



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Instituto de Fisiología Celular

MECANISMOS DE NEURODEGENERACIÓN Y NEURORREGENERACIÓN DE  
LAS MOTONEURONAS ESPINALES

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

P R E S E N T A

Q. F. B. MARA GUADALUPE PRIOR GONZÁLEZ

TUTOR PRINCIPAL

RICARDO TAPIA IBARGÜENGOYTIA

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Luis B. Tovar y Romo

Luis Fernando Covarrubias Robles

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Ciudad de México, septiembre de 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **AGRADECIMIENTOS**

*Agradezco al posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas por darme la oportunidad de crecer en mi nivel profesional.*

*Agradezco al Dr. Ricardo Tapia, al Dr. Luis Covarrubias y al Dr. Luis Tovar, por todos sus consejos durante mi formación.*

*A todo el equipo de trabajo del laboratorio del Doctor Ricardo Tapia, quienes me recibieron con los brazos abiertos y me apoyaron desde el primer día de mi llegada.*

*Agradezco principalmente a mi amigo-hermano mayor Rafael Lazo, quien ha sido mi sensei durante todo este tiempo y con quien he compartido una gran cantidad de risas, por lo que lo considero uno de mis mejores amigos.*

*A mis grandes amigos-vecinos Lucy Cambreros, Cristian Gerónimo y en especial a Carmen Torres, quienes me han dado una gran cantidad de consejos y con quienes he compartido muchísimas grandes experiencias dentro y fuera del laboratorio, no saben cuánto los aprecio y espero que nuestra amistad continúe por muchos años.*

*Finalmente a mi gran soporte, gracias a quienes soy la persona que he llegado a ser hoy en día y quien me ha apoyado en todas mis decisiones sabiéndome guiar por un excelente camino, dejándome tropezar y estando ahí para ayudar a levantarme, mi familia. Gracias a Lucano Prior Herrera y María Guadalupe González Flores, mis papás, quienes con su ejemplo me han inspirado a ser una mejor persona cada día, y gracias a mi pequeño-gran hermano, mi cómplice y mejor amigo de toda la vida, quien aun en los peores momentos, sabe sacarme una sonrisa.*

# INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
ABREVIATURAS .....	3
INTRODUCCIÓN .....	4
MODELO EXPERIMENTAL DE ESTUDIO .....	5
DEACETILASA DE HISTONAS 4.....	6
ESTABILIZADORES DE MICROTÚBULOS .....	7
PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA .....	9
OBJETIVO GENERAL .....	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
ANIMALES .....	9
PREPARACIÓN DE MINIBOMBAS OSMÓTICAS Y TRATAMIENTOS.....	10
CIRUGÍA, IMPLANTACIÓN DE MINIBOMBAS OSMÓTICAS.....	10
EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN MOTORA .....	11
HISTOLOGÍA .....	12
WESTERN BLOT .....	12
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	13
RESULTADOS.....	13
LA INFUSIÓN CRÓNICA DE AMPA OCASIONA DÉFICIT MOTRIZ Y MUERTE NEURONAL, ELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA .....	13

EFFECTO DE BUTIRATO DE SODIO .....	16
EL NABUT NO ALTERA EL DESEMPEÑO EN LAS PRUEBAS MOTRICES, NI TIENE EFECTO NEUROPROTECTOR EN LA DEGENERACIÓN OCASIONADA POR LA INFUSIÓN ESPINAL DE AMPA 3 MM. ....	16
LA ADMINISTRACIÓN DE NABUT NO INFLUYE EN LOS NIVELES DE ACETILACIÓN DE LA HISTONA H3 EN LOS RESIDUOS DE LAS LISINAS K9 Y K14 EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO. ....	19
EFFECTO DE PACLITAXEL.....	20
EL ESTABILIZADOR DE MICROTÚBULOS PACLITAXEL MEJORA EL DESEMPEÑO MOTRIZ, PERO NO TIENE UN EFECTO NEUROPROTECTOR ANTE LA INFUSIÓN MEDULAR DE AMPA.....	20
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	26
EFFECTO DEL BUTIRATO DE SODIO .....	26
EFFECTO DEL PACLITAXEL.....	27
CONCLUSIÓN GENERAL.....	28
REFERENCIAS .....	30

## RESUMEN

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS por sus siglas en inglés) es una enfermedad neurodegenerativa de inicio tardío, selectiva de las motoneuronas (MN) de la corteza cerebral y la médula espinal. Algunos de los mecanismos implicados en la muerte de las MN son: la excitotoxicidad mediado por la sobre-activación de los receptores de glutamato, por un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a niveles que las células no pueden regular; y el déficit en el transporte axonal por la desorganización de los neurofilamentos y el desequilibrio en el estado dinámico de los microtúbulos (volviéndolo hiperdinámico). Aunque para el estudio de esta patología hay diversos modelos genéticos in vivo, estos solo representan un bajo porcentaje de los casos, es por ello que nuestro laboratorio ha diseñado un modelo in vivo basado en la producción de muerte por excitotoxicidad de las MN espinales mediante la infusión crónica del agonista de los receptores de glutamato, AMPA.

A pesar de numerosos estudios, aun no existe un tratamiento óptimo que frene la progresión de la enfermedad y que revierta los síntomas. Es por ello que el trabajo de esta tesis se centra en la evaluación de dos posibles tratamientos basados en la regeneración y la formación de nuevas conexiones nerviosas con los músculos, con el fin de revertir la parálisis ocasionada por la muerte de las MN.

La HDAC4 pertenece a la familia IIa de deacetilasas de histonas. Se encuentra principalmente en los miocitos del músculo esquelético en la región postsináptica de las conexiones nerviosas (placas neuromusculares, NMJ), dentro de los núcleos; y está involucrada en los procesos de diferenciación muscular. Durante los procesos degenerativos tiende a separarse de las NMJ y a acumularse en los núcleos donde recientes estudios demuestran su participación en los procesos de denervación mediante la intervención en la expresión de los genes de los receptores de acetilcolina.

Los microtúbulos son polímeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina que en los axones neuronales tienen funciones estructurales y de transporte, proporcionándole direccionalidad al formar arreglos lineales polarizados. En condiciones normales presentan un equilibrio entre el estado dinámico, en el cual se da la formación y el crecimiento de la red polimérica mediante el ensamble de los dímeros de tubulina, y el estado estable en el que se da la unión de numerosas proteínas asociadas y las modificaciones transcripcionales de acetilación y detirosinación de  $\alpha$ -tubulina. Durante los procesos degenerativos este equilibrio se ve afectado ocasionando el daño de los axones y sus conexiones nerviosas.

En el trabajo de esta tesis se evaluaron el posible efecto protector de un inhibidor de las deacetilasas (NaBut) y un estabilizador de microtúbulos (Paclitaxel). En nuestro modelo de excitotoxicidad por AMPA, a pesar de que ninguno posee actividad neuroprotectora, el inhibidor de la HDAC4, NaBut, no presenta ninguna actividad ante la progresión de la parálisis de los animales infundidos con AMPA; por otro lado la administración del estabilizador de microtúbulos, Paclitaxel, protegió

significativamente contra la progresión del déficit motor. Con estos datos no podemos aun concluir cual es el mecanismo de esta acción protectora.

## ABSTRACT

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is an adult-onset neurodegenerative disease by the selective loss of motor neurons (MN) of the cerebral cortex and the spinal cord. Some of the mechanisms that seems to be involved in the cellular death process are: glutamate-mediated excitotoxicity by the overactivation of the glutamate receptors, by an increase of intracellular level of calcium that cells can not buffered, and axonal transport deficits by the neurofilament disorganization and alterations that affect the microtubule dynamic equilibrium (reducing microtubule stability). Although the use of the in vivo transgenic mouse model to study ALS, it represents a low percentage of the cases, that is why our laboratory develop an in vivo excitotoxic MN death model in rats induced by chronic spinal infusion of glutamate agonist AMPA.

Besides several number of studies, there is still no optimal treatment for ALS that stops the disease and reverses the paralysis. That is why this thesis work is based in the ability evaluation of two treatments to promote regeneration and new neuromuscular junctions development, to revert the paralysis caused for the MN death.

HDAC4 belongs to the IIa histone deacetylase family. It take place into the nucleus myocytes of skeletal muscles at the postsynaptic region of NMJ, and its activity is involved in muscle differentiation process. During the neurodegenerative process it tends to dissociates from the NMJ leading to a nuclear accumulation, recent studies show that HDAC4 is implicated in the denervation processes through the intervention in the expression of acetylcholine receptor genes.

Microtubules are  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin polymers that in neuronal axons giving structural support and axonal transport functions, providing direccionalidad through its linearized polarized structures arrangements. At normal conditions microtubules exist in two balanced states, dynamic state in which the polymeric net grows by the tubulin dimers assembly and stable state, in wich associated proteins interact with microtubules and  $\alpha$ -tubulin is post-translationally modified (for example, acetylation and detyrosination, occur). At degenerative process this balance is affected and the axons and nervous connections are lost.

In this thesis work, the evaluation of the possible protective effect of a histone deacetylase inhibitor (NaBut) and a microtubule stabilizer (Paclitaxel) was made. In our AMPA-induced excitotoxic model, although neither of both had neuroprotective activity, HDAC4 inhibitor NaBut, did not present any activity at the paralysis progression by AMPA infusion; nevertheless, microtubule stabilizer Paclitaxel significantly improved the performance of AMPA-infused animals. However we still can not conclude the mechanisms of this protective activity.

## ABREVIATURAS

AMPA: (R, S) ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

Contra: contralateral, lado correspondiente al sitio donde se implantó la cánula en la médula espinal

Hr: hora

HDAC4: Deacetilasa de Histonas 4

iHDAC: inhibidor de Deacetilasas de Histonas

IP: intraperitoneal

Ipsi: ipsilateral, lado correspondiente al sitio donde se implantó la cánula en la médula espinal

MN: motoneuronas

NaBut: Butirato de Sodio

NMJ: Neuromuscular junctions (placas neuromusculares)

PBS: Solución salina, buffer de fosfatos

PFA: Paraformaldehido



## INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que el ambiente neuronal así como propiedades específicas de las células (tomando en cuenta los distintos subtipos celulares) son factores indispensables para la formación y el mantenimiento de todo circuito nervioso. La neurodegeneración es la pérdida progresiva de las estructuras y la función de las neuronas; algunas características importantes observadas en los procesos neurodegenerativos son deficiencias en la función sináptica en etapas tempranas. Los procesos neurodegenerativos pueden causar una gran variedad de síntomas dependiendo del tipo de neurona afectada y así desencadenar diferentes enfermedades como Alzheimer, Parkinson y Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS por sus siglas en inglés), entre otras (Frey, D. et. al., 2000; Dubey et. al., 2015).

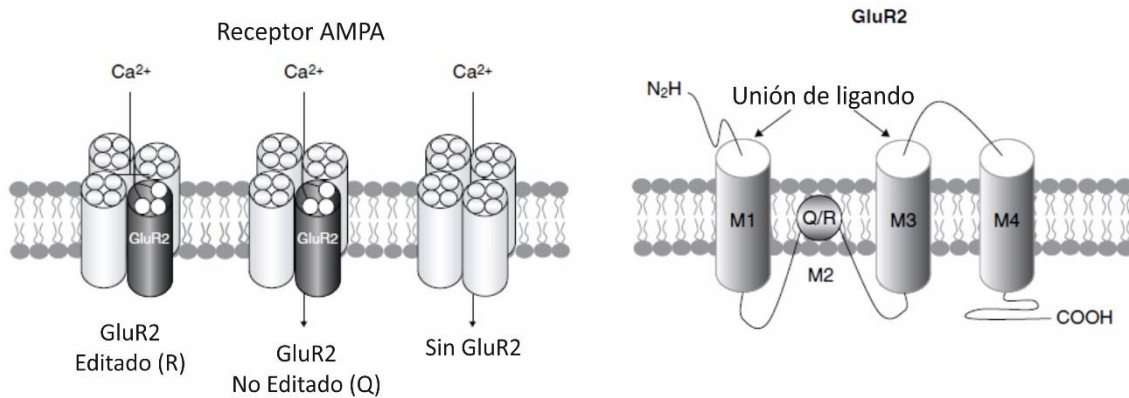
La ALS es una enfermedad neurodegenerativa de inicio tardío caracterizada por la pérdida progresiva y selectiva de las motoneuronas (MN) del tronco encefálico y la médula espinal. Esta patología puede ser clasificada en bulbar o espinal basado en el tipo de MN inicialmente afectado: las neuronas del tronco encefálico o las neuronas de la médula espinal situadas en las astas ventrales; sin embargo sin importar el origen, en las etapas finales de la enfermedad se denervan los músculos respiratorios lo que provoca paro respiratorio y culmina con la muerte de los pacientes (Cleveland & Rothstein, 2001; Wood & Langford, 2014). Esta enfermedad puede aparecer de forma esporádica (SALS) o de origen desconocido y que abarca aproximadamente el 90% de los casos, o puede ser de tipo familiar (FALS) asociada a mutaciones genéticas de las cuales se han descrito más de cien (Chen et. al., 2013).

