X EN CÉLULAS MO3.13.....	49
5.2	MODELO DE ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AL CROMOSOMA X EN CÉLULAS B12	62

5.3 OLIGODENDROCITOS OBTENIDOS A PARTIR DE iPSCs DERIVADAS DE PACIENTES CON ALD-X	70
6. CAPÍTULO 6: RESULTADOS ENFERMEDAD DE KRABBE.....	91
6.1 MODELO DE LA ENFERMEDAD DE KRABBE EN CÉLULAS MO3.13 POR APLICACIÓN EXÓGENA DE PSICOSINA	91
6.2 MODELO DE LA ENFERMEDAD DE KRABBE EN CÉLULAS MO3.13 POR INDUCCIÓN ENDÓGENA DE PSICOSINA.....	100
6.3 MODELO DE LA ENFERMEDAD DE KRABBE EN CULTIVOS PRIMARIOS DE OLIGODENDROCITOS POR LA APLICACIÓN EXÓGENA DE PSICOSINA	103
7. CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN	109
7.1 ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AL CROMOSOMA X	109
7.2 MODELO SUGERIDO PARA LA ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AL CROMOSOMA X	115
7.3 ENFERMEDAD DE KRABBE	116
7.4 MODELO SUGERIDO PARA LA ENFERMEDAD DE KRABBE.....	122
8. CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES	123
9. CAPÍTULO 9: PERSPECTIVAS	126
ANEXOS	127
BIBLIOGRAFÍA	152

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Mecanismo de acción de los receptores nucleares PPARs	20
Figura 2.2 Señalización celular mediada por el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF1).....	24
Figura 2.3 Vía PI3K/AKT.....	31
Figura 2.4 Vía MAPK/ERK1-2.....	32
Figura 2.5 Vía AMPK/mTOR.....	34
Figura 4.1 Efecto del IGF1 y agonistas PPARs durante la diferenciación de las células MO3.13	48
Figura 5.1.1 Modelo de adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X en células MO3.13 por interferencia del gen ABCD1.....	50
Figura 5.1.2 Efecto de IGF1 y agonistas PPARs sobre la viabilidad de células MO3.13 shCONTROL y shABCD1 durante el proceso de diferenciación.....	52
Figura 5.1.3 Efecto del IGF1 y agonistas PPARs a diferentes tiempos sobre la viabilidad en células MO3.13 shCONTROL y shABCD1.....	53
Figura 5.1.4 La deficiencia de ABCD1 en células MO3.13 diferenciadas a oligodendrocitos impacta la señalización IGF1R/AKT /mTOR	56
Figura 5.1.5 Análisis por inmunofluorescencia de la forma fosforilada del receptor IGF1	58
Figura 5.1.6 La deficiencia de ABCD1 impacta la fosforilación de ERK1.....	60
Figura 5.1.7 Efecto del IGF-1 y los agonistas PPARs sobre el nivel de ABCD1 y MBP en células MO3.13	61

Figura 5.2.1 Morfología de las células B12 en medio de crecimiento.....	62
Figura 5.2.2 Modelo de adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X en células B12 por interferencia del gen ABCD1	64
Figura 5.2.3 Efecto del IGF1 sobre la vía de señalización AKT/AMPK/mTOR en células B12 WT y shABCD1.....	65
Figura 5.2.4 Análisis por western blot de la señalización AKT/AMPK/mTOR	67
Figura 5.2.5 Las células B12 shABCD1 presentan menor expresión de CNPase	69
Figura 5.3.1 Colonias de iPSCs derivadas de fibroblastos de pacientes con AMN y cALD y el CONTROL	70
Figura 5.3.2 Cuerpos embrionarios	71
Figura 5.3.3 Formación de rosetas neurales.....	72
Figura 5.3.4 Células precursoras de neuronas (NPCs).....	73
Figura 5.3.5 Oligodendrocitos diferenciados obtenidos a partir de iPSCs CONTROL.....	75
Figura 5.3.6 Oligodendrocitos diferenciados obtenidos a partir de iPSCs AMN	76
Figura 5.3.7 Oligodendrocitos diferenciados obtenidos a partir de iPSCs cALD	77
Figura 5.3.8 Análisis por western blot de ALDP en oligodendrocitos diferenciados obtenidos de iPSCs derivadas de pacientes con cALD y AMN	78
Figura 5.3.9 Análisis por western blot de las vías PI3K/AKT y AMPK/mTOR en oligodendrocitos obtenidos de iPSCs CONTROL y cALD.....	80
Figura 5.3.10 Análisis por inmunofluorescencia de PMP70 y MTCO2 en oligodendrocitos obtenidos de iPSCs CONTROL, AMN y cALD.....	81

Figura 5.3.11 Los oligodendrocitos obtenidos de iPSCs cALD presentan disminución en el potencial de membrana mitocondrial.....	84
Figura 5.3.12 Análisis por inmunofluorescencia de PEX14 y MTCO2 en oligodendrocitos obtenidos de iPSCs CONTROL, AMN y cALD.....	85
Figura 5.3.13 Disminución de la acetilación en oligodendrocitos cALD	88
Figura 5.3.14 El acetato de sodio y SAHA contribuyen a la activación de AMPKα en oligodendrocitos	89
Figura 5.3.15 Análisis por inmunofluorescencia de AceCS1 en oligodendrocitos CONTROL, cALD y AMN	90
Figura 6.1.1 La exposición exógena de Psicosisina induce muerte en las células MO3.13 diferenciadas de manera dosis-tiempo dependiente	92
Figura 6.1.2 El pretratamiento de una hora con Rosiglitazona logró proteger a las células MO3.13 diferenciadas de la muerte causada por la exposición de Psicosisina.....	93
Figura 6.1.3 Efecto neuroprotector de GW0742 y WY14643 frente a la exposición de Psicosisina en células MO3.13.....	95
Figura 6.1.4 Efecto de agonistas PPARs sobre p-AKT (Ser 473) en células MO3.13 tratadas con Psicosisina.....	97
Figura 6.1.5 Efecto de la Rosiglitazona sobre p-ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204) en células MO3.13 tratadas con Psicosisina.....	98
Figura 6.1.6 Efecto de IGF1 y agonistas PPARs sobre el número de peroxisomas y mitocondrias en células MO3.13 tratadas con Psicosisina	99
Figura 6.2.1 Modelo in vitro de la enfermedad de Krabbe por inducción de Psicosisina endógena por silenciamiento del gen GALC en la línea celular MO3.13.....	101

Figura 6.2.2 Efecto de la Rosiglitazona y el IGF1 en el modelo endógeno de Enfermedad de Krabbe en células MO3.13 shGALC diferenciadas.....	102
Figura 6.3.1 Cultivos primarios de oligodendrocitos derivados de cerebros de ratones un día postnatal.....	104
Figura 6.3.2 Efecto del IGF1 y agonistas PPARs sobre la viabilidad y expresión de MBP en oligodendrocitos tratados con Psicosisina.....	106
Figura 6.3.3 Efecto del IGF1 y agonistas PPARs en la activación de las vías PI3K/AKT y MAPK/ERK1/2 en oligodendrocitos expuestos a Psicosisina.....	107
Figura 7.1 Modelo propuesto para la adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X.....	115
Figura 7.2 Modelo propuesto para la enfermedad de Krabbe	122

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Anticuerpos primarios usados en Western Blot	38
Tabla 2 Anticuerpos secundarios usados en Western Blot	38
Tabla 3 Anticuerpos primarios usados en inmunofluorescencia	39
Tabla 4 Anticuerpos secundarios usados en inmunofluorescencia.....	39

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. CULTIVO CELULAR.....	127
1.1 CÉLULAS MO3.13.....	127
1.1.1 Crecimiento.....	127
1.1.2 Diferenciación.....	127
Esquema 1. Modelo de ALD-X por interferencia del gen ABCD1	128
Esquema 2. Modelo exógeno de EK por adición de Psicossina	128
Esquema 3. Modelo endógeno de EK por inferencia del gen GALC.....	129
1.2 CÉLULAS B12	129
1.2.3 Crecimiento	129
Esquema 4. Modelo de ALD-X en células B12 por inferencia del gen GALC	129
1.3 CULTIVOS PRIMARIOS DE OLIGODENDROCITOS	130
Esquema 5. Modelo exógeno de EK en cultivos primarios de oligodendrocitos por adición de Psicossina	133
1.4 OLIGODENDROCITOS DIFERENCIADOS OBTENIDOS A PARTIR DE iPSCs DERIVADAS DE PACIENTES CON ALD-X.....	133
Esquema 7. Diferenciación de oligodendrocitos	134
ANEXO 2. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS MO3.13.....	135
2.1 Enfermedad de Krabbe.....	135
2.2 Adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X.....	136
2.1 Protocolo de transfección	136

ANEXO 3. VIABILIDAD CELULAR	138
3.1 WST-1.....	138
3.2 LDH.....	139
ANEXO 4. WESTERN BLOT	142
4.1 Soluciones usadas en Western Blot.	142
4.1.1 Gel de separación	142
4.1.2 Gel de concentración	143
4.1.3 Buffer Towing 10X.....	143
4.1.6 Buffer de lavado: TRIS Buffer Salino (TBS) 10X	144
4.1.7 Buffer de bloqueo.	145
4.1.8 Anticuerpo primario	145
4.1.9 Anticuerpo secundario.....	145
4.2 Extracción de proteína	145
4.3 Electroforesis en geles denaturantes de poliacrilamida	146
4.5 Transferencia a membranas de nitrocelulosa	146
4.6. Detección de proteínas	147
4.7 Limpieza de membranas luego de WB para re-análisis.....	147
4.7.1 Buffer de limpieza.....	148
ANEXO 5. INMUNOFLUORESCENCIA	149
Células MO3.13 y Cultivos primarios	149
Conteo de peroxisomas (ALDP) y mitocondrias (TOM20) usando Image J.....	150
Oligodendrocitos obtenidos a partir de iPSCs	151

LISTA DE ABREVIATURAS

AA:	Ácido araquidónico
ABC:	Transportadores con dominios de unión a ATP del inglés, <i>ATP-Binding Cassette Transporter</i>
ABCD1:	<i>ATP-Binding Cassette, subfamily D, member 1</i>
Abcd1:	Proteína de la adrenoleucodistrofia o ALDP
Abcd2:	Proteína relacionada a la proteína de la adrenoleucodistrofia o ALDPR
ABCD2:	<i>ATP-Binding Cassette, subfamily D, member 2</i>
ABCD3:	<i>ATP-Binding Cassette, subfamily D, member 3</i>
Abcd3:	Proteína de membrana peroxisomal o PMP70
ABCD4:	<i>ATP-Binding Cassette, subfamily D, member 4</i>
Abcd4:	Proteína relacionada con PMP70 o P70R
ACC1:	Acetil CoA carboxilasa del inglés, <i>Acetyl CoA Carboxylase</i>
AceCS:	Acetil-CoA Sintetasa
ACLY:	ATP citrato liasa del inglés, <i>ATP Citrate Lyase</i>
ACS2:	Acetil-CoA sintetasa 2
AICAR:	<i>5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-4-ribofuranoside</i>
AKT:	Proteína cinasa B
ALDP:	Proteína de la adrenoleucodistrofia o proteína Abcd1
ALDRP:	Proteína relacionada con la proteína de la adrenoleucodistrofia o proteína Abcd2

ALD-X:	Adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X
AMN:	Adrenomieloneuropatia, adrenoleucodistrofia de inicio tardío
AMPK:	Proteína cinasa activada por AMP del inglés, <i>AMP-activated Protein Kinase</i>
ANOVA:	Análisis de varianza
B12 WT:	Células B12 silvestres
cALD:	Adrenoleucodistrofia infantil (cALD, del inglés, <i>childhood adrenoleukodystrophy</i>)
CM:	Cóctel de citoquinas
CNPase:	2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase
cPLA2 IVa:	Fosfolipasa citosólica dependiente de calcio A2-IVa del inglés, <i>Cytosolic Phospholipase A2-IVa</i>
CYP46:	Colesterol 24-hidroxilasa del inglés, <i>Cholesterol 24-Hydroxylase</i>
DHA:	Ácido docosahexaenoico del inglés, <i>Docosahexaenoic Acid</i>
Dok:	<i>Downstream of tyrosine kinases</i>
EAE:	Modelo experimental de la encefalomiелitis autoinmune
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico del inglés, <i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR:	Receptor del factor de crecimiento epidérmico del inglés, <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EK:	Enfermedad de Krabbe
ELOVL1:	Enzima para elongación de los ácidos grasos de cadena muy larga del inglés, <i>Elongation of Very Long Chain Fatty Acids</i>
EPA:	Ácido eicosapentaenoico del inglés, <i>Eicosapentaenoic Acid</i>
ERK:	<i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i>

Lista de abreviaturas

FABPs:	Proteínas de unión a ácidos grasos del inglés, <i>Fatty Acid Binding Proteins</i>
FAs:	Ácidos grasos del inglés, <i>Fatty Acids</i>
FASN:	Ácidos grasos sintasa del inglés, <i>Fatty Acid Synthase</i>
FAT/CD36:	Traslocasa de ácidos grasos/CD36 del inglés, <i>Fatty Acid Translocase/CD36</i>
FATP1-6:	Proteínas de transporte de ácidos grasos del inglés, <i>Fatty Acid Transport Proteins 1–6</i>
FGF-2:	Factor de crecimiento fibroblástico 2 del inglés, <i>Fibroblast Growth Factor 2</i>
FGFR:	Receptor del factor de crecimiento fibroblástico del inglés, <i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
FRS2:	<i>FGF receptor substrate 2</i>
Gab:	<i>Grb2-associated binder</i>
GalC:	Enzima lisosomal galactosilceramidasa del inglés <i>Galactosylceramidase</i>
GALC:	<i>Galactosylceramidase</i>
GFAP	Proteína fibrilar ácida de la glia
GM1-4:	Gangliósido del inglés, <i>Ganglioside</i>
GW:	GW0742, agonista PPAR- β
GW9662:	2-chloro-5-nitrobenzanilide, potente antagonista de PPAR- γ
HDAC1:	Histona deacetilasa 1
IFN- γ :	Interferón gama
IGF1:	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I del inglés, <i>Insulin-like Growth Factor I</i>

IGF1R:	Receptor de IGF1
IL-1 α :	Interleucina 1 alfa
IL-2:	Interleucina 2
IL-3:	Interleucina 3
IL-6:	Interleucina 6
iNOS:	Sintasa de óxido nítrico inducible
iPSCs:	Células madre pluripotentes inducidas
IRS:	<i>Insulin receptor substrate</i>
JC-1:	Yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil benzimidazol carbocyanina)
LCFA:	Ácidos grasos de cadena larga del inglés, <i>Large Chain Fatty Acids</i>
LDH:	Lactato deshidrogenasa
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad del inglés, <i>Low Density Lipoprotein</i>
LDLR:	Receptor de lipoproteínas de baja densidad del inglés, <i>Low Density Lipoprotein Receptor</i>
LXR:	Receptor X hepático del inglés, <i>Liver X Receptor</i> . GW3965
MAG:	Glicoproteína asociada a mielina
MBP:	Proteína básica de mielina del inglés, <i>Myelin Basic Protein</i>)
MEGF7:	Múltiples del factor de crecimiento epidérmico-como dominios de 7 de genes del inglés, <i>Multiple Epidermal Growth Factor-Like Domains 7</i>)
MOSP:	<i>Myelin/oligodendrocyte-specific protein</i>
mTOR:	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
NaAc:	Acetato de sodio

Lista de abreviaturas

NF- κ B:	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NG2:	Proteoglicano que sirve como marcador glial de polidendrocitos, células progenitoras de oligodendrocitos y precursores neuronales, también conocido como <i>CSPG4</i> , del Inglés <i>Chondroitin Sulphate Proteoglycan</i> .
NGFR:	Receptor del factor de crecimiento nervioso del inglés, <i>Nerve Growth Factor Receptor</i>
NPCs:	Células Precursoras de Neuronas
NT-3:	Neurotrofina 3
O1:	Marcador de oligodendrocitos
O4:	Marcador de oligodendrocitos tardíos
OLs:	Oligodendrocitos
OPCs:	Células progenitoras de oligodendrocitos
P70R:	Proteína relacionada con PMP70 o proteína Abcd4
PGC-1:	PPAR-coactivador-1
PKC:	Proteína cinasa C
PLP:	Proteína proteolipídica
PMA:	<i>Phorbol-12-Myristate-13-Acetate</i>
PMP70:	Proteína de membrana peroxisomal o proteína Abcd3
PPARs:	Receptores activados por el proliferador peroxisomal del inglés, <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptors</i>
PPREs:	Elementos reguladores de respuesta a PPARs
Psicosina:	Galactosilesfingosina

Psy:	Psicosina
PUFAs:	Ácidos grasos poliinsaturados del inglés, <i>Polyunsaturated Fatty Acids</i>
RA:	Ácido retinoico del inglés, <i>Retinoic Acid</i>
Rap:	Rapamicina, inhibidor de mTOR
Ros:	Rosiglitazona, agonista PPAR- γ
RXR:	Receptor X del ácido retinoico del inglés, del inglés, <i>Retinoid X Receptor</i>
SAHA:	<i>Suberoylanilide hydroxamic acid</i> , inhibidor de deacetilasas de histonas
SFB:	Suero fetal bovino
shABCD1:	Células transfectadas con RNA de interferencia para el gen ABCD1
shCONTROL:	Células transfectadas con un vector que tiene una secuencia similar (scrRNA) no conocida en genes de humano, ratón o rata.
shGALC:	Células transfectadas con RNA de interferencia para el gen GALC
SNC:	Sistema Nervioso Central
sPLA2 IIa:	Fosfolipasa secretada A2-IIa del inglés, <i>Secretory Phospholipase A2-IIA</i>
SR-BI:	Receptor barretero BI del inglés, <i>scavenger receptor BI</i>
T3:	Triyodotironina, 3,3',5-Triiodo-L-thyronine
TNF- α :	Factor de necrosis tumoral alfa
TTC:	Tetraciclina
VLACS:	<i>Very Long-chain Acyl-Coenzyme A synthetase</i>
VLCFA:	Ácidos grasos de cadena muy larga del inglés, <i>Very Large Chain Fatty Acids</i>)
WB:	<i>Western Blot</i>

Lista de abreviaturas

Wort: Wortmannin, inhibidor de PI3K

WST-1: *2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium*

WY: WY14643, agonista PPAR- α

1. CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los desórdenes desmielinizantes y dismielinizantes del sistema nervioso central (SNC) hacen parte de un grupo de enfermedades degenerativas muy discapacitantes, tanto en niños y adultos jóvenes. Dentro de las principales enfermedades dismielinizantes se encuentran las leucodistrofias, en particular la adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (ALD-X) y la enfermedad de Krabbe (EK). Estas enfermedades convergen en la pérdida de mielina a nivel de los axones de las neuronas del SNC, lo cual se puede reflejar en una alta heterogeneidad clínica y fisiopatológica. Actualmente, el diagnóstico de este tipo de enfermedades es complejo y las estrategias que se han venido utilizando como herramientas protectoras solo lo hacen de manera temporal, lo cual podría atribuirse al desconocimiento de varios aspectos celulares y moleculares básicos que subyacen a este grupo de enfermedades y de la biología básica de las células gliales involucradas en la formación de la mielina, específicamente los oligodendrocitos.

Aunque, se ha avanzado en el entendimiento de la fisiopatología de este tipo de degeneración, faltan por conocer varios aspectos relacionados con la biología básica de los oligodendrocitos y su relación con la adecuada transmisión sináptica, en particular asociado a la dificultad técnica de generar modelos adecuados *in vitro* de oligodendrocitos (líneas celulares o cultivos primarios), el poco conocimiento de su proceso de diferenciación, y la carencia de modelos establecidos que simulen la vaina de mielina.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Debido a que no existe un tratamiento definitivo para las enfermedades desmielinizantes se hace necesario la búsqueda de alternativas terapéuticas. En el caso particular de la esclerosis múltiple, una enfermedad desmielinizante, se han observado avances recientes con la introducción de nuevos medicamentos con un componente anti-inflamatorio y adicionalmente con un componente metabólico como fue el caso de las estatinas. Así mismo, los PPARs tienen la cualidad de modular la expresión de genes implicados en metabolismo, inflamación e inmunidad, y han mostrado un papel neuroprotector en algunos modelos *in vitro* de enfermedades neurodegenerativas. Por tanto, conocer los mecanismos moleculares que subyacen a la muerte de los oligodendrocitos en enfermedades desmielinizantes como la ALD-X y EK puede contribuir en gran medida a la identificación de novedosos blancos terapéuticos.

Aunque, la ALD-X y la EK pertenecen al grupo de enfermedades raras, el establecimiento de modelos *in vitro* de estas patologías permite conocer varios aspectos de la biología básica de los oligodendrocitos y de las células precursoras de oligodendrocitos, como son los mecanismos celulares y moleculares involucrados en diferenciación, metabolismo, proliferación, muerte y sobrevivencia.

Además, estos modelos permiten evaluar la función de la mitocondria y el peroxisoma en el desarrollo y progresión de estas enfermedades. En consecuencia, el entendimiento de dichos eventos puede facilitar la creación de fármacos para proteger a las neuronas y a los oligodendrocitos de los diversos insultos a los que se ven enfrentados durante el proceso de pérdida y degeneración de la mielina. Así mismo, la detección temprana de los procesos neurodegenerativos y los riesgos asociados a estos están íntimamente relacionados con la identificación de factores neuroprotectores con potencial terapéutico.

Este trabajo contó con el asesoramiento internacional del Dr. Inderjit Singh (Universidad de Carolina del Sur – Estados Unidos), uno de los líderes en la

Capítulo 1: Introducción

búsqueda de alternativas neuroprotectoras para esclerosis múltiple, quien es el pionero en el uso de estatinas. Por tanto, este trabajo permite abrir nuevos horizontes en el aspecto científico, académico y social, fortalecer la cooperación internacional, y una línea de investigación en el área de enfermedades desmielinizantes recientemente creada en el grupo de muerte celular, la cual incluye el estudio de dos entidades patológicas, la ALD-X y la EK.

1.3 HIPÓTESIS

La muerte celular en los modelos *in vitro* de ALD-X y de EK está asociada a la disfunción de vías de señalización, como la vía PI3K/AKT, MAPK/ERK y AMPK/mTOR cambios que podrían ser revertidos mediante la utilización de factores de crecimiento como IGF1 y activadores de PPARs.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo General

Estudiar el efecto de agonistas PPARs (rosiglitazona, WY14643, GW0742) e IGF1 sobre los mecanismos moleculares de supervivencia, metabolismo y diferenciación en oligodendrocitos y en modelos *in vitro* de adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X y enfermedad de Krabbe

1.4.2 Objetivos Específicos

Determinar el efecto de agonistas PPARs y el factor de crecimiento IGF1 sobre la muerte de oligodendrocitos en los modelos analizados.

Analizar el papel de las vías de señalización PI3K/AKT, MAPK/ERK y AMPK/mTOR en función de agonistas PPARs e IGF1.

Efecto de agonistas PPARs e IGF1 en modelos *in vitro* de leucodistrofias

Evaluar el efecto de los agonistas PPARs e IGF1 sobre la proliferación de los peroxisomas y la función mitocondrial en los diferentes modelos.

Determinar el efecto de agonistas PPARs e IGF1 durante el proceso de diferenciación de los oligodendrocitos.

2. CAPÍTULO 2: ESTADO DEL ARTE

2.1 LEUCODISTROFIAS

El término leucodistrofias (*leuco*: blanco, *distrofia*: defecto en la nutrición) se refiere a un grupo de aproximadamente treinta (30) desórdenes degenerativos de origen familiar, altamente heterogéneos, deletéreos y muchas veces fatales, en los cuales se afecta la sustancia blanca del SNC, con o sin degeneración de nervios periféricos (Aicardi, 1993; Vanderver et al., 2015). Aunque, las leucodistrofias en un principio fueron definidas como enfermedades hereditarias, en la actualidad se incluyen condiciones adquiridas y esporádicas y algunas raras que afectan la sustancia gris (Holmes et al., 2011).

La sustancia blanca está compuesta por células precursoras de oligodendrocitos (OPCs), oligodendrocitos maduros, glía (polidendrocitos), astrocitos, microglía y vasos sanguíneos, por tanto entender los mecanismos fisiopatológicos de este grupo de desórdenes es complejo (van der Knaap and Bugiani, 2017). Las leucodistrofias más conocidas se relacionan con alteraciones en la mielina, principalmente atribuidas a la disfunción de las OPCs y de los oligodendrocitos, ya sea por hipomielinización, dismielinización, desmielinización o vacuolización de la mielina (Berger et al., 2001; van der Knaap and Bugiani, 2017). A partir de lo anterior, van der Knaap y Bugiani (2017) han propuesto una nueva clasificación de las leucodistrofias teniendo en cuenta el tipo de célula afectada en cada trastorno y su patogénica, por tanto han sugerido las siguientes categorías: oligodendropatías, astrocitopatías, microgliopatías, leuco-axonopatías y leuco-vasculopatías, esto con el propósito de desarrollar estrategias terapéuticas más exitosas a este grupo de enfermedades.

La epidemiología de las leucodistrofias es desconocida, incluso en Europa y Estados Unidos, mientras algunos expertos las consideran desórdenes raros (afectando a 1,2 de cada 100.000 nacimientos vivos) (Vanderver et al., 2012), otros sugieren que son mucho más frecuentes (afectando a 1 de cada 7.663 nacimientos vivos) (Bonkowsky et al., 2010). Adicionalmente, determinar la incidencia de las leucodistrofias es difícil debido al amplio rango de edad de inicio de la enfermedad, la heterogeneidad clínica y el escaso número de neuropediatras familiarizados con su clínica y diagnóstico (Ashrafi and Tavasoli, 2017). En Colombia no hay datos epidemiológicos fiables, sin embargo, la Fundación Lucía Alas de Esperanza reportó en el 2012 que aproximadamente 500 niños Colombianos padecían algún tipo de leucodistrofia (Chaves, 2012).

Clínicamente las leucodistrofias pueden aparecer durante la niñez, la adolescencia o la adultez, se manifiestan con signos neurológicos relacionados con trastornos motores y visuales altamente incapacitantes, asimismo se presenta retraso en el desarrollo cognitivo y cambios en la función cognitiva a lo largo del tiempo, estos signos son progresivos, incurables y conducen a la muerte temprana de los pacientes (Kohler et al., 2018; Kohlschutter and Eichler, 2011).

Con relación a las leucodistrofias con deterioro en la mielina, el análisis neuropatológico permite identificar las leucodistrofias de acuerdo a la tinción de los productos de degradación de la mielina. Así mismo, la identificación de enzimas o defectos en los transportadores de lisosomas o peroxisomas han permitido determinar un grupo importante de leucodistrofias caracterizadas por la pérdida de la mielina, incluyendo la leucodistrofia metacromática, la ALD-X y la EK (también conocida como leucodistrofia de células globoides) (Biffi et al., 2011).

El reconocimiento de las leucodistrofias ha revolucionado con el uso de las nuevas tecnologías, como la tomografía computarizada, las imágenes por resonancia magnética, las pruebas moleculares y la secuenciación de nueva generación, las cuales permiten revelar características específicas de las

Capítulo 2: Estado del arte

leucodistrofias para su diagnóstico y posterior tratamiento (Parikh et al., 2015). Sin embargo, aproximadamente el 50% de los pacientes con leucodistrofia no son diagnosticados y las opciones de tratamiento para las leucodistrofias son limitadas (Bonkowsky et al., 2010), aun cuando se ha avanzado en la identificación de genes asociados en los procesos de mielinización, remielinización y desmielinización y han emergido la terapia génica y la terapia celular, persiste el desconocimiento de la biología básica de las células gliales, lo cual no permite tener claridad acerca de la fisiopatología de este grupo de desórdenes y como consecuencia la ausencia de un tratamiento exitoso.

2.1.1 Adrenoleucodistrofia Ligada Al Cromosoma X

La ALD-X es un desorden peroxisomal neurometabólico de tipo dismielinizante (Baarine et al., 2012a), que afecta la sustancia blanca del cerebro, medula espinal, nervios periféricos, córtex adrenal y testículos (Ferrer et al., 2010). Tiene una incidencia de 1:17.000, incluyendo homocigotos y heterocigotos, representando la leucodistrofia monogénica y trastorno peroxisomal más común (Berger and Gartner, 2006). Clínicamente la adrenoleucodistrofia presenta dos fenotipos diferentes: la que se manifiesta durante la niñez (cALD, del inglés, *childhood adrenoleukodystrophy*) (Akbar et al., 2005), que pertenece a una enfermedad peroxisomal de ensamblaje, caracterizada por un desarrollo cerebral normal hasta los cuatro años de edad, en donde se inicia un fuerte proceso de dismielinización inflamatorio de la sustancia blanca y termina con la muerte a los pocos años; y la adrenomieloneuropatía (AMN) (Singh et al., 1984), la forma que se desarrolla en la adultez, de progresión lenta que involucra procesos de dismielinización en medula espinal, nervios periféricos, sin afectar el SNC, y en algunos casos se presenta insuficiencia adrenocortical y corresponde a deficiencias enzimáticas aisladas (Ferrer et al., 2010; Steinberg et al., 1993).

Este desorden es causado por mutaciones y/o deleciones en el gen *ABCD1* (o ALDP, localizado en la región Xq28 del cromosoma X), en el que se han reportado

más de 800 mutaciones (Kemp et al., 2001) (www.x-ald.nl). Sin embargo, no existe correlación entre el genotipo y el fenotipo (Kemp et al., 2001), ya que pacientes con mutaciones idénticas presentan diversas formas de la enfermedad, lo cual sugiere que deben existir factores genéticos o epigenéticos adicionales importantes en la progresión de la ALD-X (Singh et al., 2009).

El gen ABCD1 codifica para la proteína de la adrenoleucodistrofia (ALDP), una proteína de 74kDa, que se encuentra integrada en la membrana de los peroxisomas y actúa como transportador de ácidos grasos de cadena larga. La proteína ALDP contiene una secuencia homóloga con la familia de proteínas transportadoras ABC (del inglés, *ATP - Binding Cassette*) (Contreras et al., 1994; Kemp and Wanders, 2010). Las alteraciones en este transportador se relacionan con disfunción peroxisomal en la β -oxidación de ácidos grasos y la acumulación de ácidos grasos saturados de cadena muy larga en tejidos y plasma (Ferrer et al., 2010; Kemp and Wanders, 2010; Moser et al., 1984; Singh et al., 1984; Singh, 1997; Wanders, 1999).

Se han encontrado tres genes adicionales de la familia ABC (Matsukawa et al., 2011) que codifican para proteínas de membrana peroxisomal (Berger et al., 1999; Kamijo et al., 1990; Matsukawa et al., 2011; Valle and Gartner, 1993): la proteína relacionada con ALDP (ALDRP, codificada por el gen ABCD2) (Lombard-Platet et al., 1996), la proteína de membrana peroxisomal (PMP70, codificada por el gen ABCD3) (Kamijo et al., 1990) y la proteína relacionada con PMP70 (P70R, codificada por el gen ABCD4) (Holzinger et al., 1997; Shani et al., 1997). Aunque, la deficiencia de estas proteínas no se asocia a ningún desorden metabólico, la sobreexpresión de ALDRP, PMP70 o P70R producen la restauración de la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena muy larga en fibroblastos humanos (Braiterman et al., 1998; Netik et al., 1999), sugiriendo que se encuentran expresadas de forma redundante en el peroxisoma. Además, en un estudio realizado por Maier y colaboradores (2008) se determinó que el fenotipo de la ALD-X es independiente del genotipo de ABCD2 (Maier et al., 2008).

Capítulo 2: Estado del arte

Las proteínas de membrana peroxisomal pertenecientes a la familia de proteínas transportadoras ABC, son "medio" transportadores (del inglés *half transporters*), y pueden estar presentes formando homo o heterodímeros, debido a que se expresan en forma diferencial en los tejidos (Berger et al., 1999; Holzinger et al., 1997; Troffer-Charlier et al., 1998). Igualmente, se ha visto que el aumento en la expresión de ALDRP es capaz de corregir la deficiencia en el metabolismo de los ácidos grasos de cadena muy larga asociado a alteraciones en ALDP (Braiterman et al., 1998; Cartier et al., 1995; Flavigny et al., 1999; Netik et al., 1999). Ahora bien, la proteína ALDRP que presenta la mayor homología a ALDP, parece desempeñar una función similar a la de ALDP constituyendo un blanco terapéutico importante para la ALD-X (Kemp et al., 1998; Pai et al., 2000; Singh et al., 1998). No obstante aún se desconoce la forma como ALDP y/o los demás medio transportadores peroxisomales intervienen en la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena muy larga, y como la ALDP mutada produce una reducción en la actividad de la enzima Acil-CoA Sintetasa para ácidos grasos de cadena muy larga (VLACS del inglés, *Very Long-chain Acyl-Coenzyme A Synthetase*) (Steinberg et al., 1999; Wiesinger et al., 2013; Yamada et al., 1999).

Los ácidos grasos cumplen funciones críticas, ya que representan la mayor fuente de almacenamiento de energía, constituyen los componentes esenciales para la estructura de las membranas, sirven para modificar y regular las propiedades de muchas proteínas a través de enlaces covalentes y están involucrados en la señalización celular y en la regulación metabólica (Dowhan et al., 2008). Cabe agregar que por sus propiedades anfipáticas los ácidos grasos requieren asociarse con proteínas para su transporte y tráfico intracelular (Mouille et al., 2012).

Por otra parte, el metabolismo de lípidos es crucial en el cerebro y se hace más complicado por la presencia de la barrera hematoencefálica (Benarroch, 2011; Hawkins and Davis, 2005). La concentración total de ácidos grasos en la sangre es de 0,4 a 0,5 mM, no obstante el 99% de éstos están unidos a la albúmina, por tanto la cantidad de ácidos grasos libres es mínima, la cual corresponde a 7,5

+/- 2,5 nM (Richieri and Kleinfeld, 1995). Los ácidos grasos deben disociarse de la albúmina con el propósito de atravesar la barrera hematoencefálica e ingresar al cerebro. Aunque, existen pocos estudios relacionados con el transporte de ácidos grasos a través de la barrera hematoencefálica, se sugiere que éstos pueden difundir a través de ésta (Hamilton and Brunaldi, 2007). De acuerdo con este mecanismo, la regulación de los ácidos grasos estaría dada por las propiedades de la membrana, lo cual implica que todos los ácidos grasos de la dieta estarían a disposición de las células del cerebro. No obstante, el transporte de ácidos grasos a través de la barrera hematoencefálica podría ser un proceso complicado y altamente regulado por proteínas de transporte (Kamp and Hamilton, 2006; Stahl, 2004). En la barrera hematoencefálica y en diferentes áreas del cerebro se ha demostrado la expresión de proteínas transportadoras de ácidos grasos como FATP1, FATP3, FATP4, FAT/CD36 y FABPs, las cuales también están involucradas en el desarrollo del cerebro y neurogénesis en adultos (Anderson and Stahl, 2013; Moulle et al., 2012; Owada, 2008).

La composición de los ácidos grasos en el cerebro y en el tejido neural es extremadamente variable e incluye una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), especialmente de cadena larga, como el ácido araquidónico (AA, C20), ácido eicosapentaeoico (EPA, C22) y ácido docosahexaenoico (DHA, C22); estos ácidos grasos son críticos para el desarrollo, estructura y función del SNC, para la supervivencia neuronal y la neurotransmisión. Es así que, por ejemplo, el 50% de las membranas de las neuronas están formadas por ácidos grasos (Akbar et al., 2005; Bazan, 2005; Chalon et al., 2001; Hamilton and Brunaldi, 2007; Owada, 2008; Rao et al., 2007). También, se ha demostrado que la ingesta de PUFAs constituye un factor ambiental capaz de actuar sobre el desarrollo cerebral y procesos de neurotransmisión sináptica (Chalon et al., 2001; Moulle et al., 2012).

Los ácidos grasos de cadena muy larga han sido objeto de investigación debido a que se han relacionado con diferentes desórdenes del SNC que afectan su

Capítulo 2: Estado del arte

metabolismo (Berger et al., 2001; Singh, 1997). Estos ácidos grasos de cadena muy larga han sido encontrados en gran proporción formando las hojas de mielina, lo que sugiere su posible papel en la estructura de las membranas mielínicas (Bourre et al., 1977; O'Brien and Sampson, 1965; Singh, 1997; Svennerholm and Stallberg-Stenhagen, 1968). Además, bajo condiciones patológicas la acumulación de ácidos grasos de cadena muy larga, se encuentran en forma esterificada a especies lipídicas como ésteres de colesterol, gangliósidos, esfingomielina, fosfatidilcolina (Antoku et al., 1984; Igarashi et al., 1976; Sharp et al., 1991; Singh, 1997; Tsuji et al., 1981) y en la proteína proteolipídica de mielina (Bizzozero et al., 1991; Bizzozero and Good, 1991).

En los pacientes con ALD-X estos ácidos grasos de cadena muy larga se acumulan de forma excesiva produciendo la desestabilización de las membranas celulares y también de la mielina en el SNC (Di and Salvati, 1997; Knazek et al., 1983; Whitcomb et al., 1988). Adicionalmente, se ha observado que pacientes jóvenes con ALD-X presentan acumulación de ácidos grasos de cadena muy larga pero permanecen asintomáticos durante varios años (Aubourg, 1999), igual a lo que se ha descrito en modelos animales de ALD-X (Forss-Petter et al., 1997; Kobayashi et al., 1997; Lu et al., 1997; Pujol et al., 2002), lo que sugiere que existe un evento adicional a la acumulación de ácidos grasos de cadena muy larga que desencadena el proceso de desmielinización en el SNC y el cuadro clínico asociado.

Por otra parte, la ALD-X se asocia a un proceso inflamatorio que en la cALD puede afectar la sustancia blanca y algunas células relacionadas en el cerebro, mientras que en la AMN se afecta el tracto axonal de la médula espinal (Powers et al., 1992; Powers et al., 2000; Powers and Rubio, 1995; van Geel et al., 2001). Por ejemplo, en un estudio neuropatológico realizado por Paintlia y colaboradores (2003) en la región de la placa desmielinizante de cerebros cALD, se encontró mayor expresión de citoquinas (IL-1 α , TNF- α , IL-6, IL-2, IL-3 y GM-CSF), quimocinas, receptores de quimocinas y la sintasa de óxido nítrico inducible

(iNOS), en relación a regiones del cerebro no afectadas y a cerebros de controles (Paintlia et al., 2003).

Así mismo, las citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 α e IFN- γ se han encontrado expresadas en enfermedades como la esclerosis múltiple y se han relacionado con el proceso inflamatorio desmielinizante (Centonze et al., 2010; Powers et al., 1992). De igual manera, Khan y colaboradores (1998) evaluaron el efecto de estas citoquinas (TNF- α , IL-1 α , IFN- γ) en la línea celular de glioma C6 y encontraron deficiencia en el metabolismo de ácidos grasos de cadena muy larga asociado a la inhibición de la β -oxidación que trae como consecuencia final su acumulación (Khan et al., 1998).

De acuerdo con los razonamientos que se han venido realizando y al amplio espectro clínico que presenta esta enfermedad, los posibles tratamientos van dirigidos a disminuir la acumulación de ácidos grasos de cadena muy larga, o por otro lado, evitar el proceso inflamatorio que lleva a la muerte de los oligodendrocitos, las células blanco de esta enfermedad (Baarine et al., 2012a; Baarine et al., 2012b; Berger et al., 2010; Biffi et al., 2011; Miranda et al., 2012; Semmler et al., 2008).

Con referencia a lo anterior, los posibles blancos terapéuticos para la ALD-X han sido evaluados en su mayoría en modelos celulares que no involucran células formadoras de mielina, específicamente oligodendrocitos o en modelos *in vivo* de adrenoleucodistrofia, como el ratón *knockout* ABCD1 $^{-/-}$, que simulan únicamente el desorden metabólico, pero no presentan procesos inflamatorios, ni desmielinizantes. No obstante, el modelo *in vivo* de doble mutante ABCD1 $^{-/-}$, ABCD2 $^{-/-}$, ha podido simular las características de desmielinización e inflamación, similar al que se presenta en el fenotipo de AMN (Pujol et al., 2004). En este último modelo de ratones sintomáticos, se ha evaluado el efecto del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF1) y la neurotrofina 3 (NT-3) como terapia génica

donde se logró interrumpir la progresión de la enfermedad y se observó recuperación del estado de la mielina en la médula espinal (Mastroeni et al., 2009).

2.1.2 Enfermedad De Krabbe

La EK o leucodistrofia de células globoides es un desorden neurológico fatal del metabolismo de los esfingolípidos con herencia autosómica recesiva, con una incidencia estimada de 1:100.000-200.000 nacimientos vivos en Estados Unidos (Suzuki, 2003;Wenger, 1993). Es la leucodistrofia más frecuente en la infancia temprana, alrededor de cuatro a cinco meses, aunque se ha reportado el inicio de sintomatología en adultos jóvenes (Kolodny et al., 1991). La EK tiene tres estadios clínicos descritos por Hagberg; el primero, irritabilidad, rigidez de miembros inferiores, retardo psicomotor y fiebre; el segundo, opistótonos, mioclonías, profundización de la regresión psicomotora e hipertermia; y el tercero, postura de descerebración y parálisis (Wenger, 1993).

El defecto bioquímico de base en esta enfermedad es la acumulación del esfingolípidio galactosilesfingosina (Psicosina) en las células del tejido nervioso. La Psicosina es uno de los sustratos de la enzima lisosomal β -galactosilcerebrosidasa (β -galactosilceramidasa, GalC), el gen GALC se encuentra en el cromosoma 14q31, el cual se encuentra mutado en los pacientes con EK y conduce a la deficiencia de la enzima GALC (Zhu et al., 2012). Por tanto, la acumulación progresiva de Psicosina es la responsable de la patogénesis en esta enfermedad (Suzuki, 2003;Suzuki and Suzuki, 1983;Suzuki and Taniike, 1995). Además, la acumulación de Psicosina es especialmente citotóxica en los oligodendrocitos, resultando así en desmielinización temprana (revisado en Singh et al., 2009). Los cambios histopatológicos más importantes hallados en pacientes con EK y en el modelo murino (ratón Twitcher), es la extensa pérdida de mielina y oligodendrocitos, gliosis y presencia de macrófagos únicos o células globoides PAS-positivas, marca histopatológica de la enfermedad (Suzuki and Suzuki, 1983). Cabe agregar que en la EK también se presenta pérdida de peroxisomas y/o función peroxisomal, lo cual

puede ser explicado como un evento secundario a la disfunción lisosomal (Haq et al., 2006;Khan et al., 2005).

El diagnóstico de la EK se confirma por el bajo nivel de la actividad enzimática de GalC (0% - 5% de la actividad normal) en leucocitos aislados de sangre completa o de fibroblastos cultivados derivados de piel. También, se puede determinar la concentración de Psicossina, la cual es muy elevada en pacientes con inicio temprano de la enfermedad, usualmente, mayor a 10nmol/L. Finalmente, se sugiere realizar la secuenciación del gen GALC para determinar la mutación (revisado en Orsini et al., 2016).

El modelo de ratón Twitcher de EK tiene una mutación sin sentido (W339X) en el gen GALC en ratones C5Bl (Suzuki and Taniike, 1995). Este es un modelo genético, enzimático y morfológico auténtico de la EK humano (Suzuki and Suzuki, 1983;Suzuki and Taniike, 1995). El ratón Twitcher desarrolla temblores alrededor del día posnatal 20, seguido por deficiencias del crecimiento, pérdida de peso, debilidad y parálisis de patas traseras. En el día posnatal 40, el ratón alcanza un estado terminal y usualmente no sobrevive más allá de 45 días (Suzuki and Suzuki, 1983). El cerebro del Twitcher presenta células globoides, deficiencia de la enzima GalC, acumulación de Psicossina, pérdida de oligodendrocitos (Suzuki and Suzuki, 1983) y de peroxisomas (Haq et al., 2006;Khan et al., 2005).

Se ha demostrado que la Psicossina es altamente tóxica, regula a la alta c-jun, como vía pro-apoptótica; regula a la baja NF- κ B, como vía de supervivencia; promueve la liberación de citocromo c (Haq et al., 2003) e induce la actividad de la fosfolipasa A2 (Giri et al., 2006), generando agentes pro-inflamatorios como la lisofosfatidilcolina y liberación de ácido araquidónico, con la consecuente generación de radicales libres (Giri et al., 2006); induce incremento en la expresión de citoquinas inflamatorias, como TNF- α , IL-6, sintasa de óxido nítrico y por ende la producción de óxido nítrico (Giri et al., 2002;Giri et al., 2008); inhibe enzimas plasmalógenas (Haq et al., 2006;Khan et al., 2005;Singh et al., 2009), activa la

Capítulo 2: Estado del arte

caspasa 3 (Smith et al., 2011); adicionalmente, induce defosforilación de neurofilamentos por deregulación de las fosfatasa PP1 y PP2A (Cantuti-Castelvetri et al., 2012), y todo esto se correlaciona con el número de células Tunel positivas y ADN fragmentado (indicadores de células apoptóticas) (Haq et al., 2003; Haq et al., 2006).

Adicionalmente, en células progenitoras de oligodendrocitos, se ha mostrado que la Psicosina inhibe la fosforilación de AKT, lo que contribuye a la muerte en estas células (Haq et al., 2006; Zaka et al., 2005). La Psicosina también induce la formación de células globoides mediante la inhibición de la citocinesis (Kanazawa et al., 2000). Recientemente, se ha reportado que la Psicosina se acumula en la membrana celular, especialmente en balsas lipídicas y altera la arquitectura de la membrana, y se cree que este fenómeno perturba vías de señalización involucradas en supervivencia y mielinización (White et al., 2009; White et al., 2011). El efecto pro-apoptótico de la Psicosina se ha definido en células C6 gliales de rata (Jatana et al., 2002), en líneas celulares de oligodendrocitos y progenitores de oligodendrocitos y cultivos primarios (Giri et al., 2006; Zaka et al., 2005), de tal forma que se sugiere que la Psicosina es capaz de causar muerte de oligodendrocitos en cerebros Twitcher y en cerebros de pacientes con EK por apoptosis.

Se ha demostrado que existe una pérdida del número de peroxisomas en el cerebro Twitcher (Haq et al., 2006), y estudios utilizando tratamientos de Psicosina en células gliales C6 muestran disminución de las proteínas peroxisomales (Khan et al., 2005) y regulación a la baja de la actividad transcripcional de PPAR- α (Haq et al., 2006), un factor de transcripción involucrado en la expresión de proteínas peroxisomales (Tan et al., 2005), indicando la potencial contribución de los peroxisomas en esta patología. Por tanto, también se sugiere que la progresión inflamatoria de la enfermedad puede estar mediada por la disfunción peroxisomal a través de dos mecanismos, el primero, por inhibición de las enzimas peroxisomales, mediado por intermediarios como el óxido nítrico y los radicales libres; y el segundo,

por inhibición de la biogénesis peroxisomal, mediante la regulación a la baja de PPARs (Singh et al., 2009).

2.2 PEROXISOMAS

Los peroxisomas son organelos de una sola membrana presentes en todas las células eucariotas. Estos son esenciales para algunas funciones celulares como el metabolismo de lípidos (Hunt and Alexson, 2008; Wanders and Waterham, 2006), y están principalmente involucrados en la β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga, ácidos grasos de cadena muy larga y ácidos grasos de cadena ramificada (Schrader and Fahimi, 2004). Además, los peroxisomas son importantes en la homeostasis de las especies reactivas de oxígeno y especies de nitrógeno (Schrader and Fahimi, 2008). También, participan en la síntesis de ácidos grasos específicos y esenciales para el cerebro, como el ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3) y plasmalógenos, los cuales son indispensables para el crecimiento de las neuronas y son componentes importantes de la vaina de mielina (Brites et al., 2004).

Los peroxisomas ejercen funciones vitales dentro de los oligodendrocitos y la pérdida de su actividad resulta en enfermedades neurológicas dismielinizantes fatales (Steinberg et al., 2006; Wanders and Waterham, 2006), ya que alteraciones en la función peroxisomal de los oligodendrocitos favorece la acumulación de ácidos grasos de cadena muy larga e inducción de muerte de estas células (Baes and Aubourg, 2009; Bottelbergs et al., 2010; Kassmann et al., 2007). Kassmann y colaboradores (2007) demostraron en un modelo transgénico de ratón que la pérdida de los peroxisomas en los oligodendrocitos (CNP-Pex5) conduce a desmielinización progresiva del SNC (Kassmann et al., 2007); mientras que, Bottelbergs y colaboradores (2010) usando ratones transgénicos carentes de peroxisomas en astrocitos (GFAP-Pex5) o neuronas (NEX-Pex5) no evidenciaron tal fenotipo neurodegenerativo, y tampoco acumulación de ácidos grasos de cadena muy larga (Bottelbergs et al., 2010), lo que sugiere la especificidad neurotóxica de las alteraciones en peroxisomas.

Capítulo 2: Estado del arte

Los desórdenes peroxisomales pueden ser causados por mutaciones en proteínas únicas o por defectos a nivel de biogénesis peroxisomal. Adicional a las alteraciones heredables de los peroxisomas, varios estudios han documentado la pérdida de peroxisomas a causa de mediadores pro-inflamatorios (Schrader and Fahimi, 2006) y acumulación de Psicovina (Contreras et al., 2008; Haq et al., 2006; Khan et al., 2005). De ahí la importancia del estudio de los peroxisomas en el contexto de las enfermedades desmielinizantes.

2.4.3 Proliferación De Peroxisomas

Los términos proliferación y multiplicación de peroxisomas son comúnmente usados para referirse al proceso de generación de peroxisomas. Es así como multiplicación hace referencia al mantenimiento del número de los peroxisomas, mientras, proliferación se refiere al pronunciado incremento de estos, usualmente, después de una estimulación externa, tal como lo describieron Hess y colaboradores (1965) en un modelo de ratas tratadas con un medicamento hipolipemiante (Hess et al., 1965). La proliferación de los peroxisomas depende de eventos de señalización asociados a cambios adaptativos celulares, que conducen a modificaciones controladas y coordinadas dentro del núcleo para aumentar la transcripción de genes relacionados con proteínas de biogénesis peroxisomal, que resultan en un drástico incremento del número y tamaño de los peroxisomas (Schrader et al., 2012).

Hoy en día se conoce que la duplicación de peroxisomas pre-existentes se lleva a cabo a través del proceso de fisión y subsecuente maduración. Estudios de genética y proteómica en sistemas celulares de levaduras y mamíferos han permitido identificar aproximadamente 32 proteínas involucradas en la biogénesis de los peroxisomas, colectivamente denominadas peroxinas o Pex (Kim et al., 2006). Pex11p fue el primero de los componentes de la maquinaria de fisión en ser descubierto. Pex11p se conjuga con Pex25p y Pex27p e inducen la elongación y constricción del organelo. También, la GTPasa Rho1p está involucrada en este proceso y se sugiere que es reclutada por Pex25p para controlar la organización de

la actina en la membrana peroxisomal (Kim et al., 2006). Los eventos de fisión se relacionan con proteínas tales como Vps1p, DLP1 y Fis1, las cuales también están involucradas en el proceso de fisión mitocondrial. Así mismo, el tamaño de los peroxisomas es regulado por proteínas de membrana tales como Pex30p, Pex31p y Pex32p en *Sacharomyces cerevisiae* por un mecanismo aún desconocido (Schrader et al., 2012).

Estudios recientes usando microscopia de fluorescencia y aproximaciones bioquímicas sugieren que la membrana del retículo endoplasmático es la fuente para la formación de *novo* de los peroxisomas. Por su parte, la generación de *novo* de los peroxisomas no está restringida a células deficientes en el número de peroxisomas, sino que corresponde a un proceso normal de las células y requiere de Pex16p una proteína integral de la membrana (Kim et al., 2006). La inducción de la proliferación de los peroxisomas es mediada principalmente por lípidos. En mamíferos se ha descrito que el factor de transcripción activado por un ligando PPAR- α es capaz de promover la proliferación peroxisomal (Li et al., 2002).

2.3 RECEPTORES NUCLEARES Y PPARs

Los receptores nucleares constituyen una familia de proteínas con 48 miembros conocidos que actúan como factores de transcripción, regulando la expresión de diferentes genes a través de la formación de heterodímeros funcionales activados por unión del ligando (Sladek, 2011). Todos los miembros de esta familia presentan características estructurales comunes: un dominio de unión de ligando localizado en la mitad C-terminal, un dominio de unión a DNA altamente conservado en la región central, y un dominio de activación de la transcripción hacia el extremo N-terminal de la molécula (Berger and Moller, 2002; Shi, 2007; Sladek, 2011).

Una subfamilia de receptores nucleares es la de los receptores activados por el proliferador peroxisomal (PPARs), que contiene al menos tres miembros que son codificados en humanos y ratones por genes diferentes: 1) PPAR- α (NR1C1) es expresado principalmente en tejidos con alta oxidación de ácidos grasos como son

Capítulo 2: Estado del arte

hígado, riñón, intestino delgado, músculo y corazón. En el hígado PPAR- α es el principal regulador de la β -oxidación de ácidos grasos en mitocondrias y peroxisomas (Hashimoto et al., 2000); 2) PPAR- β (NC1R2), también conocido como PPAR- δ , es de amplia distribución e induce la expresión de genes requeridos para la β -oxidación de ácidos grasos y la disipación de energía en tejido adiposo y músculo esquelético (Wang et al., 2003); y 3) PPAR- γ (NR1C3) es expresado principalmente en tejido adiposo. Se encuentra también en microglía, astrocitos, oligodendrocitos y neuronas, y es esencial en la diferenciación de adipocitos promoviendo el almacenamiento de lípidos/energía en los adipocitos maduros (Rosen and Spiegelman, 2001).

Los receptores PPARs regulan la expresión génica a través del reconocimiento y unión a los denominados "elementos reguladores de respuesta a PPAR" (PPREs) presentes en la región promotora de los genes blanco (Figura 2.1). Los receptores PPAR cumplen un importante papel en la regulación de la expresión de genes implicados en el metabolismo de lípidos: PPAR- α regula genes implicados en el metabolismo del colesterol, mientras que PPAR- γ hace lo propio en el metabolismo de los ácidos grasos (Viswakarma et al., 2010).

Entre los fármacos más utilizados en la actualidad para el tratamiento de las complicaciones asociadas con la diabetes tipo-2 y dislipidemias están las tiazolidinedionas o TZDs (rosiglitazona y pioglitazona, entre otros) que actúan como antidiabéticos al aumentar la sensibilidad a la insulina y mejorar el metabolismo de la glucosa. Otro tipo de fármacos son los fibratos (fenofibrato y gemfibrozil, entre otros), que actúan como hipolipemiantes y anti-ateroscleróticos al ayudar en el metabolismo de lípidos. Ambos tipos de fármacos son agonistas de los receptores PPAR: los TZDs son agonistas PPAR- γ , mientras que los fibratos son agonistas PPAR- α (Etgen and Mantlo, 2003; Jay and Ren, 2007).

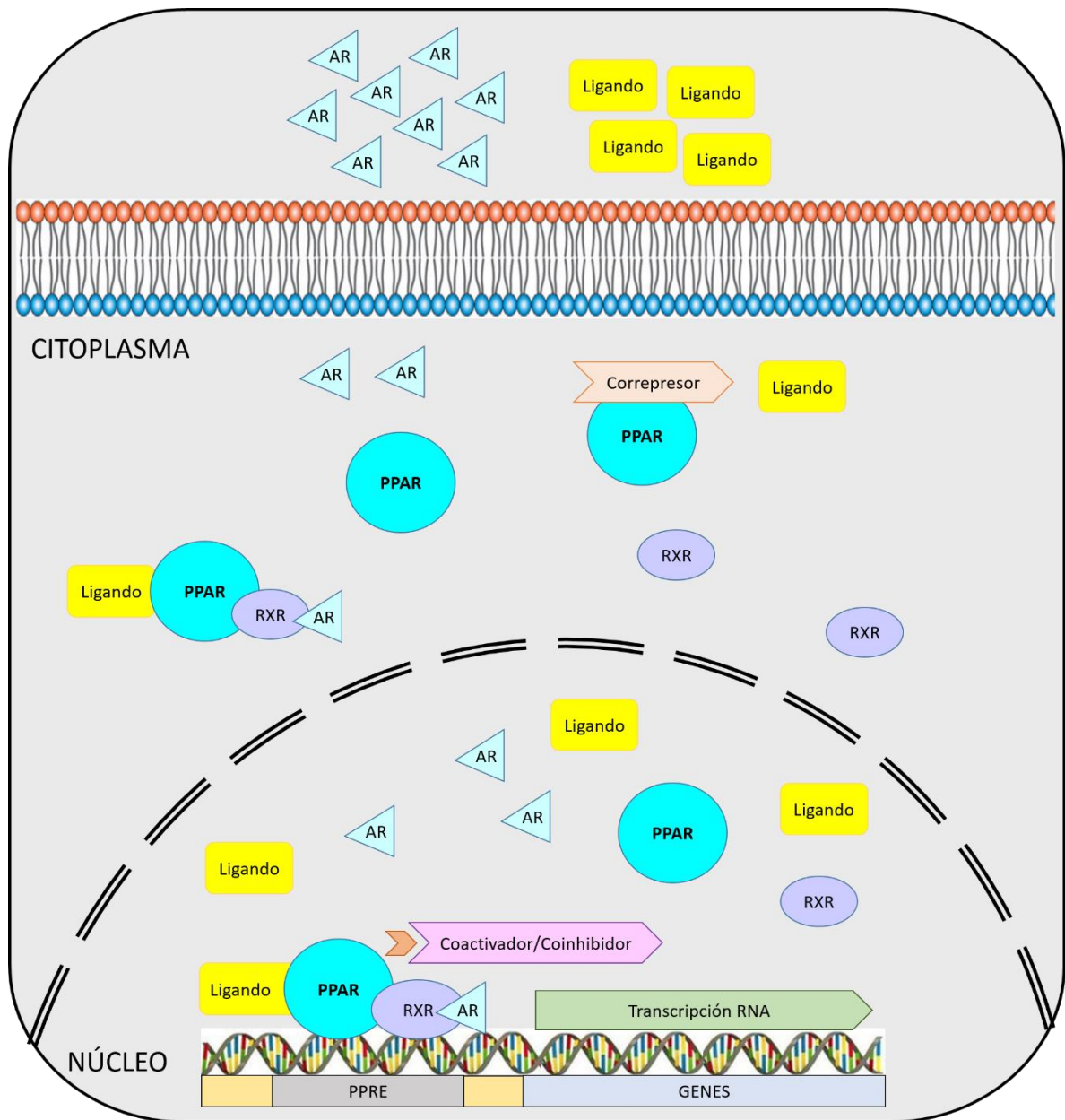


Figura 2.1 Mecanismo de acción de los receptores nucleares PPARs

Los receptores nucleares PPARs después de su unión al ligando sufren un cambio conformacional que permite la disociación de correpresores y la unión a coactivadores, así como su traslocación al núcleo y heterodimerización con el receptor X retinoico (RXR) cuyo ligando es el ácido retinoico (AR). Los heterodímeros de PPAR/RXR se unen a regiones específicas del DNA denominadas elementos de respuesta a PPARs (PPRE). La función transcripcional de los PPARs es regulada por diferentes moléculas coactivadores o coinhibidores, los cuales pueden estimular la función o represión de los PPARs.

