



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ESTRATEGIAS DE NEUROPROTECCIÓN PARA EL PROCESO
DEGENERATIVO DE LAS MOTONEURONAS ESPINALES INDUCIDO POR
EXCITOTOXICIDAD *IN VIVO***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. CITLALLI NETZAHUALCOYOTZI PIEDRA

TUTOR PRINCIPAL

DR. RICARDO TAPIA IBARGÜENGOYTIA

Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. DIANA ESCALANTE ALCALDE - Instituto de Fisiología Celular

DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO - Facultad de Química

Ciudad de México. Septiembre, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Ricardo Tapia Ibargüengoytia en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con los apoyos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (128229, 240817) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (IN201013).

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de este trabajo estuvo conformado por:

Dr. Ricardo Tapia Ibargüengoytia	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Diana Escalante Alcalde	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Facultad de Química, UNAM

El Jurado de Examen Doctoral estuvo compuesto por:

Dra. María de Lourdes Massieu Trigo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dra. Angélica Zepeda Rivera	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Julio Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Durante mis estudios de Doctorado recibí una beca otorgada por CONACyT con el número de registro 240130. También conté con la ayuda del Programa de Apoyo a los Estudiantes de Posgrado (PAEP) para asistir a diversos congresos nacionales e internacionales. Del 15 de Octubre al 15 de Diciembre del 2015 realicé una estancia de investigación en el Laboratorio del Dr. Luc Pellerin en la Universidad de Lausana, Suiza con el apoyo de la beca mixta del CONACyT y del PAEP.

Se reconocen y agradecen las facilidades brindadas por el Bioterio y las unidades de Histología y Microscopia, así como al T. I. Francisco Pérez Eugenio y a la M. en C. Ana María Escalante Gonzalbo de la unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Particularmente agradezco el asesoramiento para el uso de los diferentes microscopios al M. en C. Alberto Julio Amilpas (epifluorescencia), al M.C.P. Rodolfo Paredes Días (electrónico) y a la Dra. Yasmín Ramiro Cortés (confocal). Se reconoce también el apoyo de la M. en C. Patricia Salazar Sandoval (Técnica Académica), de Marina Cristobal (Auxiliar) del laboratorio AL-301, así como el de Leticia García Gutiérrez y Adelina Gonzales Pérez del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ricardo Tapia Ibarquengoytia, porque sus consejos y enseñanzas me ayudaron a crecer profesionalmente y porque bajo su tutela aprendí el verdadero significado de lo que es la “ciencia bien hecha”.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la inigualable oportunidad de crecer profesional y personalmente.

Un agradecimiento también para los viejos y nuevos amigos que han estado a mi lado para hacer la vida más llevadera. En especial, agradezco el tiempo y apoyo de Alberto Julio, quien estuvo conmigo para mantenerme de pie cuando fue necesario.

Finalmente, dedico este trabajo a mi familia, a mis papás Edith y Julio, y a mis hermanas Xochitl e Itai, porque ellos son el pilar más importante en mi vida.

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

Para la facilidad de su lectura y comprensión, este trabajo está dividido en seis secciones principales:

I. INTRODUCCIÓN

En este apartado se da a conocer la información general relevante para la comprensión del proyecto.

II. PRIMERA ESTRATEGIA: Uso de sustratos energéticos para disminuir los efectos del estímulo crónico con AMPA en la médula espinal.

Esta sección inicia con los **Antecedentes** respectivos a la primera estrategia de neuroprotección evaluada y se incluye el artículo original “Energy substrates protect hippocampus against endogenous glutamate-mediated neurodegeneration in awake rats” (Netzahualcoyotzi y Tapia. *Neurochem Res.* 2014;39). Posteriormente presentamos el **Planteamiento del problema** y los **Objetivos**. Los **Métodos y Resultados** están englobados dentro del artículo original “Degeneration of spinal motor neurons by chronic AMPA-induced excitotoxicity *in vivo* and protection by energy substrates” (Netzahualcoyotzi y Tapia. *Acta Neuropathol Commun.* 2015;3).

III. SEGUNDA ESTRATEGIA: Uso del fragmento C-terminal de la toxina tetánica para disminuir los efectos del estímulo crónico con AMPA en la médula espinal.

Al inicio se presenta una sección de **Antecedentes** sobre la segunda estrategia de neuroprotección. Le siguen el **Planteamiento del problema** y los **Objetivos** respectivos. Al final, los **Métodos y Resultados** se describen dentro del texto del artículo titulado “Tetanus toxin C-fragment protects against toxic effects induced by chronic excitotoxicity in the spinal cord” (Netzahualcoyotzi y Tapia), el cual ya se ha enviado para su publicación.

IV. DISCUSIÓN

Aquí se analizan los resultados de una forma integral y se discuten algunos puntos adicionales a los que contiene cada uno de los artículos en su discusión particular.

V. CONCLUSIONES

En esta sección se dan las conclusiones puntuales derivadas de la interpretación de los resultados del trabajo.

VI. REFERENCIAS

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
I. INTRODUCCIÓN.....	5
Neurotransmisión glutamatérgica	5
Excitotoxicidad y neurodegeneración	7
Motoneuronas y la médula espinal	10
La esclerosis lateral amiotrófica	11
Etiología de la enfermedad.....	12
Modelos farmacológicos de neurodegeneración espinal.....	15
II. PRIMERA ESTRATEGIA: Sustratos energéticos	17
ANTECEDENTES.....	17
Estimulación del metabolismo energético como estrategia de neuroprotección	17
Los sustratos energéticos protegen al hipocampo del daño excitotóxico <i>in vivo</i> : ARTÍCULO ORIGINAL	21
Los sustratos energéticos como terapia para la ELA	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
OBJETIVOS	23
MÉTODOS Y RESULTADOS: ARTÍCULO ORIGINAL	24
III.- SEGUNDA ESTRATEGIA: El fragmento TTC.....	25
ANTECEDENTES.....	25
Neurotrofinas.....	25
Las neurotrofinas como estrategia de neuroprotección	28
La toxina tetánica y su fragmento C-terminal	29
Antecedentes de neuroprotección del TTC.....	34

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
OBJETIVOS	37
MÉTODOS Y RESULTADOS II: ARTÍCULO ORIGINAL	38
IV. DISCUSIÓN	39
V. CONCLUSIONES.....	47
VI. REFERENCIAS	48

LISTA DE ABREVIATURAS

3-NPA	ácido 3-nitropropiónico
4-AP	4-aminopiridina
ACAC	acetoacetato
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ATP	adenosín trifosfato
BDNF	factor neurotrófico derivado del cerebro
BHB	β -hidroxibutirato
CGN	neuronas granulares de cerebelo
CL	cadena ligera de la toxina tetánica
CP	cadena pesada de la toxina tetánica
DNA	ácido desoxirribonucleico
EAAT	transportador de aminoácidos excitadores
ELA	esclerosis lateral amiotrófica
GABA	ácido γ -aminobutírico
Gln	glutamina
Glu	glutamato
H₂O₂	peróxido de hidrógeno
i.c.v.	intracerebroventricular
i.m.	intramuscular
MEK/Erk	vía de las cinasas activadas por mitógenos
mGluR	receptor metabotrópico a glutamato
MN	motoneurona
MPP⁺	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NADH	dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NCX	intercambiador Na ⁺ -Ca ²⁺
NGF	factor de crecimiento nervioso
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMJ	placa neuromuscular
NT	neurotrofinas

p75	receptor de 75 kDa para neurotrofinas
PDC	L-trans-pirrolidina-2,4-dicarboxilato
PI3K	fosfatidilinositol 3 cinasa
PLC-γ	fosfolipasa C- γ
RNA	ácido ribonucleico
ROS	especies reactivas de oxígeno
SN/SA	sistema de transporte tipo N/A para glutamina en astrocitos/neuronas
SNC	sistema nervioso central
SOD1	superóxido dismutasa Cu-Zn o tipo 1
SOD1-G93A	mutación de sustitución glicina por alanina en la posición 93 de la SOD1
β-trefoil	láminas- β plegadas en forma de hoja de trébol
TCA	ciclo del ácido tricarbóxico
TeTx	toxina tetánica
Trk	receptor tirosina cinasa
TTC	fragmento C-terminal de la toxina tetánica
UP	uniportador de Ca^{2+}
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
vGLUT	transportador vesiculares de glutamato
Y	tirosina

RESUMEN

El proceso excitotóxico ha sido considerado entre los mecanismos que inducen la muerte neuronal que subyace a distintas patologías del sistema nervioso. Entre las enfermedades neurodegenerativas, la esclerosis lateral amiotrófica se caracteriza por la degeneración selectiva de las motoneuronas, parálisis muscular y la subsecuente muerte del paciente por complicaciones respiratorias. A pesar de la abundante investigación al respecto, aún no se cuenta con tratamientos exitosos para tratar esta enfermedad. Por esta razón consideramos relevante estudiar nuevos tratamientos que pudieran proteger a las motoneuronas de la muerte y, evitar así, las repercusiones conductuales motoras. El grupo del Dr. Tapia ha demostrado que la perfusión crónica de AMPA en la médula espinal de rata induce la degeneración de las motoneuronas espinales a través de un mecanismo excitotóxico y la parálisis progresiva de las patas traseras. En este trabajo evaluamos dos estrategias de neuroprotección usando este modelo crónico neurodegeneración espinal *in vivo*. En la primera estrategia tratamos de estimular el metabolismo energético en la médula espinal, a través del uso de sustratos energéticos y en la segunda parte del proyecto, evaluamos el posible efecto neurotrófico del fragmento C-terminal de la toxina tetánica. Los resultados demuestran que los sustratos energéticos piruvato y β -hidroxibutirato son más eficaces que los antioxidantes ascorbato y glutatión en disminuir la degeneración espinal y las alteraciones motoras inducidas por la perfusión crónica de AMPA en la médula espinal. Con ello proponemos que las alteraciones del metabolismo energético celular juegan un papel crucial en el proceso de muerte de las motoneuronas espinales inducido por un estímulo excitotóxico crónico *in vivo*. Por otro lado, los resultados de la segunda parte del proyecto constituyen la primera demostración de que el fragmento C-terminal de la toxina tetánica administrado intramuscularmente protege a las motoneuronas de la muerte inducida por la estimulación glutamatérgica crónica en la médula espinal. Adicionalmente, mostramos por primera vez que el receptor TrkA de la placa neuromuscular contribuye a la neuroprotección del fragmento.

ABSTRACT

The excitotoxic process has been proposed as one of the mechanisms that induce neuronal death in different pathologies of the central nervous system. Among these diseases, amyotrophic lateral sclerosis is characterized by the selective death of motor neurons, muscular paralysis and finally the decease of the patient. In spite of progress on research, there is not a successful therapy for amyotrophic lateral sclerosis. Therefore, it is relevant to study and evaluate treatments that could potentially protect neurons from death and thus, avoid the behavioral alterations. Dr. Tapia group has shown that AMPA chronic infusion into the lumbar spinal cord of rat induces excitotoxicity-mediated degeneration of spinal motor neurons and progressive paralysis of rear limbs. In this work we evaluated two strategies of neuroprotection in our chronic model of spinal neurodegeneration: On the first part we aimed to stimulate the energy metabolism through provision of energy substrates to the spinal cord and in the second part of the project, we evaluated the putative neurotrophic effect of tetanus toxin C-terminal fragment. Our results show that energy substrates pyruvate and β -hydroxybutyrate, unlike antioxidants ascorbate and glutathione, significantly reduce spinal degeneration and motor alterations in our model. We conclude that alterations in cellular energy metabolism play a crucial role in the dying process of spinal motoneurons induced by chronic excitotoxic stimulation *in vivo*. On the other hand, the outcomes of the second part are the first evidence to show the intramuscular administration of tetanus toxin C-terminal fragment protects motoneurons from death induced by chronic glutamatergic stimulation in the spinal cord. We also demonstrated for the first time that TrkA receptor of the neuromuscular junction is involved in the neuroprotective mechanism of the fragment.

I. INTRODUCCIÓN

Neurotransmisión glutamatérgica

El glutamato es un aminoácido que puede ser sintetizado en nuestro organismo, principalmente a través de la transaminación del α -cetoglutarato o la desaminación de la glutamina. El ácido glutámico es un componente esencial del antioxidante endógeno glutatión y por acción de la enzima glutamato descarboxilasa también da origen al ácido γ -aminobutírico (GABA). El glutamato es el neurotransmisor excitador más abundante en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos y participa en diversos procesos fisiológicos como el desarrollo neuronal, la coordinación motora, la plasticidad sináptica y en procesos cognitivos como el aprendizaje y la formación de la memoria (Hassel y Dingleline, 2006).

En una sinapsis glutamatérgica (**Figura 1**), el glutamato de la presinapsis entra a las vesículas sinápticas a través de sus transportadores vesiculares (vGLUT) que intercambian un protón por glutamato. La liberación del glutamato de las vesículas sinápticas hacia el espacio sináptico es un proceso dependiente de Ca^{2+} y mediado por el complejo de proteínas SNARE. El glutamato en el espacio sináptico puede unirse a sus respectivos receptores, de los cuales hablaremos más adelante, o puede ser removido y transportado hacia el interior de las células neuronales o gliales a través de los transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT1 o GLAST y EAAT2 o GLT1), los cuales se encuentran mayormente expresados en los procesos astrocíticos en la sinapsis. Al interior de los astrocitos la enzima glutamina sintetasa convierte el glutamato en glutamina, la cual puede llegar a las neuronas a través de los transportadores de glutamina presentes en las células gliales y neuronas (SN y SA, respectivamente). A través de una reacción de desaminación en las neuronas, la enzima mitocondrial glutaminasa convierte a la glutamina en glutamato para su consecuente almacenamiento dentro de las vesículas sinápticas y reiniciar este ciclo de neurotransmisión conocido como el ciclo glutamina-glutamato (Niciu *et al.*, 2012).

De acuerdo al mecanismo de acción los receptores a glutamato se han clasificado como metabotrópicos (mGluR) y ionotrópicos. Los primeros están acoplados a diferentes proteínas G, proteínas conformadas por una única cadena polipeptídica con siete dominios transmembranales que acoplan su señalización a la actividad de segundos mensajeros. De esta manera, los mGluR participan en la actividad sináptica excitadora lenta pero prolongada en el SNC. Por su parte, los receptores ionotrópicos están acoplados a canales que permiten el paso selectivo de cationes, razón por la cual se encuentran involucrados en la neurotransmisión rápida del cerebro (Hassel y Dingleline, 2006).

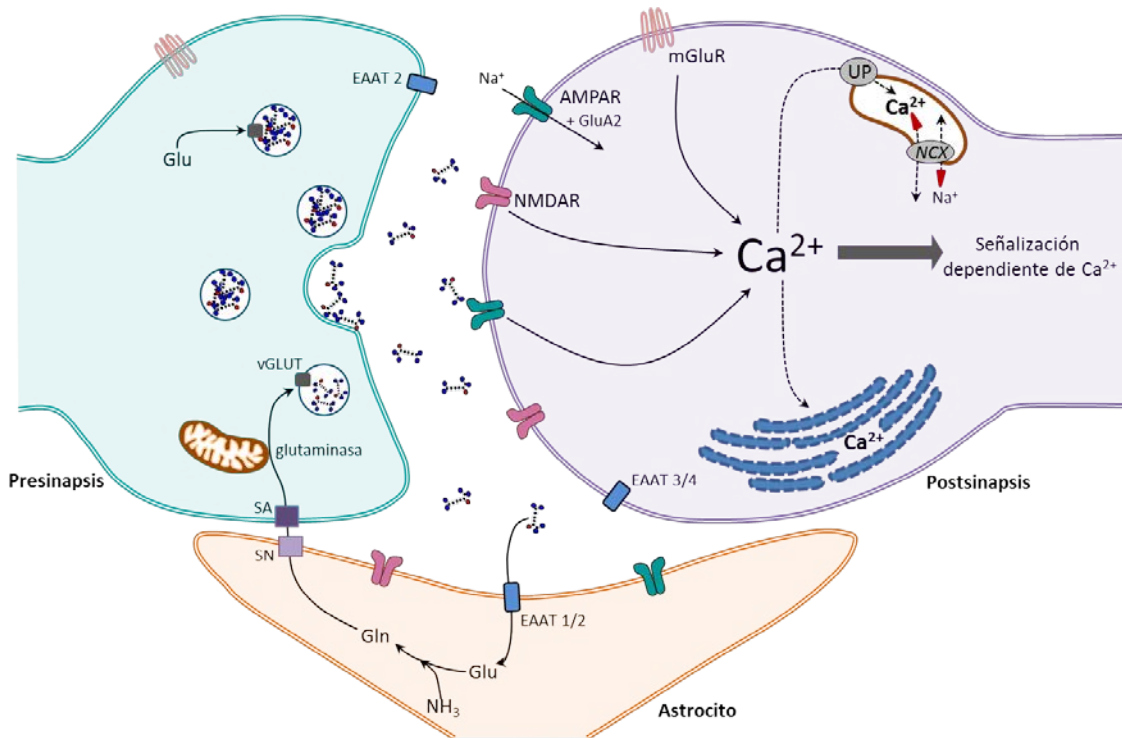


Figura 1. Representación esquemática de una sinapsis glutamatergica. El glutamato liberado en la hendidura sináptica puede activar a sus distintos receptores en la membrana postsináptica, dando como resultado un incremento en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} . Este catión puede actuar como segundo mensajero y puede también ser almacenado en reservorios intracelulares como el retículo endoplásmico y la mitocondria (flechas con líneas punteadas). En la mitocondria las flechas negras indican el flujo normal de los iones, mientras que las flechas rojas señalan el flujo iónico que resulta cuando el intercambiador invierte su función bajo condiciones excitotóxicas. Una descripción más detallada se ofrece a lo largo del texto. Glu, glutamato; Gln, glutamina; SN y SA, transportadores de glutamina en los astrocitos y neuronas respectivamente; AMPAR, receptor tipo AMPA; GluA2, subunidad correctamente editada que hace al receptor impermeable a Ca^{2+} ; NMDAR, receptores tipo NMDA; mGluR, receptor metabotrópico a glutamato; EAAT, transportador de aminoácidos excitadores, UP, uniportador de Ca^{2+} , NCX, intercambiador Na^+ - Ca^{2+} .

En función del agonista que los activa, los receptores ionotrópicos se han clasificado en los receptores de tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) y los receptores de tipo no-NMDA que reconocen al kainato y/o al ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA). Los receptores ionotrópicos a glutamato son estructuras tetraméricas cuya combinación de las distintas subunidades da origen a una amplia diversidad de subtipos y le confieren a esta familia de receptores una alta variabilidad funcional (Niciu *et al.*, 2012):

- El receptor NMDA puede estar conformado por la combinación de las siguientes subunidades: la GluN1 con ocho isoformas, la GluN2 con cuatro subunidades (A, B, C y D) y la GluN3 con dos subunidades (A y B). La activación del receptor NMDA facilita el acceso de Ca^{2+} y Na^+ . Además de la unión del agonista glutamato, esta activación requiere la unión del co-agonista glicina, así como la despolarización de membrana para eliminar el bloqueo del canal por Mg^{2+} . Adicionalmente, la función del receptor NMDA puede ser modulada por su unión a moléculas como las poliaminas y el ion Zn^{2+} .
- El receptor AMPA puede integrarse de las subunidades que van de la GluA1 a la GluA4 en forma de complejos homoméricos o heteroméricos. La activación de este receptor depende de su unión al ligando y es independiente de voltaje. Su permeabilidad catiónica está determinada por la selección de subunidades que lo conforman. La presencia de la subunidad GluA2 le confiere al canal la propiedad de ser permeable en mayor proporción al ion Na^+ . Sin embargo, cuando el receptor carece de esta subunidad o ésta no se sometió a las modificaciones post-transcripcionales respectivas en el sitio Q/R (cambio de una glutamina por arginina), el canal se hace preferentemente permeable a Ca^{2+} .
- Los receptores de tipo kainato son selectivamente permeables al Na^+ , estos canales pueden estar ensamblados en homo o heterodímero de las subunidades GluK1-3 con baja afinidad por el kainato, y las subunidades GluK4 y 5 con alta afinidad por el mismo ligando.

Excitotoxicidad y neurodegeneración

El Ca^{2+} es un segundo mensajero cuya importancia radica en que regula una gran cantidad de vías de señalización en las células eucariotas. En células en estado de reposo la concentración intracelular de Ca^{2+} libre es 10,000 veces menor que la cantidad de este catión en el medio extracelular (~100 nM vs 1-2 mM). Este gradiente se logra por la participación de mecanismos homeostáticos en la membrana plasmática como la bomba Ca^{2+} -ATPasas, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, así como las proteínas quelantes de calcio (calbindina, calreticulina, parvalbúmina), y la capacidad del retículo endoplásmico para almacenar a este ion a través de sus bombas Ca^{2+} -ATPasas. Cuando todos los mecanismos previos fallan en regular la concentración de Ca^{2+} las mitocondrias pueden, aunque transitoriamente, almacenar a este catión en su interior a través de los uniportadores de Ca^{2+} . En casos particulares cuando se pierde el potencial de membrana mitocondrial como en el proceso excitotóxico, la dirección de los intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ localizados en la membrana interna puede invertirse y

colaborar con la acumulación de este catión en la mitocondria (**Figura 1**) (Albers y Siegel, 2006). El funcionamiento y supervivencia neuronal también están fuertemente ligados a la homeostasis de Ca^{2+} intracelular. En las neuronas este catión participa en los procesos de transmisión y plasticidad sináptica, así como en la regulación de la expresión genética a través del efecto de unión del Ca^{2+} a reguladores transcripciones (Bading, 2013).

Bajo situaciones patológicas, en el espacio sináptico se pueden elevar las concentraciones de glutamato a niveles tóxicos cuando la liberación del neurotransmisor en las terminales neuronales está aumentada, cuando su sistema de recaptura trabaja de manera ineficiente, o bien, puede ser resultado de la liberación del contenido intracelular de glutamato de células vecinas dañadas. Este incremento exacerbado de glutamato en la hendidura sináptica sobre-activa a sus receptores y conduce a la consecuente entrada masiva de Ca^{2+} a las neuronas. Cuando la concentración de este catión excede a los mecanismos homeostáticos que la regulan, se activa una serie de eventos que pueden llevar a la disfunción y muerte de la neurona (Brini *et al.*, 2014). Estos acontecimientos inducidos por la exacerbada neurotransmisión glutamatérgica están englobados dentro del término de excitotoxicidad.

La excesiva elevación de Ca^{2+} intracelular durante el proceso excitotóxico puede llevar a la activación de enzimas dependientes de este catión, como algunas nucleasas, las proteasas calpaínas y algunas lipasas como la fosfolipasa A2 (Gentile *et al.*, 2012; Yang, 2011), las cuales favorecen el daño y la degradación generalizada de la estructura celular. La concentración elevada de este catión también pueden incrementar significativamente la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno, hasta establecer el estado de estrés oxidante, definido como el desequilibrio entre la producción de especies reactivas y la capacidad de las defensas antioxidantes endógenas (Görlach *et al.*, 2015). Este estado oxidante se ve favorecido por la activación dependiente de Ca^{2+} de la sintasa del óxido nítrico, cuyo producto es clave para desencadenar una cascada aún mayor de especies reactivas. Dada su alta reactividad, la producción aumentada de estas especies genera la oxidación inespecífica de los lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos, intensificando así el daño en el proceso excitotóxico (Halliwell, 2006).

Bajas concentraciones de Ca^{2+} ingresan en la matriz mitocondrial para regular algunas vías metabólicas en condiciones fisiológicas, pero en estados patológicos como en el proceso excitotóxico, este catión puede acumularse en cantidades tóxicas en este organelo. Esta sobrecarga puede colapsar el potencial de membrana mitocondrial y con ello afectar directamente la fosforilación oxidativa (Gleichmann y Mattson, 2011; Santa-Cruz *et al.*, 2012). Adicionalmente, esta falla en el potencial de membrana mitocondrial altera el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones y estimula la producción de ROS a través de la oxidación parcial del oxígeno (Halliwell,

2006). Las elevadas cantidades de Ca^{2+} pueden también estimular la formación del poro de transición mitocondrial y con ello facilitar la liberación de factores pro-apoptóticos. Adicionalmente, la activación del factor inductor de apoptosis por las calpaínas puede estimular la vía apoptótica. En el proceso excitotóxico también se han reportado alteraciones del sistema de degradación por proteosoma y la consecuente acumulación de agregados proteicos. En su conjunto, estos eventos pueden conducir a la disfunción y a la degeneración neuronal (Görlach *et al.*, 2015; Orrenius *et al.*, 2015; Santa-Cruz *et al.*, 2012).

La importancia del proceso excitotóxico mediado por glutamato radica en su vinculación con diversas patologías del SNC. El grupo del Dr. Tapia ha demostrado que la inyección en hipocampo de 4-aminopiridina (4-AP), un bloqueador inespecífico de los canales de K^+ , estimula la liberación de glutamato endógeno, genera epilepsia y conduce a la degeneración de las neuronas piramidales. Estos efectos se reducen casi en su totalidad por el antagonismo de los receptores NMDA (Peña y Tapia 2000; Vera y Tapia, 2012). De forma semejante, el antagonismo de la neurotransmisión glutamatérgica ha mostrado tener efectos anticonvulsivantes y neuroprotectores en otros modelos de epilepsia en roedores (Fujikawa, 1995; Sato *et al.*, 1988); además de que ha sido eficiente para disminuir el daño neuronal en modelos de isquemia/reperfusión (Bao *et al.*, 2001; Görgülü *et al.*, 2000; Ke *et al.*, 2016).

La excitotoxicidad tiene un papel importante en el estudio de enfermedades neurodegenerativas, pues se le ha propuesto como uno de los mecanismos de muerte neuronal en estas patologías. Se ha demostrado que agregados del péptido β -amiloide, principal componente de las placas seniles que caracterizan a la enfermedad de Alzheimer, desestabilizan la homeostasis de Ca^{2+} y sensibilizan a las neuronas al daño excitotóxico (Revet *et al.*, 2013). También se ha estudiado que este péptido β -amiloide estimula la liberación de glutamato de los astrocitos, facilitando así el proceso excitotóxico que conduce a la disfunción sináptica, la cual puede revertirse usando antagonistas glutamatérgicos (Talanta *et al.*, 2013). En modelos transgénicos de la enfermedad de Huntington que sobre-expresan la proteína huntingtina, se ha reportado que esta proteína sobre-activa a los receptores NMDA (Zeron *et al.*, 2001) y que además, la activación de este receptor glutamatérgico intensifica la neurodegeneración estriatal en estos animales (Shehadeh *et al.*, 2006).

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad degenerativa en la que también se ha propuesto al proceso excitotóxico como uno de los mecanismos responsables de la muerte neuronal. Ya que el presente trabajo se centra en estudiar estrategias de neuroprotección en un modelo que asemeja características fisiopatológicas de la ELA, hablaremos en extenso sobre esta enfermedad en las siguientes secciones.

Motoneuronas y la médula espinal

Las motoneuronas (MNs) son las células encargadas de la ejecución de los movimientos voluntarios y se dividen en dos grupos según su localización (**Figura 2A**) (Afifi y Bergman, 2005):

- MNs superiores: el soma de estas neuronas glutamatérgicas se encuentra en la corteza (también conocidas como células de Betz) o tallo cerebral y sus axones forman a los tractos descendentes, cuyas terminaciones interactúan directa o indirectamente (a través de las interneuronas) con las MNs espinales. Estos tractos descendentes conforman al sistema piramidal (donde se incluye al tracto corticoespinal) y el extrapiramidal.
- MNs inferiores: estas neuronas de naturaleza glutamatérgica se localizan en el asta ventral de la médula espinal y sus axones se proyectan hasta inervar directamente al músculo esquelético.

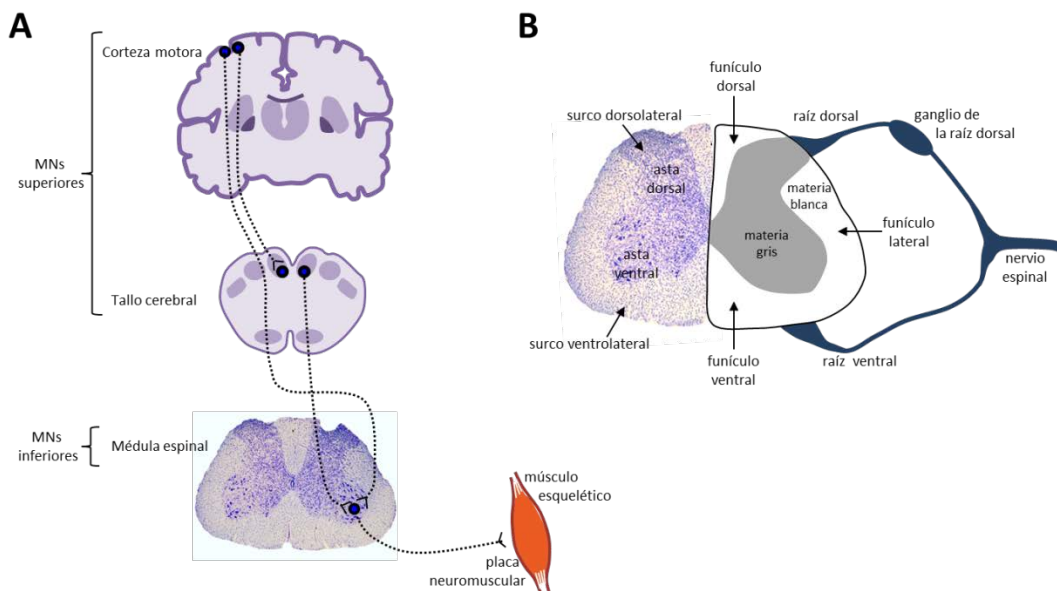


Figura 2. Motoneuronas y médula espinal. **A.** Representación esquemática de la ubicación de las MNs superiores e inferiores, así como la conexión de éstas últimas con la musculatura esquelética. **B.** Corte transversal de la médula espinal lumbar de ratona que representa algunas regiones anatómicas de relevancia descritas en el texto.

Entre los componentes del sistema motor previamente descrito, la médula espinal es la que controla el movimiento muscular voluntario de las extremidades y del torso del cuerpo, además de que recibe información sensorial de estas mismas regiones. También regula a la mayoría de las vísceras y la irrigación sanguínea del tórax, abdomen y pelvis (Watson y Kayalioglu, 2009).

La forma de la médula espinal es de un cilindro continuo con dos engrosamientos a la altura de la región cervical y lumbar, correspondientes a las zonas de inervación de las extremidades superiores e inferiores. Longitudinalmente se divide en segmentos según su morfología y función. La mayoría de los mamíferos tiene un patrón de segmentos espinales muy similares. El humano tiene 31 segmentos: 8 cervicales, 12 torácicos, 5 lumbares, 5 sacros y 1 coxígeo; mientras que la rata presenta 34 segmentos: 8 cervicales, 13 torácicos, 6 lumbares, 4 sacros y 3 coxígeos. Su estructura está cubierta de membranas de tejido conectivo que son la continuación de las meninges del encéfalo (piamadre, aracnoides y duramadre como la más externa). El espacio subaracnoideo comprendido entre la piamadre y la aracnoides contiene al líquido cefalorraquídeo y el espacio epidural, localizado entre la duramadre y el canal vertebral, contiene tejido graso y vasos linfáticos y sanguíneos de pequeño calibre (Watson y Kayalioglu, 2009).

En un corte transversal (**Figura 2B**), se puede observar que la médula espinal está compuesta por la denominada materia blanca en la región circundante y por materia gris en la parte interna con una disposición aparente en forma de mariposa o “H”. Ambas regiones contienen células gliales, pero la materia blanca se compone mayoritariamente de funículos (dorsal, lateral y ventral) compuestos de fibras ascendentes y descendentes, mientras que la materia gris alberga a los somas neuronales (Watson y Kayalioglu, 2009). La materia gris se subdivide en dos regiones: el asta dorsal que alberga a las interneuronas y a las proyecciones aferentes de las neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal, y el asta ventral donde se localizan algunos grupos de interneuronas y las MNs. Éstas últimas pueden tener funciones viscerales o somáticas. Las MNs viscerales o autónomas se localizan en la zona medial entre el asta dorsal y ventral e inervan al músculo liso y a las glándulas. Las MNs somáticas inervan al músculo esquelético para señalar movimientos voluntarios y en su mayoría pertenecen al denominado tipo alfa (inervan a las fibras musculares extrafusales), en menor proporción se presentan las MNs gama (inervan fibras intrafusales) y escasamente también existen las MNs somáticas de tipo beta que inervan indistintamente a las fibras intra o extrafusales (McHanwell y Watson, 2009).

La esclerosis lateral amiotrófica

Las enfermedades de la neurona motora son un conjunto heterogéneo de desórdenes neurológicos definidos y caracterizados por la degeneración específica de las MNs. La ELA es la forma más común y severa de estas patologías, con una incidencia mundial reportada de ~2.6 casos (en todos los casos la incidencia es por c/100,000 habitantes). Los datos más actuales en nuestro continente indican que en Norteamérica la frecuencia es de ~1.9 casos y, aunque no encontramos datos del resto de países latinoamericanos, sabemos que la incidencia de ELA es de ~1.4 en Uruguay (Chiò *et al.*, 2013). En México el estudio epidemiológico sobre esta neuropatología se

encuentra rezagado, reportando en el año de 1972 una prevalencia de sólo ~0.8 casos (Olivares *et al.*, 1972).

La ELA fue descrita por primera vez por el neurólogo francés Jean-Martin Charcot en el año de 1869. La enfermedad también fue conocida como esclerosis de Charcot y como enfermedad de Lou Gehrig, en honor a un famoso beisbolista estadounidense afectado por la enfermedad en la década de 1930 (Cleveland y Rothstein, 2001). La denominación de “esclerosis” hace referencia al endurecimiento de los tractos corticoespinales que corren a lo largo del funículo “lateral” de la médula espinal (**Figura 2B**), como resultado de la intensa gliosis que se presenta sobre las zonas de neurodegeneración. Por su parte, el calificativo de “amiotrófica” refiere a la atrofia de las fibras musculares como consecuencia de la denervación en respuesta a la muerte de las MNs (Rowland y Shneider, 2001).

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la muerte crónica y progresiva de las MNs, tanto superiores como inferiores, con excepción de las MNs del núcleo oculomotor y del núcleo de Onuf, localizadas respectivamente en el tallo cerebral y la región sacra de la médula espinal (Brooks, 1994; Mancuso y Navarro, 2016). La población mayormente afectada abarca a los adultos mayores entre los 54 y 67 años de edad (Chiò *et al.*, 2013), presentando una mayor incidencia entre los hombres en una proporción 3:2, con respecto a las mujeres (Manjaly *et al.*, 2010).

Cuando la neurodegeneración inicia a la altura del tallo cerebral se clasifica a la ELA como de inicio bulbar (~25% de los casos), y cuando el proceso inicia en la médula es de inicio espinal (~75%). Aunque hasta el momento no se ha descrito que la neurodegeneración tenga preferencia por avanzar en dirección cefálica o caudal, está bien establecido que en la ELA el proceso de muerte suele diseminarse desde el sitio de origen hasta abarcar a todas las MNs, tanto superiores como inferiores (Ravits y La Spada, 2009). Como resultado, las manifestaciones clínicas más comunes son debilidad y atrofia muscular, fasciculaciones (movimientos musculares finos involuntarios), hiperreflexia y espasticidad, hasta llegar a la parálisis (Cleveland y Rothstein, 2001). Finalmente, y a pesar del uso de algunos fármacos en combinación con las terapias paliativas, la muerte del paciente acontece a causa de complicaciones respiratorias después de 2-4 años de haber iniciado la enfermedad, y sólo un 10-20% sobrepasan esta expectativa de vida (Chiò *et al.*, 2009).

Etiología de la enfermedad

Aproximadamente el 90% de los casos de ELA se consideran de tipo esporádico pues se desconoce la etiología de la enfermedad en estos pacientes. En el ~10% restante la neurodegeneración está asociada a alteraciones genéticas y se denomina ELA

familiar. En ambos casos la sintomatología motora es muy similar. Sin embargo, en los pacientes con ELA esporádica no son frecuentes las alteraciones en el estado de conciencia o del juicio, mientras que en los casos familiares cerca del 60% de los pacientes presentan síntomas de demencia frontotemporal 1-2 años antes de presentar las alteraciones motoras (Hu *et al.*, 1999). La vinculación entre estas dos enfermedades radica en la coincidencia de algunos genes dañados en ambas patologías (Cleveland y Rothstein, 2001; Lattante *et al.*, 2015). En la ELA familiar las mutaciones más frecuentes se encuentran en los genes codificantes para las proteínas C9orf72 y la enzima superóxido dismutasa Cu-Zn (SOD1), en menor medida le siguen las alteraciones en los genes para las proteínas FUS, TDP-43 y secuestrosoma-1 (Lattante *et al.*, 2015).

Con respecto a la etiología de la ELA esporádica, aún cuando no se conocen con precisión los mecanismos que inducen la muerte de las MNs, se ha propuesto que pudiera ser una enfermedad multifactorial. Entre los posibles mecanismos involucrados, no excluyentes uno del otro, se encuentran: la excitotoxicidad, el estrés oxidante, alteraciones energéticas mitocondriales, el transporte axonal alterado, agregación proteica, estrés reticular, procesamiento anormal del RNA y la neuroinflamación (Cleveland y Rothstein, 2001; Mancuso y Navarro, 2015). Hasta el momento no se sabe si estos mecanismos son la causa inicial o consecuencia del proceso de neurodegeneración, pero hay evidencias que destacan la participación del proceso excitotóxico mediado por glutamato en esta patología.

En ensayos clínicos se han detectado elevados niveles de glutamato en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con ELA esporádica (Rothstein *et al.*, 1990; Shaw *et al.*, 1995; Spreux-Varoquaux *et al.*, 2002). Sin embargo, existe controversia a este respecto ya que algunos grupos no han podido reproducir estos hallazgos (Perry *et al.*, 1990; Ryberg *et al.*, 2003). En estudios realizados sobre el tejido *post mortem* se ha encontrado también que la expresión del transportador de aminoácidos excitadores EAAT2 se encuentra reducida en la médula espinal y la corteza cerebral de pacientes con ELA (Fray *et al.*, 1998; Rothstein *et al.*, 1995; Sasaki *et al.*, 2000). Adicionalmente hay que destacar que el Riluzol, cuyo mecanismo de acción consiste en la disminución de la neurotransmisión glutamatérgica al inhibir los canales de Na⁺ necesarios para la liberación del neurotransmisor, es el único fármaco que ha logrado incrementar significativamente, aunque en forma modesta (2-3 meses), la esperanza de vida de los pacientes (Goyal y Mozaffar, 2014).

Por otro lado, diversos estudios han aportado información relevante acerca de la susceptibilidad de las MNs frente al proceso excitotóxico, respaldando así la hipótesis de que este estímulo tóxico es crucial en la fisiopatología de la ELA (Corona *et al.*, 2007; Jaiswal, 2014). En el tejido *post mortem* de pacientes controles, se halló que la población de MNs vulnerables en la ELA expresan de 5 a 6 veces menor cantidad de

calbindina y de parvalbúmina (proteínas de unión a Ca^{2+}), en comparación con las MNs resistentes a la muerte como aquellas del núcleo oculomotor y del núcleo de Onuf (Alexianu *et al.*, 1994). Estas diferencias son aún más evidentes en un estudio con microarreglos, donde se demuestra que el perfil transcripcional de la población de MNs sensibles a la degeneración dista mucho del perfil de las neuronas resistentes, especialmente en genes relacionados con la transmisión sináptica, la función mitocondrial, el sistema de degradación por proteosoma y algunos factores transcripcionales (Brockington *et al.*, 2013).