En los últimos años se han identificado una gran cantidad de mecanismos involucrados en la muerte de las MN, de los cuáles yo me centraré en dos ya que estos son en los que se apoya el estudio de esta tesis, y los cuales están basados en los datos que se revisan en detalle en las siguientes revisiones, varias de las cuales han sido publicadas por nuestro laboratorio: Santa-Cruz et. al., 2012; Corona, & Tapia, 2007; Takuma et. al., 1999; Ramirez-Jarquín et. al., 2014; Tovar-y-Romo et.al., 2009; Fanara et. al., 2007; Hirano et. al., 1984:

- Excitotoxicidad mediada por la sobre-activación de los receptores de glutamato. Este mecanismo se ha propuesto, entre otros datos, con base en los hallazgos en pacientes de ALS de una alta concentración de glutamato en el líquido cefalorraquídeo, la reducción de los transportadores de glutamato tipo 1 (EAAT2 en humanos) y un error en la edición de la subunidad 2 del receptor de glutamato tipo AMPA (GluR2) en la médula espinal, lo cual resulta en que el receptor sea permeable a  $Ca^{2+}$  (Figura 1). Estos datos han permitido concluir que la sobre excitación de estos

receptores aumenta los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a concentraciones que las células ya no pueden regular y por consiguiente se desencadena la activación de enzimas líticas, falla mitocondrial que genera deficiencias en el metabolismo energético y estrés oxidativo.

- Déficits en el transporte axonal. Mecanismo propuesto por el hallazgo en pacientes de ALS, de la formación de agregados proteicos, mal plegamiento de proteínas, desorganización de los neurofilamentos y desregulación del estado dinámico de los microtúbulos (estado hiperdinámico) lo que provoca disfunción en el transporte axonal y degeneración.



**Fig. 1. Estructura del receptor de glutamato tipo AMPA.** Esquema representativo de los dominios transmembranales de la subunidad 2 del receptor de glutamato tipo AMPA (GluR2), que muestra el aumento en la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  debido a error en la edición de la subunidad. (Adaptada de Corona & Tapia, 2007)

### Modelo experimental de estudio

En el laboratorio nos hemos enfocado a modelos experimentales in vivo basados en la producción de muerte de las MN espinales por excitotoxicidad, mediante la infusión del agonista de los receptores de glutamato, AMPA, en la médula espinal por microdiálisis (modelo agudo) o por minibombas osmóticas (modelo crónico), como alternativa a los modelos transgénicos, para evaluar la enfermedad y posibles estrategias terapéuticas. En ambos modelos se produce una parálisis de las extremidades inferiores y una pérdida notable de las MN sanas en el sitio de infusión, aunque difieren en los cambios neuropatológicos: en el modelo agudo estos cambios son la pérdida celular por necrosis, mientras que en el modelo crónico se comienza con un proceso temprano apoptótico seguido posteriormente por necrosis (Ramirez-Jarquín & Tapia, 2016). Para este trabajo se ha escogido el modelo crónico, ya que provoca un deterioro progresivo de las MN a lo largo de varios días, que se asemeja más a las características de neurodegeneración en ALS y que permite además la evaluación del potencial efecto neuroprotector o

regenerativo de diversos compuestos (Corona & Tapia, 2004; Corona & Tapia, 2007; Netzahualcoyotzi & Tapia, 2015; Tovar-y-Romo & Santa-Cruz, 2009; Tovar-y-Romo & Tapia, 2012; Tovar-y-Romo et. al., 2007).

A pesar de muchos trabajos en que se ha demostrado protección por varios compuestos, ninguno ha resultado significativamente útil para aliviar o retardar los síntomas de la enfermedad y prolongar el tiempo de vida de los pacientes (Tovar-y-Romo et. al., 2014; Wood & Langford, 2014). Se ha visto que las neuronas poseen mecanismos intrínsecos que conducen a procesos de regeneración y a la formación de nuevas conexiones nerviosas con los músculos (placas neuromusculares, NMJ) como una forma de compensar la denervación (Bruneteau et. al., 2013; Chen et. al., 2016; Dupuis & Loeffler, 2009), por lo que uno de los posibles mecanismos para tratar estas enfermedades es rescatar el funcionamiento de las neuronas mediante la regeneración y la estimulación de la ramificación de los axones colaterales. Entre estos mecanismos se ha encontrado que las deacetilasas de histonas tienen un importante papel, como se describe a continuación.

#### **Deacetilasa de histonas 4**

Las neuronas del sistema nervioso central de mamíferos, incluidos los humanos, presenta una baja capacidad para la regeneración, a comparación de otras especies, debido a diversas limitaciones en la expresión de modificaciones transcripcionales. Por otro lado, se han encontrado casos dentro de la ALS los cuales presentan una progresión lenta de la enfermedad sobrepasando la esperanza de vida para la misma, sobreviviendo por más de 10 años después de ser diagnosticados. En estos trabajos se demostró que estos pacientes presentan mayor porcentaje de reinnervación en sus músculos, a diferencia de los pacientes de progresión rápida. Estos intentos de reinnervación, así como la mayor capacidad de resistencia de algunas neuronas ante los procesos degenerativos a diferencia de otras presentes en la misma región espinal, sugieren que lo que diferencia una MN de otra reside en factores intrínsecos de las mismas, tales como diferentes mecanismos epigenéticos y la expresión de genes (Bruneteau et. al., 2013; Chen et. al., 2016). En estos trabajos se demuestra que en el proceso de esta reinnervación participan las deacetilasas de histonas (HDAC). Williams et. al., (2009), encontraron un aumento en la expresión del miRNA 206 específico para los músculos esqueléticos en un modelo genético de ALS con ratones G93A-SOD1, y que esta sobreexpresión estaba involucrada en la reinnervación, ya que el miRNA 206 es indispensable para la formación y el mantenimiento de las NMJ, y es un inhibidor de la traducción de la deacetilasas de histonas 4 (HDAC 4).

La HDAC4 pertenece a la familia de HDAC IIa y es una enzima cuya actividad es dependiente de  $Zn^{2+}$ , siendo sus dianas la histona 3 en los residuos de lisinas 9, 14, 18 y 23 y en la histona 4 en los residuos de lisinas 5, 8, 12 y 16 (Lazo-Gómez et. al., 2013; Wang et. al., 2014). En los miocitos del músculo esquelético se localiza en la región postsináptica de la NMJ. En condiciones normales se encuentra en el núcleo inhibiendo la expresión de MEF2 (factor de transcripción que participa en la

diferenciación de las células del músculo esquelético) y durante los procesos degenerativos se separa de la NMJ y se acumula en el núcleo. Su acción durante éste proceso es mediante la regulación de la cascada transcripcional de Dach2 (co-represor transcripcional Dachschund 2) – miogenina en el músculo, donde la enzima inhibe la transcripción de Dach2 con lo cual se induce la expresión de miogenina, factor transcripcional regulador de la activación de los genes sinápticos nAChR $\epsilon$ , nAChR $\delta$  y MUSK, genes que regulan la expresión de los receptores de acetilcolina, (nAChR). Debido a esto, se pierde la regulación de la formación de nAChR, y por consiguiente se dañan las estructuras existentes y se dificulta la formación de nuevas sinapsis (Cohen et. al., 2007). Por otro lado, la HDAC4 inhibe la expresión de FGFBP1 (proteína de unión a los factores de crecimiento de fibroblastos 1) que ayuda a la maduración de la NMJ y se encarga de interactuar y potenciar los efectos de los FGFs (factores de crecimiento de fibroblastos) 7, 10 y 22, reguladores que promueven la diferenciación presináptica, durante la re-inervación (Williams et. al., 2009).

Con estos antecedentes, en nuestro trabajo usamos el butirato de sodio (NaBut) que es un derivado los ácidos grasos con actividad inhibitoria de las HDAC de las familias I y II (inhibidor global), entre otras, y que tiene la capacidad de atravesar la barrera hemato-encefálica (Egorin M. et. al., 1999); su capacidad de poder ser administrado de diferentes formas, lo hace conveniente para ser usado en este trabajo ya que no existen inhibidores específicos de HDAC4.

## **Estabilizadores de microtúbulos**

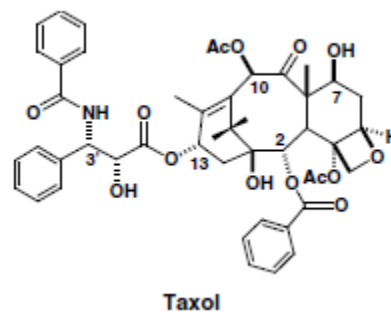
Los microtúbulos, en los axones neuronales, tienen funciones regulatorias, estructurales y además, forman arreglos lineales polarizados (extremo menos y extremo más) que les proporciona direccionalidad, permitiendo el transporte axonal. Los microtúbulos son en realidad una red polimérica de subunidades de dímeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina que en condiciones normales presentan dos estados. Un estado dinámico, durante el cual se da la formación y crecimiento de la red polimérica; en este proceso  $\beta$ -tubulina se encuentra unido a GTP cuando está en estado libre y una vez que éste se incorpora al polímetro, el GTP se hidroliza a GDP, de tal forma que el extremo menos del polímetro de microtúbulos es rico en subunidades de tubulina con GDP a diferencia del extremo más. Y un estado estable, en el cual a la red polimérica se da la unión de un gran número de proteínas asociadas y estabilizadoras, además de ser el estado donde ocurren diferentes modificaciones postraduccionales en la subunidad de  $\alpha$ -tubulina, uno de ellos es la acetilación en el residuo de lisina 40, y otro es la detirosinación en el residuo C-terminal. Este estado prevalece cuando ya se han formado las conexiones nerviosas con los músculos por medio de las NMJ (Bass & Ahmad, 2013; Dubey et. al., 2015).

Uno de los mecanismos involucrados en los procesos degenerativos durante la muerte neuronal es el déficit en el transporte axonal debido, entre otras cosas, a la desorganización de los neurofilamentos y a la desregulación del equilibrio “dinámico-estable” de los microtúbulos. Se sabe que, dependiendo del proceso y la

enfermedad degenerativa, es el estado de la dinámica de los microtúbulos, y en el caso de la ALS, de acuerdo a lo observado en modelos genéticos de ratones G93A-SOD1, se encuentran en un estado hiperdinámico (Dubey et. al., 2015; Fanara et. al., 2007). Emplear agentes estabilizadores de microtúbulos como terapia para el sistema nervioso en patologías que presentan este tipo de proceso degenerativo, podría prevenir la degradación de los axones durante la enfermedad e incluso inducir su reparación y regeneración (Baas y Ahmad, 2013; Ballatore et. al., 2012).

En los últimos años, se han descubierto un gran número de estabilizadores de microtúbulos, entre los que destaca el Taxol o Paclitaxel, como se le conoce comercialmente. El mecanismo mediante el cual actúa el Paclitaxel, es mediante su unión a la  $\beta$ -tubulina, probablemente en el sitio de unión a la proteína Tau, impidiendo la hidrólisis del GTP, y promoviendo la unión de más subunidades de tubulina, estabilizando así a la red polimérica al suprimir el desensamble de los dímeros de tubulina por probables cambios conformacionales. Debido a esto, el Paclitaxel interfiere en procesos celulares tales como la división celular (arrestando las células en mitosis) y la movilidad celular, es decir, estabiliza el crecimiento distrófico, lo que le confiere además actividad anticancerígena. Por otro lado el efecto del Paclitaxel incrementa los niveles de tubulina acetilada y detironisada al aumentar la estabilidad y permitir que se den estas modificaciones; además, interfiere en la unión entre algunas de las proteínas asociadas a los microtúbulos dependiendo del estado de estas uniones interprotéicas (Ballatore et. al., 2012; Baas y Ahmad, 2013; Orr et. al., 2003).

Por lo anterior el Paclitaxel puede tener diferentes efectos dependiendo de su concentración, por lo que puede disminuir el desensamble de los microtúbulos, impedirlo completamente o promoverlo. A altas concentraciones, se ha visto que el Paclitaxel hiper-estabiliza los microtúbulos bloqueando completamente su dinámica e impidiendo el crecimiento de las neuritas, además de provocar la acumulación y formación de manojos de microtúbulos interviniendo en el transporte axonal y la estructura de los mismos; mientras que a bajas concentraciones antagoniza el daño favoreciendo la polimerización en los extremos positivos de los microtúbulos (Sengottuvel et. al., 2011; Baas y Ahmad, 2013). En la figura 2 se muestra la estructura del Paclitaxel.