Se ha demostrado en diferentes modelos que tratamientos con agonistas PPARs regulan positivamente los niveles de proteínas PPAR-coactivador-1 (PGC-1) (Spiegelman, 2007), tanto alfa como beta (Hondares et al., 2006;Shao et al., 2010), que son reconocidas como las reguladoras de la biogénesis mitocondrial en diferentes tejidos, incluyendo adipocitos pardos, blancos y neuronas (Rohas et al., 2007;Spiegelman, 2007). Adicionalmente se ha demostrado en diferentes modelos, incluyendo neuronas, que los PPARs pueden proteger de apoptosis mediante la regulación positiva de los niveles de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 (Wu et al., 2009).

Los receptores PPARs están involucrados en la diferenciación celular en una variedad de tejidos (Barbier et al., 2002;Fajas et al., 2001). Los receptores PPARs están presentes en el SNC, con una mayor expresión de PPAR- β (Heneka and Landreth, 2007). En células obtenidas de glioma, los tratamientos con agonistas PPAR- γ han mostrado una disminución en la proliferación celular e inhibición en los procesos de migración e invasión (Coras et al., 2007;Han et al., 2015). Por su parte los agonistas PPAR- β promueven la diferenciación de pre-oligodendrocitos de cerebro de ratas (Saluja et al., 2001) y agonistas PPAR- γ tienen la capacidad de inducir maduración de oligodendrocitos en medula espinal (Roth et al., 2003). El tratamiento con agonistas PPAR- γ en cultivos primarios de células progenitoras de oligodendrocitos de rata promueve la diferenciación de estas células e incrementa su capacidad antioxidante mediante el incremento en los niveles de enzimas como la catalasa, superóxido dismutasa de cobre-zinc, promoviendo el equilibrio en la homeostasis celular (Bernardo et al., 2009), que resulta de gran importancia en este tipo celular por la gran cantidad de radicales libres que se generan durante el metabolismo de la formación de la mielina.

Dentro de los efectos de agonistas PPARs en el modelo experimental de la encefalomiелitis autoinmune (EAE), el cual es frecuentemente utilizado para el estudio de enfermedades desmielinizantes autoinmunes como la esclerosis

múltiple, se ha observado que logran retrasar el desarrollo de la enfermedad y mejorar las manifestaciones clínicas mediante mecanismos que reducen la respuesta inflamatoria, la activación de células de la glía y la desmielinización (Diab et al., 2002; Feinstein et al., 2002; Lovett-Racke et al., 2004; Natarajan and Bright, 2002; Niino et al., 2001; Peiris et al., 2007; Polak et al., 2005; Raikwar et al., 2006).

Los efectos de agonistas PPARs en modelos de ALD-X aún no han sido estudiados a profundidad y resultan de gran interés debido a que esta es una enfermedad peroxisomal que genera un desbalance en el contenido de ácidos grasos de cadena muy larga y los PPARs han mostrado su potencial en la regulación de la expresión de proteínas peroxisomales y la homeostasis de lípidos.

En la EK los efectos de los agonistas PPARs han sido parcialmente estudiados hasta el momento. Se ha determinado que los ratones Twitcher con mutaciones en GalC e incremento de Psicossina, tienen menores niveles de expresión y actividad PPAR- γ , lo cual puede correlacionarse con la disminución de proteínas peroxisomales (Haq et al., 2006), de tal forma que el tratamiento con agonistas PPARs podría mostrar ser beneficioso para esta enfermedad.

2.4 FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA (IGF1)

El factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 o IGF1, también conocido como somatomedina C, es una hormona que corresponde a un polipéptido de setenta (70) aminoácidos de 7,65kDa, cuya estructura es similar a la insulina, se produce principalmente en el hígado en respuesta a estímulos endocrinos por parte de la hormona de crecimiento; pero es también secretada en múltiples tejidos para generar efectos endocrinos, paracrinos y autocrinos (Le et al., 2001; Puche and Castilla-Cortazar, 2012). En humanos es codificado por el gen IGF1 localizado en el cromosoma 12 (Hoppener et al., 1985). A nivel celular, el IGF1 estimula proliferación, diferenciación, migración, sobrevivencia, metabolismo, entre otros (Jones and Clemmons, 1995; Le et al., 2001). Adicionalmente, el IGF1 es

Capítulo 2: Estado del arte

trascendental en el desarrollo y mantenimiento del SNC y sistema nervioso periférico (Woods et al., 1996).

A nivel de SNC el IGF1 es producido por neuronas (Andersson et al., 1988), astrocitos (Komoly et al., 1992; Madathil et al., 2013), microglía y macrófagos (Suh et al., 2013) y tiene una función muy importante en la proliferación, diferenciación y supervivencia de las neuronas y los oligodendrocitos. Por ejemplo, el estudio de Beck y colaboradores (1995) demostró que ratones homocigotos IGF1^{-/-} de dos meses de edad presentaban cerebros con morfología normal pero con tamaño reducido e hipomielización, la cual se reflejaba en la disminución de la sustancia blanca y el número de axones mielinizados (Beck et al., 1995). En contraste, el estudio de Cheng y colaboradores (1998) sugirió que la ausencia de IGF1 durante el desarrollo no era determinante en el proceso de mielinización porque en los cerebros de los ratones nulos para IGF1, la mielina era proporcional al tamaño del cerebro y a su composición neural (Cheng et al., 1998). Hoy en día se conoce que el proceso de mielinización es robusto y que no solo depende del factor de crecimiento IGF1.

El IGF1 tiene diversos efectos biológicos principalmente a través de su unión al receptor IGF1 (IGF1R), una proteína transmembranal hetero-tetramérica. El IGF1R pertenece a la familia de los receptores tirosina cinasa, los cuales son activados por dimerización inducida por la unión del ligando, lo que genera un cambio conformacional que favorece la transfosforilación de residuos específicos de tirosina que se encuentran en la región intracelular del receptor. Esto genera una señal que permite el anclaje de proteínas involucradas en la transducción de señales, por ejemplo IRS (del inglés *insulin receptor substrate*), Gab (del inglés *Grb2-associated binder*), Dok (del inglés *downstream of tyrosine kinases*) y FRS2 (del inglés *FGF receptor substrate 2*). De esta manera se desencadena la activación de múltiples vías de señalización dependiendo del contexto celular, principalmente, las vías PI3K/AKT y Ras/MAPKs (Figura 2.2) (Duan and Xu, 2005; Jones and Clemmons, 1995), que promueven la supervivencia celular a través de varios efectores incluidos

Capítulo 2: Estado del arte

redistribución de los canales iónicos y de las bombas en la membrana celular de las neuronas, lo cual requiere una redistribución de las mitocondrias frente a los cambios metabólicos (Campbell and Mahad, 2012).

A nivel celular los eventos de fusión y fisión mitocondrial se encuentran estrechamente ligados a varios eventos celulares como son la diferenciación y plasticidad neuronal (Liesa et al., 2009) y es por ello que diferentes investigadores asocian la morfología mitocondrial con la supervivencia, muerte y metabolismo celular (Chen and Chan, 2005). Las mitocondrias son organelos dinámicos que constantemente se organizan en filamentos y redes que resultan de la actividad de procesos de fusión y fisión. Estos mecanismos son importantes en el mantenimiento de la integridad mitocondrial, la conectividad bioquímica y eléctrica, así como la homeostasis del calcio celular, transporte axonal y dendrítico, mantenimiento del ADN mitocondrial, de la síntesis de ATP y del $\Delta\psi_m$ (potencial de membrana mitocondrial) (Herzig and Martinou, 2008).

La vía mitocondrial como vía final común ha sido la más extensamente estudiada en eventos de muerte y de supervivencia neuronal (Haeberlein, 2004). En los procesos corriente arriba de la activación mitocondrial participan una multitud de proteínas proapoptóticas (Bax, Bad, Bid, Bak, Bcl-xs) y antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xl) (Hengartner, 2000), algunas de las cuales están localizadas en la superficie citosólica de la membrana externa mitocondrial y se encargan de regular la homeostasis mitocondrial por diversos mecanismos como: inserción y formación directa de un poro transmembranal, interacción y regulación del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) y del transportador de nucleótidos de adenosina (ANT), convergiendo en últimas en la alteración del poro de permeabilidad transitoria, con la consecuente liberación del citocromo c, formación del apoptosoma y la activación de caspasas efectoras (Hengartner, 2000).

Las alteraciones mitocondriales surgen del delicado balance entre los niveles de las proteínas pro y antiapoptóticas dependientes a su vez de la naturaleza e intensidad del estímulo desencadenante, del estado y del tipo celular, de algunas

condiciones del microambiente celular externo (Mattson and Kroemer, 2003) y de manera "autónoma" de procesos de regulación que modifican las formas activas y/o inactivas de las distintas vías corriente arriba, por ejemplo la fosforilación de Bad por AKT (Datta et al., 1997), lleva a su secuestro en el citosol, mientras que la defosforilación inducida por ceramidas lo lleva a interactuar con Bcl-xl y con Bcl-2 disparando la apoptosis (Stoica et al., 2003). De igual forma, la ubiquitinación y subsecuente proteólisis de Bax por el sistema de ubiquitina proteosoma regula el proceso apoptótico (Li and Dou, 2000), y por esto es importante determinar como estos procesos de modificación postraducciona están implicados en la regulación de la supervivencia neuronal y su potencial implicación en neurodegeneración (Zhang et al., 2004).

A pesar de que se han estudiado varias vías de señalización involucradas en la muerte y supervivencia de oligodendrocitos en el contexto de enfermedades desmielinizantes (Giri et al., 2006; Haq et al., 2003; Jana and Pahan, 2010; Singh and Pujol, 2010; White et al., 2009; White et al., 2011; Zaka et al., 2005); aún no es claro cuáles son los mecanismos moleculares específicos que desencadenan la muerte celular, así como la función y dinámica mitocondrial en oligodendrocitos, en gran parte debido a la carencia de estudios en este contexto. De ahí la importancia de indagar por los procesos de función y dinámica mitocondrial en estas entidades patológicas, como posibles vías de muerte/supervivencia.

2.6 OLIGODENDROCITOS

Los oligodendrocitos son células gliales altamente especializadas del SNC encargadas de la formación de la mielina, la cual envuelve los axones de las neuronas y contribuye a la eficiencia y rapidez de la transmisión saltatoria de los potenciales de acción (Sherman and Brophy, 2005). Una de las principales características de las enfermedades desmielinizantes/dismielinizantes es la disminución de oligodendrocitos maduros, por lo tanto uno de los retos de estas investigaciones es la obtención de fármacos que permitan la diferenciación del linaje

Capítulo 2: Estado del arte

precursor de oligodendrocitos a su estado maduro en presencia de diferentes tóxicos. En el caso de la esclerosis múltiple, se han estudiado diferentes modelos en los cuales se ha demostrado que las citoquinas, especialmente $TNF\alpha$, inhiben la diferenciación a oligodendrocitos maduros (Giannakopoulou et al., 2011), hecho que sustenta la hipótesis, de que un microambiente inflamatorio contribuye en la disminución de la capacidad de diferenciación de las células desde su estado inmaduro (Pluchino et al., 2008; Pluchino and Martino, 2008). Algo similar ocurre en la EK, en la cual se ha sugerido una muerte temprana de las células precursoras de la mielinización por la acumulación de Psicosina (Suzuki, 2003).

2.7 MIELINA

En el SNC la mielina corresponde a una extensión de las membranas de los oligodendrocitos, la cual está compuesta por 70% de lípidos y 30% de proteínas. La mielina contiene colesterol, fosfolípidos y glucoesfingolípidos, cuyos mayores componentes son el colesterol y los glucoesfingolípidos (aproximadamente 27% y 31%, respectivamente). La mielina presenta baja capacitancia y alta resistencia, lo que permite aislar eléctricamente al axón para una rápida y eficiente propagación del impulso eléctrico, asimismo le sirve al axón como soporte trófico (Jackman et al., 2009; Nave, 2010). Ahora bien, los glucoesfingolípidos son una clase de esfingolípidos carentes del grupo fosfato, compuestos por ceramida (esfingosina + ácido graso) y un glúcido de cadena corta. Los glucoesfingolípidos se clasifican de acuerdo al monosacárido o polisacárido que se une por medio de un enlace β -glucosídico al grupo hidroxilo de la ceramida, a saber: cerebrósidos, glocsidos, sulfátidos y gangliósidos (Lehninger, 2003). La galactosilceramida y los sulfátidos son importantes en el proceso de diferenciación de los oligodendrocitos, señalización celular e interacción entre neurona y glía (Bansal et al., 1999; Won et al., 2013).

La síntesis de los glucoesfingolípidos inicia en el retículo endoplasmático con la condensación de L-serina y palmitoil-CoA y la subsecuente formación de la

ceramida a partir de reacciones de reducción, acilación y desaturación (Baumruker et al., 2005). La galactosilceramida es formada por la adición de un residuo de galactosa a la ceramida en el retículo endoplasmático y posteriormente una porción de galactosilceramida es convertida a sulfátido en el aparato de Golgi. Mientras, el glucocerebrósido es formado por la adición de un residuo de glucosa y el glucocerebrósido es transportado al aparato de Golgi desde el retículo endoplasmático donde se le adiciona un residuo de galactosa para finalmente formar lactosilceramida, el cual es el precursor de la mayoría de gangliósidos, excepto del gangliósido GM4 que es sintetizado por la acción secuencial de sialiltransferasas (Jackman et al., 2009).

La ceramida es el precursor para galactolípidos, gangliósidos y esfingomielina. La ceramida puede ser generada por síntesis de *novo* o por catabolismo de la esfingomielina o de los glucoesfingolípidos. Adicionalmente, durante el proceso de envejecimiento la actividad de las enzimas catabólicas (por ejemplo, esfingomielinasa) es mayor en comparación con la actividad de las enzimas anabólicas (por ejemplo, la ceramida sintasa), lo cual puede contribuir al incremento de los niveles de ceramida en el cerebro durante el proceso de envejecimiento. Por otra parte, recientemente se sugiere que el incremento de ceramida en el cerebro podría resultar de la potenciación de la síntesis de *novo*, la cual es mediada por seis diferentes enzimas denominadas ceramida sintasas (CerS 1-6) (Ledesma et al., 2012).

Con respecto a la función de los gangliósidos en la biología de la mielina se sugiere que estos se unen a varios receptores del tipo tirosina cinasa. Por ejemplo el GM3 se une al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) e inhibe su actividad tirosina cinasa, mientras tanto el GM1 se une y activa el receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFR), el GM1 y GM3 inhiben la actividad del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR), y varios gangliósidos inhiben la dimerización del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR); también el extremo carboxi-terminal del FGF-2 es capaz de interactuar con varios

Capítulo 2: Estado del arte

gangliósidos. En consecuencia los gangliósidos son capaces de modular la actividad de los receptores tirosina cinasa y de esta manera modular la diferenciación y proliferación de las células precursoras de oligodendrocitos (Jackman et al., 2009).

Por otra parte, el colesterol es pobremente importado desde la periferia por tanto debe ser sintetizado de *novo* en los oligodendrocitos (Jurevics and Morell, 1995). El proceso de síntesis de colesterol en los oligodendrocitos ocurre en el retículo endoplasmático, luego es transportado al aparato de Golgi para su posterior incorporación a la membrana plasmática. Se requieren altos niveles de colesterol para la formación de la mielina, y el contenido de colesterol en los oligodendrocitos es un factor limitante para la maduración del cerebro (Saher et al., 2005). Aun cuando el transporte del colesterol en los oligodendrocitos es desconocido se sugiere que debe ser llevado a cabo por transporte vesicular, contacto directo con la membrana o transportadores citoplasmáticos (Maxfield and Wustner, 2002).

2.8 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

La señalización intracelular comprende un gran y diverso grupo de moléculas que actúan en conjunto y se activan de forma secuencial bajo un contexto celular o estímulos extracelulares para controlar diferentes procesos, por ejemplo: proliferación, diferenciación, metabolismo, supervivencia o muerte celular. A pesar de que se han estudiado varias vías de señalización involucradas en la muerte y supervivencia de oligodendrocitos en el contexto de enfermedades desmielinizantes/dismielinizantes (Giri et al., 2006; Haq et al., 2003; Jana and Pahan, 2010; Singh and Pujol, 2010; White et al., 2009; White et al., 2011; Zaka et al., 2005); aún no es claro, cuales son los mecanismos moleculares específicos que desencadenan la muerte de los oligodendrocitos en este grupo de enfermedades.

Existen varias vías de señalización intracelular y estas a su vez interaccionan unas con otras a fin de generar una respuesta en la célula, la cual depende de su contexto. Las vías de señalización relacionadas con supervivencia, metabolismo y

diferenciación en oligodendrocitos son principalmente las vías PI3K/AKT, MAPK/ERK y AMPK/mTOR (Giri et al., 2006;Haq et al., 2003;Jana and Pahan, 2010;Singh and Pujol, 2010;White et al., 2009;White et al., 2011;Zaka et al., 2005), que median la respuesta asociada a la activación de receptores de membrana por diversos factores de crecimiento (incluyendo IGF1), en particular receptores tirosina cinasa, y en respuesta a cambios metabólicos intracelulares (Liu et al., 2011;Pearson et al., 2001).

2.8.1 PI3K/AKT

La cinasa PI3K (del inglés, *phosphatidil inositol-3 kinase*) consiste de una subunidad reguladora (85kDa) y una catalítica (110kDa) encargada de la fosforilación de lípidos de inositol para generar 3-fosfoinositoles (PI: PI(3)P, PI(3,4)P2 y PI(3,4,5)P3). Estos se unen a un dominio homólogo de plekstrina presente en una gran variedad de moléculas de señalización, alterando su actividad y localización subcelular. La función de supervivencia de PI3K en particular esta mediada por el reclutamiento y activación de AKT. Recientemente, se ha demostrado que la activación de AKT requiere su translocación a la membrana plasmática y la fosforilación en dos residuos serina 473 (Ser 473) y treonina 308 (Tre 308). Adicionalmente, los blancos corriente abajo de AKT son diversos, y se asocian a una gran variedad de repuestas, en particular relacionadas con el metabolismo y la supervivencia celular (Figura 2.3) (Hirsch et al., 2007).

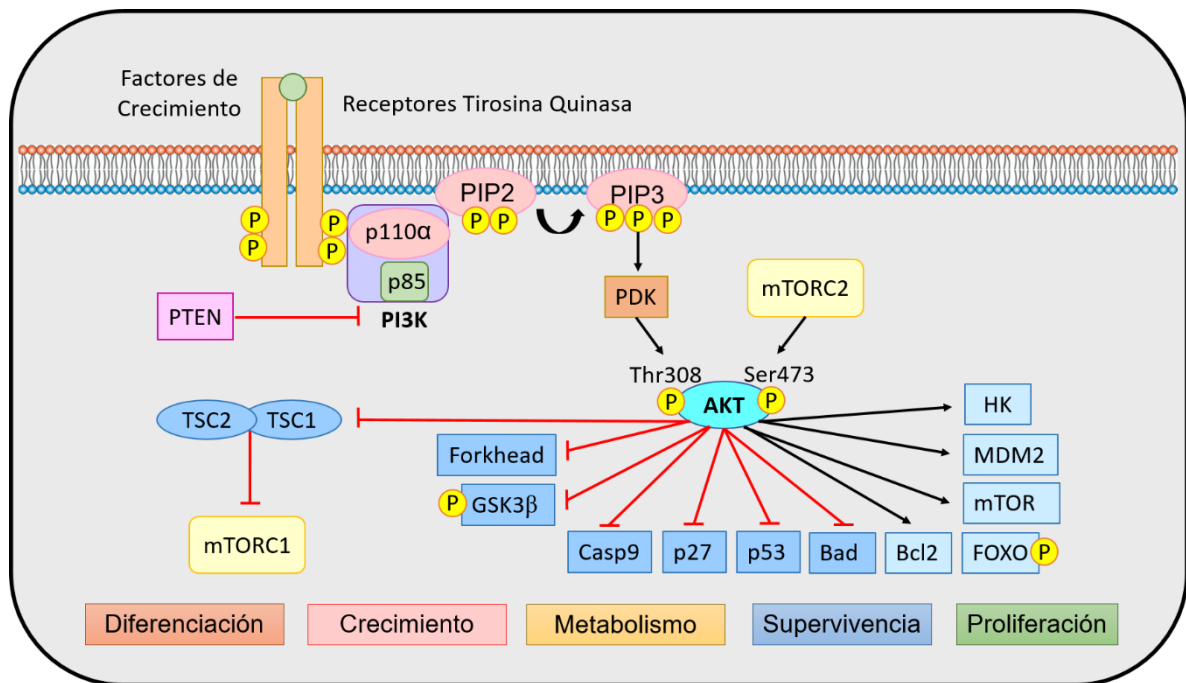


Figura 2.3 Vía PI3K/AKT

Representación esquemática de la activación de la vía PI3K/AKT a partir de receptores tirosina cinasa. Las interacciones de activación se denotan con flechas negras y las interacciones de inhibición se denotan con flechas rojas.

2.8.2 MAPK/ERK

La vía Ras/MEK/ERK también depende de la activación de receptores tirosina cinasa (Huang and Reichardt, 2003), cuya activación depende de proteínas adaptadoras como Sos y Grb2 que activan el centro regulador de esta vía, la proteína Ras (proteína GTPasa). Posteriormente, Raf es activada por Ras y es reclutada a la membrana, donde forma un complejo estable con MEK1/2 y de esta manera se activa por fosforilación a ERK1/2, las cuales son capaces de regular por fosforilación varios blancos citoplasmáticos y nucleares que controlan funciones de proliferación, diferenciación y muerte celular (Figura 2.4) (Cagnol and Chambard, 2010).

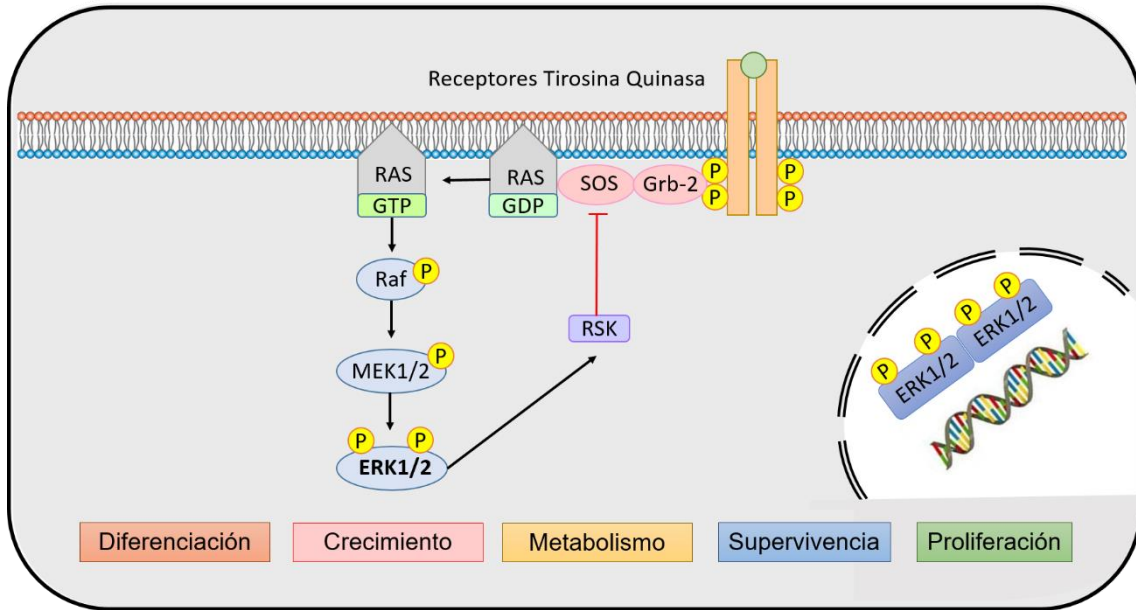


Figura 2.4 Vía MAPK/ERK1-2

Representación esquemática de la activación de la vía MAPK/ERK1-2 a partir de receptores tirosina quinasa. Las interacciones de activación se denotan con flechas negras y la interacción de inhibición se denota con la flecha roja.

2.8.3 AMPK/mTOR

AMPK (del inglés, *AMP-activated protein kinase*) es una serina/treonina cinasa altamente conservada en eucariotas. En mamíferos está compuesta por una subunidad catalítica α ($\alpha 1$ o $\alpha 2$), una subunidad reguladora β ($\beta 1$ o $\beta 2$) y una subunidad de unión a AMP γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 3$). Esta cinasa se activa cuando la relación ADP/ATP o AMP/ATP aumenta, es decir en casos de disminuciones modestas de ATP con relación al incremento de ADP y AMP, por lo tanto se conoce como el sensor intracelular de los niveles de nucleótidos de adenosina. AMPK es una de las proteínas centrales en la regulación del metabolismo celular y es fundamental en todas las células para mantener el balance entre el consumo y generación de ATP, de tal forma que su activación promueve vías catabólicas e inhibe vías

Capítulo 2: Estado del arte

anabólicas. En mamíferos, AMPK coordina el crecimiento, el metabolismo y la autofagia y regula el metabolismo de lípidos, colesterol y glucosa en tejidos especializados como hígado, músculo y tejido adiposo (Hardie, 2007;Hardie et al., 2012;Hardie, 2015;Hardie et al., 2016).

La activación de AMPK está regulada por la fosforilación de la subunidad α en el residuo treonina 172 por AMPKK (AMPK kinases), LKB1 (tumor suppressor) y varias CaMKs (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases) (Hardie, 2004;Woods et al., 2005). Por otra parte, las subunidades γ presentan un dominio de unión a nucleótidos, AMP o ATP, de manera mutuamente excluyente, de tal forma que la fosforilación de AMPK está modulada de manera alostérica, ya que su unión a AMP promueve la fosforilación, mientras que la unión a ATP la inhibe.

mTOR (del inglés, *mammalian target of rapamycin*) es una serina/treonina cinasa atípica, perteneciente a la familia de cinasas relacionadas con cinasas fosfatidilinositol (PIKK). mTOR actúa como regulador maestro de los procesos anabólicos, es decir que promueve la biogénesis de ribosomas y la síntesis de proteínas, nucleótidos, ácidos grasos y lípidos e inhibe procesos catabólicos como la autofagia (Saxton and Sabatini, 2017). Además, coordina la tasa de crecimiento celular, la proliferación, supervivencia y diferenciación celular (Inoki et al., 2003). mTOR es parte de dos complejos estructural y funcionalmente distintos, mTORC1 (mTOR complejo 1) y mTORC2 (mTOR complejo 2). mTORC1 contiene mTOR, RAPTOR (del inglés, *regulatory-associated protein of mTOR*) y mLST8 (del inglés, *mammalian lethal with sec-13 protein 8*) y es sensible a Rapamicina (Hara et al., 2002;Kim et al., 2002;Kim et al., 2003). Mientras, mTORC2 contiene mTOR, RICTOR (del inglés, *rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mSIN1 (del inglés, *mammalian stress-activated MAPK-interacting protein 1*), y mLST8 y es insensible al tratamiento agudo con Rapamicina (Figura 2.5) (Jacinto et al., 2004;Jacinto et al., 2006;Sarbassov et al., 2004).

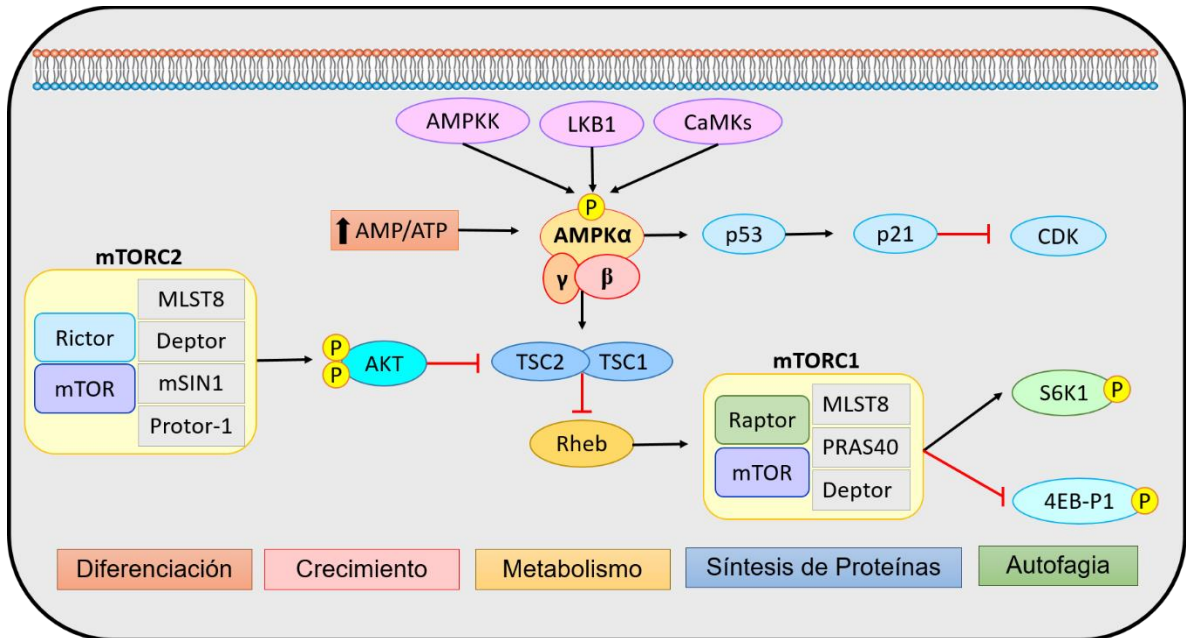


Figura 2.5 Vía AMPK/mTOR

Representación esquemática de la activación de AMPK y mTOR. Las interacciones de activación se denotan con flechas negras y las interacciones de inhibición se denotan con flechas rojas.

3. CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MODELOS BIOLÓGICOS

Los modelos que se usaron para llevar a cabo este trabajo fueron las líneas celulares MO3.13 y B12, cultivos primarios enriquecidos de oligodendrocitos derivados de cerebros de ratones un día postnatal y oligodendrocitos diferenciados obtenidos a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs del inglés *induced pluripotent stem cells*) derivadas de fibroblastos de pacientes con ALD-X (cALD y AMN) y de un control (Anexo1).

3.1.1 Línea Celular MO3.13

Las células MO3.13, es una línea celular de oligodendrocitos humanos creada por McLaurin y colaboradores en 1995, la cual se originó de la fusión de un rhabdomyosarcoma con oligodendrocitos adultos humanos. Estas células presentan marcadores de oligodendrocitos maduros tales como: GalC, MAG (glicoproteína asociada a mielina), MBP (proteína básica de mielina) y PLP (proteína proteolipídica). Además, expresan el marcador para astrocitos maduros GFAP (proteína fibrilar acídica de la glia), lo cual indica que se encuentra en un estado inmaduro del linaje celular glial (McLaurin et al., 1995).

Las células se inducen a la diferenciación cuando son cultivadas en DMEM libre de suero fetal bovino (SFB) y en presencia de PMA 100nM (phorbol-12-myristate-13-acetate), un agonista de PKC, generando una mayor expresión de marcadores de oligodendrocitos, tales como MBP y PLP, al igual que regulación a la baja del marcador de astrocitos GFAP (McLaurin et al., 1995).

3.1.2 Línea Celular B12

La línea celular B12 fue obtenida a partir de una neoplasia de SNC de rata inducida con nitrosoetilurea, (Schubert et al., 1974). Se describe como una línea oligodendroglial. Estas células fueron un regalo del Dr. Inderjit Singh y cultivadas en DMEM con 5% de suero fetal bovino y transfectadas con vectores lentivirales para silenciar ABCD1 (Baarine et al., 2015a; Singh et al., 2013).

3.1.3 Cultivo Primario Enriquecido De Oligodendrocitos Derivados De Cerebros De Ratones Un Día Postnatal

En este trabajo, también se realizaron experimentos usando cultivos primarios de oligodendrocitos con el propósito de validar algunos de los resultados hallados en la línea celular MO3.13. Por tanto, se realizó el proceso de estandarización y diferenciación de las células precursoras de oligodendrocitos obtenidas a partir de cerebros de ratones un día postnatal (Chen et al., 2007; McCarthy and de, 1980; Neman and de, 2012; O'Meara et al., 2011).

3.1.4 Oligodendrocitos Diferenciados A Partir de Células Madre Pluripotentes Inducidas

Las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs del inglés, *induced Pluripotent Stem Cells*) son un excelente modelo a la aproximación de la fisiopatología de diversas enfermedades. En el laboratorio de neurogenética y desarrollo dirigido por el Dr. Inderjit Singh de la Universidad Médica de Carolina del Sur (MUSC) se realizaron algunos experimentos en iPSCs derivadas de pacientes con cALD (GM04934, niño de siete años de edad), AMN (GM07530, joven de 26 años de edad) y de un control (ATCC-DYR0100). Se siguió el protocolo descrito y estandarizado por Baarine y colaboradores (2015) en el laboratorio de Neurogenética y desarrollo de la MUSC (Baarine et al., 2015b).

Capítulo 3: Materiales y métodos

3.2 MATERIALES

3.2.1 Anticuerpos

Anticuerpos Primarios	Animal de Obtención	Fabricante	Referencia	Dilución WB
ABCD1	Conejo	abcam	ab197013	1:1.000
ABCD2	Conejo	abcam	ab134304	1:500
AceCS1 (D19C6)	Conejo	Cell Signaling Technology	3658	1:1.000
Acetylated-Lysine Mouse mAb (Ac-K-103)	Ratón	Cell Signaling Technology	9681	1:1.000
Acetyl-Histone H3 (Lys9) (C5B11)	Conejo	Cell Signaling Technology	9649	1:1.000
ACSS2	Conejo	abcam	ab66038	1:1.000
Akt (pan) (C67E7)	Conejo	Cell Signaling Technology	4691	1:1.000
AMPK α	Conejo	Cell Signaling Technology	2603	1:1.000
AMPK β 1/2 (57C12)	Conejo	Cell Signaling Technology	4150	1:1.000
Anti-Adrenoleukodystrophy Protein Antibody	Ratón	Millipore	MAB2164	1:1.000
Anti-beta Actin antibody	Ratón	abcam	ab8227	1:10.000
ATP citrate lyase antibody	Conejo	abcam	ab133403	1:1.000
CNPase (D83E10) XP $\text{\textcircled{R}}$	Conejo	Cell Signaling Technology	5664	1:1.000
ERK1/2	Conejo	Cell Signaling Technology Santa Cruz	9102	1:1.000
GALC (H300)	Conejo	Biotechnology	sc-67352	1:500
Histone H3 (D1H2) XP $\text{\textcircled{R}}$	Conejo	Cell Signaling Technology	4499	1:1.000
IGF-1 Receptor B (111A9)	Conejo	Cell Signaling Technology	3018	1:1.000
Insulin receptor B (L55B10)	Ratón	Cell Signaling Technology	3020	1:1.000
LC3B (D11) XP $\text{\textcircled{R}}$	Conejo	Cell Signaling Technology	3868	1:1.000
MBP	Ratón	abcam	ab62631	1:500

Efecto de agonistas PPARs e IGF1 en modelos *in vitro* de leucodistrofias

MBP (C-16)	Cabra	Santa Cruz Biotechnology Cell Signaling	sc-13914	1:500
mTOR (7C10)	Conejo	Technology	2983	1:1.000
p-Acetyl-CoA Carboxilasa (Ser 79)	Conejo	Cell Signaling Technology	3676	1:1.000
p-Akt (Ser473) (D9E) XP®	Conejo	Cell Signaling Technology	4060	1:1.000
p-AMPK α (40H9) (Thr 172)	Conejo	Cell Signaling Technology	2535	1:1.000
p-AMPK β 1 (Ser 108)	Conejo	Technology	4181	1:1.000
p-ERK1/2 (Thr 202/ Tyr 204)	Conejo	Cell Signaling Technology	4370	1:1.000
p-IGF1 R β (Tyr 1161)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc101703	1:1.000
p-insulin R β (Tyr 1162/1163)	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	sc-25103	1:1.000
p-mTOR (Ser 2448)	Conejo	Cell Signaling Technology	2971	1:1.000
Raptor (24C12)	Conejo	Cell Signaling Technology	2280	1:1.000
Rictor (53A2)	Conejo	Cell Signaling Technology	2114	1:1.000
β -Actin–Peroxidase	Ratón	Sigma	A3854	1:25.000

Tabla 1 Anticuerpos primarios usados en Western Blot

Anticuerpos Primarios	Animal de Obtención	Fabricante	Referencia	Dilución WB
Anti-Cabra IgG, HRP	Burro	Santa Cruz Biotechnology Cell Signaling	sc-2020	1:1000
Anti-Conejo IgG, HRP	Cabra	Technology Cell Signaling	7074	1:2000
Anti-Ratón IgG, HRP	Caballo	Technology	7076	1:2000

Tabla 2 Anticuerpos secundarios usados en Western Blot

Capítulo 3: Materiales y métodos

Anticuerpos Primarios	Animal de Obtención	Fabricante	Referencia	Dilución
AceCS1 (D19C6)	Conejo	Cell Signaling Technology	3658	1:200
Anti-Adrenoleukodystrophy Protein Antibody	Ratón	Millipore	MAB2164	1:200
CNPase (D83E10) XP®	Conejo	Cell Signaling Technology	5664	1:200
IGF-1 Receptor B (111A9)	Conejo	Cell Signaling Technology	3018	1:50
MBP	Ratón	abcam	ab62631	1:100
MBP (C-16)	Cabra	Santa Cruz Biotechnology, INC	sc-13914	1:100
MBP (C-16)	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	sc-13914	1:50
Nestin	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-23927	1:300
O1	Ratón	Sigma	O7014	1:50
O4	Ratón	Sigma	O7139	1:50
PAX6	Conejo	abcam	ab195045	1:300
p-IGF1 R β (Tyr 1161)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc101703	1:50
SOX1	Cabra	G&D Systems	AF3369	1:300
SOX9	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-20095	1:300
TOM20	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-136211	1:20

Tabla 3 Anticuerpos primarios usados en inmunofluorescencia

Anticuerpos Primarios	Animal de Obtención	Reconoce	Fabricante	Referencia	Dilución
Alexa Fluor® 488	Cabra	Ratón	Invitrogen	A11001	1:1.000
Alexa Fluor® 488	Cabra	Conejo	Invitrogen	A11008	1:1.000
Alexa Fluor® 568	Cabra	Ratón	Invitrogen	A11004	1:1.000
Alexa Fluor® 568	Cabra	Conejo	Invitrogen	A11011	1:1.000
Alexa Fluor® 568	Burro	Cabra	Invitrogen	A11057	1:1.000

Tabla 4 Anticuerpos secundarios usados en inmunofluorescencia

3.2.2 Materiales

Wortmannin (Sigma, W1628), Rapamicina (Sigma, R8781), AICAR (Sigma, A9978), SAHA (Cayman, CAS № 149647-78-9), Acetato de sodio (Sigma, S2889), WST-1 (Roche, 11 644807 001), JC-1 (ENZ-52304), MitoTracker® Red CMXRos (Invitrogen, M7514), Dual Color (BioRad, 161-0374), Novex® Chemiluminescent Substrates (Invitrogen, WP20002, WP20003, WP20005), PDGF-AA Human (PROSPEC, cyt-341), IGF1 Human (PROSPEC, cyt-216), T3 (Sigma, T2877), Piruvato de sodio, Sigma (P2256), WY14643 (Sigma, C7081), Rosiglitazona (Sigma, G3295), PMA (Promega, V-1171), GW9662 (Sigma, M6191), GW04712 (Sigma, G3295), D-MEM alto en glucosa (Lonza 12-614Q), L-glutamina, bicarbonato de sodio, piridoxina hidrocloreto, Gibco, 12400-024), solución antibiótico penicilina/estreptomicina (10.000 U/mL de penicilina : 10.000 mg/mL de estreptomicina, Gibco, 15140), suero fetal bovino (Gibco, 16000-044), solución de azul tripán (0,4%, Sigma, T8154), tripsina-EDTA (Sigma, T4049), albúmina sérica bovina (Sigma, A-4503), MTT (Sigma, M5655), NaHCO₃ (Panreac, 131638), PMSF (Sigma, P7626), benzamidina (Research organics, 1003B), aprotinina (Sigma, A1153), Kit de quimioluminiscencia (Amersham, ECL Plus Western Blotting Detection Reagents), BCA Protein assay (Pierce, 23225), Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad, 161-0324), mezcla 30% acrilamida:bisacrilamida 29:1 (Bio-Rad 161-0556), NP 40 (Sigma, N6507), KCl (Merck, 104936), NaCl (Merck, 106404), Na₂HPO₄ (Merck, 106586), KH₂PO₄ (Merck, 104873), EDTA (Sigma, E5134), ortovanadato de sodio Na₃VO₄ (Sigma, S6508), fluoruro de sodio NaF (Sigma, S7920), inhibidor de tripsina (Sigma, T9003), TRIS base (Promega, H5131), SDS (Sigma, L4509), glicina (Sigma, G7126), metanol (J.T Baker, 907003), isopropanol (Mallinckrodt, 67630UN1219), TEMED (Sigma, T9281), persulfato de amonio APS (Bioexpress, M133), azul brillante de Coomassie R-250 (Merck, 112553), urea (Promega, V3175), β-mercaptoetanol (Sigma, M3148), azul de bromofenol (Sigma, B8026), glicerol (Mallinckrodt, 5092), DMSO como disolvente (Sigma, D5879), DMSO para congelar células (Sigma, D2650), Lipofectamine™ 2000 Reagent (Invitrogen, 11668-019), Lipofectamine™ LTX and Plus™ Reagent (Invitrogen, 15338-100), ampicilina (Sigma, 194526), agar

Capítulo 3: Materiales y métodos

(Oxoid, L11), triptona (Oxoid, LP0042), extracto de levadura (Oxoid, LP0021), polietilenglicol wt 3.350 (PEG) (Sigma, P4338), factor de crecimiento similar a la insulina recombinante (IGF-1) (BioSource, PHG0074), kit para extracción de plásmidos (Promega, A2495), CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (LDH) (Promega, G1781), Poli-D-Lisina (PDL) (Sigma, P7405), N,N-dimetilformamida 99,8% (Panreac, 161785.1611), etanol absoluto (Sigma, 141086.1212), agarosa (SeaKem®LE Agarose, 50004).

Se emplearon tres tipos de agua: agua destilada H₂O d, agua destilada y desionizada H₂O dd y agua estéril: H₂O dd previamente autoclavada (agua ultrapura).

3.2.3 Equipos

Durante el desarrollo de esta investigación se utilizaron los siguientes equipos: balanza analítica (OHAUS Adventure AR1140), pH metros (Schott C6 840 B y Hanna), Cabina de seguridad biológica clase II tipo a (Labgard ES Energy Saver Class II, Type A2 Laminar Flow Biological Safety Cabinet Models NU-425-300 NUAIRE), Incubadora de CO₂ (AutoFlow NU-8500 Water Jacket CO₂ Incubator), bomba de vacío (Vacubrand ME2), microcentrífuga refrigerada para para tubos de 1,5 mL (Thermo Sorvall Legend Micro 17R), centrífuga para cultivo (SIGMA 2-6E), minicentrífuga (Labnet), baño serológico (Memmert), agitadores magnéticos (Lab Line Pyro Magnetic), neveras (Centrales), congelador -70 °C (Revco), microscopio invertido (Leica), cámara de Neubauer (Boeco Germany), pipette boy (Accu-jet Brand), centrífuga para viales (Eppendorf centrifuge 5410), horno secador (Heraeus Instruments Model T6 Class 2), autoclave (Pressure sterilize Model 1925X), vortex (Barnstead thermolyne, M37615), Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad 165-3302), espectrofotómetro (Thermo Scientific NanoDrop 1000. Software NanoDrop 2000 / 2000c Software), termociclador (Bio-Rad), lector de microplacas (Sunrise™ Absorbance Reader. Tecan Software: Magellan), microscopio confocal Nikon (Microscopio: Nikon eclipse ti C1 plus. Software: Nikon EZ-C1, Nikon),

sistema de documentación de imágenes (ChemiDocTMMP System Bio-Rad Laboratories Laboratories. Software: Image Lab Bio-Rad Laboratories), sonicador (Qsonica 500 Watt Sonicator).

3.2.4 Softwares

Graph Pad Prism Demo 5, NanoDrop 2000, Magellan Software, Nikon EZ-C1, Image Lab Bio-Rad Laboratories e ImageJ.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Estandarización de los modelos *in vitro* de adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma x y enfermedad de Krabbe utilizando la línea celular de oligodendrocitos humanos MO3.13

El establecimiento del modelo *in vitro* de ALD-X se hizo por medio de RNA de interferencia del gen ABCD1. La transfección se hizo con Lipofectamina® LTX Reagent con cuatro diferentes secuencias de siRNA para el gen ABCD1. Se utilizó como control una secuencia similar (scrRNA) no conocida en genes de humano, ratón o rata (Anexo 2). Las células transfectadas fueron seleccionadas con puromicina (5ug/ml). La eficiencia de la interferencia del gen ABCD1 se verificó mediante western blot de la proteína ALDP.

Para el modelo de EK se silenció el gen GALC con el propósito de inducir la acumulación endógena de la Psicosina, por tanto se utilizó un sistema de expresión lentiviral inducible con tetraciclina Lenti-X™ Tet-On®, la transfección se hizo por lipofección, usando Lipofectamine®LTX Reagent (Anexo 2). Posteriormente, el silenciamiento del gen GALC se activó cultivando las células en presencia de tetraciclina (0,5µg/ml). Las células transfectadas fueron seleccionadas con puromicina (4ug/ml), la eficiencia de la transfección fue determinada por western

Capítulo 3: Materiales y métodos

blot de la proteína (GalC). El control de la transfección se realizó con un RNA de interferencia control en el mismo sistema de expresión lentiviral.

Para realizar el análisis del efecto de los agonistas PPARs y del factor de crecimiento IGF1 se realizaron tratamientos de manera independiente para cada población celular con los diferentes tratamientos Rosiglitazona, WY14643, GW0742 e IGF1. Cada experimento se realizó por lo menos tres veces de manera independiente.

3.3.2 Determinación del efecto de agonistas PPARs y del factor de crecimiento IGF1 sobre la muerte de oligodendrocitos en los modelos analizados

El efecto de agonistas PPAR (Rosiglitazona, WY14643, GW0742) e IGF1 sobre la muerte de oligodendrocitos en los modelos analizados (células MO3.13, Células B12, Cultivos primarios de oligodendrocitos y oligodendrocitos diferenciados derivados de iPSCs) se realizó con las pruebas MTT, WST-1 y LDH en placas de 96 (Anexo 3).

3.3.3 Análisis del papel de las vías de señalización PI3K/AKT, MAPK/ERK y AMPK/mTOR en función de agonistas PPARs e IGF1

Las vías de señalización PI3K/AKT, MAPK/ERK, AMPK/mTOR se analizaron en función de los tratamientos con Rosiglitazona, WY14643, GW0742 e IGF1, por western blot de las proteínas IGF1R, AKT, mTOR, ERK y AMPK, con tales propósitos se usaron anticuerpos primarios para las formas total y fosforilada de cada una de las proteínas. Como control de carga se usó la proteína β -Actina (Anexo 4). La densitometría se realizó usando el programa ImageJ de libre distribución.

3.3.4 Evaluación del efecto de los agonistas PPARs e IGF1 sobre la proliferación de los peroxisomas y la función mitocondrial en los diferentes modelos

La evaluación del efecto de Rosiglitazona, WY14643, GW0742 e IGF1 sobre la función mitocondrial y la proliferación peroxisomal se realizó mediante microscopia de fluorescencia y confocal utilizando marcadores fluorescentes específicos, para mitocondrias (TOM20, MTCO2, MitoTracker Red y JC1) y para la proliferación peroxisomal (ALDP, PMP70 Y PEX14). Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa ImageJ de libre distribución (Anexo 5).

3.3.5 Determinación del efecto de agonistas PPARs e IGF1 durante el proceso de diferenciación de los oligodendrocitos

Para llevar a cabo este objetivo se extrajo proteína de la línea celular MO3.13 (línea celular que se diferencia de precursores de oligodendrocitos a oligodendrocitos maduros en medio DMEM en ausencia de SFB con PMA 1µg/ml.) a diferentes días de diferenciación (Día 0, 1, 2, 3, 4 y 5). Las células MO3.13 se cultivaron en medio de diferenciación con cada uno de los agonistas PPARs y el factor de crecimiento IGF1, se hizo la extracción de proteínas a diferentes días y se realizó western blot de las vías PI3K/AKT, MAPKs/ERK y AMPK/mTOR.

El análisis de diferenciación de OPCs a oligodendrocitos maduros se realizó por inmunofluorescencia y western blot de marcadores de diferenciación oligodendrogliol teniendo en cuenta el esquema de diferenciación propuesto por Neman y Vellis (2012) (Anexo 1, Esquema 7).

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de resultados se realizó mediante análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) seguido del test de comparación múltiple de *Tukey-Kramer*, análisis de varianza de dos vías seguido de una prueba de comparación múltiple *Bonferroni* o mediante la prueba *t de student*. Todos los datos se presentaron como

Capítulo 3: Materiales y métodos

promedio +/- SEM. Cada experimento se realizó de manera independiente por lo menos tres veces.

3.5 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El conocimiento científico permite tener una visión más amplia y esperanzadora frente a los retos que imponen las enfermedades, un ejemplo son las enfermedades desmielinizantes, las cuales son altamente discapacitantes y complejas a nivel clínico y fisiopatológico. Por ende, es necesario que los científicos cumplamos con responsabilidad, honestidad y rigurosidad nuestra labor, con el propósito de evitar que se malinterprete el estado actual del conocimiento y su aplicación en la medicina. Bajo tales condiciones, el conocimiento generado a partir de este proyecto de investigación básica podría contribuir directamente a la comunidad nacional e internacional a esclarecer aspectos desconocidos de la biología de los oligodendrocitos y de las enfermedades desmielinizantes y proponer una estrategia terapéutica.

La metodología y el manejo de la información dentro de esta investigación se realizaron en el marco de la legislación tanto nacional como internacional de investigaciones en salud (Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia) y la Ley 430 de Enero de 1998 por la cual se dictan las normas prohibitivas en materia ambiental, referentes a los desechos peligrosos. El trabajo con animales se realizó teniendo en cuenta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales (Ley No. 84 del 27 de diciembre de 1989 del congreso Nacional de la República de Colombia).

4. CAPÍTULO 4: RESULTADOS DEL EFECTO DE AGONISTAS PPARs E IGF1 EN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS MO3.13

El proceso de diferenciación de OPCs a oligodendrocitos maduros es un proceso altamente regulado, el cual está controlado por numerosos mecanismos donde intervienen factores intrínsecos (regulación transcripcional, remodelamiento de la cromatina y microRNAs) y extrínsecos (ligandos extracelulares, moléculas secretadas y actividad axonal) (Emery, 2010). En la línea celular MO3.13 existe la posibilidad de inducir un proceso de diferenciación oligodendroglial en el cual se detiene su proliferación y se regulan a la alta proteínas específicas de oligodendrocitos, para esto es necesario cultivar las células en medio de diferenciación que corresponde a DMEM alto en glucosa con adición de PMA-100nM y ausencia de SFB (activador de PKC) (McLaurin et al., 1995).

En este estudio se exploró el efecto del IGF1 y los agonistas PPARs en las células MO3.13 durante cuatro días en medio de diferenciación, con el objetivo de dilucidar los cambios cada 24 horas en la señalización celular de IGF1R, AKT, ERK y AMPK, ya que McLaurin y colaboradores (1995) mencionan que un periodo de cuatro días en medio de diferenciación es necesario para que las células MO3.13 presenten características morfológicas y moleculares de oligodendrocitos, por ejemplo, incremento de la expresión de MBP y PLP y disminución de la expresión de GFAP.

El análisis por western blot de las células MO3.13 se llevó a cabo cada 24 horas, durante cuatro días, el tiempo de diferenciación se empezó a contar a partir del momento en el que las células fueron cultivadas en el medio de diferenciación. Los resultados por western blot de las proteínas p-IGF1 β R, p-AKT, p-ERK1/2 y p-AMPK α muestran que la fosforilación de AMPK α disminuye a medida que

Capítulo 4: Resultados del efecto de agonistas PPARs e IGF1 en la diferenciación de las células MO3.13

transcurren los días de diferenciación, específicamente en el tercer día, mientras que los cambios a nivel de la fosforilación de IGF1 β R, AKT y ERK1/2 no son tan contundentes con el transcurso del tiempo (Figura 4.1).

Con relación al efecto del IGF1 y los agonistas PPARs durante el periodo de diferenciación de las células MO3.13, se pudo observar que el tratamiento con IGF1 mantiene potenciado el nivel de fosforilación del receptor IGF1 y de AKT en comparación con las células control y las células tratadas con los agonistas PPARs. También, se observó que los tratamientos con IGF1 y agonistas PPARs contribuyen a disminuir los niveles de fosforilación de ERK1 y AMPK α desde el tercer día de diferenciación. Adicionalmente, se observó que los datos correspondientes a los niveles de p-ERK1 y p-AMPK son los más dispersos en comparación con los niveles de p-IGF1 β R, p-AKT y p-ERK2 que se muestran más estables durante el tiempo y el tratamiento (Figura 4.1).

Finalmente, a partir de los anteriores experimentos se puede afirmar que los cambios a nivel de señalización celular de las vías PI3K/AKT, MAPK/ERK y AMPK/mTOR durante el periodo de diferenciación oligodendroglial en las células MO3.13 son muy variables, por tanto se sugiere que la línea celular MO3.13 no es el modelo adecuado para estudiar el proceso de diferenciación de OPCs a oligodendrocitos maduros, dado que las células MO3.13 tienen un origen híbrido por tanto no fue posible establecer de forma clara y precisa los cambios a nivel de señalización celular de las vías PI3K/AKT, MAPK/ERK1/2 y AMPK/mTOR durante su proceso de diferenciación.