En cultivos primarios mixtos de médula espinal se observó que las MNs son particularmente susceptibles a la muerte inducida por el estímulo del agonista AMPA, en comparación con otras subpoblaciones neuronales espinales (Carriedo *et al.*, 1996). Este mismo grupo demostró que el estímulo con AMPA sobre las MNs en cultivo incrementa drásticamente y de forma transitoria las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} y, que además, promueve la pérdida del potencial de membrana mitocondrial e incrementa la producción intracelular de ROS (Carriedo *et al.*, 2000). En estos trabajos se concluye que esta vulnerabilidad se debe a la elevada expresión de canales AMPA permeables al ion Ca^{2+} en las MNs espinales. Como se mencionó al inicio de la introducción, la presencia de la subunidad GluA2 correctamente editada en el receptor AMPA le confiere al canal la permeabilidad preferente para Na^+ , pero alteraciones en su edición post-transcripcional y/o la ausencia de esta subunidad cambian la permeabilidad del receptor hacia Ca^{2+} .

Lo anterior resulta interesante ya que en el tejido espinal de personas control se demostró, a través de un ensayo de hibridación *in situ*, que las MNs no expresan la subunidad GluA2 (Williams *et al.*, 1997). Además se evidenció que entre diferentes tipos neuronales de pacientes controles, sólo las MNs espinales expresan bajas concentraciones del RNA mensajero para GluA2, en comparación son las otras subunidades del receptor AMPA (Kawahara *et al.*, 2003). Se hallaron también bajas concentraciones (con respecto al control) del RNA mensajero para dicha subunidad en homogenados de tejido espinal de pacientes con ELA (Virgo *et al.*, 1996). Otros trabajos, aunque no reportan esta baja expresión de GluA2, sí demuestran una deficiente edición post-transcripcional en el sitio Q/R específicamente en las MNs espinales de pacientes con ELA (Hideyama *et al.*, 2012; Kawahara *et al.*, 2004). La enzima ADAR2 es la encargada de la edición post-transcripcional de GluA2 y las alteraciones en la edición del receptor AMPA se han asociado a la escasa expresión de este enzima en las MNs espinales de los pacientes diagnosticados con ELA (Hideyama *et al.*, 2012; Kwak y Kawahara, 2005).

En la médula espinal de rata la subunidad GluA2 también tiene una baja expresión (Sun *et al.*, 2005) y el grupo del Dr. Tapia ha demostrado que hay una clara susceptibilidad de las MNs espinales de rata a la excitotoxicidad mediada por AMPA.

La descripción de estos experimentos y de los modelos de neurodegeneración espinal a los que dieron lugar, se describen a detalle en el siguiente apartado.

Con respecto a las MNs de la corteza, mientras algunos grupos muestran evidencia de que estas neuronas en personas control no expresan la subunidad GluA2 (Williams *et al.*, 1997), otros trabajos señalan no sólo haberla encontrado, sino además muestran que su edición post-transcripcional es correcta en casi la totalidad del tejido cortical de pacientes controles (Akbarian *et al.*, 1995; Paschen *et al.*, 1994). Aunque no hallamos trabajos en los que se estudie a GluA2 en la corteza cerebral de pacientes con ELA, se tiene el antecedente de que un estímulo excitotóxico con glutamato en cultivos de neuronas corticales puede disminuir la actividad enzimática de ADAR2, y con ello incrementar la expresión de la subunidad no editada, acrecentando así permeabilidad a Ca^{2+} en los receptores AMPA (Mahajan *et al.*, 2011).

Modelos farmacológicos de neurodegeneración espinal

En el laboratorio del Dr. Tapia, los primeros experimentos realizados en la médula espinal de rata se enfocaron en estudiar la susceptibilidad de las MNs espinales *in vivo* frente a diferentes estimulaciones del sistema glutamatérgico. Para ello, en una rata anestesiada se infundieron distintos fármacos en el asta ventral de la médula espinal lumbar a través de microdiálisis. Los resultados demuestran que la inhibición aguda de los transportadores de glutamato con L-trans-pirrolidina-2,4-dicarboxilato (PDC) no daña a las MNs, a pesar de que se incrementa intensamente y de forma transitoria la concentración extracelular de este neurotransmisor. De manera similar la infusión de NMDA, kainato o 4-aminopiridina (que induce la liberación de glutamato endógeno) resultó inocua para las neuronas motoras espinales (Corona y Tapia, 2004). Por el contrario, la administración aguda de AMPA 6 mM produjo la muerte de ~90% de las MNs ubicadas del lado ipsilateral a la zona de inyección de este compuesto. Como resultado, los animales desarrollaron parálisis unilateral de los cuartos traseros a las 12-24 h después del tratamiento (Corona y Tapia, 2004). A este protocolo de administración de AMPA por microdiálisis se denominó como el “modelo agudo de neurodegeneración espinal”.

En experimentos posteriores se demostró que la muerte de las MNs espinales en este modelo es dependiente de la activación de los receptores AMPA permeables a Ca^{2+} y del aumento intracelular de este catión, ya que el uso de un bloqueador de estos receptores y un quelante de Ca^{2+} intracelular (BAPTA-AM) es suficiente para disminuir significativamente la neurodegeneración (Corona y Tapia, 2007). También se demostró que la infusión aguda de AMPA no estimula el incremento de marcadores de estrés oxidante como la 2,7-diclorofluoresceína y la inmunoreactividad para la 3-nitrotirosina en el tejido espinal (Santa-Cruz y Tapia, 2014). Por su parte, las mitocondrias aisladas

de la médula espinal de ratas sometidas a este modelo agudo de excitotoxicidad, presentaron alteraciones morfológicas como hinchamiento y desorganización de las crestas mitocondriales, así como una actividad disminuida de los complejos mitocondriales I y IV (Santa-Cruz *et al.*, 2016).

Siguiendo el fundamento de los experimentos previos, el grupo del Dr. Tapia desarrolló el “modelo crónico de degeneración espinal”. En este caso el agonista AMPA en concentración 7.5 mM se administra de forma gradual y crónica en la médula espinal lumbar de la rata a través de minibombas osmóticas conectadas a una cánula que queda insertada en el tejido espinal. Como resultado, la neurodegeneración espinal se presenta de forma bilateral en las astas ventrales y la parálisis es progresiva hasta que se establece la inmovilidad total de ambas patas traseras (Tovar-y-Romo *et al.*, 2007). De forma semejante a los resultados obtenidos en el modelo agudo, se demostró que el bloqueo crónico de los transportadores de glutamato usando PDC o DL-treo- β -benziloxiaspartato, a pesar de incrementa de forma mantenida los niveles extracelulares de glutamato en la médula espinal, no provoca la muerte de las MNs (Tovar-y-Romo *et al.*, 2009). Los puntos a resaltar en este último modelo son que el proceso de neurodegeneración al ser progresivo y bilateral, asemeja algunas características histopatológicas de la ELA. Adicionalmente, la exclusión de alteraciones genéticas en el procedimiento coincide con la vasta mayoría de casos esporádicos de esta enfermedad.

La evaluación de terapias para la ELA ha sido ampliamente estudiada en modelos transgénicos de la enfermedad de tipo familiar y, ya que referiremos a uno de ellos más adelante, ofrecemos una breve descripción. Aunque el número de cepas transgénicas de ELA familiar va en aumento, hasta el momento el modelo más utilizado ha sido el ratón SOD1-G93A. La alteración genética en esta cepa radica en la sustitución de una glicina por alanina en la posición 93 de la proteína SOD1. El fenotipo de estos animales puede intensificarse o acelerarse según la programación del número de copias de la proteína mutada pero, en esencia, la cepa se caracteriza por presentar una parálisis progresiva de las extremidades como resultado de la muerte de las MNs superiores e inferiores, además de que exhiben una esperanza de vida reducida en comparación con las cepas silvestres (Gurney *et al.*, 1994; Haenggeli y Kato, 2002). La neurodegeneración en este modelo se ha asociado no sólo a la pérdida de la capacidad antioxidante de la SOD1, sino también a que la enzima mutada puede incrementar la producción de ROS y con ello estimular el daño oxidante en las células (Beckman *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; Mattiazzi *et al.*, 2002).

II. PRIMERA ESTRATEGIA: SUSTRATOS ENERGÉTICOS

ANTECEDENTES

Estimulación del metabolismo energético como estrategia de neuroprotección

En el capítulo previo se describió que, durante el proceso excitotóxico la mitocondria juega un papel importante como regulador de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. Sin embargo, también es cierto que su función en el metabolismo oxidativo celular no está exenta de alteraciones y daños frente a este estímulo tóxico.

La exposición de cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (CGN) a un tratamiento agudo con glutamato genera un incremento exacerbado de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} y también una desregulación total de los sistemas homeostáticos de este catión (Castilho *et al.*, 1998, Ward *et al.*, 2000). Este incremento de Ca^{2+} intracelular tiene alcances mucho mayores, pues también puede provocar la disminución de la respiración mitocondrial y provocar el desacople entre la respiración y la fosforilación oxidativa. Incluso, puede inducir el colapso del potencial de membrana mitocondrial que precede a la muerte neuronal (Ankarcrona *et al.*, 1996). Adicionalmente, el proceso excitotóxico puede estimular la excesiva producción de ROS, especialmente al interior de las mitocondrias despolarizadas, y exacerbar así el daño mitocondrial y la muerte neuronal (Castilho *et al.*, 1999).

Se ha demostrado que la administración sistémica y crónica de un inhibidor metabólico como el iodoacetato (bloqueador de la enzima glucolítica gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), incrementa significativamente la vulnerabilidad del hipocampo a la neurodegeneración inducida por glutamato *in vivo* (Massieu *et al.*, 2000). Incluso, aun cuando la administración intraestriatal o intrahippocampal de PDC (bloqueador de la recaptura de glutamato) es inocua, se puede generar un intenso daño neuronal si se administra simultáneamente con el ácido 3-nitropropiónico (3-NPA) que inhibe a la enzima succinato deshidrogenasa del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) (Sánchez-Carbente y Massieu, 1999). Por el contrario, y como describimos en las siguientes páginas, hay antecedentes donde se demuestra que la estimulación del metabolismo energético puede promover la supervivencia celular.

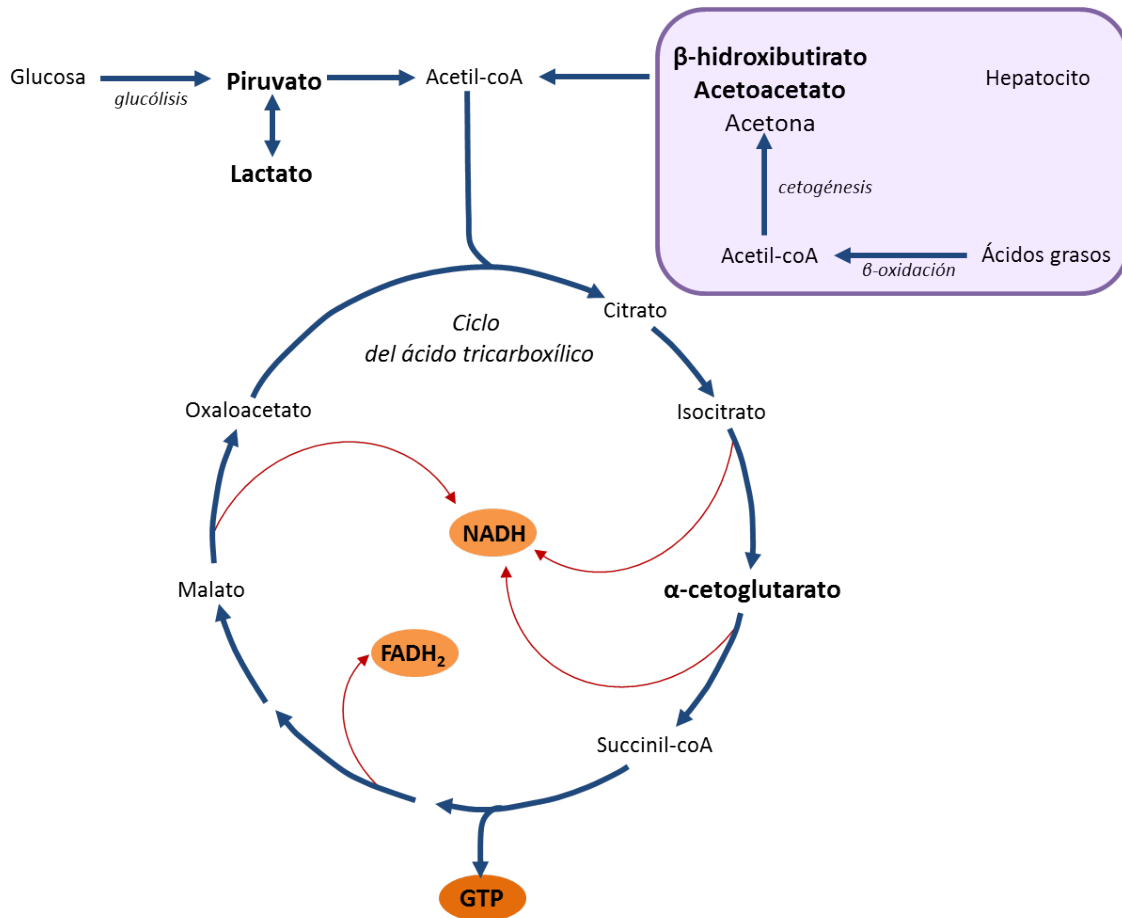


Figura 3.- Integración de los sustratos energéticos al metabolismo oxidativo celular. En letras negritas se resaltan a los sustratos con los que se trabajó en este proyecto. El diagrama trata de representar que independiente del sitio en el que se incorporen los sustratos, todos ellos estimulan la producción de agentes reductores que serán utilizados para promover la fosforilación oxidativa.

El piruvato, producto final de la glucólisis aerobia, es considerado como un sustrato energético para la célula, ya que después de internalizarse en las células a través de los transportadores de monocarboxilatos, puede descarboxilarse e incorporarse al ciclo del TCA para estimular la producción energética en la célula (**Figura 3**). En cultivos neuronales primarios la suplementación con este sustrato, o de su forma reducida, el lactato, disminuye significativamente la neurodegeneración inducida por la exposición aguda a glutamato (Jekabsons y Nicholls, 2004; Laird *et al.*, 2013; Miao *et al.*, 2011). Incluso, estas moléculas son capaces de revertir la disminución en la capacidad respiratoria mitocondrial y la depleción de adenosín trifosfato (ATP) provocada por este estímulo excitotóxico (Jourdain *et al.*, 2016; Laird *et al.*, 2013). El efecto neuroprotector del piruvato y del lactato se ha evaluado también en cultivos o rebanadas cerebrales expuestas a al agonista glutamatérgico NMDA, con resultados muy semejantes. Se ha evidenciado también la eficacia de estos sustratos para recuperar

los niveles de ATP, desestabilizados previamente por un evento excitotóxico (Izumi y Zorumski, 2010; Maus *et al.*, 1999). Con respecto a los antecedentes *in vivo*, aunque escasos, se ha descrito que la administración sistémica de piruvato protege exitosamente de la muerte neuronal inducida por kainato en diversas regiones cerebrales, aunque en este caso se propone al incremento de la proteína de choque térmico HSP70 como la mediadora de la protección (Kim *et al.*, 2007). Este mismo monocarboxilato logró disminuir exitosamente el daño neuronal generado por la inyección de glutamato en el núcleo estriado de ratas tratadas con la toxina mitocondrial 3-NPA (Massieu *et al.*, 2001).

La acetona, el acetoacetato (ACAC) y el β -hidroxibutirato (BHB) son los denominados cuerpos cetónicos, que se producen a partir de la degradación de los ácidos grasos en el hígado por la vía conocida como cetogénesis. Con excepción de la acetona que es una molécula muy volátil, el resto de los cuerpos cetónicos son sustancias solubles que logran internalizarse en el músculo esquelético, riñones y sistema nervioso a través de los transportadores de monocarboxilatos y, al interior de las células, pueden incorporarse al ciclo del TCA en forma de acetil-coA (**Figura 3**) (McKenna *et al.*, 2006). Estos sustratos energéticos han demostrado, al igual que el piruvato y lactato, ser eficaces en disminuir la muerte de cultivos neuronales expuestos a un estímulo excitotóxico con glutamato (Jeong *et al.*, 2011; Laird *et al.*, 2013; Maalouf *et al.*, 2007; Noh *et al.*, 2006). En estos estudios es evidente que la excitotoxicidad afecta fuertemente la actividad mitocondrial, por lo que se propone que la protección desplegada por los cuerpos cetónicos pudiera depender de su capacidad para incrementar la respiración mitocondrial (Laird *et al.*, 2013; Maalouf *et al.*, 2007), así como por su eficacia para regular y mantener los niveles de dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH), y con ello, disminuir el estrés oxidante en estas células expuestas a glutamato (Maalouf *et al.*, 2007). En modelos *in vivo* se ha demostrado que la dieta cetógena también es eficaz para reducir el daño hipocampal generado por la inyección del agonista glutamatérgico kainato. Aunque en este caso, la protección se asocia a la disminución de los mediadores inflamatorios bajo estas condiciones dietéticas (Jeong *et al.*, 2011). También se ha estudiado que los cuerpos cetónicos son capaces de disminuir las lesiones en el encéfalo generadas por la inyección de glutamato, o la inhibición de su recaptura, en ratas tratadas con el 3-NPA o iodoacetato (Massieu *et al.*, 2001; 2003; Mejía-Toiber *et al.*, 2006).

Adicionalmente a estos trabajos en donde los sustratos energéticos piruvato, lactato y cuerpo cetónicos protegen del daño inducido por estímulos excitotóxicos, generalmente *in vitro*, existen varios estudios en los que se demuestra la eficacia de estas moléculas para disminuir los efectos nocivos en modelos animales de isquemia e hipoglucemia (Berthet *et al.*, 2009; Julio-Amilpas *et al.*, 2015), así como en modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer (Wang *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2016) y

modelos farmacológicos de la enfermedad de Parkinson (Cheng *et al.*, 2009; Satpute *et al.*, 2013) y Huntington (Lim *et al.*, 2011; Ryu *et al.*, 2003).

Es importante destacar que entre los sustratos energéticos de los que hemos hablado en este capítulo, el piruvato se caracteriza estructuralmente por ser un α -cetoácido carboxílico. Estos ácidos tienen la capacidad de actuar como antioxidantes al neutralizar al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de una reacción de descarboxilación no enzimática (Lopalco *et al.*, 2016; Lopalco y Stella, 2016). Por su parte, los cuerpos cetónicos ACAC, D-BHB y L-BHB (isómero metabólicamente inactivo) comparten una fuerte capacidad antioxidante frente al anión hidroxilo, mientras que el ACAC también puede neutralizar al ácido hipocloroso, al peroxinitrito y al oxígeno singulete (Haces *et al.*, 2008), aunque para estos casos se desconoce el mecanismo de reacción. La capacidad del piruvato y el BHB para proteger cultivos celulares de la citotoxicidad inducida con H_2O_2 se ha asociado directamente a la capacidad antioxidante de estas moléculas (Cheng *et al.*, 2013; Desagher *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2007).

Enseguida se presenta un artículo en el que evaluamos el efecto de neuroprotección de algunos sustratos energéticos y antioxidantes en un modelo de excitotoxicidad *in vivo* en el hipocampo de rata. Los resultados obtenidos en dicho trabajo son uno de los antecedentes directos de este proyecto.

**ARTÍCULO ORIGINAL: Los sustratos energéticos protegen al hipocampo del
daño excitotóxico *in vivo***

**Energy substrates protect hippocampus against endogenous glutamate-mediated
neurodegeneration in awake rats**

Citlalli Netzahualcoyotzi y Ricardo Tapia

Neurochemical Research 2014;39(7):1346-54.

En experimentos con ratas anestesiadas y en libre movimiento, el grupo del Dr. Tapia ha demostrado que la administración en el hipocampo de 4-AP, un bloqueador de canales de K^+ , estimula la liberación de glutamato desde las terminales sinápticas, genera epilepsia de forma inmediata y neurodegeneración tardía en las zonas CA1 y CA3. Ya que estos efectos tóxicos se inhiben al administrar al antagonista MK-801, sabemos que los efectos de la 4-AP se deben a la sobre-activación del receptor NMDA debido al exceso de glutamato liberado (Peña y Tapia 1999; 2000; Vera y Tapia, 2012). Con el objetivo de averiguar la participación del metabolismo energético y el estrés oxidante durante el proceso de neurodegeneración inducido por excitotoxicidad *in vivo* en el hipocampo, evaluamos el posible efecto protector de distintos sustratos energéticos (piruvato, ACAC, BHB y α -cetoglutarato), así como el de algunos antioxidantes (ascorbato y glutatión, este último en forma de etil éster lo que facilita la entrada del antioxidante a la célula, Zeevalk *et al.*, 2007). Para lograrlo, a ratas en libre movimiento les administramos a través de microdiálisis en la región CA1 (unilateral) del hipocampo la 4-AP sola, o en combinación con algunos de los sustratos. La perfusión de 4-AP indujo convulsiones conductuales así como en el registro encefalográfico, que evolucionaron hasta establecer un *status* epiléptico. A este respecto, sólo el BHB en sus dos formas isoméricas (D- y L-) logró incrementar la latencia para llegar al *status*. La 4-AP también provocó la pérdida de casi la totalidad de neuronas piramidales de CA1 y CA3 del lado ipsilateral. Por su parte, todos los sustratos energéticos disminuyeron aproximadamente en un 50% la muerte neuronal, mientras que la protección ejercida por los antioxidantes fue significativamente menor. Nuestros resultados aluden a que la suplementación de sustratos mitocondriales le permite a las neuronas contrarrestar la cascada de eventos tóxicos generados por la estimulación glutamatérgica. Esto sugiere que la disfunción energética mitocondrial, a diferencia del estrés oxidante, está fuertemente involucrada en el mecanismo de neurodegeneración inducida por el proceso excitotóxico en el hipocampo *in vivo*. Adicionalmente, encontramos un discreto efecto anticonvulsivante generado por la administración aguda de los cuerpos cetónicos, el cual ya ha sido descrito previamente por otros grupos.

Energy Substrates Protect Hippocampus Against Endogenous Glutamate-Mediated Neurodegeneration in Awake Rats

Citlalli Netzahualcoyotzi · Ricardo Tapia

Received: 12 February 2014 / Revised: 24 March 2014 / Accepted: 21 April 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract Excitotoxicity due to excessive glutamatergic neurotransmission is a well-studied phenomenon that has been related to the mechanisms of neuronal death occurring in some disorders of the CNS. We have previously shown that the intrahippocampal perfusion by microdialysis of 4-aminopyridine (4-AP) in rats stimulates endogenous glutamate release from nerve endings and this results in excitotoxic effects such as immediate seizures and delayed neuronal death, due to the overactivation of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. To study whether mitochondrial energy dysfunction and oxidative stress could be involved in this 4-AP-induced excitotoxicity, we evaluated in awake rats the protective effect of several energy substrates and antioxidant compounds, using microdialysis, electroencephalographic (EEG) recording and histological analysis. The 4-AP-induced behavioral and EEG seizures, which progressed to status epilepticus in about 30 min, were prevented by the NMDA receptor antagonist MK-801, whereas acetoacetate, DL- and L- β -hydroxybutyrate did not protect against seizures but increased the latency to the onset of status epilepticus; pyruvate, α -ketoglutarate and glutathione ethyl ester did not show any protective effect. 4-AP also produced nearly complete loss of pyramidal neurons in CA1 and CA3 regions of the ipsilateral hippocampus 24 h after the experiment. MK-801 totally prevented this neuronal death and the energy substrates tested protected by about 50 %, whereas the antioxidants showed only a weak protection. We conclude that ketone bodies possess weak

anticonvulsant effects and that energy metabolism impairment plays a more important role than oxidative stress in the delayed hippocampal neurodegeneration resulting from the excitotoxic action of 4-AP mediated by endogenous glutamate.

Keywords Hippocampus · Excitotoxicity · 4-Aminopyridine · Energy substrates · Ketone bodies · Glutamate

Abbreviations

4-AP	4-Aminopyridine
ACAC	Acetoacetate
DL- β HB	DL- β -Hydroxybutyrate
EEG	Electroencephalogram
GEE	Glutathione ethyl ester
GSH	Reduced glutathione
KB	Ketone bodies
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-aspartate
Pyr	Pyruvate
α KG	α -Ketoglutarate

Introduction

Excitotoxicity due to excessive glutamatergic neurotransmission has been related to the mechanisms of neuronal death occurring in some acute and chronic disorders of the CNS, such as epilepsy, anoxia-ischemia, cerebral trauma, and several neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. We have previously shown that the intrahippocampal perfusion by microdialysis of 4-aminopyridine (4-AP) in anesthetized and awake rats stimulates endogenous glutamate release from nerve endings and this

C. Netzahualcoyotzi · R. Tapia (✉)
División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-253,
04510 Mexico, DF, Mexico
e-mail: rtapia@ifc.unam.mx

results in excitotoxic effects such as immediate seizures and delayed neuronal death, effects that are mediated by overactivation of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors because they are prevented by antagonists of this receptor [1–3].

This type of excitotoxic-induced damage involves a disruption of intracellular calcium homeostasis due to an increase in the cytoplasmic Ca^{2+} concentration, consequent to NMDA receptor opening that exceeds the buffering Ca^{2+} mechanism of the neuron. This in turn overloads mitochondria and generates reactive oxygen species and energy failure, resulting in neuronal death [4–7]. Accordingly, some oxidative substrates of metabolic pathways have been shown to protect cells in different models of neurodegeneration. Pyruvate (Pyr), an end product of glycolysis, restored ATP levels and showed protective action against excitotoxic and metabolic insults in neuronal cultures [8] and in brain slices [9, 10]. In vivo, Pyr restored ATP levels and reduced tissue damage under hypoxic-ischemic encephalopathy in rodents [11]. Ketone bodies (KB), by-products from fatty acids catabolism that can be used as energy source when glucose is not readily available, such as D- β -hydroxybutyrate (D- β HB) and acetoacetate (ACAC), protect neurons against excitotoxic and metabolic insults in cultures and in brain slices [12–15]. Furthermore, KB possesses anti-convulsant effects in both experimental and human epilepsy [16].

Therefore, and in view that few studies have been carried out in vivo, we considered of interest to study whether alterations of energy metabolism and/or oxidative stress may be involved in the 4-AP-induced excitotoxicity in the hippocampus of awake rats. For this purpose, we evaluated the effect of the energy substrates Pyr, DL- β HB, ACAC and α -ketoglutarate (α KG), as well as the antioxidants L- β HB and glutathione ethyl ester (GEE) on both the convulsant and the neurotoxic action of 4-AP, by means of microdialysis, electroencephalographic (EEG) recording and histological analyses.

Materials and Methods

Adult male Wistar rats (220–240 g) were used in all experiments and were handled in accordance with international standards of animal welfare and with approval of the Local Animal Care Committee. All efforts were made to avoid unnecessary suffering of the animals. All drugs were purchased from Sigma, St. Louis, MO, USA. Surgery, microdialysis and EEG recording were carried out essentially as previously reported [3], and therefore only a brief description will be given below.

Surgery

Briefly, rats were anesthetized with 0.5–2.0 % isoflurane in 95 % O_2 /5 % CO_2 mixture, placed in a stereotaxic frame, and implanted with two cranial electrode screws over the parietal cortex for EEG recording and with a cannula guide in the right dorsal hippocampus (coordinates from bregma: AP -3.6 , L $+2.4$ and V -2.6 [17]). The electrodes and cannula guide were fixed to the skull with dental cement. After surgery, anesthesia was discontinued, and rats were returned to individual cages and provided with food and water ad libitum.

Microdialysis and EEG Recording

Five days after surgery, the microdialysis was carried out in the awake, freely moving rats, to avoid the effects of anesthesia on glutamatergic neurotransmission [18]. Previously water-flushed microdialysis cannulas (CMA/12, CMA Solna, Sweden) were inserted into the cannula guide, to reach the vertical coordinate mentioned above. The animals were then placed in the bowl of a free-movement microdialysis system (CMA 120), and the cannulas were continuously perfused using a microinjection pump (CMA 400/Carnegie Medicin) at a flow rate of 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ with Krebs medium of the following composition (in mM): 118 NaCl, 1.2 KH_2PO_4 , 4.7 KCl, 1.18 MgSO_4 , 25 NaHCO_3 , 10 glucose, 2.5 CaCl_2 (pH 7.4). After a 1 h equilibration period, 25 μl (12.5 min) consecutive fractions of perfusate were continuously collected. After the first three fractions, 4-AP (Sigma, St. Louis, MO, USA) at a 7 mM concentration was perfused during 25 min, followed by three additional fractions with normal Krebs medium. This concentration was chosen on the basis of previous results from our laboratory showing that 7 mM is enough to induce the excitotoxic effects for 4-AP in awake rats, whereas the effect of lower concentrations is too weak and higher ones are too toxic [3]. When tested, the energy substrates and antioxidants were perfused continuously from the equilibration period until the end of the experiment (160 min), at the concentrations indicated in “Results”, although the efficiency of the dialysis membrane is 10–12 % [19]. In all experiments osmolarity was maintained by reducing NaCl concentration proportionally. To corroborate the involvement of NMDA receptors in the excitotoxic effect of 4-AP, in some experiments the NMDA receptor antagonist MK-801 was injected i.p. (1 mg/kg) 30 min before 4-AP perfusion. The cortical EEG recording was carried out continuously in all experimental groups, starting at the time of collection of the basal microdialysis fractions, using a grass polygraph (low-frequency filter at 3 Hz and high-frequency filter at 100 Hz). At the end of the experiment animals were returned to their

individual cages with food and water ad libitum until the time of histological analysis.

Histological Evaluation

Histological evaluation was carried out 24 h after the experiment, because 4-AP-induced neurodegeneration, although starting since 3–6 h, is maximal at this time [20]. Rats were anesthetized with pentobarbital and perfused transcardially with 250 ml saline solution (0.9 %), followed by 250 ml of 4 % paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. The brains were removed, postfixed for 24 h at 4 °C, and transferred successively to 10, 20 and 30 % sucrose (24 h each). Brain coronal sections (40 µm thick) were obtained in a cryostat and stained with cresyl violet for assessing the correct location of the microdialysis probes and for histological observations. For quantitative analysis, the morphologically undamaged neurons (identified as cells of >15 µm in diameter, with clear cytoplasm, nucleus and nucleolus) in the hippocampal region were counted in a 20× microscopic field (30,000 µm²) with the help of the image analyzer system NIH Image 1.6. Three brain slices obtained from each of 7–14 rats for each experimental group were counted, covering the CA1, CA2 and CA3 areas.

Statistics

ANOVA followed by a Tukey's post hoc test was used for the statistical analysis of latency times and number of healthy neurons, as indicated in the figure legends (Graphpad prism version 5.00, Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Ketone Bodies Retarded the Onset of Status Epilepticus Induced by 4-AP

Control rats perfused only with Krebs medium did not show any significant behavioral alteration and their EEG traces were characteristic of the awake state at all times, as shown in Fig. 1. In agreement with our previous results [3], perfusion of 4-AP induced EEG seizures characterized by an initial hypersynchronous discharge followed by trains of high-amplitude spikes. The latency to the first discharge was 19.6 ± 0.6 min, and after 26.9 ± 0.7 min the discharge activity became continuous and of high amplitude, thus defining a status epilepticus, which lasted until the end of the recording period (Fig. 1). This EEG activity coincided with several motor alterations including grooming, masticatory movements, continuous hypersalivation, head

shakes, eyelids myoclonus, rigidity of the tail and loss of posture. As shown in Figs. 1 and 2, the previously described protective action of MK-801 was corroborated: the increase in the latency to first discharge was about 35 %, the behavioral alterations were prevented and status epilepticus did not occur in 4 of the 7 rats of this group. The other three animals showed a 50 % increase in the latency to status epilepticus as compared with 4-AP alone.

Figures 1 and 2 show that neither the energy substrates nor the antioxidants tested modified the basal EEG traces; neither had they modified the latency to the initial 4-AP-induced discharge. However, the latency to the onset of status epilepticus was significantly increased by about 33 % by DL-βHB (20 and 50 mM), L-βHB (50 mM) and ACAC (20 mM), but not by the other drugs tested (Fig. 2).

Energy Substrates Protect Against 4-AP Induced Neurodegeneration

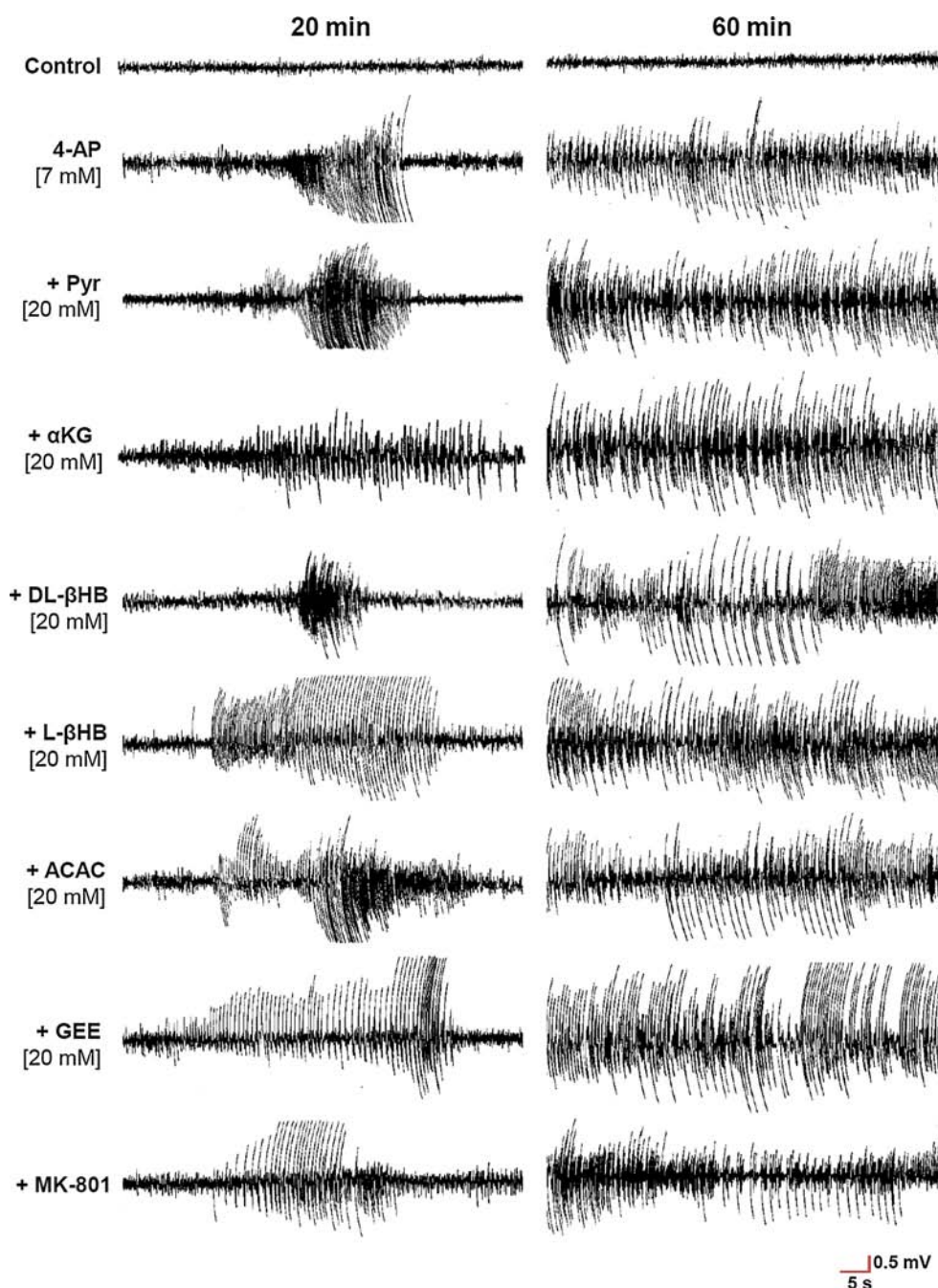
Histological examination showed that the only damage observed in the control rats perfused with Krebs medium was the mechanical lesion caused by the cannula. The number of healthy pyramidal neurons in this group was 95.3 ± 1.5 on CA1, 86.4 ± 2.1 on CA2 and 84.6 ± 3.2 on CA3 (Figs. 3, 4). The previously described remarkable neurotoxic effect of 4-AP in the ipsilateral hippocampus and the protection by MK-801 were corroborated [3]. 4-AP induced a massive neuronal death of about 84 % in CA1 and 62 % in CA3, characterized by the presence of pyknotic nuclei and a thinner pyramidal layer. The CA2 area and the contralateral hippocampus were not affected (not shown). MK-801 treatment completely prevented 4-AP-induced neuronal even in the animals that showed status epilepticus (Figs. 3, 4).

All compounds tested, except GEE, protected partially against the neurotoxic effect of 4-AP (Figs. 3, 4). Pyr, αKG and DL-βHB (at the two concentrations tested) exerted a notable protective effect, reducing the neuronal loss in CA1 to 40–52 %, and in the CA3 region to 25–37 %. L-βHB and ACAC also significantly protected in CA1, reducing neuronal loss to ~67 %, but not in CA3. In contrast, the antioxidant GEE was ineffective, since the number of healthy neurons in CA1 and CA3 of this group was not different from the 4-AP-treated animals (Figs. 3, 4).

Discussion

The main findings of this work performed in an in vivo model are that energy substrates remarkably protected against the neurodegeneration induced by 4-AP in the hippocampus, whereas antioxidant compounds were much less effective. Interestingly, the KB tested, but not the other

Fig. 1 Representative EEG recordings of each experimental group, at the indicated times after the 4-AP infusion by microdialysis. The 4-AP induced status epilepticus was prevented by MK-801 in 4 of 7 rats, and as shown in Fig. 2 the KB but not the other substrates delayed the onset of status epilepticus. $n = 7-14$



substrates, showed also some anticonvulsant action manifested by an increase in the latency to the 4-AP-induced EEG status epilepticus. The present results confirm that the 4-AP-induced massive neuronal death is mediated by the overactivation of the NMDA receptor because it is blocked with MK-801, even in the animals treated with the antagonist that showed status epilepticus. This indicates that the neurodegeneration is not directly related to the epilepsy, in agreement with previous findings from our laboratory showing that MK-801 prevents the neuronal loss even

when administered 1 h after the beginning of the epileptiform discharges [21].

