ISBN 970-27-1045-6

EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS α y β DEL mRNA DEL GFAP DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE PNM DE BO DE RATA ADULTA HACIA EL FENOTIPO DE ALDAINOGLÍA Y EN GLÍA ENVOLVENTE PURIFICADA

Carrillo-González Nidia, Ortuño-Sahagún Daniel, Gudiño-Cabrera Graciela.

Laboratorio de Desarrollo y Regeneración Neural,
Dpto de Biología Celular y Molecular,
Instituto de Neurobiología. CUCBA U de G.
CUCBA, Universidad de Guadalajara.
ggudinoc@cucba.udg.mx

Introducción

Los filamentos intermedios (FI) se caracterizan por ser los elementos del citoesqueleto más rígidos y resistentes, en comparación con los microtúbulos y microfilamentos, forman una red en el citoplasma que rodea el núcleo, y se extienden hasta la periferia celular. Se encargan principalmente de proporcionar resistencia mecánica a la célula e interaccionan con otros componentes del citoesqueleto (Alberts *et al.*, 1999), además, regulan la localización de proteínas y la transmisión de señales intracelulares (Paramio y Jorcano, 2002).

La secuencia de aminoácidos de los FI forma una estructura tripartita común que consiste en un dominio central α-hélice altamente conservado, con dos extremos el N-terminal (cabeza) y el C-terminal (cola), con una alta diversidad en secuencias de aminoácidos (Fig. 1) (Eng y Lee, 1995).

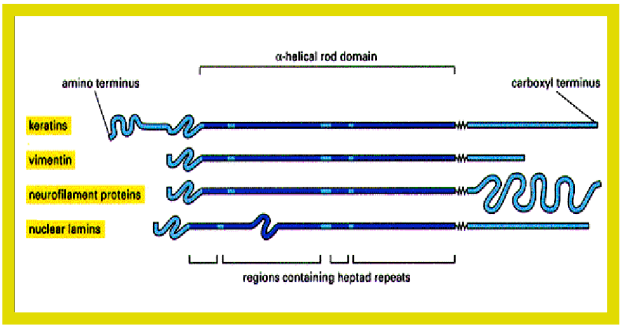

Fig 1. Estructura de los filamentos intermedios: consiste en un dominio α-hélice central, con dos extremos: N-terminal (cabeza) y C-terminal (cola) de longitud variable (Lodish et al., 2002).

La familia multigénica de estos FI la constituyen más de 60 miembros, los cuales pueden dividirse en 6 categorías, con base en su estructura génica, homología en secuencia y propiedades de ensamble, todos forman arreglos citoplásmicos a excepción del tipo V (Strelkov *et al.,* 2002; Paramio y Jorcano, 2002):

-Tipo I y II: incluye a las queratinas ácidas y básicas respectivamente.
-Tipo III: incluye a la vimentina descrita en células de origen mesenquimal; la desmina en células musculares; la GFAP en células gliales y la periferina en sistema nervioso periférico (SNP).
-Tipo IV: localizados en neuronas, incluye los neurofilamentos: NF-L, NF-M y NF-H y la α-internexina.
-Tipo V: las laminas nucleares.
-Tipo VI: incluye la nestina, sinemina, paranemina y tanabina.

Cada FI presenta distintas isoformas, y su expresión es propia de cada tejido o tipo celular, lo que nos indica cierta especificidad celular y funcional (Lodish *et al*., 2002; Kalnins *et al.,* 1986).

La GFAP es un polipéptido de 430 aminoácidos, de 55kDa, propio de los diversos tipos de células gliales del SN, a excepción de los oligodendrocitos. Este filamento es el responsable de modular el movimiento y proporcionar estabilidad estructural a los procesos astrocitarios (Eng *et al.,* 2000).

La GFAP es codificada por 9 exones, y hasta la fecha se han descrito 5 isoformas identificadas en rata y humano (α, β, γ, δ y ε) (Nielsen *et al.,* 2002). De las cuales la isoforma α del mRNA de la GFAP característica de la glía del SNC, difiere de la expresada en glía de SNP (isoforma β) debido a que su sitio de inicio de transcripción comienza 169pb antes que el sitio de incio de transcripción de la GFAPα (Galea *et al*., 1995).

Recientemente se ha descrito la expresión de la GFAP en células precursoras neurales multipotenciales (PNM) de organismos adultos.