**Fig. 2. Estructura del estabilizador de microtúbulos Paclitaxel (Taxol).** (Orr, et. al., 2003)

## PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

Aun no existen en la actualidad tratamientos efectivos para prevenir o curar las enfermedades neurodegenerativas, incluida la ALS, ya que son de origen multicausal y no es posible la predicción de su aparición. En base a todo lo anterior, en el presente trabajo de tesis se decidió estudiar dos posibles tratamientos cuya actividad se basa en promover la regeneración y la estimulación de la ramificación de los axones colaterales de las MN sanas durante el proceso degenerativo contrarrestando la parálisis provocada por la muerte neuronal.

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar la posible actividad terapéutica del inhibidor de HDAC4 y el estabilizador de microtúbulos Paclitaxel, reflejado en una mejora conductual, en el modelo de degeneración crónica de las MN espinales por excitotoxicidad por AMPA.

### Objetivos específicos

- Conocer si la inhibición de la HDAC4 en el modelo de degeneración de las MN espinales con AMPA promueve la reinnervación y la regeneración de los axones.
- Conocer si el estabilizador de microtúbulos Paclitaxel permite la reinnervación y la regeneración de los axones en el modelo de degeneración de las MN espinales con AMPA.
- Evaluar si la reinnervación resultante por el inhibidor de la HDAC4 y el Paclitaxel se manifiesta en la recuperación, parcial o total de la función motora.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Para todos los experimentos se trabajó con ratas macho Wistar de 260 a 310g, a los cuáles se les mantuvo bajo ciclos controlados 12 horas de luz-obscuridad, así como comida y agua normal *ad libitum*. Todos los animales se manipularon de acuerdo al reglamento para la investigación en materia de salud (México) en conjunto con la aprobación del comité local de cuidados animales (RTI21-14).



## **Preparación de minibombas osmóticas y tratamientos**

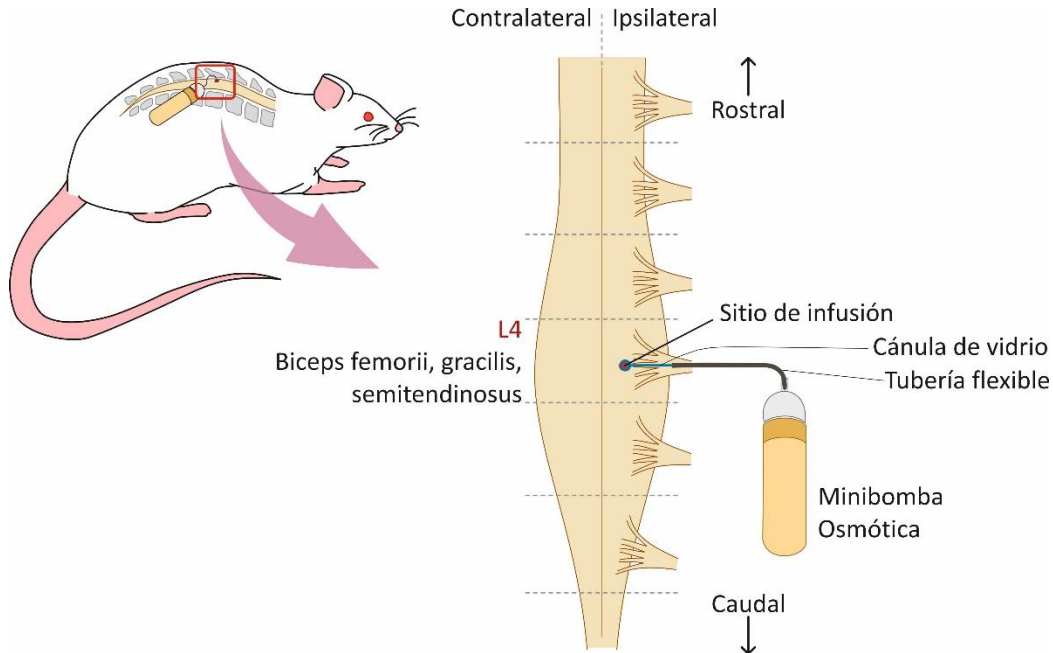
La administración de AMPA (Abcam) se realizó a través de minibombas osmóticas ALZET (modelo 2004, capacidad de  $\sim 234 \mu\text{L}$ , tasa de flujo  $0.23 \mu\text{L}/\text{Hr}$ ). Las minibombas fueron llenadas con diferentes soluciones dependiendo del caso, solución PBS 0.1M (controles), o AMPA disuelta en solución PBS 0.1 M en tres concentraciones diferentes, 7.5 mM, 3 mM y 1.5 mM. Las minibombas se llenaron 48 horas previo a las cirugías de implante y se mantuvieron en solución salina filtrada a  $37^\circ\text{C}$  hasta alcanzar un flujo constante.

Para estudiar la actividad de todas las drogas en el modelo de excitotoxicidad antes explicado se les administró por vía intraperitoneal (IP) preparados en fresco (diariamente), esta vía de administración se eligió debido a su fácil manejo y a que permite realizar administraciones repetidas. En los experimentos con el NaBut (Sigma Aldrich), el inhibidor se administró en una dosis de 500 mg/Kg de peso corporal disuelto en PBS 0.1 M durante 6 días después de implantar la minibomba osmótica; esta dosis fue seleccionada con base en estudios farmacocinéticos reportados, ya que cuando la dosis es mayor se produce un estrés metabólico (Gagliano et. al., 2014; Egorin et. al., 1999). En los experimentos con el estabilizador de microtúbulos Paclitaxel (Sigma Aldrich), se evaluaron en grupos aislados dos concentraciones diferentes, la primera de  $10 \mu\text{g}$  y la segunda de  $20 \mu\text{g}$  diarios, ambos en DMSO al 1% en PBS 0.1 M, administrando al primer grupo durante 6 días y el segundo grupo durante 9 días después de implantar la minibomba; esta dosis fue seleccionada en base al experimento realizado por el grupo de Hellal et. al., 2011.

## **Cirugía, implantación de minibombas osmóticas**

La implantación de las minibombas osmóticas se realizó como se describe en Tovar-y-Romo et. al., 2007. Las ratas se anestesian mediante la inhalación de una mezcla de isofluorano-carbógeno al 5% por 4 minutos y posteriormente se montan en el estereotáxico espinal donde progresivamente se disminuye la anestesia hasta mantenerla en un rango de 2.5 a 1.5% durante toda la cirugía. Posteriormente se afeita y desinfecta correctamente la zona, seguido de una incisión longitudinal a nivel de la región lumbar, se retira la fascia que rodean las vértebras lumbares en la región correspondiente a las costillas inferiores y a nivel de la región L4 se retiran los músculos y el proceso espinoso hasta dejar la lámina expuesta; del lado izquierdo de la lámina (lado contralateral (contra)) se coloca un tornillo de acero inoxidable ( $\sim 2\text{mm}$  de diámetro y  $\sim 3\text{mm}$  de largo) a  $\sim 1\text{mm}$  de profundidad el cual funge como soporte para fijar el implante; entretanto del lado derecho de la lámina (lado ipsilateral (ipsi)) se realiza una laminectomía de  $\sim 2\text{mm}$  de largo hasta exponer la medula espinal y se retiran las meninges. Una cánula de vidrio de 2mm de longitud unida a una tubería flexible, se inserta de forma vertical dirigida a las astas ventrales en la médula a una profundidad de 1 mm y toda la lámina es recubierta por un fuerte adhesivo y acrílico dental cubriendo así mismo el tornillo (implante). Una vez seco el implante la tubería flexible es conectada a la minibomba osmótica

por medio del tubo dosificador, y la bomba es colocada y fijada subcutánea y dorsalmente en el animal, finalmente la incisión de la piel se cierra por medio de grapas quirúrgicas y de forma intraperitoneal se administra antibiótico mientras se monitorea que el animal despierte y se recupere de la anestesia. En la figura 3 se esquematiza el procedimiento de implantación de la minibomba osmótica utilizado.



**Fig. 3. Diagrama de la implantación de las minibombas osmóticas.** Se indica el sitio donde se implanta la cánula (región L4 de la médula espinal).

Las ratas se mantienen en el vivario por 7 días (grupos del iHDAC) y 10 días (grupos del estabilizador de microtúbulos) posteriores a la cirugía, y se evalúan en las pruebas motrices, seguido de la administración IP del tratamiento correspondiente preparado en fresco (el día de la administración) cada 24 horas según corresponda.

### Evaluación de la función motora

Se entrenó a las ratas en dos pruebas motrices 4 a 5 días previos a la cirugía. La prueba motriz, Rotarod (Columbus Instrument, USA), consiste en hacer caminar a las ratas sobre un rodillo con una aceleración de 2 rpm por segundo hasta alcanzar una velocidad de 10 rpm durante 120 segundos, durante el análisis se evaluaron 3 intentos independientes registrando el mayor tiempo de permanencia caminando en el rodillo. La prueba motriz basada en la medida de fuerza de las extremidades traseras se hizo por medio del PGE (Paw Grip Endurance equipment, TSE Systems USA), esta prueba consiste en que la medición de la fuerza precisa de las patas traseras de la rata colocándolas en una rejilla y posteriormente se jala gentilmente su cola provocando que el animal intente huir dando un salto, la fuerza que emplee para la retirada es registrado en el equipo en ponds y se evalúan 3 intentos



independientes registrando el de mayor magnitud, finalmente cada valor obtenido es normalizado al valor basal de cada animal (obtenido al día cero, previo a la cirugía). En ambas pruebas se mantuvo un extremo cuidado en evitar el estrés de los animales.

En los experimentos con el iHDAC se evaluaron ambas pruebas motrices durante 7 días cada 24 Hrs y después de la evaluación son administradas IP con el inhibidor. En los experimentos con el estabilizador de microtúbulos se evaluó la prueba motriz Rotarod después de la cirugía cada 24 Hrs por 7 y 10 días según el caso, seguido de la administración IP del estabilizador.

Después de este tiempo de evaluación y administración, los animales fueron sacrificados con el fin de la obtención de los tejidos médula espinal y los músculos Biceps femorii ipsi y contra. A los animales cuyos tejidos se utilizaron para la histoquímica, se les perfundió con solución salina y con paraformaldehído (PFA) previamente enfriadas; en el caso de los animales cuyos tejidos se utilizaron para los western blot, se sacrificaron por medio de decapitación seguido del procesamiento inmediato de los tejidos en frío.

## **Histología**

Para el conteo de motoneuronas sanas al final de los experimentos, se realizó un análisis histoquímico mediante una tinción de Violeta de Cresilo (tinción de Nissl). Las ratas utilizadas para las histoquímicas se perfunden con 250 mL de solución salina al 0.9% y 250 mL de PFA al 4% en PBS 0.1M previamente filtrados y fríos. Se extrae un fragmento de la médula espinal de ~5cm correspondiente al sitio de lesión (región L4) y se somete a fijación en PFA al 4% en frío de 24 a 48 Hrs., cumplido este tiempo se deshidrata la médula colocándola en una solución de sacarosa al 30% por 48 Hrs., al finalizar este tratamiento se realizan cortes simétricos transversales de 40 micras con ayuda del criostato. Se fijaron de 18 a 20 cortes correspondientes al sitio de lesión (sitio donde se insertó la cánula) en laminillas y se sometieron a la tinción de violeta de cresilo.

Se realizó el conteo de MN en las astas ventrales, registrando por separado los valores del lado ipsi y contra. Se consideró una MN sana si poseía un tamaño de >25 micras, citoplasma claro, con proyecciones de neuritas definidas y se podía distinguir el núcleo.

## **Western blot**

Se realizó la determinación de los niveles de histona 3 acetilada en los residuos de lisina K9 y K14 (H3 acetilada en K9 y K14) como forma indirecta para la evaluación de la actividad inhibitoria del NaBut, dado que éstos son unos de los dianas de la HDAC4. Para ello se obtuvieron ~100 µg de los músculos Biceps Femoral ipsi y contra después de decapitar a los animales tras su evaluación y administración, y se homogenizaron a 4°C en 400 µL de buffer RIPA (Tris 50mM ajustando con HCl

concentrado a pH 8, NaCl 150mM, NP-40 al 1%, Deoxicolato Sódico al 0.5%, SDS al 0.1% e inhibidor de proteasas COMPLETE-Roche al 4%), el homogenado se centrifugó a 12500 rpm por 15min a 4°C y el sobrenadante fue recolectado y desnaturalizado 1:1 con el Buffer de carga a 100°C por 5 minutos; la solución resultante se almacenó a -70°C. La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Lowry.

Para los análisis de Western Blot, se cargó lo equivalente a 40 µg de proteína en geles SDS-PAGE al 8% de acrilamida y transferidos a una membrana de PVDF, la detección de las proteínas fue con ayuda de los anticuerpos α-Tubulina (1:10000 abcam) y H3 acetilada K9 y K14 (1:500 Santa Cruz Biotechnology). La unión de los anticuerpos fue detectada utilizando el anticuerpo secundario anti rabbit-IgG-HRP (1:4000 y 1:10000 Cell Signaling, respectivamente) y el sustrato quimiluminescente Immobilon™ Western de Millipore. El análisis de las bandas se hizo en Image J.

