



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DIVISIÓN DE NEUROCIENCIAS Y BIOFÍSICA

**LAS SIRTUINAS COMO MECANISMO PROTECTOR EN MODELOS DE
NEURODEGENERACIÓN ESPINAL POR EXCITOTOXICIDAD *IN VIVO***

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

RAFAEL ESAID LAZO GÓMEZ

T U T O R P R I N C I P A L

DR. RICARDO TAPIA IBARGÜENGOYTIA - INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

C O M I T É T U T O R

DRA. ANA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ - INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES - INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM



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.

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo de tesis se realizó bajo la tutoría del Dr. Ricardo Tapia Ibargüengoytia en la División de Neurociencias y Biofísica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con los apoyos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, número de proyectos 128629 y 240817) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA, programa PAPIIT, número de proyectos IN201013, IN204516 e IN206719).

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de este trabajo estuvo conformado por:

Dr. Ricardo Tapia Ibargüengoytia	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Rocío Salceda Sacanelles	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Ana Brígida Clorinda Arias	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Por otra parte, los miembros del jurado del examen doctoral fueron:

Dr. Rudolf Marnus Buijs (presidente)	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Rocío Salceda Sacanelles (secretario)	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Luis Bernardo Tovar y Romo (vocal)	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Ataulfo Martínez Torres (vocal)	Instituto de Neurobiología, UNAM
Dr. Abimael González Hernández (vocal)	Instituto de Neurobiología, UNAM

Para realizar mis estudios de doctorado recibí una beca de manutención de CONACyT con el número de CVU 408105. Asimismo, recibí apoyo económico del Programa de Apoyo a los Estudiantes de Posgrado para asistir a congresos internacionales.

Reconozco y agradezco los servicios ofrecidos por las unidades de servicio y el personal del Instituto de Fisiología Celular para llevar a cabo los trabajos de investigación científica reflejados en este documento. En especial, deseo señalar el apoyo de Patricia Salazar Sandoval (técnico académico, jubilado), de Mara Prior González (técnico académico, activo) y de Marina Cristóbal (auxiliar) del laboratorio AL-301; de Daniela Rodríguez Montaña y Teresa Cortés Flores de la Unidad de Histología; de Yazmín Ramiro Cortés de la Unidad de Imagenología, y de Claudia Rivera Cerecedo y del personal del Bioterio y del Vivarium.

Finalmente, reconozco la labor del personal del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM y agradezco la oportunidad de permitirme formar parte de y aportar a la Universidad.

AGRADECIMIENTOS

A Rafael y Teresa por ser la base y el ejemplo.

A Aldo y Abril por ser mis aliados.

A Aldo porque ha decidido acompañarme.

A Citlalli y a Mara por ser más que colegas.

A Abraham, Gabriela, Rubén, Martha, León, Yazmín y Raúl
porque eligen ser mi otra familia.

A Miriam, Abraham y Marco
por mostrarme otras facetas de la vida.

A Chucha porque siempre ha estado ahí.

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

Este trabajo de tesis esta compuesto por siete secciones principales que reflejan la organización del trabajo de investigación desarrollado durante mi formación doctoral. Este trabajo de investigación consistió en estudiar 1) los mecanismos neuroquímicos que subyacen la degeneración excitotóxica de las NMs y 2) el papel de la activación de la sirtuinas como neuroprotectoras de la muerte excitotóxica de la NMs.

1. INTRODUCCIÓN

El marco teórico fundamental necesario para comprender el proyecto es explicado en esta sección: constitución macroscópica y microscópica de la médula espinal, la fisiología y los principios de excitabilidad de las neuronas motoras, las enfermedades de neurona motora, la excitotoxicidad como mecanismo clave de neurodegeneración y el papel de las sirtuinas en la fisiología del sistema nervioso y en trastornos neurodegenerativos.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

Aquí se explican los fundamentos que genera las preguntas de investigación y la justificación para cada uno de los dos proyectos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

4. RESULTADOS

4.1. PRIMER TRABAJO. *Efectos sobre las neuronas motoras de la estimulación crónica de la liberación de glutamato endógeno en la médula espinal in vivo.*

El resultado de este trabajo de investigación es la publicación “Lazo-Gómez R and Tapia R. Motor alterations induced by chronic 4-aminopyridine infusion in the spinal cord *in vivo*: role of glutamate and GABA receptors. *Front Neurosci* (2016) May 9; 10:200. doi: 10.3389/fnins.2016.00200”, que puede consultarse completa en el anexo 13.2.

4.2. SEGUNDO TRABAJO. *Las sirtuinas como mecanismo protector en un modelo de neurodegeneración de neuronas motoras espinales por excitotoxicidad crónica.*

Derivado de este trabajo surgieron dos publicaciones, la revisión “Lazo-Gómez R, Ramírez-Jarquín UN, Tovar-y-Romo LB, Tapia R. Histone deacetylases and their role in motor neuron degeneration. *Front Cell Neurosci* (2013), Dec, 5; 7:243. doi: 10.3389/fncel.2013.00243” y la publicación original “Lazo-Gómez R and Tapia R. Quercetin prevents spinal motor neuron degeneration induced by chronic excitotoxic stimulus by a sirtuin 1-dependent mechanism. *Transl Neurodegener* (2017) Nov 21;6:31. doi: 10.1186/s40035-017-0102-8”, que puede consultarse de manera completa en los anexos 13.1 y 13.3, respectivamente.

5. DISCUSIÓN

En esta sección se consideran los hallazgos de ambos trabajos y se discuten de manera integral, en especial su relevancia de acuerdo a lo expuesto en la Introducción.

6. CONCLUSIONES

CONTENIDOS

RECONOCIMIENTOS	II
AGRADECIMIENTOS	III
ORGANIZACIÓN DE LA TESIS	IV
CONTENIDOS	V
1. Resumen	1
2. Abstract	2
3. Lista de abreviaturas	3
4. Introducción	5
4.1. Neurobiología de la neuronas motoras espinales	5
<i>Médula espinal: consideraciones anatómicas</i>	5
<i>Citoarquitectura de la médula espinal</i>	9
<i>Neuronas motoras espinales: morfología y fisiología sináptica</i>	12
4.2. Neurodegeneración en las enfermedades de neurona motora	15
<i>Enfermedades de neurona motora</i>	15
<i>Mecanismos de degeneración de neuronas motoras</i>	20
4.3. Excitotoxicidad en la degeneración de las neuronas motoras	22
<i>Neurotransmisión glutamatérgica y su función en las NMs espinales</i>	22
<i>Excitotoxicidad como mecanismo de neurodegeneración</i>	25
<i>Modelos animales de ELA basados en excitotoxicidad</i>	28
<i>Neurotransmisión GABAérgica y falla inhibitoria</i>	29
4.5. Las sirtuinas como estrategia de neuroprotección	31
<i>Deacetilasas de histonas: generalidades y clasificación</i>	31
<i>SIRT1 como moduladora de la expresión génica y de la actividad de vías de señalización</i>	35
<i>Papel de SIRT1 en enfermedades degenerativas del sistema nervioso central</i>	37
<i>Activadores e inhibidores de SIRT1</i>	38
<i>SIRT1 y sus blancos como estrategia terapéutica en enfermedades de neurona motora</i>	39
5. Planteamiento del problema	41

6. Objetivos	43
7. Materiales y métodos	45
<i>Animales</i>	45
<i>Preparación de minibombas osmóticas</i>	45
<i>Implante quirúrgico de las minibombas osmóticas</i>	46
<i>Evaluación de la conducta motora</i>	48
<i>Perfusión y fijación</i>	49
<i>Tinción histológica y conteo de NMs</i>	50
<i>Marcaje inmunohistofluorescente y microscopía confocal</i>	51
<i>Conteo de células gliales off-line</i>	52
<i>Análisis estadístico</i>	53
8. Resultados	54
8.1. Efectos sobre las neuronas motoras de la estimulación crónica de la liberación de glutamato endógeno en la médula espinal <i>in vivo</i>	54
<i>La infusión crónica de 4AP induce alteraciones en la conducta motora, que son empeoradas por bicuculina</i>	54
<i>La bicuculina, pero no 4AP, induce degeneración de NMs</i>	57
<i>La activación crónica de GABA_AR con muscimol no previene la parálisis ni la degeneración de NMs inducidas por AMPA</i>	57
<i>La activación crónica de los receptores de glutamato de tipo NMDA ocasiona debilidad reversible y neurodegeneración</i>	59
8.2. Las sirtuinas como mecanismo protector en un modelo de neurodegeneración de neuronas motoras espinales por excitotoxicidad crónica	60
<i>SIRT1 se expresa sólo en las neuronas en la médula espinal</i>	60
<i>Cambios en la conducta motora inducidos por la infusión de AMPA, RSV, QCT o EX527</i>	62
<i>Efectos de la infusión de RSV, QCT o EX527 en la degeneración de NMs inducida por AMPA</i>	65
<i>Efectos de la infusión de AMPA, RSV, QCT o EX527 en el número de astrocitos y de células microgliales</i>	67
<i>La infusión de crónica de butirato de sodio no previene de la parálisis ni la neurodegeneración inducida por AMPA</i>	70
9. Discusión	71

9.1. La estimulación crónica de la liberación de glutamato endógeno en la médula espinal <i>in vivo</i> no provoca muerte de NMs	71
9.2. El efecto neuroprotector de quercetina contra la excitotoxicidad crónica en la médula espinal <i>in vivo</i> es mediado por SIRT1	74
10. Conclusiones	80
11. Perspectivas	81
12. Referencias bibliográficas	83
13. Anexos	96
13.1. Artículo de revisión: <i>Histone deacetylases and their role in motor neuron degeneration.</i>	97
13.2. Artículo original: <i>Motor alterations induced by chronic 4-aminopyridine infusion in the spinal cord in vivo: role of glutamate and GABA receptors.</i>	104
13.3. Artículo original: <i>Quercetin prevents spinal motor neuron degeneration induced by chronic excitotoxic stimulus by a sirtuin 1-dependent mechanism.</i>	113

Al caer, perdió el conocimiento; cuando lo recobró, el presente era casi intolerable de tan rico y tan nítido, y también las memorias más antiguas y triviales. Poco después averiguó que estaba tullido. El hecho apenas le interesó. Razonó (sintió) que la inmovilidad era un precio mínimo. Ahora su percepción y su memoria eran infalibles.

JORGE LUIS BORGES
Funes el Memorioso, 1942

1. RESUMEN

Las enfermedades de neurona motora son un grupo heterogéneo de trastornos degenerativos que se caracterizan por la pérdida selectiva e irreversible de las neuronas motoras de la corteza cerebral, el tronco encefálico y la médula espinal. Esta degeneración provoca debilidad, atrofia muscular y parálisis, culminando con la muerte por complicaciones respiratorias. Los mecanismos que conducen a la muerte de las neuronas motoras no han sido dilucidados por completo y tampoco se cuentan con tratamientos efectivos. Sin embargo, abundante evidencia señala que la excitotoxicidad, que es la activación excesiva de receptores ionotrópicos de glutamato, tiene un papel primordial en la pérdida selectiva de las neuronas motora. En el laboratorio del Dr. Tapia se diseñó un modelo *in vivo* de excitotoxicidad crónica espinal que replica algunos rasgos de las enfermedades de neurona motora. Este modelo consiste en la infusión crónica y continua en la médula espinal lumbar, mediante minibombas osmóticas, de agonistas del receptor de glutamato de tipo AMPA.

Previamente nuestro grupo demostró que la estimulación de la liberación de glutamato endógeno, mediante la administración de 4-aminopiridina, causaba muerte neuronal en el hipocampo y el estriado dependiente de la activación de receptores de glutamato. El modelo de excitotoxicidad crónica espinal depende de la administración de un agonista de glutamato exógeno, por lo que evaluamos el efecto de la infusión crónica de 4-aminopiridina a la médula espinal *in vivo* y sus características neuroquímicas. Este tratamiento no provocó muerte neuronal, pero causó alteraciones en la conducta motora dependientes de la activación de receptores de glutamato, en especial los de tipo NMDA. Por el contrario, observamos que el bloqueo crónico de la neurotransmisión inhibitoria condujo a la pérdida de neuronas motoras. Con estos hallazgos concluimos que la estimulación crónica de la liberación de glutamato endógeno ocasiona alteraciones motoras pero no provoca muerte de neuronas motoras, a diferencia de la falla inhibitoria crónica, que podría constituir otro mecanismo relevante de degeneración de neuronas motoras.

También estudiamos el potencial efecto neuroprotector de la activación de sirtuina 1 en nuestro modelo como estrategia terapéutica. En varios modelos de neurodegeneración se ha observado que la activación de sirtuina 1 mediante polifenoles (como el resveratrol y la quercetina) confiere neuroprotección, aunque su papel en las enfermedades de neurona motora no ha sido del todo establecidos. Es por ello que evaluamos el efecto de la administración crónica de resveratrol o quercetina en nuestro modelo de excitotoxicidad espinal crónica *in vivo*. Primero, observamos que sirtuina 1 se expresa de manera preferente en somas neuronales de la médula espinal, pero no en la glía. Después, encontramos que la administración de resveratrol no tuvo efectos y que sólo quercetina evitó la muerte de neuronas motoras, la parálisis y la astrogliosis inducidas por excitotoxicidad. Este efecto era parcialmente prevenido por un inhibidor selectivo de sirtuina 1. Además, la inhibición crónica de sirtuina 1 no provocó ni evitó la degeneración de neuronas motoras, pero previno la astrogliosis y la microgliosis, inducidas por excitotoxicidad. Estos resultados sugieren que sirtuina 1 se encuentra involucrada en la degeneración neuronal mediada por excitotoxicidad y que su activación podría representar una estrategia terapéutica para enfermedades de neurona motora.

2. ABSTRACT

Motor neuron disease is a heterogeneous group of degenerative disorders characterized by the selective and irreversible loss of motor neurons, located in the cerebral cortex, brainstem and spinal cord. This degeneration results in weakness, muscle atrophy and paralysis, which leads to death due to respiratory complications. Mechanisms underlying motor neuron degeneration have not been completely elucidated and there are no effective treatments. However, a great amount of evidence suggests that excitotoxicity, the excessive activation of ionotropic glutamate receptors, plays a pivotal role in the selective loss of motor neurons. In Dr. Tapia's laboratory an *in vivo* model of chronic spinal cord excitotoxicity was developed that replicates some of the features of motor neuron diseases. This model is achieved through the continuous and chronic infusion into the lumbar spinal cord tissue of an AMPA-type glutamate receptors agonist, using osmotic minipumps.

Our group previously demonstrated that the stimulation of endogenous glutamate release, through 4-aminopyridine administration, caused neuronal death in the hippocampus and striatum. This effect is dependent on the activation of glutamate receptors. The model of chronic spinal excitotoxicity depends on the administration of an exogenous glutamate receptor agonist. Thus we studied the effect of the chronic infusion of 4-aminopyridine into the spinal cord *in vivo* and its neurochemical characteristics. This treatment did not result in motor neuron death, although it caused motor behavioral alterations that were due to the activation of glutamate receptors, especially of the NMDA type. On the contrary, the chronic blockade of inhibitory neurotransmission led to motor neuron loss. With these findings we concluded that the chronic stimulation of endogenous glutamate release leads to motor behavior alteration but does not cause motor neuron death. However chronic inhibitory failure does provoke neuronal loss, which might constitute another relevant mechanisms of motor neuron degeneration.

We studied the potential neuroprotective effect of sirtuin 1 activation in our model as a therapeutic strategy, as well. Sirtuin 1 activation through polyphenols, such as resveratrol and quercetin, confers protection in several models of neurodegeneration although its role in motor neuron diseases has not been definitely established. Therefore we evaluated the effect of the chronic administration of resveratrol or quercetin in our model of chronic excitotoxicity in the spinal cord *in vivo*. We first observed that sirtuin 1 is expressed preferentially in neuronal somas in the spinal cord and is absent in glia. Then, we found that resveratrol had no effects and that only quercetin administration prevented excitotoxic motor neuron death, paralysis and astrogliosis. This effect was partially prevented by a sirtuin 1 selective inhibitor. Also, chronic inhibition of sirtuin 1 did not cause or prevent excitotoxic motor neuron degeneration, but prevented astrogliosis and microgliosis. These results suggest that sirtuin 1 is involved in excitotoxic motor neuron degeneration and that sirtuin 1 activation might represent a therapeutic strategy for motor neuron diseases.

3. LISTA DE ABREVIATURAS

SIRT	Sirtuina	AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
HDAC	Deacetilasa de histona	NMDA	Ácido N-metil-D-aspartico
RSV	Resveratrol	PBS	Amortiguador de fosfato y sodio
QCT	Quercetina	OAADPr	O-acetil-ribosil-difosfato de adenosina
EX	EX527, selisistat	ME	Médula espinal
NM	Neurona motora	KA	Ácido kaínico
ENM	Enfermedad de neurona motora	VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica	AMPK	Cinasa de proteínas activada por AMP
AEM	Atrofia espinal muscular	SNC	Sistema nervioso central
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido	4AP	4-aminopiridina
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado	BIC	Metbromuro de bicuculina
PDC	Ácido L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxílico	MK801	Dizocilpina
PGC1α	Coactivador glicosilado 1 α de PPAR γ	NBQX	2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahidrobenzo[f]quinoxalina-7-sulfonamida
PPARγ	Receptor activador de la proliferación de peroxisomas γ	hSOD1	Superóxido dismutasa humana
HXKXac	Lisinas acetiladas (posición X) de la histona X	SOD1^{G93A}	SOD1 mutante con sustitución de alanina por glicina en posición 93
GABA	Ácido γ -aminobutírico	GluR	Receptor de glutamato
MUSC	Muscimol	NF-κB	Factor nuclear κ B

GABA_AR Receptor de GABA tipo A

HSP Proteína de choque térmico

TDP43 Proteína del unión al ADN de
respuesta transactiva de 43 kDa

4. INTRODUCCIÓN

4.1. NEUROBIOLOGÍA DE LAS NEURONAS MOTORAS ESPINALES

Médula espinal: consideraciones anatómicas

El sistema nervioso central de los mamíferos se compone, desde un punto de vista anatómico, de encéfalo y de médula espinal. El encéfalo está compuesto por aquellas regiones que se encuentran en el interior de la cavidad craneal y varias porciones del tubo neural embriológico lo originan (ver Tabla 4.1) (Jessell & Sanes 2013).