Las células gliales del SNC se clasifican principalmente en 4 tipos: astrocitos, oligodendrocitos, microglía y aldainoglía (gr: *aldainos*, hacer crecer). Las células denominadas aldainoglía presentan la capacidad de promover el crecimiento neural y de las cuales se han estudiado tanto *in vivo* como *in vitro,* y sus propiedades y marcadores de superficie específicos han sido bien caracterizados (Gudiño-Cabrera y Nieto-Sampedro, 1999, 2000). La glía envolvente (GE) es la aldainoglía mejor caracterizada y se ha utilizado en diferentes modelos de lesión, como glía promotora de la regeneración en el SNC. La capacidad de la GE para envolver axones y aislarlos del microambiente, ha permitido su uso en transplantes a nivel experimental para promover la regeneración de axones sensoriales y su navegación en la médula espinal adulta (Ramón-Cueto y Nieto Sampedro, 1994).

El caracterizar la expresión de las isoformas de la GFAP en PNM de adulto, durante su diferenciación hacia células con fenotipo GE (aldainoglía), nos permitirá identificar las isoformas características de esta glía y dilucidar sus implicaciones funcionales a lo largo de dicho proceso.

Objetivo

Identificar la expresión de la isoforma del mRNA de la GFAP durante la diferenciación de PNM de BO de adulto hacia células con fenotipo aldainoglía.

Material y Métodos

Cultivos primarios

Los cultivos se realizaron a partir de tejido procedente de ratas (*Rattus norvergicus*) de la cepa Wistar, criadas y mantenidas en el bioterio del Dpto. de Biología Celular y Molecular, con acceso libre a agua y alimento, a una temperatura constante de 22-25°C con periodos de luz-obscuridad de 12-12h. El sacrificio de animales se realizó en una cámara de CO_2. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37ºC en una atmósfera de 5% de CO_2, y la renovación del medio para GE se realizó tres veces por semana, mientras que la renovación del medio de PNM de BO de rata adulta se realizó dos veces por semana. El medio basal utilizado (D/F) consta de una mezcla de DMEM (Sigma) y DMEM/F12 (Sigma) en proporción 1:1, suplementado con glucosa (3 gr/lt), glutamina (2 mM), penicilina (Sigma, 100 U/ml) estreptomicina, (0.1 mg/ml) y gentamicina (40 g/ml). Este medio se utilizará como base para preparar los medios de cultivo utilizados, tanto suplementados con suero, como el medio definido B27.

Cultivo de glía envolvente

El cultivo de GE se realizó como se describe en Gudiño-Cabrera y Nieto-Sampedro (1996). Se utilizaron ratas macho de 8 a 10 semanas de edad y en condiciones estériles se les extrajo el BO, los cuales se colocaron por separado en solución de Hanks con Ca^{+2} y Mg^{+2}. Se retiraron las meninges y se disecaron las capas de fibras nerviosas y glomerular, se le adicionó tripsina (2.5 mg/ml) por 20 min a 37°C, posteriormente se disoció mecánicamente con una pipeta Pasteur, y se resuspendió en DF-10S (medio D/F suplementado con 10% v/v suero fetal bovino (SFB), se lavó por centrifugación dos veces a 200 g durante 7 min a 25°C, se filtró a través de una malla estéril de 45 m y se sembraron en DF-10S en frascos de cultivo pretratados con PLL 10 g/ml.

Inmunopurificación magnética positiva

Después de 8 a 10 días de cultivo de GE *in vitro*, se realizó una digestión con tripsina/EDTA (0.05 %/0.02 a temperatura ambiente, agitando para facilitar el desprendimiento de las células, ya suspendidas las células en DF-10S se lavaron por centrifugación a 200 g por 7 min, y la GE se purificó con ayuda de microesferas magnéticas; Dynabeads (DB, DYNAL) de material ferromagnético recubiertas con IgG de cabra anti-ratón y monoclonal 192-NGFR, las células se mezclaron con DB-NGFR a una relación de 4:1 DBs por célula, y se incubaron durante 40 min a 4°C, finalmente las células NGFR-positivas se resuspendieron en medio DF-10S, y se sembraron en frascos con PLL a una densidad de $2.5x10^4$ células/cm^2, después del 3er pase se mantuvieron en medio definido/B-27.

Recolección de medio condicionado por GE

La recolección de medios se realizó tres veces por semana al momento de cambio del medio. Se tomó el medio condicionado del frasco de cultivo de GE y se filtró a través de una malla de 22 m y se congeló a -20ºC hasta su uso.

Cultivo de PNM de BO de rata adulta

Se realizó el mismo procedimiento que se sigue para el cultivo de GE, sólo que los cultivos se mantuvieron en medio condicionado de fibroblastos suplementado con FGF (20 ng/ml)/EGF (20 ng/ml). Se sembró el tejido correspondiente a dos BO por caja de cultivo de 25 cm^2 sin PLL.