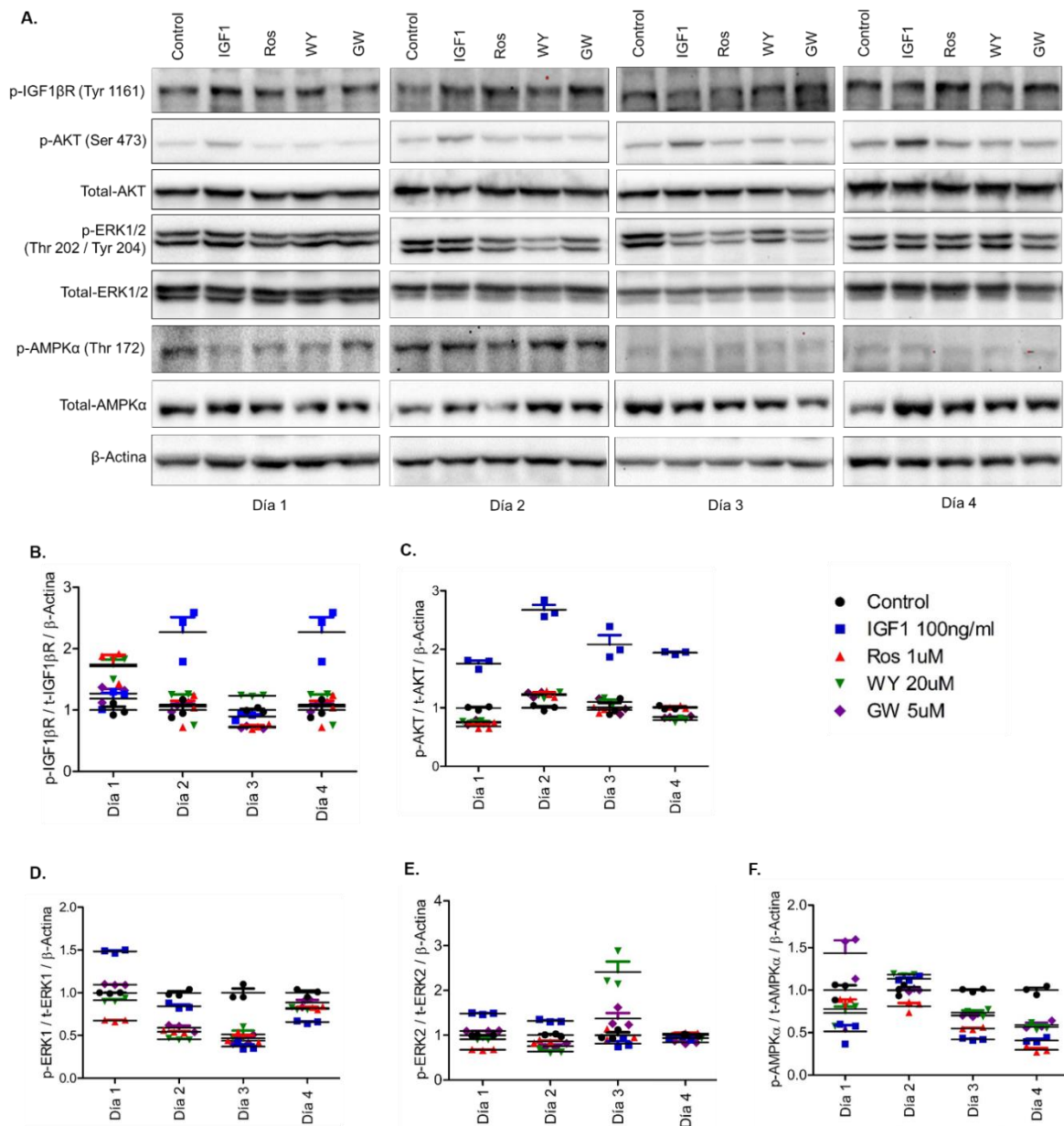
Efecto de agonistas PPARs e IGF1 en modelos *in vitro* de leucodistrofias

Figura 4.1 Efecto del IGF1 y agonistas PPARs durante la diferenciación de las células MO3.13

A. Western blot representativo de las proteínas p-IGF1βR (Tyr 1161), p-AKT (Ser 473), t-AKT, p-ERK1/2 (Thr 202 / Tyr 204), t-ERK1/2, p-AMPKα (Thr 172), t-AMPKα y β-Actina (control de carga). **B-F.** Análisis por densitometría de las proteínas p-IGF1R, p-AKT, p-ERK1/2 y p-AMPKα, cada dato está representado respecto al control de cada día.

5. CAPÍTULO 5: RESULTADOS

ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AL CROMOSOMA X

El modelo de ALD-X se llevó a cabo a través de la interferencia del gen ABCD1 en las líneas celulares MO3.13 y B12, dado que mutaciones y/o deleciones en este gen se describen como la causa de esta enfermedad, su fisiopatología se relaciona con la regulación a la baja y/o disfunción del transportador peroxisomal ABCD1, lo cual conduce a la acumulación de ácidos grasos de cadena muy larga. Se usaron tres modelos celulares: primero, las células MO3.13; segundo, las células B12 y tercero, iPSCs derivadas de pacientes con ALD-X (AMN y cALD), las cuales fueron diferenciadas a oligodendrocitos maduros.

5.1 MODELO DE ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AL CROMOSOMA X EN CÉLULAS MO3.13

El modelo de ALD-X en células MO3.13 se realizó por RNA interferencia del gen ABCD1 usando cuatro diferentes secuencias de RNA de interferencia a través de vectores lentivirales. La transfección se hizo usando *Lipofectamine® LXT Reagent* y la selección se efectuó con puromicina 5µg/ml. Las células transfectadas con las cuatro secuencias de shABCD1 presentaron menor expresión de la ALDP con relación a las células MO3.13 y MO3.13 shCONTROL (células MO3.13 transfectadas con un vector lentiviral comercial control). La diferencia en la expresión de la ALDP en las células shABCD1 es altamente significativa respecto a las células MO3.13 (**P<0,001) y shCONTROL (###P<0,001) y corresponde a una regulación a la baja de ALDP de más del 50% (Figura 5.1.1 A y B).

La regulación a la baja de ALDP permanece en las células MO3.13 shABCD1 después del proceso de diferenciación, periodo de cuatro días en el cual las células se mantienen en cultivo con DMEM, sin suero fetal bovino y PMA 100nM (Figura

Efecto de agonistas PPARs e IGF1 en modelos *in vitro* de leucodistrofias 5.1.2 A y B). Previamente, se demostró que durante el proceso de diferenciación de las células MO3.13 se presenta una muerte basal de aproximadamente el 15% de la población celular pero en la línea celular MO3.13 shABCD1 este porcentaje de muerte se incrementa aproximadamente hasta el 50%. De acuerdo a los resultados de viabilidad con la prueba WST-1, las células MO3.13 shABCD1 comparadas con las células MO3.13 shCONTROL sobreviven menos durante el proceso de diferenciación y esta diferencia es altamente significativa ($^{***}P < 0,001$), lo cual indica que la regulación a la baja de ALDP le confiere a las células MO3.13 mayor susceptibilidad durante el proceso de diferenciación (Figura 5.1.2 C).

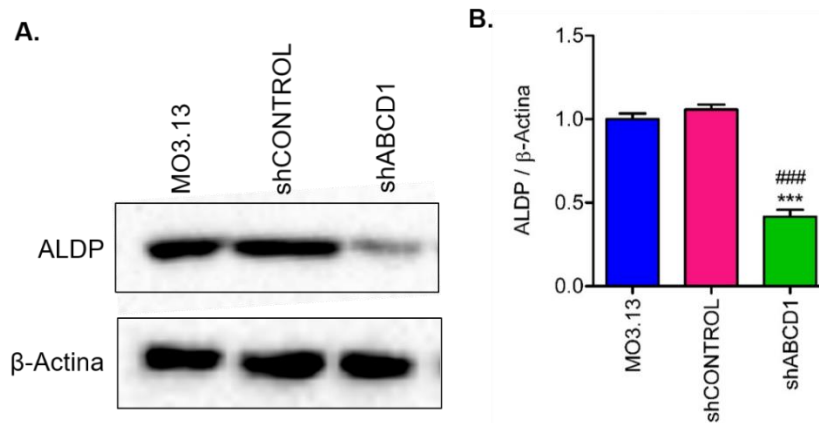


Figura 5.1.1 Modelo de adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X en células MO3.13 por interferencia del gen ABCD1

A. Western blot representativo de ALDP en células MO3.13, shCONTROL y shABCD1. Los resultados por western blot mostraron que las células shABCD1 transfectadas con las cuatro secuencias de siRNA para ABCD1 presentan menor expresión de ALDP. **B.** En el análisis por densitometría de ALDP se demostró que las células shABCD1 presentan menor expresión de ALDP y que esta diferencia es altamente significativa respecto a las células MO3.13 ($^{***}P < 0,001$) y a las células shCONTROL ($^{####}P < 0,001$). Los datos se presentan como la media \pm S.E.M. y están normalizados respecto a MO3.13. Se realizó ANOVA de una vía seguido por una prueba *t* de student, $n=3$.

Ahora bien, teniendo el modelo de regulación a la baja de ALDP en células MO3.13 se procedió a la aplicación de los diferentes tratamientos, IGF1 y agonistas PPARs, (Rosiglitazona: PPAR- γ , GW0742: PPAR- β y WY14643: PPAR- α) durante los cuatro días que requieren las células MO3.13 para su proceso de diferenciación

Capítulo 5: Resultados adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X

de OPCs a oligodendrocitos (Anexo 1, Esquema 1). El objetivo de este experimento fue determinar si alguno de estos tratamientos lograba proteger a las células MO3.13 shABCD1 de la muerte celular conferida por la regulación a la baja de la ALDP (Figura 5.1.2 C). De acuerdo a los resultados obtenidos, en el contexto de diferenciación oligodendroglial *in vitro*, se pudo evidenciar que las células MO3.13 shCONTROL tratadas por cuatro días con IGF1 y agonistas PPARs incrementaron la actividad WST-1 y por ende la viabilidad respecto al control ($^{**}P<0,01$). Mientras tanto, en las células shABCD1 el escenario es diferente, ya que solo el tratamiento con IGF1 logra incrementar levemente la actividad WST-1 ($^{\#}P<0,05$). Lo anterior sugiere que la deficiencia de la proteína ALDP podría estar relacionada con la transducción de vías de señalización celular relacionadas con IGF1 y agonistas PPARs, dado que el efecto protector se pierde en las células que presentan deficiencia en la expresión de ALDP.

También, se determinó el efecto de cada uno de los tratamientos durante una hora, 24 horas y cuatro días con el propósito de precisar si la protección conferida por éstos es independiente o dependiente del tiempo. De acuerdo con los resultados de viabilidad celular medidos por la actividad WST-1, la aplicación de los tratamientos por un periodo de una hora no logró incrementar la actividad WST-1 en ninguno de los tipos celulares (Figura 5.1.3), lo anterior sugiere un efecto protector dependiente del tiempo. En las células MO3.13 shCONTROL, el efecto protector de GW0742 ($^*P<0,05$) y LXR ($^{**}P<0,01$) empezó a ser evidente cuando los tratamientos se aplicaron por 24 horas, entretanto todos los tratamientos, IGF1 y agonistas PPARs, aplicados por cuatro días tuvieron un efecto protector altamente significativo ($^{**}P<0,01$) (Figura 5.1.3 A). Por su parte, en las células MO3.13 shABCD1 solo el tratamiento con IGF1 logró incrementar la actividad WST-1 desde las 24 horas (Figura 5.1.3 B), en consecuencia se considera que la protección conferida por IGF1 en tiempos largos podría ser coherente con la activación del receptor IGF1 y la transducción de vías de supervivencia celular y diferenciación celular como las vías PI3K/AKT, MAPK/ERK y AMPK/mTOR. Actualmente, no existe ninguna evidencia que logre vincular el transportador peroxisomal ABCD1 con estas vías de señalización.

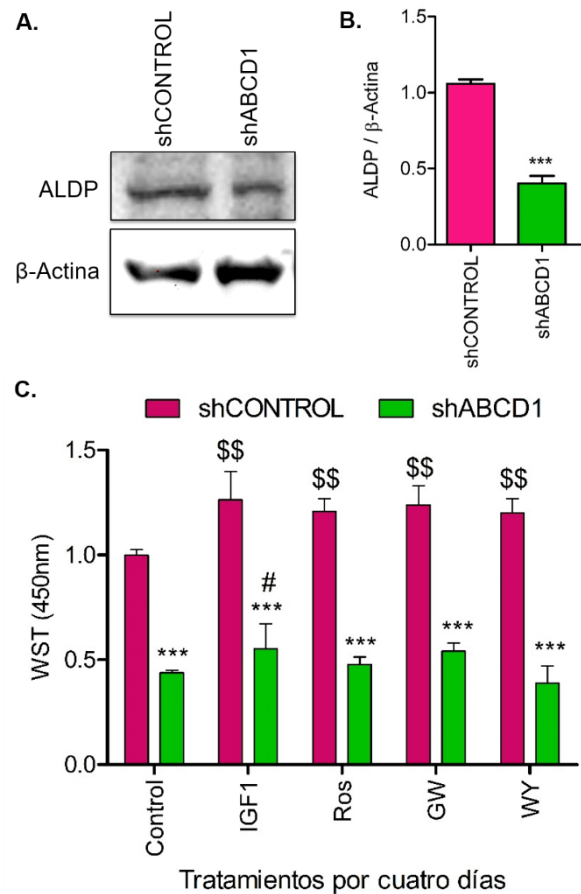


Figura 5.1.2 Efecto de IGF1 y agonistas PPARs sobre la viabilidad de células MO3.13 shCONTROL y shABCD1 durante el proceso de diferenciación.

A. Western blot representativo de ALDP en células MO3.13 diferenciadas. Los resultados por western blot muestran que las células shABCD1 diferenciadas mantienen la menor expresión de la ALDP respecto a las células shCONTROL. **B.** Análisis de viabilidad por WST-1 de células MO3.13 shCONTROL y shABCD1 diferenciadas. Tratamientos por 4 días de IGF1 100ng/ml, Ros: rosiglitazona 1 μ M, GW: GW0742 5 μ M y WY: WY14463.). Los datos se presentan como la media \pm S.E.M. y están normalizados respecto al control de shCONTROL. Se realizó ANOVA de una vía seguido por una prueba t de student, n=3. Las células shABCD1 presentan menor viabilidad respecto a las células shCONTROL (***) $P < 0,001$). Los tratamientos con IGF1 y agonistas PPARs en las células shCONTROL logran incrementar la viabilidad celular respecto al control (\$\$ $P < 0,01$), pero en las células shABCD1 solo el tratamiento con IGF1 logra incrementar la viabilidad respecto al control de las células shABCD1 (# $P < 0,5$).

Capítulo 5: Resultados adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X

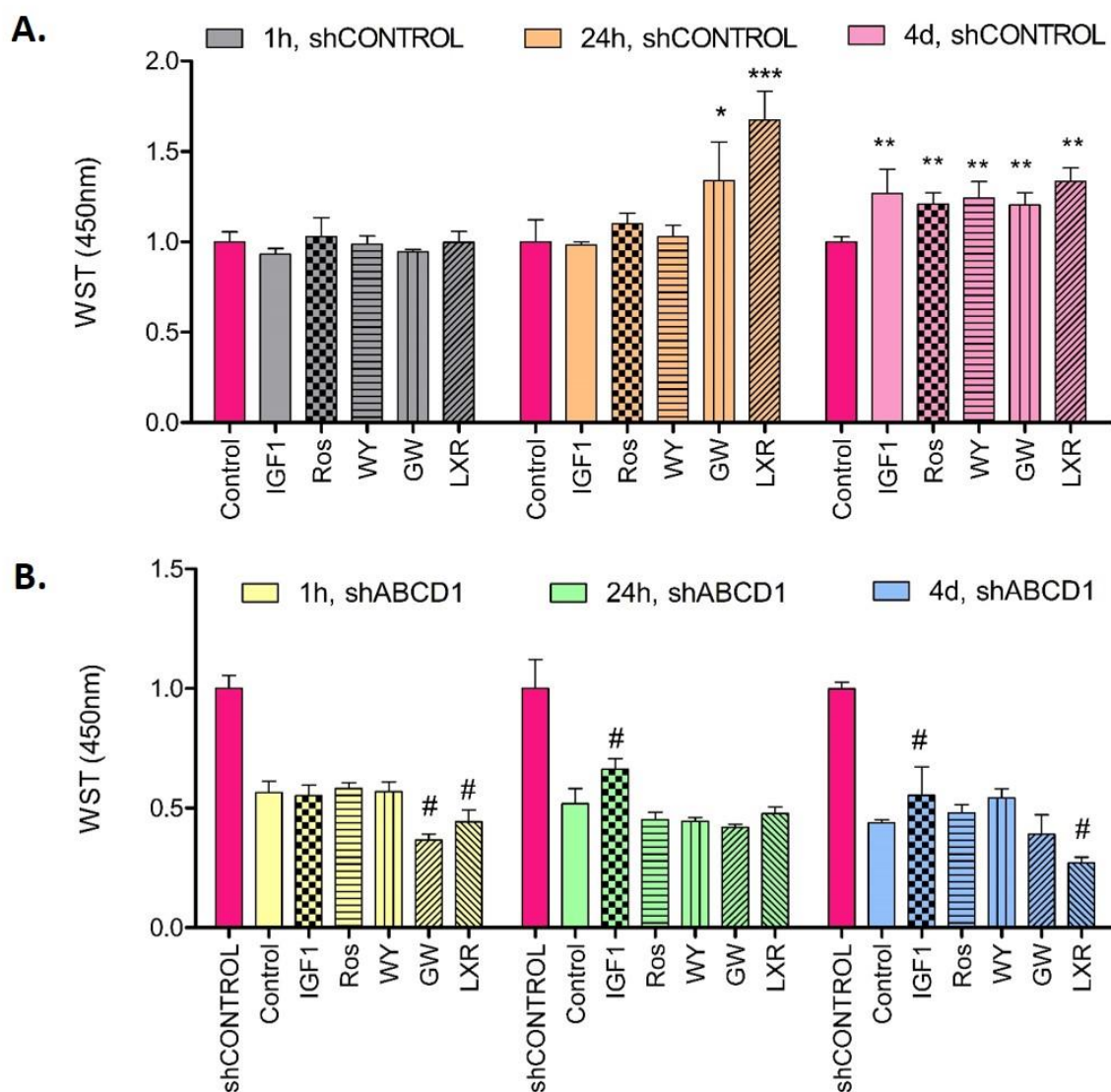


Figura 5.1.3 Efecto del IGF1 y agonistas PPARs a diferentes tiempos sobre la viabilidad en células MO3.13 shCONTROL y shABCD1

Análisis de viabilidad por WST-1 en células MO3.13 shCONTROL y shABCD1 tratadas con IGF1 y agonistas PPARs en medio de cultivo de diferenciación (DMEM + PMA 100nM). Tratamientos por una hora (1h), 24 horas (24h) y cuatro días (4d) con IGF1: 100ng/ml, Ros: Rosiglitazona 1 μ M, GW: GW0742 5 μ M, WY: WY14463 20 μ M, y LXR: GW3965 1 μ M. Los datos se presentan como la media \pm S.E.M. y están normalizados respecto al control de shCONTROL. Se realizó ANOVA de dos vías seguido por una prueba de comparaciones múltiples Bonferroni, $n=3$. Las células shABCD1 sin o con tratamiento presentan menor viabilidad respecto al control de las células shCONTROL ($P<0,001$). * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$ respecto al control de shCONTROL; # $P<0,05$ respecto al control de shABCD1.

Con base en lo anterior se realizó el análisis de las vías de señalización PI3K/AKT, AMPK/mTOR y MAPK/ERK por western blot, estos resultados muestran algunas diferencias altamente significativas entre las células MO3.13 shCONTROL y shABCD1 (Figura 5.1.4). Primero, los niveles de fosforilación del receptor IGF1 fosforilado en la tirosina 1161 (Figura 5.1.4 A y B) y de mTOR en la serina 2448 están disminuidos en las células MO3.13 shABCD1 (** $P < 0,001$), así mismo llama la atención la disminución en el nivel total del receptor IGF1 y de mTOR (** $P < 0,001$) (Figura 5.1.4 A y D). Segundo, el nivel de fosforilación de AKT en la serina 473 está aumentado en las células MO3.13 shABCD1 (** $P < 0,001$) (Figura 5.1.4 A y C). Por último, las células MO3.13 shABCD1 presentan reducción del nivel de fosforilación de ERK1 en la treonina 202 (** $P < 0,01$) (Figura 5.1.6 A y B).

A partir de las diferencias encontradas entre la señalización de las células MO3.13 shCONTROL y shABCD1 se buscó un tratamiento que logrará reestablecer la disfunción en la transducción de señales derivada de la deficiencia de la ALDP. En tal sentido, se pudo observar por western blot que el receptor IGF1 β en las células MO3.13 shABCD1 responde al tratamiento con IGF1 (100ng/ml) dado que se observó incremento en la fosforilación del receptor en la serina 2448 respecto a su control ($\#P < 0,05$) (Figura 5.1.4 A y B). Con el propósito de analizar en detalle el receptor IGF1 se realizó inmunofluorescencia de la forma total y fosforilada de éste, con y sin el tratamiento de IGF1 (100ng/ml por 24 horas) (Figura 5.1.5). Los resultados del análisis no mostraron diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia de la forma total del receptor IGF1 entre las células MO3.13 shCONTROL y shABCD1. Por otra parte, la intensidad de fluorescencia de la forma fosforilada en la tirosina 1161 del receptor IGF1 β es mayor en las células MO3.13 shABCD1 respecto a las células MO3.13 shCONTROL (** $P < 0,01$) (Figura 5.1.5 A y B), asimismo, se observó que los dos tipos celulares, shCONTROL y shABCD1, responden al tratamiento con IGF1. Interesantemente, las células shABCD1 tratadas con IGF1 presentan agregados de la forma fosforilada del receptor IGF1, esta observación es reiterativa en más de 30 células analizadas, además, la intensidad de fluorescencia del receptor fosforilado incrementó drásticamente en las

Capítulo 5: Resultados adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X

células shABCD1 después de ser tratadas con IGF1 (###P<0,001) e incluso este aumento es mayor que en las células MO3.13 shCONTROL con adición de IGF1 (\$\$\$P<0,01).

De acuerdo a la inmunofluorescencia y al análisis de la intensidad de fluorescencia del receptor IGF1 β en las formas total y fosforilada, se podría explicar que el incremento de la activación de AKT en las células MO3.13 shABCD1 es dependiente de la activación del receptor IGF1, dado que existe evidencia que los oligodendrocitos son capaces de sobre-expresar el receptor IGF1 como mecanismo compensatorio a una lesión (Komoly et al., 1992). Aunque la expresión del receptor IGF1 es controlada por varias condiciones fisiológicas y estados metabólicos de la célula, existen varios estudios que demuestran cambios en su expresión, los cuales pueden tener efectos proliferativos o anti-proliferativos dependiendo del contexto celular (Giraud et al., 2001).

Adicionalmente a las diferencias encontradas entre las células MO3.13 shCONTROL y shABCD1 en la señalización de IGF1R, AKT y mTOR, también se evidenció por western blot que las células shABCD1 presentan una menor activación de ERK2 por fosforilación en la treonina 202 en comparación con las células shCONTROL y esta diferencia es significativa (**P<0,01) (Figura 5.1.6). Esta sumatoria de cambios en la señalización de las células deficientes de ALDP no es fácil de explicar puesto que las vías de señalización celular interactúan entre ellas, lo cual hace que la regulación de los procesos celulares sean altamente complejos y a la vez redundantes, es por esto que la mayoría de los estudios se enfocan en analizar una sola vía. Actualmente, se han propuesto varios mecanismos por los cuales la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR puede interactuar con la vía MAPK/ERK1-2 específicamente en procesos relacionados con diferenciación celular de OPCs a oligodendrocitos maduros (Dai et al., 2014).

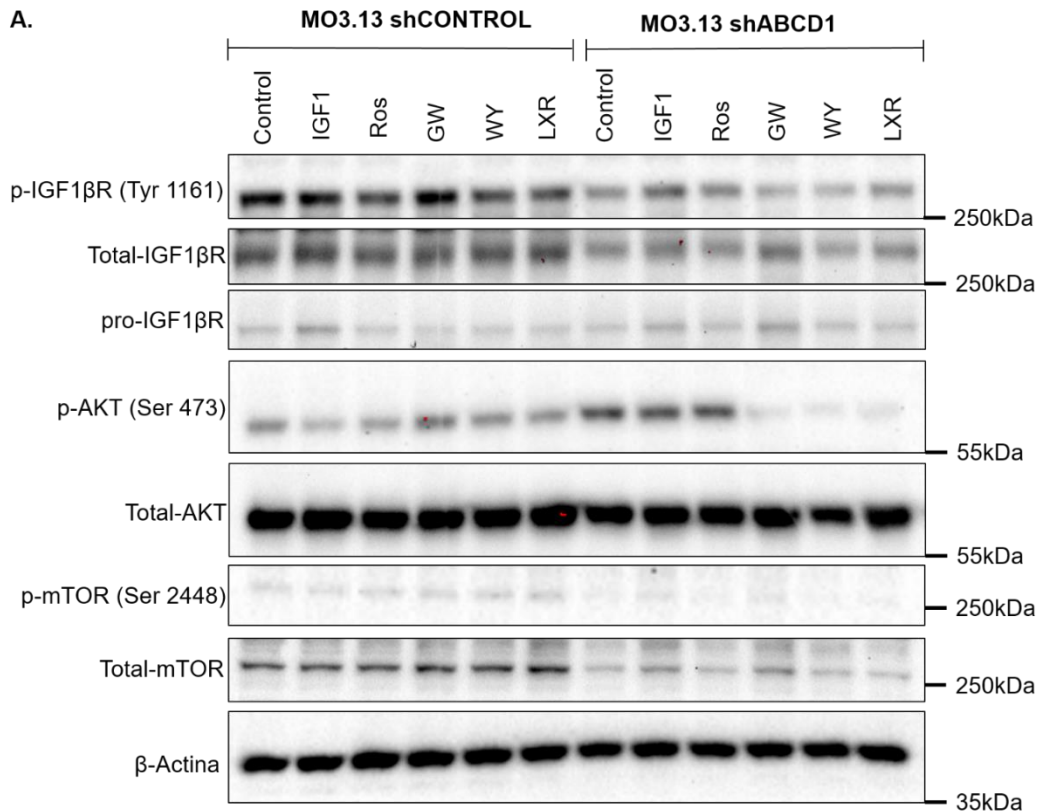


Figura 5.1.4 La deficiencia de ABCD1 en células MO3.13 diferenciadas a oligodendrocitos impacta la señalización IGF1R/AKT /mTOR

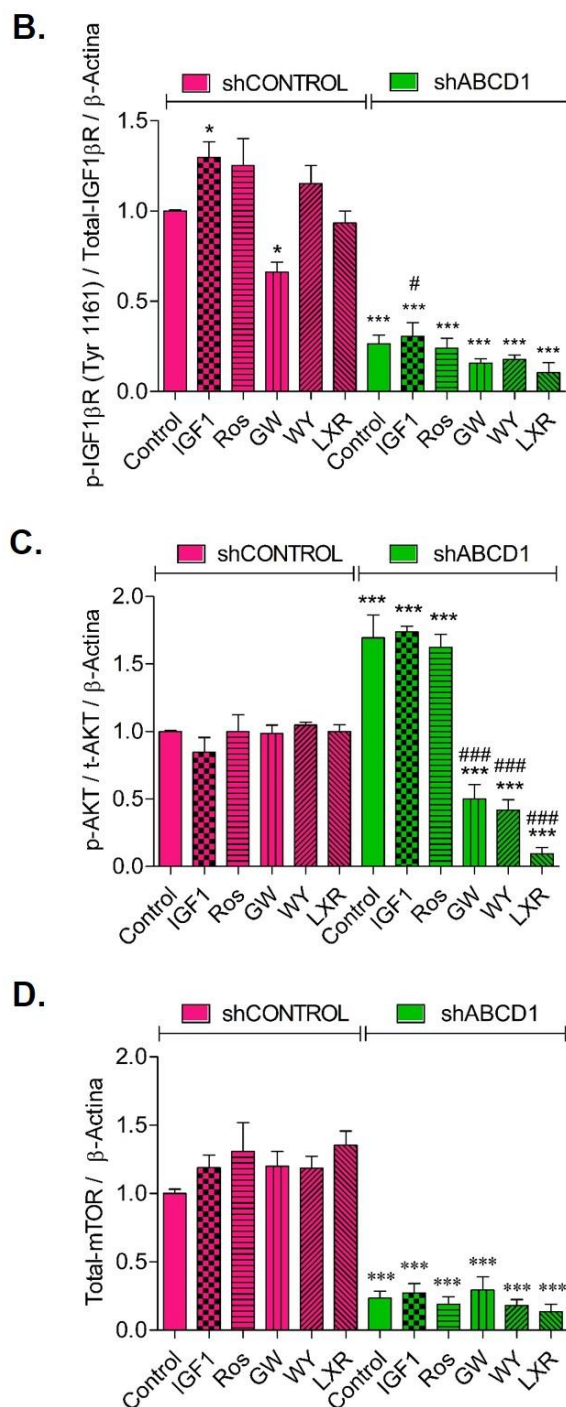
A. Western blot representativo de tres experimentos independientes. La expresión del receptor IGF1 y de la proteína mTOR están disminuidas en las células MO3.13 shABCD1, mientras que la fosforilación de AKT en la serina 473 está aumentada.

B-D. Análisis por densitometría del receptor IGF1, AKT y mTOR. Los datos se presentan como la media \pm S.E.M. y están normalizados respecto al control de shCONTROL. Se realizó ANOVA de dos vías seguido por una prueba de comparaciones múltiples Bonferroni, $n=3$.

B. La expresión del receptor IGF1 fosforilado está disminuida en las células shABCD1 respecto a las células shCONTROL ($^{***}P<0,001$). El tratamiento con IGF1 logra incrementar el nivel de fosforilación del receptor IGF1 tanto en las células shCONTROL ($^{*}P<0,05$) y shABCD1 ($^{#}P<0,05$).

C. Las células shABCD1 control, tratadas con IGF1 y Rosiglitazona presentan mayor activación de AKT respecto a las células shCONTROL ($^{***}P<0,001$), mientras que las células tratadas con GW, WY y LXR presentan disminución de la activación de AKT respecto al control de las células shCONTROL ($^{***}P<0,001$) y al control de las células shABCD1 ($^{####}P<0,001$).

Capítulo 5: Resultados adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X



Continuación de la figura 5.1.4 D. En las células shABCD1 se observa una drástica disminución de la expresión de mTOR respecto a las células shCONTROL (** $P < 0,001$).

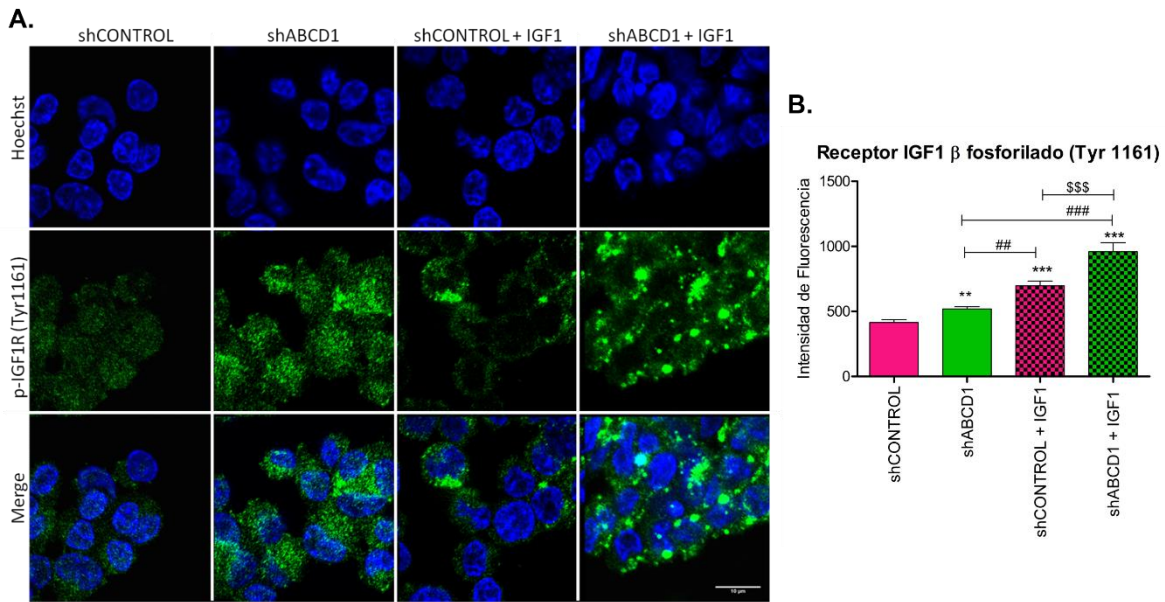


Figura 5.1.5 Análisis por inmunofluorescencia de la forma fosforilada del receptor IGF1

Las células MO3.13 shCONTROL y shABCD1 responden a la adición de IGF1 (100ng/ml por 24 horas). **A.** Inmunofluorescencia de la forma fosforilada del receptor IGF1 en la tirosina 1161. Después del tratamiento con IGF1, en las células shCONTROL, la localización del receptor fosforilado es perinuclear, mientras en las células shABCD1 se puede observar una marcada agregación del receptor fosforilado IGF1 hacia la membrana celular y menor localización perinuclear. **B.** Intensidad de fluorescencia del receptor fosforilado IGF1 β en células MO3.13 shCONTROL y shABCD. Los datos se presentan como la media \pm S.E.M. y están normalizados respecto a MO3.13. Se realizó ANOVA de una vía seguido por una prueba *t* de student, $n=30$. La intensidad de fluorescencia del receptor IGF1 β es mayor en las células MO3.13 shABCD1 con relación a las células shCONTROL (** $P<0,01$), el tratamiento con IGF1 incrementa la intensidad de fluorescencia en las células shCONTROL (** $P<0,001$) y shABCD1 (#### $P<0,001$) respecto a los controles y el incremento es mayor en las células shABCD1 con relación a las células shCONTROL tratadas con IGF1 (\$\$\$ $P<0,01$).

A partir de lo anterior, y con el propósito de entender la relación de estas vías de señalización con el proceso de diferenciación oligodendroglial, se realizó el análisis por western blot del nivel de la proteína básica de mielina, MBP, un marcador que se usa para reconocer los oligodendrocitos maduros. Se encontró que las células MO3.13 shABCD1 presentan menor nivel de la proteína MBP en comparación con

Capítulo 5: Resultados adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X

las células shCONTROL (**P<0,001) (Figura 5.1.7), lo anterior podría indicar que la deficiencia de la ALDP es capaz de impactar las vías de señalización PI3K/AKT, AMPK/mTOR y ERK1-2, lo cual no solo tiene efecto en la viabilidad celular sino que también afecta el proceso de diferenciación *in vitro* de las células MO3.13. La disfunción en el proceso de diferenciación de las OPCs a oligodendrocitos maduros es un factor fisiopatológico crítico en el desarrollo de la ALD-X, pero aún no es claro por qué los OPCs pierden la capacidad para diferenciarse y cuál es la señal en el contexto de esta enfermedad que estanca o retarda el proceso de maduración.

Con base en lo anterior, se probó el efecto del IGF1 y de los agonistas PPARs con el propósito de hallar un tratamiento que permitiera reestablecer el proceso de maduración de OPCs a oligodendrocitos. Los resultados indican que las células MO3.13, tanto shCONTROL y shABCD1 presentan una tendencia al aumento de la expresión de MBP con cada uno de los tratamientos, sin embargo el incremento en la expresión de MBP es más evidente y contundente en las células shCONTROL. Por consiguiente, se puede afirmar que el IGF1 y los agonistas PPARs contribuyen de manera positiva a la viabilidad y a la diferenciación de las células MO3.13 y que esta protección se pierde en las células MO3.13 quizá como consecuencia de la interferencia del gen ABCD1.

Un resultado interesante encontrado en este modelo celular es que el tratamiento con IGF1 además de incrementar la viabilidad celular y el nivel de MBP es capaz de acrecentar el nivel de ABCD1. Este resultado llama la atención por tanto se propone estudiar en mayor detalle el efecto de IGF1 en el contexto celular de deficiencia de ABCD1 y analizar la existencia de alguna relación del IGF1 en la regulación de la transcripción del gen ABCD1.

Finalmente y para concluir, los mecanismos de protección que activan los agonistas PPARs en las células MO3.13 se pierden de manera significativa por la interferencia del gen ABCD1. Solo el tratamiento con IGF1 permite que se mantenga la protección en viabilidad y diferenciación en el modelo celular MO3.13 de ALD-X.

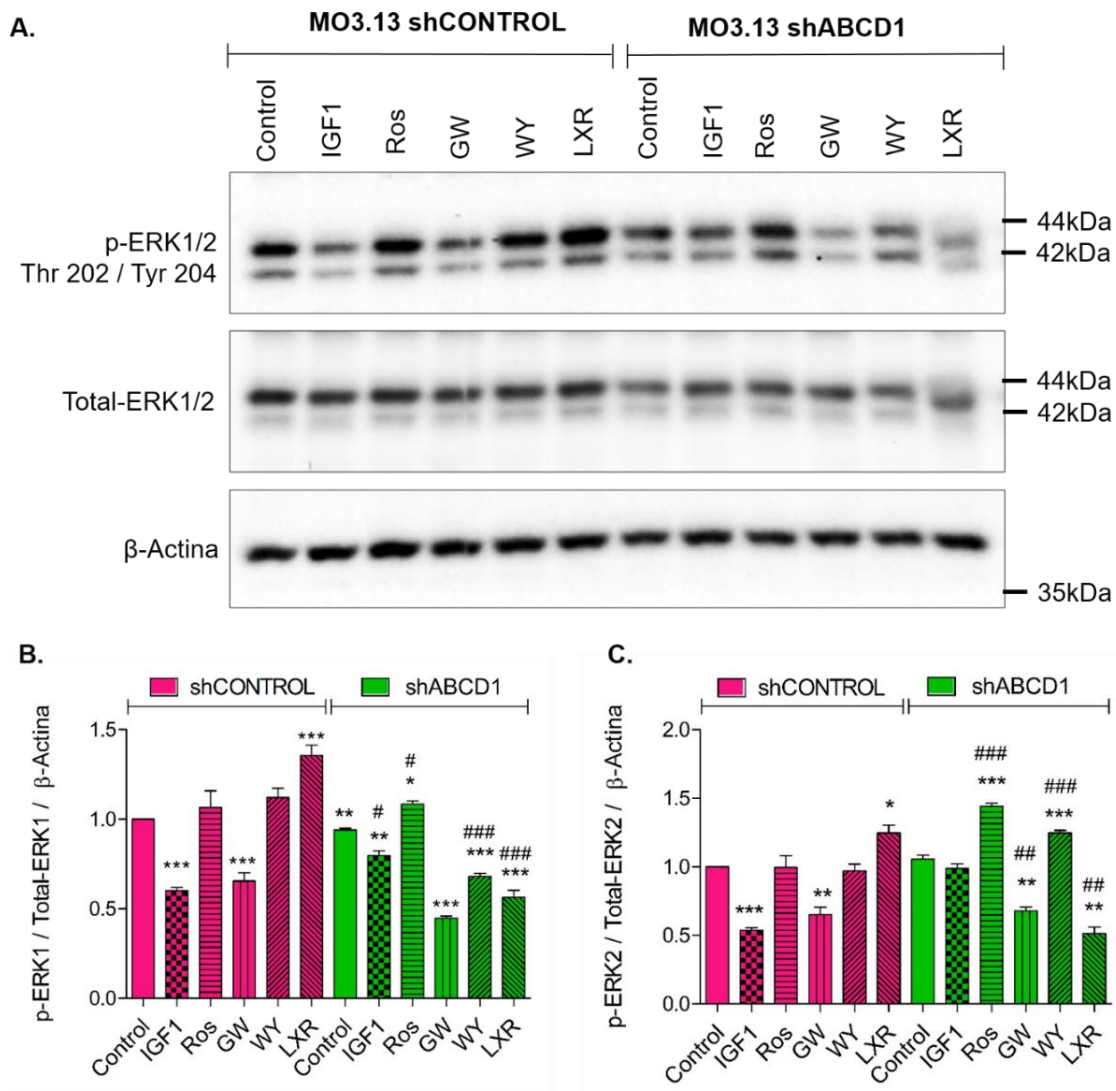


Figura 5.1.6 La deficiencia de ABCD1 impacta la fosforilación de ERK1

A. Western blot representativo de tres experimentos independientes. **B-C.** Análisis por densitometría de ERK1/2. **A.** La expresión de ERK1 está disminuida en las células shABCD1. Los datos se presentan como la media \pm S.E.M. y están normalizados respecto al control de shCONTROL. Se realizó ANOVA de dos vías seguido por una prueba de comparaciones múltiples Bonferroni, $n=3$. **B.** La forma fosforilada de ERK1 en la treonina 202 está disminuida en las células shABCD1 respecto a las células shCONTROL ($**P<0,01$) y el tratamiento con IGF1 disminuye la fosforilación de ERK1 en las células shCONTROL ($***P<0,001$) y shABCD1 ($#P<0,05$). **C.** Entre las células shCONTROL y shABCD1 no se presentan diferencias significativas en el nivel de fosforilación de ERK2 en la tirosina 204, el tratamiento con IGF1 disminuye el nivel de fosforilación de ERK2 en las células shCONTROL ($***P<0,001$).

Capítulo 5: Resultados adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X

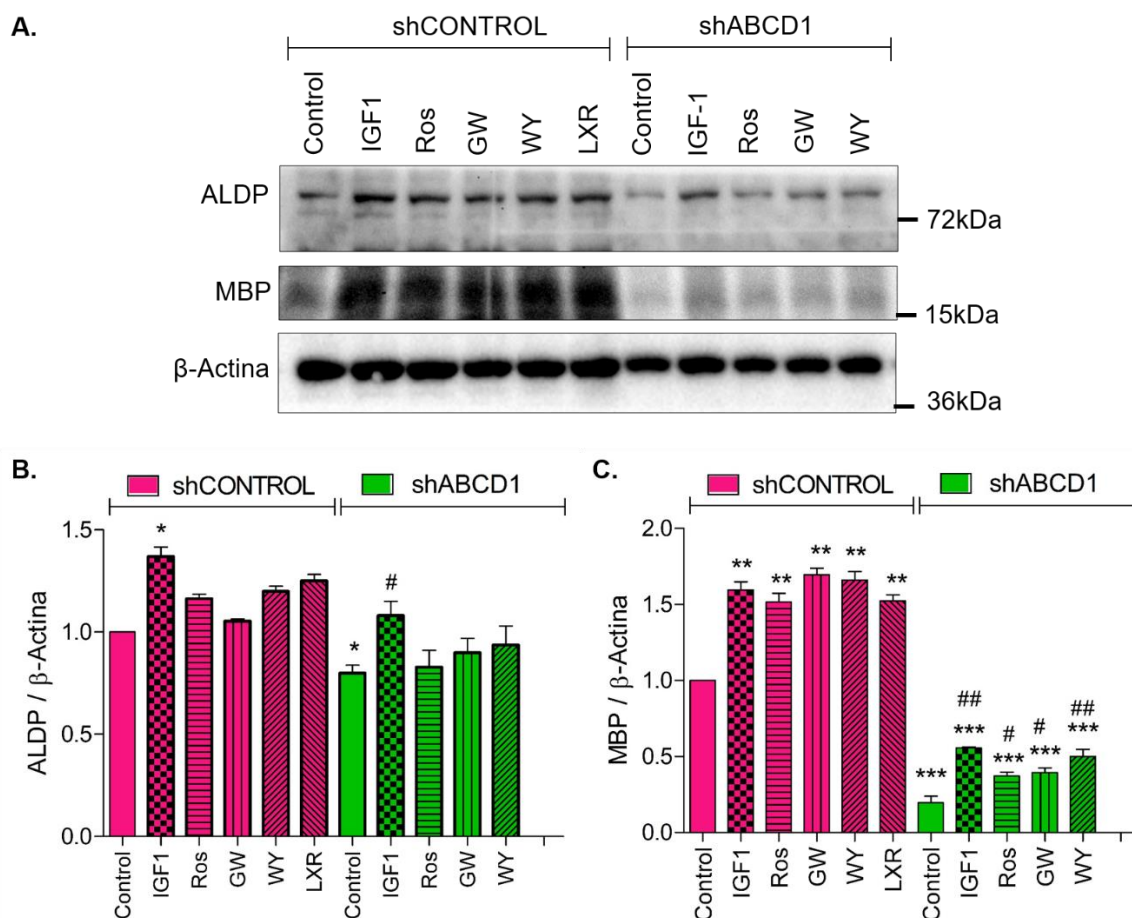


Figura 5.1.7 Efecto del IGF-1 y los agonistas PPARs sobre el nivel de ABCD1 y MBP en células MO3.13

A. Western blot representativo de tres experimentos independientes. **B. – C.** Análisis por densitometría de ABCD1 y MBP. Los datos se presentan como la media \pm S.E.M. y están normalizados respecto al control de shCONTROL. Se realizó ANOVA de dos vías seguido por una prueba de comparaciones múltiples Bonferroni, $n=3$. **A.** El tratamiento con IGF-1 ($1\mu\text{g/ml}$ por cuatro días) es capaz de incrementar el nivel de ABCD1 en las células MO3.13 shCONTROL ($*P<0,05$) y shABCD1 ($\#P<0,05$). **B.** Los tratamientos con IGF1 y agonistas PPARs contribuyen a incrementar el nivel de expresión de MBP en las células shCONTROL ($*P<0,01$) y en las células shABCD1 ($\#P<0,05$, $\#\#P<0,05$).

5.2 MODELO DE ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AL CROMOSOMA X EN CÉLULAS B12

A partir de los resultados obtenidos en el modelo de ALD-X en células MO.313, en el cual solo el tratamiento con IGF1 favoreció la viabilidad y la diferenciación oligodendroglial, se procedió a evaluar el efecto del IGF1 sobre las vías de señalización PI3K/AKT y AMPK/mTOR en las células B12 WT (silvestres) y en las células B12 con la interferencia del gen ABCD1 (B12 shABCD1) (Figura 5.2.1).

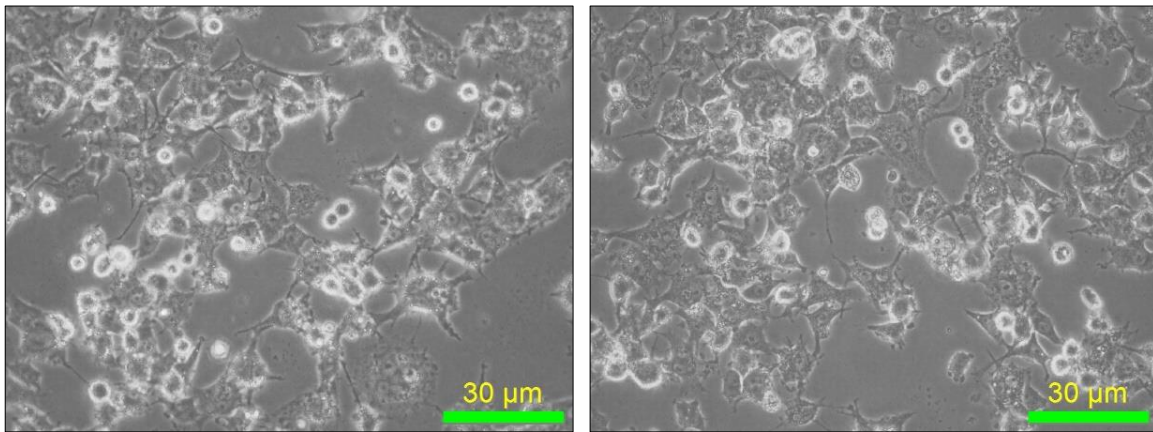


Figura 5.2.1 Morfología de las células B12 en medio de crecimiento

A. Células B12 WT. **B.** Células B12 shABCD1. Las microfotografías muestran las células cultivadas en medio DMEN suplementado con 10% SFB. La morfología de estas células en medio de crecimiento es similar a la morfología de oligodendrocitos inmaduros.

La línea celular B12 fue derivada de una neoplasia de SNC de rata y tuvo su origen a partir de OPCs u oligodendrocitos. Las células B12 expresan marcadores específicos de oligodendrocitos como MOSP (*myelin/oligodendrocyte-specific protein*), GalC y CNPase, no expresan marcadores neuronales como neurofilamentos y tampoco el marcador de astrocitos GFAP. Además, las células B12 no expresan la proteína MBP, por tanto carecen de los procesos finales de

Capítulo 5: Resultados adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X

diferenciación (Roth et al., 2003). En este punto vale la pena recordar que las células MO3.13 expresan las proteínas GFAP y MBP.

Los resultados en la línea celular B12 demuestran que la interferencia del gen ABCD1 genera una regulación a la baja de más del 50% de ALDP y esta diferencia es altamente significativa respecto a las células B12 WT (Figura 5.2.2). El porcentaje de liberación de LDH en las células B12 WT es del 10%, mientras que en las células B12 shABCD1 es del 17%, y esta diferencia es significativa (* $P < 0,05$). En este modelo celular se reitera que la deficiencia de ALDP le confiere a las células mayor susceptibilidad (Figura 5.2.2. D).

Asimismo, en el modelo de ALD-X en células B12 se demostró que existen alteraciones en las vías de señalización PI3K/AKT y AMPK/mTOR. Los resultados por western blot mostraron que las células B12 shABCD1 presentan mayor fosforilación basal de AKT (Ser 473) y mTOR (Ser 2448) (** $P < 0,001$) y menor fosforilación de AMPK β (Ser 108) (** $P < 0,001$) en comparación con las células B12 WT (Figura 5.2.3).

Tanto las células B12 WT como las células B12 shABCD1 responden al tratamiento con IGF1 por 15min y 30min. El análisis por western blot indicó que la activación de AKT por IGF1 es mayor en las células deficientes de ALDP, ya que con el tratamiento de IGF1 en las células B12 shABCD1 se evidenció mayor incremento del nivel de p-AKT (Ser 473) que en las células B12 WT y esta diferencia es significativa ($^{**}P < 0,05$) (Figura 5.2.3 A y B). Lo anterior, se relacionó con mayor activación de mTOR por fosforilación en la serina 2448 en las células shABCD1 sin y con tratamiento de IGF1 (Figura 5.2.3 A y C).

Por otra parte, las células B12 shABCD1 presentan menor activación por fosforilación de AMPK β (** $P < 0,001$) (Figura 5.2.3 A y C). Estos resultados señalan que la interferencia del gen ABCD1 si tiene un impacto sobre la vía de señalización PI3K/AKT/AMPK/mTOR, y se podría especular que las células B12 WT shABCD1 potencian la vía PI3K/AKT/mTOR como respuesta a la interferencia del gen ABCD1

y como un posible mecanismo compensatorio al daño causado por la deficiencia de ALDP.

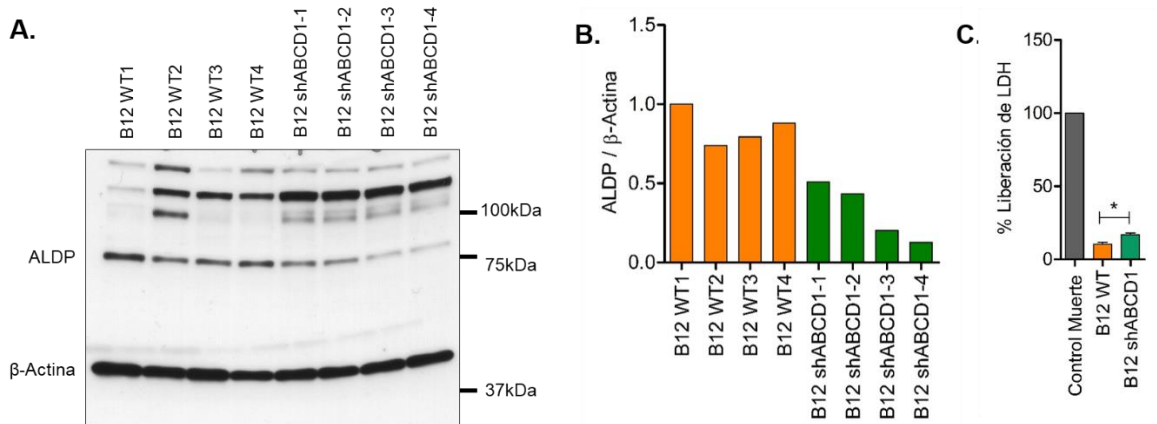


Figura 5.2.2 Modelo de adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X en células B12 por interferencia del gen ABCD1

A. Western blot de ALDP en células B12 WT y B12 shABCD1. **B.** Densitometría de ALDP. Se demuestra por western blot que las células B12 shABCD1 presentan menor expresión de ALDP respecto a las células B12 WT, se usó como control de carga β -Actina. **C.** Liberación de LDH. Los datos se presentan como la media \pm S.E.M. y están normalizados respecto al control de muerte. Se realizó ANOVA de una vía seguido por una prueba t de student, $n=3$. * $P<0,05$ comparado con las células B12 WT.

*Las bandas de alto peso molecular corresponden a inespecificidades del anticuerpo ALDP (Millipore MAB2164), por tanto la proteína ALDP fue identificada por peso molecular (75kDa).

Capítulo 5: Resultados adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X

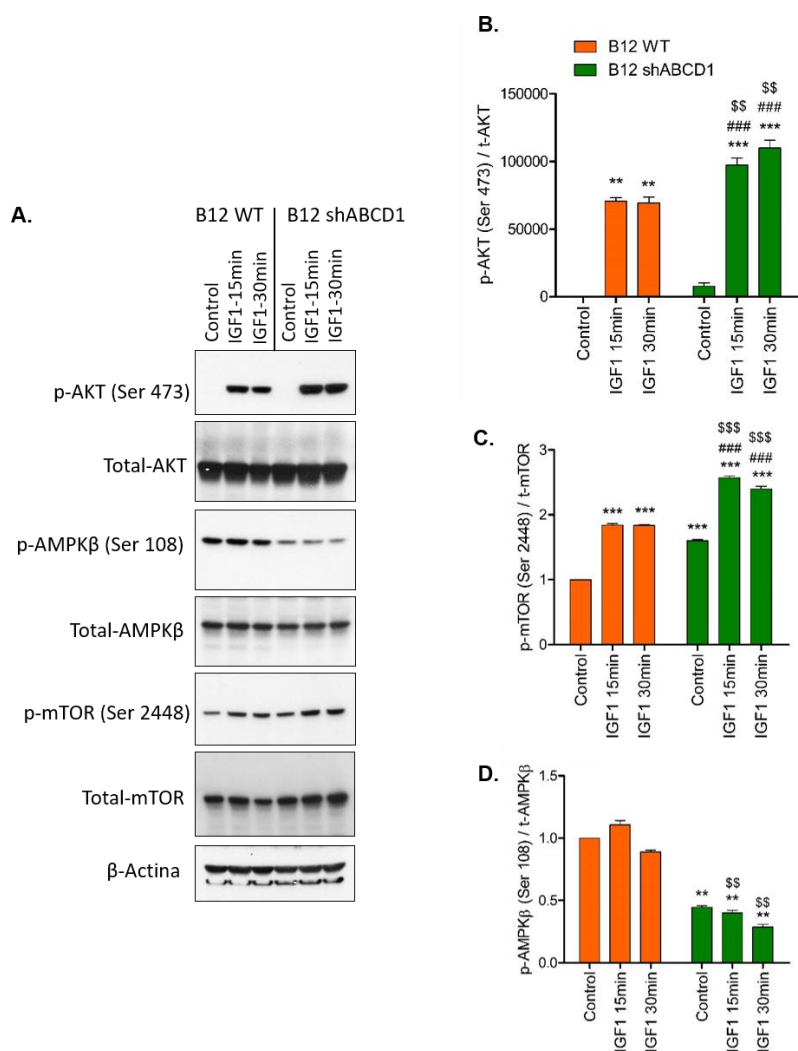


Figura 5.2.3 Efecto del IGF1 sobre la vía de señalización AKT/AMPK/mTOR en células B12 WT y shABCD1

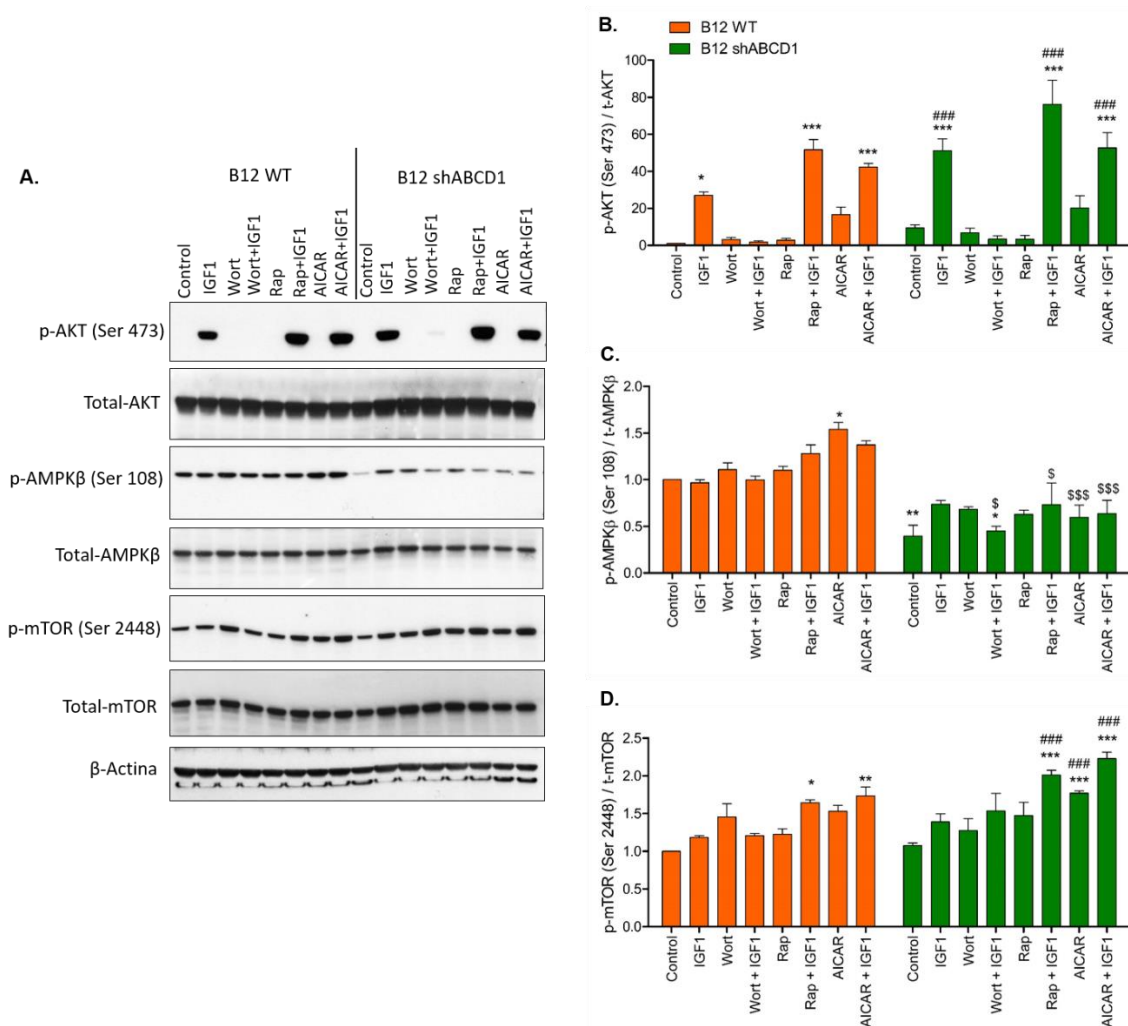
A. WB representativo de AKT, mTOR y AMPK β en células B12 WT y B12 shABCD1 tratadas con IGF1 1 μ g/ml por 15min o 30min. **B - D.** Análisis por densitometría de p-AKT (Ser 473), p-mTOR (Ser 2448) y p-AMPK α (Ser 108), respectivamente. Los datos fueron normalizados respecto al control de B12 WT y expresados como la media \pm S.E.M. Se realizó ANOVA de dos vías seguido de una prueba de comparaciones múltiples Bonferroni, $n=3$. *** $P<0,001$, ** $P<0,01$ comparado con el control de B12 WT; ### $P<0,001$ comparado con el control de B12 shABCD1; \$\$\$ $P<0,01$ comparado con el respectivo tratamiento de IGF1 en B12 WT.