## **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 6. Para las comparaciones de las pruebas motrices se realizó un análisis ANOVA de dos vías seguido de una prueba *post-hoc* de Bonferroni. Para las comparaciones del conteo de MN sanas se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de un análisis *post-hoc* de Bonferroni.

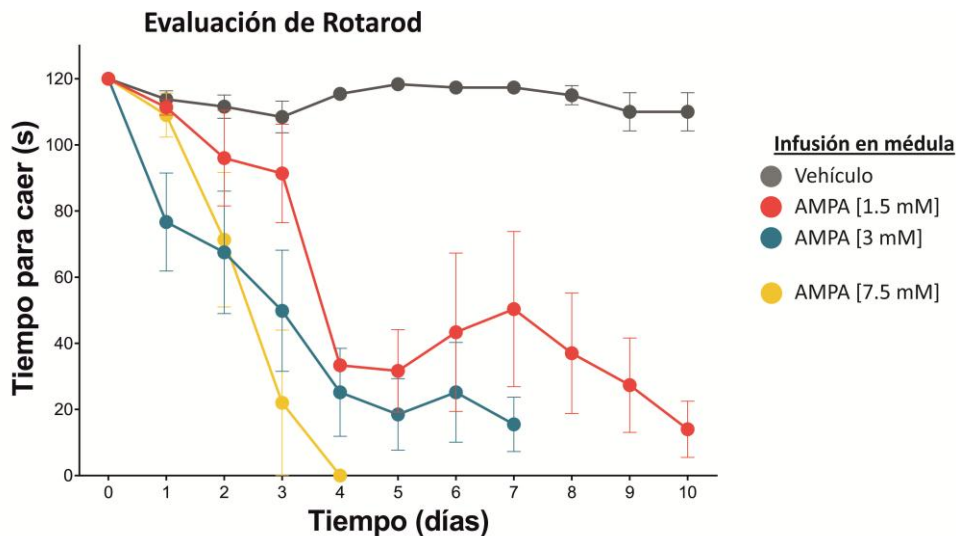
## **RESULTADOS**

### **La infusión crónica de AMPA ocasiona déficit motriz y muerte neuronal, elección de la concentración óptima**

Se realizaron experimentos iniciales con 3 concentraciones diferentes de AMPA con el fin escoger una concentración óptima que permitiera evaluar el proceso degenerativo mediante la evaluación de la capacidad motriz, en conjunto con la actividad de las drogas al ser administradas IP.

Las concentraciones de AMPA que se evaluaron fueron 7.5 mM, 3 mM y 1.5 mM a diferentes tiempos, comparándolos con el desempeño de un grupo control al cual se le infundió el vehículo PBS 0.1M. Este grupo en ningún momento presentó déficit motor o de algún otro tipo, mientras que los 3 grupos infundidos por AMPA presentaron, aunque a distintos días, pérdida progresiva de la capacidad motriz comenzando por espasmos y rigidez de los músculos de la pata ipsilateral (ipsi) correspondiente al lado donde se colocó el implante en la médula espinal, seguido de los mismos síntomas en los músculos de la pata del lado contralateral (contra), culminando con la completa parálisis de las extremidades traseras y esto se vio

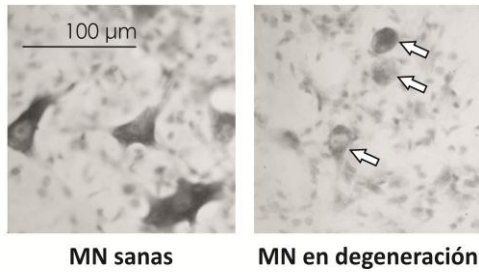
reflejado en la disminución progresiva de la permanencia de los animales en el Rotarod (Figura 4).



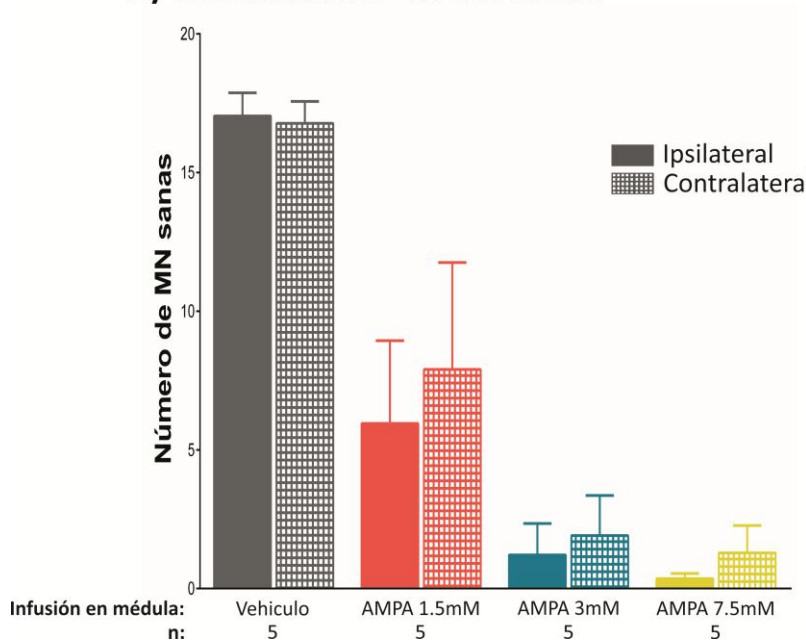
**Fig. 4 La infusión de crónica de AMPA ocasiona déficit motriz, elección de la concentración óptima. (A)** Tiempo máximo en segundos de permanencia de las ratas en el Rotarod. Seguimiento del desempeño diario, después de la implantación de las minibombas osmóticas en la médula espinal; 4 días para el grupo AMPA 7.5 mM, 7 días para el grupo AMPA 3 mM y 10 días para el grupo AMPA 1.5 mM (En todos los grupos n= 5).

El grupo tratado con AMPA 7.5 mM se mantuvo y se evaluó por un tiempo de 4 días debido a que después de este tiempo el estado de salud de los animales era muy pobre; los animales pertenecientes a este grupo tuvieron un progreso degenerativo muy acelerado, logrando permanecer en el equipo Rotarod tan solo un máximo de 22 segundos al día 3 después de implantar la minibomba osmótica y presentando parálisis total al día cuatro. El grupo tratado con AMPA 3 mM se mantuvo y se evaluó un máximo de 7 días; este grupo demostró una progresión de la parálisis más lenta aunque desde el día 1 se logró observar una bajada en el tiempo de permanencia en el equipo y para el día 3 la parálisis fue más evidente ya que los animales solo lograban permanecer un promedio de 50 segundos en el equipo; al final de los 7 días los animales presentaban atrofia total en ambas patas en la mayoría de los casos. En el caso del grupo tratado con una infusión de 1.5 mM de AMPA se mantuvieron y se evaluaron a los animales por un periodo de 10 días, al término del cual los animales presentaban atrofia solo en la pata ipsi y cierta rigidez en la pata contra; la caída de tiempo más pronunciada se observó al cuarto día, después del cual los animales demostraron una leve recuperación, sin embargo esta recuperación fue transitoria ya que a los días siguientes siguió decayendo su tiempo promedio de permanencia en el Rotarod (Figura 4).

### A) Micrografías representativas de MN sanas y en degeneración



### B) Cuantificación de MN sanas



**Fig. 5 La infusión crónica de AMPA a diferentes concentraciones ocasiona degeneración y muerte neuronal (A) Micrografías representativas con alta amplificación, de MN sanas y MN en proceso de degeneración (flechas). (B) Promedio de la cuantificación de MN sanas  $\pm$ SEM de las astas ventrales en la región de la médula espinal correspondiente al sitio de infusión, a los 4 días de la cirugía para el grupo AMPA 7.5 mM, 7 días para el grupo AMPA 3 mM y 10 días para el grupo AMPA 1.5 mM**

Para el conteo de las MN presentes en el sitio donde se implantó la minibomba osmótica (L4) al término del tiempo de evaluación de la prueba motriz Rotarod, se identificó el estado en el que éstas se encontraban, clasificando a una MN completamente sana, como aquella que posee un tamaño promedio de 20 a 30  $\mu$ m y que después de la tinción de Violeta de cresilo (Nissl) se encuentra densamente teñida, posee un núcleo y neuritas claramente definido; mientras que aquellas que ya se encuentran en proceso degenerativo se encuentran encogidas, poco teñidas,

presentan picnosis y las neuritas son poco visibles o presentan discontinuidad (Figura 5a). Basado en estas características, se contabilizó y registró el número de MN en buen estado, de los animales de cada grupo, encontrando una clara disminución en todos ellos tanto en el lado ipsi como en el contra; encontrando en los grupos infundidos con AMPA 7.5 mM (4 días) y AMPA 3 mM (7 días) un promedio de menos de 2 MN para cada lado de la médula, mientras que en el grupo infundido con AMPA 1.5 mM (10 días), se encontró un promedio de  $8 \pm 2$  MN en ambos lados de la médula espinal, a comparación del grupo control en el cual se observaron ~ 18 o 19 MN en promedio tanto en el lado ipsi como en el lado contra (Figura 5b). Dicha pérdida de MN se logra correlacionar con el déficit motriz observado en la prueba Rotarod.

Del experimento anterior se seleccionaron las concentraciones 3 mM y 1.5 mM de AMPA para analizar la actividad del NaBut y del Paclitaxel, tal como se describe abajo.

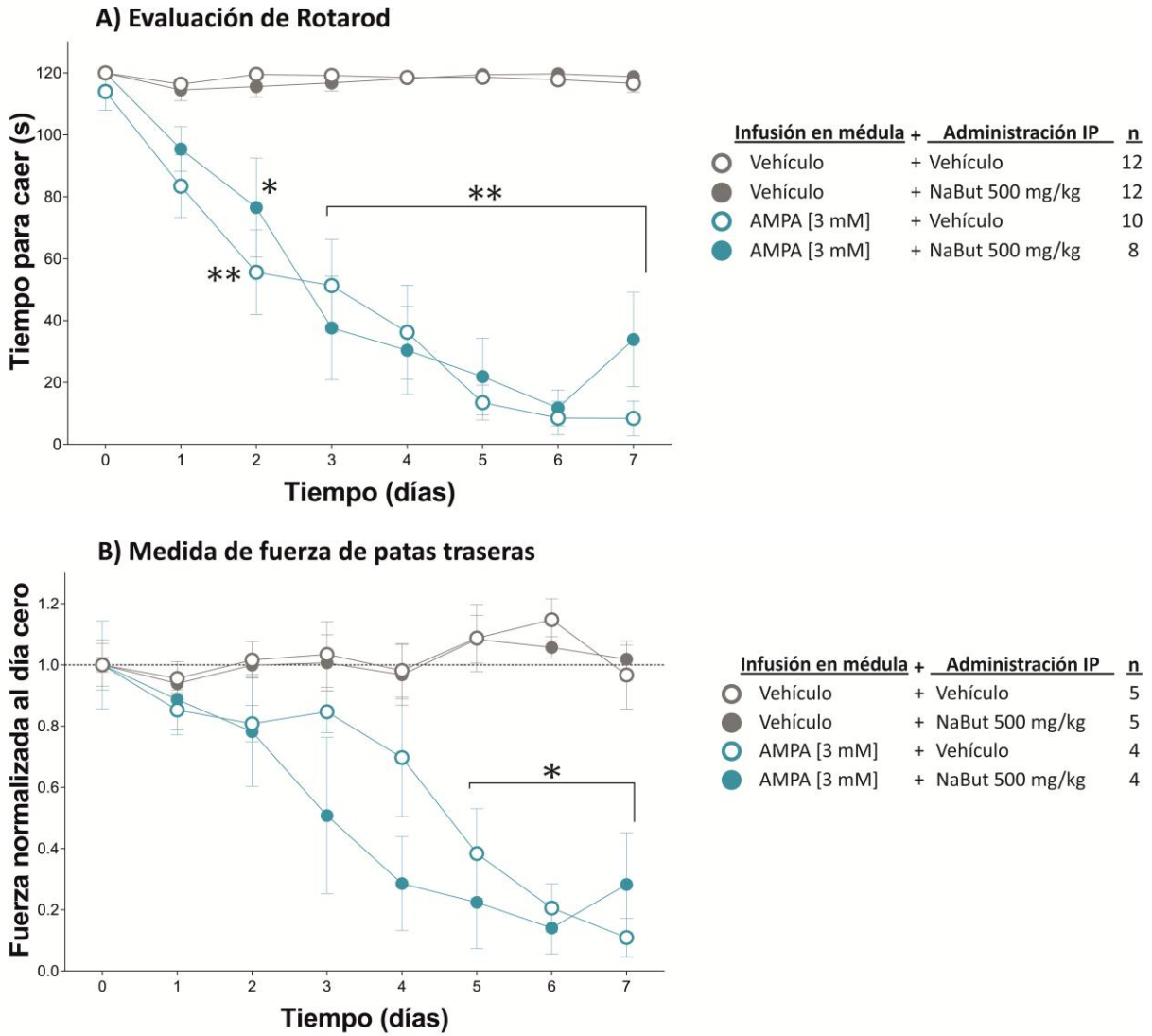
### **Efecto de butirato de sodio**

Para este estudio se trabajó con la infusión de AMPA 3 mM para evaluar la actividad de NaBut al considerar que esta concentración mostraba una progresión de la parálisis más evidente y menos agresiva a diferencia de las otras concentraciones.