Inducción de la diferenciación de PNM de BO de adulto

Las neuroesferas de PNM de BO de adulto se sembraron en cajas Lab-Teck (Nalgene) de 8 pocillos pretratadas con PLL 50 g/ml. Las neuroesferas en suspensión, fueron centrifugadas a 200 g durante 10 min y resuspendidas con la ayuda de una pipeta Pasteur en DefB27 (2.5×10^4 células/cm^2), las células se sometieron a diferenciación en medio condicionado por GE (diluido 1:1 con medio definido B27).

Obtención de mRNA

La extracción del mRNA se realizó en condiciones estériles y libres de RNAsas, como se describe en el KIT: QuickPrep® *Micro mRNA Purification KIT* (Pharmacia Biotech). El mRNA se extrajo a partir de aproximadamente 1×10^7 células de los cultivos de PNM de BO de adulto diferenciadas a las 0, 6, 24 y 48 h así como de GE purificada.

Síntesis de cDNA

El mRNA se precipitó por centrifugación en una microfuga a 13,000 rpm durante 20 min, después se eliminó el sobrenadante, el pellet del mRNA se resuspendió en 5 l de agua DEPC, para poder utilizarse en la síntesis de cDNA. La síntesis de cDNA se realizó como se describe en el KIT de síntesis *FIRST-Strand*® cDNA (Amersham Biosciences), a partir de un 1 l de mRNA, el cDNA se mantuvo a -20°C para su posterior amplificación.

Reacción en cadena de la polimerasa

La mezcla de reacción se realizó en un tubo de microcentrífuga de 0.5 ml y fue mantenida en hielo, el cDNA fue amplificado con la enzima Taq Polimerasa (1 U por reacción), añadida a la mezcla de reacción para la PCR que incluye: tampón para PCR (10 x) pH 8.5, dNTP 0.5 a 1 M, 1.5 M MgCl2 y 0.5 M de mezcla de oligonucleótidos, a lo cual se le añadió 1 l del cDNA.

La mezcla de reacción se sometió al programa del termociclador: de 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos a 94°C durante 1 min, 65°C por 1 min y 72°C durante 2 min para su

extensión, finalmente se incubó a 72°C por 5 min, y, posteriormente se reduce la temperatura a 4°C durante 5 min, los productos finales se almacenaron a 4°C.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.5% preparados con solución amortiguadora para electroforesis TBE (Tris Borato EDTA), utilizando bromuro de etidio (0.5 g/ml).

Oligonucleótidos para identificar las isoformas de la GFAP

Para identificar las isoformas descritas en tejido neural de la GFAP: α y β, se seleccionaron 3 oligonucleótidos (cuya secuencia se ilustra en la Tabla 1), su posición relativa se ilustra en la figura 2.

Oligonucleótidos	Secuencia 5´- 3´	Posición en mRNA	Tm
21	GAC ATC CCA GGA GCC AGC A	-18/+1	62
22	GAG ACG TAT CAC CTC TGC AC	23/42	62
23	GCT GTT CCA GGA AGC GGA CCT	285/265	68

Tabla 1. Las secuencias de oligonucleótidos se diseñaron a partir de la secuencia del mensajero de GFAP reportada en el Gen-Bank, con número de acceso: AF028784. [1] La Tm se calculó de acuerdo a la fórmula: 4(G+C)+2(A+T)= °C. (La numeración de los oligonucleótidos se realizó únicamente con fines de identificar la secuencia). Los oligonucleótidos se sintetizaron en *Invitrogen*.

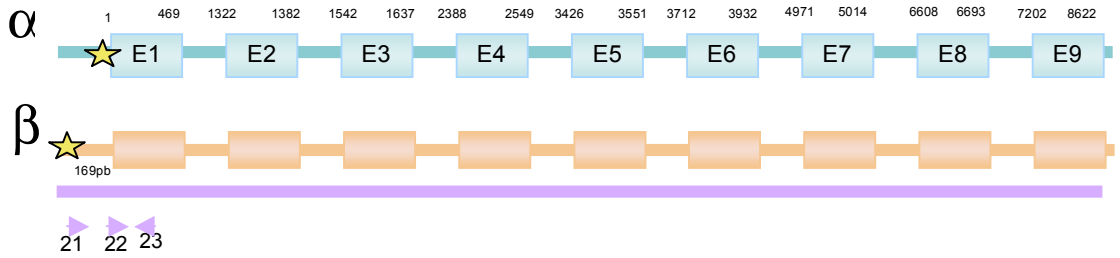

Figura 2. Secuencia de intrones y exones del gen de la GFAP. Se indican las diferencias entre las isoformas α y β del GFAP. Las cajas señaladas como E1, E2….E9, representan los exones, separadas por líneas que representan los intrones. En la parte inferior se señala la posición relativa de los diferentes oligonucleótidos empleados para las amplificaciones por PCR.