TABLA 4.1. DERIVADOS EMBRIOLÓGICOS DE LAS REGIONES DEL TUBO NEURAL

Región del tubo neural		Componentes derivados
Prosencéfalo	Telencéfalo	Hemisferios cerebrales, hipocampo, bulbos olfatorios
	Diencefalo	Retina, tálamo, hipotálamo, epitalamo
Mesencéfalo		Pedúnculos cerebrales, sustancia nigra, mesencéfalo
Rombencéfalo	Metencéfalo	Cerebelo, puente de Varolio
	Mielencéfalo	Bulbo raquídeo
Tercio distal del tubo neural		Médula espinal

En cambio, la médula espinal es la porción del sistema nervioso central que se encuentra dentro del canal vertebral. El canal vertebral resulta de la organización, en el eje vertical, de cada uno de los forámenes vertebrales. Embriológicamente, la médula espinal deriva del resto del tubo neural que no constituye el encéfalo (Sadler 2005).

Macroscópicamente se trata de un cordón cilíndrico, que se origina inferiormente a la decusación de la pirámides del bulbo raquídeo, sitio donde el tracto corticoespinal cambia de lateralidad. La médula espinal presenta dos intumescencias, o engrosamientos, a nivel cervical y lumbar. En la porción más caudal, a nivel de la vértebra lumbar 1 (L1) en el humano adulto, la médula espinal termina en un adelgazamiento conocido como cono medular. El cono medular se continua en un filamento fibroso y elástico de tejido conectivo que se fusiona con las meninges, el *filum terminale*, y se ancla a la porción posterior de la primera vértebra coccígea (Figura 4.1). En contraste, en la rata la médula espinal termina al nivel de la vértebra L3 y no existe el cono medular, mientras que el *filum terminale* posee los mismos componentes citoarquitectónicos básicos de la médula espinal y termina en la tercera vértebra caudal (Watson & Katyaloglu 2009).

En la cara anterior y en la línea media, la médula espinal presenta un hundimiento estrecho y profundo, conocido como fisura anterior, que divide a la médula en dos porciones laterales. Lateralmente a la fisura anterior, también en la cara anterior, es posible apreciar otras dos fisuras paramedianas que son más superficiales, llamadas fisuras anterolaterales. En el humano, cada dos a

tres centímetros (cm), dichas fisuras presentan la emergencia de 6 a 8 cordones nerviosos finos, que tras una longitud de 1 a 2 cm se fusionan en un único cordón nervioso, conocido como raíz ventral. Dicha raíz se encuentra constituida por los axones de neuronas motoras, e inervan a músculos específicos de acuerdo a la región de la médula espinal que se trate; esto forma el sistema eferente de la médula espinal.

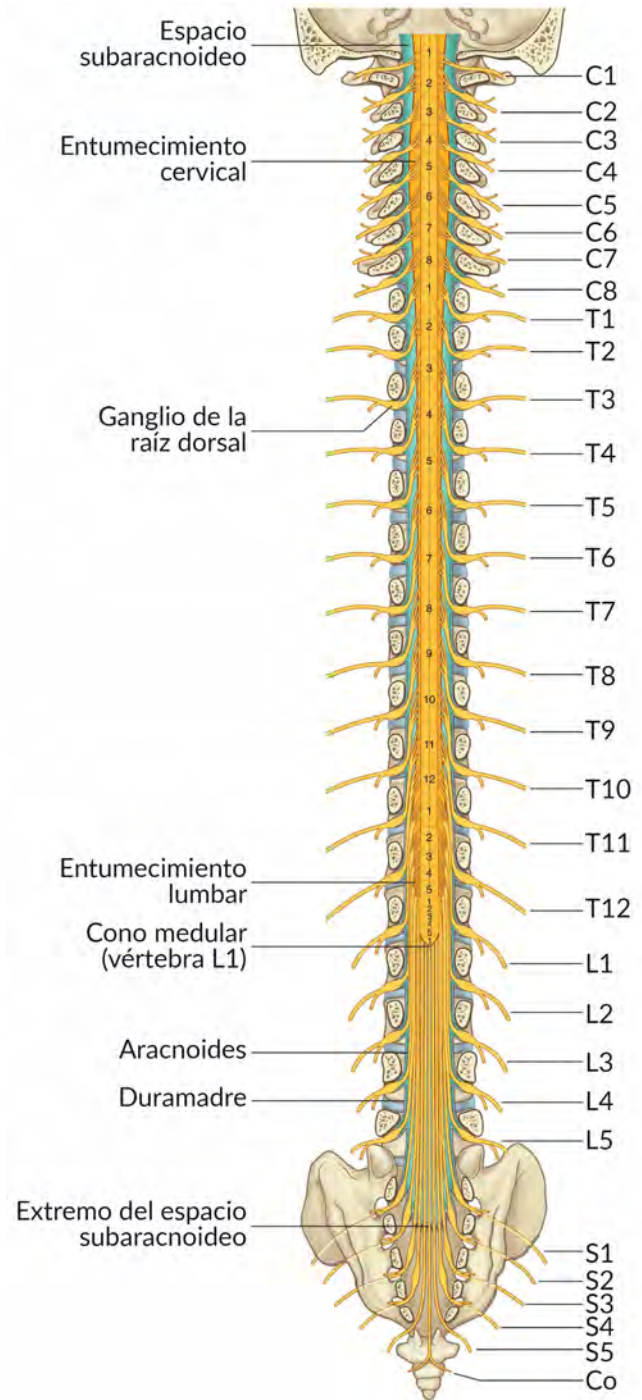


Figura 4.1. Vista posterior de la médula espinal y el canal vertebral del humano adulto. La médula espinal inicia en la decusación de las pirámides, en la unión con el bulbo raquídeo, y termina en el cono medular a la altura de la vértebra L1. De cada foramen intervertebral emerge una raíz espinal, la cual brinda la inervación de cada territorio corporal. De este hecho deriva la regionalización de la médula espinal en cuatro segmentos: cervical (C1-C8), torácico (T1-T12), lumbar (L1-L5), sacro (S1-S5) y cóccigeo (Co). Figura tomada y modificada de Drake *et al.* 2015, p. 62.

De la porción posterior se puede apreciar también una fisura mediana que corre verticalmente, mucho más superficial que la fisura anterior, conocida como fisura posterior. Asimismo, a cada lado de la fisura posterior se encuentra una fisura paramediana de la cual emergen 6 a 8 cordones nerviosos finos que presentan aproximadamente las mismas características anatómicas que aquellas que originan la raíz ventral, sólo que en este caso originan a la raíz dorsal. Sin embargo, una diferencia notable es la presencia de un ensanchamiento, llamado ganglio de la raíz dorsal, encontrado justo lateral a la fusión de los cordones nerviosos en la raíz dorsal. Dicha raíz se encuentra formada por los axones de las neuronas bipolares sensitivas, constituyendo el sistema aferente de la médula espinal. Los somas de estas neuronas residen en el ganglio de la raíz dorsal.

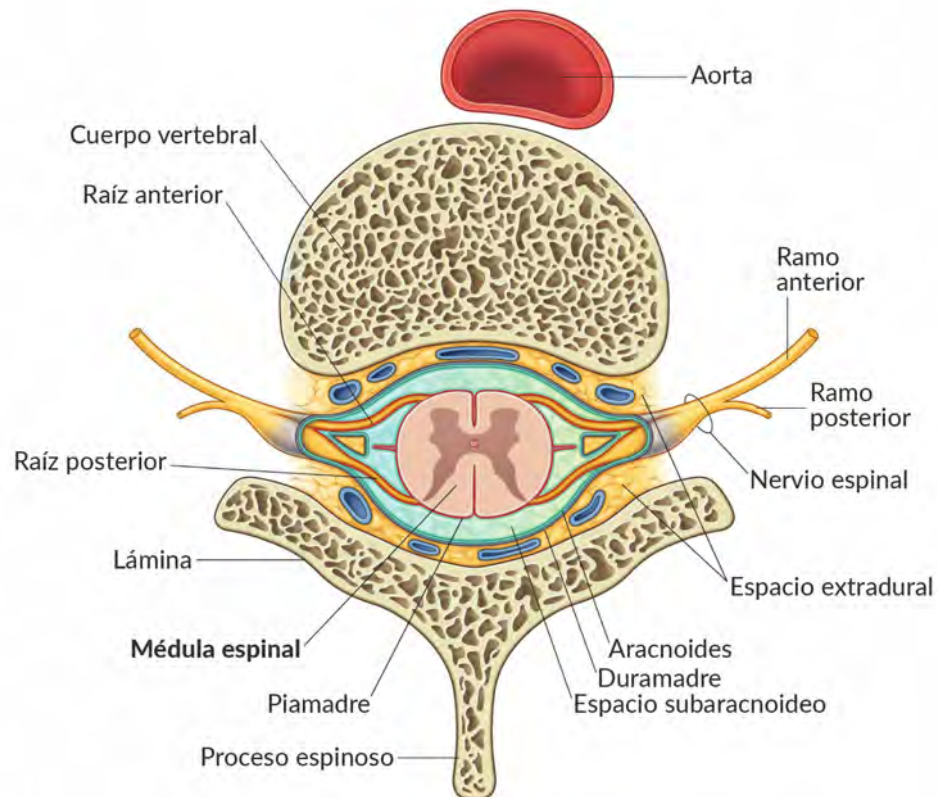


Figura 4.2. La médula espinal se encuentra dentro del canal vertebral, recubierta por las meninges (duramadre, aracnoides y piamadre). Nótese que de los forámenes intervertebrales salen las raíces espinales, cada una de las cuales brinda la inervación de cada territorio corporal. Figura tomada y modificada de Drake *et al.* 2015, p. 59.

Las raíces dorsales y ventrales emergen a la misma altura una de la otra, y a cada lado, de la médula espinal. Asimismo, ambas tienen un patrón de inervación sensitiva y motora territorial específico y reproducible entre individuos de la misma especie. Por tanto, existe una correspondencia entre regiones de la médula espinal, en el eje vertical, con las regiones corporales. Esta correspondencia deriva de la segmentación de la médula espinal desde su desarrollo embrionario. A

cada segmento de la médula espinal, marcado por la emergencia de las raíces espinales, se conoce como mielómero. Aproximadamente 1.5 a 2.5 cm de su emergencia, ambas raíces se fusionan en una única raíz espinal en la que después ocurrirá redistribución de los axones en diferentes cordones nerviosos, o nervios periféricos, de manera más o menos estereotipada en su trayecto hacia sus blancos de inervación (Figura 4.2).

Existe una correspondencia clara entre los mielómeros, en la médula espinal, con las raíces espinales. En el humano, existen 31 mielómeros que se organizan en cuatro regiones, que son cervical (8 mielómeros, gran parte de los cuales otorgan la inervación a los miembros superiores o torácicos), torácica (12 mielómeros, que inervan tórax y abdomen), lumbar (5 mielómeros, que proporcionan la inervación a la porción anterior de los miembros inferiores o pélvicos), sacra (5 mielómeros, cuyo blanco es la región posterior de los miembros pélvicos, el periné, ano y genitales) y coccígea (un mielómero). De manera similar, en la rata los mielómeros se organizan en las mismas regiones, con la diferencia de que la región torácica presenta trece mielómeros, la lumbar tiene seis, la sacra tiene cuatro y la coccígea tiene tres (que inervan la cola), para un total de 34 mielómeros (Kayalioglu 2009a).

Las raíces espinales salen del interior del canal vertebral a través de los forámenes intervertebrales, compuestos por la hendidura inferior del arco vertebral, superiormente, y por la hendidura superior del arco vertebral, inferiormente (Kayalioglu 2009b). Como ya se había mencionado, las raíces espinales están constituidas por los axones motores y sensitivos que se originan de y van hacia la médula espinal. Dicho axones siguen una redistribución posterior en plexos y nervios periféricos terminales, de tal manera que estos pueden tener axones de neuronas aferentes y eferentes al mismo tiempo. Sin embargo, existe una segmentación de los territorios cutáneos inervados por cada raíz dorsal, así como de los músculos inervados por cada raíz ventral. A éstos segmentos se les conoce como dermatomas para el primer caso, y miotomas para el segundo caso (Kayalioglu 2009a). En la Tabla 4.2 se presentan los miotomas de la extremidad pélvica de la rata, que fueron considerados en los trabajos experimentales presentados en esta tesis (Mohan *et al.* 2015). Esta correspondencia entre una porción del sistema nervioso central con un territorio, o patrón, corporal periférico se le conoce como organización somatotópica, y es uno de los motivos anatómo-funcionales más recurrentes del sistema nervioso.

Como continuación del encéfalo, y hacia el *filum terminale*, las tres meninges recubren también a la médula espinal. Se trata de tres membranas protectoras constituidas fundamentalmente por tejido conectivo que, de externo a interno, se conocen como duramadre, aracnoides y piamadre (o pia). La duramadre es una membrana resistente, mientras que la aracnoides presenta un espacio, el subaracnoideo, donde se encuentra el líquido cefalorraquídeo. Finalmente, la piamadre es la membrana que se encuentra en íntimo contacto con la superficie de la médula espinal, y del resto del sistema nervioso (Kayalioglu 2009b) (Figura 4.2).

El aporte sanguíneo de la médula espinal está dado por un círculo anastomótico arterial que deriva de tres arterias espinales longitudinales, una anterior (o ventral) y dos posteriores (o dorsales). La

arteria espinal anterior deriva de la arteria vertebral en la porción más cefálica de la médula espinal, y se dirige caudalmente por fisura ventral mediana. Por su parte, las arterias espinales dorsales derivan de la arteria vertebral o de las primeras ramas de ésta, es decir, de las arterias cerebelosas postero-inferiores. De la misma manera, se originan en el extremo cefálico de la médula espinal y descienden hacia el extremo caudal por las fisuras dorsales paramedianas. La red arterial recibe también aportes de las arterias intercostales, vertebrales, cervicales profundas y lumbares, todas ramas segmentarias de la aorta (Watson & Kayalioglu 2009).

TABLA 4.2. MIOTOMOS DE LA EXTREMIDAD PÉLVICA DE LA RATA

Mielómero	Músculos inervados
L2	<i>Vastus medialis, vastus lateralis, gracilis, biceps femoris</i>
L3	<i>Vastus medialis, vastus lateralis, gluteus maximus, gracilis, biceps femoris, tibialis</i>
L4	<i>Vastus medialis, gluteus maximus, gracilis, semitendinosus, biceps femoris, tibialis, gastrocnemius</i>
L5	<i>Gluteus maximus, gracilis, semitendinosus, biceps femoris, tibialis, gastrocnemius</i>
L6	<i>Gluteus maximus, gastrocnemius</i>
S1	<i>Gastrocnemius</i>

Basado en los resultados de Mohan *et al.* 2015

Citoarquitectura de la médula espinal

En el interior de la médula se encuentra la sustancia gris, cuyo aspecto está dado por la abundante presencia de somas neuronales. La sustancia gris presenta forma de mariposa, aunque esta forma varía de acuerdo a la región de la médula espinal que se considere, y está organizada en dos astas ventrales, dos astas dorsales, dos astas intermediolaterales (en las regiones torácica y lumbar) y una región central (Watson & Kayalioglu 2009) (Figura 4.3).

La sustancia gris espinal presenta una organización intrínseca, dada por zonas de regularidad en la morfología celular conocidas como láminas de Rexed (Figura 4.3). Esta organización ha sido encontrada en varias especies de mamíferos, aunque fue originalmente descrita en el gato (Rexed 1954) y se ha estudiado en detalle en el ratón, la rata y el humano. De dorsal a a rostral (o de posterior a anterior) se identifican 10 láminas, cada una de las cuales tiene citoarquitectura, conectividad, funciones y quimioarquitectura características (Heise & Kayalioglu 2009).

Las láminas 1 a 4 son las principales regiones receptoras cutáneas de las neuronas bipolares del ganglio dorsal. La lámina 1, conocida también como el núcleo posteromarginal, está compuesta principalmente por neuronas fusiformes y el neuropilo tiene un aspecto reticular. La mayor parte de las neuronas contienen ácido γ -aminobutírico (GABA), aunque se han identificado también neuropéptidos como la sustancia P, dinorfina y encefalina. La lámina 2, también llamada sustancia gelatinosa, contiene

neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas que modulan la transmisión nociceptiva dentro del asta dorsal. La lámina 3 contiene una población morfológicamente heterogénea de neuronas GABAérgicas, glicinérgicas y colinérgicas. Las neuronas de esta lámina responden a la estimulación táctil, ya sea ligera o por presión intensa. La lámina 4 contiene neuronas GABAérgicas que responden a estímulos no nociceptivos.