Con el propósito de analizar en mayor detalle las vías PI3K/AKT y AMPK/mTOR, las células B12 fueron tratadas con Wortmannin 4 μ M un inhibidor de PI3K, Rapamicina 5 μ M un inhibidor de mTOR y AICAR 1mM (*5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -4-ribofuranoside*) un activador de AMPK (Anexo 1, Esquema 4). El tratamiento con Wortmannin logró inhibir la fosforilación de AKT tanto en las células B12 WT como en las B12 shABCD1 y la fosforilación de AKT no se logró recuperar con la posterior adición de IGF1, lo cual indica que la activación de AKT por fosforilación en respuesta al tratamiento con IGF1 es dependiente de la actividad de PI3K. Adicionalmente, cuando se inhibió PI3K se perdió la diferencia en el nivel de p-AKT (Ser 473) que existía entre las células B12 WT y shABCD1 tratadas con IGF1 (Figura 5.2.4 A y B).

Con respecto al efecto del tratamiento con Rapamicina por una hora sobre p-AKT (Ser 473) no se presentaron diferencias significativas respecto a las células control. Tanto las células B12 WT como las células B12 shABCD1 fueron capaces de responder al tratamiento con IGF1 mientras el complejo mTOR estaba inhibido. Por otra parte, el tratamiento con AICAR por una hora tendió a aumentar la fosforilación de AKT y la posterior aplicación de IGF1 incrementó el nivel de p-AKT. El nivel de p-AKT (Ser 473) se mantuvo mayor en las células shABCD1 con relación a las células B12 WT y los diferentes tratamientos (Figura 5.2.4 A y B).

Como previamente se mencionó, las células B12 shABCD1 presentan deficiencia en la fosforilación de p-AMPK β (Ser 108) respecto a las células B12 WT, y el tratamiento con AICAR por una hora no logró restaurar el nivel de p-AMPK β (Ser 108) en las células shABCD1. En cambio en las células B12 WT, AICAR incrementó el nivel de p-AMPK β (Ser 108) de manera significativa (* $P < 0,05$), y este incremento se pierde cuando las células B12 WT son tratadas con AICAR junto a IGF1 (Figura 5.2.4 C). Estos resultados reiteran que las células B12 shABCD1 presentan disfunción en la vía AMPK y ninguno de los tratamientos evaluados logró recuperar la activación de AMPK.

Capítulo 5: Resultados adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X

**Figura 5.2.4 Análisis por western blot de la señalización AKT/AMPK/mTOR**

A. WB representativo de AKT, AMPK β y mTOR en células B12 WT y B12 shABCD1. Las células fueron tratadas con Wortmannin 4 μ M (Wort), Rapamicina 5 μ M (Rap) y AICAR 1mM en ausencia o presencia de IGF1 1 μ g/ml. **B - D.** Análisis por densitometría de p-AKT (Ser 473), p-AMPK α (Ser 108) y p-mTOR (Ser 2448), respectivamente. Los datos fueron normalizados respecto al control B12 WT y expresados como la media \pm S.E.M. Se realizó ANOVA de dos vías seguido de una prueba de comparaciones múltiples Bonferroni, $n=4$. *** $P<0,001$, ** $P<0,01$, * $P<0,05$, comparado con el control de B12 WT; #### $P<0,001$ comparado con el control de shABCD1; §§ $P<0,01$, § $P<0,05$ comparado con el respectivo tratamiento en B12 WT.

Finalmente, el análisis de p-mTOR (Ser 2448) mostró que su activación no es dependiente de PI3K, dado que las células tratadas con Wortmannin por una hora no presentaron cambios significativos en el nivel de p-mTOR (Ser 2448). Adicionalmente, el tratamiento con Rapamicina 5 μ M por una hora no tuvo el efecto esperado en la inhibición de p-mTOR (Ser 2448), lo cual podría ser atribuido al tiempo o la concentración del tratamiento con Rapamicina. Llama la atención que en las células shABCD1, el tratamiento con AICAR no tiene un efecto significativo en el nivel de p-AKT (Ser 473) pero si en el nivel de p-mTOR (Ser 2448), se observó que el tratamiento con AICAR en las células B 12 shABCD1 incremento el nivel de p-mTOR (Ser 2448) de manera altamente significativa respecto al control. Lo cual indica que AICAR podría tener un efecto parcial en la activación de mTOR en las células shABCD1 que son deficientes en AMPK.

Por otra parte, en el modelo de células B12 se evidenció que la deficiencia de ALDP se relaciona con menor expresión de la proteína CNPase, y ninguno de los tratamientos logra recuperar el nivel de la proteína CNPase. Asimismo, ninguno de los tratamientos tiene efecto sobre el nivel de expresión de ALDP, como se evidenció en el modelo de las células diferenciadas MO3.13, donde el tratamiento con IGF1 logró incrementar los niveles de ALDP y MBP en células MO3.13 shABCD1.

Finalmente, se demostró por western blot que existe una señalización diferencial entre las células B12 WT y las células B12 shABCD1, específicamente en AKT, AMPK y mTOR y que las células B12 shABCD1 responden al tratamiento con IGF1, incluso con un mayor nivel de activación en AKT y mTOR en comparación con las células B12 WT. Adicionalmente, en este modelo celular se encontraron diferencias contundentes respecto al modelo de ALD-X en células MO3.13, una de ellas y la más importante es la diferencia con relación a mTOR, ya que en las células MO3.13 shABCD1 la señalización de mTOR está drásticamente disminuida respecto a las células MO3.13 shCONTROL, mientras que en las células B12 shABCD1 la señalización de mTOR está potenciada respecto a las células B12 WT.

Capítulo 5: Resultados adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X

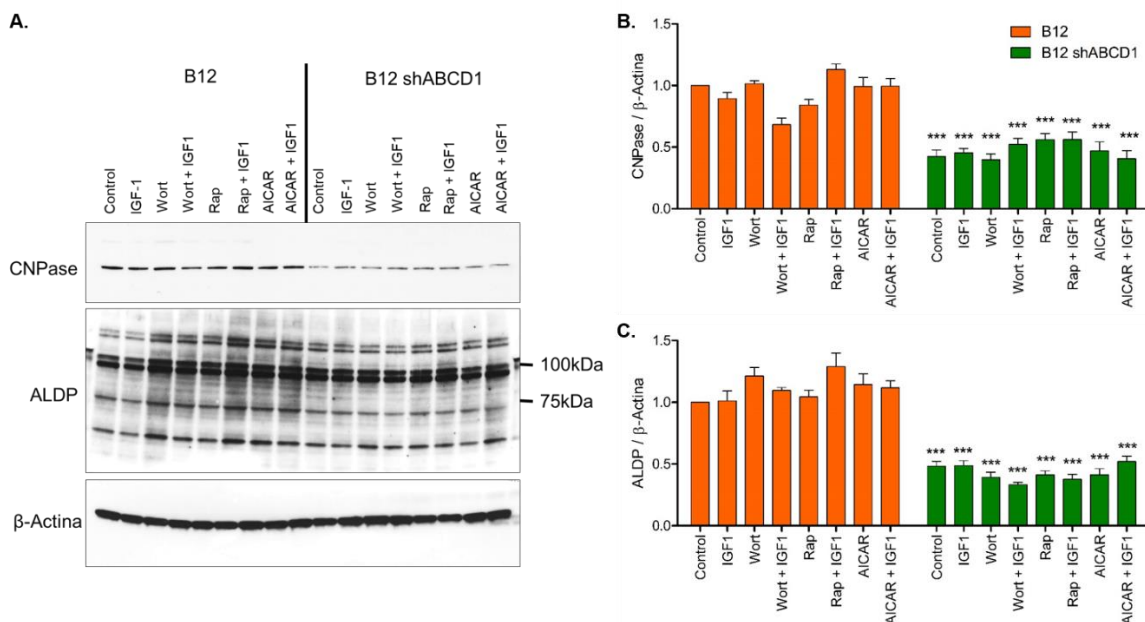


Figura 5.2.5 Las células B12 shABCD1 presentan menor expresión de CNPase

A. WB representativo de CNPase y ALDP en células B12 WT y B12 shABCD1. Las células fueron tratadas con Wortmannin $4\mu\text{M}$ (Wort), Rapamicina $5\mu\text{M}$ (Rap) y AICAR 1mM en ausencia o presencia de IGF1 $1\mu\text{g/ml}$. **B-C.** Análisis por densitometría de CNPase y ALDP. Los datos fueron normalizados respecto al control B12 WT y expresados como la media \pm S.E.M. Se realizó ANOVA de dos vías seguido de una prueba de comparaciones múltiples Bonferroni, $n=4$. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$, comparado con el control de B12 WT; #### $P < 0,001$ comparado con el control de shABCD1; \$\$ $P < 0,01$, \$ $P < 0,05$ comparado con el respectivo tratamiento en B12 WT.

5.3 OLIGODENDROCITOS OBTENIDOS A PARTIR DE iPSCs DERIVADAS DE PACIENTES CON ALD-X

Con el propósito de validar los hallazgos en los modelos de ALD-X en las células MO3.13 y B12, se usó el modelo de oligodendrocitos diferenciados obtenidos a partir de iPSCs derivadas de pacientes con cALD y AMN y un CONTROL. El procedimiento para obtener los oligodendrocitos empezó desde el descongelamiento, siembra, crecimiento y mantenimiento de las colonias en medio para iPSCs humanas (formulación E8). En la figura 5.3.1 se puede observar que el crecimiento de las colonias iPSCs CONTROL, AMN y cALD es adecuado, las colonias no se encuentran diferenciadas y los bordes son regulares.

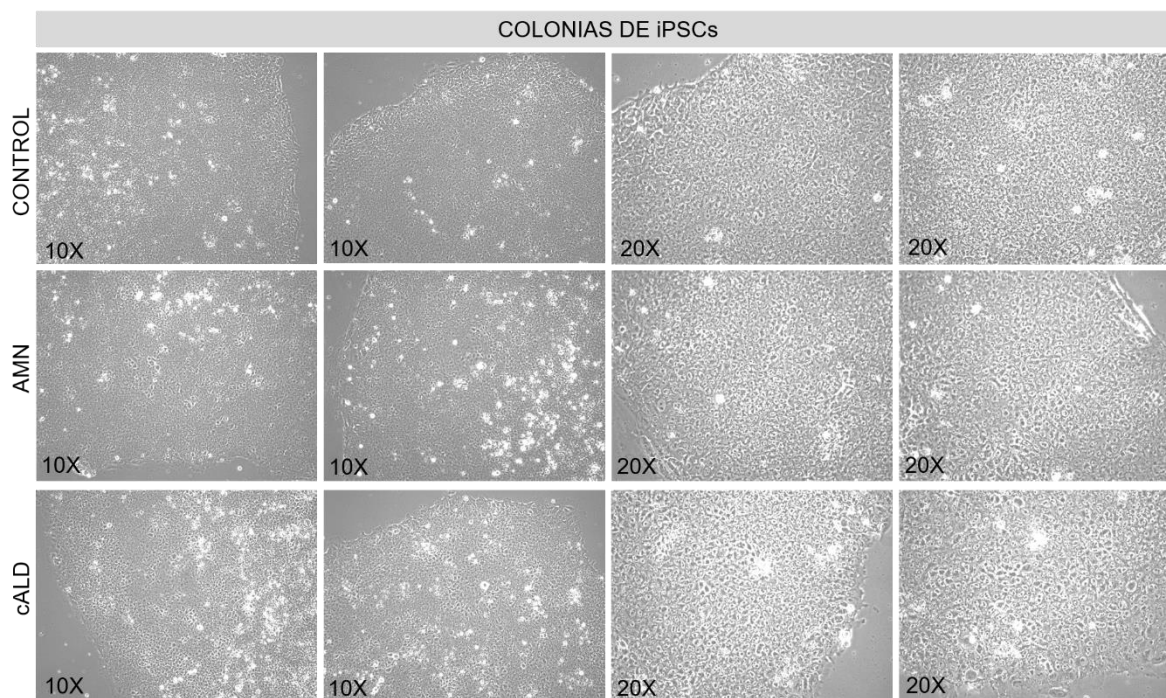


Figura 5.3.1 Colonias de iPSCs derivadas de fibroblastos de pacientes con AMN y cALD y el CONTROL

En la microfotografía se observan las colonias de iPSCs CONTROL, AMN y cALD en medio E8. Las colonias no están diferenciadas y sus bordes son regulares (lisos).

Capítulo 5: Resultados adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X

A partir de las colonias de iPSCs se procedió a la generación de los cuerpos embrionarios, los cuales se lograron obtener sembrando las células individuales (disgregadas con *Accutase*) y no diferenciadas de las colonias de iPSCs en un sistema de pozos específicos que permitió la agregación de las células. Para llevar a cabo este procedimiento, las células se cultivaron en medio de formación de cuerpos embrionarios junto con un inhibidor de Rock a una concentración de $1\mu\text{M}$. En la figura 5.3.2 se observa la formación de agregados celulares de forma esférica. Estas esferas celulares son denominadas cuerpos embrionarios. Después de haber obtenido los cuerpos embrionarios estos son colectados y cultivados en platos de 6 pozos con medio de inducción neural con el propósito de que se adhieran y empiece la formación de las rosetas neuronales, proceso que tarda aproximadamente 7 días, tal como se puede observar en la figura 5.3.3. Luego, se seleccionaron las rosetas neurales y se cultivaron en nuevas cajas con medio de inducción neural para obtener células progenitoras de neuronas (NPCs), a los siete días de cultivo se realizó la caracterización por inmunofluorescencia de las NPCs CONTROL, AMN y cALD y estas fueron positivas para los marcadores Nestin, SOX1, PAX6 y SOX9 (Figura 5.3.4).

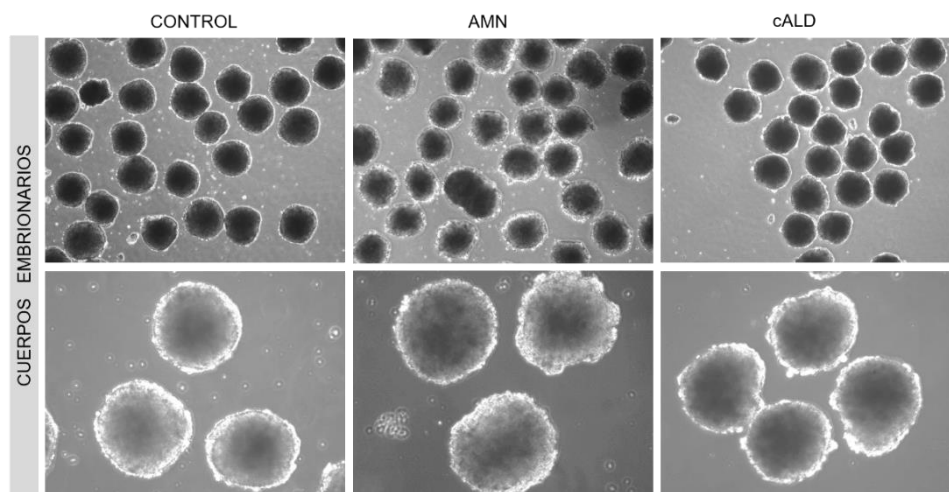


Figura 5.3.2 Cuerpos embrionarios

Después de cinco días de cultivar las células en medio de formación de cuerpos embrionarios se generan los cuerpos embrionarios, los cuales se encuentran creciendo en suspensión, las células están agregadas y forman una esfera.

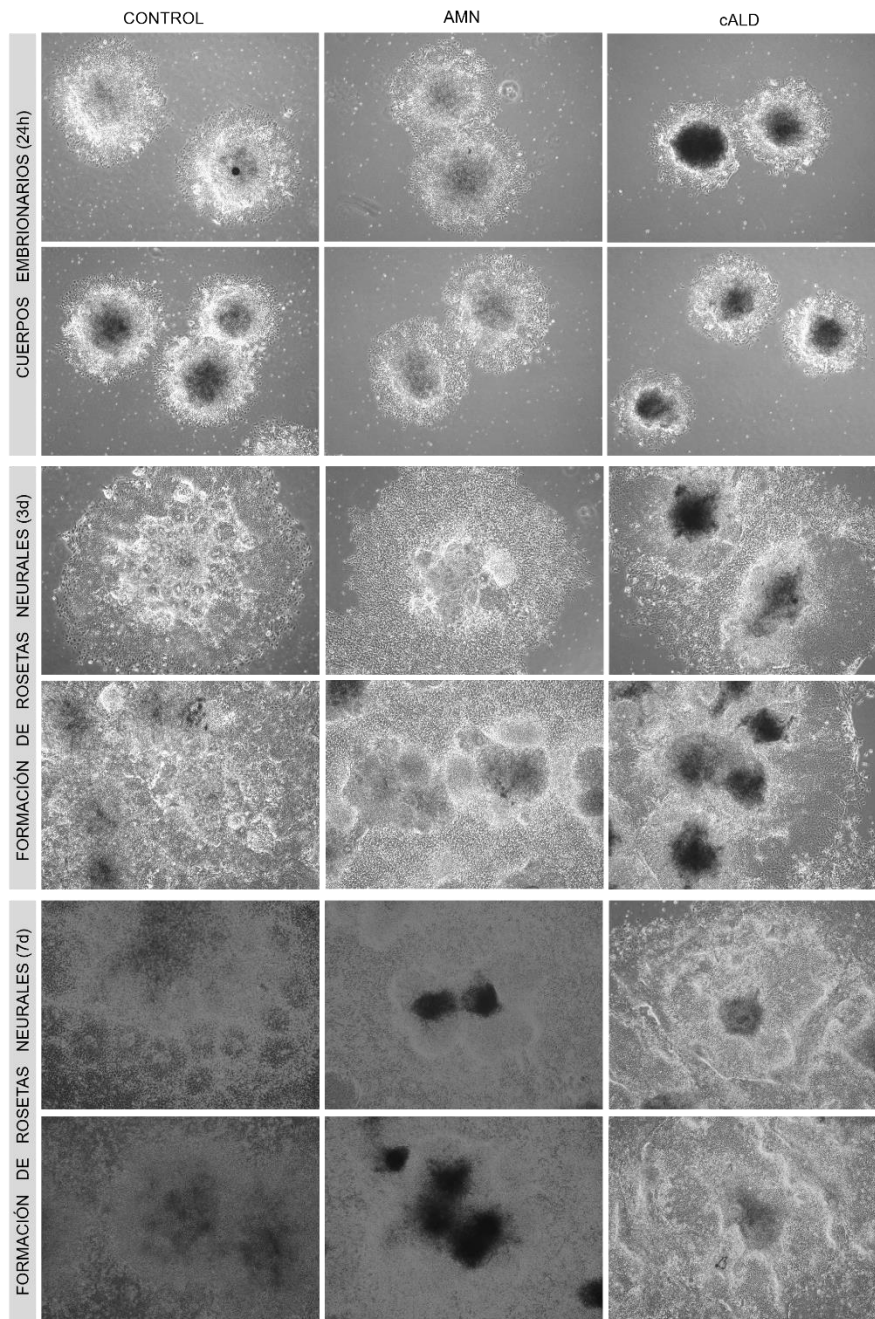


Figura 5.3.3 Formación de rosetas neurales

A. Cuerpos embrionarios a las 24h de ser cultivados en medio de inducción neural en cajas de 6 pozos. Los cuerpos embrionarios se adhieren a la caja de cultivo y empieza su crecimiento para la posterior formación de las rosetas neurales, **B.** tres días y **C.** siete días de formación de rosetas neurales. A los siete días ya hay suficientes rosetas neurales para empezar el cultivo de las células precursoras de neuronas (NPCs).

Capítulo 5: Resultados adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X

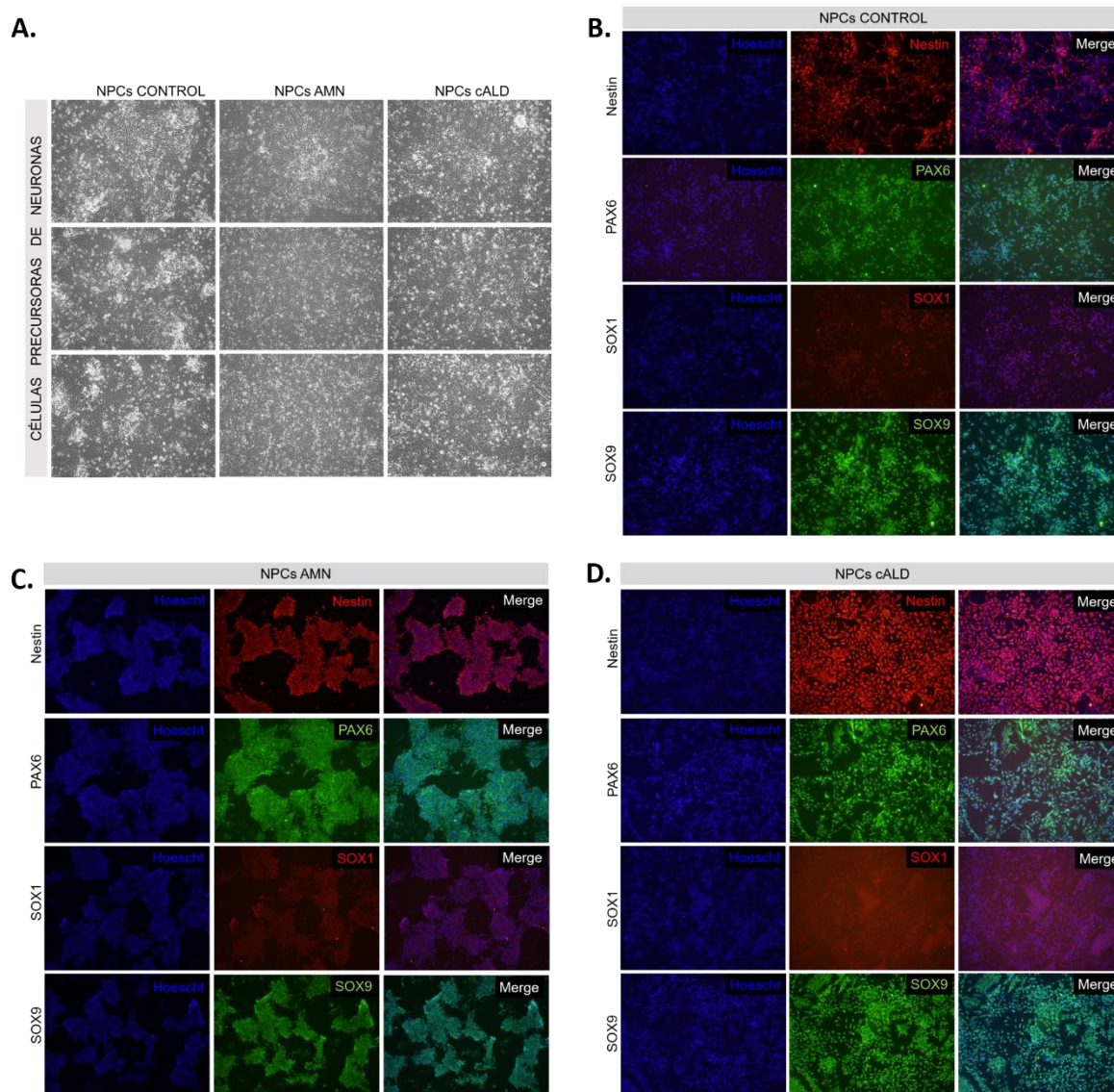


Figura 5.3.4 Células precursoras de neuronas (NPCs)

A. NPCs cultivadas en medio de inducción neural, séptimo día de cultivo. **B - D.** Caracterización de las NPCs con los marcadores Nestin, PAX6, SOX1 y SOX9. **B.** NPCs CONTROL. **C.** NPCs AMN. **D.** NPCs cALD.

Una vez obtenidas las NPCs CONTROL, AMN y cALD se procedió a la diferenciación de NPCs a oligodendrocitos, por tanto el medio de inducción neural se cambió por medio de diferenciación a oligodendrocitos (medio neurobasal + suplemento B27 + glutamina + T3). La obtención de oligodendrocitos maduros tardó 30 días, contados a partir de la adición del medio de diferenciación a oligodendrocitos. Finalizando el periodo de diferenciación, se realizó la inmunofluorescencia de los oligodendrocitos y se encontró que eran positivos para CNPase y MBP, marcadores de oligodendrocitos maduros (Figuras 5.3.5 – 5.3.7). De acuerdo a las microfotografías se observó que los oligodendrocitos obtenidos a partir de iPSCs cALD presentaron una marcación de CNPase y MBP diferente a de los oligodendrocitos obtenidos a partir de iPSCs CONTROL. En el caso de CNPase la marcación se ve fragmentada y se observa un patrón punteado. Además, con la marcación de MBP las ramificaciones de los oligodendrocitos cALD son muy cortas y están en menor número respecto a los oligodendrocitos obtenidos de iPSCs derivadas del CONTROL y del paciente con AMN, estos hallazgos sugieren una disrupción en los procesos de diferenciación en los oligodendrocitos cALD.

El análisis por western blot demostró que los oligodendrocitos diferenciados obtenidos a partir de las iPSCs derivadas de pacientes con cALD y AMN presentan menor expresión de ALDP con relación a los oligodendrocitos CONTROL. La disminución de ALDP en los oligodendrocitos cALD es mayor al 50%, en cambio en los oligodendrocitos AMN es solo del 15% (Figura 5.3.8 A). Adicionalmente, el porcentaje de liberación de LDH en los oligodendrocitos derivados de iPSCs CONTROL es 36,6%, mientras que en los oligodendrocitos derivados de iPSCs de pacientes con AMN y cALD es 43,7% y 53,4%, respectivamente. El alto porcentaje de muerte basal (% liberación de LDH) en el cultivo de oligodendrocitos obtenidos de iPSCs se relaciona con el desprendimiento de los oligodendrocitos durante la última semana de diferenciación, lo cual se refleja en el alto porcentaje de liberación de LDH (Figura 5.3.8 B).

Capítulo 5: Resultados adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X

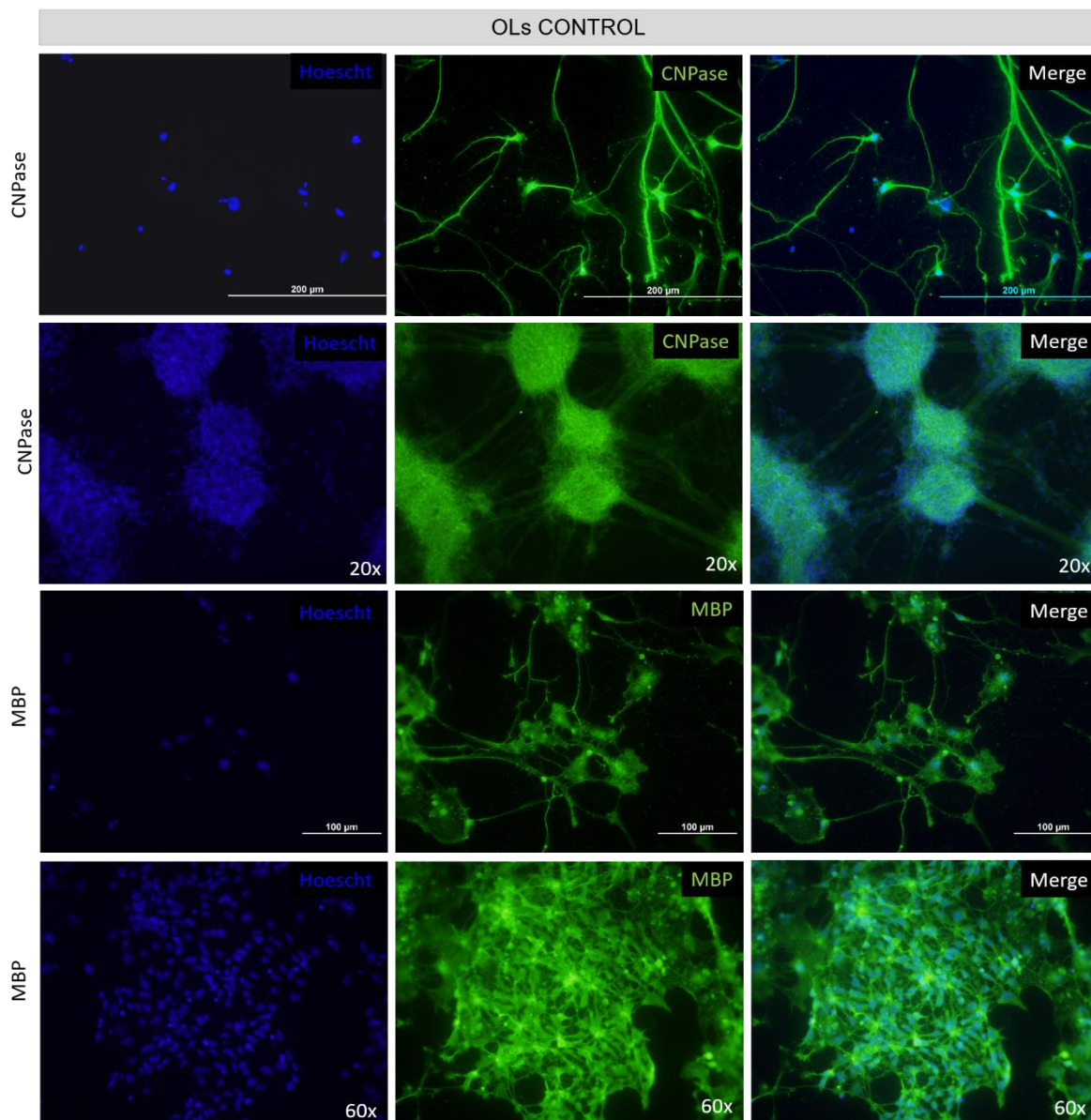


Figura 5.3.5 Oligodendrocitos diferenciados obtenidos a partir de iPSCs CONTROL

Oligodendrocitos con 30 días de diferenciación en medio de diferenciación de oligodendrocitos. Los oligodendrocitos expresan los marcadores CNPase y MBP.

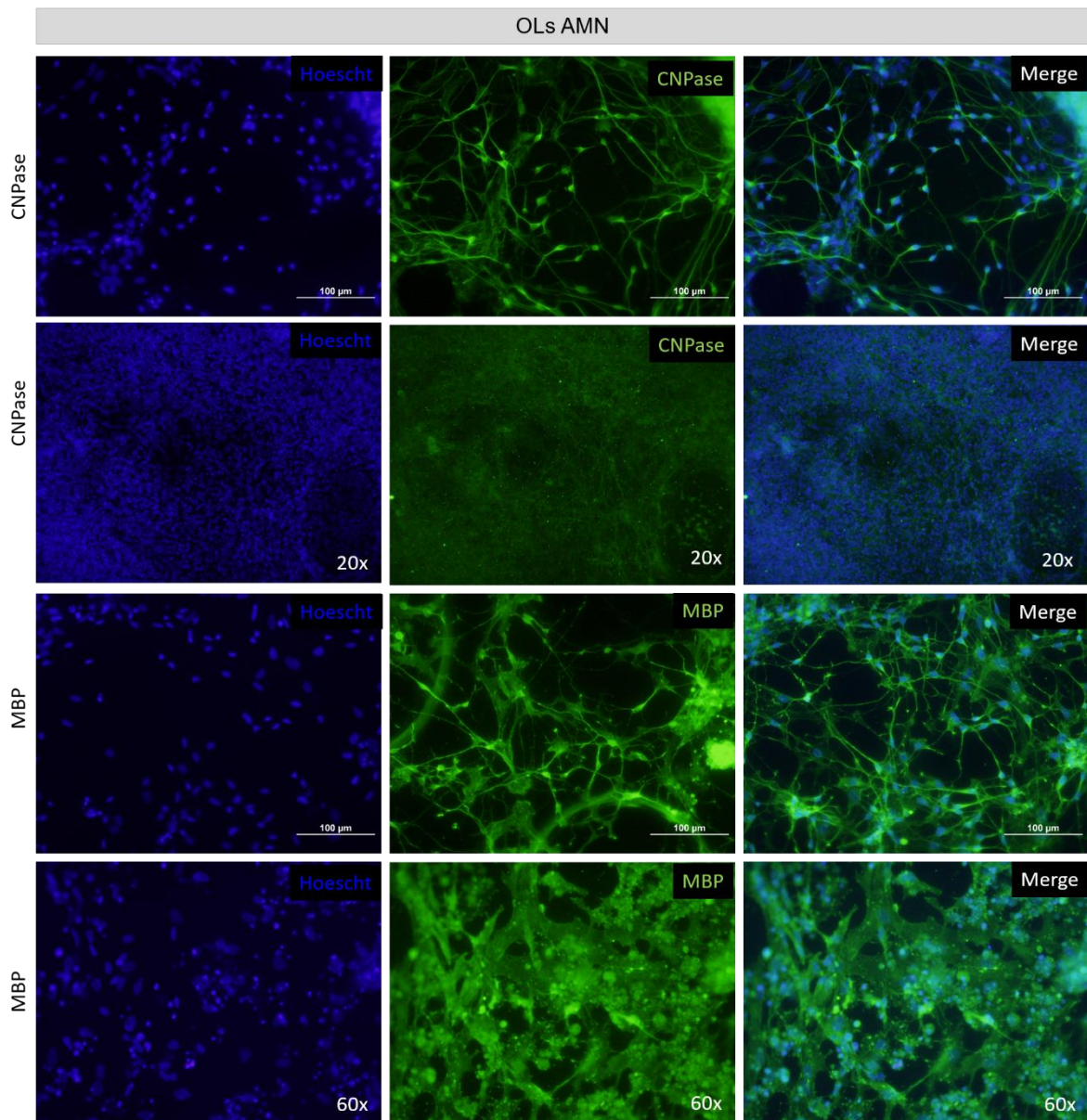


Figura 5.3.6 Oligodendrocitos diferenciados obtenidos a partir de iPSCs AMN
Oligodendrocitos con 30 días de diferenciación en medio de diferenciación de oligodendrocitos. Los oligodendrocitos expresan los marcadores CNPase y MBP.

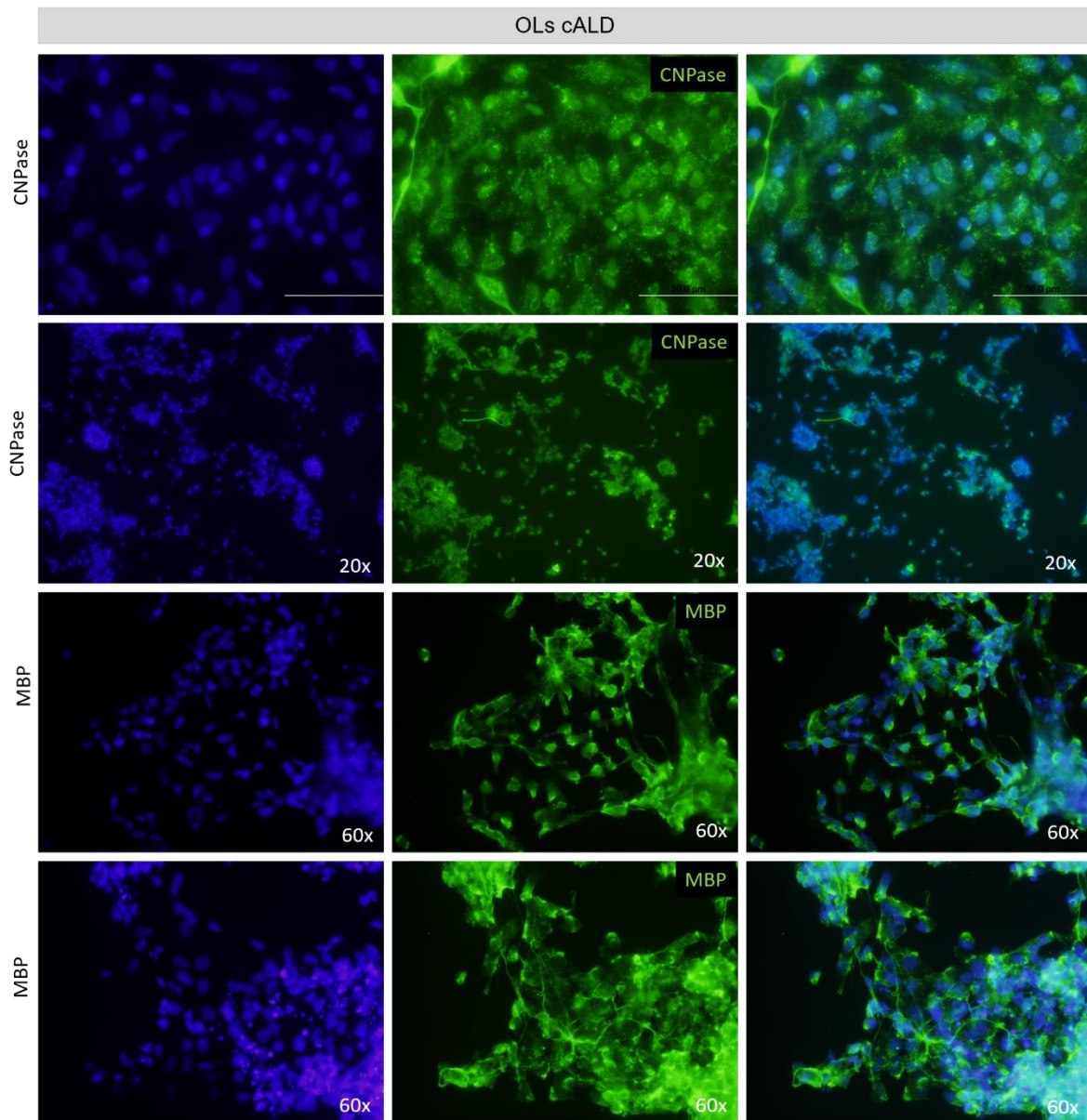


Figura 5.3.7 Oligodendrocitos diferenciados obtenidos a partir de iPSCs cALD
Oligodendrocitos con 30 días de diferenciación en medio de diferenciación de oligodendrocitos. Los oligodendrocitos expresan los marcadores CNPase y MBP.

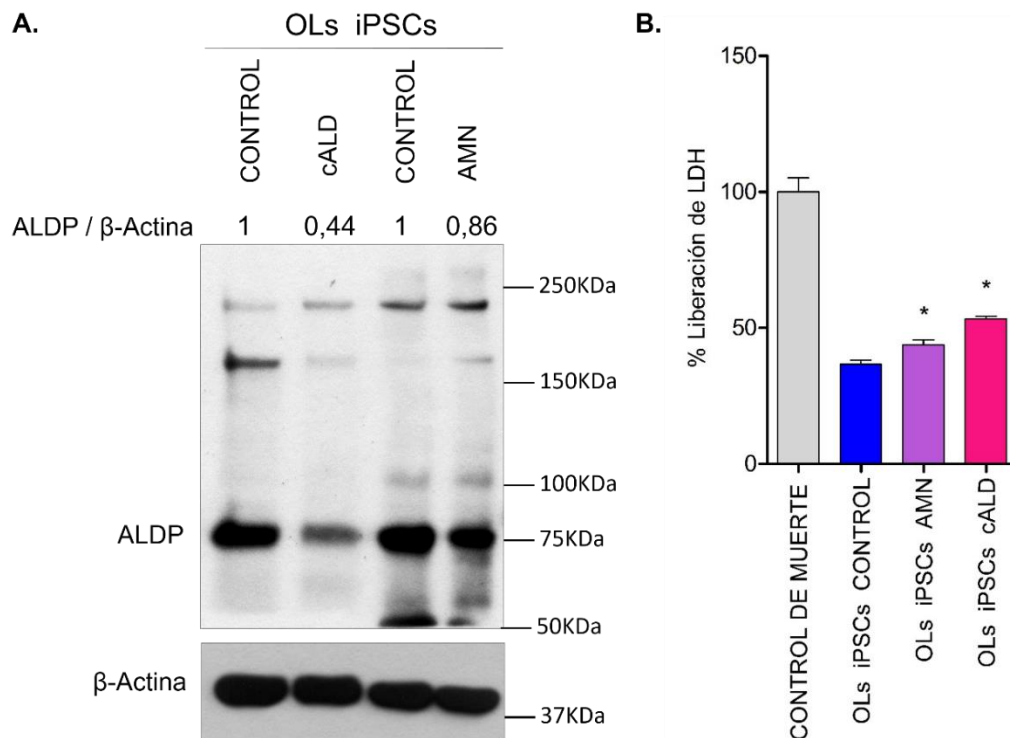


Figura 5.3.8 Análisis por western blot de ALDP en oligodendrocitos diferenciados obtenidos de iPSCs derivadas de pacientes con cALD y AMN

A. Análisis por western blot de ALDP en oligodendrocitos obtenidos de iPSCs CONTROL, cALD y AMN, se usó como control de carga β -Actina. **B.** Porcentaje de liberación de LDH. Los datos se presentan como la media \pm S.E.M. Se realizó ANOVA de una vía seguido por una prueba *t* de student, $n=3$. * $P<0,05$ comparado con los oligodendrocitos obtenidos de iPSCs CONTROL.

Inicialmente, en este modelo se evaluaron por western blot las vías PI3K/AKT y AMPK/mTOR (Anexo 1, Esquema 6). Los oligodendrocitos derivados de iPSCs cALD presentan mayor activación por fosforilación de AKT en la serina 473 con relación a los oligodendrocitos derivados de iPSCs CONTROL (Figura 5.3.9 A y B). El tratamiento con Wortmannin $4\mu\text{M}$ por una hora inhibió totalmente la activación de AKT tanto en el CONTROL como en cALD. La regulación a la alta de la vía de señalización PI3K/AKT es consistente en los tres modelos celulares estudiados de ALD-X, células MO3.13, células B12 y oligodendrocitos diferenciados obtenidos a partir iPSCs de pacientes con ALD-X.

Capítulo 5: Resultados adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X

Respecto a los niveles de p-mTOR (Ser 2448), los oligodendrocitos cALD tienden a tener un mayor nivel de fosforilación con relación a los oligodendrocitos CONTROL, aunque esta diferencia no es significativa. El tratamiento con IGF1 incrementa la activación de mTOR tanto en oligodendrocitos CONTROL y cALD, no obstante, el aumento del nivel de p-mTOR (Ser 2448) en los oligodendrocitos cALD es mayor que en los oligodendrocitos CONTROL y esta diferencia es altamente significativa (**P<0,001) (Figura 5.3.9 A y C). Estos resultados reproducen los hallazgos en células B12 donde la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR es mayor en las células deficientes de ALDP (shABCD1) en respuesta al tratamiento con IGF1.

El tratamiento por una hora de Rapamicina 5µM logró inhibir aproximadamente el 50% de la activación de mTOR (Ser 2448) en los oligodendrocitos CONTROL y cALD. También, el tratamiento por una hora de Wortmannin tuvo un efecto inhibitorio sobre la activación de mTOR (Ser 2448) en los oligodendrocitos y este efecto fue mayor en comparación con el tratamiento de Rapamicina. Estos resultados sugieren que en este modelo celular, oligodendrocitos diferenciados obtenidos a partir de iPSCs, la activación de mTOR por fosforilación en la serina 2448 depende en mayor proporción de la señalización PI3K.

Por otra parte, se encontró que los oligodendrocitos cALD presentan menor nivel las proteínas p-AMPKα (Thr 172), p-AMPKβ (Ser 108), Raptor y LC3-β en comparación con los oligodendrocitos CONTROL (Figura 5.3.9). Lo cual podría sugerir que los oligodendrocitos deficientes en ALDP podrían presentar una disfunción a nivel metabólico, la cual podría reflejarse a nivel mitocondrial y peroxisomal. Por tanto, a continuación se analizó el potencial de membrana mitocondrial con la técnica JC1 y *Mito Tracker Red*, igualmente se realizó un análisis por inmunofluorescencia de las mitocondrias usando el anticuerpo MTCO2 (citocromo c oxidasa) y de los peroxisomas usando los marcadores PMP70 y PEX14.

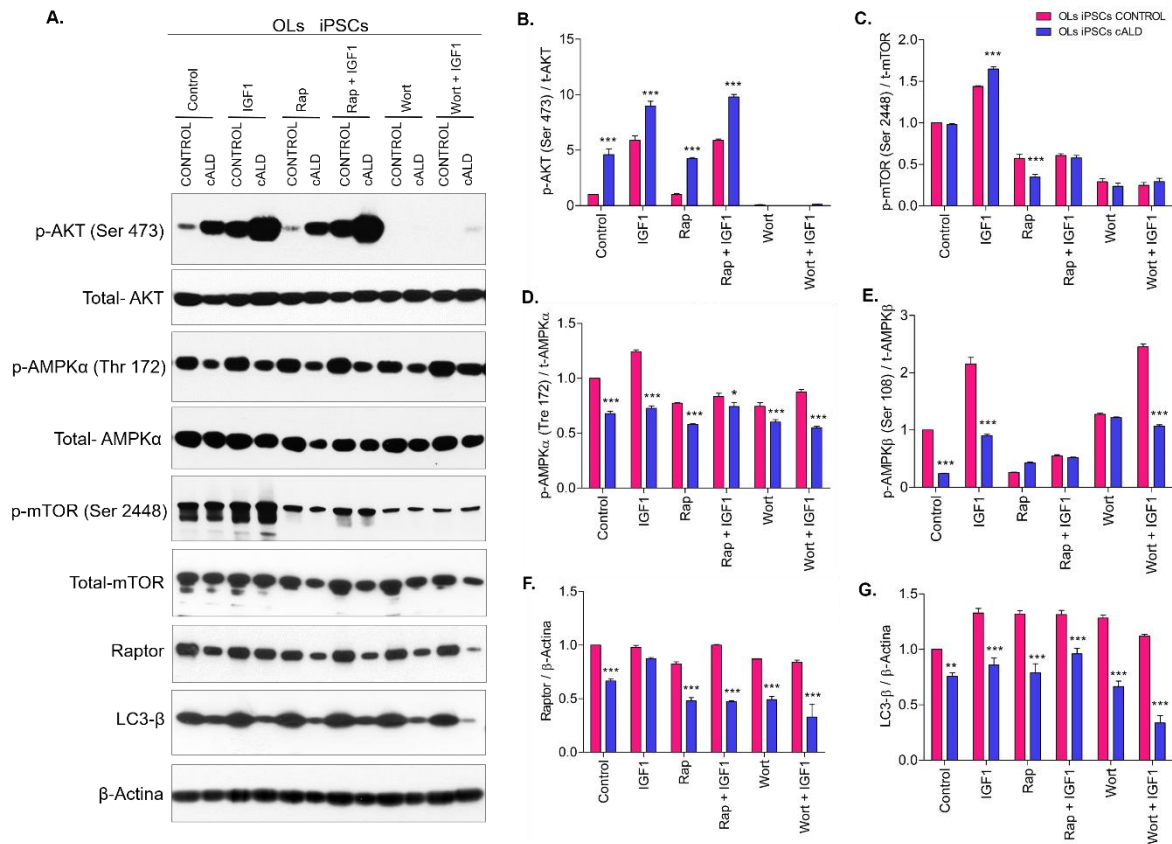


Figura 5.3.9 Análisis por western blot de las vías PI3K/AKT y AMPK/mTOR en oligodendrocitos obtenidos de iPSCs CONTROL y cALD

A. Western blot representativo de p-AKT, t-AKT, p-AMPK α , t-AMPK, p-mTOR, t-mTOR, Raptor, LC3- β y β -Actina en oligodendrocitos obtenidos a partir de iPSCs CONTROL y cALD, los oligodendrocitos fueron tratados con IGF1 (1 μ g/ml), Rapamicina (5 μ M) y Wortmannin (4 μ M). **B.** Análisis por densitometría de p-AKT, p-mTOR, p-AMPK α , p-AMPK β , Raptor y LC3- β . Los datos se presentan como el promedio \pm S.E.M. y están normalizados respecto al control de oligodendrocitos derivados de iPSCs CONTROL. Se realizó ANOVA de dos vías seguido por una prueba de comparaciones múltiples Bonferroni, $n=4$. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$, comparado con los oligodendrocitos obtenidos de iPSCs CONTROL

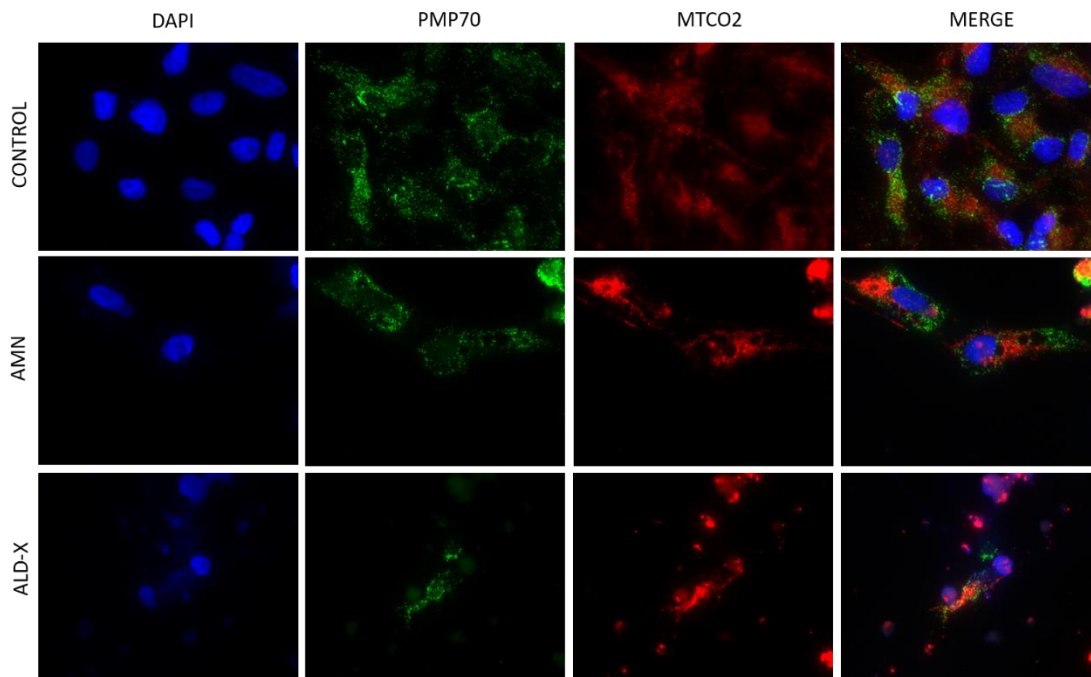


Figura 5.3.10 Análisis por inmunofluorescencia de PMP70 y MTCO2 en oligodendrocitos obtenidos de iPSCs CONTROL, AMN y cALD

El análisis por inmunofluorescencia muestra que los oligodendrocitos cALD presentan menor intensidad de fluorescencia de los marcadores PMP70 (peroxisomas) y MTCO2 (mitocondrias) con relación a los oligodendrocitos CONTROL y AMN.

El análisis preliminar por inmunofluorescencia de las mitocondrias y los peroxisomas en los oligodendrocitos CONTROL, AMN y cALD señaló que la intensidad de fluorescencia para PMP70 (marcador peroxisomal) y MTCO2 (citocromo c oxidasa, marcador mitocondrial) es menor en los oligodendrocitos cALD (Figura 5.3.10). Estos resultados indican que los oligodendrocitos cALD manifiestan una disfunción a nivel mitocondrial y peroxisomal. En la figura 5.3.11 se evidenció tanto por JC-1 (yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil benzimidazol carbocyanina) y Mito Tracker Red que los oligodendrocitos cALD presentan pérdida del potencial de membrana mitocondrial con relación a los oligodendrocitos CONTROL.

En referencia a la marcación con JC-1, en los oligodendrocitos cALD la mayor emisión de fluorescencia fue verde (527nm), lo cual revela que el colorante JC-1 se encontraba al interior de las células en forma de monómero y fuera de las mitocondrias, como consecuencia de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial en los oligodendrocitos cALD. Por el contrario, en los oligodendrocitos CONTROL la mayor emisión de fluorescencia fue roja (590nm), lo cual señala que el colorante JC-1 se encontraba agregado al interior de las mitocondrias puesto que el potencial de membrana mitocondrial era negativo (aproximadamente -100mV).

Con los resultados de *Mito Tracker Red* (Figura 5.3.11 B), también se confirmó la pérdida del potencial de membrana mitocondrial en los oligodendrocitos cALD. La intensidad de fluorescencia roja, la cual corresponde al marcador *Mito Tracker Red* acumulado al interior de las mitocondrias cuyo potencial de membrana mitocondrial es negativo, es muy baja en los oligodendrocitos cALD en comparación con los oligodendrocitos CONTROL.

Adicional a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, se determinó a través de la inmunofluorescencia de MTCO2 que la morfología mitocondrial en los oligodendrocitos AMN y cALD está alterada. En los oligodendrocitos CONTROL, se evidenció que las mitocondrias forman una red donde existe interconectividad. Por el contrario, en los oligodendrocitos AMN esta red no existe y lo que se observó fue un patrón punteado y/o fragmentado de MTCO2, por tanto se pierde la conectividad entre las mitocondrias (mitocondrias fisionadas). Por su parte, en los oligodendrocitos cALD, se observó una limitada distribución de MTCO2, básicamente restringida a la región perinuclear, lo cual se relaciona con los hallazgos por inmunofluorescencia de MBP, donde las ramificaciones de los oligodendrocitos cALD y la inmunoreactividad de CNPase y MBP están altamente reducidos en comparación con los oligodendrocitos CONTROL y AMN (Figura 5.3.12). De acuerdo a los resultados del potencial de membrana mitocondrial y los resultados de la morfología mitocondrial, se puede concluir que los oligodendrocitos

Capítulo 5: Resultados adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X

cALD manifiestan una drástica disfunción mitocondrial, la cual se revela por la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la pérdida de la red mitocondrial.

De igual manera se realizó el análisis por inmunofluorescencia de los peroxisomas en los oligodendrocitos CONTROL, AMN y cALD, para llevar a cabo esto se usaron dos marcadores peroxisomales, PMP70 y PEX14. En la figura 5.3.10 se observa que la intensidad de fluorescencia de PMP70 está reducida en los oligodendrocitos cALD, mientras que en los oligodendrocitos CONTROL y AMN la inmunoreactividad de PMP70 es similar entre las dos poblaciones celulares. Con referencia al marcador PEX14, proteína integral de la membrana peroxisomal y componente esencial en la maquinaria de importación de proteínas hacia la matriz del peroxisoma (Reguenga et al., 2001), se pudo observar que la intensidad de fluorescencia disminuyó en los oligodendrocitos AMN y cALD con relación a los oligodendrocitos CONTROL. En los oligodendrocitos CONTROL y cALD se observó que PEX14 colocaliza con DAPI (marcador nuclear), lo cual se puede explicar porque PEX14 actúa como un corepresor transcripcional de la histona deacetilasa 1 (HDAC1) (Gavva et al., 2002). Interesantemente, en los oligodendrocitos AMN no se observó colocalización de PEX14 con DAPI, adicionalmente, el patrón de distribución de PEX14 en los oligodendrocitos AMN es punteado y presenta un alto porcentaje de colocalización con MTCO2, lo cual no se evidenció en los oligodendrocitos CONTROL pero si se observó en los oligodendrocitos cALD (Figura 5.3.12).

Los resultados anteriormente descritos, demostraron que la deficiencia de la proteína ADLP en oligodendrocitos tiene efecto sobre diferentes eventos: 1) impacta las vías de señalización PI3K/AKT y AMPK/mTOR, 2) retarda el proceso de diferenciación de los oligodendrocitos y 3) altera la función mitocondrial y peroxisomal. En este punto y de acuerdo a los experimentos que se realizaron en esta investigación no es posible proponer una secuencia de eventos que finalmente conduzcan a la muerte de los oligodendrocitos, dado que las vías de señalización,

el proceso de diferenciación y la función mitocondrial y peroxisomal son procesos que están en constante regulación, interacción, cambio y adaptación.