The neurotoxic effects of glutamate-induced excitotoxicity are at least partially due to energy deficits associated to the limited available energy substrates in the brain. Therefore, neurons are extremely sensitive to energy decline occurring during hypoxia, ischemia, stroke, and other forms of neurotrauma [5, 22]. In this work, the substrates that can be integrated to the energy metabolism of neurons were the most potent protectors

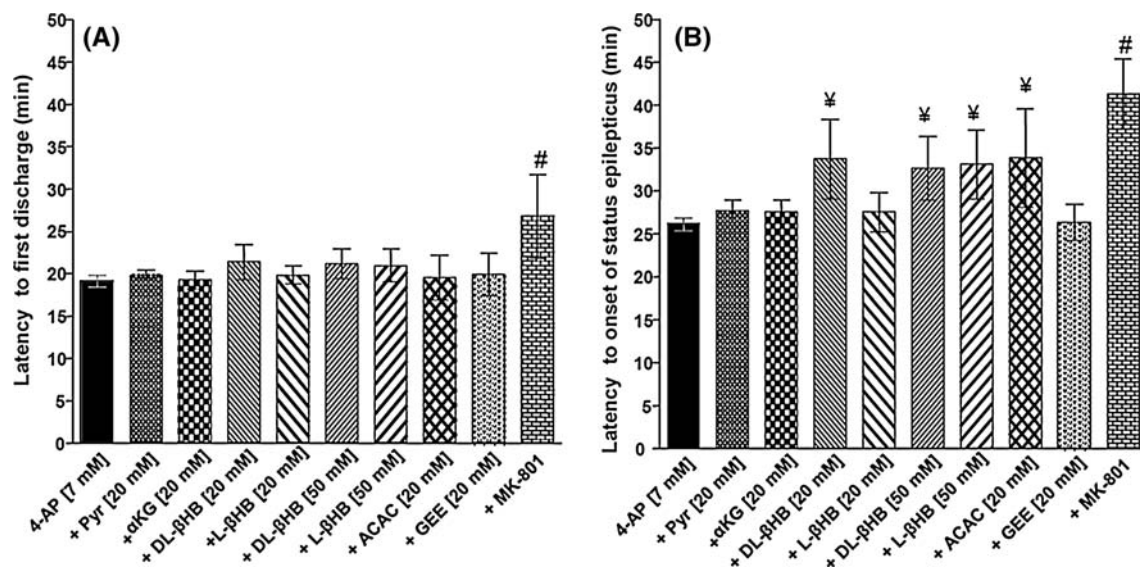


Fig. 2 Latency to first discharge and to onset of status epilepticus in each experimental group. **a** Latency to first discharge was increased only by MK-801. **b** Ketone bodies increased the latency to status epilepticus. Data are mean values \pm SEM. $^*p < 0.01$, $^{\#}p < 0.001$

versus 4-AP group (one-way ANOVA, Tukey post hoc) ($n = 7$ – 14 per group; $n = 3$ for MK-801 because in 4 of the 7 animals status epilepticus did not occur)

from 4-AP-induced neurodegeneration, probably because they can be readily oxidized to promote energy in the mitochondria, as described below.

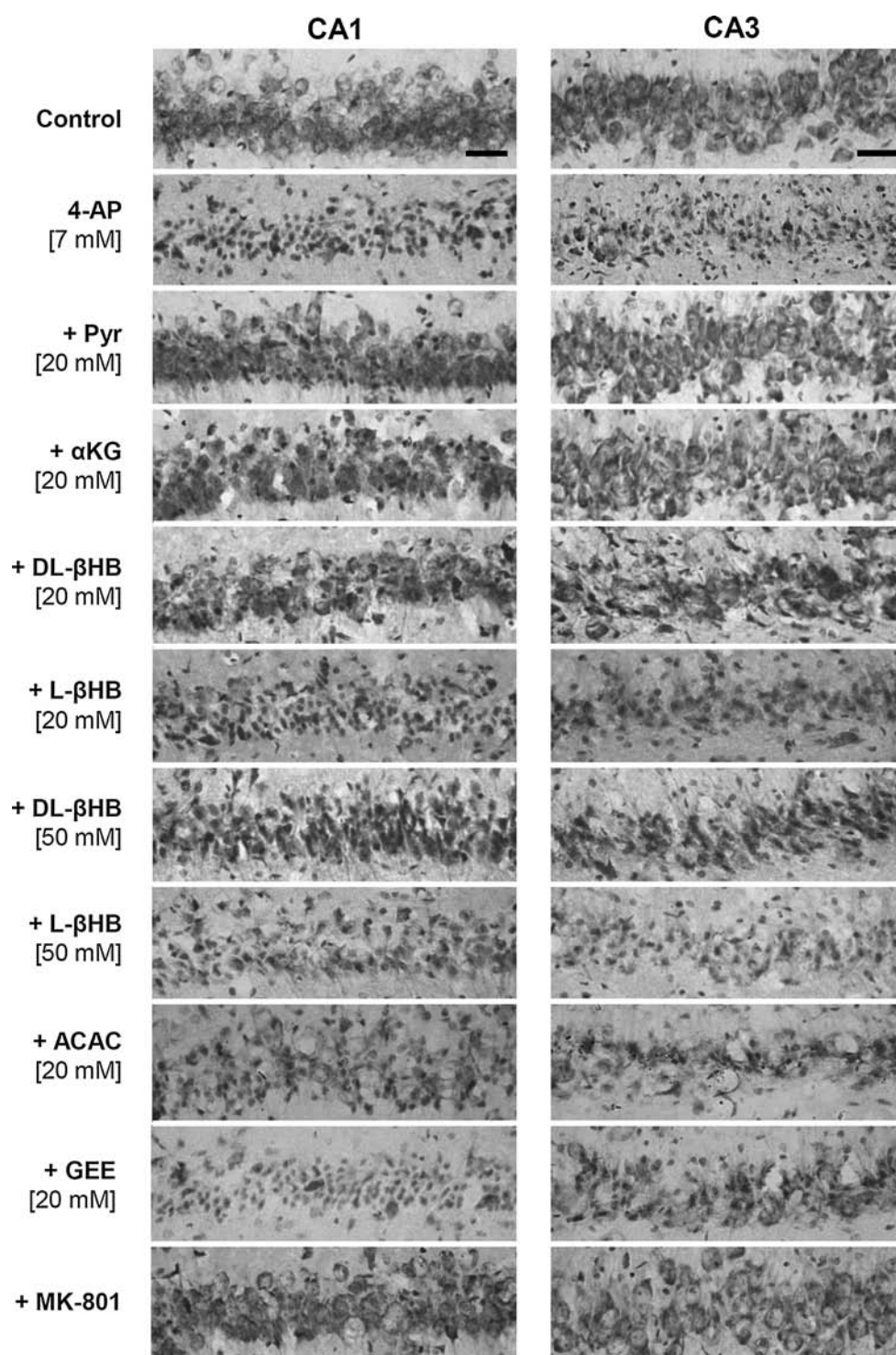
In cultured striatal neurons Pyr maintained ATP levels and protected from the neurotoxic effects of AMPA and NMDA [8]. Similar protection by Pyr was observed in hippocampal slices subjected to NMDA exposure [9] and glucose deprivation [10]. In neonatal rats in vivo, Pyr preserved ATP levels, diminished reactive oxygen species and protected brain from hypoxia–ischemia-induced damage [11]. The neuroprotective effect of α KG is probably due to its oxidation and energy production through the tricarboxylic acid cycle. Although few data exist on this action, a recent study in mice showed that oral administration of this substrate protected the brain against the toxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, restored mitochondrial complex I activity and reduced oxidative stress, assessed ex vivo [23].

The protective effect of the DL- β HB and ACAC can be explained as well by the generation of ATP through oxidative phosphorylation, since, as has been shown both in vitro and in vivo, these KB notably protect against several neurotoxic insults. In cultured hippocampal neurons, ACAC protected from glutamate + iodoacetate-induced damage [12], and in neocortical neurons D- β HB and ACAC reduced glutamate-induced free radical formation and neuronal death by increasing the $NAD^+/NADH$ ratio and enhancing mitochondrial respiration [13]. In hippocampal slices exposed to mitochondrial respiratory complex inhibitors, KB preserved synaptic transmission,

diminished reactive oxygen species production and enhanced ATP generation [14]. In addition, D- β HB protected neurons against oxygen–glucose deprivation and NMDA-induced excitotoxicity [15]. In vivo, i.v. administration of ACAC decreased the volume of the lesion induced by iodoacetate in the hippocampus and significantly increased ATP concentration [12]. Furthermore, intrastriatal D- β HB prevented lipid peroxidation, ATP depletion and tissue damage elicited by glutamate + iodoacetate in the striatum [24]. Regarding D- β HB, it is worth noting that it might be acting through a mechanism different from its oxidation or its antioxidant properties, namely the specific inhibition of class I histone deacetylases. These enzymes are involved in the regulation of gene expression, and it has been shown that their inhibition by D- β HB results in the expression of genes encoding oxidative stress resistance factors FOXO3A and MT2, that confers protection against in vivo and in vitro cell damage produced by oxidative stress [25, 26]. So, the synergism between this epigenetic mechanism of action and its role as energy substrate could explain the better protection that we observed with DL- β HB as compared to ACAC.

The above data support the conclusion that Pyr, α KB, DL- β HB and ACAC protect neurons against the 4-AP-induced excitotoxic-mediated neurodegeneration through an energy-mediated mechanism. Because such effect of 4-AP is due to the overactivation of NMDA receptors, the stimulation of energy production probably compensates for the mitochondrial functional damage resulting from the entrance of Ca^{2+} through such NMDA receptors [7]. The

Fig. 3 Representative micrographs of the CA1 and CA3 regions of the hippocampus, 24 h after the experiment, showing the notable protective effect of MK-801 and energy substrates and the weak protection by the antioxidants against 4-AP induced-neurodegeneration. The CA2 region and contralateral hippocampus were not affected by 4-AP (not shown). Quantitative data are shown in Fig. 4. Scale bar 50 μ m



pathways of energy production by oxidation of the energy substrates tested are well known, but it is of interest that α -ketoacids may protect neurons acting as direct antioxidants [27–30], or through an indirect antioxidant mechanism, increasing glutathione concentration [31–33]. Because these data were obtained *in vitro*, in order to study whether the antioxidant activity of α -ketoacids is

determinant for the neuroprotective effects, we tested two antioxidants: L- β HB, a non-physiological compound that cannot be used as energy substrate but has the same antioxidant activity of its isomer D- β HB [34], and GEE as source of reduced glutathione, in view that intracellular GSH levels increase more efficiently after its administration than after GSH administration [35]. GSH is an

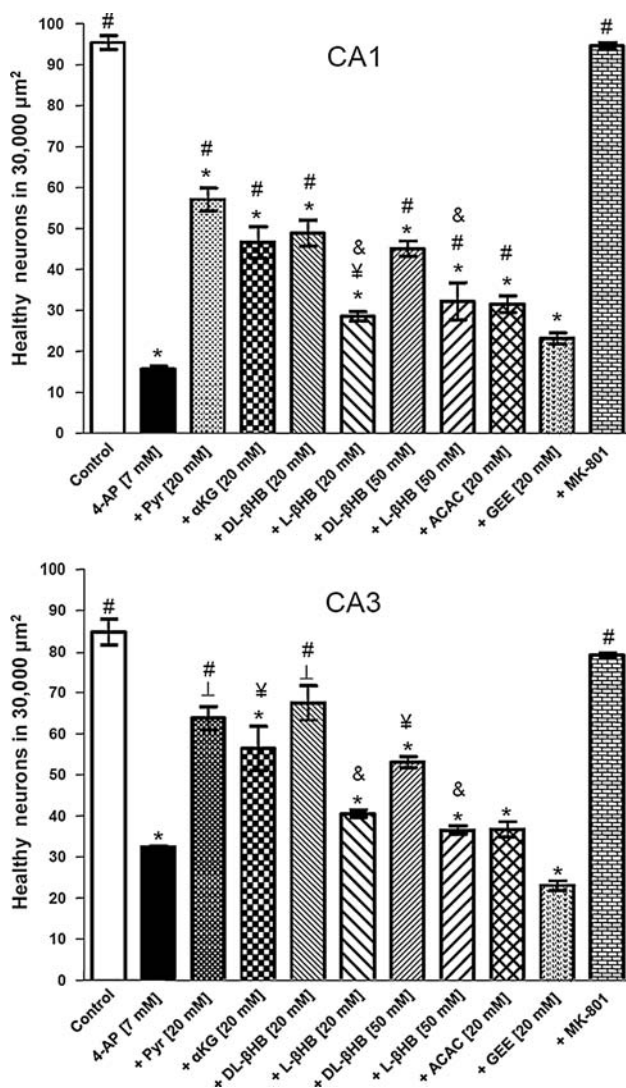


Fig. 4 Number of healthy pyramidal neurons in CA1 and CA3 regions of the hippocampus, in each experimental group. MK-801 completely prevented neuronal loss induced by 4-AP, and the energy substrates Pyr, α KB, DL- β HB and ACAC showed a significantly better protection than the antioxidants L- β HB and GEE ($p < 0.05$). Three histological sections from each rat were analyzed ($n = 7$ –14 per group). Data are mean values \pm SEM. $^{\dagger}p < 0.05$, $^*p < 0.001$, versus control group. $^{\vee}p < 0.01$, $^{\#}p < 0.001$, versus 4-AP group. $^{\&}p < 0.001$ versus the corresponding DL- β HB group (one-way ANOVA, Tukey post hoc)

important endogenous antioxidant that reacts directly with radicals in nonenzymatic reactions and it is also an electron donor in the reduction of peroxides catalyzed by glutathione peroxidase [36]. Our results clearly show that the two antioxidants tested exerted a weak protection, as compared with energy substrates, thus supporting the conclusion that the maintenance of energy production is the major factor for preserving neuronal integrity.

Thus, our results demonstrate that in awake rats 4-AP-induced excitotoxicity is mediated by excessive glutama-

tergic neurotransmission and NMDA receptor overactivation, and that mitochondrial energy dysfunction is prominently involved in the mechanism of neurodegeneration. A different question is why Pyr and α KG did not protect against seizures whereas the KB DL- β HB and ACAC showed some anticonvulsant action, manifested by a significant delay in the onset of the EEG status epilepticus. Because 4-AP-induced seizures occur as an immediate response of the 4-AP-glutamate-induced NMDA receptor activation and its direct effect as K^+ channel blocker, whereas degeneration is a delayed event [1–3, 20], such effect of the KB cannot be due to their action as energy substrates. In addition, the non-metabolized isomer L- β HB [50 mM] also significantly retarded the status epilepticus.

Antiepileptic effects of KB have been described in both experimental models and human patients (see [16, 37] for recent reviews). Ketogenic diets protect from pentylenetetrazole-induced seizures and against the maximal dentate activation of epileptogenesis [38–40], and a ketogenic diet for 3 months in epileptic children notably decreased seizure frequency [41]. Furthermore, intraperitoneal administration of DL- β HB reduced cortical excitability in non-anesthetized rat pups exposed to flurothyl [42], and ACAC protected against seizures in the Frings audiogenic seizure-susceptible juvenile mouse [43]. Interestingly, the EEG seizures induced by the administration of 4-AP by microdialysis in the hippocampus were reduced by the perfusion of ACAC, and this effect was correlated with a notable inhibition of the 4-AP-induced release of glutamate in the hippocampus. This effect was ascribed to a decreased vesicular glutamate transport produced by ACAC, as determined in proteoliposomes [44], which thus could be an important factor in the mechanism of the antiepileptic action of KB.

In conclusion, the present study suggest that mitochondrial energy dysfunction is predominantly involved in the mechanism of endogenous glutamate-dependent neurodegeneration induced by 4-AP in the hippocampus of awake rats, because energy substrates exert a better neuroprotective effect than antioxidants. These findings imply that supplementation of mitochondrial metabolism by energy substrates enable neurons to counteract the neurotoxic cascade triggered by glutamate receptors activation. Our findings show also that the delayed neurodegeneration process is independent of the rapid neuronal excitation induced by 4-AP and that the latter is reduced by KB, in agreement with previous studies on the anticonvulsant action of these compounds.

Acknowledgments This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACYT, project 128229) and DGAPA, UNAM (IN201013). C.N. is recipient of a scholarship from CONACYT. This work is part of the Ph.D. thesis of C.N.

References

- Peña F, Tapia R (1999) Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis and electroencephalographic study. *J Neurochem* 72:2006–2014
- Peña F, Tapia R (2000) Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience* 101:547–561
- Vera G, Tapia R (2012) Activation of group III metabotropic glutamate receptors by endogenous glutamate protects against glutamate-mediated excitotoxicity in the hippocampus in vivo. *J Neurosci Res* 90:1055–1066
- Jekabsons MB, Nicholls DG (2004) In situ respiration and bioenergetic status of mitochondria in primary cerebellar granule neuronal cultures exposed continuously to glutamate. *J Biol Chem* 279:32989–33000
- Nicholls DG (2008) Oxidative stress and energy crises in neuronal dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 1147:53–60
- Wang Y, Qin ZH (2010) Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis* 15:1382–1402
- Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL (2013) Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol* 698:6–18
- Maus M, Marin P, Israel M, Glowinski J, Prémont J (1999) Pyruvate and lactate protect striatal neurons against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 11:3215–3224
- Izumi Y, Zorumski CF (2010) Neuroprotective effects of pyruvate following NMDA-mediated excitotoxic insults in hippocampal slices. *Neurosci Lett* 478:131–135
- Shetty PK, Sadgrove MP, Galeffi F, Turner DA (2012) Pyruvate incubation enhances glycogen stores and sustains neuronal function during subsequent glucose deprivation. *Neurobiol Dis* 45:177–187
- Pan R, Rong Z, She Y, Cao Y, Chang LW, Lee WH (2012) Sodium pyruvate reduces hypoxic-ischemic injury to neonatal rat brain. *Pediatr Res* 72:479–489
- Massieu L, Haces ML, Montiel T, Hernández-Fonseca K (2003) Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. *Neuroscience* 120:365–378
- Maalouf M, Sullivan PG, Davis L, Kim DY, Rho JM (2007) Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience* 145:256–264
- Kim DY, Vallejo J, Rho JM (2010) Ketones prevent synaptic dysfunction induced by mitochondrial respiratory complex inhibitors. *J Neurochem* 114:130–141
- Samoilova M, Weisspapir M, Abdelmalik P, Velumian AA, Carlen PL (2010) Chronic in vitro ketosis is neuroprotective but not anti-convulsant. *J Neurochem* 113:826–835
- McNally MA, Hartman AL (2012) Ketone bodies in epilepsy. *J Neurochem* 121:28–35
- Paxinos G, Watson C (1982) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Sydney
- Ramírez-Munguía N, Vera G, Tapia R (2003) Epilepsy, neurodegeneration and extracellular glutamate in the hippocampus of awake and anesthetized rats treated with okadaic acid. *Neurochem Res* 28:1517–1524
- Massieu L, Morales-Villagrán A, Tapia R (1995) Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem* 64(5):2262–2271
- Ayala GX, Tapia R (2003) Expression of heat shock protein 70 induced by 4-aminopyridine through glutamate-mediated excitotoxic stress in rat hippocampus in vivo. *Neuropharmacology* 45:649–660
- Ayala GX, Tapia R (2005) Late N-methyl-D-aspartate receptor blockade rescues hippocampal neurons from excitotoxic stress and death after 4-aminopyridine-induced epilepsy. *Eur J Neurosci* 22:3067–3076
- Khatra N, Man HY (2013) Synaptic activity and bioenergy homeostasis: implications in brain trauma and neurodegenerative diseases. *Front Neurol* 4:199. doi:10.3389/fneur.2013.00199
- Satpute R, Lomash V, Kaushal M, Bhattacharya R (2013) Neuroprotective effects of alpha-ketoglutarate and ethyl pyruvate against motor dysfunction and oxidative changes caused by repeated 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine exposure in mice. *Hum Exp Toxicol* 32:747–758
- Mejía-Toiber J, Montiel T, Massieu L (2006) D-beta-hydroxybutyrate prevents glutamate-mediated lipoperoxidation and neuronal damage elicited during glycolysis inhibition in vivo. *Neurochem Res* 31:1399–1408
- Lim S, Chesser AS, Grima JC, Rappold PM, Blum D, Przedborski S, Tieu K (2011) D-β-hydroxybutyrate is protective in mouse models of Huntington's disease. *PLoS One* 6:e24620
- Shimazu T, Hirschey MD, Newman J, He W, Shirakawa K, Le Moan N, Grueter CA, Lim H, Saunders LR, Stevens RD, Newgard CB, Farese RV Jr, de Cabo R, Ulrich S, Akassoglou K, Verdin E (2013) Suppression of oxidative stress by β-hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science* 339:211–214
- Desagher S, Glowinski J, Prémont J (1997) Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *J Neurosci* 17:9060–9067
- Wang X, Perez E, Liu R, Yan LJ, Mallet RT, Yang SH (2007) Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Brain Res* 1132:1–9
- Noh HS, Hah YS, Nilufar R, Han J, Bong JH, Kang SS, Cho GJ, Choi WS (2006) Acetoacetate protects neuronal cells from oxidative glutamate toxicity. *J Neurosci Res* 83:702–709
- Cheng B, Lu H, Bai B, Chen J (2013) d-β-Hydroxybutyrate inhibited the apoptosis of PC12 cells induced by H₂O₂ via inhibiting oxidative stress. *Neurochem Int* 62:620–625
- Fernandez-Gomez FJ, Pastor MD, Garcia-Martinez EM, Melero-Fernandez de Mera R, Gou-Fabregas M, Gomez-Lazaro M, Calvo S, Soler RM, Galindo MF, Jordán J (2006) Pyruvate protects cerebellar granular cells from 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity by activating the Akt signaling pathway and increasing glutathione peroxidase expression. *Neurobiol Dis* 24:296–307
- Miao Y, Qiu Y, Lin Y, Miao Z, Zhang J, Lu X (2011) Protection by pyruvate against glutamate neurotoxicity is mediated by astrocytes through a glutathione-dependent mechanism. *Mol Biol Rep* 38:3235–3242
- Cheng B, Yang X, An L, Gao B, Liu X, Liu S (2009) Ketogenic diet protects dopaminergic neurons against 6-OHDA neurotoxicity via up-regulating glutathione in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 1286:25–31
- Haces ML, Hernández-Fonseca K, Medina-Campos ON, Montiel T, Pedraza-Chaverri J, Massieu L (2008) Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. *Exp Neurol* 211:85–96
- Zeevalk GD, Manzano L, Sonsalla PK, Bernard LP (2007) Characterization of intracellular elevation of glutathione (GSH) with glutathione monoethyl ester and GSH in brain and neuronal

- cultures: relevance to Parkinson's disease. *Exp Neurol* 203: 512–520
36. Dringen R (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62:649–671
 37. Bough KJ, Rho JM (2007) Anticonvulsant mechanisms of the ketogenic diet. *Epilepsia* 48:43–58
 38. Bough KJ, Eagles DA (1999) A ketogenic diet increases the resistance to pentylenetetrazole-induced seizures in the rat. *Epilepsia* 40:138–143
 39. Bough KJ, Schwartzkroin PA, Rho JM (2003) Calorie restriction and ketogenic diet diminish neuronal excitability in rat dentate gyrus in vivo. *Epilepsia* 44:752–760
 40. Bough KJ, Yao SG, Eagles DA (2000) Higher ketogenic diet ratios confer protection from seizures without neurotoxicity. *Epilepsy Res* 38:15–25
 41. Neal EG, Chaffe H, Schwartz RH, Lawson MS, Edwards N, Fitzsimmons G, Whitney A, Cross JH (2008) The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial. *Lancet Neurol* 7:500–506
 42. Minlebaev M, Khazipov R (2011) Antiepileptic effects of endogenous beta-hydroxybutyrate in suckling infant rats. *Epilepsy Res* 95:100–109
 43. Rho JM, Anderson GD, Donevan SD, White HS (2002) Acetoacetate, acetone, and dibenzylamine (a contaminant in l-(+)-beta-hydroxybutyrate) exhibit direct anticonvulsant actions in vivo. *Epilepsia* 43:358–361
 44. Juge N, Gray JA, Omote H, Miyaji T, Inoue T, Hara C, Uneyama H, Edwards RH, Nicoll RA, Moriyama Y (2010) Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron* 68:99–112

Los sustratos energéticos como terapia para la ELA

El hinchamiento de las mitocondrias, así como algunas irregularidades en la organización de su membrana interna, son algunas de las alteraciones morfológicas que se han reportado en el tejido espinal de pacientes diagnosticados con ELA esporádica (Sasaki e Iwata, 2007). En las biopsias de músculo esquelético de estos pacientes, a través de estudios de microarreglos y un análisis de redes genéticas, también se han demostrado irregularidades en la expresión de genes involucrados en la función mitocondrial (Bernardini *et al.*, 2013). Incluso, en este mismo tejido muscular se ha reportado una disminución en la actividad mitocondrial, especialmente del complejo IV (Crugnola *et al.*, 2010; Vielhaber *et al.*, 2000; Wiedemann *et al.*, 1998), así como una elevada cantidad de daño (deleciones) en el ácido desoxirribonucleico (DNA) de este organelo (Vielhaber *et al.*, 1999; 2000). De forma semejante, se han descrito alteraciones estructurales y funcionales en las mitocondrias de la médula espinal de animales transgénicos del modelo de ELA familiar G93A (Bendotti *et al.*, 2001; Mattiazzi *et al.*, 2002; Parone *et al.*, 2013).

En cultivos de células NSC-34 en las que se indujo la sobre-expresión de la mutación G93A, se ha demostrado que la suplementación de BHB en el medio restablece los niveles del antioxidante glutatión (D'Alessandro *et al.*, 2011). En cultivos de células semejantes expuestos a concentraciones tóxicas de cobre que estimulan el estrés oxidante, el piruvato redujo significativamente la muerte celular y los niveles de ROS (Kim *et al.*, 2005). Con respecto a las evidencias *in vivo*, se demostró en ratones de la cepa SOD1-G93A que la administración sistémica crónica de piruvato no es capaz de modificar el inicio de la enfermedad, pero sí es eficaz para disminuir la progresión de los síntomas y mejorar el desempeño motor (Park *et al.*, 2007). Por otro lado, las mitocondrias de la médula espinal de ratones G93A sometidos a dietas cetónicas son capaces de mejorar su respiración mitocondrial, así como de restablecer los niveles de ATP, lo que disminuye la muerte de las MNs y rescata el desempeño motor de los animales (Ari *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2006; 2012).

En nuestro modelo agudo se ha demostrado que el AMPA en la médula espinal induce alteraciones morfológicas en la estructura mitocondrial, así como disfunción de los complejos mitocondriales, especialmente del complejo I (Santa-Cruz *et al.*, 2016). La infusión espinal de sustratos energéticos tales como el piruvato, lactato, BHB, creatina y α -cetobutirato ha demostrado ser eficaz para disminuir estas afectaciones mitocondriales, así como la neurodegeneración espinal y la parálisis unilateral que se presenta en los animales sometidos a este modelo rápido de degeneración (Corona y Tapia, 2007; Santa-Cruz y Tapia, 2014; Santa-Cruz *et al.*, 2016).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los antecedentes muestran que los sustratos oxidables que pueden integrarse al metabolismo celular para estimular la producción energética protegen de diversos estímulos neurotóxicos. En nuestro laboratorio se ha demostrado que estos sustratos protegen de la neurodegeneración espinal inducida por un estímulo excitotóxico agudo. Pero, ya que este modelo agudo se aleja de los síntomas progresivos y crónicos característicos de la ELA, consideramos de interés determinar si los sustratos energéticos son igualmente eficaces para disminuir los efectos tóxicos de un estímulo crónico con AMPA en la médula espinal *in vivo*. Estos resultados nos permitirán deducir la importancia de las alteraciones del metabolismo energético en el proceso gradual de neurodegeneración que caracteriza a nuestro modelo crónico.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Establecer si las alteraciones en el metabolismo energético celular son determinantes en el proceso de muerte inducido por el estímulo excitotóxico crónico en la médula espinal de rata.

Objetivos particulares

- Estudiar el efecto de los sustratos energéticos piruvato y BHB en nuestro modelo crónico de degeneración espinal inducido con AMPA.
- Determinar si los efectos de los sustratos energéticos depende de su actividad antioxidante al comparar su eficiencia de neuroprotección con el de los antioxidantes glutatión y ascorbato.

MÉTODOS Y RESULTADOS: ARTÍCULO ORIGINAL

Degeneration of spinal motor neurons by chronic AMPA-induced excitotoxicity *in vivo* and protection by energy substrates

Citlalli Netzahualcoyotzi y Ricardo Tapia

Acta Neuropathologica Communications 2015;3:27.

El grupo del Dr. Tapia ha demostrado que la infusión crónica de AMPA en la médula espinal lumbar, a través del uso de mini bombas osmóticas, induce la degeneración progresiva de las MNs en las dos astas lumbares. Como resultado, se presenta debilidad y disfunción motriz de las patas traseras, que progresa hasta establecerse la parálisis bilateral completa (Tovar-y-Romo *et al.*, 2007). Para estudiar la posible participación de la disfunción energética mitocondrial y el estrés oxidante en este proceso crónico de degeneración espinal mediado por excitotoxicidad, decidimos evaluar el efecto de sustratos energéticos (piruvato y BHB) que pueden ser incorporados al metabolismo celular, así como el de algunos potentes antioxidantes (ascorbato y glutatión, éste último en forma de etil éster lo que facilita su entrada a la célula, Zeevalk *et al.*, 2007). Siguiendo la metodología establecida por Tovar-y-Romo (2007), evaluamos concentraciones decrecientes de AMPA (7.5, 4.0, 3.5 y 1 mM) con el objetivo de encontrar las condiciones que nos permitieran disminuir la intensidad de los efectos tóxicos del modelo y los hiciera aparecer de forma más paulatina. No encontramos diferencia significativa entre los efectos generados con las tres concentraciones más altas. Elegimos trabajar con 1 mM de AMPA porque con esta concentración y la colocación de la cánula del implante entre los segmentos espinales L3 y L4, logramos inducir una parálisis paulatina que tarda aproximadamente siete días en establecerse de forma bilateral y completa. Esta parálisis inicia en la parte más distal de la pata ipsilateral y avanza progresivamente hasta abarcar los músculos proximales y, con un leve retraso, este mismo daño motor se presenta en la pata contralateral. Como resultado, los animales tratados con AMPA disminuyen de forma paulatina su desempeño motor evaluado a través del test del rotarod, así como su capacidad para escalar una rejilla vertical. Estos efectos conductuales concuerdan con la neurodegeneración ~90 % de las MNs espinales de la región lumbar, que se acompaña de una intensa marca de gliosis reactiva. Por otro lado, cuando los animales son co-infundidos con los sustratos energéticos (piruvato o BHB 10 mM) disminuye significativamente el daño motor y se preserva su desempeño en las tareas motoras. Concordantemente, la muerte de las MNs espinales en este grupo disminuye a ~40 %. En contraste, ninguno de los antioxidantes (ascorbato o glutatión 10 mM, evaluados solos o en combinación 1:1), logró proteger de los efectos neurotóxicos del AMPA. Ya que los sustratos energéticos protegieron significativamente en este modelo, concluimos que el déficit en el metabolismo energético celular participa importantemente en el mecanismo de muerte de las MNs inducido por un estímulo excitotóxico crónico en la médula espinal. Por el contrario, parece que el estrés oxidante tiene una participación más limitada en este proceso, pues los antioxidantes mostraron escasos o nulos efectos de protección.

RESEARCH

Open Access

Degeneration of spinal motor neurons by chronic AMPA-induced excitotoxicity in vivo and protection by energy substrates

Citlalli Netzahualcoyotzi and Ricardo Tapia*

Abstract

Introduction: Several data suggest that excitotoxicity due to excessive glutamatergic neurotransmission may be an important factor in the mechanisms of motor neuron (MN) death occurring in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). We have previously shown that the overactivation of the Ca^{2+} -permeable α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) glutamate receptor type, through the continuous infusion of AMPA in the lumbar spinal cord of adult rats during several days, results in progressive rear limb paralysis and bilateral MN degeneration. Because it has been shown that energy failure and oxidative stress are involved in MN degeneration, in both ALS and experimental models of spinal MN degeneration, including excitotoxicity, in this work we tested the protective effect of the energy substrates pyruvate and β -hydroxybutyrate (β HB) and the antioxidants glutathione ethyl ester (GEE) and ascorbate in this chronic AMPA-induced neurodegeneration.

Results: AMPA infusion induced remarkable progressive motor deficits, assessed by two motor tasks, that by day seven reach bilateral rear limb paralysis. These effects correlate with the death of >80% of lumbar spinal MNs in the infused and the neighbor spinal cord segments, as well as with notable astrogliosis in the ventral horns, detected by glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry. Co-infusion with pyruvate or β HB notably prevented the motor deficits and paralysis, decreased MN loss to <25% and completely prevented the induction of astrogliosis. In contrast, the antioxidants tested were ineffective regarding all parameters analyzed.

Conclusions: Chronic progressive excitotoxicity due to AMPA receptors overactivation results in MN death and astrogliosis, with consequent motor deficits and paralysis. Because of the notable protection against these effects exerted by pyruvate and β HB, which are well established mitochondrial energy substrates, we conclude that deficits in mitochondrial energy metabolism are an important factor in the mechanisms of this slowly developed excitotoxic MN death, while the lack of protective effect of the antioxidants indicates that oxidative stress seems to be less significant factor. Because excitotoxicity may be involved in MN degeneration in ALS, these findings suggest possible preventive or therapeutic strategies for the disease.

Keywords: AMPA, Amyotrophic lateral sclerosis, Antioxidants, Energy substrates, Excitotoxicity, Motor neurons, Neurodegeneration, Spinal cord

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a lethal neurodegenerative disorder characterized by the death of the upper motor neurons (MNs) in the motor cortex and the lower ones in the brain stem and the spinal cord. ALS patients develop a progressive muscle paralysis and there is still no

effective treatment. About 10% of ALS cases involve genetic alterations and are therefore termed familial ALS, but the etiology of the remainder 90%, sporadic ALS, is still largely unknown. Among the many factors that have been involved in the mechanisms of MN degeneration are glutamate receptor-mediated excitotoxicity, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, neuroinflammation, immune-mediated processes, protein aggregation and axonal transport alterations [1,2], but there is still no satisfactory explanation of why such factors damage predominantly MNs.

* Correspondence: rtapia@ifc.unam.mx

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-253, 04510 México DF, México

Mitochondrial oxidative metabolism seems to be involved in ALS pathogenesis, since morphological and functional alterations in mitochondria of spinal MNs and skeletal muscle of ALS patients have been described [3-6], as well as mitochondrial swelling and vacuolization in the spinal cord of transgenic mutant superoxide dismutase 1 (SOD1) ALS mice [7,8]. In addition, isolated mitochondria from the spinal cord of these mutant SOD1 mice showed decreased Ca^{2+} buffering capacity [8], and dysfunction of oxidative phosphorylation and consequently decreased ATP synthesis [9,10].

The excitotoxic process involves the entrance of Ca^{2+} through glutamate receptors, and the resulting disruption of Ca^{2+} homeostasis activates lytic enzymes, induces the overproduction of reactive oxygen species and leads to mitochondrial dysfunction and energy failure [2,11-13]. Work from our laboratory has shown that such excitotoxic mechanism, mediated mainly by overactivation of the Ca^{2+} -permeable AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate)-type receptors induces the death of spinal MNs in the rat in vivo and that this results in progressive paralysis. Acute or chronic infusion of AMPA in the lumbar spinal cord, by means of microdialysis [14,15] or osmotic minipumps [16], respectively, results in MN degeneration that correlated with motor alterations and finally paralysis of the rear limbs, in 3–12 h after microdialysis or in 3–5 days after the implantation of the osmotic pump. The acute MN death and ipsilateral paralysis caused by AMPA microdialysis perfusion was prevented or reduced by specific Ca^{2+} -permeable AMPA receptor antagonists and by intracellular Ca^{2+} chelators [15,17], demonstrating the vulnerability of spinal MNs to the excitotoxic effect of Ca^{2+} -permeable AMPA receptors activation in vivo, which had been previously reported only in studies in neuronal cultures in vitro [18-20]. Using the acute microdialysis procedure, which results in rapid ipsilateral MN loss and motor alterations of the corresponding rearlimb, we recently showed that among several energy substrates and antioxidants tested, pyruvate and β -hydroxybutyrate (β HB) notably protected against the excitotoxic effects of AMPA whereas the antioxidants tested were ineffective. These results allowed us to conclude that failure in mitochondrial energy metabolism was greatly involved in this rapid MN death, and also permitted to establish a correlation between the number of dead MNs and the degree of unilateral motor alterations [21]. Nonetheless, in this microdialysis acute experiment AMPA is perfused during 25 min and produces only unilateral paralysis, MN alterations and motor deficits that develop in less than 6 h, whereas the chronic slow continuous administration of AMPA through osmotic minipumps induces bilateral rear limb paralysis that progresses slowly along several days, also correlated with MN loss but extended to both ventral horns. Therefore, we considered of

interest to evaluate the efficacy of the energy substrates and the antioxidants to protect against the chronic AMPA excitotoxic action. In addition, we correlated the protective effect along the progress of motor alterations with the MN loss in the infused region and in the immediate rostral region of the lumbar spinal cord, as well as with the prevention of astrogliosis induced by AMPA.

Materials and methods

Adult male Wistar rats (280–300 g) were used in all experiments and were handled in accordance with international standards of animal welfare and with approval of the Institutional Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (Approval No. RTI21-14). Rats were housed in a laboratory environment with a 12 h light/dark cycle and with food and water ad libitum. Animals showing complete paralysis and loss of the righting reflex within 15 s were sacrificed to avoid unnecessary suffering and were not analyzed further.

Osmotic minipumps implantation

The implantation of the osmotic minipumps in the lumbar spinal cord was carried out essentially as previously described [16] with the following modifications.

All drugs were dissolved in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. After some preliminary experiments with 7.5, 4.5, 3.5 and 1 mM AMPA (Tocris, Ellisville, MO, USA), the latter concentration was chosen because it induced a slow and progressive paralysis of the rear limbs along several days, whereas the effect of the higher doses was more rapid and severe. We tested the effect of the energy substrates pyruvate and β HB, and the antioxidants ascorbate and glutathione ethyl ester (GEE) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) at concentration of 20 mM, based on our previous work with AMPA acute administration [21]. GEE was used instead of glutathione because it enters the cell more efficiently [22]. Osmotic minipumps (Alzet model 2004, capacity ~250 μL , flow rate 6 $\mu\text{L}/\text{day}$) were filled with one of the following solutions: vehicle as control, 1 mM AMPA, AMPA + sodium pyruvate, AMPA + DL- β HB sodium salt, AMPA + GEE, AMPA + L-ascorbic acid, and AMPA + antioxidant mixture (GEE + ascorbate), and they were incubated in sterile saline solution at 37°C for 48 h for stabilization before the implantation. The day of surgery rats were anesthetized with isoflurane 1-2% in a 95% O_2 + 5% CO_2 mixture and placed in a stereotaxic spinal unit. A longitudinal incision of the skin was made in the lumbar region and muscles surrounding the lumbar vertebrae were retracted. A stainless-steel screw (3.7 mm long, 1 mm diameter) was inserted on the left side of the third lumbar vertebra without reaching the surface of the spinal cord to anchor the implant. A 1–2 mm diameter hole was drilled at the same vertebrae and a small cut of

the meninges was made to insert a borosilicate glass probe (1 mm long, 0.5 I.D. x 0.8 O.D., VitroCom Inc.) into the right dorsal horn of the spinal cord. The other end of the cannula was connected through a plastic tube to the osmotic minipump which was placed subcutaneously in the back of the rat, caudally to the skin incision. The probe and the screw were fixed to the bone with dental acrylic. At the end of the surgery, the skin incision was closed with surgical stainless-steel clips and rats received a single i.m. dose of penicillin (50 U). After recovering from anesthesia animals were kept in individual cages with water and food ad libitum until perfusion for histological analysis. Neither the control nor the experimental animals showed signs of pain or suffering during the time period studied, even during their performance in the motor tests.

Assessment of motor function

Before surgery rats were trained to achieve 120 s on the rotarod test (Columbus Instruments), in which rotation started at 10 rpm and accelerated at 0.2 rpm/s, and also to perform a PGE task, where the latency to climb a vertical grid is scored. Three trials/day/rat were assessed in each motor test. In addition, the hind paw footprint was registered using non-toxic Chinese ink on the hind paws of rats. Besides, holding up the tail we photographically recorded the changes in the position of the rear limbs. These motor evaluations were assessed daily five days prior surgery until the seventh day, when animals were anesthetized and perfused for histology.

Histology and immunohistochemistry

Seven days after osmotic pump implantation rats were perfused and fixed for histological and immunohistochemical analyses as previously described [16]. Briefly, spinal cords were removed, postfixed 48 h at 4°C and dehydrated with 20% and 30% sucrose solutions. Transverse sections (45 µm thick) of the spinal cords were obtained in a cryostat. Fifty serial slices at the site of the cannula infusion (infused region) and the next fifty rostral slices (rostral region) were obtained, so that the total tissue analyzed was 2.25 mm length, about 2 lumbar segments each region. Alternate slices were stained with cresyl violet or immunostained for neurofilament protein SMI-32 and glial fibrillary acidic protein (GFAP). The number of morphologically healthy MNs (i.e. large neurons with a soma diameter >20 µm and distinguishable nucleus, similar in appearance to those of the control and intact rats) in both the ipsilateral and contralateral ventral horns were counted in fifteen Nissl-stained slices/rat/region and the values were averaged.