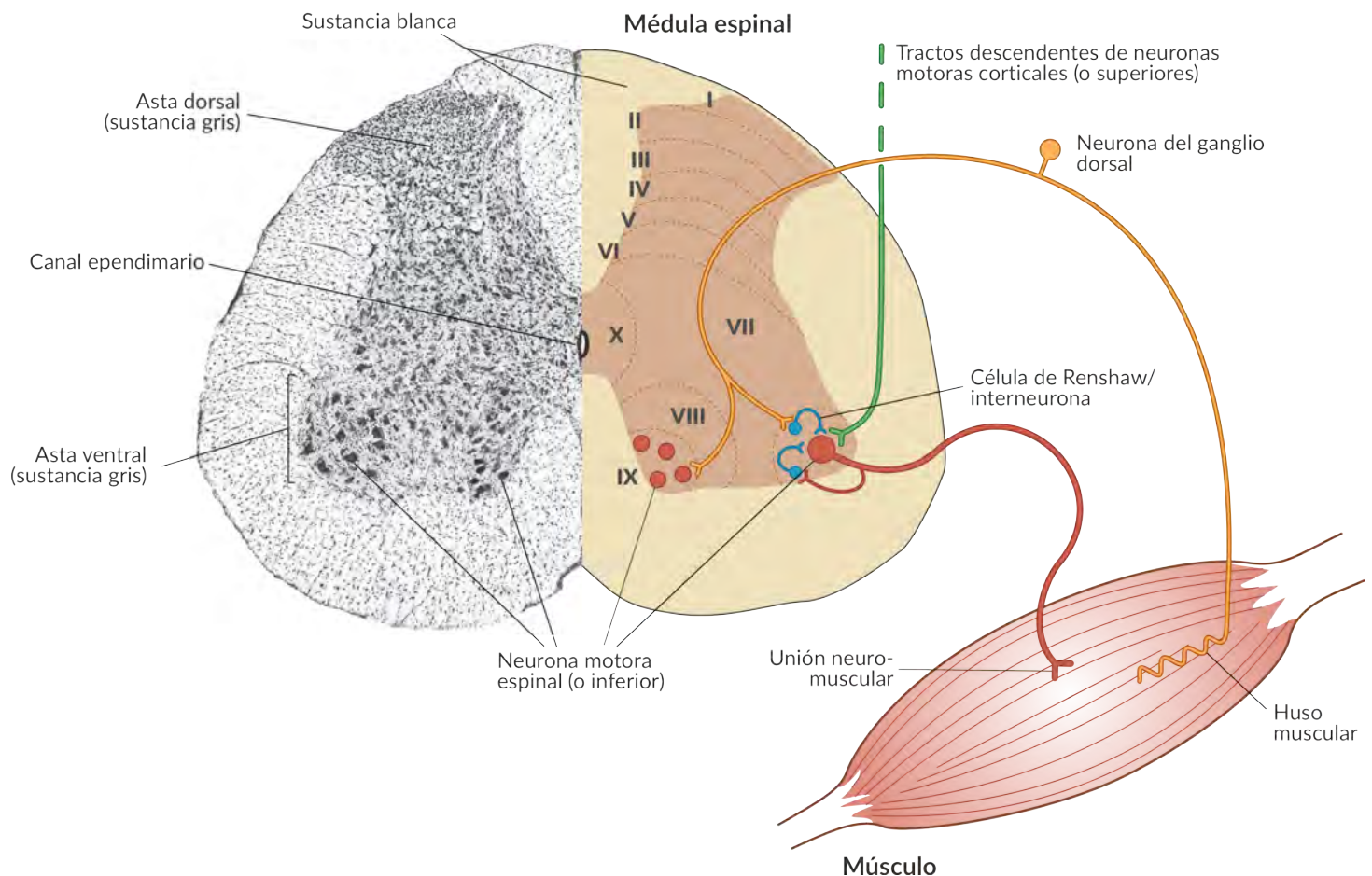


Figura 4.3. Citoarquitectura de la médula espinal. **Izquierda,** Micrografía representativa de un corte transversal de la médula espinal de la rata en el mielómero L3, teñida con violeta de cresilo (tinción de Nissl, ver sección *Tinción y conteo de NMs* en MATERIALES Y MÉTODOS). En la porción periférica del cordón medular se encuentra la sustancia blanca, formada por tractos axonales ascendentes y descendentes. En la parte central se puede apreciar la sustancia gris, la cual se divide en dos astas, dorsal y ventral. En el asta ventral se encuentran las NMs. **Derecha,** Esquema de la organización de las láminas de Rexed en la sustancia gris y de algunas aferencias que llegan a las NMs. Las NMs espinales se encuentran en la lámina IX. Establecen contacto sináptico con las fibras musculares (en la unión neuromuscular) y la neurotransmisión está mediada por acetilcolina. Reciben sinapsis inhibitorias (GABAérgicas y glicinérgicas) de interneuronas propioespinales y células de Renshaw, mientras que la excitación (mediada por glutamato en este caso) procede de las neuronas del ganglio dorsal y de tractos descendentes, provenientes de la corteza motora, por ejemplo. Micrografía izquierda tomada de Watson *et al.* 2009, p. 290.

La lámina 5 recibe estimulación sensitiva de varias modalidades de las vísceras, los músculos y las articulaciones, así como fibras rubroespinales. Contiene neuronas estelares, fusiformes y triangulares que liberan GABA principalmente. Estas neuronas proyectan sus axones a centros supraespinales, como el cerebelo, para enviar información mecano-, noci- y multirreceptiva de la periferia. El núcleo dorsal, o columna de Clarke, se encuentra en la láminas 5 a 10, en los segmentos T1 a L3. Recibe aferentes de las extremidades pélvicas y sus axones forman el tracto espinocerebeloso.

La lámina 6 constituye la porción más profunda del asta dorsal. Las interneuronas de esta lámina están involucradas en vías reflejas, reciben sobre todo axones colaterales de las fibras aferentes del huso muscular del grupo Ia. A su vez, la mayor parte de estas neuronas son propioespinales, aunque algunas se proyectan al cerebelo o al bulbo raquídeo. La lámina 7 corresponde al asta intermedio-lateral. Sus neuronas son consideradas interneuronas premotoras GABAérgicas que reciben axones de regiones del encéfalo involucradas con el control motor, como la corteza motora, el núcleo rojo y la sustancia gris periacueductal. Los axones de estas neuronas terminan generalmente en la lámina 9, donde residen las neuronas motoras espinales (NMs), en donde realizan la modulación de la función motora. Las neuronas preganglionares del sistema nervioso autónomo también se encuentran en la lámina 7, en los núcleos intermediolateral e intercalado.

Las neuronas de la lámina 8 son morfológicamente heterogéneas, son GABAérgicas en su mayoría y ocupan la mayor parte del asta ventral. Establecen conexiones contralaterales propioespinales con las láminas 7, 8 y 9, llamadas fibras comisurales. Las neuronas de la lámina 8 tienen un papel fundamental en la coordinación de la actividad motora entre ambos lados del cuerpo.

Las neuronas motoras espinales (NMs) son neuronas colinérgicas que residen en la lámina 9, en la base del asta ventral. La mayor parte de las NMs son neuronas motoras α , que son neuronas multipolares grandes que inervan el músculo estriado. Existe otra población de neuronas, las neuronas motoras γ , que constituyen sólo el 30% de las neuronas en la lámina 9 y, aunque también son multipolares, son de menor tamaño. Estas neuronas inervan las fibras del huso muscular. Las NMs se organizan en columnas motoras longitudinales que proporcionan la internación eferente a grupos musculares específicos. Además, se ha observado un cierto grado de organización somatotópica en esta lámina, puesto que es común observar grupos de columnas motoras mediales y laterales, que se corresponden con los grupos musculares mediales y laterales, respectivamente.

En el centro de la sustancia gris se encuentra el canal central, o canal endimario, continuación del sistema ventricular del encéfalo y que discurre a lo largo de toda la médula espinal. En el feto y en el recién nacido el canal endimario se encuentra permeable y contiene líquido cefalorraquídeo en su interior, mientras que el adulto éste se oblitera en varios segmentos. Recubriendo el interior del canal endimario se encuentran células epiteliales columnares con vellosidades, las células del epéndimo, que hacen circular el líquido cefalorraquídeo y mantienen constante su composición. Alrededor del canal endimario se encuentra la lámina 10, compuesto de una población heterogénea de neuronas

desde el punto de vista morfológico y neuroquímico. Esta lámina recibe aferencias somáticas y viscerales nociceptivas (Heise & Kayalioglu 2009).

Rodeando a la sustancia gris se encuentra la sustancia blanca, cuyo aspecto está dado por la abundancia de axones mielinizados ascendentes y descendentes desde y hacia el encéfalo. La forma de la sustancia gris divide a la sustancia blanca en regiones o funículos, que son el anterior, el posterior y el lateral. A su vez, estos funículos están compuestos por fascículos o tractos, que son grupos de axones que presentan una relación funcional común (Watson & Kayalioglu 2009).

Neuronas motoras espinales: morfología y fisiología sináptica

La mayor parte de la investigación original sobre neurodegeneración se ha centrado en las NMs α , por lo que en esta tesis se hará sólo referencia a este subtipo de neurona motora. Las NMs lumbares de la rata son neuronas multipolares cuyo soma mide 35 μm de diámetro y tiene entre 6 y 12 dendritas primarias. Estas dendritas se ramifican sobre todo en el asta ventral ipsilateral, especialmente en dirección rostrocaudal y dorsoventral (1.5 y 1.3 mm en promedio, respectivamente). Del 96 al 98% de la superficie de las NMs lumbares está constituida por sus dendritas (Chen & Wolpaw 1994) y la gran mayoría de las sinapsis se encuentran en el árbol dendrítico (Rall *et al.* 1992). Por otro lado, más del 70% de la superficie del soma está cubierta por botones sinápticos (Ichiyama *et al.* 2006).

Las NMs constituyen la vía final común que vincula el sistema nervioso central (SNC) con la conducta motora. La regulación de la excitabilidad de las NMs depende en gran medida de canales activados por voltaje. La descripción detallada de cada una de las corrientes iónicas dependientes de voltaje está fuera del alcance de este trabajo, aunque se presentarán brevemente las más relevantes (ver Tabla 4.3). Todas las NMs presentan corrientes de sodio rápidamente inactivantes ($I_{\text{Na}i}$) que explican los potenciales de acción dependientes de sodio. Los canales de sodio activados por voltaje (Na_v) responsables de la $I_{\text{Na}i}$ se encuentran en el segmento inicial del axon. (Rekling *et al.* 2000).

Los canales de potasio activados por voltaje (K_v) son los principales determinantes del potencial de membrana (o de reposo), la forma del potencial de acción, las propiedades de disparo y los principales blancos de los neuromoduladores de la excitabilidad de las NMs (McLarnon 1995). Los K_v determinantes de las corrientes potasio se encuentran distribuidos en las dendritas, el soma, el segmento inicial y el axón de las NMs (Rekling *et al.* 2000). En un experimento *in vivo* en ratas anestesiadas se determinó que el potencial de membrana de NMs lumbares era de -78 a -52 mV (Turkin *et al.* 2010). Este valor es positivo al potencial de equilibrio del K^+ , lo que sugiere que el potencial de membrana es resultado del balance entre las conductancias salientes de K^+ , entrante de Na^+ y de fuga de Cl^- . Varias corrientes de potasio que explican el potencial de membrana y la excitabilidad de las NMs: rectificante retardada ($I_{\text{K}dr}$), rectificante entrante ($I_{\text{K}ir}$), entrante activada por hiperpolarización (I_h), saliente transitoria (I_A) y activada por calcio (Rekling *et al.* 2000).

TABLA 4.3. CORRIENTES DE MEMBRANA ENCONTRADAS EN LAS NEURONAS MOTORAS ESPINALES DE MAMÍFERO Y SUS CARACTERÍSTICAS

Corriente (iones)	Función propuesta	Neurotransmisores moduladores
I_{Na_i} (Na^+)	Potencial de acción	
I_{Na_p} (Na^+)	Lleva el potencial de membrana a umbral de disparo, amplifica el PPSE, relaciona directamente el disparo con el ingreso de corriente	5-HT
$I_{K_{leak}}$ (K^+)	Contribuye a establecer el potencial de membrana (o de reposo)	TRH, NE, SP, 5-HT y mGlu
$I_{K_{ir}}$ (K^+)	Contribuye a establecer y estabilizar el potencial de membrana	
$I_{K_{dr}}$ (K^+)	Repolarización tras el potencial de acción, post-hiperpolarización rápida	
I_h (K^+ , Na^+)	Contribuye a establecer y estabilizar el potencial de membrana y los potenciales de rebote	5-HT, NE
I_A (K^+)	Contribuye a establecer el potencial de membrana, controla el inicio de disparo	NE
$I_{Cl_{leak}}$ (Cl^-)	Contribuye a establecer el potencial de membrana	
$I_{K_{Ca(BK)}}$ (K^+)	Repolarización tras el potencial de acción	
$I_{K_{Ca(SK)}}$ (K^+)	Determina la post-hiperpolarización	
$I_{Ca_{HVA}}$ (Ca^{2+})	Contribuye a la post-despolarización, a la post-hiperpolarización y a los potenciales de meseta	5-HT, adenosina, mGlu
$I_{Ca_{LVA}}$ (Ca^{2+})	Contribuye a la post-despolarización y a la repolarización tras el potencial de acción	5-HT
$I_{Na_{Ca}}$ (Na^+)	Determina los potenciales de meseta y la post-despolarización en neuronas motoras especializadas	
$I_{K_{Na}}$ (K^+)	Determina la hiperpolarización post-descarga	

5-HT, serotonina; mGlu, glutamato a través de receptores metabotrópicos; NE, norepinefrina; SP, sustancia P; TRH, hormona liberadora de tirotrinas.

Tomado y modificado de Reckling *et al.* 2000

Las corrientes de potasio rectificantes son aquellas en las que ocurren cambios en la conductancia de acuerdo con ciertos potenciales de membrana. Varios canales subyacen las corrientes rectificantes. La $I_{K_{dr}}$ es una corriente saliente de K^+ sostenida activada por despolarización. Esta corriente contribuye a la modulación de la trayectoria en la membrana de los potenciales de acción y de la post-hiperpolarización rápida. El tetraetilamonio (TEA) bloquea la $I_{K_{dr}}$, lo que provoca que el potencial de acción se prolongue y la post-hiperpolarización sea suprimida. Por otro lado, la I_A es una corriente de K^+ activada por despolarización e inactivada por hiperpolarización, que modula el inicio y la frecuencia de disparo de las NMs. La 4-aminopiridina (4AP) bloquea esta corriente, lo que prolonga

la espiga de repolarización y reduce la post-hiperpolarización rápida (McLarnon 1995, Rekling *et al.* 1995).

Las corrientes de calcio están involucradas en la fase de caída del potencial de acción, en la espiga post-despolarización y en la post-hiperpolarización. Estas corrientes están determinadas por canales de calcio dependientes de voltajes (Cav) (Rekling *et al.* 2000). En las NMs se han identificado Cav dependientes de voltaje alto (tipos L, N y P) y dependientes de voltaje bajo (tipo T) (Umemiya & Berger 1994). Aunque se conoce en gran detalle las propiedades electrofisiológicas de los Cav en las NMs del núcleo hipogloso (en el tallo cerebral) de la rata neonatal, poco se conoce acerca de sus funciones en las NMs espinales (Rekling *et al.* 2000). Se ha determinado que los Cav tipo L y N se expresan en el soma y en las dendritas proximales de las NMs (Westenbroek *et al.* 1998).

La regulación de la excitabilidad de las NMs y la integración sináptica son muy complejas. Esta tarea es elemental para la expresión de la conducta motora. Hay dos mecanismos identificados para lograr dicha regulación: dependiente de receptores ionotrópicos y dependiente de neuromoduladores. Los receptores ionotrópicos son activados por neurotransmisores que, una vez unidos a su receptor, provocan la apertura de un canal iónico que es parte del receptor; glutamato, GABA y glicina tienen receptores de este tipo. Los neuromoduladores son neurotransmisores que activan a receptores metabotrópicos que desencadenan cascadas de señalización que finalmente alteran las respuestas de los receptores ionotrópicos. Los neuropéptidos y las aminas (como serotonina, dopamina y norepinefrina) son ejemplos de neuromoduladores. Este mecanismo de regulación de la excitabilidad es más relevante fisiológicamente para las actividades de las NMs que la activación pura de los receptores ionotrópicos (Heckman *et al.* 2009).

La mayoría de las aferencias sinápticas que reciben las NMs provienen de neuronas propioespinales (ver sección 4.2. *Citoarquitectura de la médula espinal*) (Holstege 1991). Entre las más relevantes son axones colaterales recurrentes provenientes de otras NMs que inervan grupos musculares relacionados, sinapsis inhibitorias originadas de las neuronas de Renshaw (dirigidas sobre todo a NMs que inervan músculos proximales), de interneuronas y de otras neuronas que reciben estímulos de la piel, músculos y articulaciones en el mismo segmento espinal o de segmentos superiores. Estos circuitos propioespinales originan patrones de actividad rítmicos y coordinados, que se sugiere son la base de tareas motoras estereotipadas e independientes de centros superiores del sistema nervioso, como la marcha y el rascado (Rekling *et al.* 2000).

Otras neuronas aferentes cuyos somas se localizan en centros superiores del sistema nervioso, como el tallo cerebral y el mesencéfalo, también establecen sinapsis con las NMs (Tabla 4.4). Éstas neuronas son llamadas también neuronas premotoras. Los núcleos del rafé pálido y oscuro, ubicados en el bulbo raquídeo, contienen neuronas serotoninérgicas que envían sus proyecciones directamente a las NMs a través de los funículos ventrales y laterales. Por su parte, las neuronas premotoras del *locus coeruleus*, ubicado también en el bulbo raquídeo, son noradrenérgicas. Otras regiones, como el núcleo retroambiguo, la médula ventromedial y ventrolateral, el núcleo del tracto solitario y el sistema vestibuloespinal, son inhibitorias (es decir, su neurotransmisor es GABA o glicina). También hay

proyecciones corticoespinales, glutamatérgicas, que estimulan a las NMs. La mayor parte son indirectas, a través de interneuronas, mientras que las restantes directas están involucradas en el control motor fino de la musculatura distal (como en los músculos de la mano, en los primates). El núcleo rojo, también glutamatérgico y encontrado en el bulbo raquídeo, establece contactos sinápticos con las NMs que inervan a otros músculos distales (Heckman *et al.* 2009, Rekling *et al.* 2000).