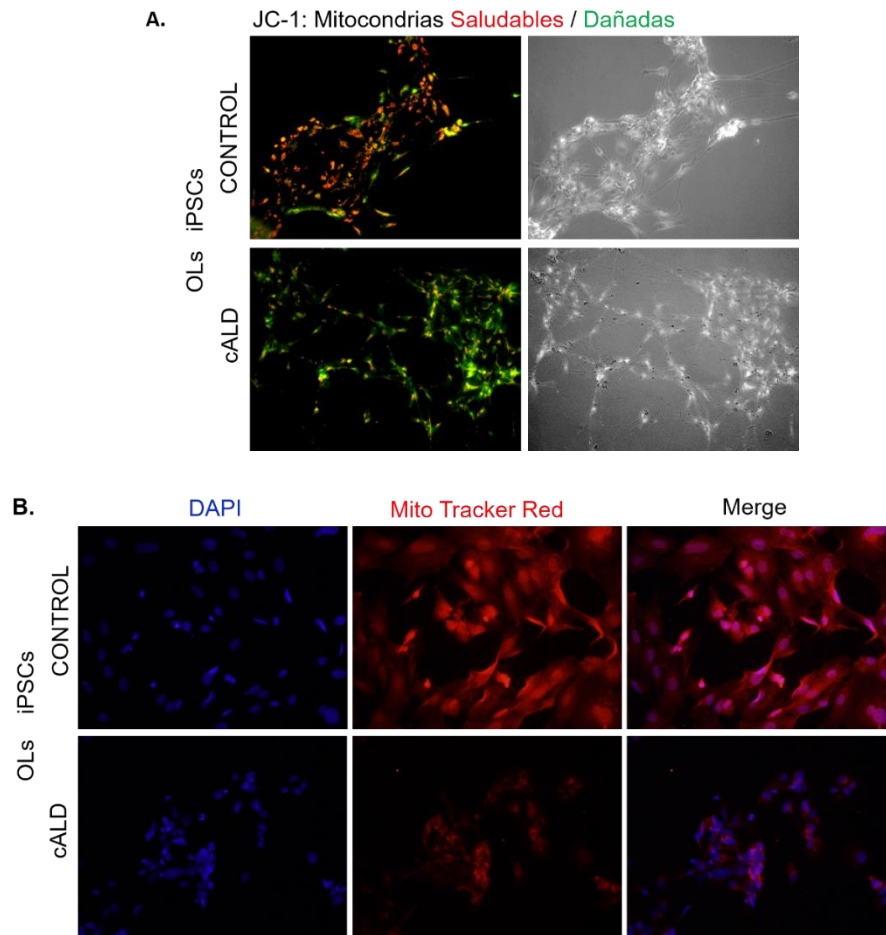


Figura 5.3.11 Los oligodendrocitos obtenidos de iPSCs cALD presentan disminución en el potencial de membrana mitocondrial

A. Potencial de membrana mitocondrial determinado por JC-1. Las células con mitocondrias saludables (potencial de membrana mitocondrial negativo) presentan fluorescencia roja y las células con mitocondrias dañadas (pérdida del potencial de membrana mitocondrial) presentan fluorescencia verde. Los oligodendrocitos CONTROL en su mayoría exhiben mitocondrias saludables, mientras que los oligodendrocitos cALD tienen mitocondrias dañadas. **B.** Potencial de membrana mitocondrial determinado por Mito Tracker Red. La intensidad de fluorescencia roja (incorporación y acumulación del Mito Tracker Red en mitocondrias con potencial de membrana negativo) es mucho mayor en los oligodendrocitos CONTROL. Tanto por la técnica JC-1 como Mito Tracker Red se confirmó la pérdida del potencial de membrana mitocondrial en los oligodendrocitos cALD en comparación con los oligodendrocitos CONTROL.

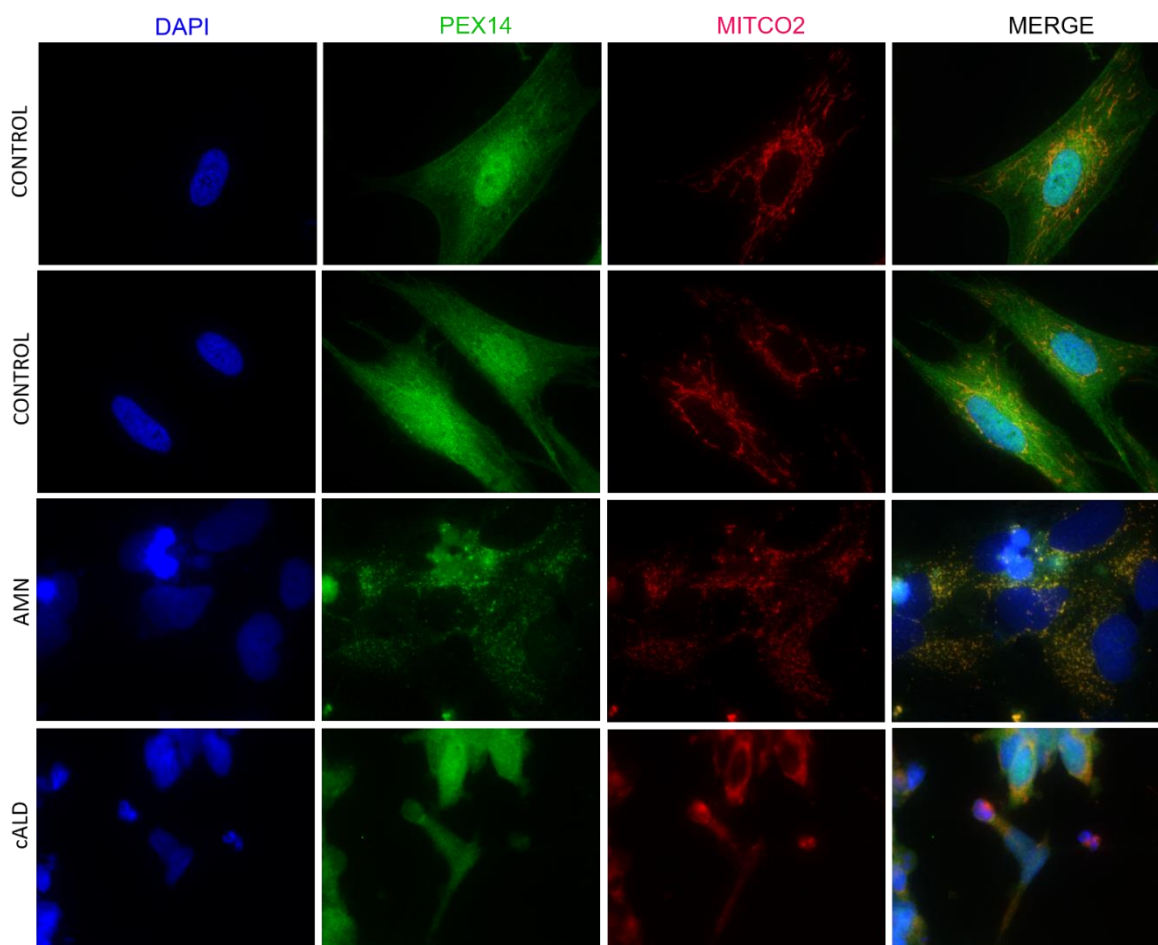


Figura 5.3.12 Análisis por inmunofluorescencia de PEX14 y MTCO2 en oligodendrocitos obtenidos de iPSCs CONTROL, AMN y cALD

El análisis por inmunofluorescencia de PEX14 (marcador peroxisomal) y MTCO2 (marcador mitocondrial) muestra que los oligodendrocitos cALD presentan menor intensidad de fluorescencia de los marcadores PEX14 y MTCO2 con relación a los oligodendrocitos CONTROL. Los oligodendrocitos AMN presentan fragmentación de la red mitocondrial y no se observó co-localización de PEX14 en el núcleo a diferencia de lo observado en los oligodendrocitos CONTROL y cALD.

Con el propósito de indagar en mayor profundidad las alteraciones encontradas en los modelos de ALD-X y teniendo en consideración que uno de los aspectos más controversiales de la ALD-X es la gran variabilidad a nivel clínico (Kemp et al., 2012). Por ejemplo, las diferencias clínicas entre los pacientes con cALD (ALD de inicio en la niñez) y AMN (ALD de inicio tardío) son muy amplias, incluso se ha descrito que

hermanos gemelos con X-ALD presentan una clínica muy variable de la enfermedad. El aspecto clínico de la ALD-X llama la atención porque partiendo de la base que la causa de la enfermedad son las mutaciones en el gen ABCD1, cuya consecuencia es la disfunción de la proteína ALDP; entonces, cómo explicar esta alta variabilidad clínica entre los pacientes con ALD-X. Otra posible explicación a estos sucesos son las modificaciones epigenéticas y con base en los cambios encontrados en la señalización celular de las vías PI3K/AKT y AMPK/mTOR se quiso investigar acerca de la acetilación de histonas, uno de los mecanismos reguladores de la epigenética y que podría estar relacionado con la disfunción en las vías de señalización y disfunción mitocondrial y peroxisomal en el contexto de ALD-X.

Inicialmente, se determinó por western blot el nivel de acetilación de residuos de lisina (modificación postraducciona de las proteínas) y el nivel de acetilación de la histona 3 (Ac-H3). Estos hallazgos sugieren que los oligodendrocitos cALD y AMN presentan menor acetilación en los residuos de lisina en comparación con los oligodendrocitos CONTROL (Figura 5.3.13 A). Adicionalmente, las células fueron tratadas por 48h con NaAc 1mM, 5mM y 10mM (acetato de sodio) y con SAHA 5µM (*suberoylanilide hydroxamic acid*, inhibidor de deacetilasas de histonas) y los resultados mostraron que el tratamiento con SAHA logró incrementar el nivel de acetilación de los residuos de lisina tanto en oligodendrocitos CONTROL como en oligodendrocitos cALD y AMN, lo que no ocurrió con los tratamientos de NaAc. También, se demostró que el nivel de acetilación de la histona 3 está disminuido en los oligodendrocitos cALD y que el tratamiento con NaAc por 12h logra incrementar su nivel tanto en oligodendrocitos CONTROL y cALD, adicionalmente, se observó que este incremento es dependiente de la concentración de NaAc, a mayor concentración de NaAc mayor es el incremento de la acetilación de la histona 3 (Figura 5.3.13 B). Otro aspecto importante de resaltar es que los tratamientos con NaAc y SAHA por 48h tienden a incrementar los niveles de fosforilación de AMPKα en oligodendrocitos CONTROL, cALD y AMN (Figura 5.3.14). Lo cual llamó la atención porque una de las diferencias más contundentes a nivel de señalización

Capítulo 5: Resultados adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X

celular entre oligodendrocitos CONTROL y ALD-X es la disminución de la fosforilación de AMPK α/β en los modelos de ALD-X.

A partir de lo anterior, surgió la pregunta de cuál podría ser la relación entre la disminución de la acetilación de proteínas con la disfunción a nivel de vías de señalización, mitocondria y peroxisomas en los oligodendrocitos ALD-X, y se llegó a un punto interesante, la relación de AMPK y mTOR con la regulación de la acetilación de histonas y la producción de Acetil CoA. A partir de esa relación surge el interés de estudiar la enzima Acetil-CoA Sintetasa (AceCS), dado que recientemente en el contexto de cáncer, se descubrió que AMPK es capaz de fosforilar a AceCS2 en la Ser 659, lo cual induce su translocación al núcleo; una vez que AceCS2 se encuentra en el núcleo es capaz de generar Acetil CoA para la acetilación de la histona 3 y así regular de manera positiva la expresión de genes que contribuyen a la biogénesis lisosomal, autofagia y la generación de tumores cerebrales (Li et al., 2017).

En esta investigación, se realizó inmunofluorescencia de la proteína AceCS1 en los oligodendrocitos CONTROL, AMN y cALD, este análisis mostró una distribución diferencial de AceCS1 entre las diferentes poblaciones celulares. En los oligodendrocitos CONTROL, la proteína AceCS1 se encuentra tanto en citoplasma como en núcleo, a diferencia de los oligodendrocitos AMN donde AceCS1 tiene una localización más citoplasmática y menos nuclear, y con respecto a los oligodendrocitos cALD hay una disminución drástica de la inmunoreactividad de la proteína AceCS1 y su localización está restringida al área perinuclear, aunque por la calidad de las imágenes no fue posible determinar si la localización de la proteína es perinuclear o nuclear (Figura 5.3.15).

En conclusión, cada uno de los modelos estudiados aportó información valiosa para la comprensión de los mecanismos subyacentes a la disfunción de la proteína ALDP en los procesos de viabilidad, señalización celular, metabolismo, diferenciación y regulación epigenética en oligodendrocitos en el contexto de ALD-X y a partir de estos resultados quedan muchos interrogantes que vale la pena

Efecto de agonistas PPARs e IGF1 en modelos *in vitro* de leucodistrofias

seguir investigando con el propósito de encontrar blancos terapéuticos novedosos que permitan en un futuro mejorar la calidad de vida de los pacientes con ALD-X, por ejemplo, tratamientos enfocados en la activación de la vía de supervivencia PI3K/AKT, la activación de AMPK, la activación de la acetilación de histonas, la inducción de la proliferación peroxisomal y la biogénesis mitocondrial.

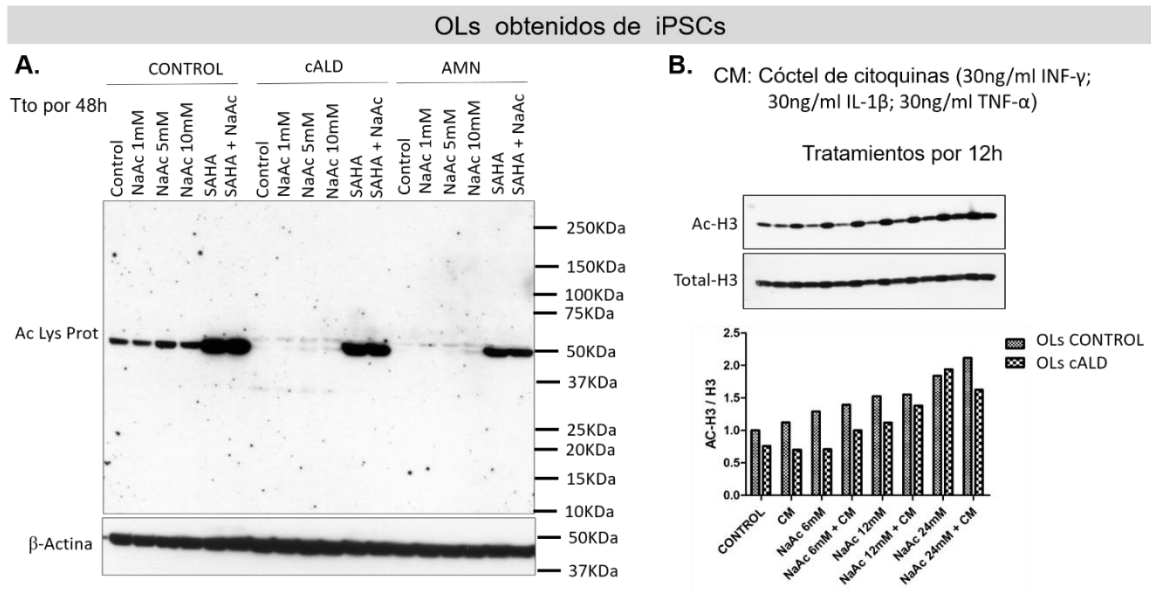


Figura 5.3.13 Disminución de la acetilación en oligodendrocitos cALD

Western blot representativo de la acetilación de residuos de lisina (Ac Lys Prot) y de la histona 3 acetilada (Ac-H3). **A.** El análisis por western blot de Ac Lys Prot reveló que los oligodendrocitos cALD y AMN presentan menor nivel de acetilación de los residuos de lisina con relación a los oligodendrocitos CONTROL. El tratamiento con SAHA 5μM por 48h, logró incrementar el nivel de acetilación en el CONTROL, cALD y AMN. **B.** El análisis por western blot de Ac-H3 reveló que los oligodendrocitos cALD tienden a tener menor nivel de Ac-H3. El tratamiento con NaAc consiguió incrementar el nivel de Ac-H3 y su efecto es dependiente de la concentración. (NaAc: Acetato de sodio, SAHA: SAHA 5μM, SAHA + NaAc: SAHA 5μM + NaAc 1mM).

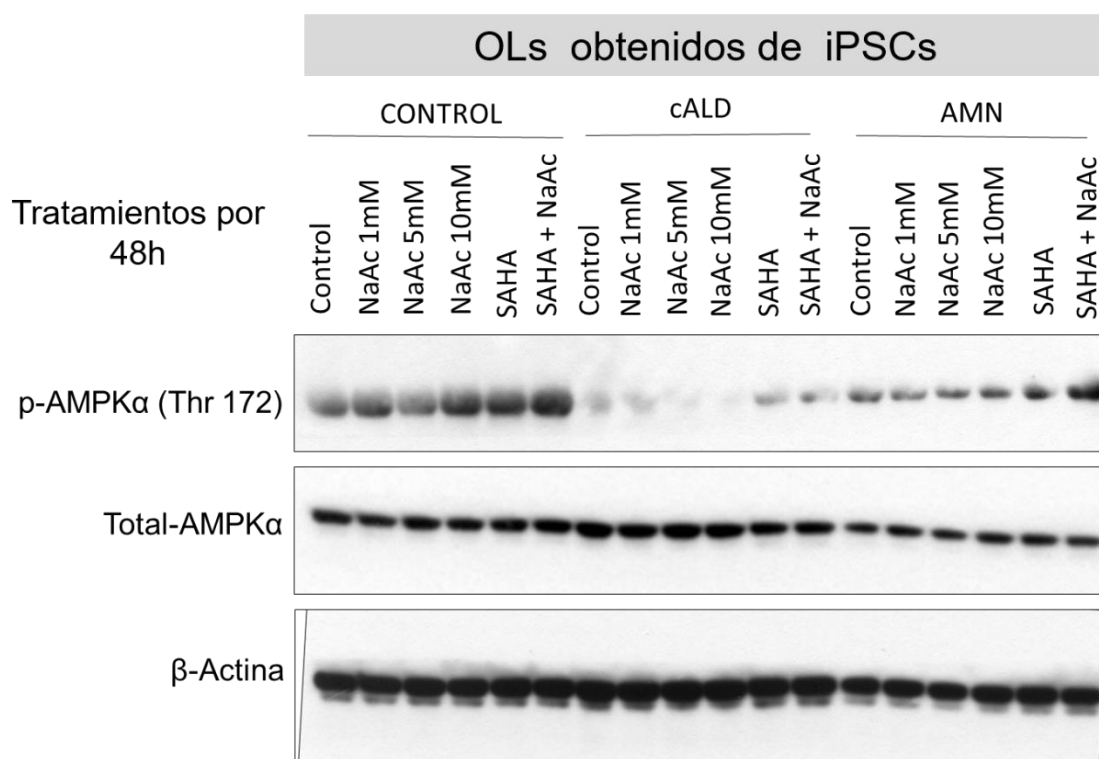


Figura 5.3.14 El acetato de sodio y SAHA contribuyen a la activación de AMPK α en oligodendrocitos

Western blot representativo del efecto de NaAc y SAHA sobre p-AMPK α (Thr 172) en oligodendrocitos CONTROL, cALD y AMN. Los tratamientos con NaAc y SAHA por 48h contribuyen a la activación por fosforilación de AMPK α en la treonina 172 (NaAc: Acetato de sodio, SAHA: SAHA 5 μ M, SAHA + NaAc: SAHA 5 μ M + NaAc 1mM).

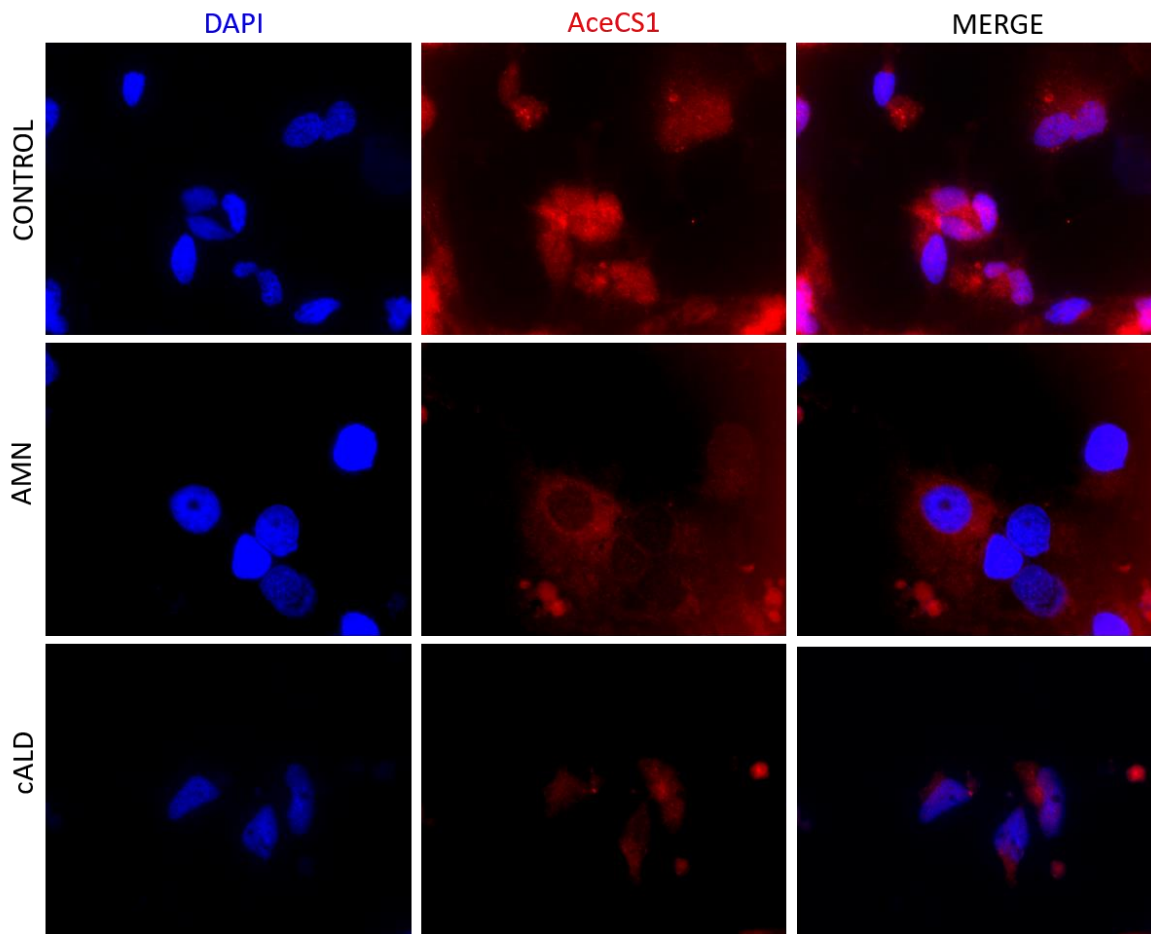


Figura 5.3.15 Análisis por inmunofluorescencia de AceCS1 en oligodendrocitos CONTROL, cALD y AMN

Immunofluorescencia de AceCS1 en oligodendrocitos CONTROL, AMN y cALD. Nótese que la distribución de la proteína AceCS1 es diferente en cada población celular. En oligodendrocitos CONTROL la proteína AceCS1 se encontró tanto en el citoplasma como en el núcleo. En los oligodendrocitos AMN, la proteína AceCS1 se detectó en menor proporción en el núcleo. En oligodendrocitos cALD, además de que la inmunoreactividad para AceSC1 es escasa, su distribución es perinuclear, aunque por la calidad de las imágenes no se pudo determinar co-localización de AceCS1 con DAPI.

6. CAPÍTULO 6: RESULTADOS ENFERMEDAD DE KRABBE

Para la EK se validaron dos modelos en la línea celular MO3.13, uno exógeno por la adición de Psicossina y otro endógeno por la interferencia del gen GALC, dado que la deficiencia de GALC conlleva a la acumulación de Psicossina. Adicionalmente, los resultados obtenidos en la línea celular MO3.13 del modelo exógeno de EK se validaron en cultivos primarios enriquecidos de oligodendrocitos derivados de cerebros de ratones un día postnatal.

6.1 MODELO DE LA ENFERMEDAD DE KRABBE EN CÉLULAS MO3.13 POR APLICACIÓN EXÓGENA DE PSICOSINA

El tratamiento con Psicossina causa muerte celular en las células MO3.13 diferenciadas con un efecto dosis-tiempo dependiente. Las células MO3.13 en medio de diferenciación fueron tratadas con Psicossina a diferentes concentraciones (1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M y 20 μ M) durante seis horas y 24 horas. Se observó que el aumento de la concentración de Psicossina y el tiempo de exposición disminuye el porcentaje de viabilidad celular (WST-1) (Figura 6.1.1 A y B). Adicionalmente, el porcentaje de muerte (determinado por el porcentaje de liberación de LDH) aumentó con relación al tiempo de exposición de la Psicossina 10 μ M (Figura 6.1.1 C). Con base en estos resultados, se estableció la dosis de Psicossina 10 μ M para llevar a cabo los siguientes experimentos, porque según los resultados obtenidos la concentración 10 μ M de Psicossina causa una drástica disminución en el porcentaje de viabilidad, por tanto la muerte de las células puede ser atribuida principalmente al tratamiento con Psicossina 10 μ M, ya sea a las seis o a las 24 horas de exposición.

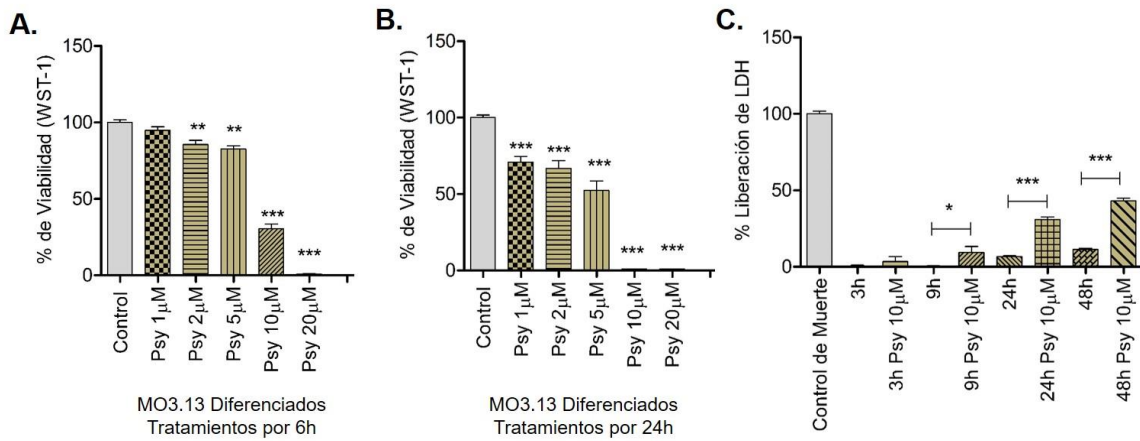


Figura 6.1.1 La exposición exógena de Psicosina induce muerte en las células MO3.13 diferenciadas de manera dosis-tiempo dependiente

Efecto dosis-tiempo dependiente de la Psicosina (Psy) sobre la viabilidad de las células MO3.13 diferenciadas. **A - B.** Porcentaje de viabilidad medido por la actividad WST-1, los datos fueron normalizados con respecto al control (100% de viabilidad). **A.** Las células MO3.13 diferenciadas fueron tratadas durante seis horas (6h) con Psicosina (Psy) a diferentes concentraciones. **B.** Las células MO3.13 diferenciadas fueron tratadas durante 24 horas (24h) con Psicosina (Psy) a diferentes concentraciones. **C.** Porcentaje de liberación de LDH, los datos fueron normalizados respecto al control de muerte (100% de muerte). Se determinó el porcentaje de muerte de las células MO3.13 diferenciadas inducido por el tratamiento de Psicosina 10µM (Psi 10µM) a diferentes tiempos (3h, 9h, 24h y 48h). Los datos se presentan como el promedio \pm S.E.M. Se realizó ANOVA de una vía seguido por una prueba de comparaciones múltiples Tukey-Kramer, $n=3$. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$ (Martínez-Galarza, 2014).

A continuación se procedió a evaluar el efecto neuroprotector de los pretratamientos por una hora y 24 horas de los agonistas PPARs (Ros, GW, WY) e IGF1 en las células MO3.13 expuestas a Psicosina 10µM por 24 horas, con el propósito de determinar cuál de los pretratamientos podría tener un efecto neuroprotector frente a la muerte inducida por la exposición a Psicosina en las células MO3.13 diferenciadas (Anexo 1, Esquema 2).

Inicialmente, se probó el efecto neuroprotector de la Rosiglitazona (agonista PPAR- γ) frente al neurotóxico Psicosina, los resultados mostraron que el

Capítulo 6: Resultados enfermedad de Krabbe

pretratamiento de una hora logró proteger a las células MO3.13 de la muerte conferida por la exposición de Psicossina 10 μ M (Figura 6.1.2 A), mientras que el pretratamiento de 24 horas no consiguió proteger a las células de la muerte. (Figura 6.1.2 B). También, se demostró que el efecto neuroprotector de la Rosiglitazona es dependiente de su actividad como agonista de PPAR- γ , ya que al bloquear PPAR- γ con el antagonista GW9662 se perdió totalmente la protección conferida por el tratamiento con Rosiglitazona (Figura 6.1.2).

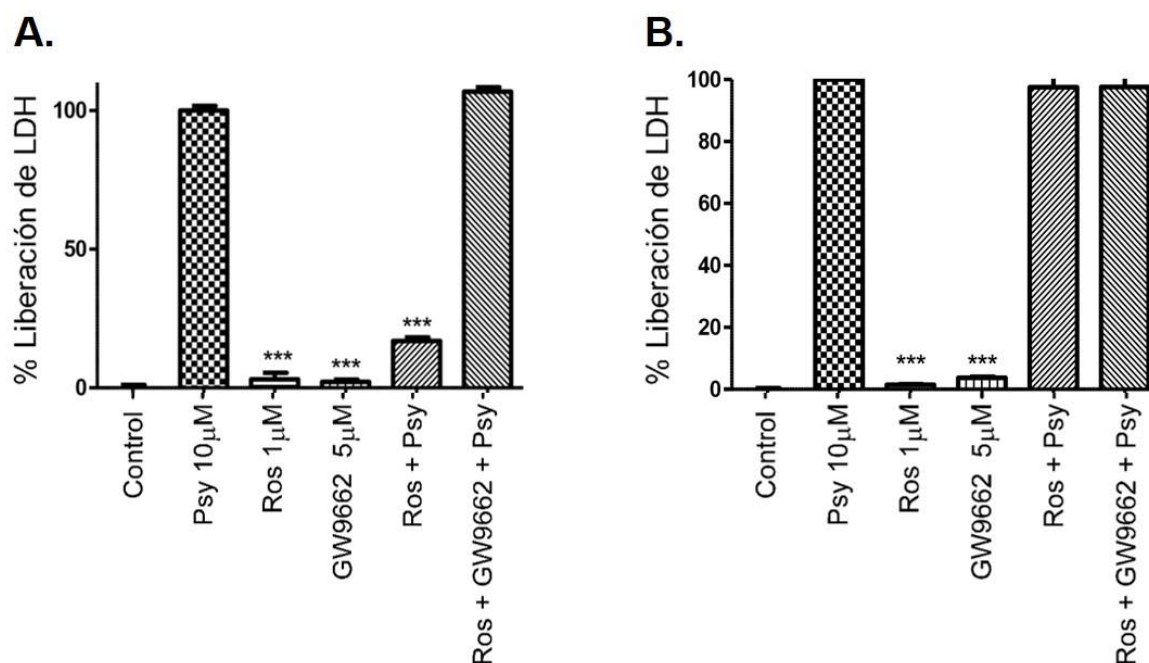


Figura 6.1.2 El pretratamiento de una hora con Rosiglitazona logró proteger a las células MO3.13 diferenciadas de la muerte causada por la exposición de Psicossina

Porcentaje de liberación de LDH, las células fueron tratadas con Psicossina 10 μ M (Psy 10 μ M), Rosiglitazona 1 μ M (Ros 1 μ M), GW6992 5 μ M (Potente antagonista de PPAR- γ). **A.** Una hora pretratamiento con Ros 1 μ M. **B.** 24 horas pretratamiento con Ros 1 μ M. Los datos fueron normalizados respecto al control de muerte (Psy 10 μ M). Los datos se presentan como el promedio \pm S.E.M. Se realizó ANOVA de una vía seguido por una prueba de comparaciones múltiples Tukey-Kramer, $n=3$. *** $P<0,001$ comparado con el tratamiento Psy 10 μ M (Control de muerte 100%) (Martínez-Galarza, 2014).

A continuación se evaluó el efecto neuroprotector de GW0742 (agonista PPAR- β) y de WY14643 (agonista PPAR- α) frente a la muerte causada por la Psicossina en las células MO3.13 diferenciadas, los resultados mostraron que los pretratamientos con GW0742 (0,1 μ M, 1 μ M, 5 μ M) por una o 24 horas no lograron proteger a las células de la muerte conferida por la exposición de Psicossina 10 μ M (Figura 6.1.3 A y B). Respecto a WY14643, se encontró que el pretratamiento por 24 horas con WY14643 20 μ M recuperó significativamente la viabilidad de las células MO3.13 luego de ser tratadas con Psicossina 10 μ M (**P<0,01) (Figura 6.1.3 C y D).

Con base en los resultados anteriores, se procedió a explorar el efecto de los agonistas PPARs sobre las vías de señalización PI3K/AKT y MAPK/ERK1-2. Los resultados por western blot demostraron que la Psicossina impacta las vías de señalización PI3K/AKT y MAPK/ERK1-2. Se evidenció que el tratamiento con Psicossina 10 μ M por 24 horas disminuyó el nivel de fosforilación de AKT (Ser 473) y ERK1/2 (Thr202 / Tyr 204). Los pretratamientos por una y 24 horas con GW0742 5 μ M y WY14643 20 μ M no lograron restaurar el nivel de fosforilación de AKT. Mientras que el pretratamiento por una hora con Rosiglitazona 1 μ M incrementó de manera significativa el nivel de p-AKT (Ser 473) (**P<0,001) y p-ERK1/2 (Thr 202 / Tyr 204) (**P<0,001) en el modelo exógeno de EK (células MO3.13 diferenciadas tratadas con Psicossina 10 μ M por 24h) (Figura 6.1.4 y Figura 6.1.5).

Capítulo 6: Resultados enfermedad de Krabbe

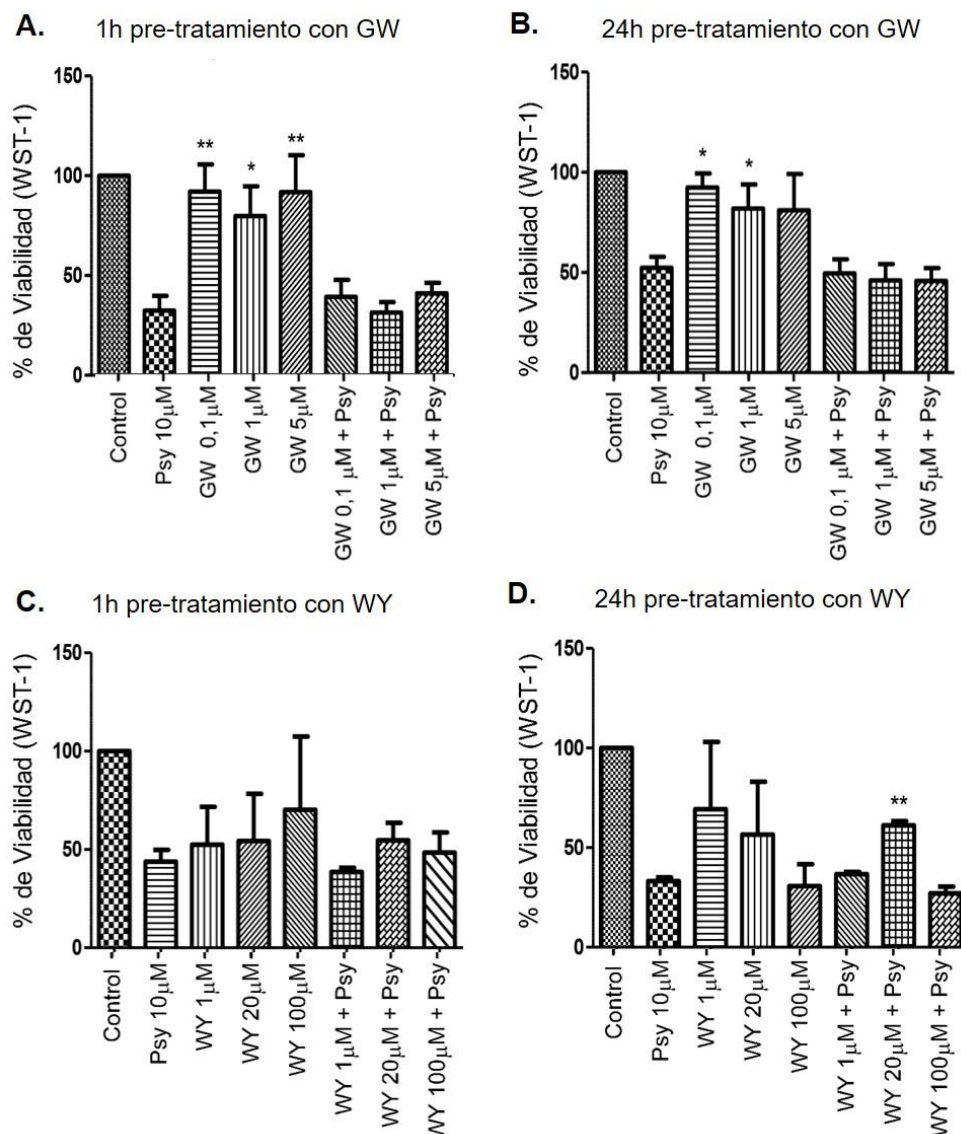


Figura 6.1.3 Efecto neuroprotector de GW0742 y WY14643 frente a la exposición de Psicosisina en células MO3.13

Porcentaje de viabilidad de las células MO3.13 diferenciadas. Células fueron tratadas con los agonistas GW0742 (0,1 μ M, 1 μ M o 5 μ M) y WY14643 (1 μ M, 20 μ M, 100 μ M) a diferentes concentraciones en presencia o ausencia de Psicosisina 10 μ M. **A.** Una hora pretratamiento con GW0742. **B.** 24 horas pretratamiento con GW0742. **C.** Una hora pretratamiento con WY14643. **D.** 24 horas pretratamiento con WY14643. Los datos de viabilidad fueron normalizados respecto al control. Los datos se presentan como el promedio \pm S.E.M. Se realizó ANOVA de una vía seguido por una prueba de comparaciones múltiples Tukey-Kramer, $n=3$. ** $P<0,05$, ** $P<0,01$ comparado con el tratamiento Psy 10 μ M (Martínez-Galarza, 2014).

Partiendo de los hallazgos anteriormente descritos en el modelo de EK por exposición de Psicossina en las células MO3.13 diferenciadas y del concepto de la EK como un desorden neurometabólico, en el cual se presenta pérdida de la función peroxisomal y mitocondrial (Haq et al., 2003; Haq et al., 2006; Strasberg, 1986), quizá como consecuencia de la acumulación de Psicossina, aunque los mecanismos moleculares y celulares de este evento no son claros. En este estudio también se exploró acerca del efecto de la Psicossina sobre el número de peroxisomas y mitocondrias, así como el efecto de los tratamientos y pretratamientos con el IGF1 y agonistas PPARs. Por tanto, células MO3.13 con cuatro días de diferenciación fueron expuestas a los tratamientos y pretratamientos con IGF1 100ng/ml, Rosiglitazona 1 μ M y WY14643 20 μ M y la aplicación exógena de Psicossina 10 μ M por 24 horas. El número de peroxisomas y mitocondrias por célula para cada tratamiento se determinó por inmunofluorescencia, se usó el marcador ALDP para peroxisomas y TOM20 para mitocondrias.

El análisis del número de peroxisomas por célula, señaló que el tratamiento con Psicossina no tuvo impacto en el número de peroxisomas. Adicionalmente, los tratamientos de una y 24 horas con Rosiglitazona e IGF1 aumentaron significativamente el número de los peroxisomas con respecto al control. También, se determinó que la adición de Psicossina posterior a los tratamientos de Rosiglitazona e IGF1 inhibió de manera significativa su efecto en la proliferación peroxisomal, vale la pena mencionar que solo en el pretratamiento de una hora con IGF1 y posterior adición de Psicossina se mantuvo un número elevado de peroxisomas.

Capítulo 6: Resultados enfermedad de Krabbe

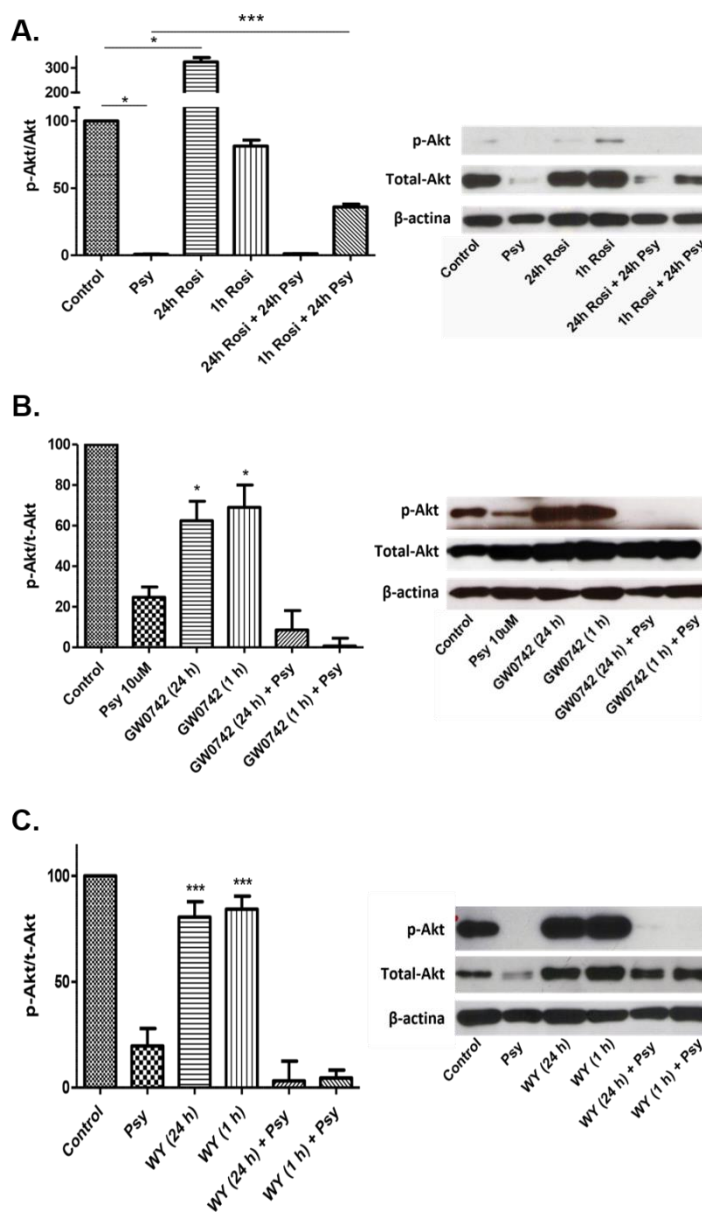


Figura 6.1.4 Efecto de agonistas PPARs sobre p-AKT (Ser 473) en células MO3.13 tratadas con Psicosina

Análisis por densitometría del efecto de los pretratamientos con agonistas PPARs sobre el nivel de p-AKT (Ser 473) en el modelo exógeno de EK (células MO3.13 diferenciadas tratadas con Psicosina 10μM por 24h). **A.** Rosiglitazone 1μM. **B.** GW0742 5μM. **C.** WY14643 20μM. Los datos fueron normalizados con respecto al control. Los datos se presentan como el promedio \pm S.E.M. Se realizó ANOVA de una vía seguido por una prueba de comparaciones múltiples Tukey-Kramer, $n=3$. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$ comparado con el tratamiento Psy 10Mm (Martínez-Galarza, 2014).

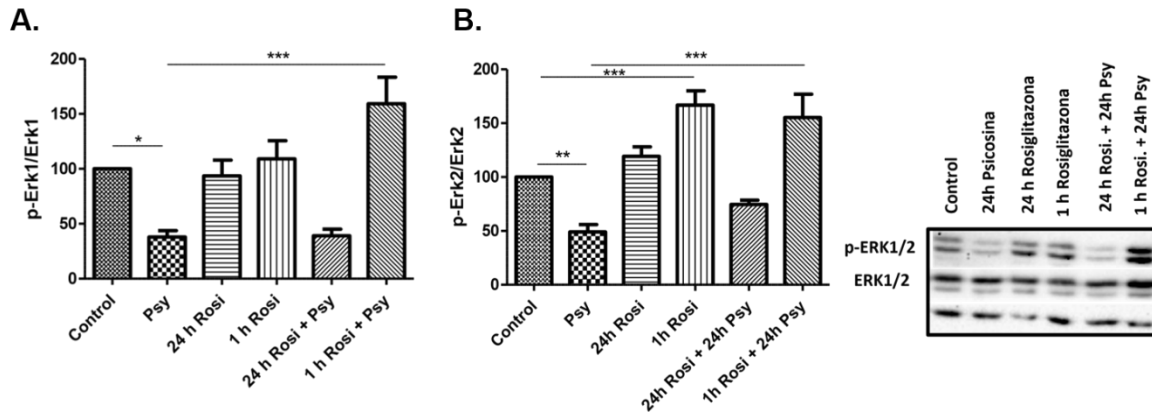


Figura 6.1.5 Efecto de la Rosiglitazona sobre p-ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204) en células MO3.13 tratadas con Psicosina

Análisis por densitometría del efecto de los pretratamientos de una y 24 horas con Rosiglitazona $1\mu\text{M}$ sobre el nivel de p-ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204) en el modelo exógeno de EK (células MO3.13 diferenciadas tratadas con Psicosina $10\mu\text{M}$ por 24h). **A.** Densitometría de p-ERK1. **B.** Densitometría de p-ERK2. Los datos fueron normalizados con respecto al control. Los datos se presentan como el promedio \pm S.E.M. Se realizó ANOVA de una vía seguido por una prueba de comparaciones múltiples Tukey-Kramer, $n=3$. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$ (Martínez-Galarza, 2014).

Capítulo 6: Resultados enfermedad de Krabbe

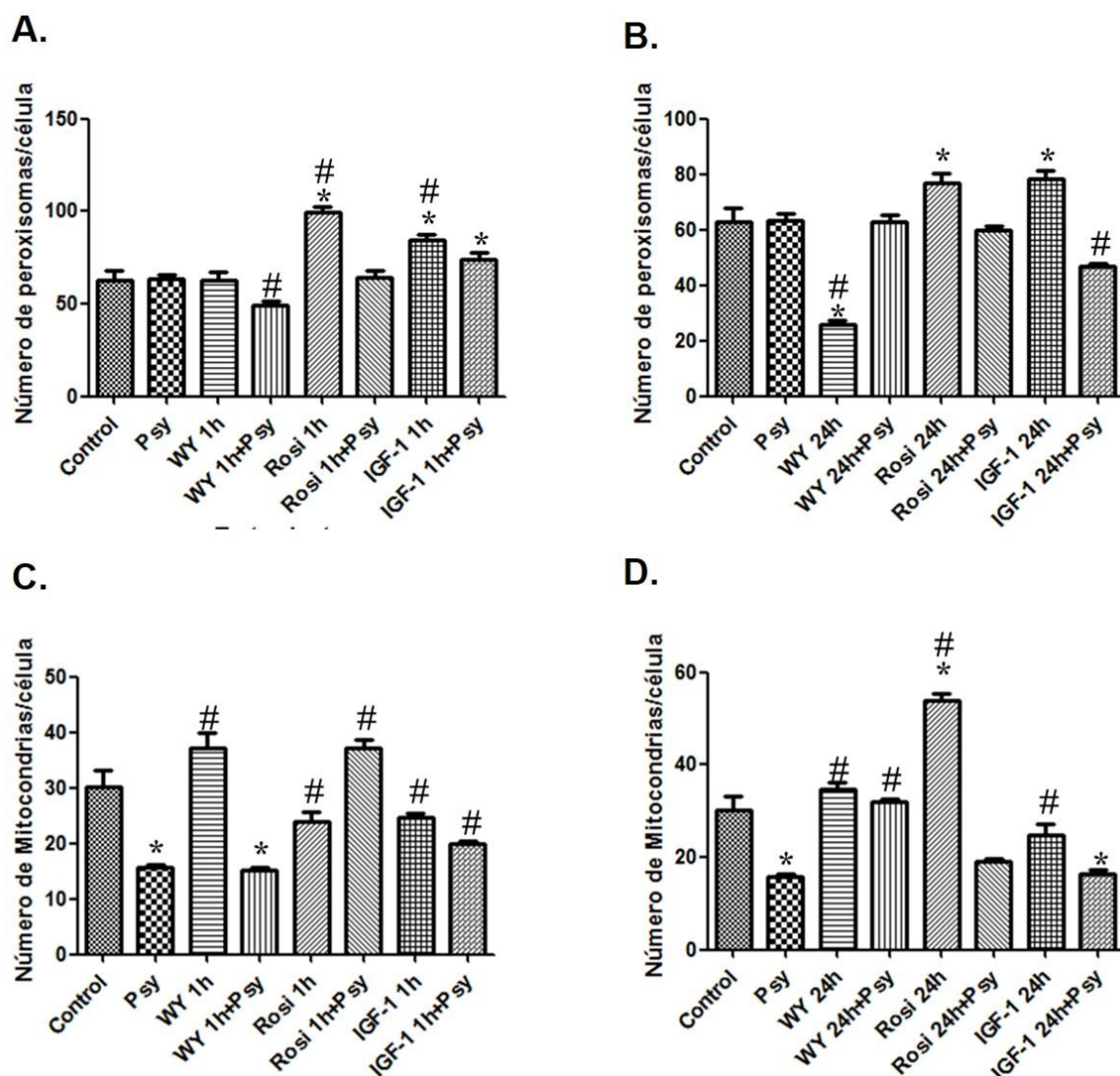


Figura 6.1.6 Efecto de IGF1 y agonistas PPARs sobre el número de peroxisomas y mitocondrias en células MO3.13 tratadas con Psicossina

Se evaluó el número de peroxisomas (marcador ALDP) y mitocondrias (marcador TOM20) por célula para cada uno de los tratamientos (Psicossina 10 μ M por 24h, WY14643 20 μ M, Rosiglitazona 1 μ M, IGF1 100ng/ml). **A.** Número de peroxisomas por célula, pretratamientos por una hora con agonistas PPARs e IGF1. **B.** Número de peroxisomas por célula, pretratamientos de 24 horas con agonistas e IGF-1. **C.** Número de mitocondrias por célula, pretratamientos por una hora con agonistas PPARs e IGF1. **D.** Número de mitocondrias por célula, pretratamientos por 24 horas con agonistas PPARs e IGF1. Los datos se analizaron por medio de una prueba Kruskal-Wallis seguido de una prueba de comparaciones múltiples Dunn. Se denota el nivel de significancia $P < 0,05$ respecto al control con * y respecto al tratamiento con Psicossina con # (Buitrago et al., 2014)

6.2 MODELO DE LA ENFERMEDAD DE KRABBE EN CÉLULAS MO3.13 POR INDUCCIÓN ENDÓGENA DE PSICOSINA

El modelo de EK por inducción endógena de Psicossina se realizó por RNA de interferencia del gen GALC, para tal propósito se usó un vector lentiviral inducible con tetraciclina, según la fisiopatología de la EK las mutaciones en el gen GALC conducen a la disfunción de la enzima GalC y consecuente acumulación de la Psicossina endógena. El análisis por western blot confirmó la regulación a la baja de la expresión de la enzima GalC posterior a la inducción con tetraciclina (Figura 6.2.1 F). Adicionalmente, se demostró que la interferencia del gen GALC aumentó el porcentaje de muerte en las células shGALC con tetraciclina y esta diferencia es altamente significativa con relación a las células shCONTROL ($***P<0,001$) y a las células shGALC sin tetraciclina ($**P<0,01$) (Figura 6.2.1 G y H). Adicionalmente, se observó al microscopio que las células shGALC inducidas con tetraciclina pierden la morfología característica de las células MO3.13 diferenciadas (Figura 6.2.1 B y D).

Posteriormente, se evaluó el efecto de la Rosiglitazona y el IGF1 en el modelo endógeno de EK (Anexo 1, Esquema 3), los resultados obtenidos con la prueba de LDH indicaron que los tratamientos con Rosiglitazona $10\mu\text{M}$ por una hora y el tratamiento con IGF1 por 24 horas protegieron a las células shGALC de la muerte conferida por la interferencia del gen GALC de manera significativa ($***P<0,001$, $*P<0,05$, respectivamente) (Figura 6.2.2 A y B). Con referencia al impacto en las vías de señalización uno de los hallazgos más contundentes fue que las células shGALC inducidas con tetraciclina no responden al tratamiento por una hora de IGF1, lo cual si ocurrió en las células shCONTROL, donde se observó la activación de AKT en respuesta al tratamiento con IGF1 por una hora. No obstante, cuando se aplicó el tratamiento combinado de IGF1 y Rosiglitazona el nivel de p-AKT incrementó de manera altamente significativa, tanto en las células shCONTROL como en las shGALC ($***P<0,001$) (Figura 6.2.2 C). Adicionalmente, se observó que

Capítulo 6: Resultados enfermedad de Krabbe

las células shGALC presentan un mayor nivel en la fosforilación de ERK1/2 con respecto a las células shCONTROL (Figura 6.1.5 D). En conclusión, los resultados obtenidos en el modelo endógeno de EK en células MO3.13 diferenciadas sugieren que la muerte celular producida por la acumulación de Psicossina impacta las vías de señalización PI3K/AKT y MAPK/ERK1/2, por tanto una estrategia de protección podría ser mediante la activación de las vías de neuroprotección mediadas por IGF1 y la regulación transcripcional de PPARs.

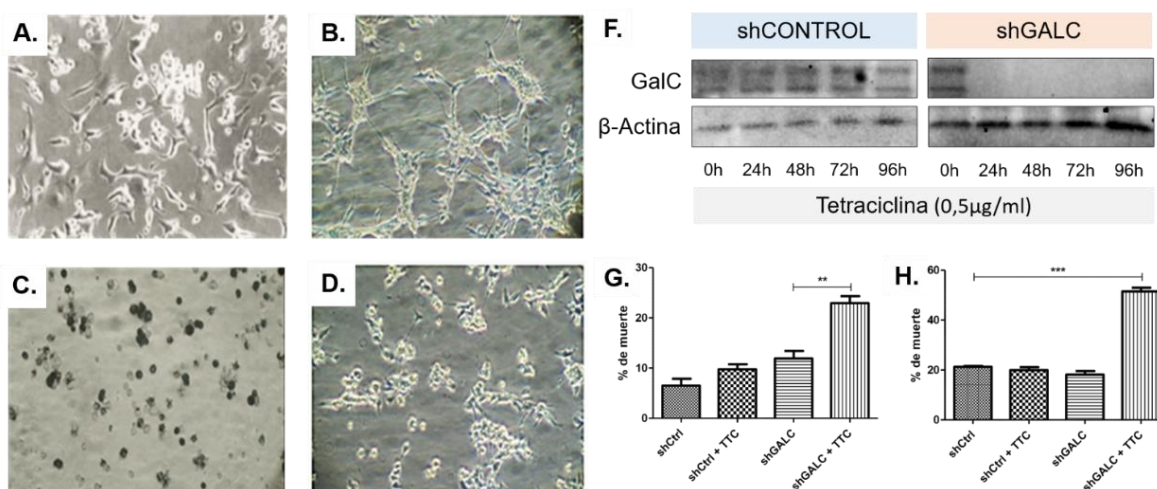


Figura 6.2.1 Modelo in vitro de la enfermedad de Krabbe por inducción de Psicossina endógena por silenciamiento del gen GALC en la línea celular MO3.13

Silenciamiento del gen GALC en células MO3.13. **A.** Células MO3.13 en crecimiento. **B.** Células MO3.13 diferenciadas. **C.** Células MO3.13 sin diferenciar después de 72h de la inducción de shGALC con tetraciclina 0,5 μ g/ml (TTC). **D.** Células MO3.13 diferenciadas después de 72h de la inducción de shGALC con TTC. **F.** Análisis por western blot de la enzima GalC (galactosilceramidasa), se demostró la regulación a la baja de la enzima GalC en las células transfectadas de manera permanente con el constructo shGALC después de la inducción con TTC. **G-H** Ensayos de LDH muestran un aumento significativo de la muerte de las células shGALC con respecto a las células shCONTROL (shCtrl) luego de la inducción con TTC de 3 días (**G**) y 7 días (**H**). Los valores fueron normalizados respecto al control de muerte y presentados como el promedio \pm S.E.M. $n=3$ ****** $P < 0,01$; ******* $P < 0,001$ (Martínez-Galarza et al., 2014).