For immunohistochemistry, mouse polyclonal anti-SMI-32 (1:500, Abcam), chicken anti-GFAP (1:1000, Abcam), as markers of neurons and astrocytes, respectively;

Texas-red-conjugated anti-mouse (1:200, Invitrogen) and fluorescein-conjugated anti-chicken (1:200, Novex) antibodies were used. Sections were mounted on silane-covered slides and coverslipped with fluorescent mounting medium (DAKO). Sections were visualized under epifluorescent microscopy and merged images of the overlay of FITC and Texas Red channels were obtained with Image J (NIH, Bethesda, USA). The cross-reactivity in the immunofluorescent technique was excluded by control slices incubated in the absence of primary antibodies. There was no immunostaining in these controls.

Statistics

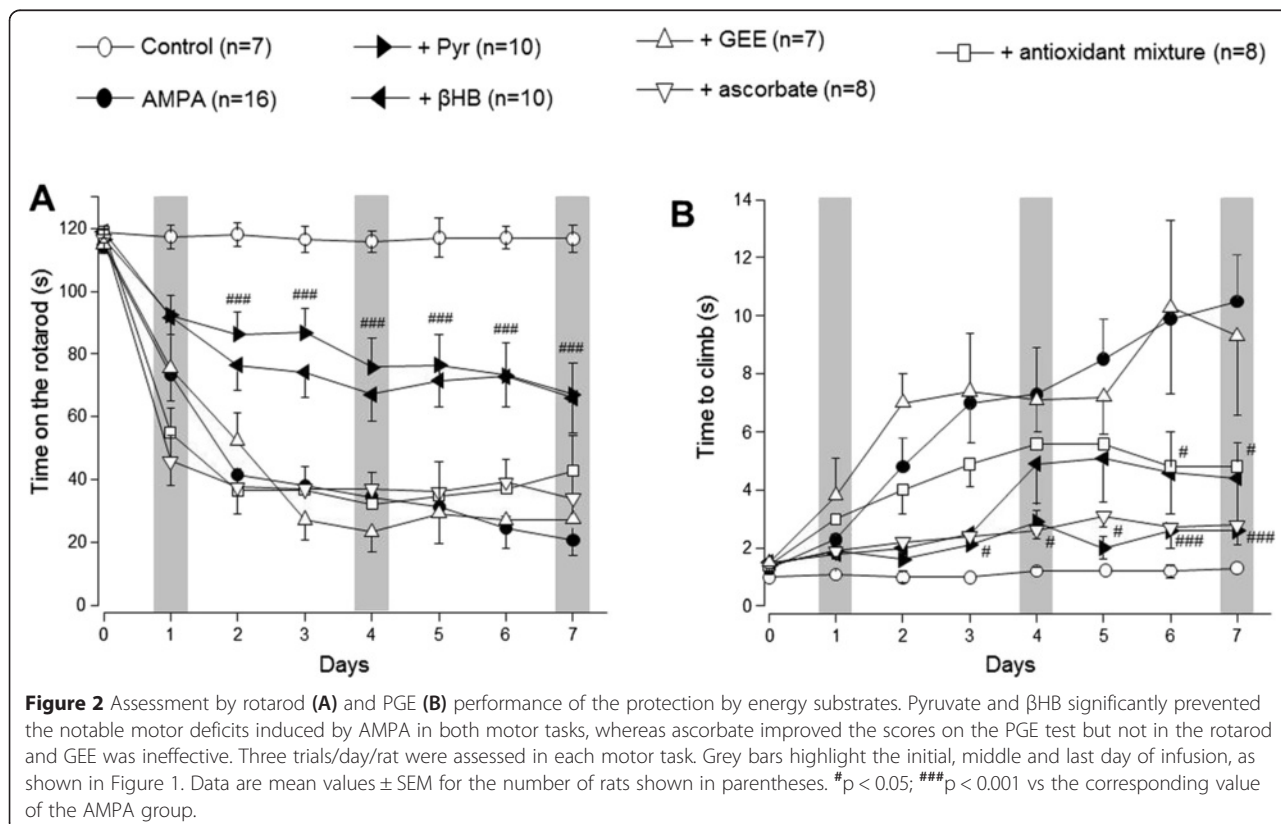
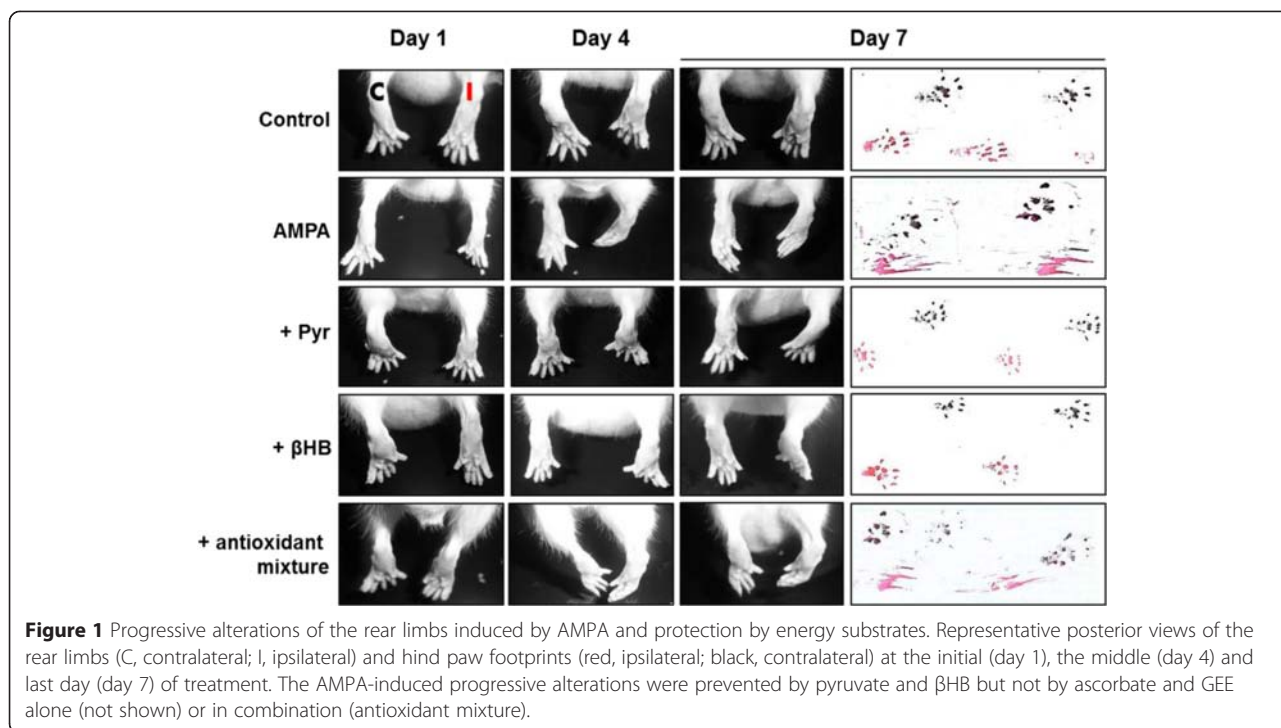
The statistical analysis of the number of healthy MNs, the rotarod and PGE performance was carried out using ANOVA followed by a Tukey's post hoc test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Energy substrates exert better protection than antioxidants against the AMPA-induced motor alterations

None of the control rats showed motor dysfunctions (Figures 1 and 2) or histological damage (Figures 3, 4 and 5) at any time up to 7 days, the maximum period studied. Perfusion of pyruvate, β HB, GEE or ascorbate alone at 20 mM concentration ($n = 3$ per group) was also innocuous (not shown). The chronic 7.5 mM AMPA infusion in the lumbar spinal cord of rats induced a gradual paralysis of the rear limbs in about 3 days [16]. As mentioned in Methods, in this work we reduced the concentration from 7.5 mM to 1 mM in order to extend the time of progression of symptoms. AMPA induced a paralysis that began in the distal ipsilateral rear limb (phalanges), ascending through the tarsus until the entire limb; the same process occurred with a short delay in the contralateral limb. This progression is shown in Figure 1 at days 1, 4 and 7. Quantitative assessment of these motor alterations in the rotarod and the paw grip endurance (PGE) test is shown in Figure 2, with emphasis in the values at these days to show the correlation with the position of the paws at these times. Whereas control rats remained in the rotarod for the total test period of 120 s, AMPA-infused animals fell at 73 s at day 1, 31–41 s at days 2–5 and 21 s at day 7. In the PGE task, control rats climbed always within 1 s whereas AMPA-treated animals at day 1 took double time to climb and then this time increased progressively until 7 s at day 4 and 10 s at day 7.

Perfusion of pyruvate and β HB partially prevented the AMPA-induced rear limbs paralysis. As shown in Figure 1, animals from these groups were able to partially control the ipsilateral phalanges and there was only a slight weakness in the contralateral ones, manifested by an incomplete tarsus footprint contralateral paw. Although the



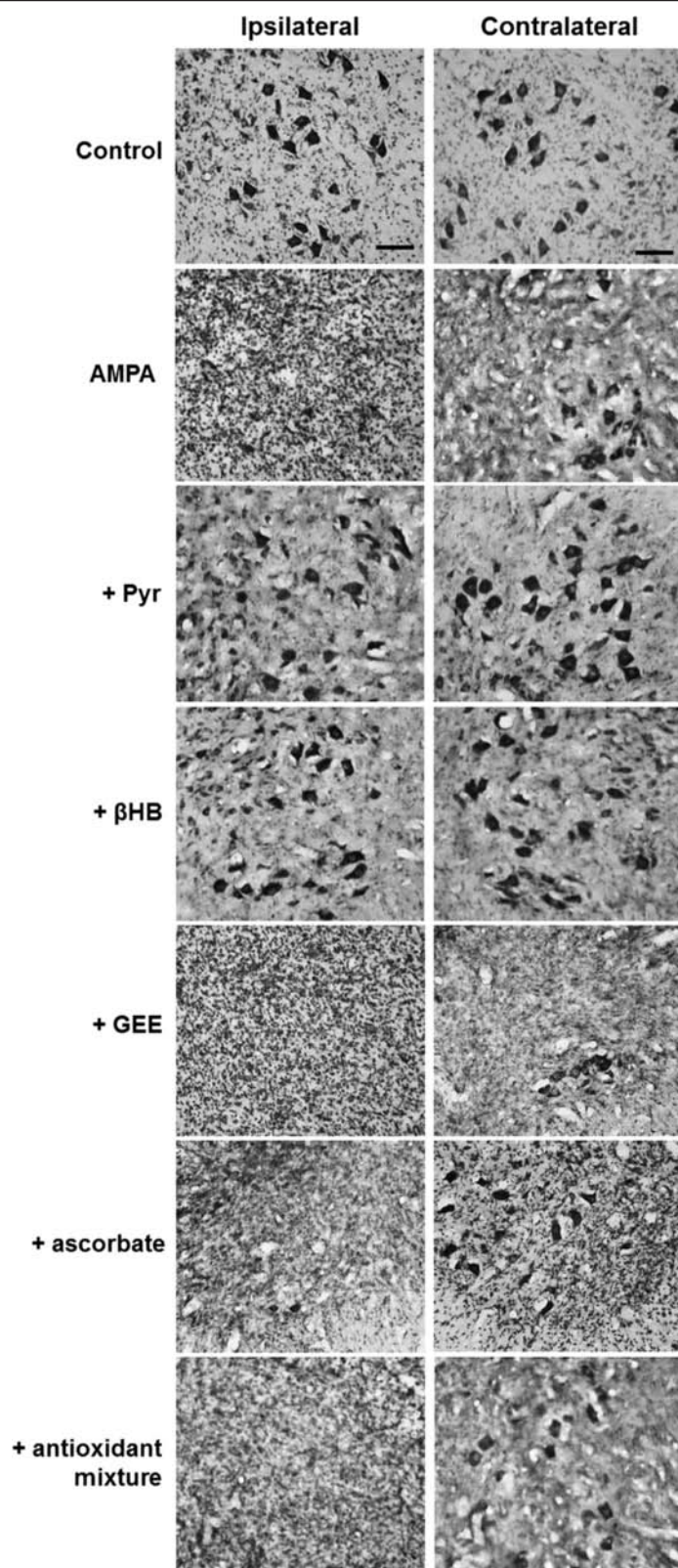


Figure 3 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Figure 3 AMPA-induced MN degeneration and protection by energy substrates. Representative micrographs of the ventral horns of Nissl-stained sections of the infused lumbar spinal cord region of rats treated as indicated, seven days after minipump implantation. AMPA induced an almost complete loss of MN in the infused side (ipsilateral) and a less intense degeneration in the contralateral side, and both effects were clearly prevented by pyruvate and β HB but not by ascorbate or GEE. Quantitative analysis is shown in Figure 4. Scale bar = 100 μ m.

energy substrates did not entirely prevent the above described AMPA-induced paralysis, its protective effect was highly significant, attaining 91 s in the rotarod performance at day 1, and then 66–76 s from day 4 to 7 (Figure 2A). In the PGE task pyruvate was very efficient, since the time to climb was only 2–3 s during the whole observation period, whereas β HB was less effective from days 4–7, with climbing times of 4–5 s (Figure 2B).

In contrast to the notable protective effect of pyruvate and β HB, neither GEE or ascorbate, alone or in combination, prevented the AMPA-induced motor deficits observed in the rotarod. In these animals the times to fall were similar or even lesser (days 1 and 4) than those shown by the AMPA group during the whole period of observation (Figure 2A). In the PGE test (Figure 2B), GEE was also totally ineffective during all observation period, but ascorbate partially protected, especially during the first three days, where the time to climb was similar to those with pyruvate and β HB. However, when ascorbate was co-infused with GEE the protection during the first three days was diminished (Figure 2B), as shown also by the complete paralysis observed in the ipsilateral rear limb in these animals (Figure 1).

Energy substrates reduced the AMPA-induced MN degeneration

As described in Methods, we analyzed two regions of the lumbar spinal cord (about two lumbar segments for each region). The infused region refers to the area where the cannula was implanted and the rostral region refers to the next rostral segments. We analyzed both regions because we found a differential effect of AMPA depending of its proximity to the probe. This pattern of damage correlates, as explained in the Discussion, with the progression of the bilateral paralysis.

As shown in Figures 3 and 4, the infusion of AMPA resulted at day 7 in an almost total loss of MNs (95%) in the ipsilateral horn and a reduction of 60% in the contralateral horn in the infused region, while in the rostral region the degeneration was also notable in both horns but less severe. The infusion of pyruvate and β HB significantly reduced the MNs loss in the infused region to 40%-50% in the ipsilateral horn and to only 10%-15% in the contralateral side. The protection by both substrates was also evident in the rostral region, where the number of healthy MNs was similar to the values in the control rats, especially in the contralateral horn. The

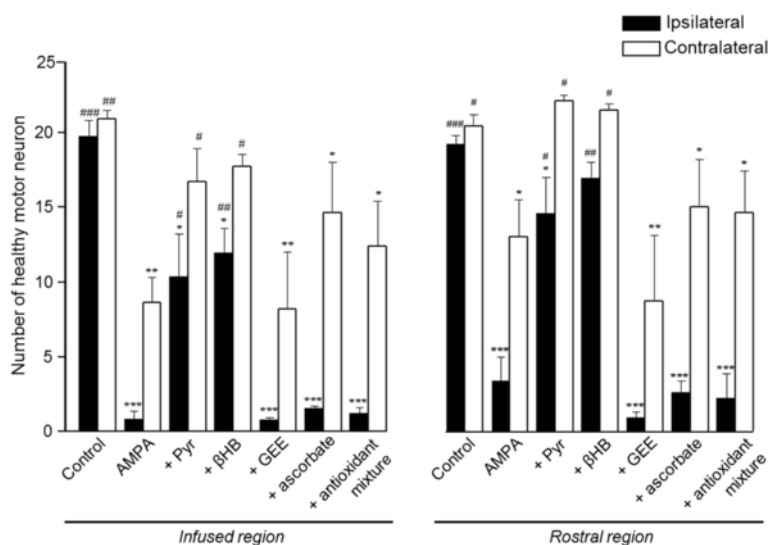
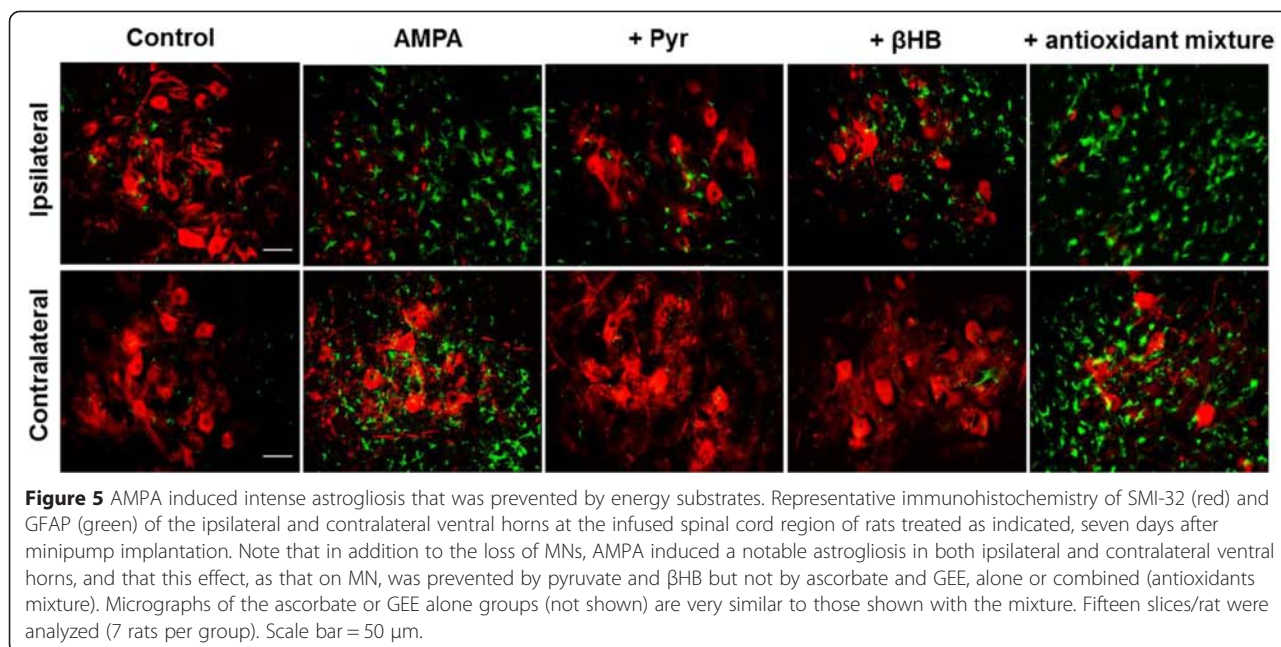


Figure 4 Quantitative analysis of MN loss in each experimental group. Number of healthy MNs in the ipsilateral and contralateral ventral horns in the infused spinal cord region and in the adjacent rostral region of rats treated as indicated, seven days after minipump implantation. Pyruvate and β HB notably prevented the AMPA-induced MN degeneration in the ipsilateral horn in both the infused and rostral regions, whereas ascorbate and GEE, alone or in combination (antioxidant mixture) were ineffective. Fifteen histological slices/rat/region were analyzed. Data are mean values \pm SEM for the following number of rats in each group: control 7; AMPA 16; AMPA + Pyr 10; AMPA + β HB 10; AMPA + GEE 7; AMPA + ascorbate 8; AMPA + antioxidants mixture 8. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs the corresponding side of the control group; # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001 vs the corresponding side of the AMPA group.



infusion of the antioxidant GEE was ineffective to protect the spinal MNs in both regions, but ascorbate alone or in combination with GEE slightly reduced the number of MNs death, particularly in the contralateral horn of the infused region; these changes, however, were not significant (Figure 4).

Figure 5 shows that the loss of MN produced by AMPA in the infused region was accompanied by a remarkable astrogliosis, as detected by GFAP immunoreactivity, in both the ipsilateral and contralateral horns. Similarly to the protection of MN, both energy substrates tested almost completely prevented the glial reactivity in the contralateral horn and clearly reduced it in the ipsilateral side. In contrast, the GFAP immunoreactivity in the groups treated with AMPA + antioxidants alone or in combination was not different from the AMPA group. These results were reproduced in each of the 7 rats treated in each group of animals and quantitative analysis was not carried out.

Discussion

In this work we show that the spinal MN death and astrogliosis induced by the continuous slow infusion of AMPA are prevented by pyruvate and β HB, and in one of the motor parameters studied by ascorbate, but not by GEE. Although the protection by the energy substrates was not complete, the number of protected MNs was enough to notably prevent the progression of the AMPA-induced motor deficits. These results show a clear correlation between the progress of motor alterations and significantly reduced MN loss and astrogliosis.

The AMPA-induced paralysis started in the ipsilateral phalanges and extended with time to the upper regions of the rear limb and to the contralateral side. This suggests that progression of the effects is due to a slow continuous diffusion of AMPA, explaining the larger damage in the infused region as compared with the rostral one. Because the infusion cannula was located between L3 and L4 segments of the spinal cord, the nearest MNs to the probe, that innervate the extensor digitorum that controls the phalanges movement are probably the first ones to receive AMPA and to degenerate, and then AMPA diffuses to affect MNs in the rostral region innervating upper limb muscles. The delay in the appearance of symptoms in the contralateral side is probably due also to the diffusion of the drug.

As mentioned in the Introduction, we have previously reported that pyruvate and β HB protected against the rapid deleterious action of the perfusion of AMPA during 25 min by reverse microdialysis, which induces unilateral paralysis and MN death in 3–12 h [21]. This acute effect allows just a restricted analysis of motor alterations and leaves open the question of whether these energy substrates are effective when the degeneration process is much slower, as it occurs in the osmotic pump continuous infusion procedure used in the present work. A therapeutic effect of oral administration of pyruvate was also reported in the mutant G93A-SOD ALS mice [23], although in these transgenic mice daily i.p. administration of pyruvate failed to delay the onset and motor decline [24]. Pyruvate or β HB also protected spinal MNs from mechanical damage [25], as well as striatal or hippocampal neurons from oxidative stress

[26] or glutamate-induced excitotoxicity [27,28]. However, this is the first report of protection by pyruvate and β HB in a non-genetic model of spinal MN degeneration that correlated with the progression of motor impairment during several days.

It is noteworthy that there was no significant difference among the protective effect produced by pyruvate and β HB (tested at the same 20 mM concentration), thus suggesting that these substrates share a neuroprotective mechanism. A possible interaction of pyruvate and β HB with AMPA to explain the protection is improbable, because, judging from the structure of these molecules it is difficult to envisage the possibility of such interaction, especially considering that it should be occurring with both substrates and these molecules differ considerably. In addition, in our previous work using microdialysis [15,21], pyruvate and β HB perfusion started 60 min before AMPA and still protected. Furthermore, we have shown that pyruvate and β HB are also good protectors against glutamate-mediated excitotoxicity in the hippocampus, in an *in vivo* model that does not use AMPA but neurodegeneration is induced by stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine [28]. On the other hand, these substrates share an important role in energy metabolism. It is widely known that pyruvate is the end product of glycolysis that can be oxidized by mitochondria driving the synthesis of ATP [29]. Pyruvate can also be taken by astrocytes and released as lactate to serve as energy substrate to neighboring neurons. β HB is a ketone body, a water-soluble mitochondrial fuel, that can be used by neurons when its concentration increases in the nervous system [30,31]. It is probably through these energy-linked mechanisms that pyruvate and β HB protect MN. In support of this interpretation, in cultured neurons these substrates protect against the excitotoxic damage produced by NMDA or glutamate, by stimulating the mitochondrial respiratory capacity and thus improving energy production [32-36], thus suggesting that *in vivo* they act through such mechanism. However, the protective effect of pyruvate and β HB has also been associated to the ability of α -ketoacids to neutralize H_2O_2 in a decarboxylating reaction. In cell cultures pyruvate protected neuroblastoma and striatal neurons exposed to H_2O_2 by diminishing the production of reactive oxidative species (ROS) [37,38], and β HB protected neuronal cultures exposed to kainate or glutamate also by reducing mitochondrial ROS production [33,34]. Improvement of the mitochondrial antioxidant defenses by MitoQ [39] or by the overexpression of antioxidant enzymes [40] also protected MNs from neurodegeneration induced by mutant G93A SOD1. Nevertheless, our results with ascorbate and GEE, an enzymatic cofactor and potent antioxidant, and one of the major antioxidant defenses of the cell, respectively, show that these

compounds were ineffective, except for some improvement in the PGE task with ascorbate alone or in combination with GEE, which however cannot be correlated with a protection against MN loss. Thus, although a role of oxidative stress cannot be completely discarded, especially in the mutant SOD-linked MN degeneration, our results indicate that this mechanism is not the predominant factor in the MN death induced by chronic excitotoxicity, in agreement with our previous results with the acute infusion of AMPA [21].

An important factor in ALS appears to be a non-cell autonomous neuron death in which other cellular types, mainly glial cells, may play a role [41]. In this respect, our results show that AMPA induced a notable reactive astrocytosis that was, similarly to MN loss, prevented by the energy substrates but not by the antioxidants, suggesting that it is a consequence of MNs death rather than a direct effect of AMPA.

Conclusion

This work shows that mitochondrial energy substrates protect spinal MNs from the neurotoxic cascade triggered by chronic excitotoxicity due to AMPA receptors overactivation, whereas antioxidants were not effective. We conclude that deficits in mitochondrial energy metabolism are an important factor in the mechanisms of this excitotoxic MN death in the spinal cord, while the role of oxidative stress is less significant. Because glutamate-mediated excitotoxicity has been postulated as a causative factor in MN degeneration in sporadic ALS, these findings suggest possible preventive or therapeutic strategies for the disease.

Abbreviations

ALS: Amyotrophic lateral sclerosis; AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate; GEE: Glutathione ethyl ester; GFAP: Glial fibrillary acidic protein; MN: Motor neuron; PGE: Paw grip endurance; ROS: Reactive oxidative species; SOD1: Superoxide dismutase 1; β HB: β -hydroxybutyrate.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

RT designed the research. RT and CN defined the experiments, analyzed the data and drafted the manuscript. CN carried out the experiments. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, project number 128229) and Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (project IN201013). C.N. is recipient of a scholarship from CONACYT. This work is part of the Ph.D. thesis in Biochemical Sciences of C.N.

Received: 21 April 2015 Accepted: 23 April 2015

Published online: 14 May 2015

References

1. Pasinelli P, Brown RH (2006) Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci* 7:710–723

2. Santa-Cruz LD, Ramírez-Jarquín UN, Tapia R (2012) Role of mitochondrial dysfunction in motor neuron degeneration in ALS. In: Maurer MH (ed) *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, InTech. doi:10.5772/31290
3. Vielhaber S, Winkler K, Kirches E, Kunz D, Büchner M, Feistner H, Elger CE, Ludolph AC, Riepe MW, Kunz WS (1999) Visualization of defective mitochondrial function in skeletal muscle fibers of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 169:133–139
4. Sasaki S, Iwata M (2007) Mitochondrial alterations in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:10–16
5. Crugnola V, Lamperti C, Lucchini V, Ronchi D, Peverelli L, Prella A, Sciacco M, Bordoni A, Fassone E, Fortunato F, Corti S, Silani V, Bresolin N, Di Mauro S, Comi GP, Moggio M (2010) Mitochondrial respiratory chain dysfunction in muscle from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 67:849–854, doi:10.1001/archneurol.2010.128
6. Bernardini C, Censi F, Lattanzi W, Barba M, Calcagnini G, Giuliani A, Tasca G, Sabatelli M, Ricci E, Michetti F (2013) Mitochondrial network genes in the skeletal muscle of amyotrophic lateral sclerosis patients. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0057739.
7. Bendotti C, Calvaresi N, Chiveri L, Prella A, Moggio M, Braga M, Silani V, De Biasi S (2001) Early vacuolization and mitochondrial damage in motor neurons of FALS mice are not associated with apoptosis or with changes in cytochrome oxidase histochemical reactivity. *J Neurol Sci* 191:25–33
8. Parone PA, Da Cruz S, Han JS, McAlonis-Downes M, Vetto AP, Lee SK, Tseng E, Cleveland DW (2013) Enhancing mitochondrial calcium buffering capacity reduces aggregation of misfolded SOD1 and motor neuron cell death without extending survival in mouse models of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 33:4657–4671, doi:10.1523/JNEUROSCI.11119-12.2013
9. Mattiazzi M, D'Aurelio M, Gajewski CD, Martushova K, Kiaei M, Beal MF, Manfredi G (2002) Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J Biol Chem* 277:29626–29633
10. Ferri A, Cozzolino M, Crosio C, Nencini M, Casciati A, Gralla EB, Rotilio G, Valentine JS, Carri MT (2006) Familial ALS-superoxide dismutases associate with mitochondria and shift their redox potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13860–13865
11. Shaw PJ (1999) Calcium, glutamate, and amyotrophic lateral sclerosis: more evidence but no certainties. *Ann Neurol* 46:803–805
12. Grosskreutz J, Van Den Bosch L, Keller BU (2010) Calcium dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Calcium* 47:165–174, doi:10.1016/j.ceca.2009.12.002
13. Wang Y, Qin ZH (2010) Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis* 15:1382–1402, doi:10.1007/s10495-010-0481-0
14. Corona JC, Tapia R (2004) AMPA receptor activation, but not the accumulation of endogenous extracellular glutamate, induces paralysis and motor neuron death in rat spinal cord in vivo. *J Neurochem* 89:988–997
15. Corona JC, Tapia R (2007) Ca²⁺-permeable AMPA receptors and intracellular Ca²⁺ determine motoneuron vulnerability in rat spinal cord in vivo. *Neuropharmacology* 52:1219–1228
16. Tovar-y-Romo LB, Zepeda A, Tapia R (2007) Vascular endothelial growth factor prevents paralysis and motoneuron death in a rat model of excitotoxic spinal cord neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:913–922
17. Corona JC, Tapia R (2008) Calpain inhibition protects spinal motoneurons from the excitotoxic effects of AMPA in vivo. *Neurochem Res* 33:1428–1434, doi:10.1007/s11064-007-9559-7
18. Carriedo SG, Yin HZ, Weiss JH (1996) Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *J Neurosci* 16:4069–4079
19. Carriedo SG, Sensi SL, Yin HZ, Weiss JH (2000) AMPA exposures induce mitochondrial Ca(2+) overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro. *J Neurosci* 20:240–250
20. Weiss JH, Sensi SL (2000) Ca²⁺-Zn²⁺ permeable AMPA or kainate receptors: possible key factors in selective neurodegeneration. *Trends Neurosci* 23:365–371
21. Santa-Cruz LD, Tapia R (2014) Role of energy metabolic deficits and oxidative stress in excitotoxic spinal motor neuron degeneration in vivo. *ASN Neuro*. doi:10.1042/AN20130046.
22. Zeevalk GD, Manzano L, Sonsalla PK, Bernard LP (2007) Characterization of intracellular elevation of glutathione (GSH) with glutathione monoethyl ester and GSH in brain and neuronal cultures: relevance to Parkinson's disease. *Exp Neurol* 203:512–520
23. Ari C, Poff AM, Held HE, Landon CS, Goldhagen CR, Mavromates N, D'Agostino DP (2014) Metabolic therapy with Deanna protocol supplementation delays disease progression and extends survival in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mouse model. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0103526.
24. Esposito E, Capasso M, di Tomasso N, Corona C, Pellegrini F, Uncini A, Vitaglione P, Fogliano V, Piantelli M, Sensi SL (2007) Antioxidant strategies based on tomato-enriched food or pyruvate do not affect disease onset and survival in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res* 1168:90–96
25. Yuan Y, Su Z, Pu Y, Liu X, Chen J, Zhu F, Zhu Y, Zhang H, He C (2012) Ethyl pyruvate promotes spinal cord repair by ameliorating the glial microenvironment. *Br J Pharmacol* 166:749–763, doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01804.x
26. Satpute R, Lomash V, Kaushal M, Bhattacharya R (2013) Neuroprotective effects of α-ketoglutarate and ethyl pyruvate against motor dysfunction and oxidative changes caused by repeated 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine exposure in mice. *Hum Exp Toxicol* 32:747–758, doi:10.1177/0960327112468172
27. Mejía-Toiber J, Montiel T, Massieu L (2006) D-beta-hydroxybutyrate prevents glutamate-mediated lipoperoxidation and neuronal damage elicited during glycolysis inhibition in vivo. *Neurochem Res* 31:1399–1408
28. Netzahualcoyotzi C, Tapia R (2014) Energy substrates protect hippocampus against endogenous glutamate-mediated neurodegeneration in awake rats. *Neurochem Res* 39:1346–1354, doi:10.1007/s11064-014-1318-y
29. Nicholls DG, Budd SL (2000) Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* 80:315–360
30. Fernandez-Fernandez S, Almeida A, Bolaños JP (2012) Antioxidant and bioenergetics coupling between neurons and astrocytes. *Biochem J* 443:3–11, doi:10.1042/BJ20111943
31. Dienel GA (2013) Astrocytic energetics during excitatory neurotransmission: What are contributions of glutamate oxidation and glycolysis? *Neurochem Int* 63:244–258, doi:10.1016/j.neuint.2013.06.015
32. Maus M, Marin P, Israël M, Glowinski J, Prémont J (1999) Pyruvate and lactate protect striatal neurons against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 11:3215–3224
33. Noh HS, Hah YS, Nilufar R, Han J, Bong JH, Kang SS, Cho GJ, Choi WS (2006) Acetoacetate protects neuronal cells from oxidative glutamate toxicity. *J Neurosci Res* 83:702–709
34. Maalouf M, Sullivan PG, Davis L, Kim DY, Rho JM (2007) Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience* 145:256–264
35. Izumi Y, Zorumski CF (2010) Neuroprotective effects of pyruvate following NMDA-mediated excitotoxic insults in hippocampal slices. *Neurosci Lett* 478:131–135, doi:10.1016/j.neulet.2010.04.078
36. Laird MD, Clerc P, Polster BM, Fiskum G (2013) Augmentation of normal and glutamate-impaired neuronal respiratory capacity by exogenous alternative biofuels. *Transl Stroke Res* 4:643–651, doi:10.1007/s12975-013-0275-0
37. Desagher S, Glowinski J, Prémont J (1997) Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *J Neurosci* 17:9060–9067
38. Wang X, Perez E, Liu R, Yan LJ, Mallet RT, Yang SH (2007) Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Brain Res* 1132:1–9
39. Miquel E, Cassina A, Martínez-Palma L, Souza JM, Bolatto C, Rodríguez-Bottero S, Logan A, Smith RA, Murphy MP, Barbeito L, Radi R, Cassina P (2014) Neuroprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med* 70:204–213, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.019
40. Liu R, Li B, Flanagan SW, Oberley LW, Gozal D, Qiu M (2002) Increased mitochondrial antioxidative activity or decreased oxygen free radical propagation prevent mutant SOD1-mediated motor neuron cell death and increase amyotrophic lateral sclerosis-like transgenic mouse survival. *J Neurochem* 80:488–500
41. Philips T, Rothstein JD (2014) Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*. doi:10.1016/j.expneurol.2014.05.015.

III.- SEGUNDA ESTRATEGIA: EL FRAGMENTO TTC

A pesar de que mundialmente se han evaluado diversos tratamientos para prevenir el daño neuronal y las respectivas alteraciones motoras en diferentes modelos experimentales de ELA, hasta el momento, ninguno de ellos ha resultado exitoso en su aplicación clínica. Debido a ello, decidimos ampliar nuestro trabajo estudiando una nueva estrategia de neuroprotección basada en la posible estimulación de señales neurotróficas a través del uso de un péptido. Los antecedentes sobre las acciones de este péptido se presentan a continuación.

ANTECEDENTES

Neurotrofinas

Los factores de crecimiento son moléculas proteicas que a través de cascadas de señalización intracelulares estimulan la diferenciación, proliferación y supervivencia celular. Aunque algunos de ellos tienen actividad en periodos restringidos durante el desarrollo, otros siguen activos a lo largo de toda la vida. Estas moléculas son sintetizadas por una amplia variedad de tipos celulares y son liberadas al medio extracelular para que logren comunicar su señal de forma parácrina o autócrina (Landreth, 2006).

Desde los primeros estudios sobre estas moléculas, se demostró que las MNs espinales son células cuya supervivencia depende íntimamente de la señalización trófica generada por los factores de crecimiento liberados por el tejido al que inervan (Oppenheim *et al.*, 1989). Hasta el momento, se sabe que son un poco más de 15 de estos factores los que influyen la supervivencia de las neuronas motoras espinales, incluidos entre ellos algunas neurotrofinas (Oppenheim, 1996).

Las neurotrofinas (NTs) son una familia de cuatro factores de crecimiento semejantes en estructura y función, que actúan casi exclusivamente en el sistema nervioso de mamíferos. Estos péptidos son sintetizados como pro-neurotrofinas y la forma activa está conformada por un dímero unido por fuerzas no covalentes. En este grupo están incluidos el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT3) y la 4/5 (NT4/5) (Landreth, 2006).

Estos factores señalizan a través de 3 receptores de tipo tirosina cinasa (Trk A, B y C) o de alta afinidad, y del receptor a NTs de 75 kDa (p75) o de baja afinidad. El NGF tiene mayor afinidad de unión por el receptor TrkA, BDNF y la NT4/5 por TrkB y la

NT3 se une mayormente a TrkC (**Figura 4**). Con respecto al p75, éste puede unirse a las cuatro NTs e incluso, puede regular la afinidad de los receptores Trk por sus distintos ligandos, así como la señalización intracelular (Deinhardt y Chao, 2014).

Los receptores Trk activan tres principales vías intracelulares: la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MEK/Erk), la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) y la fosfolipasa C- γ (PLC- γ). Posterior a la unión del ligando, la activación de estas vías requiere la dimerización del receptor Trk y la fosforilación específica de residuos de tirosina (Y) que crean sitios de unión para reclutar a las proteínas de las diferentes cascadas de señalización. En los tres receptores Trk, la fosforilación en el residuo Y490 es indispensable para activar a la vía MEK/Erk, mientras que la activación de la PLC- γ depende de la fosforilación de Y785. El residuo aminoacídico que debe ser fosforilado para activar a PI3K en el TrkA es la Y490 y en el TrkB la Y515 (Deinhardt y Chao, 2014) (**Figura 4**).