TABLA 4.4. ORIGEN E IDENTIDAD NEUROQUÍMICA DE LAS AFERENCIAS SINÁPTICAS DE LAS NEURONAS MOTORAS ESPINALES DE MAMÍFERO

<i>Neurotransmisores</i>	<i>Región del sistema nervioso¹</i>
Glutamato	Formación reticular, núcleo del rafé, <i>locus coeruleus</i> (A7/A5)
GABA	Región peri-ambigua
Glicina	Formación reticular, región peri-ambigua
Serotonina	Núcleo del rafé
Norepinefrina	<i>Locus coeruleus</i> (A7/A5)
Neuropéptidos ²	Núcleo del rafé, <i>locus coeruleus</i> (A7/A5)
Otros (adenosina, dopamina, vasopresina, FLC, somatostatina)	No establecido

1) Otras regiones del sistema nervioso cuya identidad neuroquímica no ha sido establecido pero que, mediante estudios de trazadores y electrofisiológicos, se han determinado que establecen contacto sináptico con la NMs son el núcleo pontino, los núcleos vestibulares y el núcleo del tracto solitario. 2) Incluye sustancia P, galanina, colecistocinina, neurocinina A y encefalinas. GABA, ácido γ -aminobutírico; FLC, factor liberador de corticotropinas. Tomado y modificado de Reckling *et al.* 2000

4.2. NEURODEGENERACIÓN EN LAS ENFERMEDADES DE NEURONA MOTORA

Enfermedades de neurona motora

Las enfermedades de neurona motora (ENM) son un grupo poco frecuente de trastornos neurodegenerativos caracterizados, desde el punto de vista patológico, por la pérdida de las NMs. Este grupo de trastornos incluye la atrofia espinal muscular (AEM), la atrofia espinal bulbar muscular, la parálisis bulbar progresiva y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Van den Berg-Vos *et al.* 2003). Se estima que la prevalencia global de las ENM es de 4.5 personas afectadas por cada 100,000 individuos. En México no existen estudios epidemiológicos sobre ENMs, aunque un reporte reciente estima que hubo 4,187 casos en 2016 (Logroscino *et al.* 2018).

Las ENMs tienen un curso clínico sumamente variable, cuyas manifestaciones clínicas pueden ser relativamente indolentes y lentamente progresivas, como en la atrofia espinal bulbar progresiva, o tener rápida progresión y ser uniformemente letales, como la ELA y la AEM. Incluso, en la misma ENM hay una amplia variabilidad en la velocidad de progresión; por ejemplo, en la ELA se han descrito casos con

inicio rápido seguidos de pausas en el curso de la enfermedad. Es por ello que se considera que las ENM son un grupo heterogéneo de enfermedades neurodegenerativas (Van den Berg-Vos *et al.* 2003). La pérdida de las NMs provocan una secuencia de síntomas que se establecen de manera gradual, progresiva e irreversible: fasciculaciones y debilidad muscular en las primeras fases y después atrofia muscular y parálisis (Brown & Al-Chalabi 2017). En el caso de la AEM y de la ELA estos síntomas conducen a falla respiratoria y muerte (Van de Berg-Vos 2003).

La ELA es la ENM más común, aunque es considerada una enfermedad rara (Swash & Desai 2000). Jean Martin Charcot, célebre neurólogo francés, propuso el nombre de ELA de acuerdo a los cambios neuropatológicos característicos de la enfermedad (Charcot & Joffroy 1869). En la ELA hay pérdida de las NMs de las astas anteriores de la médula espinal (o NMs inferiores), que conduce a atrofia muscular progresiva, debilidad y parálisis, y degeneración y esclerosis de las columnas laterales de la médula espinal, secundaria a la degeneración de las NMs de la corteza motora (también llamadas NMs superiores).

Aunque inicialmente se describió que la ELA es un trastorno degenerativo único en el que hay pérdida de NMs, en realidad se trata de un término que engloba a varios síndromes y fenotipos clínicos distintos. Por ejemplo, en la esclerosis lateral primaria hay degeneración solamente de las NMs superiores, mientras que en la atrofia muscular progresiva sólo las NMs inferiores se pierden. Típicamente, los síntomas iniciales de la ELA son debidos a la degeneración en las NMs inferiores, puesto que clínicamente es difícil detectar la pérdida de las NMs superiores. En tres cuartas partes de los casos que comienzan con síntomas de NMs inferiores afectan principalmente a los músculos de la extremidades; a esta forma se le conoce como de inicio espinal. El resto afecta al principio a los músculos inervados por núcleos motores en el bulbo raquídeo, por lo que se le conoce como de inicio bulbar (Al-Chalabi *et al.* 2016). De manera similar, en una pequeña cohorte retrospectiva de 61 casos confirmados de ELA de origen mexicano se observó que dos terceras partes comienzan con síntomas típicos de la forma espinal, y más de la mitad tienen síntomas sugestivos de degeneración de las NMs superiores (Martínez *et al.* 2011).

Las características demográficas y la supervivencia en pacientes afectados por ELA está fuertemente influenciado por el linaje. Por ejemplo, en Europa la incidencia cruda es de >3 casos por cada 100,000 individuos, mientras que en Asia es mucho menor (~0.7 casos por cada 100,000 individuos) (Hardiman *et al.* 2017). Además, la ELA es el trastorno neurodegenerativo más común de la vida adulta, cuyo inicio típicamente ocurre después de los 50 años de edad. Hay una tendencia a que la ELA sea más frecuente en varones (2:1 en comparación con mujeres), en especial en la forma esporádica (Brown & Al-Chalabi 2017). Comúnmente el retraso entre el inicio de los síntomas y el diagnóstico es de 1 año y la muerte ocurre entre 1 a 4 años posterior al diagnóstico (Hardiman *et al.* 2017). Por su parte, en los pacientes con ELA en México la edad promedio de inicio es a los 47.5 años, predominan los hombres (1.8:1) y el retraso promedio para el diagnóstico es de 12 meses; estos datos son similares a lo reportado en poblaciones caucásicas. En contraste, la supervivencia media desde el diagnóstico es de casi 5 años (57.8 meses), mayor que lo reportado en otras poblaciones. Además, la

supervivencia era más larga en pacientes jóvenes (≤ 40 años de edad) en comparación con aquellos más viejos (Martínez *et al.* 2011).

Estudios neuropatológicos consistentemente han demostrado que en la médula espinal hay atrofia de las raíces anteriores y reducción de los tractos corticoespinales, sin alteraciones prominentes en el encéfalo (salvo atrofia del giro precentral en algunos casos). Estos cambios están asociados con degeneración de $\geq 50\%$ de las NMs en la médula espinal y de la corteza motora, así como con pérdida de axones mielinizados en las columnas anteriores y laterales de la médula espinal (Saberí *et al.* 2015). Además, es común encontrar inclusiones intracelulares citoplásmicas en las NMs en degeneración de la médula espinal y del tallo cerebral. Los cuerpos de Bunina son inclusiones de 3-6 μm de diámetro, redondas a ovales y eosinofílicas (Piao *et al.* 2003). De manera interesante, las NMs de los núcleos oculomotores, del núcleo de Onuf (que controla la micción) y de las células de Betz nunca desarrollan cuerpos de Bunina. Son más comunes en el soma, aunque ocasionalmente puede haber en las dendritas (Saberí *et al.* 2015) y contienen cistatina c y transferrina (Okamoto *et al.* 1993). Por su parte, las inclusiones densas positivas a ubiquitina son estructuras redondas e intracitoplásmicas sólo detectables mediante microscopía electrónica. Se encuentran en pacientes con ELA y con demencia frontotemporal, sobre todo en neuronas del asta anterior de la médula espinal, de las cortezas frontal y temporal, del hipocampo y del cuerpo estriado. Las inclusiones densas positivas a ubiquitina están compuestas fundamentalmente por la proteína del unión al ADN de respuesta transactiva de 43 kDa (TDP43, véase abajo) (Saberí *et al.* 2015).

Los cambios neuropatológicos que se han observado en las NMs en degeneración en humanos con ELA son similares a los de apoptosis, aunque la evidencia es limitada (Martin 1999). Además, otros tipos celulares también sufren alteraciones en el curso de la ELA. Es común que haya astrogliosis reactiva alrededor de las NMs en degeneración, como lo señala el aumento del inmunomarcaje a la proteína glial fibrilar ácida (*glial fibrillar acidic protein*, GFAP). Por su parte, la microglia tiene cambios sugestivos de activación (Saberí *et al.* 2015).

Existen dos formas de ELA de acuerdo a la presencia de antecedentes familiares de la enfermedad. En la forma familiar es posible identificar un patrón de herencia en los integrantes de la genealogía del paciente afectado. Esta forma constituye entre el 5 y el 10% de los casos, aunque en poblaciones europeas se ha identificado una mutación causal en $\sim 20\%$ de los casos de ELA (Hardiman *et al.* 2017). En la forma esporádica, el restante 80-90% de los casos, no hay antecedentes familiares de ELA, aunque en ocasiones se logra vincular a alguna alteración genética (Van den Berg-Vos *et al.* 2003). Se han identificado numerosos genes cuyas mutaciones causan la ELA familiar y hasta dos tercios de estos casos son explicados por cuatro genes: *SOD1*, *C9ORF72*, *TARDBP* y *FUS* (Chiò *et al.* 2014). Otra docena de genes también han sido reportados como responsables de una minoría de casos de ELA familiar (Tabla 4.5).

El primer gen causante de ELA identificado fue el de la superóxido dismutasa 1 (*SOD1*) (Rosen *et al.* 1993). Aunque se han encontrado más de 170 mutaciones responsables de ELA familiar (casi todas sin sentido y no están agrupadas en alguna región particular del gen) (Ghasemi & Brown 2018), en

TABLA 4.5. GENES RELACIONADOS CON ELA FAMILIAR

Gen	Locus	Proteína	Frecuencia	Modo de transmisión
<i>SOD1</i>	21q22.1	Superóxido dismutasa 1 de Cu/Zn	20% familiar, 1% esporádica	Autosómico dominante y recesivo
<i>Alsin</i>	2q33.1	Alsina	Rara	Autosómico recesivo
<i>SETX</i>	9q34.13	Senataxina	Rara	Autosómico dominante
<i>SPG11</i>	15q21.1	Espatascina	Rara	Autosómico recesivo
<i>FUS/TLS</i>	16q11.2	Fusionada en sarcoma/ traslocada en liposarcoma	3% familiar, 0.5% esporádica	Autosómico dominante y recesivo
<i>VAPB</i>	20q13.32	Proteína B asociada a la proteína asociada a las vesículas de membrana	Rara	ND
<i>ANG</i>	14q11.2	Angiogenina	Rara	ND
<i>TARDBP</i>	1p36.22	TDP43	4% familiar, 1% esporádica	Autosómico dominante
<i>FIG4</i>	6q21	Fosfoinosítido-5-fosfatasa	Rara	Autosómico dominante
<i>OPTN</i>	10p13	Optineurina	Rara	Autosómico dominante y recesivo
<i>ATXN2</i>	12q24.12	Ataxina 2	ND	Autosómico dominante
<i>VCP</i>	9p13.3	Proteína compuesta de valosina	1% familiar, 0.5% esporádica	Autosómico dominante
<i>UBQLN2</i>	Xp11.21	Ubiquilina 2	1% familiar	Ligado al X
<i>SIGMAR1</i>	9p13.3	Receptor intracelular sigma no opioide 1	ND	Autosómico recesivo
<i>CHMP2B</i>	3p11.2	Proteína de cuerpos multivesiculares cargados 2b	1% familiar	Autosómico dominante
<i>PFN1</i>	17p13.2	Profilina 1	1% familiar, 0.5% esporádica	Autosómico dominante
<i>SQSTM1</i>	5q35.3	p62/secuestrosoma	1% familiar	Autosómico dominante
<i>C9ORF72</i>	9p21.2	Marco de lectura abierto 72 del cromosoma 9	35% familiar, 5% esporádica	Autosómico dominante

ND, no determinado; TDP43, proteína del unión al ADN de respuesta transactiva de 43 kDa.

Tomado y modificado de Chio *et al.* 2014, material suplementario

Norteamérica la sustitución de valina por alanina en el codón 4 (A4V) es la común y clínicamente tiene un curso rápido (Cudkowicz *et al.* 1997). Salvo algunas excepciones (como la mutación D90A en poblaciones escandinavas), todas las mutaciones de *SOD1* son autosómicas dominantes con

penetrancia alta y la expresión de la proteína mutante es necesaria para la manifestación clínica de la enfermedad (Ghasemi & Brown 2018). Por otro lado, la expansión de cientos a miles de veces del hexanucleótido GGGGCC en el marco de lectura abierto 72 del cromosoma 9 humano (*C9ORF72*) es la alteración genética más común en la ELA familiar, en hasta 35% de los casos (Dejesus-Hernández *et al.* 2011, Renton *et al.* 2011). Incluso, esta mutación se encuentra en 5-10% de los casos con ELA esporádica. Además, ~10% de los casos con ELA causados por esta mutación también desarrollan demencia frontotemporal. Existe una relación inversa, pero débil, entre la longitud de la expansión y la edad de inicio de la demencia (Ghasemi & Brown 2018).

El gen *TARDBP* codifica la ribonucleoproteína TDP43, cuyas mutaciones fueron recientemente relacionadas como causante de ELA familiar en hasta 4% de los casos (Sreedharan *et al.* 2008). La mayoría de las mutaciones son sin sentido y ocasionan agregados citosólicos de la proteína mutada en las NMs (Neumann 2009). De manera interesante, TDP43 es la proteína más abundante de los agregados insolubles de las NMs en casi todas las formas familiares de ELA (a excepción de las causadas por mutaciones en *SOD1* y *FUS*), así como en la mayoría de los casos de ELA esporádicas. También se ha observado este hallazgo en otros trastornos del sistema nervioso, como trauma craneoencefálico, enfermedad vascular cerebral y enfermedad de Parkinson (Neumann 2009, Ghasemi & Brown 2018). Las mutaciones en *FUS* (fusionado en sarcoma, también conocido como *TLS* – traslocado en liposarcoma) también causan ELA familiar. La proteína codificada por *FUS* es similar estructural y funcionalmente a la codificada por *TARDBP* y las mutaciones patológicas también causan agregados citoplásmicos que sólo contienen *FUS*. Entre el 3 y 5% de los casos de ELA familiar son causados por mutaciones en *FUS*, la mayor parte de las cuales tienen un patrón de herencia autosómico dominante (Chiò *et al.* 2014).

A partir de estas mutaciones se han diseñado varios modelos animales transgénicos en invertebrados (como en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*) y en vertebrados (como en el pez cebra *Danio rerio*, en el ratón y la rata) (Ghasemi & Brown 2018). En particular, el ratón transgénico que sobre-expresa la *SOD1* humana con sustitución de alanina por glutamina en la posición 93 (*hSOD1^{G93A}*) replica las características de la enfermedad (Gurney *et al.* 1994) y ha sido ampliamente utilizado para el estudio de los aspectos básicos del origen y desarrollo de la muerte selectiva de las NMs, así como el escrutinio de estrategias terapéuticas (Kaur *et al.* 2016). Sin embargo, este y otros modelos basados en transgenes ofrecen información sólo sobre las formas familiares de la ELA, que constituyen sólo el 2% de los casos, por lo que el significado de los abundantes hallazgos obtenidos a la fecha es difícil de vincular con la mucho más prevalente forma esporádica (ver *Modelos animales de ELA basados en excitotoxicidad*).

A pesar de que estos genes se heredan de manera mendeliana es característico que en las formas familiares de ELA la penetrancia sea menor del 50% y que haya pleiotropía (Hardiman *et al.* 2017). En efecto, incluso las formas esporádicas pueden tener un patrón de herencia oligo- o poligénico. Esto podría ser explicado por loci de susceptibilidad que modifican el riesgo o la velocidad de progresión de la enfermedad. De hecho, no existen diferencias clínicamente relevantes entre la forma familiar y la esporádica. Además, se han identificado mutaciones patogénicas en casos de ELA esporádico y el

hecho de que no exista un patrón familiar puede deberse a otras causas, como falta de información o el tamaño de la familia. Estas situaciones han hecho que sea necesario reconsiderar si la división entre las formas familiar o esporádica es real (Chiò *et al.* 2014). De cualquier forma, los hallazgos de genes patogénicos o de susceptibilidad contribuyen a entender los mecanismos que conducen a la muerte de las NMs (Ghasemi & Brown 2018).

Mecanismos de degeneración de neuronas motoras

A pesar de los avances en la identificación de genes causales de ELA, los mecanismos que explican la degeneración de las NMs no han sido del todo elucidados (Taylor *et al.* 2016). Sin embargo, muchas hipótesis se han postulado al respecto. La información proporcionada por la biología de los genes patogénicos en la ELA familiar, así como los descubrimientos en modelos de laboratorio, han sido útiles para proponer temas comunes que explican la susceptibilidad selectiva de las NMs (Ghasemi & Brown 2018). De esta manera, se ha propuesto que la muerte de las NMs es ocasionada por fallas en la proteostasis, alteraciones en el procesamiento del RNA, perturbaciones en el transporte axonal o neuroinflamación. Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes y, dada la heterogeneidad de la ELA, podrían ser mas o menos importantes de acuerdo con el contexto que rodea a la enfermedad (Robberecht & Philips 2013).