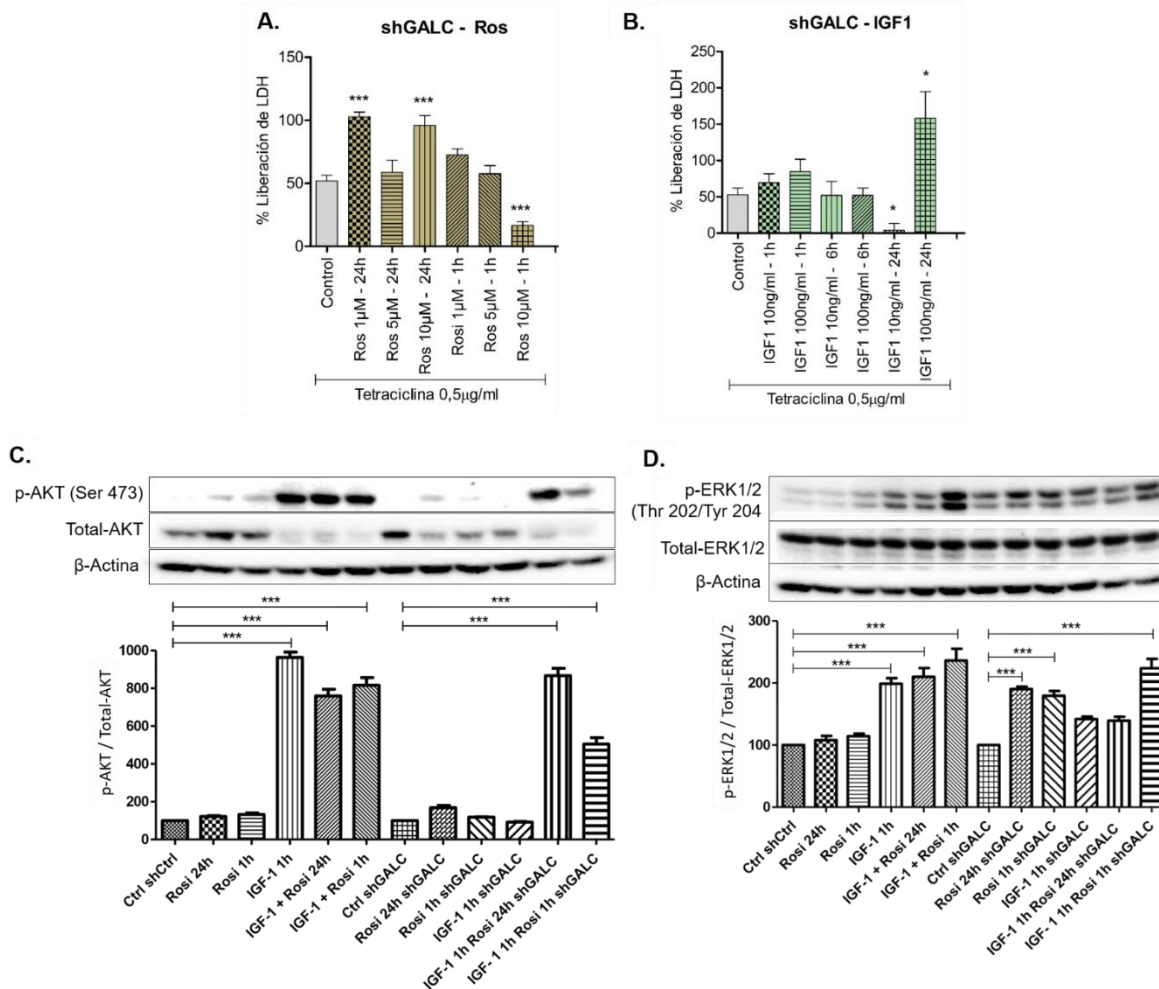


Figura 6.2.2 Efecto de la Rosiglitazona y el IGF1 en el modelo endógeno de Enfermedad de Krabbe en células MO3.13 shGALC diferenciadas

A – B. Análisis del porcentaje de liberación de LDH en células MO3.13 shGALC inducidas con tetraciclina 0,5μg/ml (TTC). Los datos fueron normalizados respecto al control de muerte. * $P < 0,05$ comparado con el control. **C – D.** Análisis por densitometría del efecto de los pretratamientos de una y 24 horas con Rosiglitazona 1μM e IGF1 sobre el nivel de p-AKT (Ser 473) y p-ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204) en el modelo endógeno de EK (células MO3.13 shGALC diferenciadas). Los datos fueron normalizados con respecto al control. **C.** Densitometría de p-AKT (Ser 473) **D.** Densitometría de p-ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204). Los datos fueron normalizados con respecto al control. Los datos se presentan como el promedio \pm S.E.M. Se realizó ANOVA de dos vías seguido por una prueba de comparaciones múltiples Bonferroni, $n=3$. *** $P < 0,001$ (Martínez-Galarza et al., 2014).

6.3 MODELO DE LA ENFERMEDAD DE KRABBE EN CULTIVOS PRIMARIOS DE OLIGODENDROCITOS POR LA APLICACIÓN EXÓGENA DE PSICOSINA

Con base en las ventajas que tienen los cultivos primarios de oligodendrocitos con relación a las líneas celulares, en esta investigación se logró trabajar con cultivos primarios enriquecidos de oligodendrocitos obtenidos a partir de cerebros de ratones un día postnatal. Inicialmente, se llevó a cabo la estandarización de los cultivos primarios de oligodendrocitos en el laboratorio del grupo de investigación de Muerte Celular del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá. De tal forma que fue posible validar los resultados encontrados en el modelo exógeno de EK establecido en la línea celular MO3.13 en los cultivos primarios de oligodendrocitos.

En la figura 6.3.1 se pueden observar varias microfotografías, las cuales demostraron que los cultivos primarios obtenidos a partir de los cerebros de ratones un día postnatal corresponden a oligodendrocitos tardíos o maduros, es decir células inmunoreactivas para marcadores de oligodendrocitos (O1 y O4) y negativas para la proteína GFAP. Además, con estas microfotografías se confirmó el éxito en el proceso de purificación de los cultivos, dado que el porcentaje de astrocitos es muy bajo, las células positivas para GFAP son casi imperceptibles.

La principal dificultad de trabajo con los cultivos primarios de oligodendrocitos radicó en el bajo rendimiento de este tipo de cultivo para obtener OPCs que posteriormente deben ser diferenciadas a oligodendrocitos tardíos o maduros (células positivas para O4 y MBP). Entonces, por una parte se obtuvieron cultivos de oligodendrocitos con un alto grado de pureza, pero con un bajo rendimiento en el número de células obtenidas después del proceso de purificación, lo cual tuvo repercusión en el número de ensayos que se realizaban en este modelo por experimento, sumado al tiempo en cultivo que los OPCs requieren para su diferenciación a oligodendrocitos maduros, aproximadamente 20 días cultivados en el medio de maduración para oligodendrocitos (Anexo 1. Protocolo).

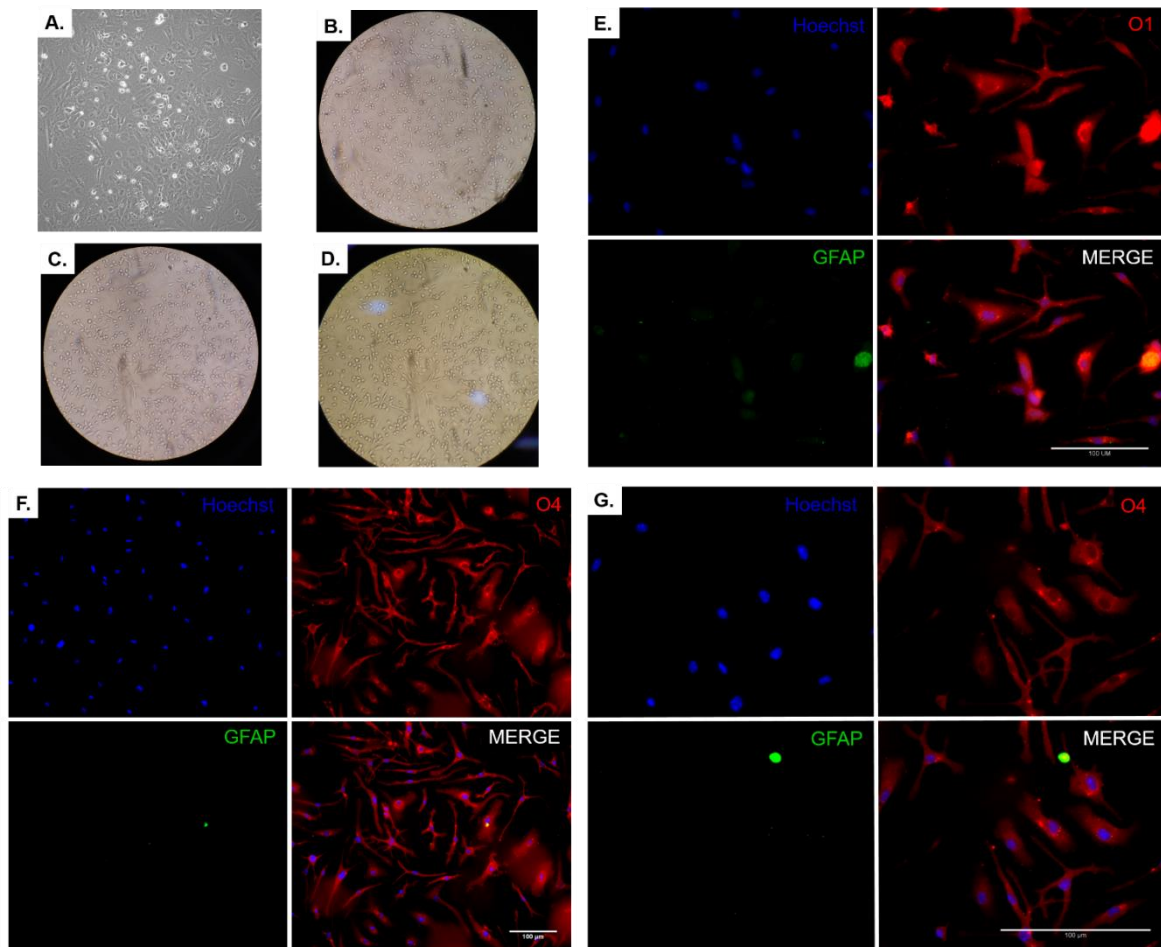


Figura 6.3.1 Cultivos primarios de oligodendrocitos derivados de cerebros de ratones un día postnatal

Microfotografías de oligodendrocitos derivados de cerebros de ratones un día postnatal. **A.** Cultivo primario mixto de cerebros de ratones un día postnatal antes de la purificación. **C– D.** Cultivo primario enriquecido con oligodendrocitos, después de la purificación. **E.** Inmunofluorescencia de O1 (rojo) y GFAP (verde). **F – G.** Inmunofluorescencia de O4 (rojo) y GFAP (verde).

Después de confirmar por inmunofluorescencia la pureza de los cultivos primarios de oligodendrocitos, se procedió a la adición de los pretratamientos de una hora con IGF1 y agonistas PPARs, seguido del pretratamiento los oligodendrocitos fueron expuestos al tratamiento de Psicossina 10 μ M por 24 horas, se usaron las mismas concentraciones y tiempos, previamente establecidos en el modelo exógeno de EK en la línea celular MO3.13 (Anexo 1, Esquema 5). Los resultados del porcentaje de

Capítulo 6: Resultados enfermedad de Krabbe

liberación de LDH (Figura 6.3.2 A) demostraron que la Psicossina causa muerte de los oligodendrocitos con un porcentaje de muerte de 65,8% comparado con un 23,4% en los oligodendrocitos control y esta diferencia es altamente significativa ($***P<0,001$).

Adicionalmente, los pretratamientos de una hora con IGF1 y Rosiglitazona lograron disminuir de manera significativa el porcentaje de muerte inducido por la Psicossina, de 65,8% a 47%. También, se demostró que el tratamiento con Psicossina disminuye el nivel de expresión de MBP ($*P<0,05$) respecto al control. Previamente, Won y colaboradores (2013) evidenciaron en células MO3.13 shGALC que la acumulación endógena de Psicossina no solo induce muerte celular en los oligodendrocitos sino que también interfiere con su proceso de diferenciación (Won et al., 2013). Adicionalmente, en este estudio se determinó que los pretratamientos de IGF1, Rosiglitazona y GW0742 lograron recuperar de manera altamente significativa el nivel de expresión de MBP (Figura 6.3.2 B y C). Los anteriores resultados sugieren que el IGF1 y los agonistas PPARs, además de tener un efecto neuroprotector frente a la muerte causada por el tratamiento de Psicossina contribuyen al proceso de maduración de los oligodendrocitos.

Ahora bien, la Psicossina impacta la vía de señalización PI3K/AKT (Figura 6.3.3). El tratamiento de Psicossina 10 μ M por 24 horas disminuyó el nivel de fosforilación del receptor IGF1 β y de AKT y los pretratamientos por una hora de IGF1 y agonistas PPARs lograron recuperar la pérdida de fosforilación del receptor IGF1 y de AKT, esto mismo ocurrió con los pretratamientos por 24 horas de IGF1 y Rosiglitazona (Figura 6.3.3 G). Con respecto a la fosforilación de ERK1/2 no se presentaron cambios significativos conferidos por la Psicossina. El pretratamiento de Rosiglitazona por 1 hora elevó los niveles de fosforilación de ERK1/2, los cuales disminuyeron después de la exposición de Psicossina ($^{\$}P<0,05$) (Figura 6.3.3 E y F). También se demostró que la Psicossina no afecta la fosforilación del receptor beta de insulina (IR β), los tratamientos de IGF1 por 24 horas y Rosiglitazona por una

hora activan el IR β por fosforilación en las tirosinas 1162 y 1163, y la activación de IR β se mantuvo después del tratamiento con Psicosisina (Figura 6.3.3 H).

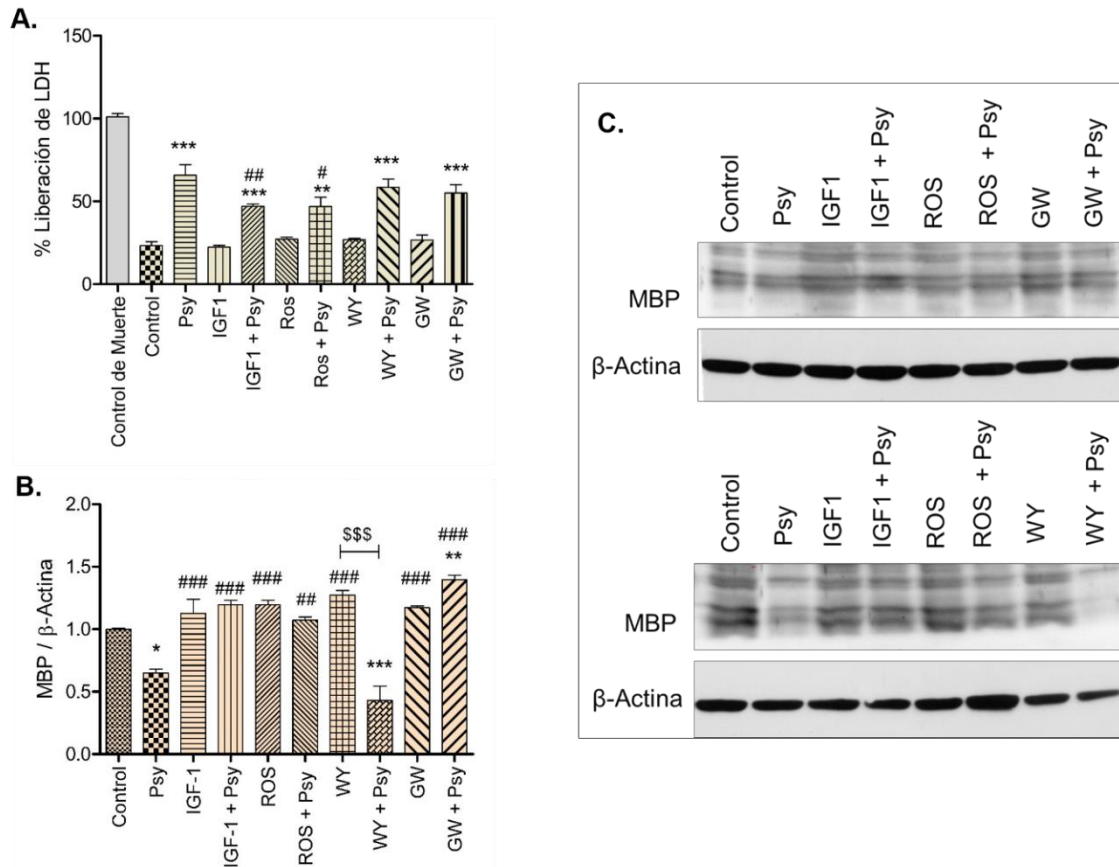


Figura 6.3.2 Efecto del IGF1 y agonistas PPARs sobre la viabilidad y expresión de MBP en oligodendrocitos tratados con Psicosisina

A. Porcentaje de liberación de LDH en cultivos primarios de oligodendrocitos tratados con Psicosisina 10 μ M por 24 horas, pretratamientos por una hora de IGF1 (100ng/ml), Rosiglitazona (1 μ M), WY14643 (20 μ M), y GW0742 (5 μ M). Los datos fueron normalizados respecto al control de muerte. **B.** Análisis por densitometría de la proteína MBP (marcador de oligodendrocitos maduros), se usó como control de carga la proteína β -Actina. Los datos fueron normalizados respecto al control. **C.** Western blot representativo de la expresión de la proteína MBP de por lo menos tres experimentos independientes. En las figuras A y B, los datos se presentan como el promedio \pm S.E.M. Se realizó ANOVA de una vía seguido por una prueba de comparaciones múltiples Tukey-Kramer, $n=3$. *** $P<0,001$, ** $P<0,01$, * $P<0,05$ comparado con el control del experimento. ### $P<0,001$, ## $P<0,01$, # $P<0,05$ comparado con el tratamiento de Psicosisina 10 μ M por 24 horas. \$\$\$ $P<0,001$.

Capítulo 6: Resultados enfermedad de Krabbe

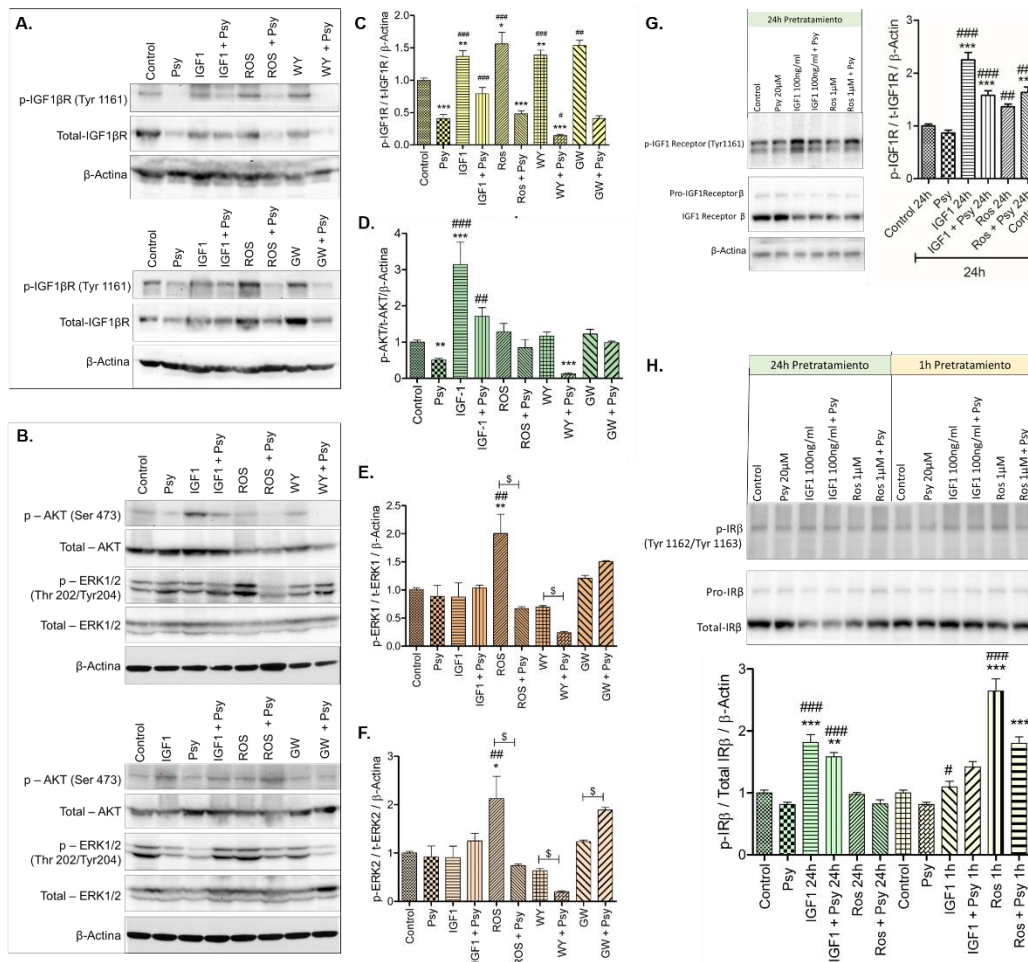


Figura 6.3.3 Efecto del IGF1 y agonistas PPARs en la activación de las vías PI3K/AKT y MAPK/ERK1/2 en oligodendrocitos expuestos a Psicosisina

Western blot representativo de por lo menos tres experimentos representativos del efecto de IGF1 y agonistas PPARs sobre IGF1 β R, AKT y ERK1/2. Psicosisina: 10 μ M por 24h y pretratamientos por una hora con IGF1: 100ng/ml, Rosiglitazona: 1 μ M, WY14643: 20 μ M y GW0742: 5 μ M. Western blot de p-IGF1 β R (Tyr 1161), t-IGF1 β R y β -Actina. **B.** Western blot de p-AKT (Ser 473), t-AKT, p-ERK1/2 (Thr 202/Tyr204), t-ERK1/2 y β -Actina. **C - F.** Análisis por densitometría, los datos fueron normalizados respecto al control y se usó como control de carga β -Actina. **C.** p-IGF1 β R. **D.** p-AKT. **E.** p-ERK1. **F.** p-ERK2. **G.** Pretratamiento de 24 horas, p-IGF1R. **H.** Pretratamientos de 1 y 24 horas, Receptor de insulina beta (IR β). Los datos se presentan como el promedio \pm S.E.M. Se realizó ANOVA de una vía seguido por una prueba de comparaciones múltiples Tukey-Kramer, n=3. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 respecto al control. #P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 respecto al tratamiento con Psicosisina 20 μ M por 24 horas. \$\$\$P<0,05.

Finalmente, se concluyó que la acumulación de Psicosisina, tanto en el modelo exógeno por adición de Psicosisina 10 μ M por 24 horas como en el modelo endógeno por interferencia del gen GALC, impacta sobre la viabilidad de los oligodendrocitos, inhibe la activación de la vía de señalización PI3K/AKT e interfiere con el proceso de maduración de los oligodendrocitos. Asimismo, los pretratamientos con IGF1 y agonistas PPARs contribuyen a mitigar el efecto neurotóxico conferido por el tratamiento exógeno de Psicosisina o la interferencia del gen GALC en oligodendrocitos.

7. CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN

7.1 ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AL CROMOSOMA X

Para el caso del modelo de ALD-X, se logró interferir el gen ABCD1 en la línea celular MO3.13 y se obtuvo una regulación a la baja del 70% de la expresión de ALDP con relación a las células shCONTROL. Las células shABCD1 presentan menor viabilidad que las células shCONTROL durante el proceso de diferenciación. Esto se correlaciona con el estudio de Singh y colaboradores (2013) en células B12 (línea celular de oligodendrocitos de rata), en el cual los oligodendrocitos con RNA interferencia del gen ABCD1 presentan mayor muerte celular, incluso sin la adición de VLCFA (Singh et al., 2013). Ahora bien, un estudio realizado por Hein y colaboradores (2008), en el cual usaron cultivos primarios de oligodendrocitos, astrocitos y neuronas derivados de cerebros de ratas expuestos a diferentes concentraciones de VLCFA, evidencio que los oligodendrocitos junto con los astrocitos son las células más susceptibles al efecto tóxico de los VLCFA. De igual manera, demuestran que los VLCFA inducen despolarización de las mitocondrias e incremento del calcio intracelular en oligodendrocitos, astrocitos y neuronas (Hein et al., 2008). De acuerdo a la evidencia de otros estudios, se podría sugerir que la pérdida en la viabilidad en las células MO3.13 shABCD1 podría relacionarse con el efecto neurotóxico de la acumulación de VLCFA como consecuencia de la deficiencia en la expresión del transportador peroxisomal Abcd1.

De acuerdo al análisis de las vías de señalización, las células MO3.13 shABCD1 presentan incremento de p-AKT (Ser 473) y disminución de p-ERK1 (Thr 202), lo cual no se correlacionó con los datos de viabilidad. Por otra parte, las células shABCD1 no presentan diferencias significativas en los niveles de p-ERK2 (Tyr 204), respecto a las células shCONTROL. Los resultados de esta investigación son contradictorios según lo reportado por Singh y colaboradores (2013), quienes

describen disminución de p-AKT y p-ERK1/2 e incremento de p-JNK en su modelo de células B12 deficientes de ABCD1 (Singh et al., 2013).

La diferencia de estos resultados contradictorios con relación a p-AKT y p-ERK, no pueden ser atribuidos al modelo celular, dado que en los experimentos realizados con las células B12 en este trabajo, también se encontró un incremento altamente significativo del nivel de p-AKT (Ser 473) con relación a las células B12. Por tanto, se sugiere que la diferencia podría relacionarse con el nivel de interferencia de la proteína ALDP en los experimentos. En el modelo MO3.13 shABCD1 el nivel de ALDP oscilaba entre el 30 – 50 % de deficiencia de la proteína ALDP en comparación con las células shCONTROL, asimismo, ocurrió en las células B12.

En el modelo de células MO3.13 shABCD1, también se observó por la técnica de western blot pérdida en la expresión del receptor IGF1 total y fosforilado, y de forma drástica mTOR, según Qin y colaboradores (2011) la hiperactivación de AKT regula a la baja el nivel transcripcional del receptor IGF1 y esta regulación es independiente de mTOR (Qin et al., 2011). Por tanto, se estudió la expresión del receptor IGF1 β de las formas total y fosforilada por inmunofluorescencia en las células MO3.13 shCONTROL y shABCD1 y no se encontraron diferencias significativas en la forma total del receptor. Con respecto al receptor p-IGF1 β (Tyr 1161) se halló que está más agregado en las células MO3.13 shABCD1 que en las células shCONTROL, adicionalmente, en las células shABCD1 sí hay respuesta al tratamiento con IGF1 100ng/ml por 24 horas, incluso se presentó una diferencia altamente significativa entre la intensidad de fluorescencia del p-IGF1 β R (Tyr1161) en las células MO3.13 shCONTROL y MO3.13 sh ABCD1 después del tratamiento con IGF1, asimismo, el receptor p-IGF1 en respuesta al tratamiento IGF1 se observó mucho más agregado que en las células shABCD1. Lo cual nos sugiere que la alteración observada en esta vía de señalización podría estar determinada por la dinámica del receptor y su distribución en las membranas; ya que existe evidencia que la disfunción o déficit del transportador peroxisomal ABCD1 se relaciona directamente con la acumulación de VLCFA, los cuales se acumulan en el citoplasma y en las membranas celulares

Capítulo 7: Discusión

y de esta manera impactan la homeostasis celular y la función mitocondrial (Baarine et al., 2012b; Baarine et al., 2014; Fourcade et al., 2014; Ho et al., 1995; Lopez-Erauskin et al., 2012; Lopez-Erauskin et al., 2013).

Los anteriores resultados, hiperactivación de AKT en células MO3.13 shABCD1, también fueron validados en las células B12 y en los oligodendrocitos diferenciados obtenidos a partir de iPSCs derivadas de pacientes con ALD-X, en los cuales también se encontró hiperactivación de AKT y respuesta al tratamiento con IGF1 por 15 o 30min por incremento del nivel de p-AKT (Ser 473). Además, cuando se inhibe PI3K con Wortmanin la activación de AKT se pierde, tanto en oligodendrocitos CONTROL y ALD-X. Igualmente, el nivel basal de fosforilación de AKT (Ser 473) es mayor en los oligodendrocitos cALD y su activación por fosforilación en la serina 473 frente a IGF1 es mayor en comparación con los oligodendrocitos CONTROL. Estos hallazgos, sugieren que la respuesta potenciada del receptor IGF1 β a través de la fosforilación de AKT (Ser 473) frente al tratamiento con IGF1 en oligodendrocitos deficientes de la proteína ALDP podría ser consecuencia de una respuesta compensatoria frente a la disfunción de ALDP y la posible acumulación de VLCFA.

Existe evidencia que los oligodendrocitos disfuncionales sobreexpresan el receptor IGF1 como mecanismo compensatorio frente a un daño (Komoly et al., 1992). Asimismo, el receptor IGF1 tiene un papel importante en el proceso de remielinización y en la prevención de lesiones desmielinizantes crónicas (Mason et al., 2003), por tanto se podría especular que la respuesta potenciada de la vía IGF1R/PI3K/AKT en los oligodendrocitos ALD-X es una señal compensatoria frente a la regulación a la baja no solo de ALDP sino de CNPase y MBP. Por tanto, la potenciación de esta vía en este contexto celular de acumulación de VLCFAs no está relacionada con protección a nivel de supervivencia, sino que se presenta como un mecanismo compensatorio frente a la pérdida de marcadores de maduración (MBP y CNPase) y a la disfunción peroxisomal y mitocondrial.

Los oligodendrocitos ALD-X y las células shABCD1 tienden a expresar menores niveles de CNPase y MBP con relación a los controles, lo cual indica que el déficit de ALDP puede impactar en el proceso de diferenciación, maduración y formación de la mielina. Según Ho y colaboradores (1995), los oligodendrocitos presentan mayor grado de asociación con VLCFA debido a la composición de su membrana (Ho et al., 1995). Por tanto, el inicio de la pérdida de la mielina en el cerebro podría estar relacionada con la cantidad de VLCFA en complejos lipídicos, como fosfatidilcolina, sulfátidos o gangliósidos, esta asociación ha sido evidenciada en vesículas artificiales de lípidos. Adicionalmente, estudios de biofísica muestran que la tasa de desorción de las membranas biológicas disminuye exponencialmente con el incremento de la longitud de los ácidos grasos, por ejemplo, la tasa de desorción de C26:0 en un modelo de membrana fosfolipídica es 100.000 menor que en el de una membrana que contiene C:16 y C:18. También, estudios microcalorimétricos indican que la inclusión de C:26 en un modelo de membrana causa disrupción de su estructura (revisado en Kemp and Wanders, 2010). A partir de esto es posible relacionar el efecto de la acumulación de VLCFA en la estructura de las membranas biológicas y todas sus posibles implicaciones a nivel de señalización celular relacionadas con sobrevivencia, proliferación, metabolismo, diferenciación y maduración en oligodendrocitos.

Por otra parte, varios autores han relacionado la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR con el proceso de mielinización, por ejemplo, Flores y colaboradores (2008) determinaron que AKT constitutivamente activo en oligodendrocitos induce hipermielinización (Flores et al., 2008), y mTOR es mediador crucial de la vía PI3K/AKT (Narayanan et al., 2009). Igualmente, experimentos usando Rapamicina (inhibidor de mTORC1 y parcial de mTORC2) sugieren que mTOR regula la diferenciación celular (Norrmen and Suter, 2013; Wood et al., 2013). Recientemente, Wahl y colaboradores (2014) demostraron que mTOR promueve la diferenciación de oligodendrocitos (Wahl et al., 2014) y Lebrun-Julien y colaboradores (2014) encontraron que la sobreactivación de mTORC1 (raptor), por ablación de TSC1, causa hipomielinización caracterizada por

Capítulo 7: Discusión

la regulación a la baja de AKT (Lebrun-Julien et al., 2014). Asimismo, se ha evidenciado que la pérdida de mTORC1 en oligodendrocitos resulta en desmielinización diferencial en áreas específicas del SNC (Bercury et al., 2014). De igual manera, Zou y colaboradores (2014) concluyeron que la actividad de mTORC1 (raptor) mediada por Rheb1 es crítica para la diferenciación de OPCs a oligodendrocitos maduros, pero que los oligodendrocitos maduros no requieren de Rheb1 para la producción y mantenimiento de la mielina en el cerebro adulto (Zou et al., 2014). Por otra parte, mTOR es un regulador negativo de la autofagia, y Launay y colaboradores (2014) demostraron que el flujo autofágico se encuentra disminuido en modelos *in vitro* e *in vivo* de ALD-X, lo cual relacionan con la activación de la vía mTOR (Launay et al., 2013; Launay et al., 2015).

Un hallazgo interesante en nuestros modelos de ALD-X es la deficiencia en p-AMPK α/β . Recientemente, se ha reportado la pérdida de AMPK α 1 en células derivadas de pacientes con ALD-X, (Singh et al., 2015) y en materia blanca de un cerebro *post-mortem* de un paciente con fenotipo de ALD-X (Singh et al., 2016). Adicionalmente, la deficiencia de AMPK α 1 en cultivos primarios de fibroblastos derivados de pacientes con ALD-X se relaciona con disfunción mitocondrial (Singh et al., 2015), dado que AMPK α 1 regula la biogénesis mitocondrial a través de PGC1 α (Fernandez-Marcos and Auwerx, 2011; Scarpulla, 2011). Los hallazgos de Singh y colaboradores (2015, 2016) coinciden con los resultados de esta investigación, en los cuales, también se encontró pérdida del potencial de membrana mitocondrial en los oligodendrocitos ALD-X y fragmentación de la red mitocondrial en los oligodendrocitos AMN. Por consiguiente, la activación de AMPK y PGC1 α podrían ser estrategias acertadas en el manejo terapéutico de los pacientes con ALD-X. Por ejemplo, el tratamiento con Metformina en cultivos primarios de fibroblastos derivados de pacientes con ALD-X incrementa la activación de AMPK α , recupera la función mitocondrial de las células, regula a la alta la expresión de Abcd2 y disminuye la inflamación (Singh et al., 2016), así mismo se ha visto un efecto neuroprotector del tratamiento con Metformina en un modelo murino de esclerosis múltiple, donde el tratamiento con Metformina es capaz de

disminuir los efectos deletéreos de la cuprizona por disminución del estrés oxidativo, incremento de enzimas antioxidantes y regulación a la alta de genes involucrados en la biogénesis mitocondrial (Largani et al., 2019).

Por otra parte, AMPK tiene impacto sobre la epigenética y los procesos de acetilación de histonas que regulan la arquitectura de la cromatina, la replicación del ADN y la transcripción de genes (Salminen et al., 2016). Además, de manera específica en el contexto de cáncer, se ha descubierto que AMPK es capaz de fosforilar a AceCS2 en la serina 659 y la fosforilación de AceCS2 favorece su translocación al núcleo. Una vez AceCS2 se encuentra en el núcleo puede usar el acetato generado de la deacetilación para producir localmente Acetil-CoA y así contribuir a la acetilación de la histona 3 y la transcripción de genes relacionados con biogénesis lisosomal, autofagia y procesos tumorales (Li et al., 2017). Los resultados de este estudio demostraron deficiencia en la acetilación de la histona 3 y de los residuos de lisina en oligodendrocitos derivados de pacientes con AMN y cALD, así mismo, se observó que el tratamiento con SAHA es capaz de incrementar recuperar el nivel de acetilación en los oligodendrocitos AMN y cALD.

Para finalizar, con base en los hallazgos de este estudio, se podrían sugerir varias alternativas terapéuticas que vayan dirigidas a la activación de la vía de supervivencia y diferenciación IGF1R/PI3K/AKT/mTOR, la activación de AMPK, la activación de la acetilación de histonas, la inducción de la proliferación peroxisomal o la biogénesis mitocondrial, entre otras. A continuación se propone un modelo de los mecanismos celulares dilucidados en esta investigación y que permiten una aproximación al entendimiento de lo que ocurre en los oligodendrocitos deficientes de ALDP.

7.2 MODELO SUGERIDO PARA LA ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AL CROMOSOMA X

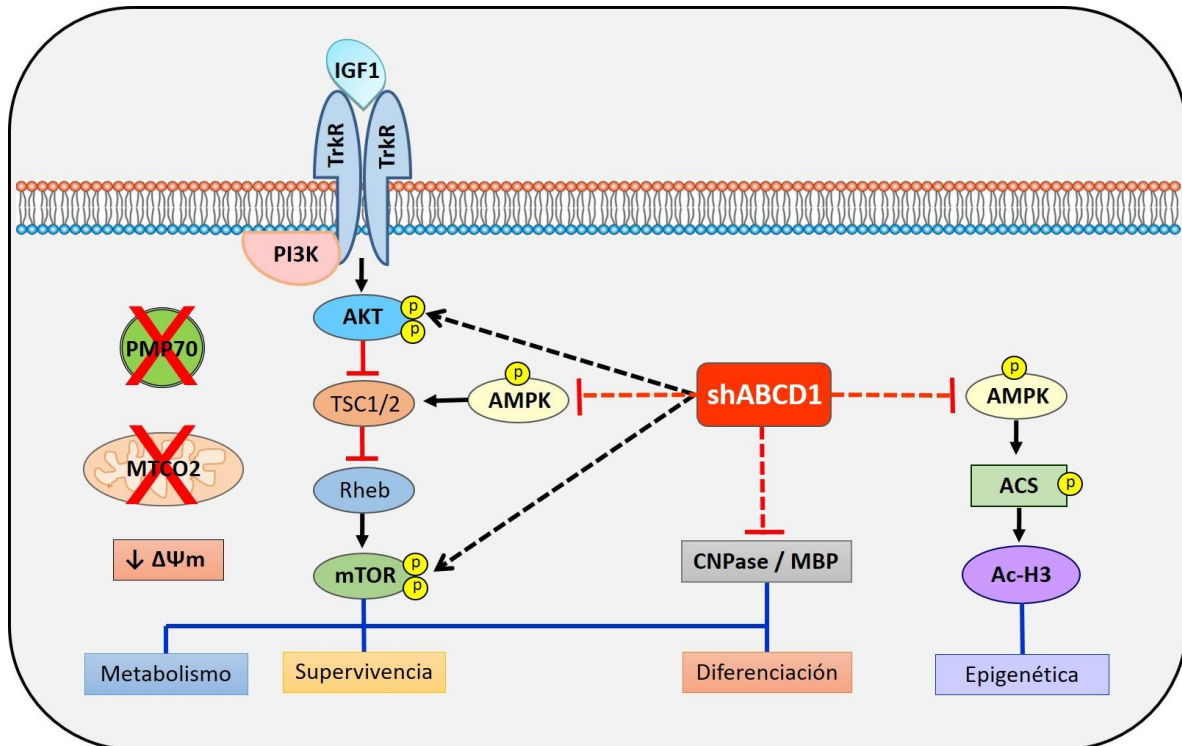


Figura 7.1 Modelo propuesto para la adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X

Los oligodendrocitos con deficiencia de la proteína ALDP (*shABCD1*) presentan alteraciones a nivel de las vías de señalización PI3K/AKT y AMPK/mTOR, lo cual se relaciona con la susceptibilidad de los oligodendrocitos durante el proceso de diferenciación, así como retardo en su proceso de maduración y disfunción peroxisomal y mitocondrial. La activación de la vía PI3K/AKT/mTOR se propone como un mecanismo compensatorio de los oligodendrocitos frente a la deficiencia de la proteína ALDP (contexto de acumulación de ácidos grasos de cadena muy larga). Adicionalmente, la deficiencia de AMPK en oligodendrocitos ALD-X se relacionó con la disminución de la acetilación de la histona 3 y de la acetilación de residuos de lisina. Las interacciones de activación se denotan con flechas negras y las interacciones inhibitorias se denotan con flechas rojas.

7.3 ENFERMEDAD DE KRABBE

Para el caso de la EK, se pudo determinar la dosis letal media de Psicossina necesaria para la muerte de las células MO3.13 diferenciadas (10 μ M por 24 horas) en el modelo exógeno y el tiempo necesario (24 horas) después de la inducción con tetraciclina para reducir en un 50 % la viabilidad celular en el modelo endógeno de EK, células MO3.13 shGALC (Martínez-Galarza et al., 2014; Martínez-Galarza, 2014). La exposición de Psicossina (10 μ M por 24 horas) en las células MO3.13 diferenciadas y en los cultivos primarios de oligodendrocitos, así como la interferencia del gen GALC en las células MO3.13 causa muerte celular de los oligodendrocitos y esto se correlaciona con la inhibición de la vía de supervivencia PI3K/AKT. Ahora bien, los mecanismos que inducen la muerte celular evidenciada por diferentes ensayos de viabilidad y supervivencia celular (LDH, MTT y WST-1), no están del todo esclarecidos. Otros investigadores han propuesto que la muerte celular conferida por la acumulación de Psicossina puede estar asociada a la alteración de la arquitectura membranal de las células, la cual podría generar un desacople de diferentes vías de señalización celular desencadenando muerte celular por apoptosis (Formichi et al., 2007; Hawkins-Salsbury et al., 2013).

En los modelos de EK, solo los pretratamientos con IGF1 y Rosiglitazona (agonista de PPAR- γ) lograron proteger a las células MO3.13 diferenciadas y oligodendrocitos maduros derivados de cerebros de ratones de la muerte causada por el tratamiento de Psicossina. Estos resultados están de acuerdo con el papel protector evidenciado por la Rosiglitazona y el IGF1 en varios modelos de neurodegeneración (Al and El, 2014; Benarroch, 2012; Pisanu et al., 2014; Shao and Liu, 2015). No obstante, se pudo establecer una clara correspondencia entre el aumento en la supervivencia celular y los niveles de fosforilación del receptor IGF1 β (Tyr 1161) y AKT (Ser 473), lo cual sugiere la activación de la vía de señalización PI3K/AKT como un posible mecanismo neuroprotector frente a la muerte causada por la exposición de Psicossina, la interferencia del gen GALC y la regulación a la baja de la enzima GalC en oligodendrocitos.

Capítulo 7: Discusión

Aunque, se desconoce el mecanismo por el cual la Rosiglitazona activa las vías de señalización PI3K/AKT y MAPK/ERK. Con base en los resultados obtenidos en esta investigación se propone como un posible mecanismo de retroalimentación positivo inducido por los genes blanco de PPAR- γ , lo cual podría conducir a la activación de receptores de factores de crecimiento a nivel de la membrana plasmática, lo que conduce a la fosforilación de los intermediarios corriente arriba de AKT y ERK1/2. Además, en cultivos primarios de oligodendrocitos se demostró que que los tratamientos por 1 y 24 horas con Rosiglitazona activan el receptor de insulina por fosforilación. Entonces, otro posible mecanismo que podría explicar la activación del receptor IGF1 por Rosiglitazona es a través de la activación del receptor de insulina, dado que existe evidencia que el receptor IGF1 se puede heterodimerizar con el receptor de insulina (Moxham et al., 1989; Treadway et al., 1989)

En 2007, Pang y colaboradores, demostraron que el IGF1 protege a las OPCs contra el daño producido por TNF- α mediante la activación de las vías PI3K/AKT, y la interrupción de la vía apoptótica mitocondrial (Pang et al., 2007). En adición, Bibollet-Bahena y Almazan, en 2009 mostraron que la síntesis de proteínas necesaria para la diferenciación de los oligodendrocitos era mediada por IGF1 a través de las vías PI3K/AKT y ERK (Bibollet-Bahena et al., 2009; Bibollet-Bahena and Almazan, 2009), también las tirosinas cinasas del tipo Src se incluyen como mediadores en la diferenciación de los oligodendrocitos a través de IGF1 (Cui and Almazan, 2007).

Respecto al efecto de la Rosiglitazona sobre la activación de AKT, este fue mucho más evidente en el pretratamiento de 24 horas que en el de una hora, donde se observó un insignificante aumento de p-AKT. Estudios previos han demostrado que la activación de PPAR- γ puede alterar directamente los niveles de fosforilación de AKT (Sun et al., 2014), pero más interesante resultan los estudios en los cuales se evidencia una activación directa de la vía PI3K/AKT por parte de los PPARs y que esto puede disminuir la apoptosis en diferentes tipos celulares (Huang et al.,

2011;Kilter et al., 2009). Sin embargo, la elevación observada en los niveles de p-AKT no necesariamente coincide con el aumento en la viabilidad celular. Esta observación puede sugerir que existen mecanismos diferentes por los cuales la Rosiglitazona podría estar ejerciendo esta función, por ejemplo la reducción del estrés oxidativo, la modulación de los mecanismo inflamatorios que están elevados en EK o, incluso, existe la posibilidad de que la Rosiglitazona ejerza un efecto independiente de la activación de PPAR- γ y actúe sobre otros blancos moleculares, por ejemplo la vía MAPKs; ya hay evidencia de que los agonistas PPAR- γ pueden mediar directamente la activación de ERK en adipocitos (Kim et al., 2009) y posiblemente en células MO3.13. Adicionalmente, en cultivos primarios de oligodendrocitos se demostró que el tratamiento con Rosiglitazona por 24 activa el receptor de insulina por fosforilación en las tirosinas 1162 y 1163.

Por otro lado, los resultados de los tratamientos con IGF1 muestran, en conjunto, que hay un aumento significativo del nivel de p-AKT. En principio, la aplicación de IGF1 puede actuar directamente activando ambas vías de supervivencia y proliferación, PI3K/AKT y Raf/MEK/ERK, lo que conduce a un aumento en los niveles de fosforilación tanto de AKT como de ERK1/2, lo que concuerda con nuestros resultados. Por otra parte, las células shGALC no presentan activación de AKT cuando son tratadas con IGF1 por una hora. En estas células, solo se encontró aumento de la fosforilación de AKT y ERK con el tratamiento sinérgico de IGF1 y Rosiglitazona, por lo cual se plantea que el efecto de la acumulación de la Psicossina altera el acoplamiento y funcionamiento de estas vías por alteración de la membrana celular, y que la aplicación exógena de estos fármacos podría tener un efecto restaurador.

Ahora bien, la validación de los anteriores hallazgos en cultivos primarios enriquecidos de oligodendrocitos sugieren que el tratamiento con Psicossina interfiere en la fosforilación del receptor IGF1, por tanto nosotros sugerimos que la alteración en la vía IGF1R/PI3K/AKT en el modelo exógeno de EK posiblemente sea una consecuencia de la disfunción en la fosforilación del receptor IGF1, lo cual

Capítulo 7: Discusión

podría ser una consecuencia de la acumulación de la Psicosina en la membrana celular que no permite la activación del receptor IGF1 por parte de su ligando (IGF1). Por otra parte, en cultivos primarios enriquecidos con oligodendrocitos se demostró que el receptor de insulina (IR) responde al tratamiento de IGF1 por 24 horas, mientras que con el tratamiento de una hora no se presenta activación por fosforilación de este. Lo anterior, es importante para entender la cinética y regulación de los receptores frente al tratamiento con IGF1 y esclarecer porque los pretratamientos con IGF1 por una o 24 horas son capaces de proteger a las células de la acumulación de Psicosina.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que la Psicosina no disminuye de manera significativa el número de peroxisomas, por ejemplo, estudios utilizando tratamientos de Psicosina en células gliales C6 muestran disminución de las proteínas peroxisomales (acyl-CoA oxidasa para β -oxidación de ácidos grasos y DHAP-sintasa para la síntesis de plasmalógenos) (Khan et al., 2005) y regulación a la baja de la actividad transcripcional de PPAR- α (Haq et al., 2006), un factor de transcripción involucrado en la expresión de proteínas peroxisomales, pero no se ha comprobado la disminución del número de estos organelos en oligodendrocitos en el contexto de acumulación de Psicosina.

Además, la Psicosina sí disminuyó el número de mitocondrias, lo cual se puede explicar como un evento secundario a la activación de las caspasas 3 y 9 (Zaka and Wenger, 2004), activación de la maquinaria de fisión mitocondrial asociado a muerte celular (Lee et al., 2004) y mitofagia, proceso destinado a la eliminación de mitocondrias que son disfuncionales (Zhang, 2013; Zhang and Ney, 2010), lo cual se podría considerar como una estrategia de protección para mitigar la liberación del citocromo c e inhibir la muerte celular por apoptosis. Por su parte, Strasberg (1986) demostró en ensayos *in vitro* que los cerebrósidos y la Psicosina causan disfunción mitocondrial (Strasberg, 1986). Por otra parte, Oezen y colaboradores (2005), usando como modelo cultivos primarios de fibroblastos derivados de ratones deficientes de ALDP, reportaron que la acumulación de ácidos grasos de cadena

muy larga no causa disfunción mitocondrial (Oezen et al., 2005); pero no se descarta que la acumulación de ácidos grasos de cadena muy larga tenga efecto en la función mitocondrial en tejidos y células específicas.

Asimismo, se ha demostrado en diferentes modelos que los tratamientos con agonistas PPARs regulan positivamente los niveles de las proteínas PGC1 α y PGC1 β (PPAR-coactivator-1) (Hondares et al., 2006; Shao et al., 2010), las cuales regulan la biogénesis mitocondrial en diferentes tejidos, incluyendo adipocitos pardos, blancos y neuronas (Rohas et al., 2007; Spiegelman, 2007). Lo anterior concuerda con el aumento de mitocondrias, observado en los pretratamientos con Rosiglitazona por 24 horas y WY14643 una y 24 horas. En el pretratamiento con Rosiglitazona por una hora no se observó aumento del número mitocondrial porque según un estudio realizado por Rong y colaboradores, en 2011, en células 3T3-L1 y adipocitos C3H/10T1/2, se requiere de 2 horas de tratamiento con Rosiglitazona para regular a la alta PGC-1 β , seguido del incremento de la maquinaria de biosíntesis, a las siete horas de tratamiento y luego un incremento de los componentes funcionales de este organelo hacia las 24 horas de tratamiento (Rong et al., 2007).

Un resultado, nunca antes reportado, asociado al tratamiento con Psicossina en las células MO3.13 fue el cambio de la apariencia de los núcleos, lo cual valdría explorar con mayor detalle, ya que se ha descrito que las alteraciones en la estructura de membrana nuclear tienen impacto en varios procesos celulares, por ejemplo, migración celular, diferenciación, nucleofagia, reprogramación celular, entre otras (Davidson et al., 2014; Mijaljica et al., 2010; Tokunaga et al., 2014; Yoshimura et al., 2014).

Finalmente, el efecto de la acumulación de Psicossina induce muerte celular en los modelos de EK en células MO3.13 y cultivos primarios de oligodendrocitos. Además, la Psicossina impacta sobre las vías de señalización celular, IGF1R/PI3K/AKT y MAPK/ERK1-2. Adicionalmente, se ha descrito que la unión de factores de crecimiento, tales como el IGF1, el EGF, el PDGF, el BDNF, entre otros,

Capítulo 7: Discusión

son importantes para los procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia en células precursoras de oligodendrocitos. Y las vías PI3K/AKT y MAPK/ERK son activadas principalmente por factores de crecimiento asociados a receptores tirosina cinasa (Pearson et al., 2001). Y en este estudio se evidenció que pretratamientos con IGF1 y Rosiglitazona tienen un efecto protector en la sobrevivencia, metabolismo y diferenciación celular frente al efecto neurotóxico de la Psicosis, por tanto se sugiere la búsqueda de blancos terapéuticos enfocados en la activación de las vías de supervivencia y diferenciación celular IGF1R/PI3K/AKT/mTOR y MAPK/ERK1-2 como posibles tratamientos terapéuticos en la EK

7.4 MODELO SUGERIDO PARA LA ENFERMEDAD DE KRABBE

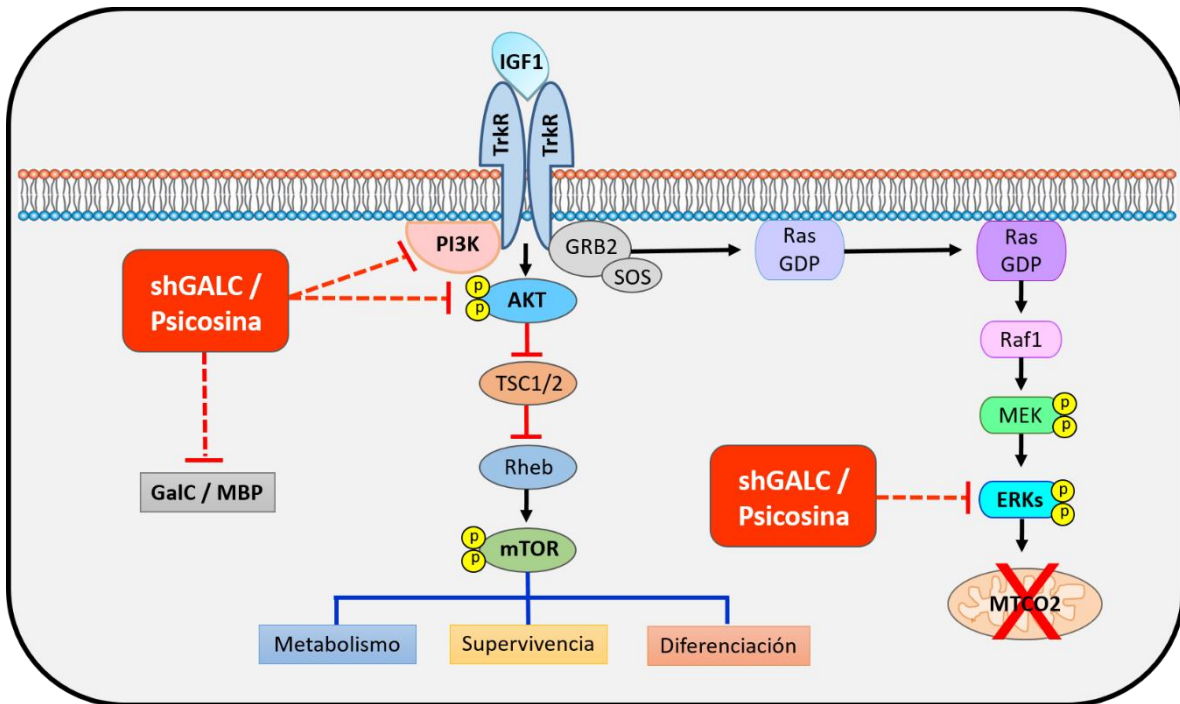


Figura 7.2 Modelo propuesto para la enfermedad de Krabbe

Los oligodendrocitos diferenciados en un contexto neurotóxico, inducido por la acumulación de Psicosina endógena por el silenciamiento del gen GALC o por la aplicación exógena de Psicosina, evidencian mayor muerte celular, inhibición de las vías de supervivencia y diferenciación celular IGF1R/PI3K/AKT y MAPK/ERK1-2, disminución del nivel de la proteína MBP y pérdida del número de mitocondrias por célula. Los tratamientos con IGF1 y Rosiglitazona logran proteger a las células del efecto neurotóxico causado por la Psicosina. Las interacciones de activación se denotan con flechas negras y las interacciones inhibitorias se denotan con flechas rojas.

8. CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES

1. El uso de modelos celulares *in vitro* de oligodendrocitos (líneas celulares MO3.13 y B12, cultivos primarios de oligodendrocitos y oligodendrocitos obtenidos a partir de iPSCs) es una herramienta útil en el entendimiento de los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a las enfermedades desmielinizantes y dismielinizantes y permiten la evaluación de diferentes fármacos en búsqueda de neuroprotección.
2. La diferenciación de OPCs a oligodendrocitos maduros es un proceso altamente regulado y complejo, y las células MO3.13 no fueron el modelo apropiado para estudiar el efecto del IGF1 y agonistas PPARs sobre el proceso de diferenciación, por tanto se sugiere como modelo de estudio los cultivos primarios de oligodendrocitos.
3. La aplicación exógena de Psicosina causa muerte en las células MO3.13 diferenciadas y no diferenciadas de manera tiempo y dosis dependiente, conforme a lo observado en pacientes con EK.
4. La muerte celular conferida por la acumulación de Psicosina puede ser atenuada mediante la activación de las vías de neuroprotección mediadas por IGF1 y la regulación transcripcional de PPARs, específicamente PPAR- γ (Rosiglitazona).
5. La activación de las vías de señalización PI3K/AKT y MAPK/ERK, pueden ser sugeridas como un posible mecanismo de protección en el contexto de muerte causada por la acumulación de Psicosina.

6. Los resultados encontrados en los modelos de EK, endógeno y exógeno, y en los cultivos primarios enriquecidos con oligodendrocitos sugieren que la acumulación de Psicosisina impacta negativamente la vía PI3K/AKT y esto podría relacionarse con una disfunción en la fosforilación del receptor IGF1.
7. La interferencia del gen ABCD1, transportador peroxisomal de ácidos grasos de cadena muy larga, en las células MO3.13 causa mayor susceptibilidad a la muerte celular durante su periodo de diferenciación.
8. La interferencia del gen ABCD1 en las líneas celulares MO3.13 y B12 incrementa la muerte celular.
9. La regulación a la baja de la proteína ALDP en células MO3.13, B12 y oligodendrocitos obtenidos de iPSCs derivadas de pacientes con cALD y AMN impacta las vías de señalización PI3K/AKT y AMPK/mTOR.
10. Los oligodendrocitos diferenciados obtenidos a partir de iPSCs derivadas de un paciente con cALD presentan disfunción a nivel peroxisomal y mitocondrial, así como defectos en su maduración.
11. Los tratamientos con IGF1 y agonistas PPARs potencian las vías de señalización celular relacionadas con la supervivencia celular y pueden tener un efecto neuroprotector de acuerdo al contexto celular.
12. En el contexto de acumulación de Psicosisina (EK) y acumulación de ácidos grasos de cadena muy larga (ALD-X) la regulación del receptor IGF1 podría jugar un papel importante como mecanismo compensatorio frente al efecto neurotóxico de la acumulación de Psicosisina y ácidos grasos de cadena muy larga.

Capítulo 8: Conclusiones

- 13.** Existen diferencias epigenéticas relacionadas con la disminución de la acetilación de proteínas e histonas en los oligodendrocitos obtenidos a partir de iPSCs derivadas de pacientes con ALD-X (cALD y AMN), lo cual podría estar relacionado con la pérdida de p-AMPK.