*El NaBut no altera el desempeño en las pruebas motrices, ni tiene efecto neuroprotector en la degeneración ocasionada por la infusión espinal de AMPA 3 mM.*

Los grupos se mantuvieron por un periodo de 7 días después de implantarles la minibomba osmótica, tiempo durante el cual los animales se evaluaron en las pruebas motrices de Rotarod y en la prueba basada en la medida de fuerza de las extremidades traseras por medio del PGE. Los grupos que estaban recibiendo la infusión medular con AMPA 3 mM mostraron una pérdida progresiva significativa del tiempo de permanencia en el Rotarod a partir del día 2 después de haber implantado la minibomba, permaneciendo un promedio de ~76 segundos para un grupo y ~56 segundos para el otro; además, a pesar de que al día 3 comenzaron a ser administrados IP, el NaBut no mostró ninguna influencia en el progreso de la pérdida del tiempo de caída hasta el término del experimento en el grupo infundido

por AMPA, ni en la capacidad para permanecer en el equipo los 120 segundos mostrada por el grupo infundido con el vehículo (Figura 6a).



**Fig. 6 NaBut no altera el desempeño en las pruebas motrices de Rotarod ni en la fuerza de las patas traseras. (A)** Tiempo de permanencia caminando de las ratas en el Rotarod. Seguimiento del desempeño diario, por 7 días, después de la implantación de las minibombas osmóticas en la médula espinal (infusión de AMPA o vehículo) y la administración IP de 500mg/Kg de NaBut o vehículo. Cada punto en la gráfica es el promedio del tiempo para caer  $\pm$ SEM \* $p$ <0.05 y \*\* $p$ <0.0001 vs. los grupos infundidos con vehículo + administración de vehículo o NaBut (ANOVA de dos vías seguido del análisis Bonferroni *post hoc*). **(B)** Valores de la medida de la fuerza de las patas traseras normalizadas al valor basal del día 0 correspondiente (antes de la implantación de las minibombas osmóticas), por 7 días. Cada punto en

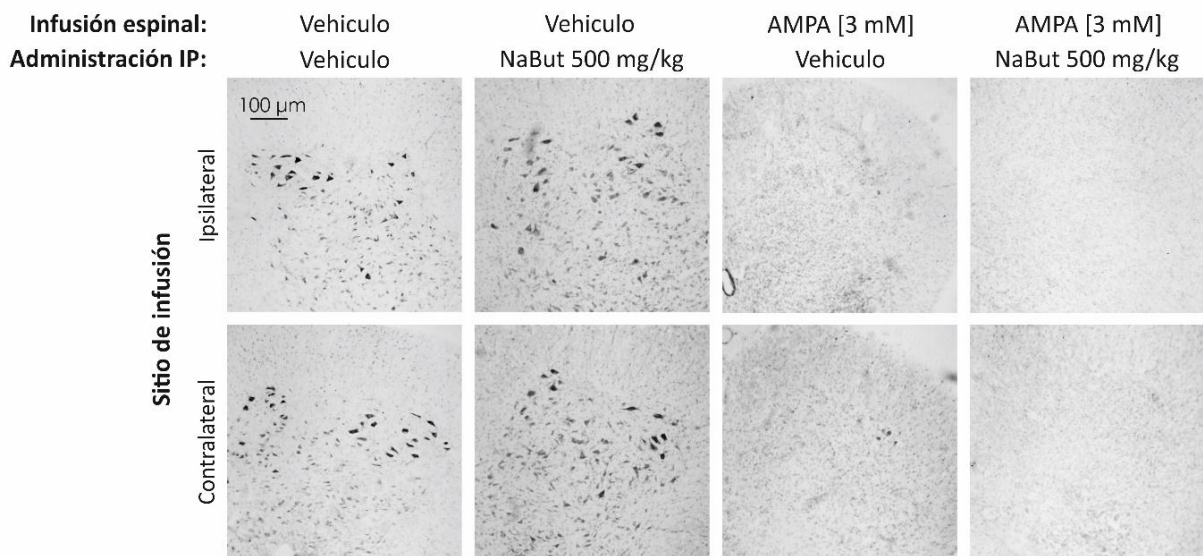


la gráfica corresponde al valor normalizado de fuerza promedio  $\pm$ SEM \* $p < 0.0001$  vs. los grupos infundidos con Vehículo + administración de vehículo o NaBut (ANOVA de dos vías seguido del análisis Bonferroni *post hoc*).

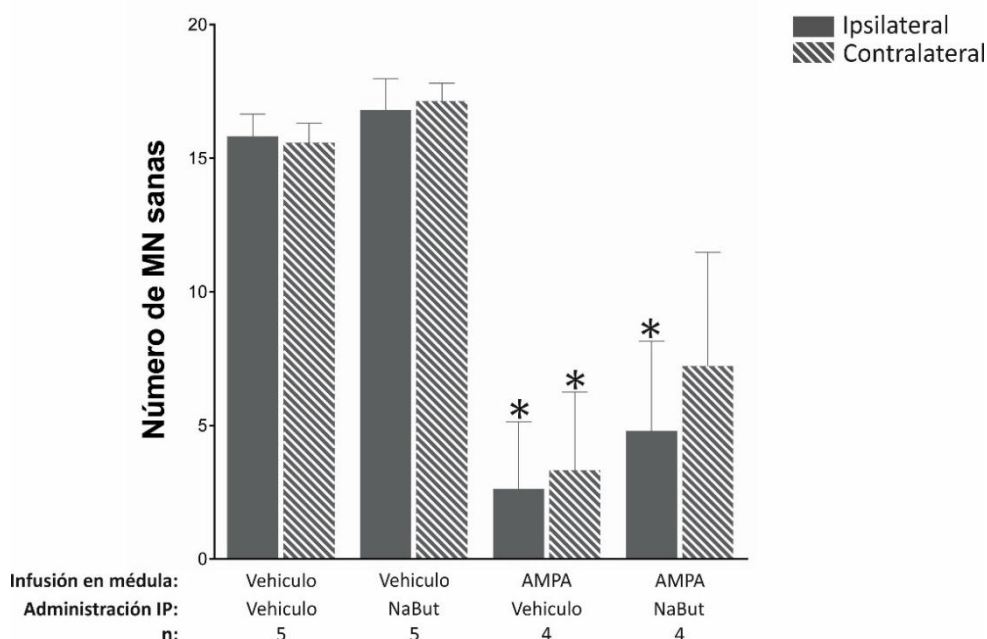
En la prueba de fuerza los animales que estaban siendo infundidos con AMPA mostraron una pérdida progresiva significativa de la fuerza, a comparación de los grupos infundidos por el vehículo, en los últimos 3 días del experimento. Éstos valores se registraron de forma normalizada con el valor basal correspondiente (valor de la fuerza al día 0, antes de implantar las minibombas osmóticas), y de forma análoga a la primera prueba motriz, el NaBut no mostró ninguna actividad en el desempeño de los grupos que estaban siendo administrados a comparación de aquellos administrados por el vehículo (Figura 6b).

Al término de la evaluación se sacrificó a los animales obteniéndose la médula espinal, y se evaluó el estado de las MN en el sitio donde se realizó el implante por medio de una evaluación histológica con ayuda de la tinción de violeta de cresilo (Figura 7a). El NaBut no demostró ninguna actividad neuroprotectora ante la muerte neuronal por la excitotoxicidad generada por la infusión de AMPA (Figura 7b). Ésta pérdida de las MN espinales sanas se correlaciona con la progresión de la parálisis en las patas traseras de los animales observada a lo largo de los días, en conjunto con los resultados obtenidos en ambas pruebas motrices.

### A) Micrografías representativas, medula espinal con tinción Nissl



## B) Cuantificación de MN sanas

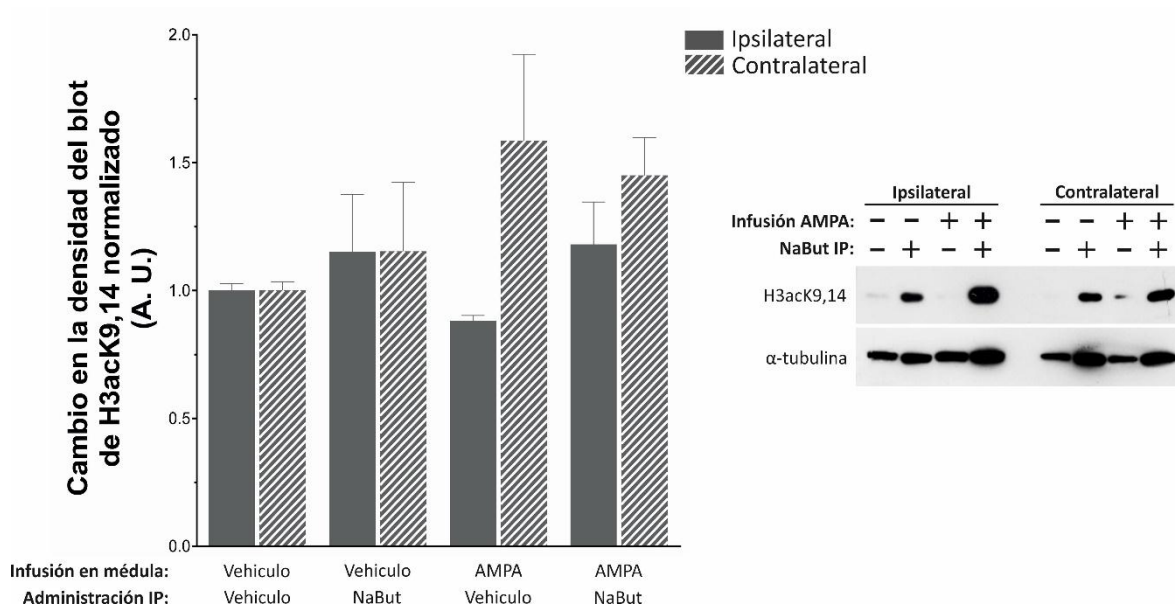


**Fig. 7 La administración de NaBut no tiene efecto neuroprotector durante la infusión de AMPA. (A y B)** Micrografías representativas con baja amplificación, de la tinción de Nissl de las MN sanas en las astas ventrales de la médula espinal a nivel de L4 del lado ipsi y contra, al día 7 de la infusión de AMPA o vehículo y la administración de vehículo o NaBut. **(B)** Promedio de la cuantificación de MN sanas  $\pm$ SEM de las astas ventrales en la región de la médula espinal correspondiente al sitio de infusión. \* $p < 0.05$  vs. los grupos infundidos con vehículo + administración de vehículo o NaBut (ANOVA de dos vías seguido del análisis Bonferroni *post hoc*).

*La administración de NaBut no influye en los niveles de acetilación de la histona H3 en los residuos de las lisinas K9 y K14 en el músculo esquelético.*

Con el fin de evaluar si la dosis de NaBut tuvo el efecto inhibitor deseado, se estudió la posible inhibición de la HDAC4 evaluando su actividad en el músculo esquelético Biceps Femoral ipsi y contra ( $n=4$ ), mediante la medición con Western Blot de los niveles de la histona H3 acetilada en los residuos de lisina K9 y K14, dos de los dianas de la HDAC4. Los niveles de H3 acetilada en K9 y K14, valores normalizados con los valores de los niveles respectivos del control de carga tubulina, no mostraron ninguna diferencia significativa en los animales administrados con NaBut a diferencia de aquellos que fueron administrados con el vehículo, en ninguno de los dos músculos. Esta falta de inhibición puede correlacionarse con la progresión de la parálisis observada en las pruebas motrices, dado que no existió visiblemente ningún efecto de reinnervación que contrarrestara la pérdida de conexiones nerviosas causado por la muerte neuronal tras la infusión de AMPA (Figura 8).





**Fig. 8 La administración de NaBut no tiene efecto en los niveles de acetilación de la histona H3 K9,14 en el músculo esquelético. (Lado derecho)** Inmunoblot representativo de la presencia de la histona H3 acetilada, en los residuos de lisina 9 y 14 (K9,14), en los músculos bíceps femoral ipsi y contra. **(Lado izquierdo)** Valores de la cuantificación de la densidad del inmunoblot de los niveles de histona H3 acetilada en K9,14 en los músculos bíceps femoral ipsi y contra, normalizados a los niveles del control de carga (tubulina) correspondientes. n= 4 animales por cada grupo.