A pesar de que el gen *SOD1* fue el primero cuyas mutaciones se vincularon a ELA familiar y fue la base para el desarrollo de un modelo animal en ratón (Gurney *et al.* 1994) ampliamente estudiado, poco se conoce de los mecanismos que llevan a la muerte selectiva de las NMs (Taylor *et al.* 2016). *SOD1* codifica a una enzima que inactiva el radical superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2). La mayor parte de las mutaciones sólo disminuyen entre 20 y 50% la actividad enzimática y la presencia de *SOD1* es necesaria para inducir neurotoxicidad. Estas observaciones han llevado a postular que la patogénesis derivada de las mutaciones es secundaria a ganancia de función tóxica, en la que la *SOD1* mutante genera más especies reactivas de oxígeno (y estrés oxidativo) o agregados proteicos (Kaur *et al.* 2016).

La presencia de inclusiones intracitoplásmicas de agregados proteicos en las NMs, ya sea en la ELA familiar o esporádica, sugieren que el mal plegamiento de proteínas o fallas en la degradación proteica podrían explicar la degeneración de NMs. En efecto, la presencia de agregados proteicos de *SOD1* mutante en las NMs en modelos murinos y en pacientes con ELA familiar apoya esta hipótesis (Basso *et al.* 2006). El proteasoma y la autofagia son dos de los mecanismos mas relevantes en la degradación de proteínas mal plegadas; es posible que las NMs en la ELA sean vulnerables cuando existan alteraciones en estos procesos. Esta hipótesis ha sido apoyada por casos de ELA causados por mutaciones en otras proteínas involucradas en la maquinaria de control de calidad proteica (Robberecht & Philips 2013). Por ejemplo, mutaciones en *UBQLN2* y en *VCP* causan ELA; *UBQLN2* transfiere proteínas ubiquitiniladas al proteasoma para su degradación (Deng *et al.* 2011) y *VCP* promueve la fusión de los autofagosomas con los lisosomas (Meyer *et al.* 2012). En apoyo a esta hipótesis, se ha observado que transcritos originados de la expansión del hexanucléotido GGGGCC del *C9ORF72* pueden ser traducidos a dipéptidos repetidos glicina-alanina, glicina-arginina, glicina-

prolina, prolina–arginina y prolina–alanina (Taylor *et al.* 2016), los cuales pueden interferir en una multitud de procesos, como en la degradación de proteínas y la maduración del ARN (Zu *et al.* 2013),

Las mutaciones causantes de ELA en genes como TDP-43 y FUS indican que otro mecanismo causante de degeneración es la alteración en el procesamiento del ARN (Taylor *et al.* 2016). Por ejemplo, se ha observado que hay redistribución de TDP-43 del núcleo al citoplasma en NMs de pacientes con ELA (Neumann *et al.* 2006). Esta proteína está involucrada en la transcripción, traducción, biogénesis de microARN, silenciamiento génico, unión y transporte del ARN y supresión de transcritos aberrantes (Ghasemi & Brown 2017). La acumulación de TDP-43 en el citoplasma forma agregados insolubles que secuestran otras proteínas de unión al ARN, lo que provoca escasez en el núcleo e insuficiencia de la maquinaria restante para el procesamiento del ARN. Finalmente, proteínas necesarias para procesos fisiológicos, como la transmisión sináptica, no son expresadas en niveles adecuados, lo que puede conducir a muerte neuronal (Taylor *et al.* 2016). Puesto que los agregados de TDP-43 son comunes en varias enfermedades neurodegenerativas, esto sugiere que este mecanismo es común en la muerte neuronal (Neumann 2009). Si se considera que la ELA es un trastorno en el que hay aberraciones en la maquinaria transcripcional, estrategias terapéuticas que modulen este proceso podrían ser prometedoras.

El transporte axonal es otro de los procesos alterados y que, probablemente, contribuyen a la neurodegeneración en ELA. Las mutaciones en genes que codifican proteínas motoras e involucradas en la organización del citoesqueleto axonal, como *DCTN1* (dinactina), *PFN1*, *NEFH* (neurofilamento pesado) y *TUBA4A* (tubulina α 4a), dan origen a formas raras de ELA. Las NMs parecen especialmente dependientes del soporte trófico proporcionado por el contacto con la unión neuromuscular, además de que el mantenimiento del axon es energéticamente muy costoso. Por otra parte, las NMs en el adulto expresan niveles bajos de factores involucrados con el crecimiento del axón y su ramificación, como osteopontina y factor de crecimiento parecido a la insulina 2 (IGF-2, *insuline-like growth factor*) (Hardiman *et al.* 2017).

También se han descrito alteraciones en otras células del sistema nervioso, como la microglia y los astrocitos. De hecho, la importancia de estas células en la degeneración de las NMs fue puesto de manifiesto en un estudio en el que se silenció selectivamente la expresión de hSOD1^{G93A} en la microglia de ratones transgénicos. Estos animales presentaron una progresión mucho más lenta de la enfermedad (Boillé *et al.* 2006). Con este hallazgo se estableció que la neuroinflamación es relevante para determinar la velocidad de progresión de la enfermedad. Por su parte, también se ha demostrado que los astrocitos tienen un papel fundamental, puesto que disminuir selectivamente la expresión del transgen hSOD1^{G93A} en astrocitos resulta también en progresión más lenta y menor activación microglial (Yamanaka *et al.* 2008). Además, existe evidencia de que los astrocitos obtenidos de pacientes con ELA liberan un factor soluble tóxico para NMs silvestres (Haidet-Phillips *et al.* 2011). La identidad de dicho factor aún no ha sido elucidado, pero se cree que modula la resistencia de las NMs a la excitotoxicidad (ver más abajo, sección 4.3. *EXCITOTOXICIDAD EN LA DEGENERACIÓN DE LAS NEURONAS MOTORAS*).

Aunque no ha sido establecida la importancia relativa de estos mecanismos en la degeneración de las NMs, todos podrían contribuir a la fisiopatología de la ELA (Taylor *et al.* 2016). Sin embargo, hay evidencia que señala que existen vías maladaptativas en las que convergen estos mecanismos patológicos. Una de dichas vías es la excitotoxicidad (Fogarty 2018). Existe amplia evidencia de la importancia de la excitotoxicidad como un fenómeno patogénico en la muerte selectiva de las NMs, por lo que en el laboratorio se ha estudiado a profundidad los mecanismos patológicos involucrados con la excitotoxicidad y estrategias para proteger a las NMs *in vivo*.

4.3. EXCITOTOXICIDAD EN LA DEGENERACIÓN DE LAS NEURONAS MOTORAS

Neurotransmisión glutamatérgica y su función en las NMs espinales

La neurotransmisión excitadora dependiente de glutamato es un proceso fundamental en el cerebro de los mamíferos. En efecto, el glutamato es el neurotransmisor más abundante del sistema nervioso central y más del 80% de las sinapsis son glutamatérgicas. El glutamato tiene un rol fundamental en numerosos procesos, como el procesamiento sensorial, el control motor, el aprendizaje, la memoria y la cognición (Hassel & Dingledine 2012). En las NMs de la médula espinal la neurotransmisión glutamatérgica está relacionada con la transmisión de retroalimentación aferente primaria (por ejemplo, de fibras del huso muscular, de los órganos tendinosos de Golgi y de la piel, músculos y articulaciones), con las sinapsis provenientes de tractos descendientes y propioespinales (Tabla 4.4), con la generación de actividad motora rítmica y estereotipada (como la respiración, locomoción o marcha, masticación, deglución y micción) y con el desarrollo dependiente de la actividad (que involucra el crecimiento del soma, ramificación dendrítica y establecimiento de circuitos motores) (Rekling *et al.* 2000).

El glutamato es un aminoácido polar con carga negativa cuya síntesis y abundancia en el medio extracelular están finamente regulados. El glutamato utilizado en la neurotransmisión es continuamente sintetizado a partir de α -cetoglutarato, un intermediario del ciclo del ácido cítrico, y posteriormente acumulado en vesículas sinápticas. Éstas fusionan su membrana con la de la presinapsis cuando hay despolarización local, lo que provoca la liberación del glutamato en el medio extracelular (Hassel & Dingledine 2012). El glutamato sináptico alcanza una concentración de ~ 1 mM y rápidamente difunde o es removido mediante transportadores de glutamato; la constante de tiempo de la presencia de glutamato en el espacio sináptico es de apenas ~ 1 ms (Bergles *et al.* 1999).

El glutamato se puede unir a dos tipos de receptores: metabotrópicos (mGluRs) e ionotrópicos. Los mGluRs son proteínas con siete dominios transmembranales acopladas a proteínas G. La activación de estos receptores resulta en la activación de cascadas de señalización. Su extremo N-terminal es extracelular y es el sitio de unión a glutamato. Se han caracterizado 8 mGluRs hasta la fecha (denominados mGluR1-mGluR8) que se agrupan en tres clases funcionales (Conn 2003). Por su parte, los receptores ionotrópicos son canales iónicos activados por ligando, formados por cuatro subunidades. La unión de glutamato a la porción N-terminal extracelular resulta en la apertura del canal y en el aumento de permeabilidad de la membrana a cationes, como Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Esto deriva

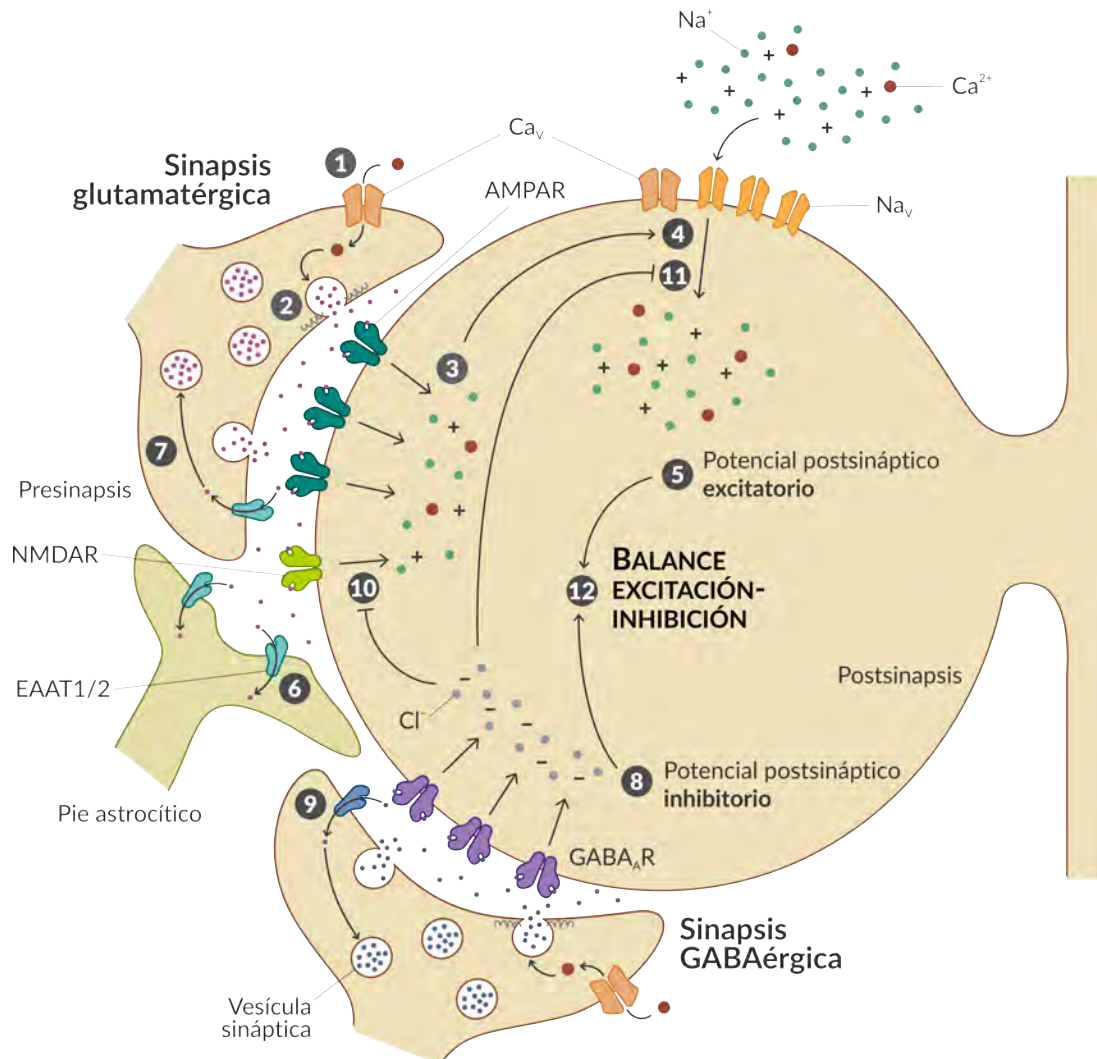


Figura 4.4. Eventos más relevantes de la neurotransmisión glutamatergica (arriba) y GABAérgica (abajo). Cuando un potencial de acción alcanza a una terminal axónica, la presinapsis, **1** los canales de calcio activados por voltaje (Ca_v) se abren y permiten el ingreso de Ca^{2+} , el cual **2** estimula la fusión de las membranas de las vesículas sináptica con la de la presinapsis y, con ello, la liberación de neurotransmisor. La unión de glutamato a sus receptores ionotrópicos (de tipo AMPA y NMDA) aumenta la probabilidad de apertura y **3** el ingreso de cationes (Na^+ y Ca^{2+}) a la espina dendrítica (la postsinapsis). La despolarización local de la membrana postsináptica resulta en **4** la apertura de canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v) y de canales Ca_v , lo cual produce una **5** corriente entrante despolarizante de Na^+ y Ca^{2+} , que finalmente desemboca en un potencial postsináptico excitatorio. La neurotransmisión glutamatergica es terminada por la recaptura de glutamato por **6** los transportadores EAAT1, expresados en astrocitos, y **7** EAAT2, expresados en la presinapsis. En el caso de la neurotransmisión GABAérgica los eventos que conducen a la activación de los receptores GABA tipo A ($GABA_A$) son similares a los descritos previamente (**1** y **2**). La unión de GABA a los receptores resulta en **8** una corriente hiperpolarizante mediada por cloro (Cl^-). El GABA presente en el espacio sináptico también **9** es recapturado por transportadores específicos ubicados en la presinapsis. La hiperpolarización resultante **10** evita la liberación del bloqueo de Mg^{2+} de los NMDAR y **11** la apertura de los canales Na_v y Ca_v . Estos eventos culminan en un potencial postsináptico inhibitorio. La integración de los potenciales sinápticos expiatorios e inhibitorios resulta en **12** el balance excitación-inhibición, del cual dependen numerosos procesos fisiológicos del sistema nervioso. Las alteraciones en estos eventos pueden conducir a daño o muerte neuronal por excitotoxicidad (ver sección *Excitotoxicidad como mecanismo de neurodegeneración*).

en el inicio de potenciales despolarizantes en la neurona post-sináptica. Se han identificado 18 genes que codifican las subunidades de los receptores ionotrópicos. Estos genes se agrupan en siete familias, de acuerdo a la similitud de la secuencia de aminoácidos, y en tres clases funcionales, de acuerdo a su farmacología: los receptores activados por N-metil-D-aspartato (NMDA), por ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) o por kainato (Hassel & Dingledine 2012).

Los receptores de tipo NMDA fueron los primeros receptores ionotrópicos de glutamato en ser descritos. Tres subunidades componen la familia de los receptores de tipo NMDA: GluN1, GluN2 (codificados por cuatro genes, GluN2A-GluN2D) y GluN3 (codificados por dos genes, GluN3A y GluN3B). Un receptor funcional contiene dos subunidades GluN1 en combinación con dos subunidades GluN2 y/o GluN3. Todas las subunidades contienen un dominio N-terminal extracelular, un dominio de unión al ligando, un dominio transmembranal (formado por cuatro hélices α) y un dominio C-terminal intracelular. Los receptores compuestos por las subunidades GluN1/GluN2 son activados por dos moléculas de glutamato y dos moléculas de glicina, un co-agonista; estos receptores son los únicos con importancia fisiológica. En cambio, los receptores formados por GluN1/GluN3 son activados únicamente por glicina. Otros agonistas endógenos de los receptores de tipo NMDA son D-serina, L-serina, D-alanina y L-alanina. La unión del ligando al receptor de tipo NMDA es insuficiente para la apertura del canal, puesto que un átomo de magnesio (Mg^{2+}) bloquea el poro en condiciones fisiológicas. La despolarización local de la membrana, por la activación de receptores de tipo AMPA por ejemplo, provoca la liberación del Mg^{2+} del canal, lo que provoca un ciclo de retroalimentación positiva (Vyklícky *et al.* 2014).

Los receptores de tipo AMPA también son tetrámeros formados por cuatro subunidades: GluA1-GluA4. Cada subunidad presenta los mismos dominios que las subunidades de la familia de los receptores de tipo NMDA. Aunque el dominio transmembranal tiene también cuatro componentes, M1-M4, sólo tres de ellos son hélices α que atraviesan la membrana. El componente M2 es un asa que se inserta en la membrana desde el lado citoplásmico, pero que no alcanza a atravesarla; a pesar de este hecho, el asa M2 tienen un papel crítico en la regulación de la permeabilidad del canal. Por otro lado, las cuatro hélices M3 forman el poro del canal. Ninguna de las subunidades es obligatoria para formar receptores funcionales, lo que aumenta considerablemente la diversidad de estos receptores. La subunidad GluA2, por ejemplo, es la subunidad más abundante y su presencia vuelve a los receptores impermeables a Ca^{2+} . Esta propiedad depende de la edición post-transcripcional del ARN mensajero (mARN) que resulta en el cambio de una glutamina por arginina (sitio Q/R) en el asa M2. El único ligando endógeno de los receptores de tipo AMPA es el glutamato y su unión provoca potenciales despolarizantes excitatorios rápidos, o fásicos. Estos receptores están exquisitamente regulados por subunidades auxiliares, que regulan el tráfico en la membrana, su expresión y sus propiedades funcionales (Gregger *et al.* 2017).