- 14.** Los tratamientos con SAHA y acetato de sodio contribuyen a la activación de AMPK y al incremento de la acetilación de histonas y residuos de lisina en oligodendrocitos diferenciados obtenidos a partir de iPSCs derivadas de pacientes con AMN y cALD.

9. CAPÍTULO 9: PERSPECTIVAS

1. Analizar el efecto de SAHA y el acetato de sodio en la regulación de la localización de AceCS a nivel nuclear y citoplasmático en oligodendrocitos diferenciados obtenidos a partir de iPSCs derivadas de pacientes con AMN y cALD.
2. Evaluar el efecto del IGF1 y agonistas PPARs sobre la diferenciación en cultivos primarios de oligodendrocitos.
3. Investigar la relación del IGF1 en la regulación de la transcripción de los transportadores peroxisomales de la familia ABCD, específicamente el transportador ABCD1.
4. Estudiar la regulación de los receptores IGF1 y de insulina en el contexto de acumulación de ácidos grasos de cadena muy larga y acumulación de Psicossina.
5. Con base en los resultados hallados en el modelo de oligodendrocitos AMN en donde se observó colocalización de PEX14 con MTCO2, evaluar la conexión entre la disfunción peroxisomal y la disfunción mitocondrial con el propósito de entender si el daño a nivel peroxisomal es una consecuencia de la disfunción mitocondrial o por el contrario la disfunción mitocondrial es consecuencia del daño peroxisomal, por tanto se propone estudiar la proteína ATM en el contexto de acumulación de ácidos grasos de cadena muy larga o acumulación de Psicossina en oligodendrocitos.

ANEXO 1. CULTIVO CELULAR

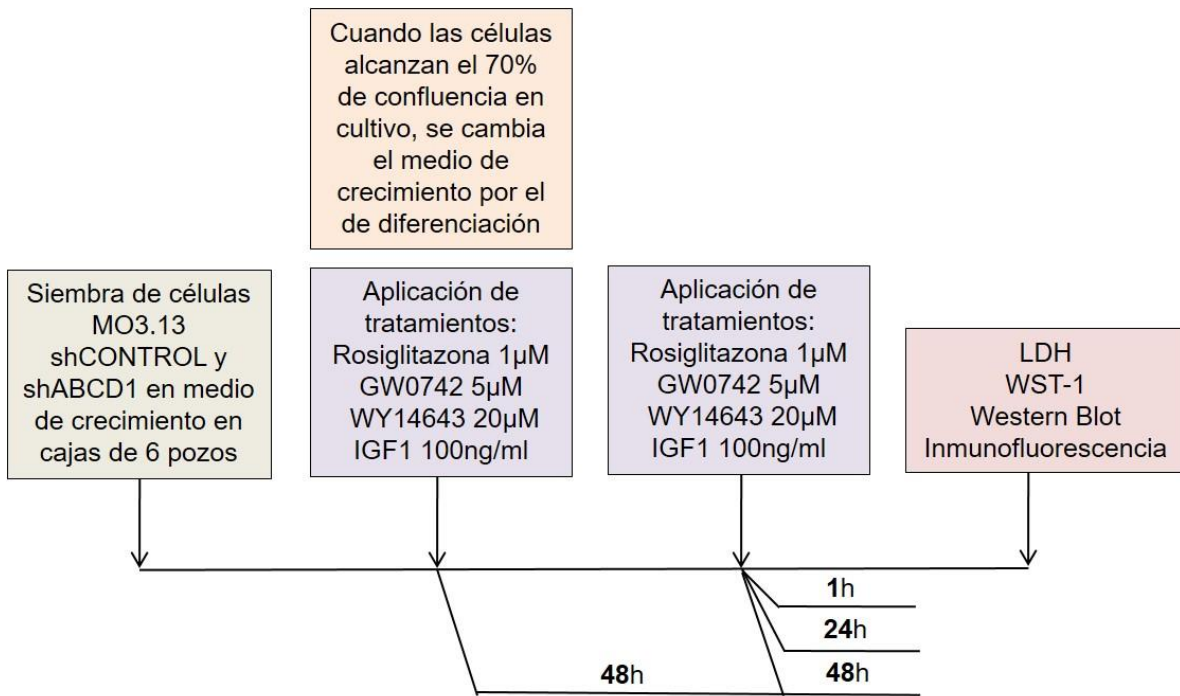
1.1 CÉLULAS MO3.13

1.1.1 Crecimiento

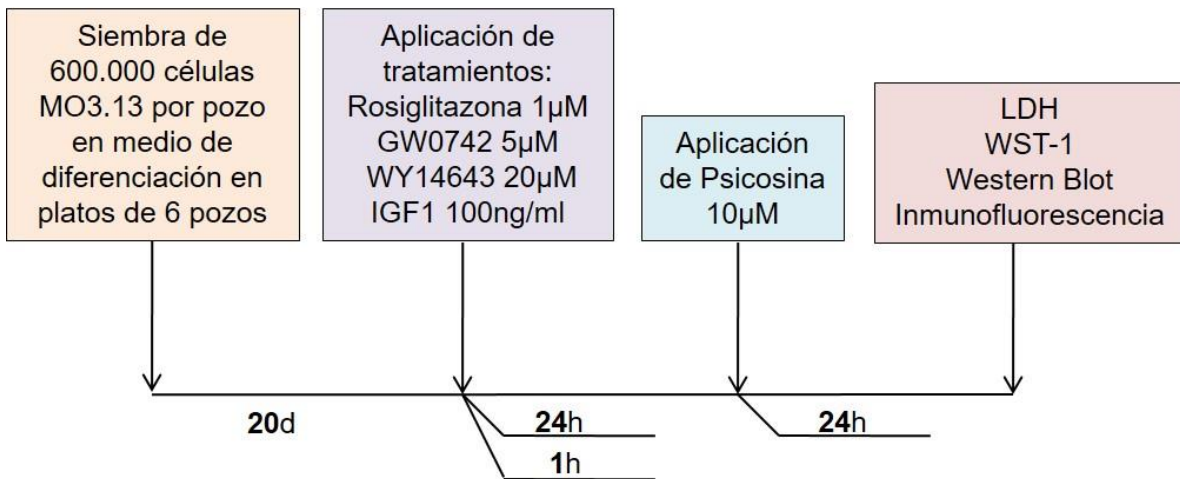
La línea celular MO3.13 fue cultivada en frascos de 75cm² conteniendo 10ml de medio fresco DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, glucosa 4,5g/l y L-Glutamina, LONZA - USA), suplementado SFB al 10% (GIBCO, USA) y 100U/ml Penicilina y 100µg/ml de Estreptomina (GIBCO, USA) en una incubadora a 37°C y 5% (v/v) en CO₂. La selección de las células transfectadas se hizo con Puromicina 5µg/ml.

1.1.2 Diferenciación

El cultivo de células MO3.13 diferenciadas se realizó en cajas de 6 pozos, previamente tratadas con Poli L Lisina, a una confluencia del 70%, en DMEM (DMEM 4.5 g/l glucosa y L-Glutamina, LONZA), libre de SFB, con 100U/ml Penicilina y 100µg/ml de Estreptomina y con 4-β-phorbol-12-myristato 13-acetato (PMA) 100nM por 3 días máximo 5 días, ya que el medio de diferenciación no se cambia.

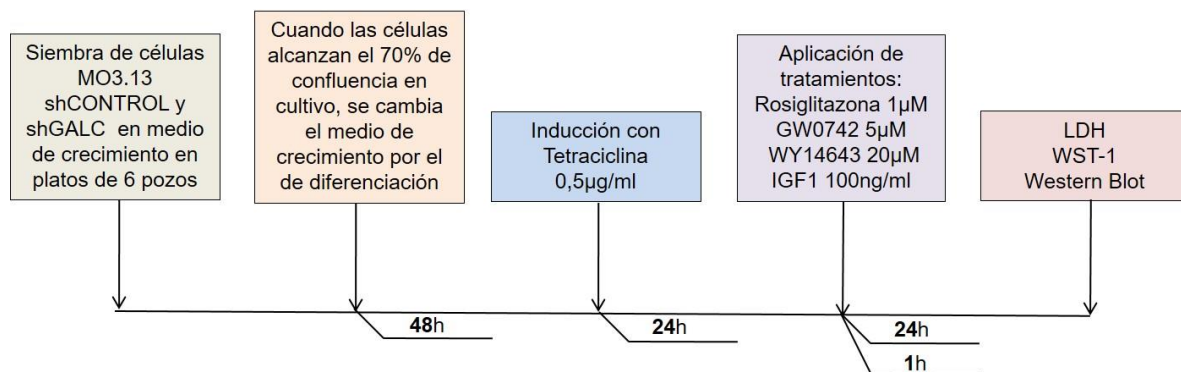


Esquema 1. Modelo de ALD-X por interferencia del gen ABCD1



Esquema 2. Modelo exógeno de EK por adición de Psicosisina

Anexos

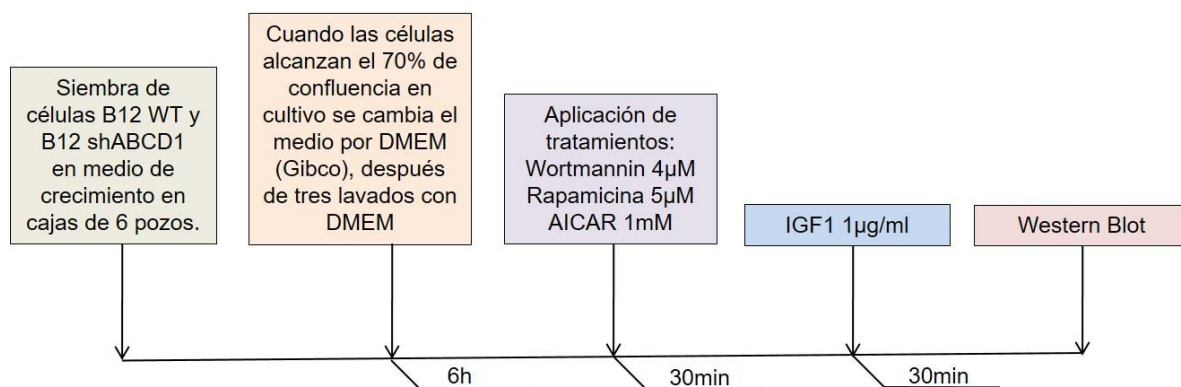


Esquema 3. Modelo endógeno de EK por inferencia del gen GALC

1.2 CÉLULAS B12

1.2.3 Crecimiento

Las células B12 se cultivaron en medio DMEM (GIBCO, USA), suplementado con SFB 10% (GIBCO, USA) en una incubadora a 37°C y 5% (v/v) en CO₂. Las células B12 shABCD1 fueron cultivadas con adición de Puromicina 5µg/ml durante el proceso de selección.



Esquema 4. Modelo de ALD-X en células B12 por inferencia del gen GALC

1.3 CULTIVOS PRIMARIOS DE OLIGODENDROCITOS

Protocolo estandarizado para la obtención de cultivos primarios enriquecidos de oligodendrocitos derivados de cerebros de ratones c57b/6 un día postnatal.

• 1. SACRIFICIO

- Sacrificar los neonatos (1 – 2 días post natal).

PASO CRITICO:

Anestesia: Sumergir cada individuo en una caja con hielo por 1 – 5 minutos, hasta que estén quietos.

Decapitación: Primero sumergir cada ratón en alcohol. Luego, separar la cabeza del tronco, con tijeras de disección. Posteriormente, dejar cada cabeza en una caja de Petri estéril de 10cm con medio HBSS (LONZA). Pasar las cabezas a otra caja de Petri que contenga HBSS a 4°C. Repetir para cada una de las cabezas. (Aproximadamente 10-15 cabezas pueden ser procesadas al mismo tiempo).

Cambiar a una caja de Petri limpia con HBSS frío fresco, si el buffer se observa enrojecido, se debe cambiar

2. DISECCIÓN (Este proceso se realiza en cabina, y todo el material debe ser estéril)

- Disectar cada cerebro en una caja de Petri sobre hielo. Retirar meninges.
- Poner todas las cortezas libres de meninges en una caja de Petri con medio HBSS frío.
- Lavar varias veces con medio HBSS, hasta retirar sangre y meninges.
- Retirar el medio HBSS

Anexos

- Para 10 cortezas, adicionar 1ml de tripsina 0,25% + EDTA 0,1%.
- Cortar las cortezas cerebrales en cuadritos de aproximadamente 1mm³ , máximo 15 minutos.
- Agregar 10ml de medio DMEM20S* , para inactivar la tripsina.
- Pasar tres veces por una jeringa estéril.
- Pasar el contenido a un falcon estéril de 15ml.
- Centrifugar a 900rpm por 5min.
- Descartar el sobrenadante.
- Adicionar al pellet 10ml de DMEM20S
- Resuspender con pipeta de 5ml y homogenizar el pellet.
- Sembrar 1ml de la solución anterior en frascos de cultivo de 75 cm³ (previamente tratados con poli-L-lisina) y llevar a 10ml con medio DMEM20S (aproximadamente 10ml por cerebro).
- Incubar a 5%CO₂ y 37°C.
- Hacer cambio completo de medio después de 24 a 48 horas. Posteriormente, se cambia la mitad del medio cada 2 a 3 días, dependiendo de la confluencia.
- Observar células precursoras de oligodendrocitos creciendo sobre capa de astrocitos

*DMEM20S=DMEM + L-Glut 4mM + SFB al 20% + 50Uml-1 penicilina+ 50µgml-1 estreptomycin.

3. PURIFICACIÓN DE OLIGODENDROCITOS

- Iniciar el día 10 (24 horas después del último cambio de medio).

Efecto de agonistas PPARs e IGF1 en modelos *in vitro* de leucodistrofias

- Cambiar el medio, poner medio fresco, DMEM20S. Adicionar 10ml de medio a cada frasco de 75cm³ e incubar por 2 horas.
- Pasar los frascos de 75cm³ al shaker orbital y asegurar las cajas muy bien.
- Agitar por 8 a 12 horas (37°C, 250rpm).
- Retirar el medio de cada frasco de 75cm³ y ponerlo en cajas de Petri plásticas estériles sin Poli-D-lisina, máximo 20ml por cada caja de Petri. Poner medio fresco DMEM20S a los frascos de 75cm³ y poner a incubar a 5%CO₂ y 37°C.
- Incubar las cajas de Petri con 5%CO₂ y 37°C por 30 a 45 minutos, para que se adhiera la microglia a las cajas de Petri.
- Colectar el medio de todas las cajas de Petri en un Falcón de 50ml y centrifugar por 10 min a 1000rpm.
- Sembrar el pellet en un frasco de 25cm³ con medio DMEM de maduración.

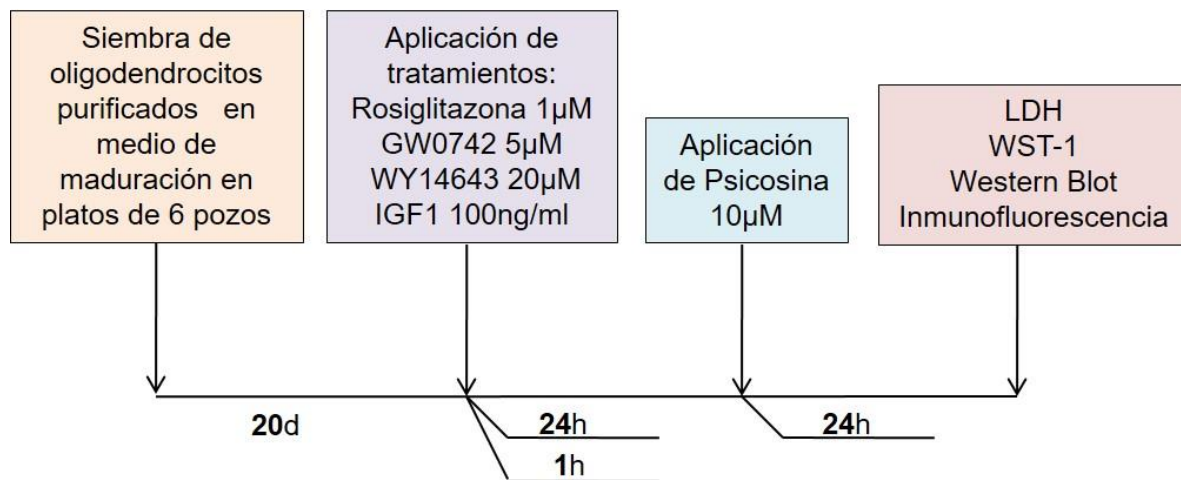
4. MADURACIÓN DE OLIGODENDROCITOS

- Adicionar al medio DEMEM alto en glucosa:
 - PDGF AA: 10ng/ml
 - Transferrina: 50mg/L
 - L-Glutamina: 0.2mM
 - Sodio Selenita: 0.03µM
 - T3: 10ng/ml
 - IGF-1: 10ng/ml

Referencias: Chen, et.al, 2007; O'Meara, et.al, 2011; Neman y De Vellis, 2012; KEN D. McCARTHY and JEAN DE VELLIS, 1980.

Protocolo hecho por: Jenny Andrea Jaramillo Gómez, estudiante de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

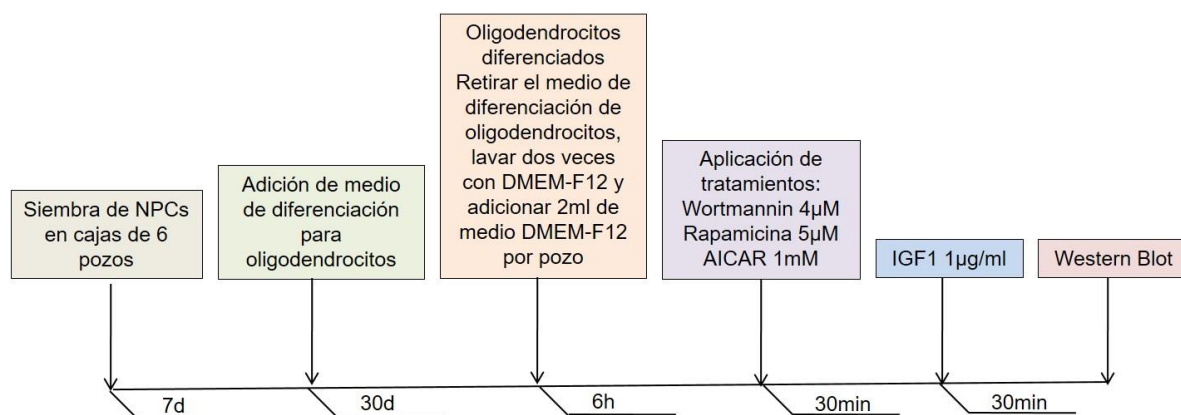
Anexos



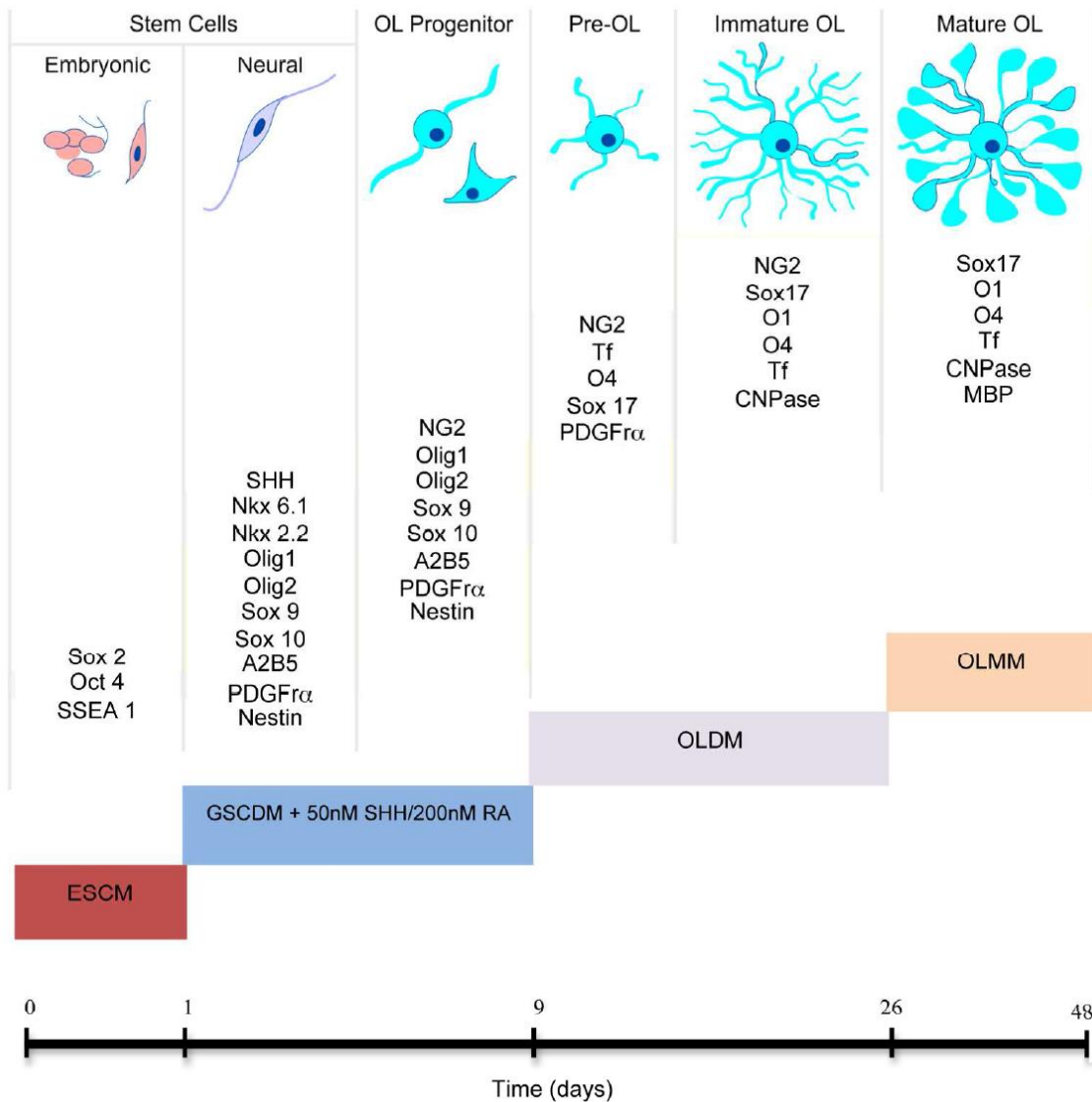
Esquema 5. Modelo exógeno de EK en cultivos primarios de oligodendrocitos por adición de Psicosisina

1.4 OLIGODENDROCITOS DIFERENCIADOS OBTENIDOS A PARTIR DE iPSCs DERIVADAS DE PACIENTES CON ALD-X

El cultivo y diferenciación de iPSCs se llevó a cabo usando el protocolo estandarizado en el grupo de Neurogenética y desarrollo de la Universidad Médica de Carolina del Sur (MUSC) (Baarine et al., 2015b).



Esquema 6. Oligodendrocitos obtenidos a partir de iPSCs de pacientes con ALD-X



Esquema 7. Diferenciación de oligodendrocitos *in vitro*

Esquema de la diferenciación de oligodendrocitos propuesto por Neman y Vellis (2012), en el cual se indican los marcadores que se expresan de manera secuencial durante la diferenciación in vitro de células madre embrionarias hasta oligodendrocitos maduros (cero a 48 días en cultivo celular).

ANEXO 2. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS MO3.13

Las células MO3.13 fueron cultivadas en medio de crecimiento en cajas de seis pozos, previamente tratadas con poli L lisina, se sembraron 300.000 células por pozo. La transfección se hizo por lipofección usando Lipofectamine® LTX Reagent de Invitrogen.

2.1 Enfermedad de Krabbe

El modelo endógeno de EK se realizó utilizando el sistema de expresión lentiviral inducible por derivados de tetraciclina (TTC) "Lenti-X™Tet-On®", para ello, células MO3.13 se transfectaron por lipofección, posteriormente fue activado el silenciamiento del gen GALC cultivando las células en medio de diferenciación y en presencia de TTC, con el propósito de inducir la expresión del shRNA. Los plásmidos fueron obtenidos de ThermoScientific Open Biosystems (TRIPZ Lentiviral Inducible shRNAmir), los cuales poseen una secuencia específica para el gen GALC, un promotor inducible con TTC, el marcador fluorescente Turbo RFP, y un marcador de selección con puromicina. Se usaron como controles plásmidos semejantes pero que no poseen la secuencia específica para GALC. Las células fueron seleccionadas con puromicina 4µg/ml, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El silenciamiento de GALC fue confirmado por western blot de la enzima GalC.

El silenciamiento del gen GALC en las células MO3.13 se hizo con 1µg de GALC TRIPZ Lentiviral Inducible, 2µl del Reagent y, 5µl de Lipofectamine® en Optimem, volumen final de 500µl por pozo. También, las células se transfectaron con 1µg de CONTROL TRIPZ Lentiviral Inducible.

2.2 Adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X

El modelo de ALD-X en la línea celular MO3.13 se realizó por RNA interferencia del gen ABCD1 utilizando cuatro diferentes secuencias de siRNA en vectores lentivirales (piLenti-siRNA). La transfección se realizó por lipofección usando Lipofectamine® LTX Reagent y la selección de las células transfectadas se hizo con puromicina 5µg/ml. Se usó como control una secuencia similar (scrRNA) no conocida en genes de humano, ratón o rata. El silenciamiento fue verificado mediante Western blot de la proteína ALDP.

La interferencia del gen ABCD1 en las células MO3.13 se hizo con la mezcla de los cuatro plásmidos, 500ng de cada plásmido, para un total de DNA por pozo de 2µg, 2µl del Reagent y, 5ul de Lipofectamine® en Optimem, volumen final 500µl. También, las células se transfectaron con un vector CONTROL (pLenti6 Control(C1) shRNA).

2.1 Protocolo de transfección

1. Previamente a iniciar este procedimiento se deben cuantificar los plásmidos en el NanoDrop.
2. Retirar el medio de las células a transfectar, es decir retirar el medio de crecimiento y en cada pozo adicionar 500µl de OptiMem (Gibco) y volver a incubar.
3. Preparar 2 soluciones: (1) La solución A: ADN plasmídico, Reagent y ½ del volumen de optimen y (2) la solución B: lipofectamina y ½ del volumen de optimen. Luego de 5 min a temperatura ambiente, la solución A y B se mezclan y se agitan suavemente por inversión. La mezcla de A + B se incuba por 20min a temperatura ambiente, periodo en el que se forman los liposomas.
4. Adicionar 500µl gota a gota de la mezcla (A + B) en cada pozo de las células que se van a transfectar, incubar por 6 horas.
5. Después de seis horas de la transfección, retirar el Optimen con la mezcla de los plásmidos y lipofectamina y adicionar 1ml de optimen fresco.

Anexos

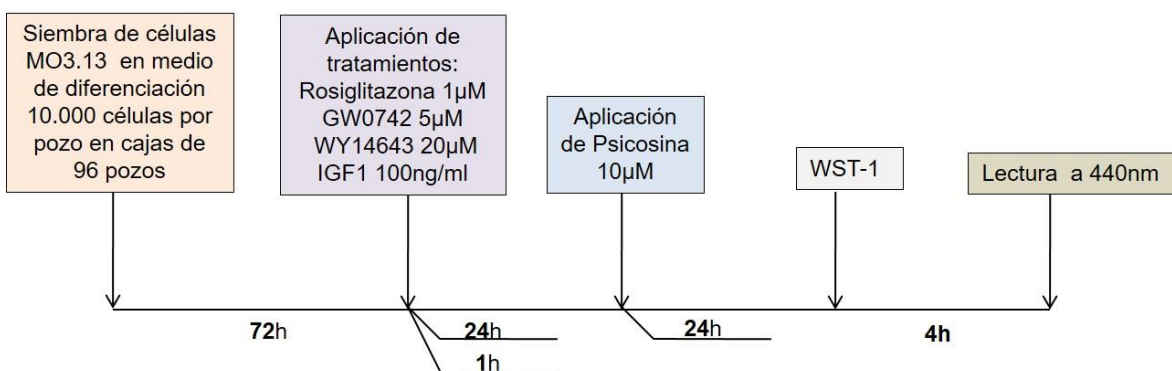
6. Después de 24 horas, retirar el Optimen y adicionar medio de crecimiento.
7. más puromicina 5µg/ml para iniciar el proceso de selección.
8. Transcurridas 48h se la transfección se adiciona el antibiótico para seleccionar las células transfectadas (Puromicina 5µg/ml). Durante el tiempo de cultivo las células permanecieron con el antibiótico de selección, el cual se retiraba al momento de montar los experimentos.

ANEXO 3. VIABILIDAD CELULAR

3.1 WST-1

La sal de tetrazolium WST-1 (*sodium 5-(2,4-disulfophenyl)-2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-2H tetrazolium inner salt*) es clivada a formazán por un mecanismo celular complejo, el cual solo ocurre en la superficie de las células vivas. Principalmente, esta bioreducción es dependiente de la producción glucolítica de NAD(P)H (Berridge et al., 2005). Es decir que la cantidad de formazán producida es proporcional al número de células metabólicamente activas en el cultivo.

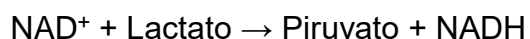
Para los ensayos de WST-1 y LDH las células se sembraron en cajas de 96 pozos con 200µl de medio de cultivo. Una vez cumplidos los tiempos de incubación específicos para cada uno de los tratamientos, se removieron 100µl de medio en cada pozo (50µl fueron usados para la prueba LDH). Luego, a cada pozo (con 100µl de medio) se le adicionaron 10µl del reactivo WST-1 (Roche). Después, las placas se pusieron, de nuevo, en la incubadora a 37°C, 5 % de CO₂ durante 4 horas. Finalmente, se llevó a cabo la lectura de la absorbancia de las placas en un espectrofotómetro a 440nm. El análisis se realizó normalizando los datos respecto al control del experimento.



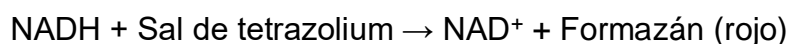
3.2 LDH

Con el propósito de determinar el porcentaje de muerte celular se usó CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, G1781), esta técnica mide cuantitativamente la liberación de la lactato deshidrogenasa (LDH) por colorimetría. La LDH es una enzima estable en el citoplasma y es liberada de la célula después de su lisis celular. Para determinar cuantitativamente la liberación de LDH por varios años se han usado métodos con sales de tetrazolium en conjunción con diaforasa u otro aceptor de electrones (Nachlas *et al.*, 1960; Korzeniewski y Callewaert, 1983; Decker T y Lohmann-Matthes, 1988). La fórmula general de la reacción de esta técnica es:

LDH



Diaforasa (aceptor de electrones)



La LDH liberada de las células lisadas permanece en el medio de cultivo y esta reacciona con el sustrato de la enzima, el proceso que se lleva a cabo es la conversión de la sal de tetrazolium a un producto de formazán rojo. La intensidad del color formado es proporcional al número de células lisadas. Por lo tanto, esta técnica puede ser útil para determinar la citotoxicidad mediada por químicos u otros agentes, así como determinar el número total de células.

PROCEDIMIENTO

1. Transferir 50µl del sobrenadante de cada uno de los tratamientos, controles del experimento y los controles específicos para LDH a una caja nueva de 96 pozos.
2. Reconstituir la mezcla de sustrato (*Substrate mix*) con el *buffer* (*Assay buffer*), 12ml de *buffer* por frasco de mezcla de sustrato, seguir las

Efecto de agonistas PPARs e IGF1 en modelos *in vitro* de leucodistrofias

indicaciones del proveedor. Después de reconstituido el sustrato almacenar a -20°C . Se debe procurar mantener frío y protegido de la luz durante la aplicación y no es necesario descongelarlo totalmente en el próximo uso.

3. Adicionar $50\mu\text{l}$ del sustrato reconstituido a cada muestra (tratamientos y controles), tapar la caja con papel aluminio para proteger de la luz e incubar a temperatura ambiente por 30 min.
4. Transcurridos los 30 min, inmediatamente, adicionar $50\mu\text{l}$ a cada pozo de la solución de parada (*Stop solution*).
5. Leer la placa de 96 pozos a 490nm y registrar los datos. El análisis de los datos se realiza teniendo en cuenta los controles de muerte.

Controles para LDH

Se debe contar con dos controles para llevar a cabo el análisis de los datos de viabilidad por LDH, estos también se deben realizar por triplicado.

Control del medio de cultivo

Corresponde al *background* del medio de cultivo dado por el rojo fenol y por la LDH presente en el SFB. El valor de la absorbancia de este control se obtiene a partir de $50\mu\text{l}$ del medio de cultivo (sin células) en el cual se ha llevado a cabo el experimento y es usado para normalizar todos los valores obtenidos de absorbancia de las muestras y del control de lisis total o lisis 100 %.

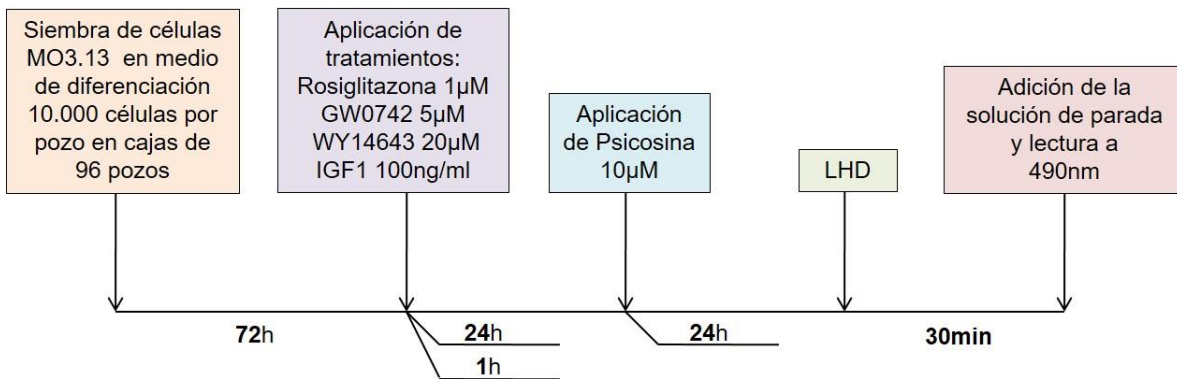
Control de lisis total o lisis 100 %

Corresponde al número total de células lisadas, lo cual indica el 100% de muerte celular. Estos controles se deben preparar con anterioridad, calculando que se tenga el sobrenadante de estos al mismo tiempo que el de las muestras del experimento para realizar el montaje en la placa de 96 de manera adecuada.

Cajas de 96 pozos: Tres pozos de células control se tratan de forma independiente con $10\mu\text{l}$ del *buffer* de lisis (Tritón 0,8%) por cada $100\mu\text{l}$ de medio de cultivo y se incuban por 45 min a 37°C . Después, se obtienen los $50\mu\text{l}$ de sobrenadante que se transfieren a la caja nueva de 96 pozos.

Anexos

Cajas de 24 o 6 pozos: El plato con las células control de lisis se saca de la incubadora y se llevan rápidamente a -70° y se congelan por 45 min. Luego se descongelan y se dejan a temperatura ambiente por otros 30 min. Posterior a esto se recoge todo el medio de cada pozo junto con las células lisadas y se centrifuga a 900 rpm por 4 min. 50 μ l de este sobrenadante se transfieren a la caja nueva de 96 pozos.



ANEXO 4. WESTERN BLOT

4.1 Soluciones usadas en Western Blot.

4.1.1 Gel de separación

Para preparar 2 geles se adicionan en el siguiente orden los volúmenes especificados a continuación:

Gel de separación	10%	12%	15%
Mezcla 30% acrilamida:bisacrilamida	3,3ml	4ml	4,95ml
1,5 M TRIS-HCl/0,4 % SDS pH 8,8 (*)	2,5ml	2,5ml	2,5ml
Solución SDS al 10 % p/v (**)	0,1ml	0,1ml	0,1ml
H ₂ O dd	4ml	3,3ml	2,35ml
Solución de APS (persulfato de amonio) al 10% p/v (***)	0,1ml	0,1ml	0,1ml
TEMED	8µl	8µl	8µl
Volumen final	18ml	18ml	18ml

El APS y el TEMED deben ser los últimos componentes en adicionar, ya que son los encargados de la polimerización. Se mezcla con suavidad, se sirven 3ml entre los vidrios de soporte, y se espera hasta que polimerice la mezcla, aproximadamente 20 min.

(*) Para 250ml de la solución 1,5M TRIS-HCl/0.4% SDS pH 8,8: Se pesa 45,42 g de TRIS base, 1 g de SDS, y se disuelven en 200ml de H₂O dd, se ajusta a pH 8,8 con HCl concentrado y se completa con H₂O dd hasta 250ml, se conserva a 4°C hasta el momento del uso.

(**) Para 50ml de SDS al 10% p/v se pesan 5 g de SDS y se diluyen en H₂O dd hasta completar 50ml de disolución.

(***) Para 500µl de solución de APS al 10% p/v se pesan 50mg de APS en un vial de 1ml y se le adicionan 500µl de H₂O dd (esta solución debe prepararse en el momento de su uso y se debe proteger de la luz).

4.1.2 Gel de concentración

Para preparar 2 geles se adicionan en el siguiente orden los volúmenes especificados a continuación:

Gel de concentración	Volumen
Mezcla 30% acrilamida:bisacrilamida	830µl
0,5 M TRIS-HCl/0,4 % SDS pH 6.8 (*)	630µl
Solución SDS al 10 % p/v (**)	50µl
H ₂ O dd	3,4ml
Solución de APS (persulfato de amonio) al 10% p/v (***)	50µl
TEMED	10µl
Volumen final	1,57

El APS y el TEMED deben ser los últimos componentes en adicionar, ya que son los encargados de la polimerización. Se mezcla con suavidad, se sirven sobre el gel de separación ya polimerizado hasta el borde final del vidrio y antes de que se polimerice se pone la peinilla. Luego se espera la polimerización, aproximadamente 20 min, para retirar la peinilla y lavar los pozos.

(*) Para 100ml de la solución 0,5 M TRIS-HCl/0,4% SDS pH 6,8: Se pesan 6,05 g de TRIS base, 0,4 g de SDS, se disuelven en 70ml de H₂O dd, se ajusta a pH 6,8 con HCl concentrado y se completa con H₂O dd hasta 100ml y se mantiene a 4°C hasta el momento de su uso.

(**) Para 50ml de SDS al 10% p/v se pesan 5 g de SDS y se diluyen en H₂O dd hasta completar 50ml de disolución.

(***) Para 500µl de solución de APS al 10% p/v se pesan 50mg de APS en un vial de 1ml y se le adicionan 500µl de H₂O dd (esta solución debe prepararse en el momento de su uso y se debe proteger de la luz).

4.1.3 Buffer Towing 10X

Para preparar un litro del *buffer Towing* 10X se pesan y disuelven en 800ml de H₂O dd los siguientes compuestos:

Buffer de corrido		Concentración 10X	Concentración 1X
TRIS base	30,3g	250mM	25mM
Glicina	144g	1,92M	192mM
SDS	10g	1% p/v	0,1%p/v

Luego se lleva a volumen final 1.000ml con H₂O dd en un balón aforado y se conserva refrigerado a 4°C. pH 8,3.

Buffer de corrido 1X

Al momento del uso, la solución 10X se disuelve 1:10 con H₂O dd. 100ml del *buffer* de corrido 10X se completan con H₂O dd hasta 1.000ml.

Buffer de transferencia 1X

Esta solución se prepara al momento de su uso, en una probeta de 1.000ml se toman 100ml del *buffer* Towing 10X y se le adicionan 200ml de metanol y 700ml de H₂O dd.

4.1.6 Buffer de lavado: TRIS Buffer Salino (TBS) 10X

Para preparar un litro de este *buffer* se pesan y disuelven en 800ml de H₂O dd los siguientes compuestos:

Buffer de lavado TBS		Concentración final 10X
TRIS base	24g	200mM
NaCl	80g	1,37M

Luego se lleva a volumen final 1.000ml en un balón aforado, se ajusta el pH a 7,6 con HCl concentrado y se conserva refrigerado a 4°C.

Buffer de lavado: TRIS Buffer Salino (TBS) 1X + Tween 20 al 0,2%

Para preparar un litro se toman 100ml de TBS 10X, se le adicionan 2ml de Tween 20 (para una concentración final de 0,2% v/v) y se completa a un volumen de 1.000ml con H₂O dd en un balón aforado o en una probeta.

4.1.7 Buffer de bloqueo.

Al momento del uso se preparan 250ml de esta solución, para lo cual se pesan 12,5 g de leche descremada (para una concentración final de 5% p/v) o 25 g de leche descremada (para una concentración final de 10% p/v) y se disuelven en 200ml de *buffer* de lavado 1X y se completa hasta 250ml.

4.1.8 Anticuerpo primario

Los anticuerpos primarios se diluyen en *buffer* de bloqueo, de acuerdo a la estandarización, la dilución se debe realizar justo antes de su uso en tubos Falcón estériles de 50ml. Los anticuerpos se deben sacar de la nevera en una caja con hielo, sólo se deben abrir en cabina y se manejan con puntas estériles, para evitar que el anticuerpo se contamine.

4.1.9 Anticuerpo secundario

Los anticuerpos secundarios se diluyen en *buffer* de bloqueo, de acuerdo a la estandarización, la dilución se debe realizar justo antes de su uso en tubos Falcón estériles de 50ml. Los anticuerpos se deben sacar de la nevera en una caja con hielo, sólo se deben abrir en cabina y se manejan con puntas estériles, para evitar que el anticuerpo se contamine.

4.2 Extracción de proteína

Para la preparación de los extractos celulares para la técnica de *western blot*, las células se cultivan en cajas de 6 pozos y se les aplican los diferentes tratamientos de acuerdo al diseño experimental. Luego de cumplidos los tiempos de tratamiento, se retira el medio de cada pozo, se lavan una vez con PBS. Las cajas se ponen sobre una superficie con hielo, a cada pozo se le adicionan 100µl del *buffer* RIPA más 1X de los inhibidores de proteasas y fosfatasa (Roche) y la monocapa celular se remueve con un "*cell scraper*", y rápidamente las células se colectan en tubos fríos de 1,5ml, debidamente marcados, este procedimiento se debe hacer siempre en frío y ágilmente. Los tubos se centrifugan en una microcentrifuga refrigerada a 2

°C, a una velocidad de 13.300 rpm durante 5 min. Se procede a sonicar el botón que se formó al final del tubo con 3 pulsos de 3 s a una amplitud de 20 %.

Luego se la proteína se cuantificó por el método de BCA y los extractos se almacenaron a -70 °C hasta el momento de su uso.

4.3 Electroforesis en geles denaturantes de poliacrilamida

Este procedimiento se realiza en un sistema miniprotean3 de *Biorad*. Los lisados se descongelan y se mantienen en hielo picado. Con los datos de la concentración de proteína de cada muestra, se realizan los cálculos para determinar el volumen de muestra que equivale a 10, 20 o 30 µg de proteína, el cual se completaba con buffer de carga hasta un volumen final de 25µl. La mezcla se realiza en tubos para PCR, y luego se desnaturaliza calentando a 95 °C durante 10 min en un termociclador, cuando el ciclo termina se ponen en hielo.

Posteriormente los tubos que contienen la mezcla se centrifugan por 15 seg en una microcentrífuga, se retornan a la cubeta con hielo y se sirven en los pozos de los geles previamente realizados, el gel de separación se debe realizar al porcentaje adecuado 10%, 12% o 15% de acrilamida/bisacrilamida, según corresponda dependiendo del tamaño de la proteína de interés. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular, (200 – 6,5 kDa), una mezcla de 2,5µl de *Kaleidoscope Prestained Standard* con 20µl de *buffer* de carga. Se realiza el montaje de la cámara de electroforesis con *buffer* de corrido 1X. Las muestras se corren inicialmente en el gel de concentración a 50 voltios durante 45 min y una vez se encuentran alineadas, se aumenta el voltaje hasta 100 voltios y se corren en el gel de separación durante 90 min.

4.5 Transferencia a membranas de nitrocelulosa

Luego de la electroforesis, se desmonta la cámara y se retira el gel de concentración. Los geles de separación junto con los materiales usados en la

Anexos

transferencia (papel de nitrocelulosa, esponjas y papel filtro) se equilibran en *buffer* de transferencia 1X durante 30 min.

La transferencia se realiza a 100 voltios, 300 mA durante 90 min. Dentro de la cámara se coloca un bloque de hielo y un agitador magnético para mantener frío el sistema y asegurar la recirculación del *buffer* de transferencia 1X.

4.6. Detección de proteínas

Para comprobar la eficiencia de la transferencia se observa el patrón de bandas del marcador de peso molecular en la membrana de nitrocelulosa; luego de esto, las membranas se incuban en *buffer* de bloqueo 10 % durante 1 hora y se ponen en contacto con el anticuerpo primario incubándolas toda la noche a 4 °C en un rotador de tubos. Al cabo de este tiempo se realizan 3 lavados de 15 min cada uno, en *buffer* de lavado TBS 1X y se ponen a incubar con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego las membranas se lavan nuevamente 3 veces con *buffer* de lavado TBS 1X, y se procede a detectar las proteínas de interés usando el kit de quimioluminiscencia Novex (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante en el fotodocumentador BioRaD acoplado a una cámara para detectar quimioluminiscencia.

4.7 Limpieza de membranas luego de WB para re-análisis

1. Asegurarse de que las membranas nunca se sequen.
2. Lavar la membrana dos veces en PBS con Tween 20 al 0.2% o en TBS con Tween 20 al 0,2% antes de la limpieza de los anticuerpos.
3. Colocar las membranas en 50ml de *buffer* de limpieza en un contenedor sellado. El *buffer* siempre debe ser fresco.
4. Sumergir parcialmente el contenedor en baño de agua a 50 °C por 15min, agitando ocasionalmente.
5. Luego de la limpieza, volver a lavar las membranas 3 o 4 veces con PBS con Tween 20 al 0,2% o en TBS con Tween 20 al 0,2%.

6. Bloquear en *buffer* de bloqueo 10% y continuar con el WB normalmente.
7. Tratar de utilizar un anticuerpo secundario diferente, la segunda vez que se pruebe la membrana.

4.7.1 Buffer de limpieza

Este *buffer* debe ser fresco

Stock	Volumen	Concentración final
10 % SDS	10ml	2% SDS
1 M TRIS, pH 6,8	3,125ml	62,5 mM TRIS, pH 6,8
β -mercaptoetanol	0,353ml	100 mM β -mercaptoetanol
H2O dd	36,5ml	

ANEXO 5. INMUNOFLUORESCENCIA

Células MO3.13 y Cultivos primarios

Las células se sembraron sobre cubreobjetos estériles previamente tratados con poly L lisina en cajas de seis pozos, en el caso de las células MO3.13 se sembraron 500.000 células por pozo, se realizaron los respectivos tratamientos y una vez cumplidos los tiempos, se procedió a la realización de la inmunofluorescencia.

Procedimiento de inmunofluorescencia para células MO3.13 y cultivos primarios

1. Retirar el medio de cultivo, lavar suavemente tres veces con PBS 1X.
2. Fijar con paraformaldehído al 4% por 15min a 4°C y lavar tres veces con PBS 1X, suavemente.
3. Permeabilizar con Tritón X-100 al 0.1% en PBS 1X por 10min, posteriormente lavar tres veces con PBS 1X.
4. Bloquear con Tritón X-100 al 0,05% y albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS 1X por una hora a temperatura ambiente y lavar con PBS 1X.
5. Incubar con los anticuerpos primarios diluidos en Tritón X-100 al 0,05%, BSA al 1% en PBS 1X a lo largo de la noche a 4°C en agitación constante.
6. Lavar tres veces con PBS 1X e incubar con los correspondientes anticuerpos secundarios AlexaFluor diluidos (1:1.000) en Tritón X-100 al 0,05%, BSA al 1% en PBS 1X, por dos horas a temperatura ambiente en la oscuridad.
7. Lavar tres veces con PBS 1X y adicionar 1ml de Hoechst 33342 (2µg/ml) a cada pozo para marcar los núcleos, incubar dos minutos en la oscuridad, lavar tres veces con PBS 1X y dejar secar.
8. Realizar el montaje con Vectashield (USA) sobre portaobjetos de vidrio, dejar secar y guardar en la oscuridad a 4°C.

Finalmente, las placas se examinaron bajo microscopía de fluorescencia o microscopia confocal, se realizó la captura de las imágenes y se analizaron con el programa ImageJ.

Conteo de peroxisomas (ALDP) y mitocondrias (TOM20) usando Image J

El protocolo para el conteo de partículas en imágenes tomadas con Microscopia Confocal fue el siguiente: Eliminación del Background de las imágenes, mediante la herramienta Subtract Background (>Process>Subtract Background), se seleccionó la opción Light Background con un radio de 50 píxeles. Mediante el filtro de difuminación Gaussiana (>Process>Filters>Gaussian Blurring) se suaviza la imagen, el radio para este filtro fue de 2 píxeles. Posterior a ello se realizó un enfoque mediante el filtro Unsharp masking (>Process>Filters>Unsharp Masking) de radio 4 píxeles y peso de la máscara de 0,60. Luego se colocó el filtro de convolución (>Process>Filters>Convolve>ok). Una vez se realizan los realces de la fotografía se procede a pasar la imagen al modelo RGB Color (>Image>Type>RGB Color). Ahora bien, para convertir la imagen en una imagen binaria primero fue necesario colocar la imagen en un formato de 8 bits, en donde cada pixel está representado por un byte de 8 bits (>Image>Type>8 bit), una vez allí se realizó la segmentación de la imagen (>Image>Adjust>Threshold), lo cual permite localizar objetos, estableciendo sus límites dentro de la imagen, los valores utilizados en todas las fotos fueron de 30 y 255. Finalmente se realizó el conteo de partículas mediante la herramienta Analyze Particles (>Analyze>Analyze Particles), una vez allí, se establece el rango de tamaño y circularidad de las partículas a contar, para las imágenes de peroxisomas el tamaño fue de 1,5-Infinito y la circularidad fue de 0.0-1.0; por su parte para el conteo de mitocondrias el rango de tamaño fue de 2,5-Infinito y la circularidad de 0.0-1.0. Nótese que el rango máximo de tamaño no se restringió debido a que puede presentarse que dichos organelos se encuentren fusionados o agrupados (Buitrago et al., 2014)

Oligodendrocitos obtenidos a partir de iPSCs

Las NPCs se sembraron en cámaras de cultivo de cuatro u ocho pozos de vidrio (Millicel EZ Slides, Millipore), se mantuvieron cultivadas en estas cámaras hasta el momento de realizar el procedimiento de inmunofluorescencia (NPCs siete días en cultivo y oligodendrocitos diferenciados aproximadamente 30 días). Los tratamientos fueron aplicados en estas cámaras, terminados los tratamientos se llevó a cabo del proceso de inmunofluorescencia con el siguiente protocolo.

Procedimiento de inmunofluorescencia para NPCs y oligodendrocitos obtenidos a partir iPSCs

1. Retirar el medio de cultivo, lavar suavemente tres veces con PBS 1X.
2. Fijar con paraformaldehído 4% por 10min a 4°C y lavar tres veces con PBS 1X, suavemente.
3. Permeabilizar con Triton X-100 al 1,5% en PBS 1X por 10 minutos.
4. Bloquear con suero fetal de caballo al 5% (Gibco), Triton X-100 al 0,05% en PBS 1X por 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Incubar con los anticuerpos primarios (1:100) diluidos en PBS 1X más suero fetal de caballo al 5% (Gibco) y Triton X-100 al 0,05% por dos horas en la oscuridad y a temperatura ambiente.
6. Lavar tres veces con PBS 1X e incubar con los correspondientes anticuerpos secundarios AlexaFluor (1:1000) en PBS 1X más suero fetal de caballo al 5% (Gibco) y Triton X-100 al 0,05% por una hora a temperatura ambiente en la oscuridad.
7. Lavar tres veces con PBS 1X y adicionar Hoechst 33324 (2ug/ml) o DAPI por pozo para marcar los núcleos, incubar por cinco minutos en la oscuridad, lavar tres veces con PBS 1X y dejar secar.
8. Realizar el montaje con Vectashield (USA), dejar secar y guardar en la oscuridad a 4°C.

BIBLIOGRAFÍA

Aicardi,J. (1993). The inherited leukodystrophies: a clinical overview. *J. Inherit. Metab Dis.* 16, 733-743.

Akbar,M., Calderon,F., Wen,Z., and Kim,H.Y. (2005). Docosahexaenoic acid: a positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 10858-10863.

Al,R.F., and El,E.E. (2014). PPAR-gamma activator induces neuroprotection in hypercholesterolemic rats subjected to global cerebral ischemia/reperfusion injury: in vivo and in vitro inhibition of oxidative stress. *Exp. Gerontol.* 51, 1-7.

Anderson,C.M., and Stahl,A. (2013). SLC27 fatty acid transport proteins. *Mol. Aspects Med.* 34, 516-528.

Andersson,I.K., Edwall,D., Norstedt,G., Rozell,B., Skottner,A., and Hansson,H.A. (1988). Differing expression of insulin-like growth factor I in the developing and in the adult rat cerebellum. *Acta Physiol Scand.* 132, 167-173.

Antoku,Y., Sakai,T., Goto,I., Iwashita,H., and Kuroiwa,Y. (1984). Adrenoleukodystrophy: abnormality of very long-chain fatty acids in erythrocyte membrane phospholipids. *Neurology* 34, 1499-1501.

Ashrafi,M.R., and Tavasoli,A.R. (2017). Childhood leukodystrophies: A literature review of updates on new definitions, classification, diagnostic approach and management. *Brain Dev.* 39, 369-385.

Aubourg,P. (1999). On the front of X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurochem. Res.* 24, 515-520.

Baarine,M., Andreoletti,P., Athias,A., Nury,T., Zarrouk,A., Ragot,K., Vejux,A., Riedinger,J.M., Kattan,Z., Bessedé,G., Trompier,D., Savary,S., Cherkaoui-Malki,M., and Lizard,G. (2012a). Evidence of oxidative stress in very long chain fatty acid-treated oligodendrocytes and potentialization of ROS production using RNA interference-directed knockdown of ABCD1 and ACOX1 peroxisomal proteins. *Neuroscience* 213, 1-18.

Baarine,M., Beeson,C., Singh,A., and Singh,I. (2014). ABCD1 deletion-induced mitochondrial dysfunction is corrected by SAHA: implication for adrenoleukodystrophy. *J. Neurochem.*

Baarine,M., Beeson,C., Singh,A., and Singh,I. (2015a). ABCD1 deletion-induced mitochondrial dysfunction is corrected by SAHA: implication for adrenoleukodystrophy. *J. Neurochem.* *133*, 380-396.

Baarine,M., Khan,M., Singh,A., and Singh,I. (2015b). Functional Characterization of iPSC-Derived Brain Cells as a Model for X-Linked Adrenoleukodystrophy. *PLoS. One.* *10*, e0143238.

Baarine,M., Ragot,K., Athias,A., Nury,T., Kattan,Z., Genin,E.C., Andreoletti,P., Menetrier,F., Riedinger,J.M., Bardou,M., and Lizard,G. (2012b). Incidence of Abcd1 level on the induction of cell death and organelle dysfunctions triggered by very long chain fatty acids and TNF-alpha on oligodendrocytes and astrocytes. *Neurotoxicology* *33*, 212-228.

Baes,M., and Aubourg,P. (2009). Peroxisomes, myelination, and axonal integrity in the CNS. *Neuroscientist.* *15*, 367-379.

Bansal,R., Winkler,S., and Bheddah,S. (1999). Negative regulation of oligodendrocyte differentiation by galactosphingolipids. *J. Neurosci.* *19*, 7913-7924.

Barbier,O., Torra,I.P., Duguay,Y., Blanquart,C., Fruchart,J.C., Glineur,C., and Staels,B. (2002). Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *22*, 717-726.

Baumruker,T., Bornancin,F., and Billich,A. (2005). The role of sphingosine and ceramide kinases in inflammatory responses. *Immunol. Lett.* *96*, 175-185.

Bazan,N.G. (2005). Synaptic signaling by lipids in the life and death of neurons. *Mol. Neurobiol.* *31*, 219-230.

Beck,K.D., Powell-Braxton,L., Widmer,H.R., Valverde,J., and Hefti,F. (1995). Igf1 gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons. *Neuron* *14*, 717-730.

Benarroch,E.E. (2011). Circumventricular organs: receptive and homeostatic functions and clinical implications. *Neurology* *77*, 1198-1204.

Benarroch,E.E. (2012). Insulin-like growth factors in the brain and their potential clinical implications. *Neurology* *79*, 2148-2153.

Bercury,K.K., Dai,J., Sachs,H.H., Ahrendsen,J.T., Wood,T.L., and Macklin,W.B. (2014). Conditional ablation of raptor or rictor has differential impact on oligodendrocyte differentiation and CNS myelination. *J. Neurosci.* *34*, 4466-4480.

Berger, J., Albet, S., Bentejac, M., Netik, A., Holzinger, A., Roscher, A.A., Bugaut, M., and Forss-Petter, S. (1999). The four murine peroxisomal ABC-transporter genes differ in constitutive, inducible and developmental expression. *Eur. J. Biochem.* 265, 719-727.

Berger, J., and Gartner, J. (2006). X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, biochemical and pathogenetic aspects. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 1721-1732.