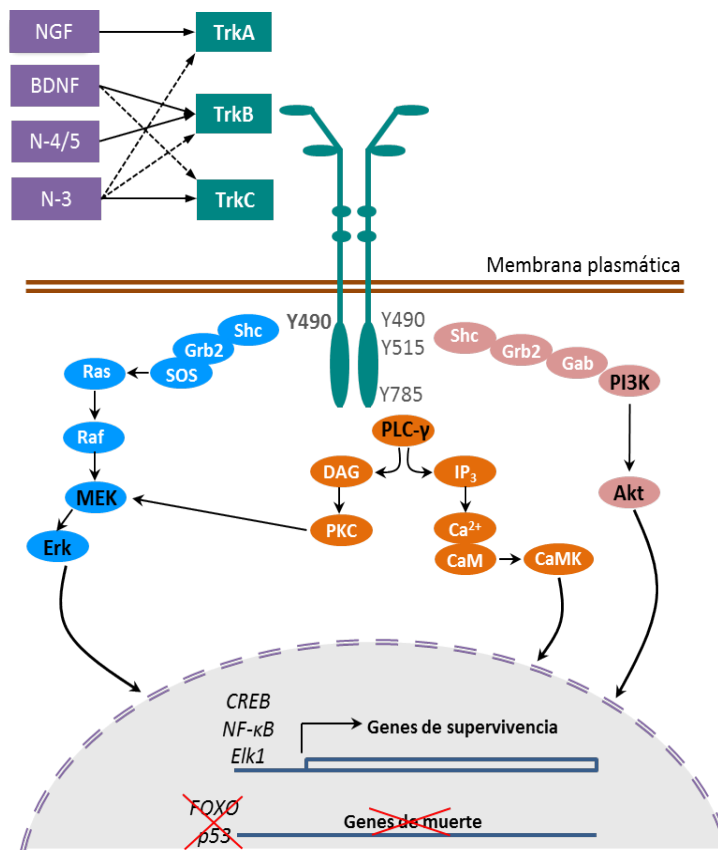


Figura 4.- Vías de señalización activadas por las neurotrofinas. En el panel superior se representa con líneas continuas la interacción con mayor afinidad entre las NTs y sus receptores Trk. Cerca del receptor se resaltan los residuos de tirosina que requieren ser fosforilados para la activación de las respectivas vías de señalización MEK/Erk, PLC- γ y PI3K/Akt. CaM, calcio calmodulina, CAMK, calcio calmodulina cinasa, factores de transcripción en letras cursivas (Imagen modificada de Deinhardt y Chao, 2014 y Brunet *et al.*, 2001).

Las vías de señalización neurotrófica regulan la actividad de algunos factores de transcripción (ej. CREB, NF- κ B, FOXO, p53), y de esta manera estimulan la expresión de genes de supervivencia y disminuyen la expresión de genes de muerte (Brunet *et al.*, 2001; Huang y Reichardt, 2001) (**Figura 4**). A través de estos mecanismos las NTs pueden participar en diversas funciones celulares incluyendo supervivencia, diferenciación, proliferación, crecimiento y arborización axonal y dendrítica, así como la plasticidad neuronal (Chao, 2003; Poo, 2001).

Con respecto a la localización de los receptores Trk, se sabe que están ampliamente distribuidos tanto en el SNC, como en el periférico. El receptor TrkA, al cual nos referiremos más adelante, se localiza abundantemente en la terminal axónica de la placa neuromuscular (NMJ) (Genç *et al.*, 2004), así como los ganglios de la raíz dorsal (Qiao y Vizzard, 2002; Yamamoto *et al.*, 1996). Dentro de la médula espinal, aunque su expresión es mucho menor, se le puede encontrar preferentemente en el cuerpo de las MNs en la región ventral (Michael *et al.*, 1997, Yamamoto *et al.*, 1996).

Las NTs después de ser secretadas se unen a sus respectivos receptores Trk que pueden estar localizados en la membrana plasmática a lo largo del axón, en el cuerpo neuronal y en la pre- o postsinapsis. Después de esta unión, el complejo ligando-receptor (NT-Trk) puede activar localmente sus cascadas de señalización o puede ser endocitado través de un mecanismo dependiente de clatrin (**Figura 5**) (Grimes *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 2008).

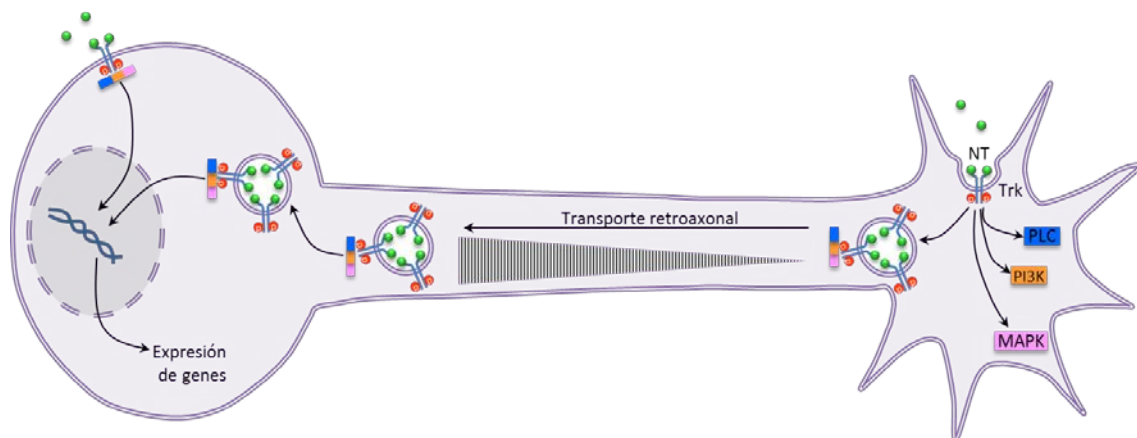


Figura 5.- Mecanismo de acción del endosoma de señalización activado por neurotrofinas. Las NTs al unirse a los receptores Trk estimulan la activación de sus respectivas cascadas de señalización a nivel local (ej. en la terminal sináptica o el soma celular). Pero el complejo Trk-NT también puede endocitarse y formar vesículas que llevan incrustado al receptor activado. Este endosoma en su transporte retroaxonal puede ir uniéndose a sus diferentes moléculas señalizadoras. En consecuencia, a mayor distancia recorrida por el endosoma, mayor intensidad de la señal neurotrófica (barras crecientes).

Inicialmente, a este proceso de endocitosis se le asociaba directamente con el proceso de degradación del complejo ligando-receptor, pero se ha demostrado que tiene otras funciones. Estas vesículas denominadas “endosomas de señalización” pueden ser transportadas retrógradamente y, ya que contiene en su membrana al receptor Trk activado, tienen la capacidad de ir uniendo y activando a las distintas proteínas señalizadoras a lo largo de su viaje a través del axón (Delcroix *et al.*, 2003; Harrington *et al.*, 2011; Marlin y Li, 2015) (**Figura 5**).

Este mecanismo de señalización es de crucial importancia en el sistema nervioso periférico, donde las NTs son liberadas por el tejido blanco (ej. músculo esquelético) y su señal debe ser transportada hasta el soma de las neuronas en la médula espinal (ej. MNs espinales). Finalmente, la señalización neurotrófica termina cuando los receptores son degradados por la vía endocítica tardía o cuando son reciclados en la membrana plasmática (Bronfman *et al.*, 2014).

Las neurotrofinas como estrategia de neuroprotección

La investigación básica ha generado una extensa cantidad de evidencia que demuestra que la administración de neurotrofinas, así como algunos factores de crecimiento puede evitar la muerte a las MNs espinales y mejorar la funcionalidad de las extremidades en modelos animales de ELA familiar (Gould y Oppenheim, 2011; Kim *et al.*, 2014; Krakora *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2008). Particularmente, el grupo del Dr. Tapia ha demostrado que la administración espinal o intracerebroventricular (i.c.v.) del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), en una ventana de hasta 2h, disminuye significativamente la neurodegeneración y la parálisis que se presenta en el modelo crónico de degeneración espinal (Tovar-y-Romo *et al.*, 2007; Tovar-y-Romo y Tapia, 2012). También se mostró que esta protección depende de las vías PI3K, y en menor medida de MEK/Erk, las cuales son comunes a la señalización de las neurotrofinas (Tovar-y-Romo y Tapia, 2010).

Sin embargo, los resultados exitosos obtenidos en la investigación básica no han podido ser replicados en estudios clínicos. Por ejemplo, en un tratamiento de nueve meses sólo la administración subcutánea de la dosis más alta (100 µg/kg) de BDNF logró una discreta mejoría en la funcionalidad muscular en pacientes con ELA (The BDNF Study Group, 1999). Para mejorar la biodisponibilidad de esta NT en pacientes diagnosticados con ELA, el BDNF también fue administrado intratecalmente a través de bombas osmóticas durante dos semanas. En este estudio, a pesar de que no estudiaron el efecto terapéutico, sí encontraron que esta NT induce efectos secundarios como parestesia y sensación de calor o quemazón en las extremidades inferiores (Ochs *et al.*, 2000). En un estudio más largo, se administró el factor neurotrófico ciliar tres veces a la semana durante nueve meses, pero no se encontró evidencia alguna de mejoría en la

fuerza muscular, ni en la supervivencia de estos pacientes con ELA. Por el contrario, se reportaron efectos adversos como anorexia, pérdida de peso y tos (ALS CNTF Treatment Study Group, 1996). Incluso, en un estudio en el que se administró el factor de crecimiento insulínico durante dos años en pacientes con esclerosis lateral, no se registró ninguna mejora en los parámetros motores, ni en la esperanza de vida al compararlos con el grupo tratado con placebo (Sorenson *et al.*, 2008).

El casi nulo éxito de los factores de crecimiento en los estudios clínicos se ha asociado, en gran parte, a su desfavorable perfil farmacocinético. Estos péptidos tienen un coeficiente de partición muy bajo, lo que les dificulta el atravesar membranas, y aún más, una tan selectiva como la hematoencefálica. También presentan una baja biodisponibilidad debido a su alta afinidad por la unión a proteínas plasmáticas y, además, tienen una elevada tasa de inactivación enzimática y eliminación. En conjunto, estas características dificultan la llegada de los factores de crecimiento hasta sus blancos celulares al interior del sistema nervioso, donde se espera que ejerzan su señal trófica (Thorne y Frey, 2001). Adicionalmente, y como se mencionó en el párrafo anterior, algunos de estos péptidos inducen efectos tóxicos que aminoran su ventana terapéutica. Debido a estos detalles, aún se buscan alternativas terapéuticas seguras que logren llegar con eficiencia a las MNs espinales para estimular su supervivencia.

La toxina tetánica y su fragmento C-terminal

La familia de toxinas clostridiales está conformada por la neurotoxina tetánica (TeTx) sintetizada por *Clostridium tetani*, y por siete serotipos de neurotoxina botulínica (de la A-G) producidos por *Clostridium botulinum*. Estas toxinas además de compartir semejanzas en su origen, estructura y mecanismo de acción, se caracterizan por su gran afinidad y efectos tóxicos sobre el sistema nervioso (Pellizzari *et al.*, 1999; Rossetto *et al.*, 2001). Aunque ambas toxinas son capaces de inhibir la liberación de los neurotransmisores, cualesquiera que éstos sean (Bergey *et al.*, 1987; Kanda y Takano, 1983), es generalmente aceptado que la toxina botulínica tiene mayor afinidad por inhibir la liberación de acetilcolina (Bigalke *et al.*, 1981) y con ello producir una parálisis flácida o botulismo; mientras que la TeTx actúa principalmente inhibiendo la liberación de glicina y GABA (Bergey *et al.*, 1987; Bigalke *et al.*, 1981; Curtis y De Groat, 1968; Williamson *et al.*, 1992), lo que da como resultado una parálisis espástica o tétanos.

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos señala que los espasmos de las cuerdas vocales y los músculos respiratorios, así como las fracturas y convulsiones son las complicaciones más frecuentes en pacientes con tétanos. Esta enfermedad es fatal en ~11% de los casos reportados y el porcentaje se

incrementa en la población mayor a los 60 años (~18%), así como en las personas no vacunadas (~22%). La dosis letal mínima de TeTx en humanos es de 2.5 ng/kg (equivalente a 175 ng para una persona de 70 kg), y de 1 ng/kg en ratones (0.3 ng extrapolando el dato para una rata de 300g) (Gill, 1982).

La TeTx es sintetizada como una pro-toxina compuesta por una sola cadena peptídica de ~150 kDa. Este péptido después de ser sometido a un corte hidrolítico post-traducciona da origen a la forma activa de la toxina que queda compuesta por una cadena de alto peso molecular (100 kDa) o cadena pesada, unida por un puente disulfuro a una cadena peptídica más pequeña (50 kDa) o cadena ligera. El dominio con actividad neurotóxica que actúa como una Zn^{2+} -metaloproteasa se encuentra en la cadena ligera, mientras que en la cadena pesada residen las propiedades de unión y traslocación (**Figura 6**) (Lacy *et al.*, 1998).

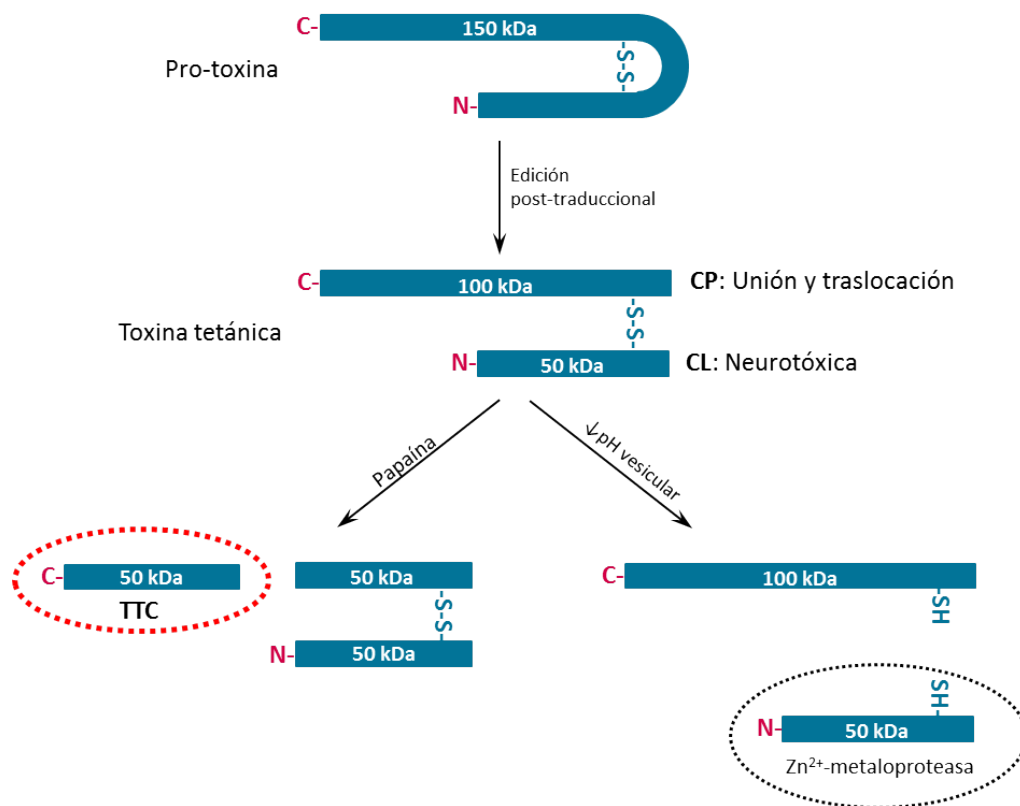


Figura 6.- Formación del fragmento C-terminal de la toxina tetánica a partir de la toxina nativa. La TeTx es sintetizada como pro-toxina y tras someterse a un corte proteolítico post-traducciona, se forma la estructura activa compuesta por una cadena pesada (CP) y una cadena ligera (CL) unidas por un puente disulfuro. El cambio en el pH del medio estimula un cambio conformacional que deja libre a la CL, la cual posee la actividad neurotóxica al actuar como Zn^{2+} -metaloproteasa. Cuando se somete la TeTx a un tratamiento con papaína el resultado es un corte proteolítico sobre la CP que da paso a la formación del fragmento TTC.

Clostridium tetani puede entrar al organismo a partir de una lesión tisular. Bajo condiciones anaerobias las esporas germinan (3-21 días de incubación) y producen la TeTx que puede diseminarse por el organismo a través del sistema circulatorio y linfático. La toxina puede unirse a gangliósidos de membrana como GT1b y GD1b (Fitzsimmons *et al.*, 2000; Fotinou *et al.*, 2001; Sinha *et al.*, 2000), y estimular su endocitosis preferentemente en terminales presinápticas colinérgicas (ej. en la NMJ) y en menor medida en terminales simpáticas (Meckler *et al.*, 1990). Al interior de la vesícula la TeTx se protege de la degradación y facilita su transporte retrógrado hacia la médula espinal donde puede realizar transcitosis hasta llegar a las interneuronas (Turton *et al.*, 2002). Durante su estancia al interior de la vesícula, la actividad de las bombas ATPasas de protones acidifica el lumen vesicular y estimula la translocación del dominio neurotóxico (cadena ligera) hacia el citoplasma (Cai *et al.*, 2006; Fischer y Montal, 2007), donde queda libre para ejercer su acción neurotóxica. Este dominio con actividad Zn^{2+} -metaloproteasa corta e inactiva a la sinaptobrevina-2 (Schiavo *et al.*, 1992; 1994), una proteína vesicular de la familia SNARE indispensable en la fusión de las vesículas sinápticas para la liberación del neurotransmisor (**Figura 7**).

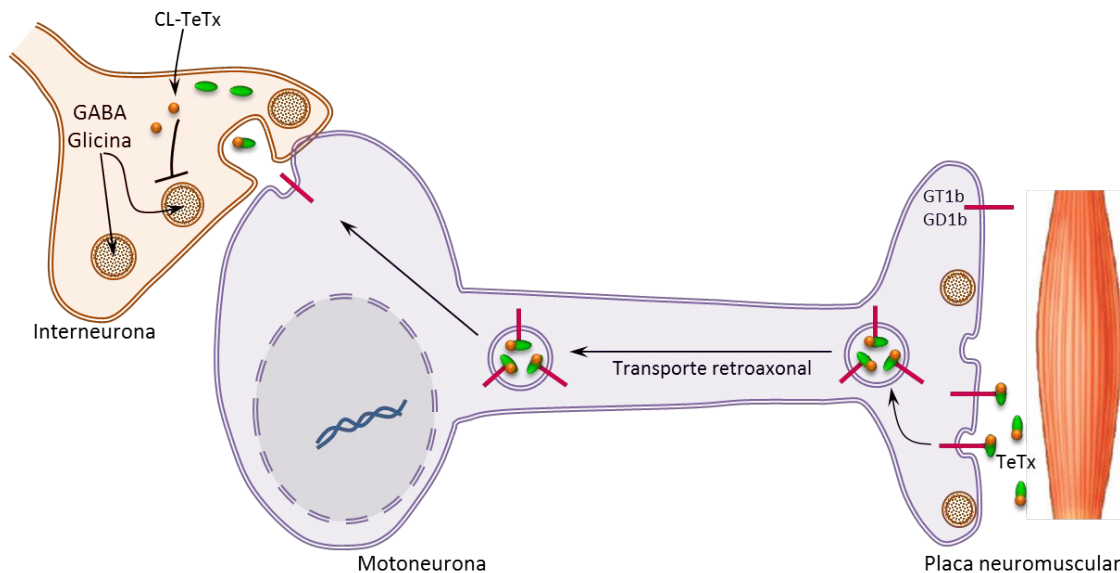


Figura 7.- Mecanismo de acción de la toxina tetánica. La TeTx puede unirse a gangliósidos de membrana en las terminales nerviosas periféricas y puede transportarse retroaxonalmente hacia el soma de las MNs espinales. En la médula espinal puede realizar transcitosis para llegar a las interneuronas y realizar ahí la inhibición de la liberación de los neurotransmisores a través de la actividad Zn^{2+} -metaloproteasa de la cadena ligera (CL). Nótese la semejanza con el mecanismo de transporte de las NTs en la Figura 5.

Debido a su facilidad para llegar a la médula espinal y, a su ya mencionada preferencia para inhibir la liberación de los neurotransmisores inhibitorios (Bergey *et al.*, 1987; Bigalke *et al.*, 1981; Curtis y De Groat, 1968; Williamson *et al.*, 1992), los

efectos de la acción de la TeTx son las contracciones musculares generalizadas y espasmos recurrentes (Pellizzari *et al.*, 1999; Turton *et al.*, 2002).

Cuando se trata a la TeTx con la endopeptidasa papaína se genera un corte aproximadamente a la mitad de la cadena pesada, lo que da origen a dos péptidos: uno de ~50 kDa que corresponde al fragmento C-terminal de la toxina original (tetanus toxin C-fragment, TTC) y otro de ~100 kDa que incluye al dominio neurotóxico unido por un puente disulfuro a lo que resta de la cadena pesada (**Figura 6**). A diferencia de la TeTx cuya dosis letal mínima es de (1 ng/kg) en ratones (Gill, 1982), hasta el momento no se han reportado efectos tóxicos por la administración del TTC en dosis de hasta 40 µg/kg i.m. en rata (Mendieta *et al.*, 2016). A pesar de estas diferencias, el fragmento mantiene las características de unión a membranas sinápticas y la capacidad para realizar transporte retrógrado como lo haría la toxina completa (Bizzini *et al.*, 1981).

La resolución de la estructura cristalina del TTC muestra que este fragmento está compuesto por un barril de láminas-β tipo remolino y otro dominio de láminas-β plegadas en forma de hoja de trébol (β-trefoil) (Umland *et al.*, 1997). De forma semejante a la TeTx completa, el fragmento TTC a través de su dominio β-trefoil puede unirse a los gangliósidos de membrana GT1b y GD1b, pero no al GM1, (Fitzsimmons *et al.*, 2000; Fotinou *et al.*, 2001; Sinha *et al.*, 2000). El fragmento en cultivos primarios de MNs espinales tiene la capacidad de unión e internalización en estas células (Herreros *et al.*, 2000), y se ha demostrado que estas propiedades dependen de la integridad del dominio β-trefoil, pues la eliminación de esta sección estructural inhibe la entrada y transporte del TTC *in vitro* e *in vivo* (Sinha *et al.*, 2000). Se sabe también que el TTC en cultivos de MNs comparte el sistema de transporte retrógrado con los receptores p75 y TrkB, así como con el NGF y BDNF. Este transporte es altamente dependiente de la actividad de las pequeñas GTPasas Rab5 y Rab 7 (Deinhardt *et al.*, 2006; Lalli y Schiavo, 2002).

El TTC administrado intramuscularmente (i.m.) puede internalizarse en las terminales colinérgicas y en menor medida en las terminales simpáticas (Meckler *et al.*, 1990). Las MNs espinales *in vitro*, así como las células PC12 diferenciadas con NGF, expresan una proteína de ~15 kDa a la cual el TTC se une fuertemente, lo que pudiera explicar la afinidad del fragmento por las terminales nerviosas motoras (Herreros *et al.*, 2000). Sin embargo, esta proteína aún no se ha estudiado en modelos *in vivo*.

Al inyectar el TTC en la lengua de roedores, este péptido tiene la capacidad para transportarse a las MNs del núcleo hipoglosa que inervan la zona de la inyección (Coen *et al.*, 1997; Miana-Mena *et al.*, 2004). Particularmente, cuando es administrado en el músculo esquelético, el TTC puede llegar a los ganglios simpáticos y los ganglios de la raíz dorsal e la médula espinal (Meckler *et al.*, 1990), pero se ubica preferentemente en las MNs inferiores que inervan al músculo inyectado, y en menor proporción en el

neurópilo (Coen *et al.*, 1997; Miana-Mena *et al.*, 2004; Ovsepian *et al.*, 2015; Perreault *et al.*, 2006; Roux *et al.*, 2005) (**Figura 8**).

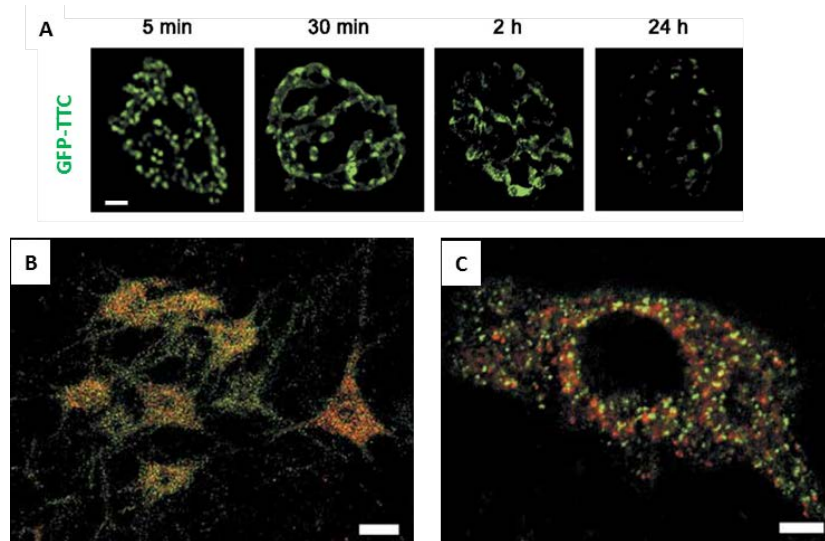


Figura 8.- Evidencias del transporte retroaxonal del fragmento C-terminal de la toxina tetánica *in vivo*. **A.** Tejido del músculo elevador de la oreja de ratones sacrificados en los tiempos indicados, después de haber sido administrados en dicho músculo con el TTC fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP-TTC, en verde). En el panel de observa que al transcurrir el tiempo la proteína GFP-TTC va disminuyendo su presencia en la placa neuromuscular. **B.** Micrografía del asta ventral de la médula espinal lumbar de un ratón sacrificado 24 h después de haber sido administrado con el TTC en el músculo gastrocnemio (en verde la GFP-TTC y en rojo la unidad B de la toxina colérica conjugada con AlexaFluor549 como marcador de transporte retroaxonal). **C.** Amplificación de **B**. Escalas: A = 5 μ m, B = 20 μ m, C = 5 μ m. Modificado de Roux *et al.*, 2005.

En un trabajo muy detallado, Roux *et al.* (2005) mostraron que el TTC después de su administración en el músculo esquelético *in vivo* tiene gran afinidad para localizarse en dominios ricos en balsas lipídicas de las terminales nerviosas de la NMJ, y que además, se internaliza en la presinapsis a través de un proceso dependiente de clatras. Adicionalmente, se ha demostrado que esta internalización *in vivo* depende de la actividad muscular (Miana-Mena *et al.*, 2002), y posiblemente esté asociada al proceso de reciclaje vesicular como se ha propuesto para la TeTx (Matteoli *et al.*, 1996).

Se ha calculado que la velocidad con la que el fragmento se transporta *in vivo* es aproximadamente 10 mm/h (Cabot *et al.*, 1991). Los seguimientos temporales indican que desde su administración i.m. al TTC le puede tomar de 6-14 h para llegar a la médula espinal (Fishman y Carrigan, 1987; Horn y Büttner-Ennever, 1990), y puede tardar de 5-12 días para que se pierda su presencia en este tejido (Horn y Büttner-Ennever, 1990; Larsen *et al.*, 2006).

Debido a la facilidad del TTC para internalizarse y transportarse hacia las MNs espinales, ha sido utilizado ampliamente como una proteína acarreadora para transportar con eficiencia moléculas neuroprotectoras como proteínas antiapoptóticas (Carlton *et al.*, 2008), factores de crecimiento (Calvo *et al.*, 2011; Chian *et al.*, 2009; Larsen *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009) y enzimas antioxidantes (Figueiredo *et al.*, 1997).

Antecedentes de neuroprotección del TTC

Cuando cultivos de neuronas corticales se exponen al TTC, éste estimula de forma dependiente de la concentración y transitoriamente, la fosforilación asociada a la activación común de los tres receptores Trk (Gil *et al.*, 2003). Aunque no se presentan los datos de cada uno de los receptores, si se reporta que un tratamiento agudo con el fragmento incrementa la fosforilación Y490 en el receptor TrkA en preparaciones de sinaptosomas (Gil *et al.*, 2001). Al analizar la cascada de señalización del TrkA en estas preparaciones *in vitro*, se encontró que la incubación con TTC fosforila e incrementa la actividad de la PLC- γ , lo que concuerda con el hecho de que el fragmento también incrementa la activación de las diferentes isoformas de PKC y su consecuente translocación de la fracción soluble a la fracción de membranas. Adicionalmente, se demostró que el TTC incrementa de forma concentración-dependiente las fosforilaciones asociadas a la activación de Akt y Erk 1/2. La activación de estas tres vías (Akt, Erk 1/2 y PLC- γ) por TTC depende de los receptores Trk, ya que se bloquea su activación con el uso de tirfostina-AG879 (inhibidor de estos receptores). Por su parte, sólo las vías Akt y Erk 1/2 activadas por el fragmento son dependientes de PI3K, pues el uso de wortmanina (inhibidor de esta cinasa) disminuye significativamente su fosforilación (Gil *et al.*, 2001; 2003).

En cultivos de CGN, el BDNF es capaz de disminuir la muerte apoptótica inducida por bajas concentraciones de K^+ . Bajo estas mismas condiciones tóxicas, el TTC reduce significativamente la activación de la caspasa-3, la condensación de la cromatina y la muerte celular. Por su parte, tanto la wortmanina como el PD98059 (inhibidor de MEK/Erk), bloquean estos efectos neuroprotectores del fragmento, lo que destaca la importancia de las vías PI3K y MEK/Erk en su mecanismo de acción (Chaïb-Oukadour *et al.*, 2004). El pretratamiento con el TTC también ha demostrado ser eficiente para disminuir la muerte apoptótica en cultivos de CGN expuestas a la toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPP^+). Según los ensayos de inmunoprecipitación, el TTC bajo estas condiciones favorece la interacción de BAD con la proteína 14-3-3 al estimula la fosforilación de la primera proteína; adicionalmente, el fragmento mantiene la unión entre Bcl- X_L y Bax, impidiendo de esta manera la activación de las proteínas pro-apoptóticas BAD y Bax (Chaïb-Oukadour *et al.*, 2009).

Las balsas lipídicas y las plataformas de ceramidas son dominios membranales que juegan un papel importante en distintos procesos biológicos. Particularmente los receptores a neurotrofinas Trk y p75, se localizan en abundancia en las balsas lipídicas de la membrana plasmática, ya que a través de estos dominios ricos en gangliósidos se proporcionan las condiciones necesarias para la interacción entre estos receptores y sus ligandos (**Figura 9**). Las plataformas de ceramidas se forman comúnmente por la acción de la esfingomielinasa neutra sobre la esfingomielina de las balsas lipídicas (Abad-Rodríguez, 2006; Zonta y Minichiello, 2013). Esto resulta de interés pues en células PC12 diferenciadas con NGF y en CGN, la exposición a TTC genera un moderado, pero rápido y mantenido incremento en la síntesis de ceramidas, así como la formación de plataformas de este componente en la membrana plasmática. El bloqueo de la formación de estas plataformas de ceramidas con GW4869, inhibidor de la esfingomielinasa neutra, no afecta la entrada del fragmento a las células, pero disminuye considerablemente la fosforilación de Akt y la protección del TTC sobre las células PC12 expuestas a H₂O₂ (Cubí *et al.*, 2013). Lo anterior apoya la hipótesis de que el TTC a través de la unión a gangliósidos de membrana, abundantes en las balsas lipídicas y en las plataformas de ceramidas, facilita su interacción con sus posibles receptores Trk para iniciar su mecanismo de neuroprotección (Calvo *et al.*, 2012; Roux *et al.* 2005) (**Figura 9**).

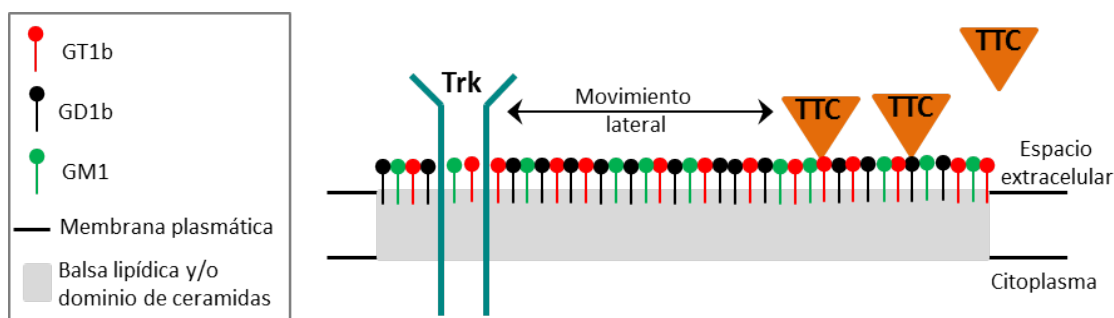


Figura 9.- Esquema del posible mecanismo de interacción entre el fragmento C-terminal de la toxina tetánica y los receptores Trk. Las balsas lipídicas y/o los dominios de ceramidas son ricos en gangliósidos y proteínas señalizadoras como los Trk. El TTC se une con gran afinidad a los gangliósidos, y el movimiento lateral de los componentes lipídicos en estos dominios membranales podría facilitar el encuentro y unión entre el fragmento y los receptores Trk. Se propone que las NTs actúan por un mecanismo semejante. Modificado de Abad-Rodríguez, 2006.

Las discinecias son un efecto secundario de los tratamientos crónicos con levodopa en pacientes diagnosticados con la enfermedad de Parkinson. En ratas con lesión dopaminérgica en las que se indujo discinecia con un tratamiento crónico con levodopa, se encontró que el TTC administrado i.m. durante 3 días en una dosis de 20 µg/Kg, no disminuyó los movimientos anormales involuntarios en estos animales

(Palafox-Sánchez *et al.*, 2016). A diferencia de este antecedente, existen otros trabajos que demuestran que el TTC tiene un efecto neuroprotector *in vivo*. Por ejemplo, en ratas con inyección de MPP⁺ en el estriado, la co-inyección del fragmento en este núcleo disminuye la degeneración, mantiene los niveles de dopamina en el estriado cerca de los valores normales y es capaz de reducir la asimetría motora (Mendieta *et al.*, 2009). Resultados semejantes se obtuvieron cuando se administró el TTC (20 µg/Kg i.m.) durante tres días, antes de lesionar a las ratas en el estriado con 6-hidroxidopamina (Mendieta *et al.*, 2012).

Estos antecedentes llevaron a probar la efectividad del fragmento TTC en un modelo de degeneración estriatal inducido por la administración de altas dosis de metanfetamina en ratas. En estos experimentos se encontró que el tratamiento con TTC (40 µg/Kg i.m.) durante tres días, disminuye la degeneración estriatal y previene la disminución de marcadores como la tirosina hidroxilasa y el transportador de dopamina en el núcleo estriado, además de que mejora la actividad locomotora de estos animales (Mendieta *et al.*, 2016). Adicionalmente, la inyección i.m. de DNA codificante para TTC, cuatro días antes de someter a roedores a un modelo de isquemia cerebral global, evita la disminución de la actividad de la SOD1/2, además de que reduce considerablemente los marcadores de estrés oxidante (niveles de óxido nítrico, radical superóxido y peroxidación lipídica) en diferentes regiones cerebrales. A través de la evaluación de la actividad locomotora y las estereotipias, se encontró que este pre-tratamiento génico con el fragmento es eficaz para disminuir la hiperactividad inducida por la isquemia (Radenovic *et al.*, 2014).

Con respecto a sus efectos en médula espinal, a través de experimentos realizados en los ratones G93A, se sabe que la administración i.m. de DNA codificante para TTC en las patas traseras y delanteras (tríceps y cuádriceps) no retrasa el inicio de los síntomas, pero sí logra incrementar la supervivencia de los animales. Aunque se observó que esta terapia génica disminuye la activación de caspasa-3 e incrementa la fosforilación de Akt en tejido de médula espinal, la protección sobre el número de MNs espinales es muy discreta (Moreno-Igoa *et al.*, 2010). Por otro lado, en rebanadas organotípicas de médula espinal expuestas a glutamato durante 30min, la adición de TTC en medio de cultivo, 2 h antes y hasta 2 h después del estímulo excitotóxico, disminuye significativamente la muerte de las MNs. En este estudio, se demostró que la protección del fragmento está mediada por las vías PI3K y MEK/Erk, ya que el uso de los inhibidores de estas vías (LY294002 y PD98059) bloquea el efecto neuroprotector del TTC (Herrando-Grabulosa *et al.*, 2013).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El TTC es un péptido no tóxico que ha demostrado ser eficaz para prevenir la muerte celular frente a diversos estímulos tóxicos. Sin embargo, no hay evidencia que demuestre su eficacia para proteger a las MNs de un estímulo excitotóxico crónico en la médula espinal, y tampoco existen datos reportados sobre su mecanismo de acción frente a este tipo de estímulos *in vivo*.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar el posible efecto neuroprotector del fragmento TTC en el modelo crónico de degeneración espinal inducido con AMPA y tratar de discernir su mecanismo de acción.

Objetivos particulares

- Evaluaremos distintas vías de administración del TTC para conocer si su transporte retroaxonal es determinante en sus efectos.
- Evaluaremos la posible participación del receptor TrkA en el mecanismo de acción del fragmento.

MÉTODOS Y RESULTADOS II: ARTÍCULO ORIGINAL

Tetanus toxin C-fragment protects against chronic excitotoxic stimulus in the spinal cord in vivo

Citlalli Netzahualcoyotzi y Ricardo Tapia
(*Enviado para su publicación*)

Resumen

Las enfermedades de la neurona motora son un conjunto de padecimientos caracterizados por la muerte progresiva de las MNs. La ELA es su forma más frecuente y, aunque aún se desconoce plenamente la causa de la neurodegeneración, se propone que el mecanismo excitotóxico pudiera estar implicado. Los factores de crecimiento que estimulan la supervivencia celular han sido propuestos como terapia para la ELA. Sin embargo, su débil perfil farmacocinético ha limitado su eficacia. Debido a esto, aún se buscan nuevas estrategias de neuroprotección que tengan la capacidad de llegar al SNC y ejercer ahí su señalización trófica. El TTC, es un péptido sin actividad tóxica que se caracteriza por su eficiencia de unión y transporte desde las terminales axónicas periféricas hasta el SNC, con especial tropismo para ubicarse en las MNs espinales. Este péptido ha mostrado efectos neuroprotectores contra diferentes estímulos tóxicos, y hasta ahora, hay escasas evidencias sobre su mecanismo de protección *in vivo*. En este trabajo evaluamos si el TTC era capaz de proteger de los efectos tóxicos del modelo crónico de degeneración espinal inducido con AMPA. El fragmento fue administrado directamente en la médula espinal o a través de una inyección i.m. en las patas traseras. Los datos muestran el TTC protege significativamente de la neurodegeneración espinal inducida con AMPA, además de que disminuye las alteraciones motoras y previene la parálisis en estos animales, especialmente cuando el fragmento es administrado i.m. También evidenciamos que el tratamiento con TTC i.m. es efectivo en una ventana de tiempo de al menos 6 h, posterior al inicio del estímulo excitotóxico en la médula espinal. Mostramos además, que el TTC i.m. incrementa la fosforilación del receptor TrkA en la médula espinal y que la inhibición farmacológica de este receptor localizado en la NMJ decrece significativamente, pero no bloquea por completo, los efectos del fragmento. Estos resultados son los primeros en demostrar el efecto neuroprotector de la administración i.m. del TTC contra un proceso excitotóxico crónico en la médula espinal *in vivo*. También evidenciamos por primera vez que la protección ejercida por el fragmento depende parcialmente de la activación del receptor TrkA de la NMJ, así como de su transporte retroaxonal hacia las MNs espinales.

Tetanus toxin C-fragment protects against chronic excitotoxic stimulus in the spinal cord *in vivo*

Citlalli Netzahualcoyotzi & Ricardo Tapia

Abstract. Excitotoxicity is an important mechanism of neuronal death in neurodegenerative diseases. The tetanus toxin C-fragment (TTC) is a non-toxic peptide that can be transported from peripheral axons into spinal motor neurons (MNs). TTC and has been shown to protect against neurodegeneration in some experimental models in brain regions, but there are no data on its protective action against excitotoxicity in the spinal cord *in vivo*. We tested such possible effect of TTC in our well-established model of chronic motor neuron degeneration induced by excitotoxicity due to the overactivation of AMPA receptors in the rat lumbar spinal cord. The i.m. injection of TTC protected against MN death and thus reduced the motor deficits induced by AMPA, when administered both before or 6-24 h after the beginning of AMPA infusion, whereas the intraspinal co-infusion with AMPA was much less effective. We also found that the i.m. injection of TTC increased TrkA receptor phosphorylation (Y490) in spinal MNs and that the i.m. administration of a specific blocker of this receptor significantly diminished the protection. Given the efficacy of its protective effects after a simple route of administration, we suggest that TTC could be considered as a potential therapeutic candidate for MN diseases.