Los receptores de tipo kainato son estructuralmente muy similares a los de tipo AMPA. Están compuestos por la combinación de cinco subunidades: GluK1-GluK5. GluK1-3 pueden formar homotetrámeros, mientras que las subunidades GluK4 y GluK5 siempre están formando receptores heteroméricos. Es poco lo que se conoce de la función de este tipo de receptores. Previamente se

había supuesto que tenían una función redundante con los de tipo AMPA, pero recientemente se han reconocido roles únicos en la plasticidad y en el desarrollo, en especial en el hipocampo (Carta *et al.* 2014).

En las NMs espinales se ha demostrado la presencia de receptores de glutamato de tipo NMDA, AMPA y kainato en múltiples modelos mamíferos y en el humano. Los receptores de tipo NMDA y AMPA tienen aproximadamente el mismo nivel de expresión en las NMs espinales de la rata, mientras que los receptores de tipo kainato son más escasos (Furuyama *et al.* 1993). Respecto a las subunidades de la familia del receptor de tipo NMDA, GluN1 es la más abundante, seguida de GluN2A y GluN2B, mientras que GluN2D y GluN2C son mucho menos frecuentes; aún no se ha determinado la presencia ni la distribución del subtipo GluN3 (Rekling *et al.* 2000). En el caso de las subunidades del receptor de tipo AMPA, múltiples estudios indican que GluA4 y GluA3 son las más expresadas, en un nivel similar, seguidas de GluA2 y GluA1 (Petralia *et al.* 1997). La abundancia de las subunidades del receptor de tipo kainato ha sido la menos estudiada, pero se ha determinado que GluK1 y GluK4 se expresa en NMs espinales lumbares en la rata (Tölle *et al.* 1993). La neurotransmisión glutamatergica genera potenciales de acción despolarizantes en las NMs espinales, puesto que aumentan la conductancia a cationes. De manera simple, los receptores de tipo NMDA median los componentes lentos, mientras que los de tipo AMPA los componentes rápidos, de la respuesta despolarizante (Rekling *et al.* 2000).

La transmisión glutamatergica es rápidamente terminada por la gran cantidad de transportadores de glutamato presentes en las membranas pre- y post-sinápticas y en la de los astrocitos. Se han identificado cinco transportadores de alta afinidad de glutamato, llamados EAAT1-5 (por *excitatory amino acid transporters*) en el humano. En la rata, EAAT1-3 son llamados GLAST, GLT y EAAC1, respectivamente; el restante recibe el mismo nombre. EAAT1 se expresa exclusivamente en astrocitos, mientras que EAAT3 y 4 se encuentran en neuronas en todo el cerebro, en especial en las presinapsis y en las dendritas. EAAT5 se localiza en la retina. Estos transportadores llevan el glutamato hacia el interior celular, en contra de su gradiente de concentración, junto con tres iones de Na⁺ y a cambio de la salida de un ion K⁺ (Hassel & Dingledine 2012). Los aspectos más relevantes de la neurotransmisión glutamatergica se resumen en la Figura 4.4.

Excitotoxicidad como mecanismo de neurodegeneración

El exceso de neurotransmisión glutamatergica resulta en daño y muerte neuronal en cualquier región del sistema nervioso. Esto fue descrito por primera vez en ratones neonatales que desarrollaban necrosis de varias áreas del cerebro tras la administración de dosis suprafisiológicas de glutamato subcutáneo (Olney 1969). A este fenómeno se le conoce *excitotoxicidad* y ha sido demostrado que participa en la mayoría de, sino es que en todos, los trastornos neurodegenerativos (Mehta *et al.* 2013, Bano & Anarkrona 2018, Fogarty 2018).

La vía final común que desencadena la muerte neuronal en tejidos sometidos a condiciones excitotóxicas es el ingreso masivo de Ca²⁺ al interior de la neurona (Bano & Anarkrona 2018). El Ca²⁺

es un catión con roles en una multitud de procesos celulares. En neuronas sanas, el Ca^{2+} participa en la liberación de neurotransmisores, en los potenciales sinápticos excitatorios, en la potenciación y depresión a largo plazo y en una gran cantidad de vías de señalización. Es por ello que la concentración intracelular de Ca^{2+} es estrictamente regulada mediante 1) la acumulación en el lumen del retículo endoplásmico, 2) la captura por proteínas de unión a Ca^{2+} , 3) la amortiguación en la matriz mitocondrial y 4) el transporte hacia el espacio extracelular por bombas específicas (Brini *et al.* 2014). El papel de la mitocondria como amortiguador intracelular de Ca^{2+} es primordial. El Ca^{2+} es transportado a través de la membrana externa mitocondrial por la proteína canal selectiva de aniones dependiente de voltaje 1 (VDAC1, *voltage dependent anion-selective channel protein 1*) y luego a través de la membrana interna por el uniportador de calcio mitocondrial (MCU, *mitochondrial calcium uniporter*) (Szabo & Zoratti 2014). El ingreso de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial provoca despolarización de la membrana interna, lo que activa a algunas deshidrogenasas del ciclo del ácido cítrico (de piruvato, α -cetoglutarato e isocitrato) y a la ATP sintasa. Es decir, la amortiguación mitocondrial de Ca^{2+} está acoplada con la producción de energía (Mehta *et al.* 2013).

Dada la gran cantidad de procesos celulares que dependen de Ca^{2+} es esperado que existan muchos mecanismos que culminan en la muerte neuronal bajo excitotoxicidad. Entre estos mecanismos destacan la participación de la mitocondria y su disfunción en los eventos que llevan a la neurodegeneración. Cuando la concentración de Ca^{2+} supera la capacidad de amortiguación de la matriz mitocondrial se abre el poro de transición mitocondrial (PTP), que despolariza la membrana externa mitocondrial. También, el Ca^{2+} genera especies reactivas de oxígeno, que inhiben a las enzimas del ciclo del ácido cítrico y al complejo I de la cadena respiratoria. Estos procesos disminuyen la producción de ATP e inducen falla energética. Además, la apertura del PTP provoca la salida de citocromo c, un poderoso inductor de la cascada apoptótica. Por otro lado, el Ca^{2+} activa a las calpaínas, una familia de proteasas de cisteínas. Estas proteasas, bajo condiciones excitotóxicas, degradan e inactivan intercambiadores de sodio y calcio, lo que promueve la muerte neuronal (Bano & Anarkona 2018). En el caso de las NMs espinales sometidas a un estímulo excitotóxico *in vivo* mediante la administración de AMPA, nuestro grupo ha observado que el Ca^{2+} es crítico para inducir neurodegeneración (Corona & Tapia 2007), que este proceso está acompañado de cambios en la morfología y función mitocondrial (Ramírez-Jarquín & Tapia 2016, Santa-Cruz *et al.* 2016) y que la inhibición de calpaínas evita la muerte neuronal (Corona & Tapia 2008).

Es posible provocar muerte neuronal excitotóxica mediante distintos mecanismos, entre los que se incluyen 1) sobreactivación de receptores ionotrópicos de glutamato, 2) bloqueo farmacológico de la recaptura de glutamato y 3) estimulación de la liberación de glutamato endógeno (Mehta *et al.* 2013) (Figura 4.4). Trabajo previo realizado por miembros del laboratorio ha establecido la eficacia diferencial de estas estrategias en desencadenar neurodegeneración en varias regiones del SNC de la rata *in vivo*. La activación de los receptores ionotrópicos de glutamato con potentes agonistas exógenos es muy eficaz para precipitar neurodegeneración. Esto ha sido confirmado en estudios en los que se administró en el estriado NMDA (Massieu *et al.* 1993), AMPA (Massieu & Tapia 1994) y kainato en el estriado (Massieu & Tapia 1994) y en el hipocampo (Arias *et al.* 1997).

Por otro lado, se ha demostrado reiteradamente que la infusión del ácido L-trans-pirrolidín-2,4-dicarboxílico (PDC), un inhibidor de los transportes de glutamato de amplio espectro (EAAT1-5), mediante microdiálisis o minibombas osmóticas es incapaz de provocar hiperexcitación y neurodegeneración, incluso aunque aumente considerablemente la concentración extracelular de glutamato (hasta 20 veces). Este hallazgo ha sido reportado en el cuerpo estriado (Massieu *et al.* 1995), en el hipocampo (Peña & Tapia 1999) y en la corteza cerebral (Tovar-y-Romo & Tapia 2006). En el hipocampo este incremento del glutamato extracelular puede, paradójicamente, proteger de la excitotoxicidad debido a la inhibición de la liberación de glutamato a través de la activación de receptores de glutamato metabotrópicos presinápticos (Vera y Tapia 2012). En contraste, la administración de dihidrokainato, otro ácido dicarboxílico inhibidor de GLT-1, provoca neurodegeneración en la región CA1 del hipocampo que depende de la activación de los receptores de tipo NMDA (Arias *et al.* 1997).

Estimular la liberación de glutamato endógeno de las terminales axónicas es posible a través de agentes despolarizantes, como la 4AP. En efecto, la infusión de 4AP *in vivo* a través de microdiálisis provoca convulsiones electroencefalográficas y conductuales, así como muerte neuronal excitotóxica en el cuerpo estriado (Morales-Villagran & Tapia 1996) y en el hipocampo (Peña & Tapia 1999, 2000) de la rata anestesiada. Estos efectos son secundarios a la sobreactivación de los receptores de glutamato, como quedó demostrado por el potente efecto neuroprotector de los antagonistas de los receptores de glutamato de tipo NMDA (MK-801 y CPP) así como del receptor de AMPA (NBQX).

Existe amplia evidencia del papel fundamental de la excitotoxicidad en la ELA. En pacientes se han reportado hallazgos compatibles con las alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica que conducen a excitotoxicidad discutidas previamente. Las NMs son diferencialmente vulnerables a la activación de receptores ionotrópicos de glutamato; sólo la activación de los receptores de AMPA y de kainato resulta en muerte neuronal (King *et al.* 2016, Staats & van den Bosch 2014). También, se ha observado que la subunidad GluA2 está disminuida en la sustancia gris del asta ventral de pacientes con ELA, además que la proporción de subunidades sin edición en el sitio Q/R es mayor (Takuma *et al.* 1999). Respecto a deficiencias en la recaptura de glutamato, se han reportado concentraciones elevadas de glutamato en el líquido cefalorraquídeo (Spreux-Varoquaux *et al.* 2002) y en tejido de la médula espinal (Plaitakis *et al.* 1998). Esto podría ser explicado por disminución en la expresión del transportador EAAT2 (Rothstein *et al.* 1992, Sasaki *et al.* 2000).

Hasta la fecha no hay evidencia directa de pacientes con ELA de que la estimulación de la liberación de glutamato endógeno. Algunos datos indirectos podrían apoyar esta idea, como el estado de hiperexcitabilidad típicamente observado en las primeras fases de la enfermedad y manifestado como fasciculaciones musculares (Fogarty *et al.* 2018, King *et al.* 2016). Sin embargo, hallazgos en el ratón transgénico hSOD1^{G93A} apoyan a la liberación aumentada de glutamato como un mecanismo relevante de excitotoxicidad, como fue recientemente descrito en sinaptosomas (Bonifacino *et al.* 2016; Milanese *et al.* 2011).

Modelos animales de ELA basados en excitotoxicidad

Basados en la excitotoxicidad como un mecanismo principal en la degeneración de las NMs en la ELA, en el laboratorio se han explorado los tres mecanismos explicados previamente para alterar la neurotransmisión glutamatérgica para diseñar modelos animales (Tovar-y-Romo *et al.* 2009a). El primer modelo creado consiste en la perfusión de fármacos a través de microdiálisis directamente en la región lumbar de la médula espinal de ratas *in vivo*. La exposición del tejido de la médula espinal a los fármacos evaluados típicamente es de ~30 minutos y no suele superar 1 hora; es por ello que a este modelo se le conoce como *agudo*. Esta técnica permite, además, recolectar fracciones de líquido del medio extracelular para el análisis del contenido de aminoácidos, como GABA y glutamato. Usando este modelo se determinó que la activación de los receptores de tipo NMDA o de kainato son incapaces de provocar degeneración de las NMs, así como el bloqueo de la recaptura de glutamato (mediante la administración de PDC) ni la estimulación de la liberación de glutamato endógeno (perfundiendo 4AP). Solo la activación de los receptores de tipo AMPA resultaba en pérdida casi completa de las NMs espinales, de manera muy rápida (en menos de 12 horas) (Corona & Tapia 2004).

De manera interesante, la perfusión de 4AP mediante microdiálisis incrementó transitoriamente (en los primeros 30 minutos), aunque de manera notable, la concentración extracelular de glutamato. Este efecto estuvo acompañado de cambios conductuales motores, como fasciculaciones, espasmos y contracción muscular en las extremidades pélvicas de las ratas, hasta por 2 horas, aunque los animales estuvieran anestesiados. Esto sugirió que 4AP provoca un estado de hiperexcitabilidad análogo a las fasciculaciones, aunque no se observó degeneración de NMs (Corona & Tapia 2004).

Puesto que la excitotoxicidad en el modelo agudo ocurre rápidamente, desarrollamos un modelo distinto que consiste en la infusión crónica de fármacos, a lo largo de varios días y a través de minibombas osmóticas, directamente en el tejido de la médula espinal lumbar en ratas conscientes (Tovar-y-Romo *et al.* 2007) (ver Figura 7.1 y las secciones *Preparación de minibombas osmóticas* e *Implante quirúrgico de las minibombas osmóticas* en Materiales y métodos para detalles sobre el procedimiento para la colocación de la minibomba osmótica). A este modelo le hemos llamado *crónico* y con él hemos replicado varias características importantes de la ELA: curso lento y prolongado, inicio en la vida adulta e independencia de un sustrato genético. Este abordaje también nos ha permitido estudiar algunos de los mecanismos básicos que subyacen la muerte de NMs excitotóxica (Corona & Tapia 2004, Corona *et al.* 2007, Ramírez-Jarquín & Tapia 2016).

Con estas condiciones experimentales se reiteró que la activación crónica del receptor de tipo AMPA resulta en degeneración de NMs y parálisis bilateral (Tovar-y-Romo *et al.* 2007). Otro grupo de manera independiente determinó que la infusión crónica de kainato también resulta en neurodegeneración en roedores (Blizzard *et al.* 2016), aunque este efecto es mediado por la activación del receptor de tipo AMPA y la sobre-expresión de la subunidad GluA3 permeable a Ca^{2+} (Sun *et al.* 2006). La activación crónica de los receptores de tipo NMDA no ha sido estudiada hasta donde tenemos conocimiento. En contraste, la inhibición crónica de los receptores de glutamato, mediante la infusión de PDC, no resulta en neurodegeneración aunque la concentración de glutamato extracelular se eleva considerablemente (Tovar-y-Romo *et al.* 2009b). El tercer mecanismo, la estimulación de la

liberación de glutamato endógeno mediante la administración crónica de agentes despolarizantes (como 4AP), no ha sido evaluado en este modelo por lo que se desconoce su relevancia en la degeneración excitotóxica de las NMs espinales.

Neurotransmisión GABAérgica y falla inhibitoria

GABA es el neurotransmisor inhibitorio más abundante del sistema nervioso de los mamíferos. Se encuentra involucrado en mantener una regulación estrecha de la excitabilidad resultado de la actividad neuronal dependiente de otros neurotransmisores, como glutamato y las monoaminas (dopamina y serotonina). De hecho, tiene un papel fundamental en la fisiopatología de numerosos padecimientos psiquiátricos y neurológicos, incluyendo los trastornos neurodegenerativos (Olsen & Li 2012). En las NMs de la médula espinal la neurotransmisión GABAérgica, mediada por interneuronas propioespinales, controla la respuestas a las aferencias y sinapsis de tractos descendientes, establece el orden de reclutamiento y moldea los patrones espaciales y temporales de actividad durante conductas estereotipadas y rítmicas (Rekling *et al.* 2000). La enzima glutamato descarboxilasa sintetiza GABA a partir de glutamato. Esta enzima sólo está presente en neuronas. Posteriormente, de manera similar a glutamato, el GABA es empaquetado en vesículas sinápticas para ser liberado cuando haya una despolarización (Olsen & Li 2012). La concentración de GABA en el espacio sináptico es de ~1-3 mM con un tiempo de eliminación <1 ms (Chua & Chebib 2017).

Se han identificado dos tipos de receptores de GABA: metabotrópicos e ionotrópicos. Los receptores de GABA tipo B son proteínas con siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G, cuya activación modula numerosas vías de señalización, de manera similar a los receptores metabotrópicos de glutamato. En general, esta modulación resulta en inhibición lenta de la actividad sináptica, ya sea a través de la activación de K_v , disminuyendo la conductancia de Ca^{2+} , regulando la producción de trifosfato de inositol o inhibiendo la síntesis de monofosfato de adenosina cíclico (Pinard *et al.* 2010).

El receptor de GABA de tipo A ($GABA_A R$) es un receptor canal que conduce cloro (Cl^-) a través de la membrana celular. Estos receptores se expresan de manera ubicua en el SNC. De manera general, su activación resulta en inhibición rápida por aumento de la permeabilidad a Cl^- e hiperpolarización de la membrana. Los $GABA_A R$ s pertenecen a la superfamilia de los canales iónicos activados por ligando pentaméricos, que también incluye a los receptores de acetilcolina nicotínicos y a los receptores de glicina. Estos receptores están compuestos de cinco subunidades homólogas, cada una de las cuales tiene un dominio extracelular, un dominio transmembranal y uno intracelular. El ligando, GABA, se une a los dominios extracelulares, mientras que los dominios transmembranales constituyen el poro del canal. Hasta la fecha se han identificado 19 subunidades del $GABA_A R$ (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , π , y ρ_{1-3}), así como numerosas variantes resultado de edición y empalme alternativo, las cuales se asocian para formar receptores heteroméricos; sin embargo, no todas las combinaciones se encuentran *in vivo* ni tienen relevancia fisiológica. De hecho, hay evidencia que sugiere que las subunidades α y β son obligatorias para formar receptores funcionales que se expresen en la membrana (Chua & Chebib 2017).