### Efecto de Paclitaxel

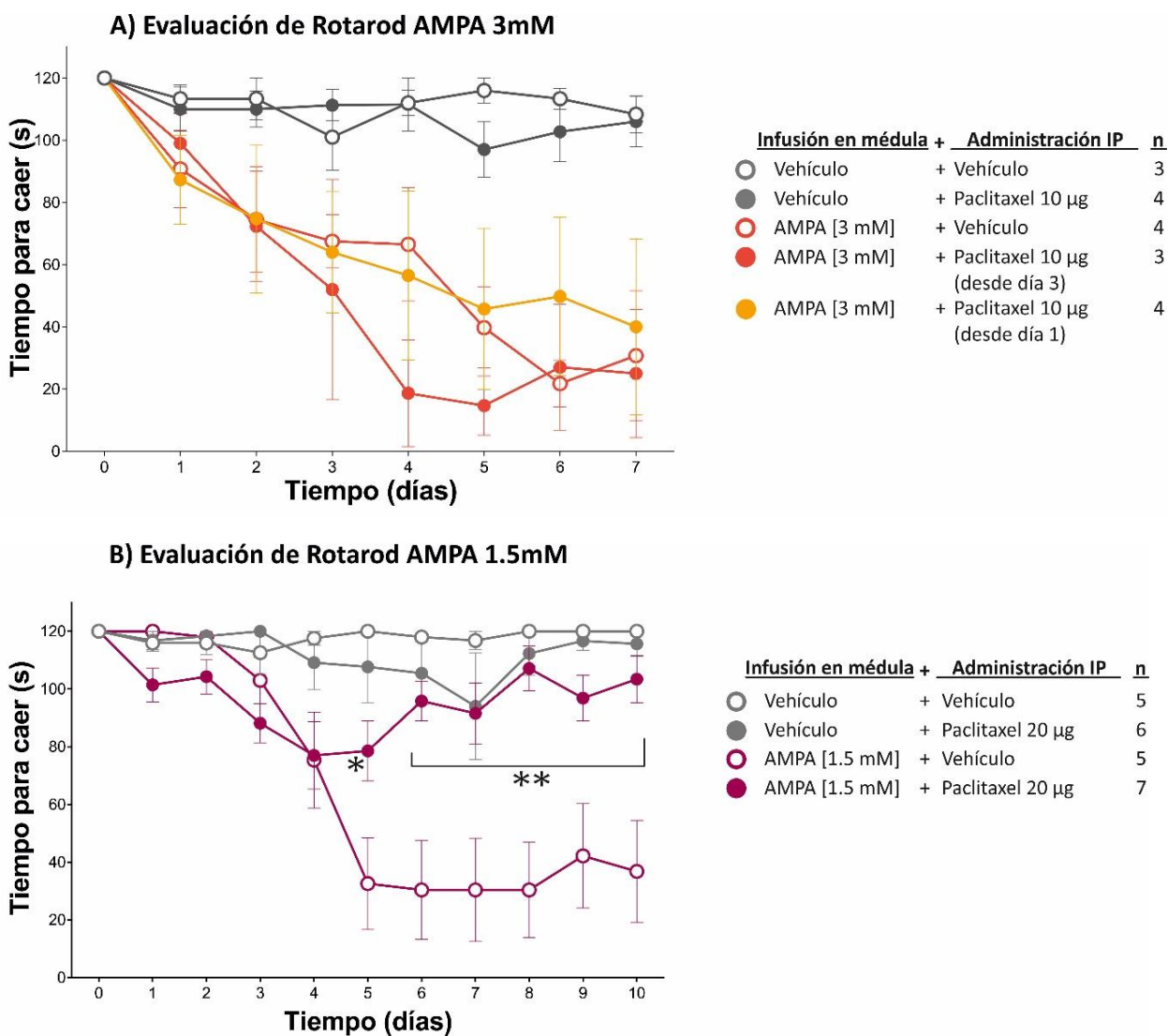
Para la evaluación de la actividad del Paclitaxel se continuó trabajando con la infusión en la médula espinal de AMPA a una concentración de 3 mM manteniendo y evaluando a los animales por 7 días, sin embargo se realizó otro estudio con la infusión de AMPA a una concentración de 1.5 mM en la médula espinal manteniendo a los animales por 10 días, tal como se describe abajo.

*El estabilizador de microtúbulos Paclitaxel mejora el desempeño motriz, pero no tiene un efecto neuroprotector ante la infusión medular de AMPA.*

El tiempo para caer de los animales que recibieron la infusión de AMPA 3 mM y que fueron administrados con 10 µg de Paclitaxel a partir del día 3, no demostró ninguna

mejora a comparación de aquellos que estaban siendo administrados con vehículo (Figura 9a). Por esta razón se consideró apropiado evaluar la actividad del Paclitaxel en otro grupo infundido con AMPA 3 mM, administrando el estabilizador de microtúbulos a partir del día 1 y hasta el día 6 después de la cirugía dado que a partir del día 1 ya es apreciable, en los animales infundidos por AMPA, una disminución en la capacidad para permanecer el máximo tiempo al que se les entrenó en el equipo Rotarod. En este ensayo los animales demostraron una leve mejora en el tiempo de permanencia a diferencia de ambos grupos infundidos por AMPA, el administrado con vehículo y el administrado con Paclitaxel a partir del día 3, sin embargo esta mejora no fue representativa y al final del tiempo de evaluación los animales terminaron con atrofia muscular en ambas patas traseras en la mayoría de los casos, logrando permanecer en el equipo un promedio de ~40 segundos (Figura 9a). Al final del estudio los animales se sacrificaron y la región de la médula donde se realizó el implante se sometió a análisis histológico con la tinción de Violeta de cresilo (Figura 10a). El Paclitaxel no demostró tener actividad neuroprotectora ante la muerte neuronal ocasionada por la infusión de AMPA 3 mM ni al ser administrado desde el día 3, ni al administrarse desde el día 1 después de la cirugía (Figura 10b).

Los resultados observados en el grupo administrado con Paclitaxel a partir del día 1, en los cuáles se observó una progresión un poco más lenta de la parálisis, se atribuyeron a una posible reinnervación insatisfactoria efectuada por la administración del estabilizador. Es por ello que considerando que la progresión de la parálisis efectuada por la infusión de AMPA 3 mM es muy rápida para lograr ver los efectos del Paclitaxel, además de que la dosis administrada de Paclitaxel era insuficiente, se decidió realizar un nuevo estudio con la infusión de AMPA 1.5 mM, concentración que muestra una progresión menos agresiva permitiendo evaluar a los animales por un mayor tiempo después de la cirugía (Figura 4), y además aumentar la administración IP diaria de Paclitaxel a 20  $\mu$ g a partir del día 1 y hasta el día 9 después de implantar la minibomba osmótica. El comportamiento de este nuevo grupo fue muy diferente, mostrando una variación significativa a partir del día 5 en el desempeño de los animales infundidos por AMPA y administrados con Paclitaxel a comparación con el grupo infundido por AMPA y administrado por vehículo, diferencia que fue aún más notoria en los últimos 4 días del estudio, logrando para estos días una permanencia en el Rotarod promedio de ~100 segundos  $\pm$ 10 segundos, mientras que el tiempo de caída para el grupo infundido con AMPA y administrado por vehículo era solamente de ~35 segundos durante los mismos días (Figura 9b).



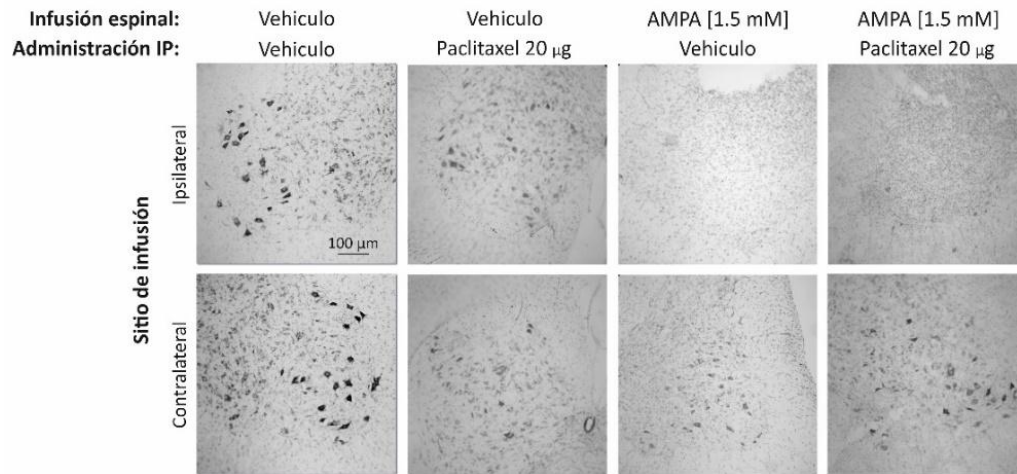
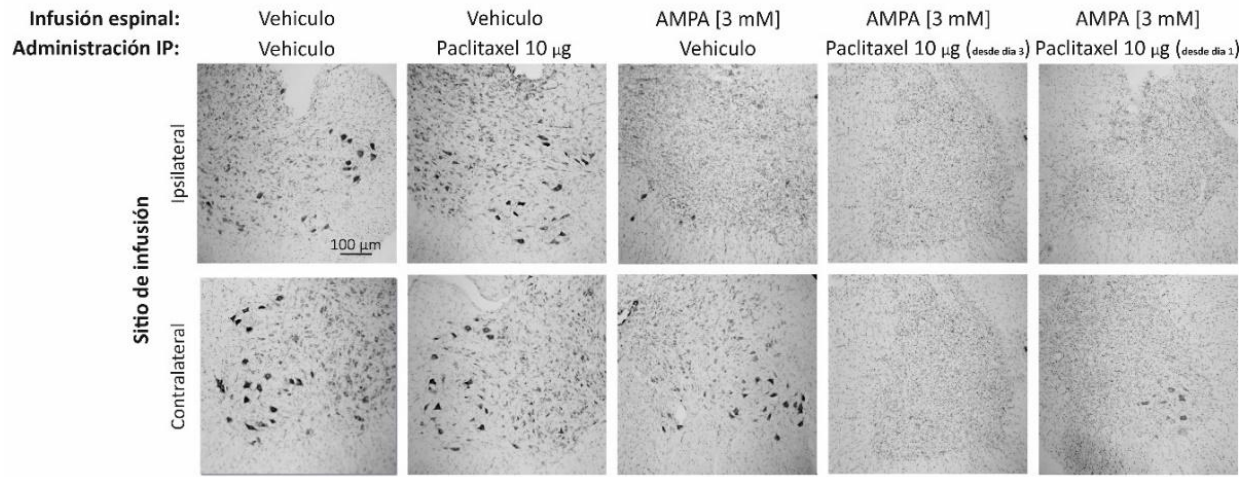
**Fig. 9 El Paclitaxel protege contra la deficiencia motora inducida por el AMPA 1.5 mM en la médula espinal. (A y B) Tiempo de permanencia caminando de las ratas en el Rotarod. Seguimiento del desempeño diario, por 7 y 10 días, después de la implantación de las minibombas osmóticas en la médula espinal (infusión de AMPA 3 mM o 1.5 mM respectivamente, o vehículo) y la administración IP de Paclitaxel o vehículo. (A) Seguimiento de los grupos infundidos en la médula espinal con AMPA 3 mM. Se muestra el desempeño de un grupo administrado con 10 µg Paclitaxel desde el día 3 después de la cirugía y otro administrado con 10 µg Paclitaxel desde el día 1 después de la cirugía, ambos hasta el día 6. Cada punto en la gráfica es el promedio del tiempo para caer  $\pm$ SEM (B) Seguimiento de los grupos infundidos en la médula espinal con AMPA 1.5 mM y administrados con 20 µg Paclitaxel o vehículo desde el día 1 hasta el día 9 después de la cirugía. Cada punto en la gráfica es el promedio del tiempo para caer  $\pm$ SEM \* $p$ <0.05 y \*\* $p$ <0.0001**

vs. el grupo infundido con AMPA 1.5mM + administración de vehículo (ANOVA de dos vías seguido del análisis Bonferroni *post hoc*).