Berger, J., and Moller, D.E. (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* 53, 409-435.

Berger, J., Moser, H.W., and Forss-Petter, S. (2001). Leukodystrophies: recent developments in genetics, molecular biology, pathogenesis and treatment. *Curr. Opin. Neurol.* 14, 305-312.

Berger, J., Pujol, A., Aubourg, P., and Forss-Petter, S. (2010). Current and future pharmacological treatment strategies in X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol.* 20, 845-856.

Bernardo, A., Bianchi, D., Magnaghi, V., and Minghetti, L. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists promote differentiation and antioxidant defenses of oligodendrocyte progenitor cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68, 797-808.

Berridge, M.V., Herst, P.M., and Tan, A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.* 11, 127-152.

Bibollet-Bahena, O., and Almazan, G. (2009). IGF-1-stimulated protein synthesis in oligodendrocyte progenitors requires PI3K/mTOR/Akt and MEK/ERK pathways. *J. Neurochem.* 109, 1440-1451.

Bibollet-Bahena, O., Cui, Q.L., and Almazan, G. (2009). The insulin-like growth factor-1 axis and its potential as a therapeutic target in central nervous system (CNS) disorders. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 9, 95-109.

Biffi, A., Aubourg, P., and Cartier, N. (2011). Gene therapy for leukodystrophies. *Hum. Mol. Genet.* 20, R42-R53.

Bizzozero, O.A., and Good, L.K. (1991). Rapid metabolism of fatty acids covalently bound to myelin proteolipid protein. *J. Biol. Chem.* 266, 17092-17098.

Bizzozero, O.A., Zuniga, G., and Lees, M.B. (1991). Fatty acid composition of human myelin proteolipid protein in peroxisomal disorders. *J. Neurochem.* 56, 872-878.

Bonkowsky,J.L., Nelson,C., Kingston,J.L., Filloux,F.M., Mundorff,M.B., and Srivastava,R. (2010). The burden of inherited leukodystrophies in children. *Neurology* 75, 718-725.

Bottelbergs,A., Verheijden,S., Hulshagen,L., Gutmann,D.H., Goebbels,S., Nave,K.A., Kassmann,C., and Baes,M. (2010). Axonal integrity in the absence of functional peroxisomes from projection neurons and astrocytes. *Glia* 58, 1532-1543.

Bourre,J.M., Pollet,S., Daudu,O., Le,S.F., and Baumann,N. (1977). Myelin consists of a continuum of particles of different density with varying lipid composition: major differences are found between normal mice and quaking mutants. *Biochimie* 59, 819-824.

Braiterman,L.T., Zheng,S., Watkins,P.A., Geraghty,M.T., Johnson,G., McGuinness,M.C., Moser,A.B., and Smith,K.D. (1998). Suppression of peroxisomal membrane protein defects by peroxisomal ATP binding cassette (ABC) proteins. *Hum. Mol. Genet.* 7, 239-247.

Brites,P., Waterham,H.R., and Wanders,R.J. (2004). Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1636, 219-231.

Buitrago,L., Jaramillo-Gómez,J.A., and Arboleda,G. Efecto de agonistas PPARs e IGF1 sobre el número de peroxisomas y mitocondrias en células MO3.13 tratadas con Psicovina. 2014.

Ref Type: Unpublished Work

Cagnol,S., and Chambard,J.C. (2010). ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J.* 277, 2-21.

Campbell,G.R., and Mahad,D.J. (2012). Mitochondrial changes associated with demyelination: consequences for axonal integrity. *Mitochondrion.* 12, 173-179.

Cantuti-Castelvetri,L., Zhu,H., Givogri,M.I., Chidavaenzi,R.L., Lopez-Rosas,A., and Bongarzone,E.R. (2012). Psychosine induces the dephosphorylation of neurofilaments by deregulation of PP1 and PP2A phosphatases. *Neurobiol. Dis.* 46, 325-335.

Cartier,N., Lopez,J., Moullier,P., Rocchiccioli,F., Rolland,M.O., Jorge,P., Mosser,J., Mandel,J.L., Bougneres,P.F., Danos,O., and . (1995). Retroviral-mediated gene transfer corrects very-long-chain fatty acid metabolism in adrenoleukodystrophy fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 1674-1678.

Centonze,D., Muzio,L., Rossi,S., Furlan,R., Bernardi,G., and Martino,G. (2010). The link between inflammation, synaptic transmission and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Cell Death. Differ.* 17, 1083-1091.

Chalon,S., Vancassel,S., Zimmer,L., Guilloteau,D., and Durand,G. (2001). Polyunsaturated fatty acids and cerebral function: focus on monoaminergic neurotransmission. *Lipids* 36, 937-944.

Chaves,A.P. Nacimiento, fines y objetivos de la fundación Lucia alas de esperanza para las leucodistrofias. Fundación Lucia alas de esperanza. 2012.

Ref Type: Pamphlet

Chen,H., and Chan,D.C. (2005). Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum. Mol. Genet.* 14 *Spec No. 2*, R283-R289.

Chen,Y., Balasubramanian,V., Peng,J., Hurlock,E.C., Tallquist,M., Li,J., and Lu,Q.R. (2007). Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. *Nat. Protoc.* 2, 1044-1051.

Cheng,C.M., Joncas,G., Reinhardt,R.R., Farrer,R., Quarles,R., Janssen,J., McDonald,M.P., Crawley,J.N., Powell-Braxton,L., and Bondy,C.A. (1998). Biochemical and morphometric analyses show that myelination in the insulin-like growth factor 1 null brain is proportionate to its neuronal composition. *J. Neurosci.* 18, 5673-5681.

Contreras,M., Mosser,J., Mandel,J.L., Aubourg,P., and Singh,I. (1994). The protein coded by the X-adrenoleukodystrophy gene is a peroxisomal integral membrane protein. *FEBS Lett.* 344, 211-215.

Contreras,M.A., Haq,E., Uto,T., Singh,I., and Singh,A.K. (2008). Psychosine-induced alterations in peroxisomes of twitcher mouse liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 477, 211-218.

Coras,R., Holsken,A., Seufert,S., Hauke,J., Eyupoglu,I.Y., Reichel,M., Trankle,C., Siebzehrubl,F.A., Buslei,R., Blumcke,I., and Hahnen,E. (2007). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist troglitazone inhibits transforming growth factor-beta-mediated glioma cell migration and brain invasion. *Mol. Cancer Ther.* 6, 1745-1754.

Cui,M., Tang,X., Christian,W.V., Yoon,Y., and Tieu,K. (2010). Perturbations in mitochondrial dynamics induced by human mutant PINK1 can be rescued by the mitochondrial division inhibitor mdivi-1. *J. Biol. Chem.* 285, 11740-11752.

Cui,Q.L., and Almazan,G. (2007). IGF-I-induced oligodendrocyte progenitor proliferation requires PI3K/Akt, MEK/ERK, and Src-like tyrosine kinases. *J. Neurochem.* 100, 1480-1493.

Dai,J., Bercury,K.K., and Macklin,W.B. (2014). Interaction of mTOR and Erk1/2 signaling to regulate oligodendrocyte differentiation. *Glia* 62, 2096-2109.

Datta,S.R., Dudek,H., Tao,X., Masters,S., Fu,H., Gotoh,Y., and Greenberg,M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.

Davidson,P.M., Denais,C., Bakshi,M.C., and Lammerding,J. (2014). Nuclear deformability constitutes a rate-limiting step during cell migration in 3-D environments. *Cell Mol. Bioeng.* 7, 293-306.

Di,B.A., and Salvati,S. (1997). Exogenous lipids in myelination and myelination. *Kaohsiung. J. Med. Sci.* 13, 19-29.

Diab,A., Deng,C., Smith,J.D., Hussain,R.Z., Phanavanh,B., Lovett-Racke,A.E., Drew,P.D., and Racke,M.K. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 168, 2508-2515.

DiMauro,S., and Schon,E.A. (2003). Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N. Engl. J. Med.* 348, 2656-2668.

Dowhan,W., Bogdanov,M., and Mileykovskaya,E. (2008). Functional roles of lipids in membranes. In *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes.*, D.E. Vance, and F.E. Vance, eds. Elsevier), pp. 1-37.

Duan,C., and Xu,Q. (2005). Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *Gen. Comp Endocrinol.* 142, 44-52.

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

Etgen,G.J., and Mantlo,N. (2003). PPAR ligands for metabolic disorders. *Curr. Top. Med. Chem.* 3, 1649-1661.

Fajas,L., Debril,M.B., and Auwerx,J. (2001). PPAR gamma: an essential role in metabolic control. *Nutr. Metab Cardiovasc. Dis.* 11, 64-69.

Feinstein,D.L., Galea,E., Gavriilyuk,V., Brosnan,C.F., Whitacre,C.C., Dumitrescu-Ozimek,L., Landreth,G.E., Pershadsingh,H.A., Weinberg,G., and Heneka,M.T. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists prevent experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann. Neurol.* 51, 694-702.

Fernandez-Marcos,P.J., and Auwerx,J. (2011). Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am. J. Clin. Nutr.* 93, 884S-8890.

Ferrer,I., Aubourg,P., and Pujol,A. (2010). General aspects and neuropathology of X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol.* 20, 817-830.

Flavigny,E., Sanhaj,A., Aubourg,P., and Cartier,N. (1999). Retroviral-mediated adrenoleukodystrophy-related gene transfer corrects very long chain fatty acid metabolism in adrenoleukodystrophy fibroblasts: implications for therapy. *FEBS Lett.* *448*, 261-264.

Flores,A.I., Narayanan,S.P., Morse,E.N., Shick,H.E., Yin,X., Kidd,G., Avila,R.L., Kirschner,D.A., and Macklin,W.B. (2008). Constitutively active Akt induces enhanced myelination in the CNS. *J. Neurosci.* *28*, 7174-7183.

Formichi,P., Radi,E., Battisti,C., Pasqui,A., Pompella,G., Lazzerini,P.E., Laghi-Pasini,F., Leonini,A., Di,S.A., and Federico,A. (2007). Psychosine-induced apoptosis and cytokine activation in immune peripheral cells of Krabbe patients. *J. Cell Physiol* *212*, 737-743.

Forss-Petter,S., Werner,H., Berger,J., Lassmann,H., Molzer,B., Schwab,M.H., Bernheimer,H., Zimmermann,F., and Nave,K.A. (1997). Targeted inactivation of the X-linked adrenoleukodystrophy gene in mice. *J. Neurosci. Res.* *50*, 829-843.

Fourcade,S., Lopez-Erauskin,J., Ruiz,M., Ferrer,I., and Pujol,A. (2014). Mitochondrial dysfunction and oxidative damage cooperatively fuel axonal degeneration in X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochimie* *98*, 143-149.

Gavva,N.R., Wen,S.C., Daftari,P., Moniwa,M., Yang,W.M., Yang-Feng,L.P., Seto,E., Davie,J.R., and Shen,C.K. (2002). NAPP2, a peroxisomal membrane protein, is also a transcriptional corepressor. *Genomics* *79*, 423-431.

Giannakopoulou,A., Grigoriadis,N., Polyzoidou,E., Loubopoulos,A., Michaloudi,E., and Papadopoulos,G.C. (2011). Time-dependent fate of transplanted neural precursor cells in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Exp. Neurol.* *230*, 16-26.

Giraud,S., Greco,A., Brink,M., Diaz,J.J., and Delafontaine,P. (2001). Translation initiation of the insulin-like growth factor I receptor mRNA is mediated by an internal ribosome entry site. *J. Biol. Chem.* *276*, 5668-5675.

Giri,S., Jatana,M., Rattan,R., Won,J.S., Singh,I., and Singh,A.K. (2002). Galactosylsphingosine (psychosine)-induced expression of cytokine-mediated inducible nitric oxide synthases via AP-1 and C/EBP: implications for Krabbe disease. *FASEB J.* *16*, 661-672.

Giri,S., Khan,M., Nath,N., Singh,I., and Singh,A.K. (2008). The role of AMPK in psychosine mediated effects on oligodendrocytes and astrocytes: implication for Krabbe disease. *J. Neurochem.* *105*, 1820-1833.

Giri,S., Khan,M., Rattan,R., Singh,I., and Singh,A.K. (2006). Krabbe disease: psychosine-mediated activation of phospholipase A2 in oligodendrocyte cell death. *J. Lipid Res.* 47, 1478-1492.

Haerberlein,S.L. (2004). Mitochondrial function in apoptotic neuronal cell death. *Neurochem. Res.* 29, 521-530.

Hamilton,J.A., and Brunaldi,K. (2007). A model for fatty acid transport into the brain. *J. Mol. Neurosci.* 33, 12-17.

Han,S., Lv,X., Wang,Y., Gong,H., Zhang,C., Tong,A., Zhang,B., and Yao,H. (2015). Effect and mechanism of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on the drug resistance of the U-87 MG/CDDP human malignant glioma cell line. *Mol. Med. Rep.* 12, 2239-2246.

Haq,E., Contreras,M.A., Giri,S., Singh,I., and Singh,A.K. (2006). Dysfunction of peroxisomes in twitcher mice brain: a possible mechanism of psychosine-induced disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343, 229-238.

Haq,E., Giri,S., Singh,I., and Singh,A.K. (2003). Molecular mechanism of psychosine-induced cell death in human oligodendrocyte cell line. *J. Neurochem.* 86, 1428-1440.

Hara,K., Maruki,Y., Long,X., Yoshino,K., Oshiro,N., Hidayat,S., Tokunaga,C., Avruch,J., and Yonezawa,K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110, 177-189.

Hardie,D.G. (2004). The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J. Cell Sci.* 117, 5479-5487.

Hardie,D.G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 774-785.

Hardie,D.G. (2015). AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 33, 1-7.

Hardie,D.G., Ross,F.A., and Hawley,S.A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 251-262.

Hardie,D.G., Schaffer,B.E., and Brunet,A. (2016). AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends Cell Biol.* 26, 190-201.

Hashimoto,T., Cook,W.S., Qi,C., Yeldandi,A.V., Reddy,J.K., and Rao,M.S. (2000). Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. *J. Biol. Chem.* 275, 28918-28928.

Hawkins,B.T., and Davis,T.P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev.* 57, 173-185.

Hawkins-Salsbury,J.A., Parameswar,A.R., Jiang,X., Schlesinger,P.H., Bongarzone,E., Ory,D.S., Demchenko,A.V., and Sands,M.S. (2013). Psychosine, the cytotoxic sphingolipid that accumulates in globoid cell leukodystrophy, alters membrane architecture. *J. Lipid Res.* 54, 3303-3311.

Hein,S., Schonfeld,P., Kahlert,S., and Reiser,G. (2008). Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy-associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1750-1761.

Heneka,M.T., and Landreth,G.E. (2007). PPARs in the brain. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 1031-1045.

Hengartner,M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.

Herzig,S., and Martinou,J.C. (2008). Mitochondrial dynamics: to be in good shape to survive. *Curr. Mol. Med.* 8, 131-137.

Hess,R., Staubli,W., and Riess,W. (1965). Nature of the hepatomegaly effect produced by ethyl-chlorophenoxy-isobutyrate in the rat. *Nature* 208, 856-858.

Hirsch,E., Costa,C., and Ciruolo,E. (2007). Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling. *J. Endocrinol.* 194, 243-256.

Ho,J.K., Moser,H., Kishimoto,Y., and Hamilton,J.A. (1995). Interactions of a very long chain fatty acid with model membranes and serum albumin. Implications for the pathogenesis of adrenoleukodystrophy. *J. Clin. Invest* 96, 1455-1463.

Holmes,L., Cornes,M.J., Foldi,B., Miller,F., and Dabney,K. (2011). Clinical epidemiologic characterization of orthopaedic and neurological manifestations in children with leukodystrophies. *J. Pediatr. Orthop.* 31, 587-593.

Holzinger,A., Kammerer,S., and Roscher,A.A. (1997). Primary structure of human PMP69, a putative peroxisomal ABC-transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 152-157.

Hondares,E., Mora,O., Yubero,P., Rodriguez de la,C.M., Iglesias,R., Giralt,M., and Villarroya,F. (2006). Thiazolidinediones and rexinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1alpha gene transcription: an autoregulatory loop controls PGC-1alpha expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivation. *Endocrinology* 147, 2829-2838.

Hoppener,J.W., de Pagter-Holthuis,P., Geurts van Kessel,A.H., Jansen,M., Kittur,S.D., Antonarakis,S.E., Lips,C.J., and Sussenbach,J.S. (1985). The human

gene encoding insulin-like growth factor I is located on chromosome 12. *Hum. Genet.* 69, 157-160.

Huang,E.J., and Reichardt,L.F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 609-642.

Huang,W., Andras,I.E., Rha,G.B., Hennig,B., and Toborek,M. (2011). PPAR α and PPAR γ protect against HIV-1-induced MMP-9 overexpression via caveolae-associated ERK and Akt signaling. *FASEB J.* 25, 3979-3988.

Hunt,M.C., and Alexson,S.E. (2008). Novel functions of acyl-CoA thioesterases and acyltransferases as auxiliary enzymes in peroxisomal lipid metabolism. *Prog. Lipid Res.* 47, 405-421.

Igarashi,M., Schaumburg,H.H., Powers,J., Kishimoto,Y., Kolodny,E., and Suzuki,K. (1976). Fatty acid abnormality in adrenoleukodystrophy. *J. Neurochem.* 26, 851-860.

Inoki,K., Zhu,T., and Guan,K.L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115, 577-590.

Jacinto,E., Facchinetti,V., Liu,D., Soto,N., Wei,S., Jung,S.Y., Huang,Q., Qin,J., and Su,B. (2006). SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 127, 125-137.

Jacinto,E., Loewith,R., Schmidt,A., Lin,S., Ruegg,M.A., Hall,A., and Hall,M.N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell Biol.* 6, 1122-1128.

Jackman,N., Ishii,A., and Bansal,R. (2009). Oligodendrocyte development and myelin biogenesis: parsing out the roles of glycosphingolipids. *Physiology*. (Bethesda.) 24, 290-297.

Jana,A., and Pahan,K. (2010). Sphingolipids in multiple sclerosis. *Neuromolecular Med.* 12, 351-361.

Jatana,M., Giri,S., and Singh,A.K. (2002). Apoptotic positive cells in Krabbe brain and induction of apoptosis in rat C6 glial cells by psychosine. *Neurosci. Lett.* 330, 183-187.

Jay,M.A., and Ren,J. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Curr. Diabetes Rev.* 3, 33-39.

Jones,J.I., and Clemmons,D.R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 16, 3-34.

Jurevics,H., and Morell,P. (1995). Cholesterol for synthesis of myelin is made locally, not imported into brain. *J. Neurochem.* 64, 895-901.

Kamijo,K., Taketani,S., Yokota,S., Osumi,T., and Hashimoto,T. (1990). The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily. *J. Biol. Chem.* 265, 4534-4540.

Kamp,F., and Hamilton,J.A. (2006). How fatty acids of different chain length enter and leave cells by free diffusion. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 75, 149-159.

Kanazawa,T., Nakamura,S., Momoi,M., Yamaji,T., Takematsu,H., Yano,H., Sabe,H., Yamamoto,A., Kawasaki,T., and Kozutsumi,Y. (2000). Inhibition of cytokinesis by a lipid metabolite, psychosine. *J. Cell Biol.* 149, 943-950.

Kassmann,C.M., Lappe-Siefke,C., Baes,M., Brugger,B., Mildner,A., Werner,H.B., Natt,O., Michaelis,T., Prinz,M., Frahm,J., and Nave,K.A. (2007). Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nat. Genet.* 39, 969-976.

Kemp,S., Berger,J., and Aubourg,P. (2012). X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, metabolic, genetic and pathophysiological aspects. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 1465-1474.

Kemp,S., Pujol,A., Waterham,H.R., van Geel,B.M., Boehm,C.D., Raymond,G.V., Cutting,G.R., Wanders,R.J., and Moser,H.W. (2001). ABCD1 mutations and the X-linked adrenoleukodystrophy mutation database: role in diagnosis and clinical correlations. *Hum. Mutat.* 18, 499-515.

Kemp,S., and Wanders,R. (2010). Biochemical aspects of X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol.* 20, 831-837.

Kemp,S., Wei,H.M., Lu,J.F., Braiterman,L.T., McGuinness,M.C., Moser,A.B., Watkins,P.A., and Smith,K.D. (1998). Gene redundancy and pharmacological gene therapy: implications for X-linked adrenoleukodystrophy. *Nat. Med.* 4, 1261-1268.

Khan,M., Haq,E., Giri,S., Singh,I., and Singh,A.K. (2005). Peroxisomal participation in psychosine-mediated toxicity: implications for Krabbe's disease. *J. Neurosci. Res.* 80, 845-854.

Khan,M., Pahan,K., Singh,A.K., and Singh,I. (1998). Cytokine-induced accumulation of very long-chain fatty acids in rat C6 glial cells: implication for X-adrenoleukodystrophy. *J. Neurochem.* 71, 78-87.

Kilter,H., Werner,M., Roggia,C., Reil,J.C., Schafers,H.J., Kintscher,U., and Bohm,M. (2009). The PPAR-gamma agonist rosiglitazone facilitates Akt rephosphorylation

and inhibits apoptosis in cardiomyocytes during hypoxia/reoxygenation. *Diabetes Obes. Metab* 11, 1060-1067.

Kim,D.H., Sarbassov,D.D., Ali,S.M., King,J.E., Latek,R.R., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., and Sabatini,D.M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, 163-175.

Kim,D.H., Sarbassov,D.D., Ali,S.M., Latek,R.R., Guntur,K.V., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., and Sabatini,D.M. (2003). GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol. Cell* 11, 895-904.

Kim,J., Han,D.C., Kim,J.M., Lee,S.Y., Kim,S.J., Woo,J.R., Lee,J.W., Jung,S.K., Yoon,K.S., Cheon,H.G., Kim,S.S., Hong,S.H., and Kwon,B.M. (2009). PPAR gamma partial agonist, KR-62776, inhibits adipocyte differentiation via activation of ERK. *Cell Mol. Life Sci.* 66, 1766-1781.

Kim,P.K., Mullen,R.T., Schumann,U., and Lippincott-Schwartz,J. (2006). The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo PEX16-dependent pathway from the ER. *J. Cell Biol.* 173, 521-532.

Knazek,R.A., Rizzo,W.B., Schulman,J.D., and Dave,J.R. (1983). Membrane microviscosity is increased in the erythrocytes of patients with adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. *J. Clin. Invest* 72, 245-248.

Kobayashi,T., Shinnoh,N., Kondo,A., and Yamada,T. (1997). Adrenoleukodystrophy protein-deficient mice represent abnormality of very long chain fatty acid metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232, 631-636.

Kohler,W., Curiel,J., and Vanderver,A. (2018). Adulthood leukodystrophies. *Nat. Rev. Neurol.* 14, 94-105.

Kohlschutter,A., and Eichler,F. (2011). Childhood leukodystrophies: a clinical perspective. *Expert. Rev. Neurother.* 11, 1485-1496.

Kolodny,E.H., Raghavan,S., and Krivit,W. (1991). Late-onset Krabbe disease (globoid cell leukodystrophy): clinical and biochemical features of 15 cases. *Dev. Neurosci.* 13, 232-239.

Komoly,S., Hudson,L.D., Webster,H.D., and Bondy,C.A. (1992). Insulin-like growth factor I gene expression is induced in astrocytes during experimental demyelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 1894-1898.

Largani,S.H.H., Borhani-Haghighi,M., Pasbakhsh,P., Mahabadi,V.P., Nekoonam,S., Shiri,E., Kashani,I.R., and Zendejdel,A. (2019). Oligoprotective effect of metformin

through the AMPK-dependent on restoration of mitochondrial hemostasis in the cuprizone-induced multiple sclerosis model. *J. Mol. Histol.* *50*, 263-271.

Launay,N., Aguado,C., Fourcade,S., Ruiz,M., Grau,L., Riera,J., Guilera,C., Giros,M., Ferrer,I., Knecht,E., and Pujol,A. (2015). Autophagy induction halts axonal degeneration in a mouse model of X-adrenoleukodystrophy. *Acta Neuropathol.* *129*, 399-415.

Launay,N., Ruiz,M., Fourcade,S., Schluter,A., Guilera,C., Ferrer,I., Knecht,E., and Pujol,A. (2013). Oxidative stress regulates the ubiquitin-proteasome system and immunoproteasome functioning in a mouse model of X-adrenoleukodystrophy. *Brain* *136*, 891-904.

Le,R.D., Bondy,C., Yakar,S., Liu,J.L., and Butler,A. (2001). The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr. Rev.* *22*, 53-74.

Lebrun-Julien,F., Bachmann,L., Norrmen,C., Trotschmuller,M., Kofeler,H., Ruegg,M.A., Hall,M.N., and Suter,U. (2014). Balanced mTORC1 activity in oligodendrocytes is required for accurate CNS myelination. *J. Neurosci.* *34*, 8432-8448.

Ledesma,M.D., Martin,M.G., and Dotti,C.G. (2012). Lipid changes in the aged brain: effect on synaptic function and neuronal survival. *Prog. Lipid Res.* *51*, 23-35.

Lee,Y.J., Jeong,S.Y., Karbowski,M., Smith,C.L., and Youle,R.J. (2004). Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol. Biol. Cell* *15*, 5001-5011.

Lehninger,A.L. (2003). Lípidos, lipoproteínas y membranas. In *Bioquímica, Las bases moleculares de la estructura y función celular.*, S.A. Ediciones Omega, ed. (Barcelona: 2003), pp. 285-339.

Li,B., and Dou,Q.P. (2000). Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 3850-3855.

Li,X., Baumgart,E., Dong,G.X., Morrell,J.C., Jimenez-Sanchez,G., Valle,D., Smith,K.D., and Gould,S.J. (2002). PEX11alpha is required for peroxisome proliferation in response to 4-phenylbutyrate but is dispensable for peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated peroxisome proliferation. *Mol. Cell Biol.* *22*, 8226-8240.

Li,X., Yu,W., Qian,X., Xia,Y., Zheng,Y., Lee,J.H., Li,W., Lyu,J., Rao,G., Zhang,X., Qian,C.N., Rozen,S.G., Jiang,T., and Lu,Z. (2017). Nucleus-Translocated ACS2 Promotes Gene Transcription for Lysosomal Biogenesis and Autophagy. *Mol. Cell* *66*, 684-697.

Liesa,M., Palacin,M., and Zorzano,A. (2009). Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev.* 89, 799-845.

Liu,X., Li,Y., Zhang,Y., Lu,Y., Guo,W., Liu,P., Zhou,J., Xiang,Z., and He,C. (2011). SHP-2 promotes the maturation of oligodendrocyte precursor cells through Akt and ERK1/2 signaling in vitro. *PLoS. One.* 6, e21058.

Lombard-Platet,G., Savary,S., Sarde,C.O., Mandel,J.L., and Chimini,G. (1996). A close relative of the adrenoleukodystrophy (ALD) gene codes for a peroxisomal protein with a specific expression pattern. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 1265-1269.

Lopez-Erauskin,J., Galino,J., Bianchi,P., Fourcade,S., Andreu,A.L., Ferrer,I., Munoz-Pinedo,C., and Pujol,A. (2012). Oxidative stress modulates mitochondrial failure and cyclophilin D function in X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain* 135, 3584-3598.

Lopez-Erauskin,J., Galino,J., Ruiz,M., Cuezva,J.M., Fabregat,I., Cacabelos,D., Boada,J., Martinez,J., Ferrer,I., Pamplona,R., Villarroya,F., Portero-Otin,M., Fourcade,S., and Pujol,A. (2013). Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in the peroxisomal disease X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 22, 3296-3305.

Lovett-Racke,A.E., Hussain,R.Z., Northrop,S., Choy,J., Rocchini,A., Matthes,L., Chavis,J.A., Diab,A., Drew,P.D., and Racke,M.K. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists as therapy for autoimmune disease. *J. Immunol.* 172, 5790-5798.

Lu,J.F., Lawler,A.M., Watkins,P.A., Powers,J.M., Moser,A.B., Moser,H.W., and Smith,K.D. (1997). A mouse model for X-linked adrenoleukodystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 9366-9371.

Madathil,S.K., Carlson,S.W., Brelsfoard,J.M., Ye,P., D'Ercole,A.J., and Saatman,K.E. (2013). Astrocyte-Specific Overexpression of Insulin-Like Growth Factor-1 Protects Hippocampal Neurons and Reduces Behavioral Deficits following Traumatic Brain Injury in Mice. *PLoS. One.* 8, e67204.

Mahad,D.J., Ziabreva,I., Campbell,G., Lax,N., White,K., Hanson,P.S., Lassmann,H., and Turnbull,D.M. (2009). Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis. *Brain* 132, 1161-1174.

Maier,E.M., Mayerhofer,P.U., Asheuer,M., Kohler,W., Rothe,M., Muntau,A.C., Roscher,A.A., Holzinger,A., Aubourg,P., and Berger,J. (2008). X-linked adrenoleukodystrophy phenotype is independent of ABCD2 genotype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 176-180.

Martínez-Galarza,D.E. Neuroprotección conferida por agonistas PPARs e IGF1 y su impacto en vías de supervivencia en dos modelos in vitro de la enfermedad de Krabbe. 2014. Universidad Nacional de Colombia.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Martínez-Galarza,D.E., Rojas,L., Jaramillo-Gómez,J.A., and Arboleda,G. Efecto de los agonistas PPARs e IGF1 sobre la supervivencia celular en un modelo endógeno *in vitro* de la enfermedad de Krabbe. 2014. Universidad Nacional de Colombia.

Ref Type: Unpublished Work

Mason,J.L., Xuan,S., Dragatsis,I., Efstratiadis,A., and Goldman,J.E. (2003). Insulin-like growth factor (IGF) signaling through type 1 IGF receptor plays an important role in remyelination. *J. Neurosci.* 23, 7710-7718.

Mastroeni,R., Bensadoun,J.C., Charvin,D., Aebischer,P., Pujol,A., and Raoul,C. (2009). Insulin-like growth factor-1 and neurotrophin-3 gene therapy prevents motor decline in an X-linked adrenoleukodystrophy mouse model. *Ann. Neurol.* 66, 117-122.

Matsukawa,T., Asheuer,M., Takahashi,Y., Goto,J., Suzuki,Y., Shimosawa,N., Takano,H., Onodera,O., Nishizawa,M., Aubourg,P., and Tsuji,S. (2011). Identification of novel SNPs of ABCD1, ABCD2, ABCD3, and ABCD4 genes in patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) based on comprehensive resequencing and association studies with ALD phenotypes. *Neurogenetics.* 12, 41-50.

Mattson,M.P., and Kroemer,G. (2003). Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol. Med.* 9, 196-205.

Maxfield,F.R., and Wustner,D. (2002). Intracellular cholesterol transport. *J. Clin. Invest* 110, 891-898.

McCarthy,K.D., and de,V.J. (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.* 85, 890-902.

McLaurin,J., Trudel,G.C., Shaw,I.T., Antel,J.P., and Cashman,N.R. (1995). A human glial hybrid cell line differentially expressing genes subserving oligodendrocyte and astrocyte phenotype. *J. Neurobiol.* 26, 283-293.

Mijaljica,D., Prescott,M., and Devenish,R.J. (2010). The intricacy of nuclear membrane dynamics during nucleophagy. *Nucleus.* 1, 213-223.

Miranda,C.O., Brites,P., Sousa,M.M., and Teixeira,C.A. (2012). Advances and Pitfalls of Cell Therapy in Metabolic Leukodystrophies. *Cell Transplant.*

Moser,H.W., Moser,A.E., Singh,I., and O'Neill,B.P. (1984). Adrenoleukodystrophy: survey of 303 cases: biochemistry, diagnosis, and therapy. *Ann. Neurol.* 16, 628-641.

Mouille,V.S., Cansell,C., Luquet,S., and Cruciani-Guglielmacci,C. (2012). The multiple roles of fatty acid handling proteins in brain. *Front Physiol* 3, 385.

Moxham,C.P., Duronio,V., and Jacobs,S. (1989). Insulin-like growth factor I receptor beta-subunit heterogeneity. Evidence for hybrid tetramers composed of insulin-like growth factor I and insulin receptor heterodimers. *J. Biol. Chem.* 264, 13238-13244.

Narayanan,S.P., Flores,A.I., Wang,F., and Macklin,W.B. (2009). Akt signals through the mammalian target of rapamycin pathway to regulate CNS myelination. *J. Neurosci.* 29, 6860-6870.

Natarajan,C., and Bright,J.J. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists inhibit experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 production, IL-12 signaling and Th1 differentiation. *Genes Immun.* 3, 59-70.

Nave,K.A. (2010). Myelination and the trophic support of long axons. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 275-283.

Neman,J., and de,V.J. (2012). A method for deriving homogenous population of oligodendrocytes from mouse embryonic stem cells. *Dev. Neurobiol.* 72, 777-788.

Netik,A., Forss-Petter,S., Holzinger,A., Molzer,B., Unterrainer,G., and Berger,J. (1999). Adrenoleukodystrophy-related protein can compensate functionally for adrenoleukodystrophy protein deficiency (X-ALD): implications for therapy. *Hum. Mol. Genet.* 8, 907-913.

Niino,M., Iwabuchi,K., Kikuchi,S., Ato,M., Morohashi,T., Ogata,A., Tashiro,K., and Onoe,K. (2001). Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice by an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J. Neuroimmunol.* 116, 40-48.

Norrmen,C., and Suter,U. (2013). Akt/mTOR signalling in myelination. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 944-950.

O'Brien,J.S., and Sampson,E.L. (1965). Myelin Membrane: a molecular abnormality. *Science* 150, 1613-1614.

O'Meara,R.W., Ryan,S.D., Colognato,H., and Kothary,R. (2011). Derivation of enriched oligodendrocyte cultures and oligodendrocyte/neuron myelinating co-cultures from post-natal murine tissues. *J. Vis. Exp.*

Oezen,I., Rossmannith,W., Forss-Petter,S., Kemp,S., Voigtlander,T., Moser-Thier,K., Wanders,R.J., Bittner,R.E., and Berger,J. (2005). Accumulation of very long-chain fatty acids does not affect mitochondrial function in adrenoleukodystrophy protein deficiency. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1127-1137.

Orsini,J.J., Kay,D.M., Saavedra-Matiz,C.A., Wenger,D.A., Duffner,P.K., Erbe,R.W., Biski,C., Martin,M., Krein,L.M., Nichols,M., Kurtzberg,J., Escolar,M.L., Adams,D.J., Arnold,G.L., Iglesias,A., Galvin-Parton,P., Kronn,D.F., Kwon,J.M., Levy,P.A., Pellegrino,J.E., Shur,N., Wasserstein,M.P., and Caggana,M. (2016). Newborn screening for Krabbe disease in New York State: the first eight years' experience. *Genet. Med.* 18, 239-248.

Owada,Y. (2008). Fatty acid binding protein: localization and functional significance in the brain. *Tohoku J. Exp. Med.* 214, 213-220.

Pai,G.S., Khan,M., Barbosa,E., Key,L.L., Craver,J.R., Cure,J.K., Betros,R., and Singh,I. (2000). Lovastatin therapy for X-linked adrenoleukodystrophy: clinical and biochemical observations on 12 patients. *Mol. Genet. Metab* 69, 312-322.

Paintlia,A.S., Gilg,A.G., Khan,M., Singh,A.K., Barbosa,E., and Singh,I. (2003). Correlation of very long chain fatty acid accumulation and inflammatory disease progression in childhood X-ALD: implications for potential therapies. *Neurobiol. Dis.* 14, 425-439.

Pang,Y., Zheng,B., Fan,L.W., Rhodes,P.G., and Cai,Z. (2007). IGF-1 protects oligodendrocyte progenitors against TNFalpha-induced damage by activation of PI3K/Akt and interruption of the mitochondrial apoptotic pathway. *Glia* 55, 1099-1107.

Parikh,S., Bernard,G., Leventer,R.J., van der Knaap,M.S., van,H.J., Pizzino,A., McNeill,N.H., Helman,G., Simons,C., Schmidt,J.L., Rizzo,W.B., Patterson,M.C., Taft,R.J., and Vanderver,A. (2015). A clinical approach to the diagnosis of patients with leukodystrophies and genetic leukoencephalopathies. *Mol. Genet. Metab* 114, 501-515.

Pearson,G., Robinson,F., Beers,G.T., Xu,B.E., Karandikar,M., Berman,K., and Cobb,M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22, 153-183.

Peiris,M., Monteith,G.R., Roberts-Thomson,S.J., and Cabot,P.J. (2007). A model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice for the characterisation of intervention therapies. *J. Neurosci. Methods* 163, 245-254.

Pisanu,A., Lecca,D., Mulas,G., Wardas,J., Simbula,G., Spiga,S., and Carta,A.R. (2014). Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after

PPAR-gamma agonist neuroprotective treatment in the MPTPp mouse model of progressive Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* *71*, 280-291.

Pizzuti,A., and Petrucci,S. (2011). Mitochondrial dysfunction as a cause of ALS. *Arch. Ital. Biol.* *149*, 113-119.

Pluchino,S., and Martino,G. (2008). The therapeutic plasticity of neural stem/precursor cells in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* *265*, 105-110.

Pluchino,S., Muzio,L., Imitola,J., Deleidi,M., Faro-Cervello,C., Salani,G., Porcheri,C., Brambilla,E., Cavasinni,F., Bergamaschi,A., Garcia-Verdugo,J.M., Comi,G., Khoury,S.J., and Martino,G. (2008). Persistent inflammation alters the function of the endogenous brain stem cell compartment. *Brain* *131*, 2564-2578.

Polak,P.E., Kalinin,S., Dello,R.C., Gavriyuk,V., Sharp,A., Peters,J.M., Richardson,J., Willson,T.M., Weinberg,G., and Feinstein,D.L. (2005). Protective effects of a peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta agonist in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* *168*, 65-75.

Powers,J.M., DeCiero,D.P., Ito,M., Moser,A.B., and Moser,H.W. (2000). Adrenomyeloneuropathy: a neuropathologic review featuring its noninflammatory myelopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *59*, 89-102.

Powers,J.M., Liu,Y., Moser,A.B., and Moser,H.W. (1992). The inflammatory myelinopathy of adreno-leukodystrophy: cells, effector molecules, and pathogenetic implications. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *51*, 630-643.

Powers,J.M., and Rubio,A. (1995). Selected leukodystrophies. *Semin. Pediatr. Neurol.* *2*, 200-210.

Puche,J.E., and Castilla-Cortazar,I. (2012). Human conditions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficiency. *J. Transl. Med.* *10*, 224.

Pujol,A., Ferrer,I., Camps,C., Metzger,E., Hindelang,C., Callizot,N., Ruiz,M., Pampols,T., Giros,M., and Mandel,J.L. (2004). Functional overlap between ABCD1 (ALD) and ABCD2 (ALDR) transporters: a therapeutic target for X-adrenoleukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 2997-3006.

Pujol,A., Hindelang,C., Callizot,N., Bartsch,U., Schachner,M., and Mandel,J.L. (2002). Late onset neurological phenotype of the X-ALD gene inactivation in mice: a mouse model for adrenomyeloneuropathy. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 499-505.

Qin,L., Wang,Y., Tao,L., and Wang,Z. (2011). AKT down-regulates insulin-like growth factor-1 receptor as a negative feedback. *J. Biochem.* *150*, 151-156.

Raikwar,H.P., Muthian,G., Rajasingh,J., Johnson,C.N., and Bright,J.J. (2006). PPARgamma antagonists reverse the inhibition of neural antigen-specific Th1 response and experimental allergic encephalomyelitis by Ciglitazone and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *J. Neuroimmunol.* 178, 76-86.

Rao,J.S., Ertley,R.N., Lee,H.J., DeMar,J.C., Jr., Arnold,J.T., Rapoport,S.I., and Bazinet,R.P. (2007). n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation in rats decreases frontal cortex BDNF via a p38 MAPK-dependent mechanism. *Mol. Psychiatry* 12, 36-46.

Reguenga,C., Oliveira,M.E., Gouveia,A.M., Sa-Miranda,C., and Azevedo,J.E. (2001). Characterization of the mammalian peroxisomal import machinery: Pex2p, Pex5p, Pex12p, and Pex14p are subunits of the same protein assembly. *J. Biol. Chem.* 276, 29935-29942.

Richieri,G.V., and Kleinfeld,A.M. (1995). Unbound free fatty acid levels in human serum. *J. Lipid Res.* 36, 229-240.

Rohas,L.M., St-Pierre,J., Uldry,M., Jager,S., Handschin,C., and Spiegelman,B.M. (2007). A fundamental system of cellular energy homeostasis regulated by PGC-1alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 7933-7938.

Rong,J.X., Qiu,Y., Hansen,M.K., Zhu,L., Zhang,V., Xie,M., Okamoto,Y., Mattie,M.D., Higashiyama,H., Asano,S., Strum,J.C., and Ryan,T.E. (2007). Adipose mitochondrial biogenesis is suppressed in db/db and high-fat diet-fed mice and improved by rosiglitazone. *Diabetes* 56, 1751-1760.

Rosen,E.D., and Spiegelman,B.M. (2001). PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J. Biol. Chem.* 276, 37731-37734.

Roth,A.D., Leisewitz,A.V., Jung,J.E., Cassina,P., Barbeito,L., Inestrosa,N.C., and Bronfman,M. (2003). PPAR gamma activators induce growth arrest and process extension in B12 oligodendrocyte-like cells and terminal differentiation of cultured oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.* 72, 425-435.

Saher,G., Brugger,B., Lappe-Siefke,C., Mobius,W., Tozawa,R., Wehr,M.C., Wieland,F., Ishibashi,S., and Nave,K.A. (2005). High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat. Neurosci.* 8, 468-475.

Salminen,A., Kauppinen,A., and Kaarniranta,K. (2016). AMPK/Snf1 signaling regulates histone acetylation: Impact on gene expression and epigenetic functions. *Cell Signal.* 28, 887-895.

Saluja,I., Granneman,J.G., and Skoff,R.P. (2001). PPAR delta agonists stimulate oligodendrocyte differentiation in tissue culture. *Glia* 33, 191-204.

Sarbassov,D.D., Ali,S.M., Kim,D.H., Guertin,D.A., Latek,R.R., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., and Sabatini,D.M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* 14, 1296-1302.

Saxton,R.A., and Sabatini,D.M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168, 960-976.

Scarpulla,R.C. (2011). Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 1269-1278.

Schrader,M., Bonekamp,N.A., and Islinger,M. (2012). Fission and proliferation of peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 1343-1357.

Schrader,M., and Fahimi,H.D. (2004). Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem. Cell Biol.* 122, 383-393.

Schrader,M., and Fahimi,H.D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 1755-1766.

Schrader,M., and Fahimi,H.D. (2008). The peroxisome: still a mysterious organelle. *Histochem. Cell Biol.* 129, 421-440.

Schubert,D., Heinemann,S., Carlisle,W., Tarikas,H., Kimes,B., Patrick,J., Steinbach,J.H., Culp,W., and Brandt,B.L. (1974). Clonal cell lines from the rat central nervous system. *Nature* 249, 224-227.

Semmler,A., Kohler,W., Jung,H.H., Weller,M., and Linnebank,M. (2008). Therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. *Expert. Rev. Neurother.* 8, 1367-1379.

Shani,N., Jimenez-Sanchez,G., Steel,G., Dean,M., and Valle,D. (1997). Identification of a fourth half ABC transporter in the human peroxisomal membrane. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1925-1931.

Shao,D., Liu,Y., Liu,X., Zhu,L., Cui,Y., Cui,A., Qiao,A., Kong,X., Liu,Y., Chen,Q., Gupta,N., Fang,F., and Chang,Y. (2010). PGC-1 beta-regulated mitochondrial biogenesis and function in myotubes is mediated by NRF-1 and ERR alpha. *Mitochondrion.* 10, 516-527.

Shao,Z.Q., and Liu,Z.J. (2015). Neuroinflammation and neuronal autophagic death were suppressed via Rosiglitazone treatment: New evidence on neuroprotection in a rat model of global cerebral ischemia. *J. Neurol. Sci.* 349, 65-71.

Sharp,P., Johnson,D., and Poulos,A. (1991). Molecular species of phosphatidylcholine containing very long chain fatty acids in human brain:

enrichment in X-linked adrenoleukodystrophy brain and diseases of peroxisome biogenesis brain. *J. Neurochem.* 56, 30-37.

Sherman,D.L., and Brophy,P.J. (2005). Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 683-690.

Shi,Y. (2007). Orphan nuclear receptors in drug discovery. *Drug Discov. Today* 12, 440-445.

Singh,I. (1997). Biochemistry of peroxisomes in health and disease. *Mol. Cell Biochem.* 167, 1-29.

Singh,I., Khan,M., Key,L., and Pai,S. (1998). Lovastatin for X-linked adrenoleukodystrophy. *N. Engl. J. Med.* 339, 702-703.

Singh,I., Moser,A.E., Moser,H.W., and Kishimoto,Y. (1984). Adrenoleukodystrophy: impaired oxidation of very long chain fatty acids in white blood cells, cultured skin fibroblasts, and amniocytes. *Pediatr. Res.* 18, 286-290.

Singh,I., and Pujol,A. (2010). Pathomechanisms underlying X-adrenoleukodystrophy: a three-hit hypothesis. *Brain Pathol.* 20, 838-844.

Singh,I., Singh,A.K., and Contreras,M.A. (2009). Peroxisomal dysfunction in inflammatory childhood white matter disorders: an unexpected contributor to neuropathology. *J. Child Neurol.* 24, 1147-1157.

Singh,J., Khan,M., Pujol,A., Baarine,M., and Singh,I. (2013). Histone deacetylase inhibitor upregulates peroxisomal fatty acid oxidation and inhibits apoptotic cell death in abcd1-deficient glial cells. *PLoS. One.* 8, e70712.

Singh,J., Olle,B., Suhail,H., Felicella,M.M., and Giri,S. (2016). Metformin-induced mitochondrial function and ABCD2 up-regulation in X-linked adrenoleukodystrophy involves AMP-activated protein kinase. *J. Neurochem.* 138, 86-100.

Singh,J., Suhail,H., and Giri,S. (2015). Loss of AMP-activated protein kinase induces mitochondrial dysfunction and proinflammatory response in unstimulated Abcd1-knockout mice mixed glial cells. *Mediators. Inflamm.* 2015, 176983.

Sladek,F.M. (2011). What are nuclear receptor ligands? *Mol. Cell Endocrinol.* 334, 3-13.

Smith,B., Galbiati,F., Castelvetti,L.C., Givogri,M.I., Lopez-Rosas,A., and Bongarzone,E.R. (2011). Peripheral neuropathy in the Twitcher mouse involves the activation of axonal caspase 3. *ASN. Neuro.* 3.

Spiegelman,B.M. (2007). Transcriptional control of energy homeostasis through the PGC1 coactivators. *Novartis. Found. Symp.* 286, 3-6.

Stahl,A. (2004). A current review of fatty acid transport proteins (SLC27). *Pflugers Arch.* 447, 722-727.

Steinberg,S.J., Dodt,G., Raymond,G.V., Braverman,N.E., Moser,A.B., and Moser,H.W. (2006). Peroxisome biogenesis disorders. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 1733-1748.

Steinberg,S.J., Kemp,S., Braiterman,L.T., and Watkins,P.A. (1999). Role of very-long-chain acyl-coenzyme A synthetase in X-linked adrenoleukodystrophy. *Ann. Neurol.* 46, 409-412.

Steinberg,S.J., Moser,A.B., and Raymond,G.V. (1993). X-Linked Adrenoleukodystrophy.

Stoica,B.A., Movsesyan,V.A., Lea,P.M., and Faden,A.I. (2003). Ceramide-induced neuronal apoptosis is associated with dephosphorylation of Akt, BAD, FKHR, GSK-3beta, and induction of the mitochondrial-dependent intrinsic caspase pathway. *Mol. Cell Neurosci.* 22, 365-382.

Strasberg,P. (1986). Cerebrosides and psychosine disrupt mitochondrial functions. *Biochem. Cell Biol.* 64, 485-489.

Suh,H.S., Zhao,M.L., Derico,L., Choi,N., and Lee,S.C. (2013). Insulin-like growth factor 1 and 2 (IGF1, IGF2) expression in human microglia: differential regulation by inflammatory mediators. *J. Neuroinflammation.* 10, 37.

Sun,Y., Zheng,B., Zhang,X.H., He,M., Guo,Z.W., and Wen,J.K. (2014). PPAR-gamma agonist stabilizes KLF4 protein via activating Akt signaling and reducing KLF4 ubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443, 382-388.

Suzuki,K. (2003). Globoid cell leukodystrophy (Krabbe's disease): update. *J. Child Neurol.* 18, 595-603.

Suzuki,K., and Suzuki,K. (1983). The twitcher mouse. A model of human globoid cell leukodystrophy (krabbe's disease). *Am. J. Pathol.* 111, 394-397.

Suzuki,K., and Taniike,M. (1995). Murine model of genetic demyelinating disease: the twitcher mouse. *Microsc. Res. Tech.* 32, 204-214.

Svennerholm,L., and Stallberg-Stenhagen,S. (1968). Changes in the fatty acid composition of cerebrosides and sulfatides of human nervous tissue with age. *J. Lipid Res.* 9, 215-225.

Tan,N.S., Michalik,L., Desvergne,B., and Wahli,W. (2005). Multiple expression control mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptors and their target genes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 93, 99-105.

Tokunaga,K., Saitoh,N., Goldberg,I.G., Sakamoto,C., Yasuda,Y., Yoshida,Y., Yamanaka,S., and Nakao,M. (2014). Computational image analysis of colony and nuclear morphology to evaluate human induced pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* 4, 6996.

Treadway,J.L., Morrison,B.D., Goldfine,I.D., and Pessin,J.E. (1989). Assembly of insulin/insulin-like growth factor-1 hybrid receptors in vitro. *J. Biol. Chem.* 264, 21450-21453.

Troffer-Charlier,N., Doerflinger,N., Metzger,E., Fouquet,F., Mandel,J.L., and Aubourg,P. (1998). Mirror expression of adrenoleukodystrophy and adrenoleukodystrophy related genes in mouse tissues and human cell lines. *Eur. J. Cell Biol.* 75, 254-264.

Tsuji,S., Suzuki,M., Ariga,T., Sekine,M., Kuriyama,M., and Miyatake,T. (1981). Abnormality of long-chain fatty acids in erythrocyte membrane sphingomyelin from patients with adrenoleukodystrophy. *J. Neurochem.* 36, 1046-1049.

Valle,D., and Gartner,J. (1993). Human genetics. Penetrating the peroxisome. *Nature* 361, 682-683.

van der Knaap,M.S., and Bugiani,M. (2017). Leukodystrophies: a proposed classification system based on pathological changes and pathogenetic mechanisms. *Acta Neuropathol.* 134, 351-382.

van Geel,B.M., Bezman,L., Loes,D.J., Moser,H.W., and Raymond,G.V. (2001). Evolution of phenotypes in adult male patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Ann. Neurol.* 49, 186-194.

Vanderver,A., Hussey,H., Schmidt,J.L., Pastor,W., and Hoffman,H.J. (2012). Relative incidence of inherited white matter disorders in childhood to acquired pediatric demyelinating disorders. *Semin. Pediatr. Neurol.* 19, 219-223.

Vanderver,A., Prust,M., Tonduti,D., Mochel,F., Hussey,H.M., Helman,G., Garbern,J., Eichler,F., Labauge,P., Aubourg,P., Rodriguez,D., Patterson,M.C., Van Hove,J.L., Schmidt,J., Wolf,N.I., Boespflug-Tanguy,O., Schiffmann,R., and van der Knaap,M.S. (2015). Case definition and classification of leukodystrophies and leukoencephalopathies. *Mol. Genet. Metab* 114, 494-500.

Viswakarma,N., Jia,Y., Bai,L., Vluggens,A., Borensztajn,J., Xu,J., and Reddy,J.K. (2010). Coactivators in PPAR-Regulated Gene Expression. *PPAR. Res.* 2010.

Wahl,S.E., McLane,L.E., Bercury,K.K., Macklin,W.B., and Wood,T.L. (2014). Mammalian target of rapamycin promotes oligodendrocyte differentiation, initiation and extent of CNS myelination. *J. Neurosci.* *34*, 4453-4465.

Wanders,R.J. (1999). Peroxisomal disorders: clinical, biochemical, and molecular aspects. *Neurochem. Res.* *24*, 565-580.

Wanders,R.J., and Waterham,H.R. (2006). Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochim. Biophys. Acta* *1763*, 1707-1720.

Wang,X., Su,B., Lee,H.G., Li,X., Perry,G., Smith,M.A., and Zhu,X. (2009). Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* *29*, 9090-9103.

Wang,Y.X., Lee,C.H., Tiep,S., Yu,R.T., Ham,J., Kang,H., and Evans,R.M. (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* *113*, 159-170.

Wenger,D.A. (1993). Krabbe Disease.

Whitcomb,R.W., Linehan,W.M., and Knazek,R.A. (1988). Effects of long-chain, saturated fatty acids on membrane microviscosity and adrenocorticotropin responsiveness of human adrenocortical cells in vitro. *J. Clin. Invest* *81*, 185-188.

White,A.B., Galbiati,F., Givogri,M.I., Lopez,R.A., Qiu,X., van,B.R., and Bongarzone,E.R. (2011). Persistence of psychosine in brain lipid rafts is a limiting factor in the therapeutic recovery of a mouse model for Krabbe disease. *J. Neurosci. Res.* *89*, 352-364.

White,A.B., Givogri,M.I., Lopez-Rosas,A., Cao,H., van,B.R., Thinakaran,G., and Bongarzone,E.R. (2009). Psychosine accumulates in membrane microdomains in the brain of krabbe patients, disrupting the raft architecture. *J. Neurosci.* *29*, 6068-6077.

Wiesinger,C., Kunze,M., Regelsberger,G., Forss-Petter,S., and Berger,J. (2013). Impaired Very Long-Chain Acyl-CoA beta-Oxidation in Human X-ALD Fibroblasts Is a Direct Consequence of ABCD1 Transporter Dysfunction. *J. Biol. Chem.*

Won,J.S., Kim,J., Paintlia,M.K., Singh,I., and Singh,A.K. (2013). Role of endogenous psychosine accumulation in oligodendrocyte differentiation and survival: Implication for Krabbe disease. *Brain Res.* *1508*, 44-52.

Wood,T.L., Bercury,K.K., Cifelli,S.E., Mursch,L.E., Min,J., Dai,J., and Macklin,W.B. (2013). mTOR: a link from the extracellular milieu to transcriptional regulation of oligodendrocyte development. *ASN. Neuro.* *5*, e00108.

Woods,A., Dickerson,K., Heath,R., Hong,S.P., Momcilovic,M., Johnstone,S.R., Carlson,M., and Carling,D. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* 2, 21-33.

Woods,K.A., Camacho-Hubner,C., Savage,M.O., and Clark,A.J. (1996). Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N. Engl. J. Med.* 335, 1363-1367.

Wu,J.S., Lin,T.N., and Wu,K.K. (2009). Rosiglitazone and PPAR-gamma overexpression protect mitochondrial membrane potential and prevent apoptosis by upregulating anti-apoptotic Bcl-2 family proteins. *J. Cell Physiol* 220, 58-71.

Yamada,T., Taniwaki,T., Shinnoh,N., Uchiyama,A., Shimosawa,N., Ohyagi,Y., Asahara,H., and Kira,J. (1999). Adrenoleukodystrophy protein enhances association of very long-chain acyl-coenzyme A synthetase with the peroxisome. *Neurology* 52, 614-616.

Yoshimura,S.H., Kumeta,M., and Takeyasu,K. (2014). Structural mechanism of nuclear transport mediated by importin beta and flexible amphiphilic proteins. *Structure.* 22, 1699-1710.

Zaka,M., Rafi,M.A., Rao,H.Z., Luzi,P., and Wenger,D.A. (2005). Insulin-like growth factor-1 provides protection against psychosine-induced apoptosis in cultured mouse oligodendrocyte progenitor cells using primarily the PI3K/Akt pathway. *Mol. Cell Neurosci.* 30, 398-407.

Zaka,M., and Wenger,D.A. (2004). Psychosine-induced apoptosis in a mouse oligodendrocyte progenitor cell line is mediated by caspase activation. *Neurosci. Lett.* 358, 205-209.

Zhang,H.G., Wang,J., Yang,X., Hsu,H.C., and Mountz,J.D. (2004). Regulation of apoptosis proteins in cancer cells by ubiquitin. *Oncogene* 23, 2009-2015.

Zhang,J. (2013). Autophagy and Mitophagy in Cellular Damage Control. *Redox. Biol.* 1, 19-23.

Zhang,J., and Ney,P.A. (2010). Reticulocyte mitophagy: monitoring mitochondrial clearance in a mammalian model. *Autophagy.* 6, 405-408.

Zhu,H., Lopez-Rosas,A., Qiu,X., Van Breemen,R.B., and Bongarzone,E.R. (2012). Detection of the neurotoxin psychosine in samples of peripheral blood: application in diagnostics and follow-up of Krabbe disease. *Arch. Pathol. Lab Med.* 136, 709-710.

Zou,Y., Jiang,W., Wang,J., Li,Z., Zhang,J., Bu,J., Zou,J., Zhou,L., Yu,S., Cui,Y., Yang,W., Luo,L., Lu,Q.R., Liu,Y., Chen,M., Worley,P.F., and Xiao,B. (2014). Oligodendrocyte precursor cell-intrinsic effect of Rheb1 controls differentiation and mediates mTORC1-dependent myelination in brain. *J. Neurosci.* *34*, 15764-15778.