En las NMs espinales las subunidades α_2 , α_3 y α_5 son las más expresadas, seguidas por la β_3 y la γ_2 , por lo que se cree que los receptores GABA_AR de composición $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ y $\alpha_2\gamma_2$ son los que median las respuestas postsinápticas a GABA. Cerca del 60% de las sinapsis que establecen contacto con el soma o el árbol dendrítico de las NMs contiene GABA o glicina. De manera similar, por cada sinapsis glutamatérgica que hay en el soma existen entre 3 y 4 sinapsis inhibitorias, mientras que en las dendritas distales este número disminuye a entre 1 y 2 (Rekling *et al.* 2000). Los GABA_ARs sinápticos median respuestas inhibitorias fásicas, o rápidas. Esto depende en gran medida de la concentración intracelular de Cl⁻, que por su parte se encuentra bajo el control de varias bombas de Cl⁻. El potencial de reposo del GABA_AR típicamente es de -70 mV, es decir, cercano al potencial de reposo. Si la concentración de Cl⁻ extracelular es mayor a la intracelular habrá ingreso de Cl⁻ al interior celular e hiperpolarización de membrana. De lo contrario, el Cl⁻ saldrá de la neurona y se favorecerá despolarización (Olsen & Li 2012).

Si la neurotransmisión GABAérgica es insuficiente se podría provocar excitotoxicidad, puesto que no habría contrapeso a la excitación producida por la neurotransmisión glutamatérgica (Figura 4.4). A este fenómeno se le ha llamado *falla inhibitoria* y podría subyacer la fisiopatología de algunos trastornos neurodegenerativos, incluidas las ENMs (Ramírez-Jarquín *et al.* 2014). En efecto, se ha propuesto que la hiperexcitabilidad observada en pacientes en ELA podría deberse a insuficiente neurotransmisión GABAérgica o glicinérgica (Martin & Chang 2012). Por ejemplo, en la médula espinal y en la corteza motora se ha observado que la expresión de la subunidad α_1 disminuye, mientras que la glutamato descarboxilasa aumenta (Petri *et al.* 2006). También, en un estudio comparativo entre los núcleos motores resistentes y vulnerables a la degeneración en ELA realizado en la rata se encontró que la subunidad α_1 es mucho más abundante en las NMs resistentes, mientras que la α_2 lo es en las NMs vulnerables (Lorenzo *et al.* 2006). A pesar de estos hallazgos, no se han reportado cambios en la concentración extracelular de GABA en el líquido cefalorraquídeo (Kostera-Pruszczyk *et al.* 2002) o en el tejido de la médula espinal (Malessa *et al.* 1991), aunque se ha observado disminución mediante espectroscopia por resonancia magnética en la corteza frontal (Foerster *et al.* 2012).

Por otro lado, la activación de los receptores GABA_AR podría constituir una estrategia de neuroprotección en condiciones de excitotoxicidad. En un ensayo *ex vivo* de rebanadas del tallo cerebral de la rata, las NMs del hipogloso fueron protegidas de excitotoxicidad mediante la administración de propofol, un agonista del GABA_AR. Sin embargo, propofol también bloquea a los receptores de tipo NMDA, y en este mismo estudio midazolam, un agonista puro de los GABA_AR, no protegió de la degeneración excitotóxica (Ghezzi *et al.* 2017). Además, un meta-análisis reciente aportó evidencia de que los moduladores del GABA_AR, en especial gabapentina, no son eficaces en detener la progresión en los pacientes con ELA (Diana *et al.* 2017). De manera análoga al propofol, la gabapentina tiene otros blancos, como la subunidad $\alpha_2\delta$ de los Cav (Offord & Isom 2015), por lo que es difícil establecer conclusiones acerca del papel de la activación de los GABA_AR como protectores de las NMs en la médula espinal en condiciones de excitotoxicidad crónica.

4.4. LAS SIRTUINAS COMO ESTRATEGIA DE NEUROPROTECCIÓN

El modelo de excitotoxicidad crónica *in vivo* diseñado en el laboratorio es muy versátil, puesto que es posible cambiar el fármaco al cuál será expuesto la médula espinal, el tiempo de exposición, la concentración e, incluso, combinar varios fármacos en la misma minibomba. Con este modelo hemos podido evaluar posibles estrategias terapéuticas de neuroprotección, como factores de crecimiento (Tovar-y-Romo *et al.* 2007, Tovar-y-Romo & Tapia 2012) y sustratos energéticos (Netzahualcoyotzi & Tapia 2015, Santa-Cruz *et al.* 2016). Las sirtuinas han demostrado ser neuroprotectores en numerosos modelos de enfermedades neurodegenerativas (Michan & Sinclair 2007), por lo que podrían tener potencial en nuestro modelo. En efecto, como parte del trabajo realizado durante mis estudios doctorales, publiqué el trabajo de revisión “Lazo-Gómez R, Ramírez-Jarquín UN, Tovar-y-Romo LB, Tapia R. Histone deacetylases and their role in motor neuron degeneration. *Front Cell Neurosci* (2013), Dec, 5; 7:243. doi: 10.3389/fncel.2013.00243”. Una porción significativa de los contenidos mostrados en esta sección derivó de la revisión de la literatura realizada para elaborar dicho artículo de revisión.

Deacetilasas de histonas: generalidades y clasificación

La actividad y estructura de las proteínas puede ser regulada por la adición catalítica de grupos funcionales en residuos de aminoácidos específicos. Estos cambios ocurren después de la traducción, o síntesis de proteínas, por lo que en general se les conoce como modificaciones post-traduccionales (MPT). Los grupos funcionales son unidos covalentemente a la cadenas laterales de ciertos aminoácidos, en especial lisina y arginina. La lisina tiene una cadena lateral larga con tres grupos metilo y un grupo amino ϵ terminal, que forma una amina primaria. Este grupo amino adopta carga positiva en el pH fisiológico. Estas características promueven que el amino ϵ terminal se encuentre expuesto en la superficie de las proteínas, estableciendo interacciones con el agua, ácidos nucleicos y otras proteínas. Esta propiedad también hace que este grupo amino sea susceptible a ser modificado químicamente. En efecto, se han descrito más de una docena de MPTs en los residuos de lisina: acetilación, metilación, ubiquitinilación, SUMOilación, fosforilación, polifosforilación, citrulinación, succinilación, hidroxilación, malonilación, glutarilación, propionilación, butirilación, cronotilación, ADP-ribosilación, entre otras que aún quedan por caracterizar (Azevedo & Saiardi 2016).

La acetilación fue de las primeras MPTs descritas, hace más de 50 años, inicialmente en histonas (Alfrey *et al.* 1964). Cinco años después se describieron las primeras enzimas que catalizaban la remoción de grupos acetilo de las histonas (Inoue & Fujimoto 1969). La investigación surgida a partir de entonces determinó su importancia en la fisiología y la enfermedad de la acetilación y de las enzimas responsables de su regulación. Por una parte, la acetilación modula la actividad de las proteínas y enzimas involucradas en vías metabólicas y cascadas de señalización, respectivamente (Choudhary *et al.* 2014). Por otra parte, la acetilación en las histonas regula el estado conformacional de la cromatina y, en consecuencia, la expresión génica (Kouzarides 2007). Dos grupos de enzimas regulan el estado de acetilación reversible de las proteínas: las acetil-transferasas de lisina (KATs) y las deacetilasas de lisinas. Puesto que la acetilación reversible de las proteínas fue primero demostrada en las histonas, la familia de las deacetilasas de lisinas es mejor conocida como deacetilasas de histonas (*histone deacetylases* –HDACs, por sus siglas en inglés) (Choudhary *et al.* 2014).

TABLA 6.1. CLASIFICACIÓN DE LAS HDACs

Familia	Clase	Subclase	Proteína (humano)
Deacetilasas de histonas (clásicas)	I		HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8
	II	IIa	HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9
		IIb	HDAC6, HDAC10
	IV		HDAC11
Reguladores de Sir2 (sirtuinas)	III	I	SIRT1, SIRT2, SIRT3
		II	SIRT4
		III	SIRT5
		IV	SIRT6, SIRT7

HDAC, deacetilasa de histonas; SIRT, sirtuina.
Tomado y modificado de Seto & Yoshida 2014.

Hasta la fecha se han identificado 18 HDACs y, en los mamíferos, se clasifican en dos familias y cuatro clases (Tabla 4.6). Inicialmente, los genes de las HDACs fueron identificados en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y su similitud en la secuencia es la base para la clasificación. La familia de las deacetilasas de histonas (también conocida como HDACs clásicas) está conformada por tres clases: I, II (a y b) y IV. La familia regulador de Sir2 (*silent information regulator 2*), o sirtuinas, constituye la clase III de HDACs dependientes de dinucleótido de nicotinamida-adenina (NAD⁺). Es interesante señalar que, desde el punto de vista evolutivo, primero surgieron las HDACs y luego las histonas, lo que sugiere que la función inicial de esta familia de enzimas no estaba relacionada con la regulación de la expresión génica (Seto & Yoshida 2014).

La familia de las deacetilasas se caracterizan por un dominio deacetilasa clásico, que guarda homología muy alta entre las enzimas de esta familia. Este dominio posee un ion zinc necesario para la actividad catalítica y los inhibidores selectivos de las HDACs desplazan este ion del sitio activo. Las HDACs recombinantes aisladas presentan muy poca actividad deacetilasa *in vitro* y experimentos posteriores determinaron la importancia de la asociación con otras proteínas reguladoras, miembros de la maquinaria remodeladora de la cromatina (de Ruijter *et al.* 2003).

Las HDACs de la clase I se encuentran exclusivamente en el núcleo puesto que poseen una señal de localización nuclear, aunque estudios más recientes han encontrado también expresión en el citoplasma. En general, esta clase de HDACs reprimen la transcripción a través de su actividad deacetilasa en las histonas que conforman el nucleosoma (H2A, H2B, H3 y H4) y de su asociación con complejos proteicos que compactan la cromatina. Las HDACs de clase II se localizan en el núcleo y en el citoplasma, de acuerdo a ciertas señales celulares; no todas las enzimas de esta clase poseen señales de localización nuclear y, en algunos casos, también tienen secuencias de exportación nuclear. Por

ejemplo, la localización de HDAC4 depende de su estado fosforilación (mediado por la cinasa dependiente de calcio/calmodulina) y de su asociación a la proteína 14-3-3 en el citoplasma. Estas HDACs están relacionadas no sólo con la regulación de la expresión génica, sino con la actividad de cascadas de señalización, como es el caso de la HDAC6 que deacetila α -tubulina y regula la motilidad celular. HDAC11, es el único miembro de la clase IV y ha sido poco estudiada (de Ruijter *et al.* 2003, Seto & Yoshida 2014).

TABLA 6.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS SIRTUINAS DE MAMÍFEROS

<i>Sirtuina</i>	<i>Localización</i>	<i>Actividad enzimática</i>	<i>Blancos de deacilación en histonas</i>	<i>Blancos en proteínas no histonas</i>
SIRT1	Núcleo, citoplasma	Deacetilasa	H1K26, H3K9, H3K14, H3K56, H4K16	FoxO3a, PGC-1 α , NF- κ B, Ku70, Hif-1 α , Hif-2 α , myc, p53
SIRT2	Núcleo, citoplasma	Deacetilasa y demiristoilasa	H3K56, H3K18, H4K16	α -tubulina, FoxO3a, eIF5a, p53, G6PD, myc
SIRT3	Mitocondria, núcleo	Deacetilasa y decrotonilasa	H4K16	AceCS2, complejo I, GDH, SOD2, IDE2, FoxO3a
SIRT4	Mitocondria	ADP-ribosiltransferasa, deacetilasa y lipoamidasa	Ninguno	GDH, PDH, IDE, ANT
SIRT5	Mitocondria	Malonil-, succinil-, glutaril- y acetyl-deacilasa	Ninguno	CPS1
SIRT6	Núcleo	ADP-ribosiltransferasa, deacetilasa y demiristoilasa	H3K9, H3K56	NF- κ B
SIRT7	Nucleolar	Deacetilasa y desuccinilasa	H3K18, H3K122	Pol I, Hif-1 α , Hif-2 α

AceCS2, acetyl-CoA sintetasa; ANT, translocador de nucleótido de adenina; CPS1, carbamoyl-fosfato sintetasa 1; eIF5a, factor de iniciación eucariota de la traducción 5a; FoxO3a, *forkhead box*, subgrupo O 3a; G6PD, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; GDH, deshidrogenasa de glutamato; Hif, factor inducible por hipoxia; IDE, enzima de degradación de insulina; NF- κ B, factor nuclear kappa B; PDH, deshidrogenasa de piruvato; PGC-1 α , coactivador 1 α del receptor gamma activado del proliferador de peroxisomas; Pol I, polimerasa de ADN I; SIRT, sirtuina; SOD2, superóxido dismutasa 2.

Tomado y modificado de Carafa *et al.* 2016, Choudhary *et al.* 2014, Haigis & Sinclair 2010, Schiedel *et al.* 2017 y Seto & Yoshida 2014.

Las HDACs clásicas tienen una expresión amplia en los tejidos del humano, como ovario, músculo, colon y páncreas (de Ruijter *et al.* 2003). Por su parte, en el sistema nervioso de la rata adulta, Broide *et al.* (2007) reportaron que las HDACs más abundantes en la médula espinal fueron la 11, 3 y 5, en orden descendente, y éstas se expresaban de manera exclusiva en neuronas y oligodendrocitos.

La familia de los reguladores de Sir2, o de las sirtuinas, fueron descubiertos en *S. cerevisiae*, aunque inicialmente fueron identificados como ADP-ribosiltransferasas (Klar *et al.* 1979). Más de dos décadas después se determinó que también tienen actividad de acetilasa dependiente de dinucleótido de nicotinamina y adenina oxidado (NAD⁺) (Imai *et al.* 2000). Mediante análisis filogenético se han clasificado las sirtuinas en 5 subclases: I, II, III, IV y U. Las siete sirtuinas descritas en mamíferos pertenecen a las primeras cuatro subclases (ver Tabla 4.6), mientras que las de la clase U sólo se han encontrado en bacterias Gram positivas (Schiedel *et al.* 2018). Contrario a las HDACs clásicas, las sirtuinas tienen más bien actividad de acetilasa de lisinas, puesto que pueden catalizar la remoción una gran diversidad de grupos acilo, como formilo, acetilo, propionilo, butirilo, crotonilo, malonilo, succinilo, glutarilo y miristoilo (Choudhary *et al.* 2014). Las características más relevantes de las sirtuinas de los mamíferos se resumen en la Tabla 4.7.

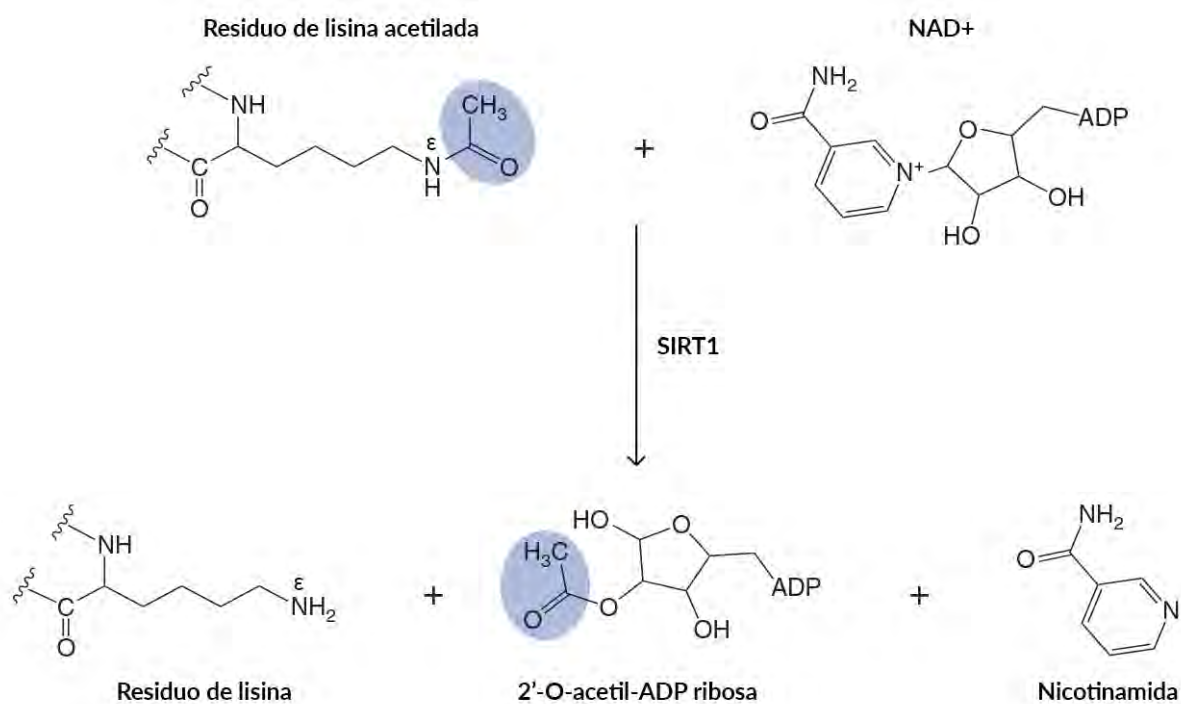


Figura 4.5. Reacción de deacetilación de SIRT1 como modelo de la actividad enzimática de las sirtuinas. El grupo ε amino terminal de la cadena lateral de la lisina está acetilado en la porción superior de la figura (elipse azul). NAD⁺ es el sustrato necesario para la remoción de los grupos acetilo por las sirtuinas. Primero, el oxígeno del grupo acetilo realiza un ataque nucleofílico en el C1 del NAD⁺, liberando nicotinamida. Luego, una serie de ataques nucleofílicos, que involucran una molécula de agua (no mostrada), terminan por escindir el grupo acetilo del grupo ε amino. Esta serie de pasos también reordenan la posición del grupo acetilo en el C2 de la molécula de ADP ribosa (elipse azul en la porción inferior). En el medio acuoso 2'-O-acetil-ADP ribosa se convierte fácilmente en 3'-O-acetil-ADP ribosa por transesterificación intramolecular no enzimática. Tomado y modificado de Seto & Yoshida 2014.