Introduction

Motor neuron diseases are neurological disorders characterized by the specific degeneration of upper and/or lower motor neurons (MNs). This specific neurodegeneration leads to muscular symptoms that include hyperreflexia, fasciculation, weakness and atrophy that finally result in paralysis and death¹. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the most common and severe form of these diseases, with a global incidence of ~3 cases/100,000 population². The etiology of MN degeneration in ALS remains to be elucidated, but it has been proposed that excitotoxicity, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, protein aggregation and neuroinflammation are some of the mechanisms participating in the development of the disease^{3,4}. Our group has shown that the excitotoxicity produced by chronic infusion of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) in the rat lumbar spinal cord leads to progressive MN death, accompanied by intense astrogliosis, that results in paralysis of the rear limbs^{5,6}. Importantly, this well-established model of progressive spinal MN degeneration *in vivo* does not depend on genetic alterations, as is the case in the vast majority of ALS cases.

Among the many compounds that have been tested to prevent or delay the progress of neurodegeneration in ALS, growth factors, including the neurotrophin (NT) family, have been considered as a potential beneficial strategy^{5,7-10}. Nonetheless, clinical testing of these growth factors in ALS have been unsuccessful¹¹⁻¹³, owing in part to the poor pharmacokinetic profiles of these factors, including rapid enzymatic inactivation, fast clearance process, sequestration, and potential immunogenicity, which complicate reaching target sites inside the central nervous system¹⁴. Hence it is of importance to look for alternative strategies that permit or facilitate the transport of the factors to reach MNs and exert their neurotrophic signaling.

The tetanus toxin produced by the anaerobic bacteria *Clostridium tetani* is a single-chain polypeptide of approximately 150 kDa, which is post-translationally nicked to form the active isoform conformed of a light chain (~50 kDa) and a heavy chain (~100 kDa) linked by a disulfide bond. The catalytic and neurotoxic domain of the toxin resides in the light chain, while the translocation and receptor-binding domains are present in the heavy chain. The heavy chain has been cleaved with papain into two parts (~50 kDa each), consisting of the tetanus toxin carboxyl-fragment (TTC) and the N-terminal portion of this chain^{15,16}. The TTC does not have the toxic effects of the native toxin^{17,18}, but maintains the capacity of membrane binding¹⁹⁻²¹, internalization, and retrograde transport²² with preferential localization in MNs, as demonstrated by studies *in vitro*^{16,23} and *in vivo*²⁴⁻²⁶. Furthermore, this fragment activates NT-regulated signaling pathways *in vitro*²⁷⁻²⁹ and has neuroprotective effects in primary cerebellar granule cell cultures exposed to toxic low concentration of potassium or treated with 1-methyl-4-phenylpyridinium^{29,30}, as well as in animal models of cerebral ischemia³¹ and Parkinson's disease³². TTC also improved MN survival in spinal cord organotypic cultures exposed for short time periods to glutamate³³, but the efficacy of the fragment to protect against excitotoxic degeneration of spinal MN *in vivo* has not been studied, and this is the purpose of the present work.

We tested the effect of the intraspinal and i.m. administration of the fragment, and we found that the i.m. injection significantly protected against the neurodegeneration and rear limb paralysis. Furthermore, we determined that TTC i.m. treatment increases TrkA receptor phosphorylation (Y490) in spinal MNs and that the blockade of this receptor in the neuromuscular junction (NMJ) partially prevents the TTC-induced neuroprotective effects. These results are the first demonstration of a protective action of TTC against neurodegeneration in the spinal cord *in vivo*.

Results

TTC i.m. administration exerts better protection than the spinal infusion

The control rats infused in the spinal cord or i.m. administered with vehicle or TTC alone did not exhibit motor dysfunctions or histological damage at any time (Figs. 1b and 3). The continuous infusion of AMPA triggered alterations in the position of the phalanges of the ipsilateral rear limb, which started on day 4 and gradually progressed to the contralateral side, resulting in complete bilateral hind limb paralysis at the end of the experiment (Fig. 1a). The progress of these alterations is clearly observed in the rotarod test. Whereas control rats remained in the rod for the total test period of 120 s, the score of animals treated with AMPA was about 70 s at day 1, and progressively decreased until ~20 s on day 7 (Fig. 1b).

The protective effect of TTC was first evaluated by its continuous spinal infusion together with AMPA. At the end of the experiment, these animals were not able to control the ipsilateral phalanges but there was still control of the contralateral ones (Fig. 1a). Their rotarod performance was not different as compared with AMPA alone until day 4, but on the last three days these animals showed a slight although significant improvement in their motor performance, scoring ~50 s (Fig. 1b). The i.m. administration of TTC exerted a much better protection: both pre- and post-treatments almost totally prevented the AMPA-induced alterations in the phalanges of rear limbs (Fig. 1a), and the protection exerted by the pre-treatment was highly significant along the entire duration of AMPA infusion, since the time on the rotarod was ~80-110 s, close to the control 120 s. The post-treatment was even more effective than the pre-treatment, and the protection started after day one, with times of ~90-100 s on the rotarod (Fig. 1b).

The histological analysis (Figs. 2 and 3) revealed that after seven days of surgery control rats exhibited ~20 MNs per section with normal morphology. As previously described⁶, AMPA in the infused region caused a significant ~88% loss of MNs in the ipsilateral ventral horn and ~47% in the contralateral side, accompanied by intense reactive astrogliosis, as detected by glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunohistochemistry, in both horns. These effects were less intense in the rostral region, exhibiting ~78% damage in the ipsilateral horn and ~32% in the contralateral side. The different TTC treatments notably prevented this massive loss of MNs and also prevented astrogliosis (Fig. 2). Rats co-infused with TTC and AMPA did not show differences in the number of MNs in the rostral region as compared to AMPA alone, but in the infused area the fragment significantly decreased neuronal death to ~74% in the ipsilateral horn and to ~30% in the contralateral side. In contrast, the i.m. pre- and post-AMPA TTC injections significantly protected against AMPA-induced neurodegeneration in both regions analyzed. In the infused area MN death was only of ~66% in the ipsilateral side and ~25% in the

contralateral horn. In the rostral zone the protection was remarkable, since there was only ~47% damage in the ipsilateral horn and ~14% in the contralateral one (Fig. 3).

The blockade of TrkA receptor in the muscle decreases the protective effect of TTC

To investigate the involvement of TrkA receptor in the protection exerted by TTC, we first analyzed the presence of the activated phosphorylated (phospho-Y490) form of the receptor³⁴ in the spinal cord, by means of immunofluorescence. A double immunohistochemistry for SMI-32 as a neuronal marker and for TrkA receptor (phospho-Y490) in control rats revealed co-localization of both indicators, thus confirming the presence of this NT receptor in MNs (Fig. 4). AMPA treatment did not alter this labeling but, as the micrographs and the quantitative analysis show, TTC i.m. alone slightly increased the fluorescent signal for TrkA (phospho-Y490). The immunochemical analysis also revealed a tendency, although non-significant, to increase this labeling in the group AMPA + TTC i.m. post-treatment (Fig. 4).

Then we used the specific inhibitor for TrkA receptor: GW-441756³⁵, administered i.m. at different times, to test whether this treatment affected the protection by TTC. In these experiments we studied only the effects of the i.m. TTC post-treatment, which was very effective even when the excitotoxic process had already started. DMSO used as a vehicle, or GW-441756 alone, were innocuous (data not shown). As shown in Fig. 5, the i.m. co-administration of TTC and GW-441756 did not alter the protection induced by the fragment neither in the rotarod test nor in MN survival. However, when GW-441756 was injected 6 and 24 h before TTC, significantly reduced, although not completely abolished, the protection exerted by the fragment. Rats from this group scored significantly lower times on the rotarod as compared to AMPA + TTC group (~65-80 s vs ~90-100 s). This effect was evident from day 3 and lasted during the remaining days of evaluation (Fig. 5a). Correspondingly, this GW-441756 pre-administration reduced the protection by TTC against MN damage, since the neuronal loss was comparable to the degeneration induced by AMPA alone in both the infused and the rostral regions (Fig. 5b).

Discussion

In this work we demonstrate for the first time that the TTC i.m. treatment, with a 6-24 h effective time frame, remarkably protected against rear limbs paralysis and spinal MN death induced by the chronic AMPA-induced excitotoxicity in the spinal cord, whereas the intraspinal infusion was less effective. The protection was partially prevented by the blockade of TrkA receptors located in the muscle.

The initial approach of infusing TTC in the spinal cord proved to be only slightly effective for protecting against AMPA-induced toxic effects, differently from data indicating that the direct application was protective against the neurodegeneration induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium in the striatum³² and by β -amyloid peptide 25-35 in the medial septum³⁶. This weak effect could be due to the constant transynaptic movement of the TTC and its concomitant clearance from the site of infusion^{37,38}, but it could also be due to the scarce existence of the putative receptor TrkA in the ventral horn of the spinal cord^{39,40}, which we corroborated in the present work by immunohistochemistry of its phosphorylated form (Fig. 4).

The i.m. injection of TTC, before or after the beginning of the AMPA-induced excitotoxic process, not only efficiently prevented the paralysis of the rear limbs, but also the bilateral MN degeneration and the concomitant glial response elicited by the continuous infusion of AMPA during seven days. A similar but much less significant effect has been described in the mutant SOD1-G93A murine model of familial ALS after the i.m. injection of naked DNA encoding for TTC⁴¹. The high efficacy of the i.m. injection of TTC in our model could be explained by the presence of the TrkA receptor in the NMJ^{42,43} and the retrograde transport of the fragment from peripheral nerve terminals to the spinal cord, which has been extensively described^{25,26,44,45}, since the i.m. administration of the blocker GW-441756 diminished the protection. The fact that some protection was still evident might be due to the possible participation of other receptors, such as TrkB²², in the TTC-induced effects. Interestingly, this requirement of axonal transport for the protection is similar to that for the cellular survival promoted by the signaling endosome activated by NT⁴⁶⁻⁴⁹.

TrkA receptor phosphorylation in Y490 is associated to the activation of survival pathways MAPK/ERK and PI3K³⁴. Remarkably, the injection of TTC alone on the forelimb muscles increased this phosphorylation in spinal MNs, suggesting that these pathways might be the intracellular mechanism of the protection, consistently with previous findings showing that the activation of these routes by the vascular endothelial growth factor (VEGF) was effective to protect against the toxic effect of AMPA in our chronic model of spinal MN degeneration⁵⁰. The protection by VEGF against the acute application of AMPA was effective when administered i.c.v. one h after the beginning of the rapid excitotoxic process developed in 3-12 h⁵¹, whereas the i.m. injection of TTC 6-24 h after the beginning of AMPA infusion proved to be very effective in the present chronic model.

Taking in consideration that TTC at very low dosage is very efficient to exert neuroprotection, and because of its easy route of administration to induced these effects, even when administered after the beginning of the degeneration process, we consider that the TTC has the potential to be considered as a therapeutic option for motor neuron diseases.

Methods

Animals. Adult male Wistar rats (280–300 g) were used in all the experiments and were handled in accordance with the Official Mexican Regulation concerning the Laboratory Animal Welfare (NOM-062-ZOO-1999) and with approval of the Local Animal Care Committee (Approval No. RTI21-14). Rats were housed in a laboratory environment with a 12 h light/dark cycle and with food and water ad libitum along the entire experiment. All efforts were made to avoid unnecessary suffering of the animals.

Surgery and drug administration. The implantation of the osmotic minipumps and intraspinal cannula was carried out essentially as previously described^{5,6} and therefore only a brief description will be given. AMPA concentration was chosen on the basis of this previous work.

RS-AMPA (Tocris, Ellisville, MO) was dissolved in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. The osmotic minipumps (Alzet model 2004, capacity ~250 μ L, flow rate 6 μ L/day) were filled with vehicle as a control, 1 mM AMPA, TTC at the concentration indicated below, or AMPA + TTC, and they were incubated in sterile isotonic saline solution at 37° for 48 h for stabilization before the implantation. The day of surgery rats were anesthetized with isoflurane 1-2% in a 95% O₂ + 5% CO₂ mixture and placed in a stereotaxic spinal unit. After shaving and disinfection of the skin an incision was made on the back of the animal. The lumbar region was carefully exposed and the muscles surrounding the T13 vertebra were retracted. The spinous process of this vertebra was lowered and on this site a stainless-steel screw (3.7 mm long, 1 mm diameter) was inserted to anchor the implant. A 1-2 mm diameter hole was drilled at the same vertebrae and a small cut of the meninges was made to insert a borosilicate glass probe (1 mm long, 50 μ m I.D. x 80 μ m O.D., VitroCom Inc.) into the right dorsal horn of the spinal cord (between L3-L4 spinal segments, Fig. 1b). The other end of the cannula was connected through a plastic tubing (1.7 cm long) to the osmotic minipump, which was implanted subcutaneously in the back of the rat. The probe and the screw were fixed to the bone with dental acrylic. At the end of the surgery, the skin incision was closed with surgical stainless-steel clips and rats received a single i.m. dose of penicillin (50 U). After recovering from anesthesia animals were kept in individual cages and it was verified that there were no motor alterations because of the surgical procedure.

TTC was obtained commercially (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), dissolved before the experiment in 0.1 M PB and administered by means of two different routes: direct spinal infusion or i.m. injection. For the spinal treatment TTC, alone or mixed with AMPA, was infused through the minipump at a 20 nM concentration, which was chosen on the basis of the results of experiments *in vitro*^{27,28}. As indicated in Fig. 6a, the TTC spinal infusion lasted seven days and, as a result, a total amount of ~42 ng of the fragment were infused into the spinal cord of each rat.

For the i.m. administration of TTC, on the basis of our previous study on the effects of AMPA infusion between L3 and L4 spinal cord segments⁶, we decided to inject the fragment into the gastrocnemius and hamstring muscles (Fig. 6b), both involved in rear limbs movement. As indicated in Fig. 6a, we injected TTC following two different protocols: pre-treatment injections were made 24 h and 48 h before the surgery, and post-treatment injections, 6 h and 24 h after the implantation. All injections were made bilaterally in the two muscles mentioned. The final dose of each treatment was 1.3 µg/kg (~400 ng/rat). This dosage is one of the lowest previously reported to be effective⁵².

In other experiments, the TrkA receptor blocker GW-441756 (Sigma, St. Louis, MO), dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) was administered i.m. (430 µg/kg, ~130 µg/rat) simultaneously with the TTC (co-administration), or 6 h before the first injection of TTC and one h before the second injection (pre-administration) (blue and green arrows in Fig. 6a, respectively). We also evaluated the i.m. administration of DMSO alone as a vehicle control. In these experiments some rats treated with AMPA alone and with AMPA + TTC post-treatment were included in parallel and the data were grouped with other rats similarly treated. Therefore, the results of these two groups are the same in Figs. 1b, 3 and 5a, b.

Assessment of motor function. Five days before surgery rats were trained to reach 120 s on the rotarod test (Columbus Instruments, Columbus, OH), with rotation starting at 10 rpm and accelerated at 0.2 rpm/s. The rats that did not fully complete the rotarod training were discarded from the experiment before surgery. Three trials/day/rat were assessed on the rotarod from the day of surgery and until the seventh day, when animals were anesthetized and perfused for histology (Fig. 6a). In addition, holding up the tail we daily photographically recorded the changes in the position of the rear limbs.

Histology and immunohistochemistry. For the histological and immunohistochemical analyses of the spinal cord, rats were transcardially perfused seven days after osmotic pump implantation (unless indicated otherwise), with 0.9% saline solution followed by 4% paraformaldehyde in PB pH 7.4. Spinal cords were removed, post-fixed 48 h at 4°C and dehydrated with sucrose solutions (up to 30%). Transverse sections (40 µm thick) of the spinal cords were obtained in a cryostat. Sixty serial slices were obtained from the site of the cannula infusion and sixty from the immediate region rostral to the infused zone. These are referred in Results as the infused and rostral region, respectively. Alternate sections were stained with cresyl violet or immunostained as indicated below. The Nissl-stained slices were used for the assessment of morphologically healthy MNs in the ipsilateral and contralateral ventral horns. Large neurons with a soma diameter >20 µm and distinguishable nucleus, similar in appearance to those of the control and intact rats (Fig. 2a) were manually counted. Fifteen histological slices/rat/region were analyzed.

For immunohistochemistry, we used the neurofilament protein SMI-32 and GFAP as markers of neurons and astrocytes, respectively. We also determined the location of the TrkA receptor but in these experiments animals (n=4 per group) were fixed four days after surgery (or four days after the first i.m. injection in the TTC-alone group), in order to detect and analyze a sufficient number of MNs, before the occurrence of the extensive AMPA-induced damage. In brief, the free-floating sections were blocked with 5% bovine serum albumin in phosphate buffer saline (PBS)–Triton X-100 (0.3%) for 2 h, and then incubated with the corresponding primary antibody: mouse polyclonal anti-SMI-32 (1:1000, Covance), chicken polyclonal anti-GFAP (1:1000, Abcam) and rabbit polyclonal anti-phosphorylated TrkA (phospho-Y490) (10 µg/ml, Abcam) for 48 h at 4°C. Then the slices were washed 4x15 min in PBS–Triton X-100 and incubated with the secondary antibody for 2 h at room temperature. We used goat anti-mouse Texas-Red (Invitrogen), goat anti-chicken FITC (Novex), and for confocal microscopy we worked with donkey anti-mouse Alexa546 (Invitrogen) and goat anti-rabbit Cy5 (Life Technologies). Finally, sections were washed and mounted on silane-covered slides and coverslipped with fluorescent mounting medium (DAKO). The cross-reactivity in the immunofluorescent technique was excluded by control slices incubated in the absence of primary antibodies. There was no immunostaining in these controls.

The immunostaining for SMI-32 and GFAP was visualized under an epifluorescence Olympus microscope. SMI-32 and TrkA receptor (phospho-Y490) were observed by confocal microscopy (LSM 710-Zeiss). The merged images are the maximum intensity projection obtained from Z-stack analysis. The corrected total cellular fluorescence (CTCF) for TrkA (phospho-Y490) in the spinal MNs was calculated using the formula previously reported: $CTCF = \text{integrated density} - (\text{area of selected cell} \times \text{mean fluorescence of background readings})^{53}$. Merged images and CTCF were obtained with Image J/FIJI (NIH, Bethesda, MD). Five histological slices/rat were analyzed (n=4 per group).

Statistical analysis. The time on the rotarod and the number of MNs was analyzed by ANOVA followed by Tukey post hoc test. To analyze the CTCF we used Kruskal-Wallis, Dunn's Multiple Comparison post hoc test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. The statistical analysis was performed using Prism 5 Software (San Diego, CA).

References

1. Statland, J.M., Barohn, R.J., McVey, A.L., Katz, J.S. & Dimachkie, M.M. Patterns of weakness, classification of motor neuron disease, and clinical diagnosis of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol. Clin.* **33**, 735-748 (2015).
2. Chiò, A. *et al.* Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology* **41**, 118-130 (2013).
3. Santa-Cruz, L.D., Ramírez-Jarquín, U.N. & Tapia, R. Role of mitochondrial dysfunction in motor neuron degeneration in ALS in *Amyotrophic Lateral Sclerosis* (ed. Maurer, M.H.) 10.5772/31290 (InTech, 2012).
4. Mancuso, R. & Navarro X. Amyotrophic lateral sclerosis: Current perspectives from basic research to the clinic. *Prog. Neurobiol.* **133**, 1-26 (2015).
5. Tovar-y-Romo, L.B., Zepeda, A. & Tapia R. Vascular endothelial growth factor prevents paralysis and motoneuron death in a rat model of excitotoxic spinal cord neurodegeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **66**, 913-922 (2007).
6. Netzahualcoyotzi, C. & Tapia, R. Degeneration of spinal motor neurons by chronic AMPA-induced excitotoxicity in vivo and protection by energy substrates. *Acta. Neuropathol. Commun.* **3**, 27; 10.1186/s40478-015-0205-3 (2015).
7. Suzuki, M. *et al.* Direct muscle delivery of GDNF with human mesenchymal stem cells improves motor neuron survival and function in a rat model of familial ALS. *Mol. Ther.* **16**, 2002-2010 (2008).
8. Krakora, D. *et al.* Synergistic effects of GDNF and VEGF on lifespan and disease progression in a familial ALS rat model. *Mol. Ther.* **21**, 1602-1610 (2013).
9. Kim, K.S. *et al.* Transplantation of human adipose tissue-derived stem cells delays clinical onset and prolongs life span in ALS mouse model. *Cell Transplant.* **23**, 1585-1597 (2014).
10. Tovar-y-Romo, L.B., Ramírez-Jarquín, U.N., Lazo-Gómez, R. & Tapia R. Trophic factors as modulators of motor neuron physiology and survival: implications for ALS therapy. *Front. Cell Neurosci.* **8**, 61; 10.3389/fncel.2014.00061 (2014).
11. A double-blind placebo-controlled clinical trial of subcutaneous recombinant human ciliary neurotrophic factor (rHCNTF) in amyotrophic lateral sclerosis. ALS CNTF Treatment Study Group. *Neurology* **46**, 1244-1249 (1996).
12. A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS: The BDNF Study Group (Phase III). *Neurology* **52**, 1427-1433 (1999).
13. Sorenson, E.J. *et al.* Subcutaneous IGF-1 is not beneficial in 2-year ALS trial. *Neurology* **71**, 1770-1775 (2008).
14. Thorne, R.G. & Frey, W.H. Delivery of neurotrophic factors to the central nervous system: pharmacokinetic considerations. *Clin. Pharmacokinet.* **40**, 907-946 (2001).
15. Lacy, D.B., Tepp, W., Cohen, A.C., DasGupta, B.R. & Stevens, R.C. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 898-902 (1998).
16. Lalli, G., Herreros, J., Osborne, S.L., Montecucco, C., Rossetto, O. & Schiavo, G. Functional characterisation of tetanus and botulinum neurotoxins binding domains. *J. Cell. Sci.* **112**, 2715-2724 (1999).
17. Eisel, U. *et al.* Tetanus toxin: primary structure, expression in *E. coli*, and homology with botulinum toxins. *EMBO J.* **5**, 2495-2502 (1986).
18. Turton, K., Chaddock, J.A. & Acharya, K.R. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 552-558 (2002).
19. Bizzini, B., Grob, P. & Akert, K. Papain-derived fragment IIc of tetanus toxin: its binding to isolated synaptic membranes and retrograde axonal transport. *Brain Res.* **210**, 291-299 (1981).
20. Herreros, J., Lalli, G. & Schiavo, G. C-terminal half of tetanus toxin fragment C is sufficient for neuronal binding and interaction with a putative protein receptor. *Biochem. J.* **347**, 199-204 (2000).
21. Sinha, K. *et al.* Analysis of mutants of tetanus toxin Hc fragment: ganglioside binding, cell binding and retrograde axonal transport properties. *Mol. Microbiol.* **37**, 1041-1051 (2000).

22. Deinhardt, K. *et al.* Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. *Neuron* **52**, 293-305 (2006).
23. Lalli, G. & Schiavo, G. Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75NTR. *J. Cell Biol.* **156**, 233-239 (2002).
24. Miana-Mena, F.J., Roux, S., Benichou, J.C., Osta, R. & Brûlet, P. Neuronal activity-dependent membrane traffic at the neuromuscular junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 3234-3239 (2002).
25. Roux, S. *et al.* Internalization of a GFP-tetanus toxin C-terminal fragment fusion protein at mature mouse neuromuscular junctions. *Mol. Cell. Neurosci.* **30**, 572-582 (2005).
26. Perreault, M.C., Bernier, A.P., Renaud, J.S., Roux, S. & Glover, J.C. C fragment of tetanus toxin hybrid proteins evaluated for muscle-specific transsynaptic mapping of spinal motor circuitry in the newborn mouse. *Neuroscience* **141**, 803-816 (2006).
27. Gil, C., Chaib-Oukadour, I., Blasi, J. & Aguilera, J. HC fragment (C-terminal portion of the heavy chain) of tetanus toxin activates protein kinase C isoforms and phosphoproteins involved in signal transduction. *Biochem. J.* **356**, 97-103 (2001).
28. Gil, C., Chaib-Oukadour, I. & Aguilera, J. C-terminal fragment of tetanus toxin heavy chain activates Akt and MEK/ERK signalling pathways in a Trk receptor-dependent manner in cultured cortical neurons. *Biochem. J.* **373**, 613-620 (2003).
29. Chaib-Oukadour, I., Gil, C. & Aguilera, J. The C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin rescues cerebellar granule neurones from apoptotic death: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Neurochem.* **90**, 1227-1236 (2004).
30. Chaib-Oukadour, I., Gil, C., Rodríguez-Alvarez, J., Ortega, A. & Aguilera, J. Tetanus toxin H(C) fragment reduces neuronal MPP+ toxicity. *Mol. Cell Neurosci.* **41**, 297-303 (2009).
31. Radenovic, L. *et al.* Neuroprotective efficiency of tetanus toxin C fragment in model of global cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *Brain Res. Bull.* **101**, 37-44 (2014).
32. Mendieta, L. *et al.* The carboxyl-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin prevents dopaminergic degeneration and improves motor behavior in rats with striatal MPP(+)-lesions. *Neurosci. Res.* **65**, 98-106 (2009).
33. Herrando-Grabulosa, M., Casas, C. & Aguilera, J. The C-terminal domain of tetanus toxin protects motoneurons against acute excitotoxic damage on spinal cord organotypic cultures. *J. Neurochem.* **124**, 36-44 (2013).
34. Biarc, J., Chalkley, R.J., Burlingame, A.L. & Bradshaw, R.A. Dissecting the roles of tyrosines 490 and 785 of TrkA protein in the induction of downstream protein phosphorylation using chimeric receptors. *J. Biol. Chem.* **288**, 16606-16618 (2013).
35. Wood, E.R., Kuyper, L., Petrov, K.G., Hunter, R.N. 3rd., Harris, P.A. & Lackey, K. Discovery and in vitro evaluation of potent TrkA kinase inhibitors: oxindole and aza-oxindoles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 953-957 (2004).
36. Patricio-Martínez, A., Mendieta, L., Martínez, I., Aguilera, J. & Limón, I.D. The recombinant C-terminal fragment of tetanus toxin protects against cholinotoxicity by intraseptal injection of β -amyloid peptide (25-35) in rats. *Neuroscience* **315**, 18-30 (2016).
37. Horn, A.K. & Büttner-Ennever, J.A. The time course of retrograde transsynaptic transport of tetanus toxin fragment C in the oculomotor system of the rabbit after injection into extraocular eye muscles. *Exp. Brain Res.* **81**, 353-362 (1990).
38. Miana-Mena, F.J. *et al.* Fragment C tetanus toxin: a putative activity-dependent neuroanatomical tracer. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. **63**, 211-218 (2003).
39. Yamamoto, M., Sobue, G., Yamamoto, K., Terao, S. & Mitsuma, T. Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues. *Neurochem. Res.* **21**, 929-938 (1996).
40. Michael, G.J., Kaya, E., Averill, S., Rattray, M., Clary, D.O. & Priestley, J.V. TrkA immunoreactive neurones in the rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* **385**, 441-455 (1997).
41. Moreno-Igoa, M. *et al.* Fragment C of tetanus toxin, more than a carrier. Novel perspectives in non-viral ALS gene therapy. *J. Mol. Med. (Berl)*. **88**, 297-308 (2010).

42. Lomen-Hoerth, C. & Shooter, E.M. Widespread neurotrophin receptor expression in the immune system and other nonneuronal rat tissues. *J. Neurochem.* **64**, 1780-1789 (1995).
43. Shibayama, E. & Koizumi, H. Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. *Am. J. Pathol.* **148**, 1807-1818 (1996).
44. Meckler, R.L., Baron, R. & McLachlan, E.M. Selective uptake of C-fragment of tetanus toxin by sympathetic preganglionic nerve terminals. *Neuroscience* **36**, 823-829 (1990).
45. Ovsepián, S.V., Bodeker, M., O'Leary V.B., Lawrence, G.W. & Oliver, Dolly.J. Internalization and retrograde axonal trafficking of tetanus toxin in motor neurons and trans-synaptic propagation at central synapses exceed those of its C-terminal-binding fragments. *Brain Struct. Funct.* **220**, 1825-1838 (2015).
46. Grimes, M.L., Beattie, E. & Mobley, W.C. A signaling organelle containing the nerve growth factor-activated receptor tyrosine kinase, TrkA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 9909-9914 (1997).
47. Delcroix, J.D., Valletta, J.S., Wu, C., Hunt, S.J., Kowal, A.S. & Mobley, W.C. NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals. *Neuron* **39**, 69-84 (2003).
48. Howe, C.L. & Mobley, W.C. Signaling endosome hypothesis: A cellular mechanism for long distance communication. *J. Neurobiol.* **58**, 207-216 (2004).
49. Marlin, M.C. & Li, G. Biogenesis and function of the NGF/TrkA signaling endosome. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **314**, 239-257 (2015).
50. Tovar-y-Romo, L.B. & Tapia, R. VEGF protects spinal motor neurons against chronic excitotoxic degeneration in vivo by activation of PI3-K pathway and inhibition of p38MAPK. *J. Neurochem.* **115**, 1090-10101 (2010).
51. Tovar-y-Romo, L.B. & Tapia, R. Delayed administration of VEGF rescues spinal motor neurons from death with a short effective time frame in excitotoxic experimental models in vivo. *ASN Neuro* **4**, e00081; 10.1042/AN20110057 (2012).
52. Mendieta, L. *et al.* The C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin given by intramuscular injection causes neuroprotection and improves the motor behavior in rats treated with 6-hydroxydopamine. *Neurosci. Res.* **74**, 156-167 (2012).
53. McCloy, R.A., Rogers, S., Caldon, C.E., Lorca, T., Castro, A. & Burgess, A. Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle* **13**, 1400-1412 (2014).

Acknowledgements. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México) (CONACyT, project 240817) y Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA, UNAM, project IN201013). C.N. is recipient of a scholarship from CONACyT and this work is part of her doctoral thesis in Biochemical Sciences. We thank Dr. Yazmin Ramiro Cortés for her help in the use of the confocal microscope.

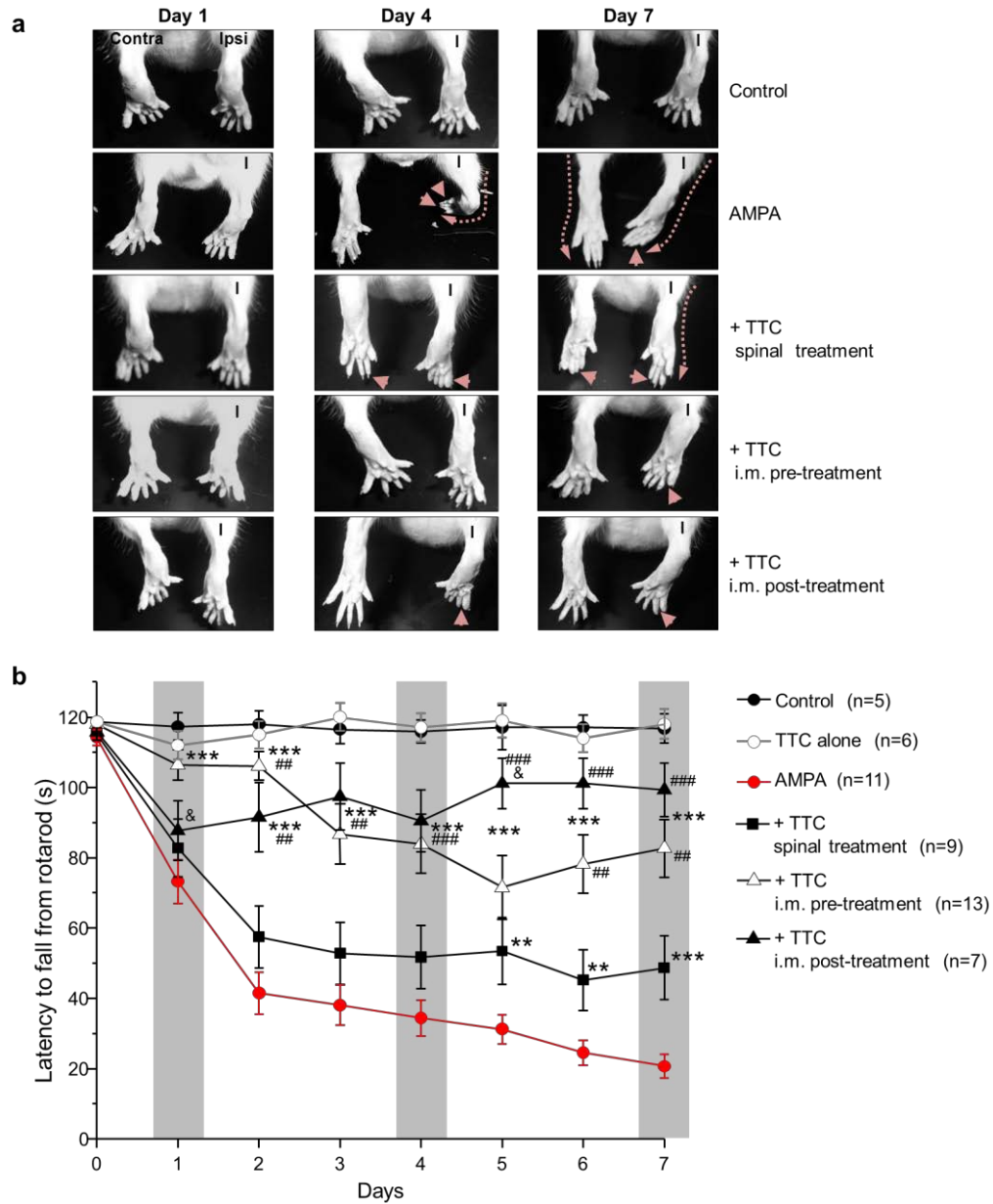


Figure 1. Progressive motor alterations induced by AMPA and protection by TTC. (a) Representative posterior views of the rear limbs (I, ipsilateral) at the beginning (day 1), the middle (day 4) and last day (day 7) of the experiment show the alterations in the position of the rear limb (discontinuous lines) and phalanges (arrowheads). **(b)**, motor performance assessed by the rotarod test was significantly affected by AMPA infusion and i.m. TTC prevented this alteration, whereas the spinal treatment was less effective. Grey bars highlight the initial, middle and last day of infusion shown in (a). Three trials/day/rat were assessed on the rotarod test. Data are mean values \pm SE for the number of animals shown in parentheses. The TTC alone group includes 3 rats treated with i.m. TTC injection and 3 with spinal infusion. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs AMPA. ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs spinal and & $p < 0.01$ vs pre-treatment.

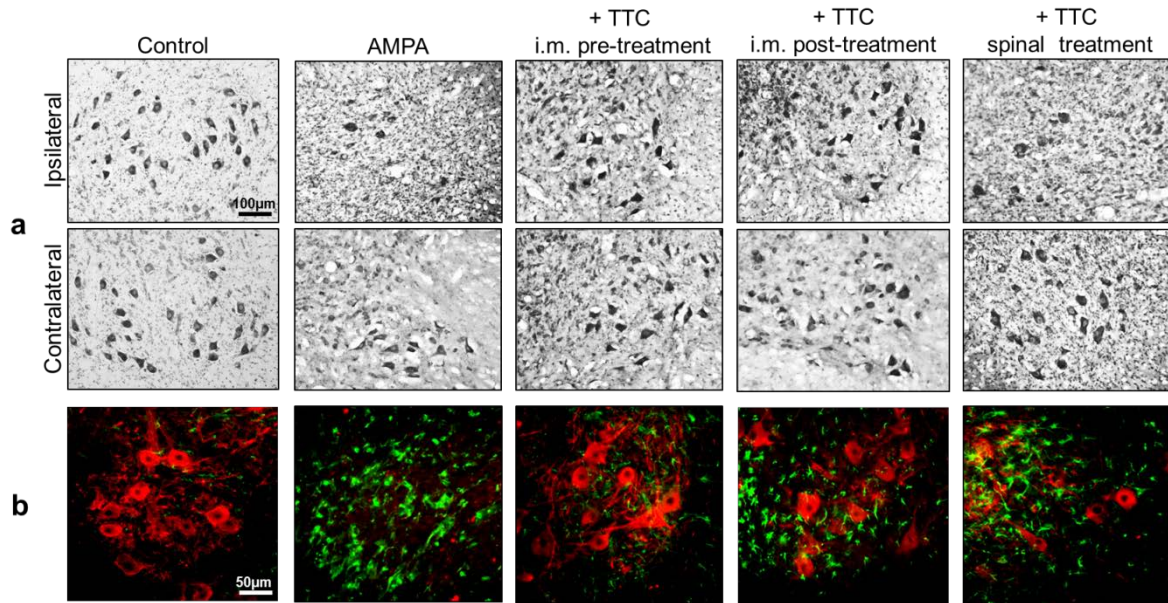


Figure 2. TTC treatment protects against the spinal MN degeneration induced by chronic excitotoxicity in the spinal cord. (a) Representative micrographs of Nissl-stained sections of the infused lumbar spinal cord region of rats treated as indicated, seven days after minipump implantation. Quantitative analysis is shown in Fig. 3. (b) Representative epifluorescence images of SMI-32 (red) and GFAP (green) immunohistochemistry of the ipsilateral ventral horns at the infused spinal cord region of rats treated as indicated, seven days after minipump implantation. AMPA induced a notable astroglia that was prevented by TTC, especially after i.m. administration. These effects were similar in the contralateral ventral horn.

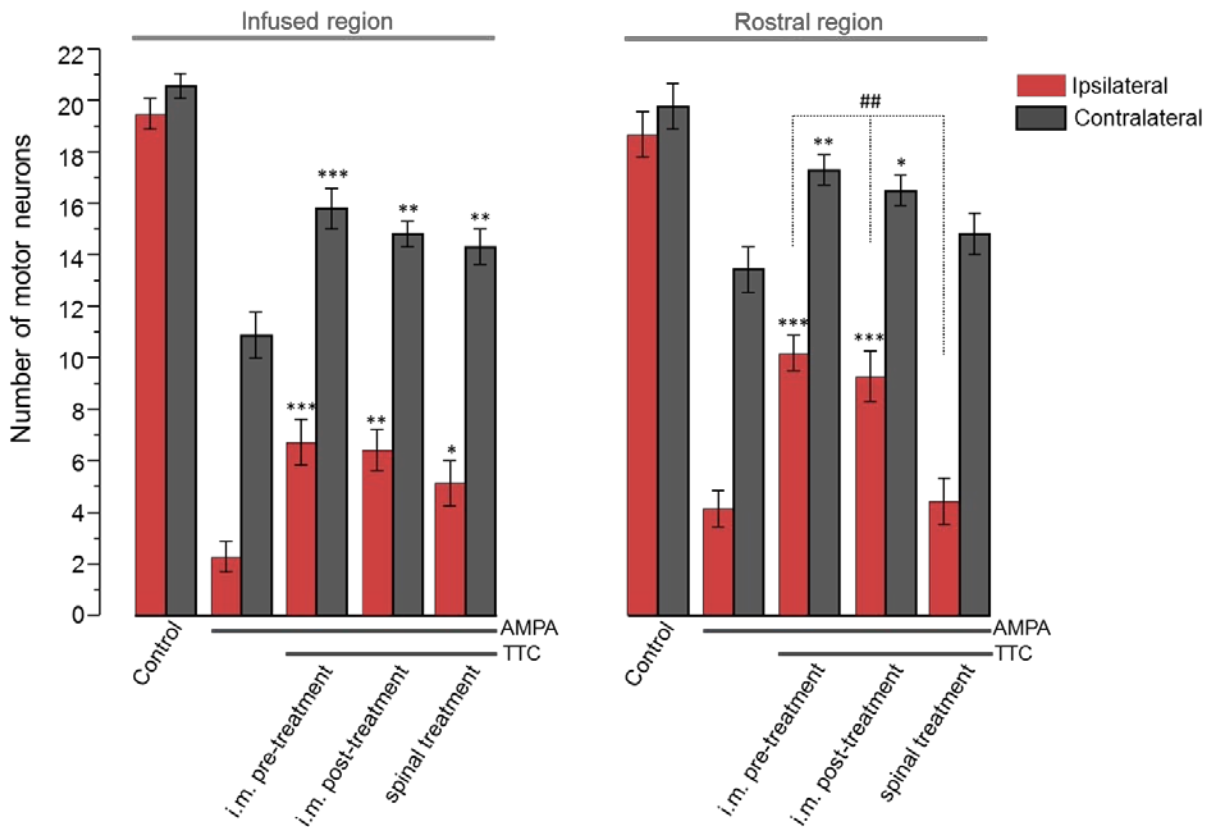


Figure 3. Quantitative analysis of the protection by TTC. Number of healthy MNs in the ipsilateral and contralateral ventral horns in the infused spinal cord region and in the adjacent rostral zone of rats treated as indicated, seven days after minipump implantation. AMPA induced almost complete loss of spinal MNs and TTC, mainly after i.m. administration, prevented this damage in both the infused and the rostral regions. Fifteen histological slices/rat/region were analyzed. Data are mean values \pm SE for 5 (control), 10 (AMPA), 11 (TTC pre-treatment), 7 (TTC post-treatment) and 8 (TTC spinal infusion) rats. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs corresponding side of the AMPA group. ## $p < 0.01$ vs corresponding side of the spinal treatment.