Resultados

Demostramos la presencia de las isoformas α y β de la GFAP, durante la diferenciación de PNM hacia fenotipo aldainoglía a las 0, 6, 24 y 48 h, mismas que se presentaron en la GE purificada (p75+), a diferencia de las células gliales del SNC como lo es la glía del cuerpo calloso, las cuales no presentaron la expresión de la isoforma β en RNAm.

Isoforma	PNM 0h n=3	PNM 6h n=2	PNM 24h n=3	PNM 48h n=3	GE Purif n=3	Cuerpo calloso
21-23 (303) β	✓	✓	✓	✓	✓	n.d.
22-23 (262) α	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Tabla 2. Isoformas amplificadas en PNM de adulto a las 0 h, diferenciadas a las 6, 24 y 48 h, GE purificada y cuerpo calloso. ✓; Amplificación positiva, n.d.; no detectado.

Las condiciones establecidas permitieron la amplificación de las isoformas α y β de la GFAP en los diferentes cultivos celulares (tabla 2).

Observamos que tanto en la GE purificada, como en las PNM, así como durante su diferenciación a las 6, 24 y 48 h, se expresaron todas las isoformas.

Conclusiones

Estos resultados aportan evidencias de que la isoforma β del mRNA de la GFAP, que se expresa en las células de Schwann (glía del SNP) también se expresa en GE así como en PNM en distintos momentos de su diferenciación. Lo anterior se relaciona con el hecho de que estos tipos de células gliales comparten otros marcadores tales como: p75, O4 y NG2, que se relacionan con el fenómeno de plasticidad celular, importante en la regeneración del SNC.

Agradecimientos

El presente trabajo de investigación es apoyado por la Universidad de Guadalajara mediante el proyecto del CA-414 en Neurobiología, y es parte de un proyecto apoyado por CONACyT U48002-M para GGC y DOS, además de la beca Doctoral 185241 de NCG.

Referencias

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P. 1999. Introducción a la Biología Celular. Ed. Omega. Barcelona.

Eng L.F. y Lee Y.L. 1995. Intermediate filaments in astrocytes. In Kettenmann. H. y Ransom. B.R. (Eds) Neuroglia. Oxford University Press. Nueva York.

Eng L.F., Ghirnikar R.S. y Lee Y.L. 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). Neurochem. Res. 25(9-10):1439-1451.

Galea E., Dupouey P. y Feinstein D.L. 1995. Glial fibrillary acidic protein mRNA isotypes: expression *in vitro* and *in vivo*. J. Neurosci. Res. 41(4):452-461.

Gudiño-Cabrera G. y Nieto-Sampedro M. 1996. Ensheathing cells: Large scale purification from adult olfactory bulb, freeze-preservation and migration of transplanted cells in adult brain. Rest. Neurol. Neurosci. 10:25-34.

Gudiño-Cabrera G y Nieto-Sampedro M. Estrogen receptor immunoreactivity in Schwann-like brain macroglia. J Neurobiol 1999;40(4):458-470.

Gudiño-Cabrera G. y Nieto-Sampedro M. 2000. Schwann-like macroglia in adult rat brain.Glia. 30(1):49-63.

Kalnins V.I., Subrahmanyan L. y Opas M. 1986. The cytoskeleton. Astrocytes. Vol.3. Academic Press, Inc.

Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D. y Darnell J., 2002. Biología Celular y Molecular. 4ta ed., Ed. Médica Panamericana. Madrid.

Nielsen A.L., Holm I.E., Johansen M., Boven B., Jorgensen P. y Jorgensen A.L. 2002. A New Splice variant of glial fibrillary acidic protein, GFAPe, Interacts with the presenilin protein. J. Biol. Chem. 277(33):29983-29991.

Paramio J.M. y Jorcano J.L. 2002. Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signaling? BioEssays. 24(9):836-844.

Ramon-Cueto A. y Nieto-Sampedro M. 1994. Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants. Exp. Neurol. 127(2):232-244.

Strelkov S., Herrmann H., Geisler N., Wedig T., Zimbelmann R., Aebi U. y Burkhard P. 2002. Conserved segments 1A and 2B of the intermediate filament dimmer: their atomic structures and role in filament assembly. EMBO J. 21(6):1255-1266.

[1] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=4103876