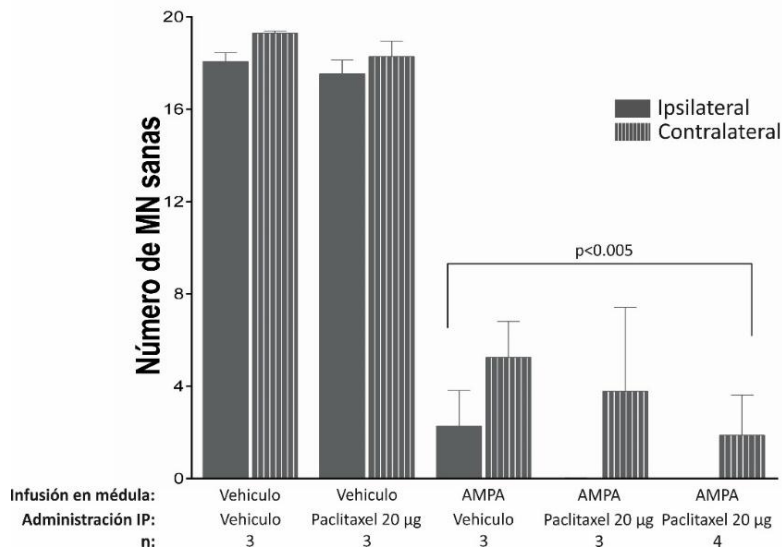
En el grupo que recibía infusión medular de vehículo y que estaba siendo administrado IP con los 20  $\mu$ g de Paclitaxel, se observó una ligera rigidez de las patas traseras de los animales, lo cual disminuyó sutilmente su capacidad para permanecer en el Rotarod los 120 segundos a los cuales se les había entrenado, sin embargo esta rigidez desapareció dos días previos al final del estudio (Figura 9b).

Al término del estudio se sacrificó a los animales y se analizaron las MN en los cortes de la médula espinal en la región donde se realizó el implante a nivel de L4, por medio de la tinción de violeta de cresilo (Figura 10a). El Paclitaxel no demostró tener actividad neuroprotectora ante la muerte neuronal ocasionada por la infusión de AMPA 1.5 mM del lado ipsi de la médula espinal, y el número de MN encontrado fue similar al que se encontró en el grupo infundido por AMPA y administrado con Vehículo por lo que los resultados obtenidos en la prueba motriz se pueden asociar a un efecto de reinnervación y sprouting por parte de las MN sanas promovido por la administración del estabilizador Paclitaxel (Figura 10a y 10c).

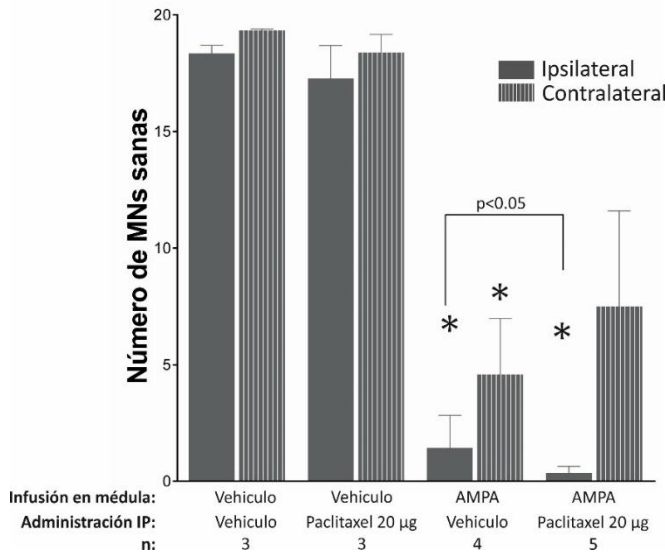
### A) Micrografías representativas, medula espinal con tinción Nissl



### B) Cuantificación de MN sanas AMPA 3 mM



### C) Cuantificación de MN sanas AMPA 1.5 mM



**Fig. 10 La administración de Paclitaxel no tiene efecto neuroprotector durante la infusión de AMPA. (A)** Micrografías representativas con baja amplificación de la tinción de Nissl de las astas ventrales de la médula espinal a nivel de L4 del lado ipsi y contra, al día 7 y 10 de la infusión para los grupos infundidos con AMPA 3 mM y AMPA 1.5 mM respectivamente. Micrografías representativas de los grupos infundidos con AMPA 3 mM o vehículo y administrados con vehículo o 10 µg Paclitaxel, un grupo administrado desde el día 3 después de la cirugía y otro administrado con 10 µg Paclitaxel desde el día 1, ambos hasta el día 6, después de la cirugía. Y micrografías representativas mostrando las MN sanas en las astas ventrales cuantificadas, de los grupos infundidos con AMPA 1.5 mM o vehículo y administrados de vehículo o 20 µg Paclitaxel desde el día 1 hasta el día 9, después de implantar la minibomba osmótica. **(B y C)** Promedio de la cuantificación de MN sanas  $\pm$ SEM de las astas ventrales en la región de la médula espinal correspondiente al sitio de infusión.  $p < 0.005$  y  $*p < 0.05$  vs. los grupos infundidos con vehículo + administración de vehículo o Paclitaxel (ANOVA de dos vías seguido del análisis Bonferroni *post hoc*).



## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El trabajo en esta tesis está basado en el modelo desarrollado en nuestro laboratorio de degeneración crónica de las MN espinales por excitotoxicidad, inducido por la infusión de AMPA in vivo como se describe en Tovar-y-Romo et. al., (2007). Coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo, la infusión de AMPA en la médula espinal ocasionó pérdida progresiva de las habilidades motoras de los animales culminando con la completa parálisis de las extremidades traseras, y esto se vio reflejado en la incapacidad de los animales para cumplir la prueba Rotarod al paso de los días. La reproducción de esos resultados nos permitió decidir la mejor concentración de AMPA que permitiera evaluar los posibles efectos protectores de los compuestos usados, como se describe en Resultados. Esto confirma que este modelo es idóneo para evaluar la posible actividad terapéutica de diferentes sustancias durante el proceso degenerativo a lo largo de varios días (Netzahualcoyotzi & Tapia, 2015; Tovar-y-Romo et. al., 2007; Tovar-y-Romo & Tapia, 2012).

### **Efecto del butirato de sodio**

Como se mencionó en la Introducción, las neuronas del sistema nervioso central presentan una baja capacidad para la regeneración nerviosa, sin embargo se han encontrado evidencias que uno de los factores que interviene en la velocidad de la progresión de la enfermedad en pacientes con ALS, es la reinnervación de las MN sanas y la formación de nuevas NMJ; estos procesos se encuentran regulados por factores intrínsecos de las mismas MN, los cuáles varían dependiendo del subtipo celular de cada neurona (Bruneteau et. al., 2013; Williams et. al., 2009; Chen et. al., 2016).

Las HDAC modulan una gran cantidad de procesos neurales al regular la expresión de genes y se sabe, que de manera específica, la HDAC4 participa en los procesos degenerativos de las NMJ e impide la reinnervación en patologías tales como la ALS (Cohen et. al., 2007; Williams et. al., 2009). Con base en lo anterior, utilizamos un inhibidor de la HDAC4 como posible protector, ya que podría tener efectos que promuevan la formación de nuevas NMJ eficientes así como colaborar con el mantenimiento de las NMJ ya formadas, contrarrestando los síntomas provocados por la denervación durante el proceso crónico degenerativo por la infusión espinal de AMPA. Como no existe ningún inhibidor específico de la HDAC4, se utilizó el NaBut, inhibidor de las HDAC de las familias I y II, el cual tiene como ventaja, en comparación con otros inhibidores, que al ser una sal derivada de un ácido graso pequeño, presenta una alta solubilidad lo que le permite ser administrado por medio de diferentes vías (Chuang et. al., 2009; Lazo-Gómez et. al., 2013).

Los resultados obtenidos a partir de la administración IP de NaBut, no mostraron ningún efecto en las pruebas conductuales ni un efecto neuroprotector durante el proceso degenerativo ocasionado por la infusión de AMPA, lo cual podría tener

diferentes explicaciones. Esta concentración corresponde a la mayor dosis tolerada por ratas que muestra una buena biodisponibilidad a pesar de su rápida metabolización (Egorin M. et. al., 1999), por esta razón se eligió utilizar esta misma dosis administrándola diariamente; sin embargo es posible que a esta dosis el compuesto fuera metabolizado rápidamente y por lo tanto quedara fuera de la circulación o bien que la concentración fuera insuficiente para promover una reinnervación que contrarrestara el déficit motor producido por el AMPA.

Como una de las hipótesis para evaluar el efecto regenerativo del NaBut era mediante el análisis de su actividad inhibitoria en las HDAC, se midió su efecto sobre la acetilación de la histona 3 en los residuos de lisina 9 y 14. El resultado de estos experimentos demostró que en nuestras condiciones experimentales no se inhibió la acetilación, por lo tanto podemos concluir que la falta de recuperación motriz se debe a la falta de esta inhibición, sin embargo es posible que la falta de inhibición observada se deba a que solamente se midió la acetilación de las lisinas K9 y K14 en la histona 3, y hay otras lisinas diana de acetilación que son en la histona 3 en los residuos de lisinas 18 y 23 y en la histona 4 en los residuos de lisinas 5, 8, 12 y 16 que no evaluamos (Wang et. al., 2014).

Otra posible razón es que al ser el NaBut un inhibidor global de las HDAC, su actividad esté afectando la expresión de HDAC que son benéficas para la formación y el mantenimiento de la NMJ. Entre las HDAC identificadas con actividad pro-regenerativas están la HDAC1, HDAC5 y HDAC6. La HDAC1 se sobre-expresa, en modelos de lesión espinal, solo en las neuronas que muestran una alta capacidad de regeneración, sugiriendo que esta enzima tiene un efecto estimulador de la regeneración, aunque no se conoce el mecanismo (Chen et. al., 2016). La HDAC5 y la HDAC6 disminuyen la acetilación de proteínas, incluida la  $\alpha$ -tubulina interviniendo en el equilibrio dinámico de los microtúbulos y por consiguiente estimulan el crecimiento axonal (Tang, 2014; Lin et. al. , 2015).

## **Efecto del paclitaxel**

La segunda droga que evaluamos en este trabajo de tesis como estimulador de la regeneración en nuestro modelo experimental es el Paclitaxel, un estabilizador de microtúbulos. Como se mencionó en la Introducción, estos estabilizadores podrían ser muy útiles para disminuir el estado hiperdinámico de los microtúbulos que se observa en el proceso degenerativo en la ALS (Fanara et. al., 2007). Además, se sabe que una de las características que presenta la muerte de las MN ocasionada por procesos excitotóxicos en la médula espinal es la fragmentación y degeneración de los axones y la retracción de las NMJ (Blizzard et. al., 2016), por lo cual nuestro modelo es apropiado para evaluar el posible efecto regenerativo del Paclitaxel.

El Paclitaxel no afectó el déficit motor producido por el AMPA 3 mM al ser administrado IP (10  $\mu$ g diarios), a pesar de que la dosis fue seleccionada a partir de que el grupo de Hellal et. al., (2011) demostró que el Paclitaxel tiene efectos regenerativos y mejora conductual en un modelo de lesión espinal, aunque en este caso la administración fue intratecal.



Ya que el proceso degenerativo ocasionado por la infusión de AMPA 3 mM es muy rápido, en la segunda serie de experimentos con Paclitaxel se administró el doble de la primera dosis y al mismo tiempo se disminuyó la concentración de AMPA a 1.5 mM. En estas condiciones, si se observó una protección contra la parálisis provocada por el AMPA, lo cual sugiere que los resultados negativos con la dosis menor se deben probablemente a que no se alcanzó una concentración suficiente para observar sus efectos. Es importante resaltar por lo tanto, que la selección de la concentración óptima de AMPA para trabajar es determinante para el escrutinio de la actividad protectora de las drogas.

Es interesante que cuando se administró Paclitaxel a la dosis alta a animales intactos (grupo control infundido con vehículo en la médula espinal), mostraron una ligera rigidez en las patas traseras, reflejándose en una disminución de tiempo de caída, aunque no significativa, en el Rotarod. Una posible explicación de este efecto es que efectivamente el Paclitaxel alteró el estado dinámico de los microtúbulos, resultando en un estado de hiper-estabilidad en los axones sanos, ocasionando alteraciones en el transporte axonal y la transmisión sináptica. Aunque esto es especulativo, podría explicar por qué a esta dosis el Paclitaxel sí mostró un efecto protector sobre las alteraciones motoras producidas por el AMPA. Estos resultados señalan la importancia de detectar el estado de los microtúbulos en el modelo de estudio, el cual es uno de los objetivos en la continuación de este proyecto, así como en la patología a tratar, ya que de ello depende el resultado benéfico, o no, de la administración de la droga (estabilizador o desestabilizador de microtúbulos). Un ejemplo de esta conclusión está en los hallazgos por Gobrecht et. al., (2016), quienes por medio de la inhibición de la detirosinación de los microtúbulos en modelos transgénicos  $GSK3\alpha^{S/A}/\beta^{S/A}$  knock-in in vivo e in vitro, disminuyendo la estabilidad de los microtubulos, lograron promover la regeneración axonal.

En cuanto a los resultados histológicos, aunque hubo protección de la conducta, esto no se relacionó con el daño de las MN. Esto puede deberse a que el Paclitaxel no presenta actividad neuroprotectora sino que, como ya se discutió, estimula la estabilización de los microtúbulos en los axones de las MN evitando así su degeneración y estimulando la ramificación de las terminales, compensando las pérdidas de los axones dañados (Hellal et. al., 2011; Sengottuvel et. al., 2011).