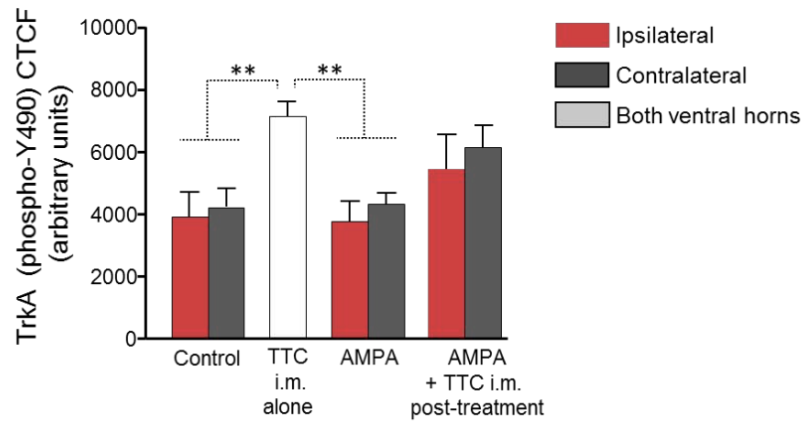
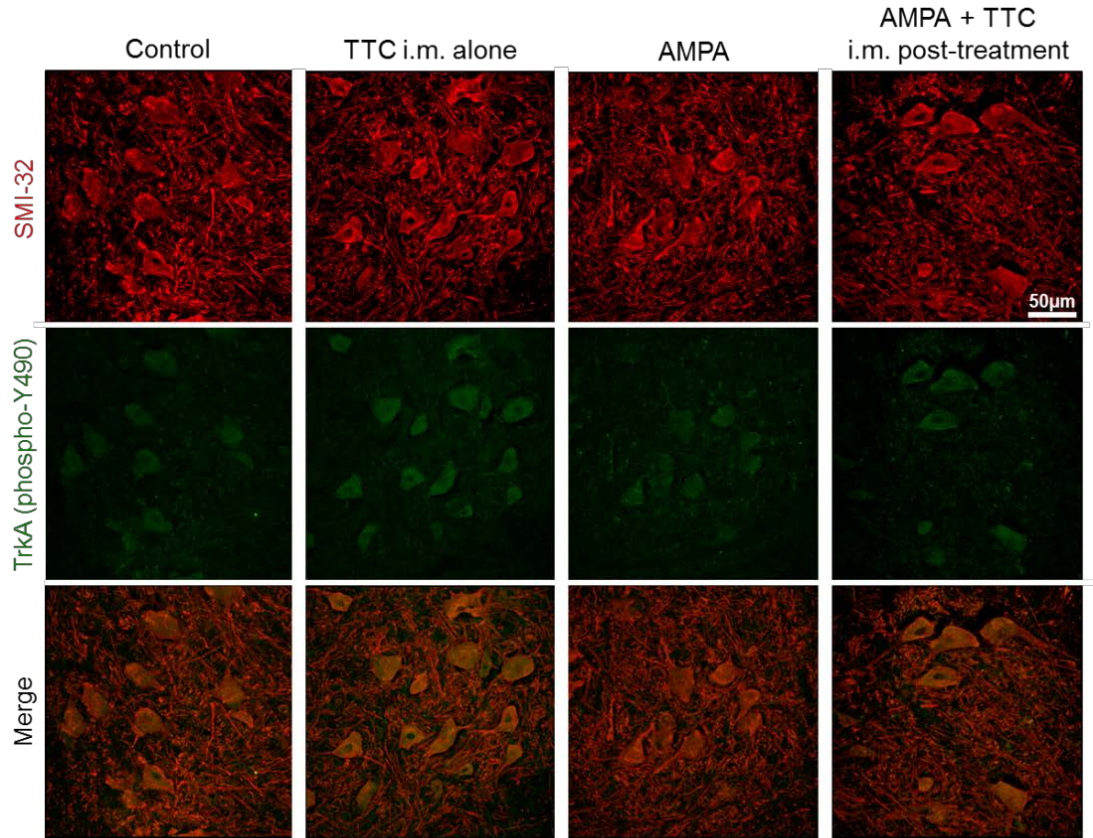


Figure 4. The i.m. administration of TTC increases TrkA receptor (phospho-Y490) in spinal MNs. Representative confocal micrographs of the ipsilateral ventral horns immunostained for SMI-32 (red) and TrkA (phospho-Y490) (green) in the lumbar section of rats treated as indicated, four days after minipump implantation. The TTC i.m. alone group received a bilateral i.m. administration of the fragment, and the white bar represents the average of both ventral horns. The analysis of the corrected total cell fluorescence (CTCF) of the images shows that TTC i.m. alone increased the phosphorylation of the TrkA receptor. Five histological slices/rat were analyzed (n=4 per group). Data are mean values \pm SE. **p<0.01.

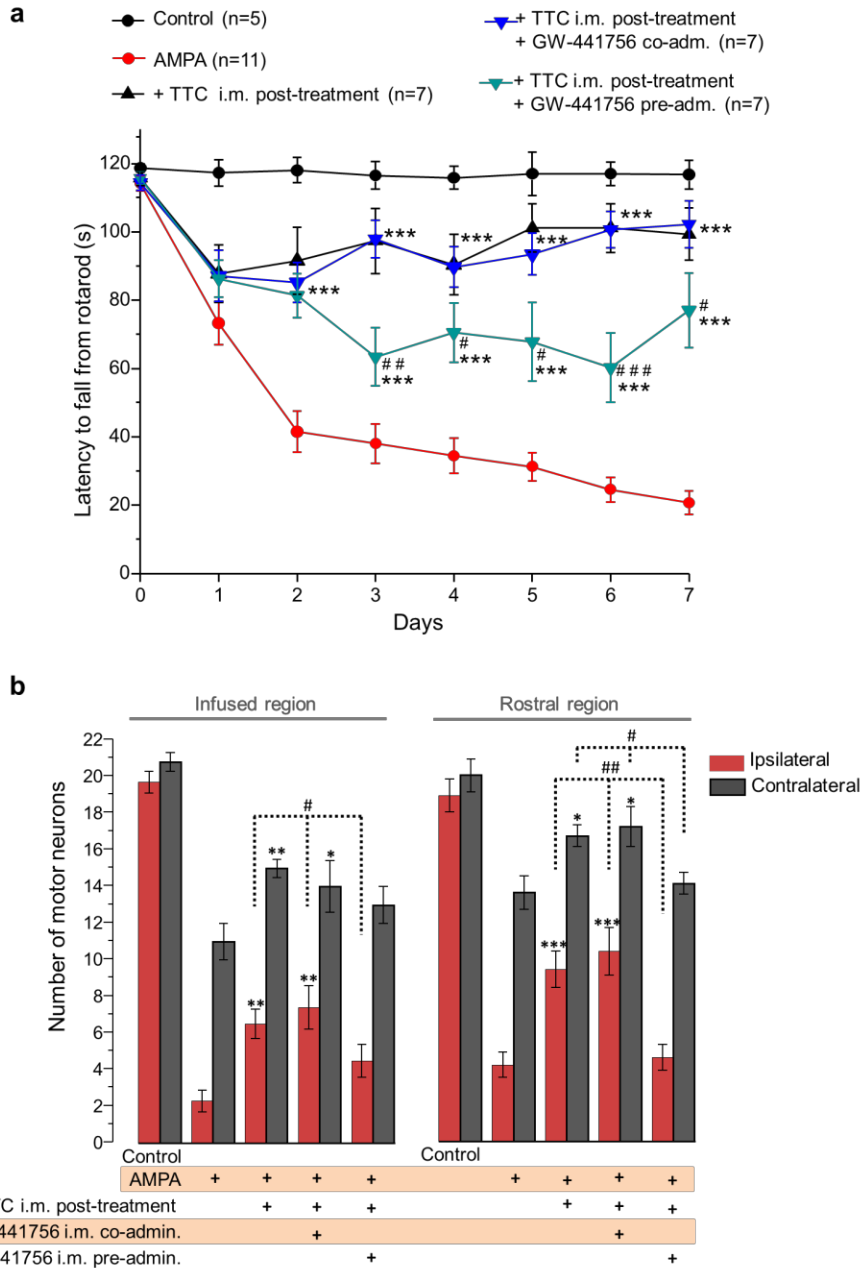


Figure 5. The i.m. administration of the TrkA receptor inhibitor GW-441756 prevents the protection exerted by TTC. (a) Motor performance assessed by the rotarod test shows that the i.m. administration of the inhibitor before the TTC, but not the co-administration, significantly decreased the protection induced by TTC. Three trials/day/rat were assessed. Data are mean values \pm SE for the number of rats shown in parentheses. *** $p < 0.001$ vs AMPA and # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs the other TTC treatments. **(b)** Number of healthy MNs in the ipsilateral and contralateral ventral horns of the infused and rostral region of the lumbar spinal cord, seven days after minipump implantation. Fifteen histological slices/rat/region were analyzed. Data are mean values \pm SE for the number of rats indicated in (a). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs

corresponding side of the AMPA group. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs corresponding side of the GW-441756 i.m. pre-administration group.

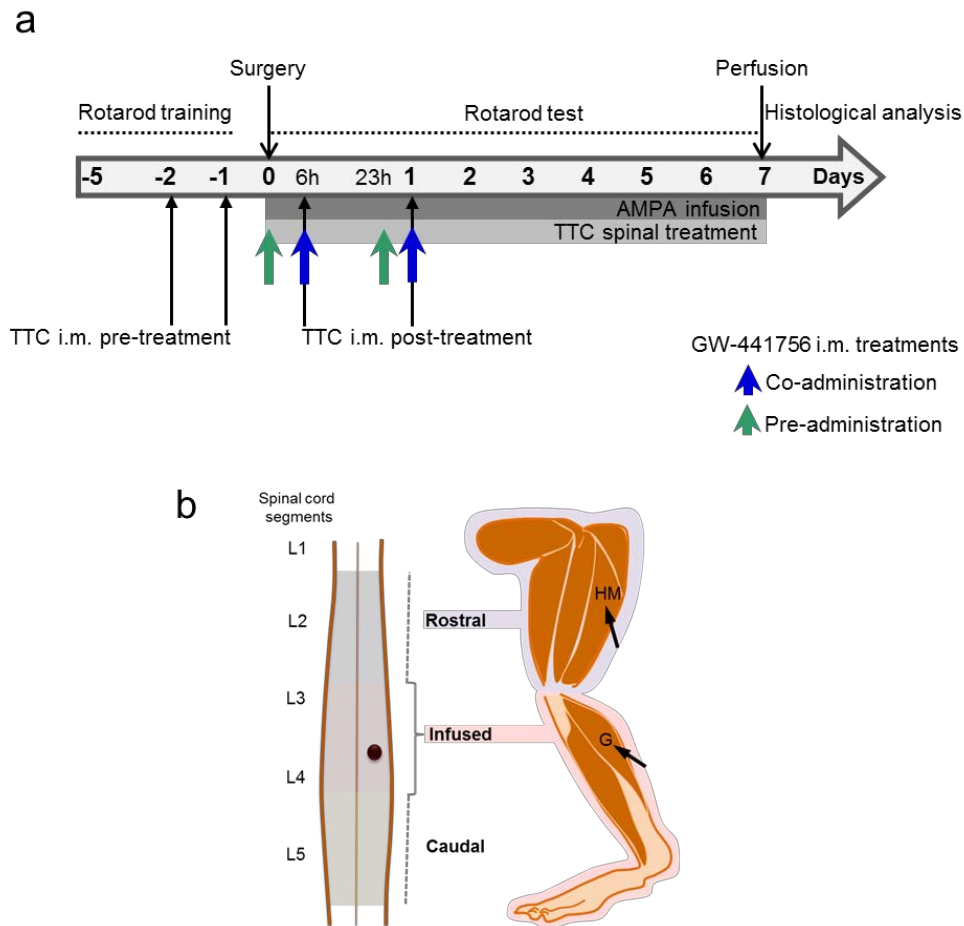


Figure 6. Experimental design. Scheme (a) indicates the timing of the rotarod training and test, and the duration of the continuous spinal infusion of AMPA and TTC (grey horizontal bars). Black thin arrows indicate the timing of TTC i.m. injections before (TTC i.m. pre-treatment) or after (TTC i.m. post-treatment) surgery. The TrkA blocker GW-441756 was injected i.m. at the same time of TTC (co-administration, blue arrows) or before TTC (pre-administration, green arrows). All i.m. treatments were made bilaterally in both the gastrocnemius (G) and hamstring muscles (HM), shown in (b) as related to the infused (pink) and rostral (blue) regions of the spinal cord, which were analyzed separately by histology (Fig. 4). The black dot represents the position of the probe in the spinal cord.

IV. DISCUSIÓN

La ELA se caracteriza por la degeneración selectiva de las MNs, lo que ocasiona una parálisis progresiva de la musculatura esquelética y finalmente la muerte del paciente. Aunque se considera que la ELA pudiera ser una enfermedad de etiología multifactorial (Cleveland y Rothstein, 2001; Mancuso y Navarro, 2015), los resultados experimentales ponen de manifiesto que la excitotoxicidad pudiera ser uno de los principales mecanismos de daño en esta patología, ya que las MNs son particularmente sensibles a este tipo de estímulos (Carriedo *et al.*, 1996; 2000; Corona *et al.*, 2007; Corona y Tapia, 2004; 2007). Es por ello relevante el estudio de estrategias enfocadas en disminuir los efectos dañinos mediados por el proceso excitotóxico.

Efecto de los sustratos energéticos

Durante el proceso excitotóxico es frecuente encontrar alteraciones estructurales y disfunción mitocondrial en las células, así como un aumento en el estrés oxidante (Gleichmann y Mattson, 2011; Görlach *et al.*, 2015; Orrenius *et al.*, 2015; Santa-Cruz *et al.*, 2012). Sin embargo, no está claro hasta qué punto la disfunción del metabolismo energético mitocondrial y el estrés oxidante participan en el proceso de neurodegeneración *in vivo* generado por un estímulo excitotóxico.

En uno de nuestros antecedentes trabajamos con el modelo de la 4-AP en ratas. La administración de este bloqueador inespecífico de canales de K^+ en el hipocampo de ratas, induce de forma casi inmediata la liberación de glutamato y genera epilepsia, además de que provoca la degeneración de las neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3, entre 12-24 h después de su administración. Sabemos que la muerte en este modelo está mediada por el proceso excitotóxico, debido a que el uso de MK-801 para inhibir a los receptores NMDA, aunque no bloquea la epilepsia, sí disminuye significativamente la neurodegeneración (Peña y Tapia, 1999; 2000; Vera y Tapia, 2012).

Nosotros encontramos que la infusión en hipocampo de los sustratos energéticos piruvato, BHB y α -cetoglutarato disminuye en gran medida la muerte neuronal inducida con 4-AP. Recientemente se demostró que la administración i.v.c. de de 4-AP en ratas, disminuye significativamente los niveles de fosfocreatina en la corteza cerebral durante el estado epiléptico y, además, reduce la actividad del complejo I mitocondrial a las 20 h, 3 y hasta 5 semanas después de haber inyectado la droga (Folbergrová *et al.*, 2016). Con esto antecedentes y nuestros resultados, proponemos que la protección generada por los sustratos energéticos se debe a su capacidad para ser incorporados al metabolismo oxidativo celular, y favorecer de esta manera la producción energética para hacer frente a los requerimientos energéticos que exige el proceso excitotóxico.

Por otro lado, también se ha demostrado que 60 min después de administrar 4-AP i.c.v. en ratas, se incrementa la marca para dihidroetidio, como marcador de la producción del anión superóxido, en las regiones CA1, CA3 y corteza cerebral (Folbergrová *et al.*, 2016). Adicionalmente, se sabe que los sustratos que utilizamos tienen capacidad antioxidante frente a diferentes especies reactivas (Haces *et al.*, 2008; Lopalco *et al.*, 2016; Lopalco y Stella, 2016), y han sido eficaces para proteger de estímulos oxidantes como el H₂O₂ (Cheng *et al.*, 2013; Desagher *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2007); por lo que su actividad antioxidante pudiera ser determinante en la protección que nosotros observamos. Tratando de establecer la importancia del estrés oxidante en el proceso de muerte inducido con 4-AP, evaluamos también el efecto de algunos antioxidantes como el glutatión en forma de etil éster, lo que facilita su entrada a las células (Zeevalk *et al.*, 2007); así como el efecto del L-BHB, isómero con actividad antioxidante semejante a la del D-BHB (Haces *et al.*, 2008). Con nuestro trabajo demostramos que a diferencia de los sustratos energéticos (piruvato, BHB y α -cetoglutarato), los antioxidantes (ascorbato y glutatión) no logran proteger a las neuronas hipocampales de la muerte excitotóxica inducida con 4-AP. Con esta información proponemos que, aunque el proceso de estrés oxidante pudiera estar participando durante las primeras horas de daño, las alteraciones en el metabolismo energético celular, que se presentan de forma más duradera, juegan un papel más importante en el proceso de muerte neuronal generado por el estímulo excitotóxico con 4-AP en el hipocampo de ratas despiertas.

En otro trabajo del grupo se demostró que estos mismos sustratos energéticos son eficaces para disminuir la muerte ipsilateral de las MNs y la parálisis unilateral que se presentan de 3-6 h posteriores a la infusión aguda de AMPA en la médula espinal (Santa-Cruz y Tapia, 2014). Sin embargo, este modelo agudo se aleja de lo que pudiera estar pasando en enfermedades como la ELA, en donde la neurodegeneración espinal y la parálisis se presentan de forma bilateral y de forma más paulatina. Adicionalmente, nuestro grupo ha demostrado que según la duración del estímulo con AMPA en la médula espinal, el proceso de muerte en las MNs puede variar de un rápido proceso necrótico en el modelo agudo, a un progresivo proceso apoptótico seguido por necrosis en el caso del modelo crónico (Ramírez-Jarquín y Tapia, 2016). Es por ello que para evaluar las estrategias de neuroprotección en la médula espinal decidimos trabajar en el modelo de excitotoxicidad crónica, en donde el deterioro motor y la degeneración espinal, se presentan de forma bilateral y progresiva a lo largo de 7 días.

Se ha demostrado ampliamente que las MNs son sensibles a la estimulación glutamatérgica con el agonista AMPA (Carriedo *et al.*, 1996; 2000; Corona y Tapia, 2004; 2007), lo que se ha asociado a la mayor expresión de receptores AMPA permeables a Ca²⁺ en estas células (Hideyama *et al.*, 2012; Kawahara *et al.*, 2003, 2004; Williams *et al.*, 1997). En este trabajo el análisis de diferentes segmentos espinales lumbares nos permitió identificar que las MNs localizadas más rostralmente son más

sensibles a la degeneración inducida con AMPA, que aquellas localizadas caudalmente. Este efecto ha sido reportado en otro trabajo (de la Cruz-Ramírez y Tapia, 2012) y pudiera tener su explicación en la mayor expresión de la subunidad GluA2 (determinante para la permeabilidad a Ca^{2+}) en la región lumbar, con respecto a los segmentos torácicos y cervicales de la médula espinal (Grossman *et al.*, 1999).

En el apartado de antecedentes enlistamos varios estudios donde se demuestra que los sustratos energéticos disminuyen el daño neuronal *in vitro* e *in vivo* inducido, generalmente, por alteraciones metabólicas. Esta protección se ha asociado al hecho de que los sustratos como el piruvato, el lactato y los cuerpos cetónicos se internalizan a las células a través de los transportadores de monocarboxilatos y pueden ser utilizados como sustratos alternativos a la glucosa para producir mayor cantidad de moléculas reductoras que pudieran estimular el trabajo de la cadena transportadora de electrones y con ello la fosforilación oxidativa (Magistretti y Allaman, 2013). Sin embargo, son pocos los antecedentes *in vivo* en donde se demuestra que estos sustratos protegen de los efectos de un estímulo puramente excitotóxico (Jeong *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2011; Ryu *et al.*, 2003). De hecho, pocas veces se ha reportado este efecto de protección sobre las MNs espinales (Corona y Tapia, 2007; Santa-Cruz y Tapia, 2014; Santa-Cruz *et al.*, 2016), células que son particularmente sensibles a la sobreexcitación glutamatérgica. Resulta interesante también que, a pesar de que las enfermedades neurodegenerativas como la ELA se caracterizan por tener una duración crónica, durante nuestra revisión bibliográfica no encontramos antecedentes en donde se haya evaluado el efecto de estos sustratos frente a un estímulo excitotóxico crónico.

En este trabajo demostramos que la continua infusión de piruvato o BHB disminuye significativamente, y de forma bilateral, la muerte neuronal y la gliosis en la médula espinal, así como la parálisis de los cuartos traseros inducida por la administración crónica de AMPA. La protección que observamos en nuestros experimentos pudiera estar relacionada con el uso de estos sustratos en el metabolismo oxidativo mitocondrial ya que, en cultivos neuronales primarios, se ha demostrado que la internalización de los sustratos energéticos está ligada a la actividad glutamatérgica, pues la estimulación de estas células con glutamato y AMPA incrementa la síntesis de los transportadores de monocarboxilatos y su presencia en la membrana plasmática (Pierre *et al.*, 2009). Adicionalmente, la actividad sináptica glutamatérgica podría estimular en los astrocitos la captación de sustratos energéticos para su posterior liberación como lactato, para uso de los requerimientos metabólicos neuronales, tal y como lo propone la hipótesis de la lanzadera astrocito-lactato-neurona (Pellerin y Magistretti, 2012). Además, la infusión de AMPA en médula espinal durante 5 días induce el hinchamiento de las mitocondrias en las MNs espinales (Ramírez-Jarquín y Tapia, 2016) y, aunque aún no se ha determinado si existen alteraciones energéticas en el modelo crónico; sí sabemos que 2 h después de infundir AMPA en la médula espinal, las mitocondrias aisladas de este tejido presentan una depleción en su potencial de

membrana, así como disminución en la tasa de consumo de oxígeno y en la actividad de los complejos mitocondriales I y VI (Santa-Cruz *et al.*, 2016). Si estas alteraciones se presentan después de una exposición breve a AMPA, suponemos que condiciones semejantes o aún más marcadas podrían presentarse en el modelo crónico. Por ejemplo, en la cepa de ratones SOD1-G93A de ELA esporádica, en donde el proceso de degeneración puede variar varios meses según el número de copias del gen mutado, se ha demostrado ampliamente que las mitocondrias de las MNs espinales presentan alteraciones como hinchazón y desorganización de las crestas, además de que se estos organelos presentan un bajo consumo de oxígeno que correlaciona con la disminución en el potencial de membrana mitocondrial y una actividad disminuida de los complejos mitocondriales I, II y IV (Bendotti *et al.*, 2001; Cassina *et al.*, 2008; Mattiazzi *et al.*, 2002; Parone *et al.*, 2013). En este modelo de ELA familiar, la administración de piruvato i.p. durante 70 días enlenteció la progresión de los síntomas, pero no modificó el inicio de la enfermedad y tampoco alargó la esperanza de vida de los animales (Park *et al.*, 2007). Por otra parte, someter a estos animales transgénicos a dietas cetogénicas no sólo mejoró la respiración y los niveles de ATP en las mitocondrias de la médula espinal, sino además, disminuyó la muerte de las MNs y la parálisis (Ari *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2006; 2012).

Como se mencionó en la introducción, la regulación de los niveles de Ca^{2+} intracelular es un mecanismo energéticamente costoso, debido a los sistemas de transporte activo a los que está asociado. Es por ello que en nuestro modelo crónico de neurodegeneración espinal, se espera que la demanda energética en las MNs sea alta en respuesta al proceso excitotóxico que deben enfrentar. La suplementación de moléculas como el piruvato y el BHB en la médula espinal de los animales sometidos al modelo crónico, muy probablemente podría ayudar a satisfacer estas necesidades energéticas; así como estos mismos sustratos han logrado revertir la disminución en la capacidad respiratoria, así como la depleción de los niveles de NADH y ATP generados por un estímulo con glutamato o NMDA *in vitro* (Izumi y Zorumski, 2010; Jourdain *et al.*, 2016; Laird *et al.*, 2013; Maalouf *et al.*, 2007; Maus *et al.*, 1999).

Por otro lado, ya que el piruvato estructuralmente es un α -cetoácido y puede neutralizar al H_2O_2 (Lopalco *et al.*, 2016; Lopalco y Stella, 2016) y el BHB tiene capacidad antioxidante frente al anión hidroxilo (Haces *et al.*, 2008), esta propiedad en común entre las dos moléculas para actuar como antioxidantes pudiera ser la responsable del efecto neuroprotector que nosotros encontramos. Para evaluar esta posibilidad estudiamos el efecto de los antioxidantes glutatión y ascorbato. Los resultados demuestran que los antioxidantes provistos de forma individual, e incluso de forma combinada, no tienen efectos neuroprotectores sobre ninguno de los parámetros evaluados. A diferencia de nuestros resultados, los tratamientos antioxidantes en modelos con la mutación SOD1-G93A han resultado efectivos para contrarrestar en buena medida algunos efectos tóxicos que caracterizan a este modelo transgénico. En

cultivos celulares con la mutación SOD1-G93A, la sobre-expresión de genes que codifican para proteínas antioxidantes como la glutatión peroxidasa o la SOD2 (Liu *et al.*, 2002), así como el uso de inhibidores de la sintasa del óxido nítrico (Cassina *et al.*, 2008) lograron disminuir fuertemente la producción de ROS, la peroxidación lipídica y la muerte celular estimulada por esta mutación. Incluso, la administración v.o. de un antioxidante dirigido a la mitocondria (MitoQ) durante 90 días en los ratones G93A, fue capaz de reducir parcialmente los marcadores de estrés oxidativo como la 3-nitrotirosina y el 4-hidroxiacetonal en tejido espinal, además de que retrasó el daño motor y extendió ligeramente la esperanza de vida (Miquel *et al.*, 2014).

Estas diferencias entre nuestros resultados y los reportados en el modelo SOD1-G93A, pudieran tener su explicación en el hecho de que el daño celular en el modelo transgénico está asociado directamente al establecimiento de un estado oxidante (Beckman *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; Mattiazzi *et al.*, 2002). A este respecto, un metaanálisis reciente encontró que los marcadores de estrés oxidativo en estos animales no se presentan durante los primeros meses de vida de estos ratones, sino hasta el inicio de los síntomas motores, lo que corrobora la participación del daño oxidante en el proceso de neurodegeneración en este modelo transgénico (Irvin *et al.*, 2015), y podría justificar la protección de los tratamientos antioxidantes en los ratones SOD1-G93A. Por otro lado, la neurodegeneración de las MNs en nuestro modelo se fundamenta en la sensibilidad de estas células al estímulo excitotóxico mediado por AMPA y, aunque hasta el momento no hemos determinado marcadores de estrés oxidante en el modelo crónico, se ha demostrado que la administración aguda de AMPA no incrementa la marca para 3-nitrotirosina en las MNs espinales, ni la producción de ROS en este tejido. Este hecho, sumado a la nula protección de los antioxidantes en nuestro modelo nos lleva a considerar que, posiblemente, el proceso de estrés oxidante pudiera no ser determinante durante el proceso de muerte de las MNs espinales inducido por la sobreexcitación crónica con AMPA, aunque no podemos descartar su presencia en el modelo.

En los últimos años se han propuesto, especialmente para el BHB, algunos otros mecanismos de protección alternativos a su capacidad de actuar como sustrato energético o antioxidante. Por ejemplo, se ha demostrado que este cuerpo cetónico actúa como un inhibidor específico de la clase I de desacetilasas de histonas. Estas enzimas están involucradas en la regulación de la expresión genética y su inhibición por el BHB induce la expresión de genes (FOXO3A and MT2) que codifican para proteínas antioxidantes (SOD2, catalasa, metalotioneina-2), y que confieren protección contra estímulos oxidativos (Lim *et al.*, 2011; Shimazu *et al.*, 2013). También se ha propuesto que tanto el BHB como el ACAC pudiera estar actuando como un regulador alostérico negativo del transportador vesicular de glutamato, lo que pudiera explicar parte de los efectos antiepilépticos de las dietas cetogénicas (Juge *et al.*, 2010). Los receptores a ácidos hidroxicarboxílicos (HCA1-3) son una familia de receptores acopladas a

proteínas G. Una de las funciones más estudiadas de estos receptores es su capacidad para actuar como sensores de intermediarios metabólicos para regular la función de los adipocitos, en donde se encuentran expresados abundantemente. El HCA2 se expresa también en células del sistema inmune (macrófagos, monocitos, neutrófilos, células dendríticas dermales), y su activación por el BHB parece tener efectos antiinflamatorios en gran variedad de tejidos, lo que pudiera ser benéfico para enfermedades que involucren un proceso inflamatorio (Graff *et al.*, 2016; Rahman *et al.*, 2014). Para el caso del piruvato, aunque no hallamos información sobre mecanismos alternos de protección, se ha mostrado que su forma reducida, el lactato, ha logrado disminuir el daño generado en modelos de isquemia *in vivo* a través de su capacidad para activar al receptor HCA1 (Castillo *et al.*, 2015).

Ya que, a diferencia de los antioxidantes, el piruvato tuvo la misma eficacia de protección que el BHB en nuestros experimentos, y ambos comparten la capacidad de actuar como sustratos energéticos, deducimos que la neuroprotección generada por estos compuestos depende, principalmente, de su utilización en el metabolismo energético neuronal, aunque no descartamos la participación de su actividad antioxidante. Por otro lado, para un mejor entendimiento del proceso de muerte en nuestro modelo crónico de excitotoxicidad, consideramos relevante que como perspectiva de este trabajo pudiera realizarse un seguimiento temporal de algunos marcadores de estrés oxidante así, como la determinación del funcionamiento mitocondrial en tejido espinal de animales tratados con AMPA y los sustratos energéticos.

Efecto del fragmento C-terminal de la toxina tetánica

El fragmento TTC es un péptido que conserva la capacidad de unión a terminales periféricas e internalización en el SNC como lo haría la TeTx nativa (Ovsepian *et al.*, 2015; Perreault *et al.*, 2006; Sinha *et al.*, 2000). Se ha demostrado que el TTC es eficiente para proteger a las células de distintos estímulos tóxicos (Cubí *et al.*, 2013; Chaïb-Oukadour *et al.*, 2009; Mendieta *et al.*, 2012; 2016), pero no hay evidencia de que pueda prevenir la neurodegeneración frente a un reto excitotóxico crónico *in vivo*. En esta segunda parte del proyecto evaluamos el efecto neuroprotector del TTC en nuestro modelo crónico. Es importante resaltar que en ningún caso detectamos efectos tóxicos provocados por el fragmento, a pesar de que éste fue administrado en una dosis máxima de 1.3 µg/kg, que supera por mucho la dosis letal mínima de la TeTx (1 ng/kg) (Gill, 1982).

Al inicio del trabajo administramos el fragmento directamente en la médula espinal, pues el objetivo era situarlo lo más cercano a las MNs. A pesar de que este tratamiento nos permitió infundir el fragmento de forma constante en las astas ventrales durante siete días, sólo generó una ligera mejora en el desempeño motor de los animales administrados con AMPA. Estudios *in vitro* demuestran que el TTC activa cascadas de

señalización trófica a partir de la activación y fosforilación de los receptores Trk (Gil *et al.*, 2003), en particular del TrkA (Gil *et al.*, 2001). La baja expresión de estos receptores en las astas dorsales y ventrales de la médula espinal (Michael *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 1996) pudiera explicar la poca eficacia del tratamiento espinal con TTC. Adicionalmente, el fragmento pudo haber difundido del sitio de administración debido a su capacidad para realizar saltos transinápticos entre los diferentes componentes celulares y a su facilidad para transportarse por el SNC (Bizzini *et al.*, 1981; Fishman y Carrigan, 1987; Horn y Büttner-Ennever, 1990). De hecho, este mecanismo de transporte tan eficiente ha sido la justificación del éxito que ha tenido el tratamiento i.m. del TTC en modelos de daño neuronal en el encéfalo (Mendieta *et al.*, 2012; 2016; Radenovic *et al.*, 2014).

Uno de los mecanismos de acción de las neurotrofinas es el denominado endosoma de señalización (Delcroix *et al.*, 2003; Harrington *et al.*, 2011). Este endosoma que contiene en su membrana al receptor Trk activado y a la neurotrofina en su interior, al transportarse retrógradamente a lo largo del axón tiene la capacidad de ir uniendo y activando a sus proteínas señalizadoras. Por esto, se propone que mientras más largo sea el viaje del endosoma hacia el núcleo celular, mayor intensidad tendrá su señal (Marlin y Li, 2015). Tomando en consideración que el receptor TrkA se encuentra abundantemente en las NMJ (Genç *et al.*, 2004), que el TTC pareciera transportarse (**Figura 7**) y comportarse como las NTs, y que éstas utilizan al endosoma de señalización como mecanismo de acción, decidimos administrar el fragmento directamente en los músculos inervados por las MNs a las que dañamos. Los datos muestran que no importa si el TTC se administra previa o posteriormente al inicio del estímulo excitotóxico, la administración i.m. del péptido disminuye significativamente la neurodegeneración espinal y previene en gran medida el daño motor inducido por la estimulación crónica con AMPA en la médula espinal. Un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio obtuvo efectos de neuroprotección semejantes usando el VEGF (Tovar-y-Romo *et al.*, 2007), pero para obtener tales resultados el factor de crecimiento tuvo que ser administrado de forma invasiva a través de una inyección i.c.v. o intraespinal. A este respecto, el TTC presenta una gran ventaja pues sus efectos fueron más eficaces a partir de una administración i.m. en las extremidades afectadas, que después de su inyección directa en la médula espinal. En un cultivo neuromuscular compartimentalizado, en donde se tiene a los miocitos en una sección y los somas de las MNs en otro sector, de forma semejante a nuestros resultados, se demostró que sólo cuando el factor neurotrófico derivado de la glía se aplica en las terminales axónicas y no en el soma neuronal se promueve el crecimiento axonal y la inervación de los miocitos. Estos efectos se han asociado a la importancia del viaje retroaxonal de las NTs para estimular sus vías de señalización (Zahavi *et al.*, 2015). Y, aunque realizamos algunas determinaciones para corroborar el transporte del fragmento del músculo hacia las MNs espinales, la inespecificidad de los anticuerpos nos impidió evidenciar su

transporte retrógrado. Sin embargo, éste ha sido ampliamente descrito en modelos *in vivo* (Coen *et al.*, 1997; Miana-Mena *et al.*, 2004; Ovsepián *et al.*, 2015; Perreault *et al.*, 2006; Roux *et al.*, 2005).

La fosforilación del receptor TrkA en la posición Y490 está asociada a la activación de las vías de supervivencia MEK/Erk y de PI3K (Deinhardt y Chao, 2014). La activación de estas vías por VEGF ha demostrado ser efectiva para prevenir de los efectos nocivos de nuestro modelo crónico (Tovar-y-Romo y Tapia, 2010). Tratando de elucidar el mecanismo de protección del TTC, estudiamos la fosforilación Y490 del receptor TrkA en la médula espinal de las ratas, y encontramos que la administración i.m. del fragmento intensifica esta señal. Esto concuerda con lo reportado por Gil *et al.*, (2001), en donde el fragmento en cultivos de CGN incrementó la misma fosforilación. Este evento pudiera estar relacionado con la activación de las cascadas de supervivencia asociadas a este receptor, lo que podría justificar los efectos neuroprotectores del fragmento en nuestro modelo.

Posteriormente, para estudiar la vinculación entre los efectos del TTC y el receptor TrkA ubicado en la NMJ, administramos en el músculo un inhibidor farmacológico específico (GW14176) para ese receptor a NTs. Este fármaco no bloqueó por completo, pero sí disminuyó significativamente la protección del TTC sobre las MNs espinales y sobre la conducta motora. El hecho de que la protección del TTC aún fuera evidente en los animales tratados con GW1417 pudiera estar relacionado con la dosis inhibidor que utilizamos, aunque también, podría deberse a la posible participación de otros receptores como el TrkB en el mecanismo de acción del TTC (Deinhardt *et al.*, 2006).

Con estos resultados no solo evidenciamos la eficacia del fragmento TTC para disminuir la neurodegeneración y parálisis de nuestro modelo, sino además, apoyan la idea de que el TTC es capaz de enviar señales de supervivencia a través de tejidos distantes pero relacionados entre sí, tales como los músculos de las extremidades posteriores y las MNs espinales que los inervan. Por otro lado, para mejor comprensión del mecanismo de neuroprotección del TTC en nuestro modelo crónico, consideramos que como perspectivas de este proyecto podría evaluarse el efecto del TTC en una ventana más grande de tiempo. Podría también determinarse la interacción entre el fragmento con los receptor TrkA y TrkB en la NMJ y en la médula espinal, para corroborar la participación de éstos en su mecanismo de acción. Sería interesante también inhibir el transporte mediado por dineína en las terminales nerviosas de la NMJ, para evidenciar la importancia del transporte retroaxonal en los efectos del fragmento. Finalmente, para establecer los detalles de la señalización intracelular responsable de los efectos neuroprotectores del fragmento TTC, se podría evaluar la activación de las vías MEK/Erk, PI3K y la PLC- γ en la médula espinal de los animales administrados i.m. con el TTC.

V. CONCLUSIONES

- I. De la primera parte del proyecto podemos concluir que las afectaciones del metabolismo energético celular participan de forma importante en el mecanismo de muerte de las MNs espinales inducido por un estímulo excitotóxico crónico con AMPA, mientras que el estrés oxidante pareciera tener una participación más limitada en este proceso de degeneración. Estos resultados en conjunto con los antecedentes en hipocampo, nos llevan a considerar que la estabilidad de metabolismo energético pudiera ser relevante para enfrentar al proceso excitotóxico en distintas regiones del SNC.

- II. De los experimentos de la segunda estrategia concluimos que el fragmento TTC administrado i.m. es eficaz, con una ventana de al menos 6 h, para proteger de los efectos tóxicos generados por un estímulo excitotóxico crónico en la médula espinal inducido con AMPA. Esta protección depende parcialmente de la activación del receptor TrkA localizado en la NMJ y su posterior transporte retrógrado hacia las MNs espinales.

Finalmente, aunque el tratamiento de neuroprotección basada en la suplementación de sustratos energéticos por el momento pudiera presentar dificultades para su aplicación clínica, sí da la pauta para el desarrollo de estrategias enfocadas en mejorar el metabolismo energético celular para contrarrestar los efectos dañinos del proceso excitotóxico crónico. En lo que respecta al TTC, ya que hasta ahora no se han reportado efectos tóxicos por su uso y tomando en cuenta la eficacia de sus efectos neuroprotectores a bajas dosis y su fácil administración, consideramos que este péptido cuenta con el perfil necesario para ser considerado como una herramienta terapéutica potencial para enfermedades caracterizadas por la muerte de las MNs, como la ELA.

VI. REFERENCIAS

- Abad-Rodríguez J. Membrane Glycolipids in Neurotrophin Receptor-Mediated Signaling, en: Intracellular Mechanisms for Neuritogenesis. (Curtis I ed.) 2007. pp. 195-221. Springer.
- Afifi AK, Bergman RA. Médula espinal, en Neuroanatomía funcional. Texto y atlas. Segunda edición, 2005. pp. 45-69. McGraw-Hill Interamericana, México.
- Akbarian S, Smith MA, Jones EG. Editing for an AMPA receptor subunit RNA in prefrontal cortex and striatum in Alzheimer's disease, Huntington's disease and schizophrenia. *Brain Res.* 1995;699(2):297-304.
- Albers RW, Siegel GJ. Membrane Transport, en: Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular, and Medical Aspects. (Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL, eds.) Séptima edición, 2006. pp. 73-94. Elsevier, UK.
- Alexianu ME, Ho BK, Mohamed AH, *et al.* The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1994;36(6):846-58.
- ALS CNTF Treatment Study Group. A double-blind placebo-controlled clinical trial of subcutaneous recombinant human ciliary neurotrophic factor(rHCNTF) in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 1996;46(5):1244-9.
- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Orrenius S, *et al.* Calcineurin and mitochondrial function in glutamate-induced neuronal cell death. *FEBS Lett.* 1996;394(3):321-4.
- Ari C, Poff AM, Held HE, *et al.* Metabolic therapy with Deanna Protocol supplementation delays disease progression and extends survival in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mouse model. *PLoS One.* 2014;9(7):e103526.
- Bading H. Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(9):593-608.
- Bao WL, Williams AJ, Faden AI, *et al.* Selective mGluR5 receptor antagonist or agonist provides neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 2001;922(2):173-9.
- Beckman JS, Estévez AG, Crow JP, *et al.* Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS. *Trends Neurosci.* 2001;24(11 Suppl):S15-20.
- Bendotti C, Calvaresi N, Chiveri L, *et al.* Early vacuolization and mitochondrial damage in motor neurons of FALS mice are not associated with apoptosis or with changes in cytochrome oxidase histochemical reactivity. *J Neurol Sci.* 2001;191(1-2):25-33.
- Bergey GK, Bigalke H, Nelson PG. Differential effects of tetanus toxin on inhibitory and excitatory synaptic transmission in mammalian spinal cord neurons in culture: a presynaptic locus of action for tetanus toxin. *J Neurophysiol.* 1987;57(1):121-31.
- Bernardini C, Censi F, Lattanzi W, *et al.* Mitochondrial network genes in the skeletal muscle of amyotrophic lateral sclerosis patients. *PLoS One.* 2013;8(2):e57739.
- Berthet C, Lei H, Thevenet J, *et al.* Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29(11):1780-9.
- Bigalke H, Heller I, Bizzini B, *et al.* Tetanus toxin and botulinum A toxin inhibit release and uptake of various transmitters, as studied with particulate preparations from rat brain and spinal cord. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1981;316(3):244-51.
- Bizzini B, Grob P, Akert K. Papain-derived fragment IIc of tetanus toxin: its binding to isolated synaptic membranes and retrograde axonal transport. *Brain Res.* 1981;210(1-2):291-299.
- Brini M, Cali T, Ottolini D, *et al.* Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(15):2787-814.
- Brockington A, Ning K, Heath PR, *et al.* Unravelling the enigma of selective vulnerability in neurodegeneration: motor neurons resistant to degeneration in ALS show distinct gene expression characteristics and decreased susceptibility to excitotoxicity. *Acta Neuropathol.* 2013;125(1):95-109.
- Bronfman FC, Lazo OM, Flores C, *et al.* Spatiotemporal intracellular dynamics of neurotrophin and its receptors. Implications for neurotrophin signaling and neuronal function, en: Handbook of Experimental Pharmacology. Neurotrophic Factors (Lewin GR, Carter BD, eds.) 2014. pp. 33-65. Springer, Heidelberg.

- Brooks BR. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *J Neurol Sci.* 1994;124:96-107.
- Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol.* 2001;11(3):297-305.
- Cabot JB, Mennone A, Bogan N, *et al.* Retrograde, trans-synaptic and transneuronal transport of fragment C of tetanus toxin by sympathetic preganglionic neurons. *Neuroscience.* 1991;40(3):805-23.
- Cai S, Kukreja R, Shoesmith S, *et al.* Botulinum neurotoxin light chain refolds at endosomal pH for its translocation. *Protein J.* 2006;25(7-8):455-62.
- Calvo AC, Moreno-Igoa M, Mancuso R, *et al.* Lack of a synergistic effect of a non-viral ALS gene therapy based on BDNF and a TTC fusion molecule. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6:10.
- Calvo AC, Oliván S, Manzano R, *et al.* Fragment C of tetanus toxin: new insights into its neuronal signaling pathway. *Int J Mol Sci.* 2012;13(6):6883-901.
- Carlton E, Teng Q, Federici T, *et al.* Fusion of the tetanus toxin C fragment binding domain and Bcl-xL for protection of peripheral nerve neurons. *Neurosurgery.* 2008;63(6):1175-82; discussion 1182-4.
- Carriedo SG, Sensi SL, Yin HZ, *et al.* AMPA exposures induce mitochondrial Ca(2+) overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro. *J Neurosci.* 2000;20(1):240-50.
- Carriedo SG, Yin HZ, Weiss JH. Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *J Neurosci.* 1996;16(13):4069-79.
- Cassina P, Cassina A, Pehar M, *et al.* Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *J Neurosci.* 2008;28(16):4115-22.
- Castilho RF, Hansson O, Ward MW, *et al.* Mitochondrial control of acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci.* 1998;18(24):10277-86.
- Castilho RF, Ward MW, Nicholls DG. Oxidative stress, mitochondrial function, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem.* 1999;72(4):1394-401.
- Castillo X, Rosafio K, Wyss MT, *et al.*, A probable dual mode of action for both L- and D-lactate neuroprotection in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015;35(10):1561-9.
- Chaïb-Oukadour I, Gil C, Aguilera J. The C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin rescues cerebellar granule neurones from apoptotic death: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Neurochem.* 2004;90(5):1227-36.
- Chaïb-Oukadour I, Gil C, Rodríguez-Alvarez J, *et al.* Tetanus toxin H(C) fragment reduces neuronal MPP+ toxicity. *Mol Cell Neurosci.* 2009;41(3):297-303.
- Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4(4):299-309.
- Cheng B, Lu H, Bai B, *et al.* d-β-Hydroxybutyrate inhibited the apoptosis of PC12 cells induced by H2O2 via inhibiting oxidative stress. *Neurochem Int.* 2013;62(5):620-5.
- Cheng B, Yang X, An L, *et al.* Ketogenic diet protects dopaminergic neurons against 6-OHDA neurotoxicity via up-regulating glutathione in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2009;1286:25-31.
- Chian RJ, Li J, Ay I, *et al.* IGF-1:tetanus toxin fragment C fusion protein improves delivery of IGF-1 to spinal cord but fails to prolong survival of ALS mice. *Brain Res.* 2009;1287:1-19.
- Chiò A, Logroscino G, Hardiman O, *et al.* Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotroph Lateral Scler.* 2009;10(5-6):310-23.
- Chiò A, Logroscino G, Traynor BJ, *et al.* Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology.* 2013;41(2):118-30.
- Cleveland DW, Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nature Reviews Neuroscience.* 2001;2,806-819.
- Coen L, Osta R, Maury M, *et al.* Construction of hybrid proteins that migrate retrogradely and transynaptically into the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(17):9400-5.
- Corona JC, Tapia R. AMPA receptor activation, but not the accumulation of endogenous extracellular glutamate, induces paralysis and motor neuron death in rat spinal cord in vivo. *J Neurochem.* 2004;89(4):988-97.
- Corona JC, Tapia R. Ca²⁺-permeable AMPA receptors and intracellular Ca²⁺ determine motoneuron vulnerability in rat spinal cord in vivo. *Neuropharmacology.* 2007;52(5):1219-28.

- Corona JC, Tovar-y-Romo LB, Tapia R. Glutamate excitotoxicity and therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Ther Targets*. 2007;11(11):1415-28.
- Crugnola V, Lamperti C, Lucchini V, *et al*. Mitochondrial respiratory chain dysfunction in muscle from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol*. 2010;67(7):849-54.
- Cubí R, Candalija A, Ortega A, *et al*. Tetanus Toxin Hc Fragment Induces the Formation of Ceramide Platforms and Protects Neuronal Cells against Oxidative Stress. *PLoS One*. 2013;8(6):e68055.
- Curtis DR, De Groat WC. Tetanus toxin and spinal inhibition. *Brain Res*. 1968;10(2):208-12.
- D'Alessandro G, Calcagno E, Tartari S, *et al*. Glutamate and glutathione interplay in a motor neuronal model of amyotrophic lateral sclerosis reveals altered energy metabolism. *Neurobiol Dis*. 2011;43(2):346-55.
- de la Cruz-Ramírez, DL., Tapia Ricardo. Participación de la NADPH oxidase en el mecanismo de excitotoxicidad por AMPA en la médula espinal. 2012. Tesis de licenciatura en Investigación Biomédica Básica. UNAM
- Deinhardt K, Chao MV. Trk Receptors, en: *Handbook of Experimental Pharmacology. Neurotrophic Factors* (Lewin GR, Carter BD, eds.) 2014. pp.103-119. Springer, Heidelberg.
- Deinhardt K, Salinas S, Verastegui C, *et al*. Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. *Neuron*. 2006;52(2):293-305.
- Delcroix JD, Valletta JS, Wu C, *et al*. NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals. *Neuron*. 2003;39(1):69-84.
- Desagher S, Glowinski J, Prémont J. Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *J Neurosci*. 1997;17(23):9060-7.
- Figueiredo DM, Hallewell RA, Chen LL, *et al*. Delivery of recombinant tetanus-superoxide dismutase proteins to central nervous system neurons by retrograde axonal transport. *Exp Neurol*. 1997;145(2 Pt 1):546-54.
- Fischer A, Montal M. Crucial role of the disulfide bridge between botulinum neurotoxin light and heavy chains in protease translocation across membranes. *J Biol Chem*. 2007;282(40):29604-11.
- Fishman PS, Carrigan DR. Retrograde transneuronal transfer of the C-fragment of tetanus toxin. *Brain Res*. 1987;406(1-2):275-9.
- Fitzsimmons SP, Clark KC, Wilkerson R, *et al*. Inhibition of tetanus toxin fragment C binding to ganglioside G(T1b) by monoclonal antibodies recognizing different epitopes. *Vaccine*. 2000;19(1):114-21.
- Folbergrová J, Ješina P, Kubová H, Druga R, Otáhal J. Status Epilepticus in Immature Rats Is Associated with Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. *Front Cell Neurosci*. 2016;10:136.
- Fotinou C, Emsley P, Black I, *et al*. The crystal structure of tetanus toxin Hc fragment complexed with a synthetic GT1b analogue suggests cross-linking between ganglioside receptors and the toxin. *J Biol Chem*. 2001;276(34):32274-81.
- Fray AE, Ince PG, Banner SJ, *et al*. The expression of the glial glutamate transporter protein EAAT2 in motor neuron disease: an immunohistochemical study. *Eur J Neurosci*. 1998;10(8):2481-9.
- Fujikawa DG. Neuroprotective effect of ketamine administered after status epilepticus onset. *Epilepsia*. 1995;36(2):186-95.
- Genç B1, Ozdinler PH, Mendoza AE, *et al*. A chemoattractant role for NT-3 in proprioceptive axon guidance. *PLoS Biol*. 2004;2(12):e403.
- Gentile MT, Reccia MG, Sorrentino PP, *et al*. Role of cytosolic calcium-dependent phospholipase A2 in Alzheimer's disease pathogenesis. *Mol Neurobiol*. 2012;45(3):596-604.
- Gil C, Chaib-Oukadour I, Aguilera J. C-terminal fragment of tetanus toxin heavy chain activates Akt and MEK/ERK signalling pathways in a Trk receptor-dependent manner in cultured cortical neurons. *Biochem J*. 2003;373(2):613-20.
- Gil C, Chaib-Oukadour I, Blasi J, *et al*. HC fragment (C-terminal portion of the heavy chain) of tetanus toxin activates protein kinase C isoforms and phosphoproteins involved in signal transduction. *Biochem J*. 2001;356(1):97-103.
- Gill DM. Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiol Rev*. 1982;46(1):86-94.
- Gleichmann M, Mattson MP. Neuronal calcium homeostasis and dysregulation. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(7):1261-73.
- Görgülü A, Kınş T, Cobanoglu S, *et al*. Reduction of edema and infarction by Memantine and MK-801 after focal cerebral ischaemia and reperfusion in rat. *Acta Neurochir (Wien)*. 2000;142(11):1287-92.

- Görlach A, Bertram K, Hudecova S, *et al.* Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol.* 2015;6:260-71.
- Gould TW, Oppenheim RW. Motor neuron trophic factors: therapeutic use in ALS? *Brain Res Rev.* 2011;67(1-2):1-39.
- Goyal NA, Mozaffar T. Experimental trials in amyotrophic lateral sclerosis: a review of recently completed, ongoing and planned trials using existing and novel drugs. *Expert Opin Investig Drugs.* 2014;23(11):1541-51.
- Graff EC, Fang H, Wanders D, *et al.*, Anti-inflammatory effects of the hydroxycarboxylic acid receptor 2. *Metabolism.* 2016;65(2):102-13.
- Grimes ML, Zhou J, Beattie EC, *et al.* Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J Neurosci.* 1996;16(24):7950-64.
- Grossman SD, Wolfe BB, Yasuda RP, *et al.* Alterations in AMPA receptor subunit expression after experimental spinal cord contusion injury. *J Neurosci.* 1999;19(14):5711-20.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, *et al.* Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science.* 1994;264(5166):1772-5.
- Haces ML, Hernández-Fonseca K, Medina-Campos ON, *et al.* Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. *Exp Neurol.* 2008;211(1):85-96.
- Haenggeli C, Kato AC. Differential vulnerability of cranial motoneurons in mouse models with motor neuron degeneration. *Neurosci Lett.* 2002;335(1):39-43.
- Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 2006;97(6):1634-58.
- Harrington AW, St Hillaire C, Zweifel LS, *et al.* Recruitment of actin modifiers to TrkA endosomes governs retrograde NGF signaling and survival. *Cell.* 2011;146(3):421-34.
- Hassel B, Dingledine R. Glutamate, en: *Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects* (Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL, eds.) Séptima edición, 2006. pp. 267-290. Elsevier, UK.
- Herrando-Grabulosa M, Casas C, Aguilera J. The C-terminal domain of tetanus toxin protects motoneurons against acute excitotoxic damage on spinal cord organotypic cultures. *J Neurochem.* 2013;124(1):36-44.
- Herreros J, Lalli G, Montecucco C, *et al.* Tetanus toxin fragment C binds to a protein present in neuronal cell lines and motoneurons. *J Neurochem.* 2000;74(5):1941-50.
- Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H, *et al.* Profound downregulation of the RNA editing enzyme ADAR2 in ALS spinal motor neurons. *Neurobiol Dis.* 2012;45(3):1121-8.
- Horn AK, Büttner-Ennever JA. The time course of retrograde transsynaptic transport of tetanus toxin fragment C in the oculomotor system of the rabbit after injection into extraocular eye muscles. *Exp Brain Res.* 1990;81(2):353-62.
- Hu WT, Seelaar H, Josephs KA, *et al.* Survival profiles of patients with frontotemporal dementia and motor neuron disease. *Arch Neurol.* 2009;66(11):1359-64.
- Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 2003;72:609-42.
- Irvin CW, Kim RB, Mitchell CS. Seeking homeostasis: temporal trends in respiration, oxidation, and calcium in SOD1 G93A Amyotrophic Lateral Sclerosis mice. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:248.
- Izumi Y, Zorumski CF. Neuroprotective effects of pyruvate following NMDA-mediated excitotoxic insults in hippocampal slices. *Neurosci Lett.* 2010;478(3):131-5.
- Jaiswal MK. Selective vulnerability of motoneuron and perturbed mitochondrial calcium homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: implications for motoneurons specific calcium dysregulation. *Mol Cell Ther.* 2014;2:26.
- Jekabsons MB, Nicholls DG. In situ respiration and bioenergetic status of mitochondria in primary cerebellar granule neuronal cultures exposed continuously to glutamate. *J Biol Chem.* 2004;279(31):32989-3000.
- Jeong EA, Jeon BT, Shin HJ, *et al.* Ketogenic diet-induced peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation decreases neuroinflammation in the mouse hippocampus after kainic acid-induced seizures. *Exp Neurol.* 2011;232(2):195-202.
- Jourdain P, Allaman I, Rothenfusser K, *et al.* L-Lactate protects neurons against excitotoxicity: implication of an ATP-mediated signaling cascade. *Sci Rep.* 2016;6:21250.

- Juge N, Gray JA, Omote H, *et al.*, Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron*. 2010;68(1):99-112.
- Julio-Amilpas A, Montiel T, Soto-Tinoco E, *et al.* Protection of hypoglycemia-induced neuronal death by β -hydroxybutyrate involves the preservation of energy levels and decreased production of reactive oxygen species. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015;35(5):851-60.
- Kanda K, Takano K. Effect of tetanus toxin on the excitatory and the inhibitory post-synaptic potentials in the cat motoneurone. *J Physiol*. 1983;335:319-33.
- Kawahara Y, Ito K, Sun H, *et al.* Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature*. 2004;427(6977):801.
- Kawahara Y, Kwak S, Sun H, *et al.* Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA: an implication for excitotoxicity in ALS. *J Neurochem*. 2003;85(3):680-9.
- Ke T, Li R, Chen W. Inhibition of the NMDA receptor protects the rat sciatic nerve against ischemia/reperfusion injury. *Exp Ther Med*. 2016;11(5):1563-1572.
- Kim HJ, Kim JM, Park JH, *et al.* Pyruvate protects motor neurons expressing mutant superoxide dismutase 1 against copper toxicity. *Neuroreport*. 2005;16(6):585-9.
- Kim KS, Lee HJ, An J, *et al.* Transplantation of human adipose tissue-derived stem cells delays clinical onset and prolongs life span in ALS mouse model. *Cell Transplant*. 2014;23(12):1585-97.
- Kim TY, Yi JS, Chung SJ, *et al.* Pyruvate protects against kainate-induced epileptic brain damage in rats. *Exp Neurol*. 2007;208(1):159-67.
- Krakora D, Mulcrone P, Meyer M, *et al.* Synergistic effects of GDNF and VEGF on lifespan and disease progression in a familial ALS rat model. *Mol Ther*. 2013;21(8):1602-10.
- Kwak S, Kawahara Y. Deficient RNA editing of GluR2 and neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Med (Berl)*. 2005;83(2):110-20.
- Lacy DB, Tepp W, Cohen AC, *et al.* Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat Struct Biol*. 1998;5(10):898-902.
- Laird MD, Clerc P, Polster BM, *et al.* Augmentation of normal and glutamate-impaired neuronal respiratory capacity by exogenous alternative biofuels. *Transl Stroke Res*. 2013;4(6):643-51.
- Lalli G, Schiavo G. Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75NTR. *J Cell Biol*. 2002;156(2):233-9.
- Landreth GE. Growth Factors, en: *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular, and Medical Aspects.* (Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL, eds.) Séptima edición, 2006. pp. 471-484. Elsevier, UK.
- Larsen KE, Benn SC, Ay I, *et al.* A glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF):tetanus toxin fragment C protein conjugate improves delivery of GDNF to spinal cord motor neurons in mice. *Brain Res*. 2006;1120(1):1-12.
- Lattante S, Ciura S, Rouleau GA, *et al.* Defining the genetic connection linking amyotrophic lateral sclerosis (ALS) with frontotemporal dementia (FTD). *Trends Genet*. 2015;31(5):263-73.
- Li J, Chian RJ, Ay I, *et al.* Insect GDNF:TTC fusion protein improves delivery of GDNF to mouse CNS. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;390(3):947-51.
- Lim S, Chesser AS, Grima JC, *et al.* D- β -hydroxybutyrate is protective in mouse models of Huntington's disease. *PLoS One*. 2011;6(9):e24620.
- Liu R, Li B, Flanagan SW, *et al.* Increased mitochondrial antioxidative activity or decreased oxygen free radical propagation prevent mutant SOD1-mediated motor neuron cell death and increase amyotrophic lateral sclerosis-like transgenic mouse survival. *J Neurochem*. 2002;80(3):488-500.
- Lopalco A, Dalwadi G, Niu S, *et al.* Mechanism of Decarboxylation of Pyruvic Acid in the Presence of Hydrogen Peroxide. *J Pharm Sci*. 2016;105(2):705-13.
- Lopalco A, Stella VJ. Effect of Molecular Structure on the Relative Hydrogen Peroxide Scavenging Ability of Some α -Keto Carboxylic Acids. *J Pharm Sci*. 2016. pii: S0022-3549(16)41344-4.
- Maalouf M, Sullivan PG, Davis L, *et al.* Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience*. 2007;145(1):256-64.
- Magistretti P, Allaman I. Brain Energy Metabolism, en: *Neuroscience in the 21st Century.* (Donald WP ed.) 2013. pp. 1591-1620. Springer.
- Mahajan SS, Thai KH, Chen K, *et al.* Exposure of neurons to excitotoxic levels of glutamate induces cleavage of the RNA editing enzyme, adenosine deaminase acting on RNA 2, and loss of GLUR2 editing. *Neuroscience*. 2011;189:305-15.

- Mancuso R, Navarro X. Amyotrophic lateral sclerosis: Current perspectives from basic research to the clinic. *Prog Neurobiol*. 2015;133:1-26.
- Manjaly ZR, Scott KM, Abhinav K, *et al*. The sex ratio in amyotrophic lateral sclerosis: A population based study. *Amyotroph Lateral Scler*. 2010;11(5):439-42.
- Marlin MC, Li G. Biogenesis and function of the NGF/TrkA signaling endosome. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2015;314:239-57.
- Massieu L, Del Río P, Montiel T. Neurotoxicity of glutamate uptake inhibition in vivo: correlation with succinate dehydrogenase activity and prevention by energy substrates. *Neuroscience*. 2001;106(4):669-77.
- Massieu L, Gómez-Román N, Montiel T. In vivo potentiation of glutamate-mediated neuronal damage after chronic administration of the glycolysis inhibitor iodoacetate. *Exp Neurol*. 2000;165(2):257-67.
- Massieu L, Haces ML, Montiel T, *et al*. Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. *Neuroscience*. 2003;120(2):365-78.
- Matteoli M, Verderio C, Rossetto O, *et al*. Synaptic vesicle endocytosis mediates the entry of tetanus neurotoxin into hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(23):13310-5.
- Mattiazzi M, D'Aurelio M, Gajewski CD, *et al*. Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J Biol Chem*. 2002;277(33):29626-33.
- Maus M, Marin P, Israël M, *et al*. Pyruvate and lactate protect striatal neurons against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci*. 1999;11(9):3215-24.
- McHanwell S, Watson C. Localization of motoneurons on the spinal cord, en: *The spinal cord. A Christopher and Dana Reeve Foundation Text and Atlas* (Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G, eds.) 2009. pp. 94-114. Elsevier, UK.
- McKenna MC, Gruetter R, Sonnewald U, *et al*. Energy Metabolism of the Brain, en: *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular, and Medical Aspects*. (Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL, eds.) Séptima edición, 2006. pp. 531-557. Elsevier, UK.
- Meckler RL, Baron R, McLachlan EM. Selective uptake of C-fragment of tetanus toxin by sympathetic preganglionic nerve terminals. *Neuroscience*. 1990;36(3):823-9.
- Mejía-Toiber J, Montiel T, Massieu L. D-beta-hydroxybutyrate prevents glutamate-mediated lipoperoxidation and neuronal damage elicited during glycolysis inhibition in vivo. *Neurochem Res*. 2006;31(12):1399-408.
- Mendieta L, Bautista E, Sánchez A, *et al*. The C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin given by intramuscular injection causes neuroprotection and improves the motor behavior in rats treated with 6-hydroxydopamine. *Neurosci Res*. 2012;74(2):156-67.
- Mendieta L, Granado N, Aguilera J, *et al*. Fragment C Domain of Tetanus Toxin Mitigates Methamphetamine Neurotoxicity and Its Motor Consequences in Mice. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2016. pii: pyw021.
- Mendieta L, Venegas B, Moreno N, *et al*. The carboxyl-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin prevents dopaminergic degeneration and improves motor behavior in rats with striatal MPP(+)-lesions. *Neurosci Res*. 2009;65(1):98-106.
- Miana-Mena FJ, Muñoz MJ, Roux S, *et al*. A non-viral vector for targeting gene therapy to motoneurons in the CNS. *Neurodegener Dis*. 2004;1(2-3):101-8.
- Miana-Mena FJ, Roux S, Benichou JC, *et al*. Neuronal activity-dependent membrane traffic at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(5):3234-9.
- Miao Y, Qiu Y, Lin Y, *et al*. Protection by pyruvate against glutamate neurotoxicity is mediated by astrocytes through a glutathione-dependent mechanism. *Mol Biol Rep*. 2011;38(5):3235-42.
- Michael GJ, Kaya E, Averill S, *et al*. TrkA immunoreactive neurones in the rat spinal cord. *J Comp Neurol*. 1997;385(3):441-55.
- Miquel E, Cassina A, Martínez-Palma L, *et al*. Neuroprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2014;70:204-13.
- Moreno-Igoa M, Calvo AC, Penas C, *et al*. Fragment C of tetanus toxin, more than a carrier. Novel perspectives in non-viral ALS gene therapy. *J Mol Med (Berl)*. 2010;88(3):297-308.
- Niciu MJ, Kelmendi B, Sanacora G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012;100(4):656-64.

- Noh HS, Hah YS, Nilufar R, *et al.* Acetoacetate protects neuronal cells from oxidative glutamate toxicity. *J Neurosci Res.* 2006;83(4):702-9.
- Ochs G, Penn RD, York M, *et al.* A phase I/II trial of recombinant methionyl human brain derived neurotrophic factor administered by intrathecal infusion to patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2000;1(3):201-6.
- Olivares I, San Esteban E, Alter M. Mexican "Resistance" to Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Arch Neurol.* 1972;27(5):397-402.
- Oppenheim RW The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death. *Trends Neurosci.* 1989;12(7):252-5.
- Oppenheim RW. Neurotrophic survival molecules for motoneurons: an embarrassment of riches. *Neuron.* 1996;17(2):195-7.
- Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;460(1):72-81.
- Ovsepian SV, Bodeker M, O'Leary VB, *et al.* Internalization and retrograde axonal trafficking of tetanus toxin in motor neurons and trans-synaptic propagation at central synapses exceed those of its C-terminal-binding fragments. *Brain Struct Funct.* 2015;220(3):1825-38.
- Palafox-Sánchez V, Mendieta L, Ramírez-García G, *et al.* Effect of the C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin on dyskinesia caused by levodopa in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2016;145:33-44.
- Park JH, Hong YH, Kim HJ, *et al.* Pyruvate slows disease progression in a G93A SOD1 mutant transgenic mouse model. *Neurosci Lett.* 2007;413(3):265-9.
- Parone PA, Da Cruz S, Han JS, *et al.* Enhancing mitochondrial calcium buffering capacity reduces aggregation of misfolded SOD1 and motor neuron cell death without extending survival in mouse models of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci.* 2013;33(11):4657-71.
- Paschen W, Hedreen JC, Ross CA. RNA editing of the glutamate receptor subunits GluR2 and GluR6 in human brain tissue. *J Neurochem.* 1994;63(5):1596-602.
- Pellerin L, Magistretti PJ. Sweet sixteen for ANLS. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32(7):1152-66.
- Pellizzari R, Rossetto O, Schiavo G, *et al.* Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1999;354(1381):259-68.
- Peña F, Tapia R. Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis and electroencephalographic study. *J Neurochem.* 1999;72(5):2006-14.
- Peña F, Tapia R. Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience.* 2000;101(3):547-61.
- Perreault MC, Bernier AP, Renaud JS, *et al.* C fragment of tetanus toxin hybrid proteins evaluated for muscle-specific transsynaptic mapping of spinal motor circuitry in the newborn mouse. *Neuroscience.* 2006;141(2):803-16.
- Perry TL, Krieger C, Hansen S, *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis: amino acid levels in plasma and cerebrospinal fluid. *Ann Neurol.* 1990;28(1):12-7.
- Pierre K, Chatton JY, Parent A, *et al.* Linking supply to demand: the neuronal monocarboxylate transporter MCT2 and the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor GluR2/3 subunit are associated in a common trafficking process. *Eur J Neurosci.* 2009;29(10):1951-63.
- Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(1):24-32.
- Qiao L1, Vizzard MA. Up-regulation of tyrosine kinase (Trka, Trkb) receptor expression and phosphorylation in lumbosacral dorsal root ganglia after chronic spinal cord (T8-T10) injury. *J Comp Neurol.* 2002;449(3):217-30.
- Radenovic L, Selakovic V, Olivan S, *et al.* Neuroprotective efficiency of tetanus toxin C fragment in model of global cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *Brain Res Bull.* 2014;101:37-44.
- Rahman M, Muhammad S, Khan MA, *et al.* The β -hydroxybutyrate receptor HCA2 activates a neuroprotective subset of macrophages. *Nat Commun.* 2014;5:3944.
- Ramírez-Jarquín UN, Tapia R. Neuropathological characterization of spinal motor neuron degeneration processes induced by acute and chronic excitotoxic stimulus in vivo. *Neuroscience.* 2016;331:78-90.
- Ravits JM, La Spada AR. ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: deconstructing motor neuron degeneration. *Neurology.* 2009;73(10):805-11.

- Revett TJ, Baker GB, Jhamandas J, *et al.* Glutamate system, amyloid β peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. *J Psychiatry Neurosci.* 2013;38(1):6-23.
- Rossetto O, Seveso M, Caccin P, *et al.* Tetanus and botulinum neurotoxins: turning bad guys into good by research. *Toxicon.* 2001;39(1):27-41.
- Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, *et al.* Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1990;28(1):18-25.
- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, *et al.* Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1995;38(1):73-84.
- Roux S, Colasante C, Saint Clément C, *et al.* Internalization of a GFP-tetanus toxin C-terminal fragment fusion protein at mature mouse neuromuscular junctions. *Mol Cell Neurosci.* 2005;30(4):572-82.
- Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med.* 2001;344(22):1688-700.
- Ryberg H, Askmark H, Persson LI. A double-blind randomized clinical trial in amyotrophic lateral sclerosis using lamotrigine: effects on CSF glutamate, aspartate, branched-chain amino acid levels and clinical parameters. *Acta Neurol Scand.* 2003;108(1):1-8.
- Ryu JK, Kim SU, McLarnon JG. Neuroprotective effects of pyruvate in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Exp Neurol.* 2003;183(2):700-4.
- Sánchez-Carbente MR, Massieu L. Transient inhibition of glutamate uptake in vivo induces neurodegeneration when energy metabolism is impaired. *J Neurochem.* 1999;72(1):129-38.
- Santa-Cruz LD, Guerrero-Castillo S, Uribe-Carvajal S, *et al.* Mitochondrial Dysfunction during the Early Stages of Excitotoxic Spinal Motor Neuron Degeneration in Vivo. *ACS Chem Neurosci.* 2016.
- Santa-Cruz LD, Ramírez-Jarquín UN, Tapia R. Role of mitochondrial dysfunction in motor neuron degeneration in ALS, en: *Amyotrophic Lateral Sclerosis.* (Maurer MH, ed.) 2012. InTech. doi:10.5772/31290
- Santa-Cruz LD, Tapia R. Role of energy metabolic deficits and oxidative stress in excitotoxic spinal motor neuron degeneration in vivo. *ASN Neuro.* 2014;6(2).
- Sasaki S, Iwata M. Mitochondrial alterations in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007;66(1):10-6.
- Sasaki S, Komori T, Iwata M. Excitatory amino acid transporter 1 and 2 immunoreactivity in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2000;100(2):138-44.
- Sato K, Morimoto K, Okamoto M. Anticonvulsant action of a non-competitive antagonist of NMDA receptors (MK-801) in the kindling model of epilepsy. *Brain Res.* 1988;463(1):12-20.
- Satpute R, Lomash V, Kaushal M, *et al.* Neuroprotective effects of α -ketoglutarate and ethyl pyruvate against motor dysfunction and oxidative changes caused by repeated 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure in mice. *Hum Exp Toxicol.* 2013;32(7):747-58.
- Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, *et al.* Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature.* 1992;359(6398):832-5.
- Schiavo G, Rossetto O, Benfenati F, *et al.* Tetanus and botulinum neurotoxins are zinc proteases specific for components of the neuroexocytosis apparatus. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;710:65-75.
- Shaw PJ, Forrest V, Ince PG, *et al.* CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration.* 1995;4(2):209-16.
- Shehadeh J, Fernandes HB, Zeron Mullins MM, *et al.* Striatal neuronal apoptosis is preferentially enhanced by NMDA receptor activation in YAC transgenic mouse model of Huntington disease. *Neurobiol Dis.* 2006;21(2):392-403.
- Shimazu T, Hirschey MD, Newman J, *et al.* Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science.* 2013;339(6116):211-4.
- Sinha K, Box M, Lalli G, *et al.* Analysis of mutants of tetanus toxin Hc fragment: ganglioside binding, cell binding and retrograde axonal transport properties. *Mol Microbiol.* 2000;37(5):1041-51.
- Sorenson EJ, Windbank AJ, Mandrekar JN, *et al.* Subcutaneous IGF-1 is not beneficial in 2-year ALS trial. *Neurology.* 2008;71(22):1770-5.
- Spreux-Varoquaux O, Bensimon G, Lacomblez L, *et al.* Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. *J Neurol Sci.* 2002;193(2):73-8.
- Sun H, Kawahara Y, Ito K, *et al.* Expression profile of AMPA receptor subunit mRNA in single adult rat brain and spinal cord neurons in situ. *Neurosci Res.* 2005;52(3):228-34.

- Suzuki M, McHugh J, Tork C, *et al.* Direct muscle delivery of GDNF with human mesenchymal stem cells improves motor neuron survival and function in a rat model of familial ALS. *Mol Ther.* 2008;16(12):2002-10.
- Talantova M, Sanz-Blasco S, Zhang X, *et al.* A β induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(27):E2518-27.
- The BDNF Study Group. A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS: The BDNF Study Group (Phase III). *Neurology.* 1999;52(7):1427-33.
- Thorne RG, Frey WH. Delivery of neurotrophic factors to the central nervous system: pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet.* 2001;40(12):907-46.
- Tovar-Y-Romo LB, Santa-Cruz LD, Zepeda A, Tapia R. Chronic elevation of extracellular glutamate due to transport blockade is innocuous for spinal motoneurons in vivo. *Neurochem Int.* 2009;54(3-4):186-91.
- Tovar-y-Romo LB, Tapia R. Delayed administration of VEGF rescues spinal motor neurons from death with a short effective time frame in excitotoxic experimental models in vivo. *ASN Neuro.* 2012;4(2). pii: e00081.
- Tovar-y-Romo LB, Tapia R. VEGF protects spinal motor neurons against chronic excitotoxic degeneration in vivo by activation of PI3-K pathway and inhibition of p38MAPK. *J Neurochem.* 2010;115(5):1090-101.
- Tovar-Y-Romo LB, Zepeda A, Tapia R. Vascular endothelial growth factor prevents paralysis and motoneuron death in a rat model of excitotoxic spinal cord neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007;66(10):913-22.
- Turton K, Chaddock JA, Acharya KR. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trends Biochem Sci.* 2002;27(11):552-8.
- Umland TC, Wingert LM, Swaminathan S, *et al.* Structure of the receptor binding fragment HC of tetanus neurotoxin. *Nat Struct Biol.* 1997;4(10):788-92.
- Vera G, Tapia R. Activation of group III metabotropic glutamate receptors by endogenous glutamate protects against glutamate-mediated excitotoxicity in the hippocampus in vivo. *J Neurosci Res.* 2012;90(5):1055-66.
- Vielhaber S, Kunz D, Winkler K, *et al.* Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 2000;123 (Pt 7):1339-48.
- Vielhaber S, Winkler K, Kirches E, *et al.* Visualization of defective mitochondrial function in skeletal muscle fibers of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 1999;169(1-2):133-9.
- Virgo L, Samarasinghe S, de Belleruche J. Analysis of AMPA receptor subunit mRNA expression in control and ALS spinal cord. *Neuroreport.* 1996;7(15-17):2507-11.
- Wang X, Hu X, Yang Y, *et al.* Systemic pyruvate administration markedly reduces neuronal death and cognitive impairment in a rat model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 2015;271:145-54.
- Wang X, Perez E, Liu R, *et al.* Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Brain Res.* 2007;1132(1):1-9.
- Ward MW, Rego AC, Frenguelli BG, *et al.* Mitochondrial membrane potential and glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci.* 2000;20(19):7208-19.
- Watson C, Kayalioglu G. The organization of the spinal cord, en *The spinal cord. A Christopher and Dana Reeve Foundation Text and Atlas* (Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G, eds.) pp. 1-16. 2009. Elsevier, UK.
- Wiedemann FR, Winkler K, Kuznetsov AV, *et al.* Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 1998;156(1):65-72.
- Williams TL, Day NC, Ince PG, *et al.* Calcium-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors: a molecular determinant of selective vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1997;42(2):200-7.
- Williamson LC, Fitzgerald SC, Neale EA. Differential effects of tetanus toxin on inhibitory and excitatory neurotransmitter release from mammalian spinal cord cells in culture. *J Neurochem.* 1992;59(6):2148-57.
- Yamamoto M, Sobue G, Yamamoto K, *et al.* Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues. *Neurochem Res.* 1996;21(8):929-38.
- Yang W. Nucleases: diversity of structure, function and mechanism. *Q Rev Biophys.* 2011;44(1):1-93.

- Yin JX, Maalouf M, Han P, *et al.* Ketones block amyloid entry and improve cognition in an Alzheimer's model. *Neurobiol Aging*. 2016;39:25-37.
- Zahavi EE, Ionescu A, Gluska S, *et al.* A compartmentalized microfluidic neuromuscular co-culture system reveals spatial aspects of GDNF functions. *J Cell Sci*. 2015;128(6):1241-52.
- Zeevalk GD, Manzano L, Sonsalla PK, *et al.* Characterization of intracellular elevation of glutathione (GSH) with glutathione monoethyl ester and GSH in brain and neuronal cultures: relevance to Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2007;203(2):512-20.
- Zeron MM, Chen N, Moshaver A, *et al.* Mutant huntingtin enhances excitotoxic cell death. *Mol Cell Neurosci*. 2001;17(1):41-53.
- Zhao W, Varghese M, Vempati P, *et al.* Caprylic triglyceride as a novel therapeutic approach to effectively improve the performance and attenuate the symptoms due to the motor neuron loss in ALS disease. *PLoS One*. 2012;7(11):e49191.
- Zhao Z, Lange DJ, Voustantiok A, *et al.* A ketogenic diet as a potential novel therapeutic intervention in amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Neurosci*. 2006;7:29.
- Zheng J, Shen WH, Lu TJ, *et al.* Clathrin-dependent endocytosis is required for TrkB-dependent Akt-mediated neuronal protection and dendritic growth. *J Biol Chem*. 2008;283(19):13280-8.
- Zonta B, Minichiello L. Synaptic membrane rafts: traffic lights for local neurotrophin signaling? *Front Synaptic Neurosci*. 2013;5:9.