## **Conclusión general**

Al evaluar nuevas drogas como estrategia de protección contra la neurodegeneración, se debe tomar en cuenta que no es suficiente enfocarse en la neuroprotección y por tanto preservar las MN sino que es igualmente necesario la estimulación de la regeneración para así, contrarrestar las consecuentes deficiencias en la conducta motora.

En cuanto a las drogas evaluadas, el NaBut no parece ser una correcta estrategia terapéutica ya que no presentó ninguna actividad en la progresión de la parálisis de los animales. Sin embargo es necesario determinar la razón de la falta de efecto para entender completamente la progresión de la enfermedad y que más adelante,

tomando en cuenta estos hallazgos, se puedan elegir otras drogas como posibles protectores. Por otro lado el Paclitaxel aparentemente sí posee una mayor capacidad regenerativa ya que protegió significativamente contra el déficit motor, lo que le confiere cierto potencial terapéutico para ser ensayado en la ALS. Sin embargo es necesario evaluar el estado de los axones y las NMJ de los animales tras su administración, para comprobar y conocer el mecanismo de su actividad regenerativa.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México (Proyecto 240817), y la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (Proyecto IN204516) al laboratorio del Dr. Ricardo Tapia. Yo fui recipiente de una beca de CONACyT.

## REFERENCIAS

- Ballatore, C., Brunden, K., Huryun, D., Trojanowski, J., Lee, V., & Smith, A. (2012). Microtubule Stabilizing Agents as Potential Treatment for Alzheimer's Disease and Related Neurodegenerative Tauopathies. *Journal of Medicinal Chemistry*, *55*, 8979-8996. doi:dx.doi.org/10.1021/jm301079z
- Bass, P., & Ahmad, F. (2013). Beyond taxol: microtubule-based treatment of disease and injury of the nervous system. *Brain*, *136*, 2937-2951. doi:10.1093/brain/awt153
- Blizzard, C., Lee, K., & Dickson, T. (2016). Inducing Chronic Excitotoxicity in the Mouse Spinal Cord to Investigate Lower Motor Neuron Degeneration. *Frontiers in Neuroscience*, *10*(76), 1-8. doi:10.3389/fnins.2016.00076
- Bruneteau, G., Simonet, T., Bauché, S., Mandjee, N., Malfatti, E., Girard, E., . . . Hantai, D. (2013). Muscle histone deacetylase 4 upregulation in amyotrophic lateral sclerosis: potential role in reinnervation ability and disease progression. *Brain*, *136*, 2359-2368. doi:10.1093/brain/awt164
- Chen, J., Laramore, C., & Shifman, M. (2016). Differential expression of HDACs and KATs in high and low regeneration capacity neurons during spinal cord regeneration. *Experimental Neurology*, *280*, 50-59. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.04.001
- Chen, J., Laramore, C., & Shifman, M. (2016). Differential expression of HDACs and KATs in high and low regeneration capacity neurons during spinal cord regeneration. *Experimental Neurology*, *280*, 50-59. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.04.001
- Chen, S., Sayana, P., Zhang, X., & Le, W. (2013). Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Molecular Neurodegeneration*, *8*(28), 1-15.
- Chuang, D.-M., Leng, Y., Marinova, Z., Kim, H.-J., & Chiu, C.-T. (2009). Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Cell*, *32*(11), 591-601. doi:10.1016/j.tins.2009.06.002
- Cleveland, D., & Rothstein, J. (2001). FROM CHARCOT TO LOU GEHRIG: DECIPHERING SELECTIVE MOTOR NEURON DEATH IN ALS. *Nature Review*, *2*, 806-819.
- Cohen, T., Waddell, D., Barrientos, T., Lu, Z., Feng, G., Cox, G., . . . Yao, T.-P. (2007). The Histone Deacetylase HDAC4 Connects Neural Activity to Muscle Transcriptional Reprogramming. *the Journal of Biological Chemistry*, *282*(46), 33752-33759. doi:10.1074/jbc.M706268200
- Corona, J. C., & 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. *Journal Neurochemistry*, *89*, 988-997.

- Corona, J. C., & Tapia, R. (2007). Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors and intracellular Ca<sup>2+</sup> determine motoneuron vulnerability in rat spinal cord in vivo. *Neuropharmacology*, *52*, 1219-1228.
- Corona, J., Tovar-y-Romo, L., & Tapia, R. (2007). Glutamate excitotoxicity and therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Informa UK. ISSN 1472-8222*, 1415-1428. doi:10.1517/14728222.11.11.1415
- Dubey, J., Ratnakaran, N., & Koushika, S. (2015). Neurodegeneration and microtubule dynamics: death by a thousand cuts. *frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*(343), 1-15. doi:10.3389/fncel.2015.00343
- Dubey, J., Ratnakaran, N., & Koushika, S. (2015). Neurodegeneration and microtubule dynamics: death by a thousand cuts. *Frontiers of Cellular Neuroscience*, *9*(343). doi:10.3389/fncel.2015.00343
- Dupuis, L., & Loeffler, J.-P. (2009). Neuromuscular junction destruction during amyotrophic lateral sclerosis: insights from transgenic models. *Current Opinion in Pharmacology*, *9*, 341-346. doi:10.1016/j.coph.2009.03.007
- Egorin, M., Yuan, Z.-M., Sentz, D., Plaisance, K., & Eiseman, J. (1999). Plasma pharmacokinetics of butyrate after intravenous administration of sodium butyrate or oral administration of tributyrin or sodium butyrate to mice and rats. *Cancer Chemother Pharmacology*, *43*, 445-453.
- Egorin, M., Yuan, Z.-M., Sentz, D., Plaisance, K., & Eiseman, J. (1999). Plasma pharmacokinetics of butyrate after intravenous administration of sodium butyrate or oral administration of tributyrin or sodium butyrate to mice and rats. *Cancer Chemother Pharmacol*, *43*, 445-453.
- Fanara, P., Banerjee, J., Hueck, R., Harper, M., Awada, M., Turner, H., . . . Hellerstein, M. (2007). Stabilization of Hyperdynamic Microtubules Is Neuroprotective in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(32), 23465-23472. doi:10.1074/jbc.M703434200
- Fanara, P., Banerjee, J., Hueck, R., Harper, M., Awada, M., Turner, H., . . . Hellerstein, M. (2007). Stabilization of Hyperdynamic Microtubules Is Neuroprotective in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(32), 23465-23472. doi:10.1074/jbc.M703434200
- Frey, D., Schneider, C., Xu, L., Borg, J., Spooren, W., & Caroni, P. (2000). Early and Selective Loss of Neuromuscular Synapse Subtypes with Low Sprouting Competence in Motoneuron Diseases. *The Journal of Neuroscience*, *20*(7), 2534-2542.
- Gagliano, H., Delgado-Morales, R., Sanz-Garcia, A., & Armario, A. (2014). High doses of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate trigger a stress-like response. *Neuropharmacology*, *79*, 75-82. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.10.031
- Gobrecht, P., Andreadaki, A., Diekmann, H., Heskamp, A., Leibinger, M., & Fischer, D. (2016). Promotion of Functional Nerve Regeneration by Inhibition of Microtubule Detyrosination. *The Journal of Neuroscience*, *36*(14), 3890-3902. doi:10.1523/JNEUROSCI.4486-15.2016

- Hellal, F., Hurtado, A., Ruschel, J., Flynn, K., Laskowski, C., Umlauf, M., . . . Bradke, F. (2011). Microtubule Stabilization Reduces Scarring and Causes Axon Regeneration After Spinal Cord Injury. *Science*, 331, 928-931. doi:10.1126/science.1201148
- Hirano, A., Nakano, I., Kurland, L., & Saccomanno, G. (1984). Fine Structural Study of Neurofibrillary Changes in a Family with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 43(5), 471-80. doi:10.1097/00005072-198409000-00002
- Kawahara, Y., Kwak, S., Ito, K., Hashida, H., Aizawa, H., Jeong, S.-Y., . . . Sun, H. (2003). Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA: an implication for excitotoxicity in ALS. *Journal of Neurochemistry*, 85, 680-689. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01703.x
- Lazo-Gómez, R., & Tapia, R. (2016). Motor Alterations Induced by Chronic 4-Aminopyridine Infusion in the Spinal Cord In Vivo: Role of Glutamate and GABA Receptors. *Frontiers in Neuroscience*, 10(200), 1-9. doi:10.3389/fnins.2016.00200
- Lazo-Gómez, R., Ramírez-Jarquín, U., Tovar-y-Romo, L., & Tapia, R. (2013). Histone deacetylases and their role in motor neuron degeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(243), 1-7. doi:10.3389/fncel.2013.00243
- Lin, S., Nazif, K., Smith, A., Bass, P., & Smith, G. (2015). Histone Acetylation Inhibitors Promote Axon Growth in Adult Dorsal Root Ganglia Neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 93, 1215-1228. doi:10.1002/jnr.23573
- Netzahualcoyotzi, C., & Tapia, R. (2015). Degeneration of spinal motor neurons by chronic AMPA-induced excitotoxicity in vivo and protection by energy substrates. *Acta Neuropatológica Communications*, 3(27), 1-9. doi:10.1.186/s40478-015-0205-3
- Orr, G., Verdier-Pinard, P., McDaid, H., & Horwitz, S. (2003). Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene*, 22, 7280-7295. doi:10.1038/sj.onc.1206934
- Ramirez-Jarquín, U., & Tapia, R. (2016). Neuropathological characterization of spinal motor neuron degeneration processes induced by acute and chronic excitotoxic stimulus in vivo. *Neuroscience*, 331, 78-90. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.06.021
- Ramirez-Jarquín, U., Lazo-Gomez, R., & Tapia, R. (2014). Spinal inhibitory circuits and their role in motor neuron degeneration. *Neuropharmacology*, 82(101), 7. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.10.003
- Santa-Cruz, L., Ramírez-Jarquín, U., & Tapia, R. (2012). Role of Mitochondrial Dysfunction in Motor Neuron Degeneration in ALS. En M. M. H, *Amyotrophic Lateral Sclerosis* (págs. 197-224). INTECH.
- Sengottuvel, V., Leibinger, M., Pfreimer, M., Andreadaki, A., & Fischer, D. (2011). Taxol Facilitates Axon Regeneration in the Mature CNS. *The Journal of Neuroscience*, 31(7), 2688-2699. doi:10.1523/JNEUROSCI.4885-10.2011

- Takuma, H., Kwak, S., & Yoshizawa, I. (1999). Reduction of GluR2 RNA editing, a molecular change that increases calcium influx through AMPA receptors, selective in the spinal ventral gray of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 46(6), 806-815. doi:10.1002/1531-8249(199912)46:6<806::AID-ANA2>3.0.CO;2-S
- Tang, B. (2014). Class II HDACs and Neuronal Regeneration. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115, 1225-1233. doi:10.1002/jcb.24802
- Tovar-y-Romo, L. B., & Tapia, R. (2012). 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(2), 1-9. doi:10.1042/AN20110057
- Tovar-y-Romo, L. B., Ramirez-Jarquín, U. N., Lazo-Gómez, R., & Tapia, R. (2014). Trophic factors as modulators of motor neuron physiology and survival: implications for ALS therapy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(61), 1-7. doi:10.3389/fncel.2014.00061
- Tovar-y-Romo, L. B., Zepeda, A., & Tapia, R. (2007). Vascular Endothelial Growth Factor Prevents Paralysis and Motorneuron Death in a Rat Model of Excitotoxic Spinal Cord Neurodegeneration. *Journal Neuropathology*, 66(10), 913-922.
- Tovar-y-Romo, L., & Santa-Cruz, L. D. (2009). Experimental models for the study of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular Neurodegeneration*, 4(31), 1-13. doi:10.1186/1750-1326-4-31
- Tovar-y-Romo, L., Santa-Cruz, L., Zepeda, A., & Tapia, R. (2009). Chronic elevation of extracellular glutamate due to transport blockade is innocuous for spinal motoneurons in vivo. *Neurochemistry international*, 54(3-4), 0197-0186. doi:https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.09.015
- Wang, Z., Qin, G., & Zhao, T. (2014). HDAC4: mechanism of regulation and biological functions. *Epigenomics*, 6(1), 139-150. doi:10.2217/EPI.13.73
- Williams, A., Valdez, G., Moresi, V., Qi, X., McAnally, J., Elliott, J., . . . Olson, E. (2009). MicroRNA-206 Delays ALS Progression and Promotes Regeneration of Neuromuscular Synapses in Mice. *Science*, 326(5959), 1549-1554. doi:10.1126/science.1181046.
- Wood, L., & Langford, S. (2014). Motor Neuron Disease: A Chemical Perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57, 6316-6331. doi:dx.doi.org/10.1021/jm5001584