El NAD⁺ es un cofactor necesario para la actividad catalítica de las sirtuinas. La deacetilación de las lisinas, que es el mecanismo catalítico mejor estudiado, resulta en la ruptura del NAD⁺ en nicotinamida y ADP-ribosa. Posteriormente, el grupo acetilo de la lisina es donado a la ADP-ribosa para formar 2'- o 3'-O-acetil-ADP ribosa (OAADPr) y liberar la cadena lateral de la lisina deacetilada (Figura 4.5). En *S. cerevisiae* se ha establecido el importante papel de la OAADPr como molécula de señalización, pero en mamíferos aún no se ha establecido del todo su relevancia. Por otra parte, la nicotinamida inhibe la actividad de las sirtuinas al competir por el sitio de unión de NAD⁺. Algunas sirtuinas, como SIRT4 y SIRT6, también tienen actividad ADP-ribosiltransferasa, aunque su eficiencia es mucho menor que la deacetilación y significado biológico de esta actividad enzimática no ha sido esclarecido (Seto & Yoshida, 2014).

SIRT1 como moduladora de la expresión génica y de la actividad de vías de señalización

Puesto que dependen de NAD⁺ para sus actividades catalíticas, las sirtuinas vinculan el estado energético celular con la actividad de redes de señalización y con la regulación de la expresión génica (Li 2013). En efecto, la deacetilación de lisinas específicas en proteínas involucradas en vías de señalización regula su activación, ya sea a la alza o a la baja. También, la deacetilación en las histonas resulta en cambios conformacionales de la cromatina. De manera general, la cromatina poco acetilada adopta un estado de heterocromatina y disminuye la actividad de la maquinaria transcripcional, puesto que las secuencias reguladoras en el ADN quedan menos expuestas para reclutar a factores y cofactores transcripcionales (Choudhary *et al.* 2014) (Figura 4.6).

La observación de que la sobre-expresión de Sir2 aumenta la longevidad en *S. cerevisiae* estimuló la investigación sobre el papel de las sirtuinas en la fisiología y en la enfermedad (Kaeberlein *et al.* 1999). Después se encontró que la sobre-expresión de SIRT1 aumentaba la esperanza de vida de varias especies de invertebrados, como en *D. melanogaster* y en *C. elegans* (Giblin *et al.* 2014). Sin embargo, en modelos mamíferos la sobre-expresión de SIRT1 no aumenta la longevidad, aunque mejora consistentemente varios parámetros metabólicos y se asocia con envejecimiento saludable (Haigis & Sinclair 2010, Michan & Sinclair 2007). En contraste, recientemente se ha reportado que la sobre-expresión de SIRT6 en ratones macho aumenta la esperanza de vida a través de la regulación de la actividad de varios componentes la vía del IGF-1 (Kanfi *et al.* 2012).

SIRT1 es un punto maestro en la regulación de la actividad metabólica y su activación, ya sea mediante estrategias genéticas o farmacológicas, resulta en mejoría en varios aspectos del síndrome metabólico. La sobre-expresión de SIRT1 en ratones tiene efectos similares a la restricción calórica, como sensibilidad aumentada a la insulina, mayor biogénesis mitocondrial y menor incidencia de enfermedades relacionadas con el envejecimiento (Bordone *et al.* 2007). El ayuno aumenta la concentración de piruvato que, a su vez, incrementa la expresión de SIRT1. Por otra parte, el aumento de la disponibilidad de NAD⁺ también incrementa su actividad enzimática. La proteína cinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK, *AMP-activated protein kinase*) es la responsable del incremento de la concentración intracelular de NAD⁺. En efecto, muchos de los efectos de la activación de AMPK se sobrepasan a los de SIRT1 (Haigis & Sinclair 2010). SIRT1 deacetila y activa, por ejemplo, el

coactivador 1 α del receptor y activado del proliferador de peroxisomas (PGC-1 α , *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) lo que resulta en la expresión de genes relacionados con la gluconeogénesis, la glucogenólisis y la biogénesis mitocondrial en hepatocitos (Cantó & Auwerx 2009). La sintetasa de acetil-CoA 1 es otro blanco de SIRT1, cuya deacetilación aumenta su actividad e incrementa la síntesis de ácidos grasos endógenos, mientras que la activación de los factores de transcripción factor nuclear LXR (*liver X receptor*) y FoxO1 (*forkhead box O1*) promueven la transcripción de factores involucrados con la regulación de la síntesis de colesterol, de la síntesis de glucosa y de la oxidación de ácidos grasos (Li 2013).

Se han descrito otros blancos de SIRT1 relacionados con una gran variedad de procesos celulares. FoxO3a y p53 son factores de transcripción involucrados en determinar si se precipita muerte celular bajo condiciones de estrés. En un ensayo *in vitro*, Hori *et al.* (2013) encontraron que la activación de SIRT1 bajo estrés oxidativo estimula la transcripción de genes dependientes de p53 y de FoxO3a, como la SOD2, y promueve la supervivencia celular. Por otro lado, SIRT1 inhibe la señalización

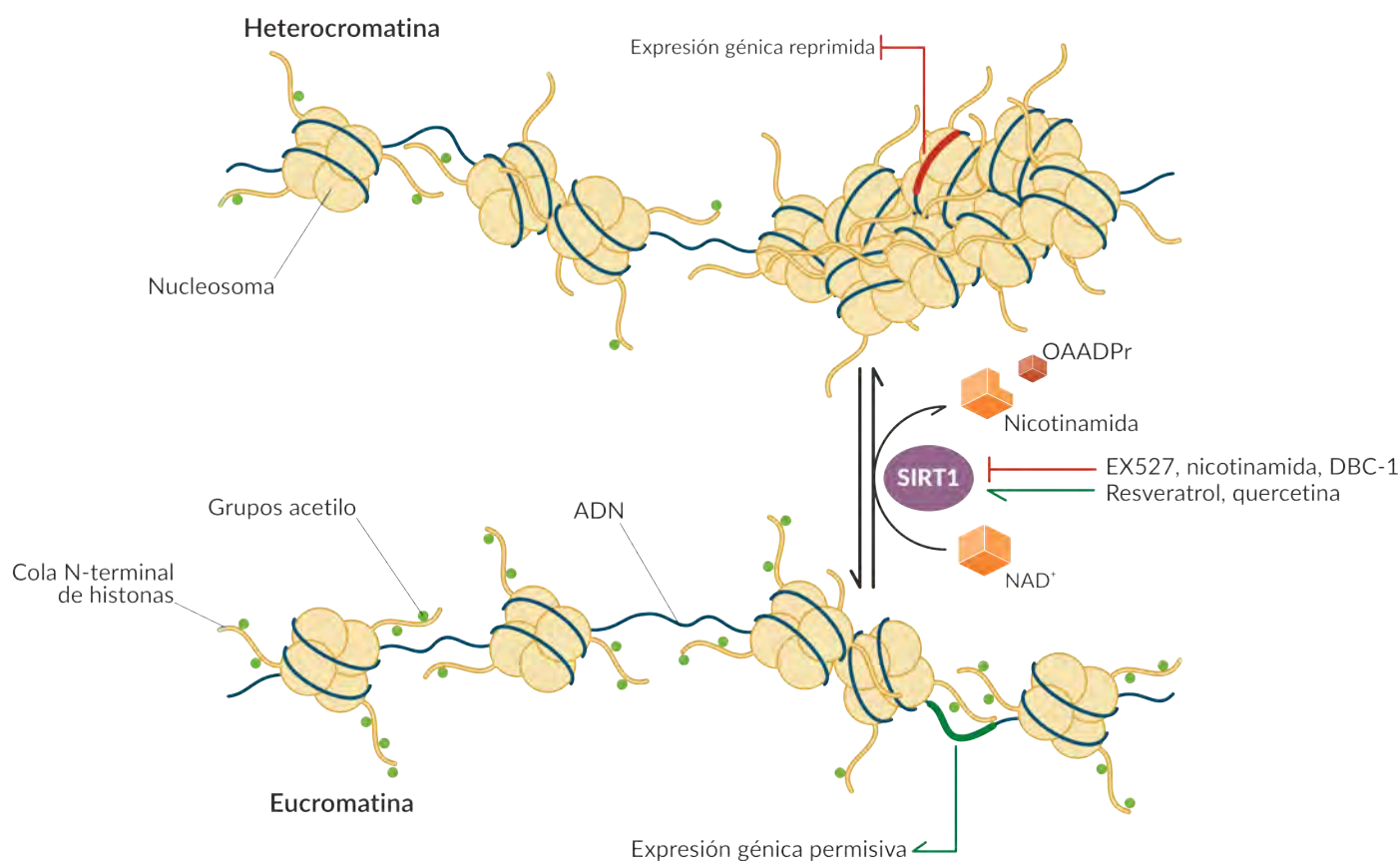


Figura 4.6. SIRT1 modula la estructura tridimensional de la cromatina a través de la deacetilación de las colas N-terminales de las histonas. Cuando la abundancia relativa de las lisinas acetiladas disminuye, la cromatina adopta un estado cerrado, o de heterocromatina, como se muestra en el esquema. Esto oculta o impide el acceso a la maquinaria transcripcional a promotores o *enhancers*, que en consecuencia disminuye la síntesis de ARN mensajero. La actividad de SIRT1 es regulada por agentes endógenos (como nicotinamida y DBC-1) y puede ser modificada por moléculas exógenas (EX527, resveratrol y quercetina) (ver sección *Activadores e inhibidores de SIRT1*).

dependiente del factor nuclear κ B (NF- κ B, *nuclear factor kappa B*), promueve el metabolismo oxidativo en las células del sistema y detiene la inflamación a través de la deacetilación de la subunidad p65 (Kauppinen *et al.* 2013). También, el factor inducible por hipoxia 1 α (Hif-1 α , *hypoxia inducible factor 1 alpha*) es estabilizado por SIRT1 tras ser deacetilado, lo que promueve la síntesis de factores relacionados con la supervivencia celular y la invasión tisular en cáncer, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el transportador de glucosa 1 (GLUT1, *glucose transporter 1*) y la metaloproteínasa de matriz 2 (MMP2, *matrix metalloproteinase 2*) (Joo *et al.* 2015).

La organización de la cromatina en los mamíferos y, en consecuencia, la actividad transcripcional de ciertos genes también es regulada por la deacetilación de las histonas. SIRT1 deacetila las lisinas 16 de la histona 4 (H4K16) y 9 de la histona 3 (H3K9), lo que induce la formación de heterocromatina facultativa. Esto es seguido del reclutamiento de la histona 1, su deacetilación en la lisina 26 (H1K26), la demetilación de la H3K79 y el silenciamiento transcripcional (Vaquero *et al.* 2004). El nivel de acetilación de H3K56 incrementa durante la fase S del ciclo celular y es crítico para la estabilidad genómica. Aunque este sitio es blanco de SIRT1, la ausencia de esta sirtuina aumenta la cantidad de sitios con evidencia de daño al ADN (Yuan *et al.* 2016). También la H3K14 es deacetilada por SIRT1, lo que disminuye la expresión de Hif-1 α *in vitro* (Dong *et al.* 2016); este hallazgo ofrece información acerca de los diferentes niveles de regulación que SIRT1 puede tener en una misma vía de señalización dependiente del contexto.

Papel de SIRT1 en enfermedades degenerativas del sistema nervioso central

El papel de esta SIRT1 en la fisiología en los mamíferos ha quedado evidenciado por una gran cantidad de estudios (Michan & Sinclair 2007, Haigis & Sinclair 2010). En el sistema nervioso central de los mamíferos SIRT1 participa de manera muy relevante en muchos procesos. Durante el neurodesarrollo SIRT1 regula la elongación axonal, el crecimiento de neuritas, la ramificación dendrítica y la elección de la estirpe celular de los precursores neurales. A través de su importante papel en el hipotálamo, afecta el ciclo circadiano, la función endocrina y la alimentación. También se ha visto involucrada en la modulación de la plasticidad y la formación de memorias (Herskovits & Guarente 2014). SIRT1 tiene una amplia distribución en el sistema nervioso central de los mamíferos, como lo demostró un estudio de hibridación *in situ* en cerebros de ratón, rata y humano. Esta sirtuina es más abundante en la médula espinal, el hipocampo, los ganglios de base, el tallo cerebral y el cerebelo, y se expresa exclusivamente en el núcleo de neuronas GABAérgicas y dopaminérgicas (Zakhary *et al.* 2010)

Puesto que SIRT1 se encuentra involucrada en muchos procesos fisiológicos del sistema nervioso, también se ha estudiado su papel en trastornos neurodegenerativos. En algunas de estas enfermedades la activación de SIRT1 resulta protectora. En un modelo *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer, la sobre-expresión de SIRT1 está relacionada con menor toxicidad al amiloide β mediado por una disminución en la expresión microglial de NF- κ B (Chen *et al.* 2005). Este hallazgo fue corroborado *in vivo* en el ratón doble transgénico para la proteína precursora del amiloide y presenilina 1, aunque en este estudio el sustrato de SIRT1 responsable de los efectos benéficos fue el receptor de ácido retinoico β (Donmez *et al.* 2010). En modelos *in vivo* de la enfermedad de Parkinson la activación

de SIRT1 también es protectora, puesto que deacetila y activa al factor de choque térmico 1 (Donmez *et al.* 2012). La activación de SIRT1 también provoca la deacetilación y la activación transcripcional de PGC-1 α en un ratones tratados con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP), un modelo ampliamente utilizado de degeneración de neuronas dopaminérgicas (Mudò *et al.* 2012).

Los resultados de la activación de SIRT1 en otros trastornos neurodegenerativos han sido contradictorios. En la enfermedad de Huntington, por una parte, la sobre-expresión de SIRT1 protege de la neurotoxicidad provocada por la huntingtina mutante en modelos murinos (Jeong *et al.* 2012, Jiang *et al.* 2012). Sin embargo, en un modelo de neurotoxicidad por huntingtina en *D. melanogaster* la inhibición de SIRT1 resulta protectora (Pallos *et al.* 2008). Interesantemente, este hallazgo es apoyado por el desarrollo clínico de selisistat, un potente y selectivo inhibidor de SIRT1 (ver más abajo), en pacientes con enfermedad de Huntington (Reilmann *et al.* 2014, Süßmuth *et al.* 2015). En las enfermedades por priones también los resultados han sido mixtos. Estos trastornos degenerativos resultan de la neurotoxicidad ocasionada por la proteína priónica conformacionalmente alterada (PrP^{Sc}). En un estudio *in vivo* la inhibición de SIRT1 retrasa la propagación de la PrP^{Sc} (Chen *et al.* 2008), mientras que otro encontró que la autofagia inducida por la activación de SIRT1 previene la neurodegeneración (Jeong *et al.* 2013). En esclerosis múltiple, un trastorno autoinmune con un importante componente neurodegenerativo, la sobre-expresión de SIRT1 mejora el daño axonal *in vivo* (Nimmagadda *et al.* 2013) aunque también se ha observado que la delección de SIRT1 retrasa el inicio y la parálisis (Rafalski *et al.* 2013).

Las observaciones realizadas en modelos de trastornos degenerativos del sistema nervioso central indican que SIRT1 es un blanco terapéutico con potencial para el tratamiento de ENMs. Además, se han descrito más de 50 proteínas blanco de SIRT1, entre histonas y no histonas (Schiedel *et al.* 2017), lo que podría sugerir vías de señalización u otros blancos moleculares relevantes para explorar modalidades de tratamiento innovadoras.

Activadores e inhibidores de SIRT1

La identificación de moléculas endógenas reguladoras y el desarrollo de compuestos capaces de activar o inhibir a las sirtuinas, incluida SIRT1, es un área de investigación activa (Carafa *et al.* 2016). SIRT1 puede ser activado por el regulador activo de SIRT1 (AROS, *active regulador of SIRT1*), lo que disminuye la actividad transcripcional de p53 (Kim *et al.* 2007b). Por otro lado, SIRT1 puede sufrir también MPTs, como fosforilación, SUMOilación y nitrosilación, las cuales aumentan su actividad deacetilasa dependiendo del blanco (Revollo & Li 2013). También es posible activar a SIRT1 mediante compuestos exógenos. Los polifenoles son compuestos derivados de plantas que han surgido como una estrategia terapéutica prometedora para trastornos neurodegenerativos (Ebrahimi & Schliesner 2012, Del Rio *et al.* 2013). Este efecto benéfico ha sido atribuido a la activación alostérica de SIRT1 (Min *et al.* 2013). Entre la gran cantidad de compuestos polifenólicos descubiertos, resveratrol (RSV) y quercetina (QCT) son dos de las moléculas más interesantes (Figura 4.7). RSV es un compuesto activador de sirtuinas bien documentado y tiene efectos protectores en modelos *in vitro* e *in vivo* de neurodegeneración mediada por excitotoxicidad (Zhang *et al.* 2015). Además, también se ha

demostrado que RSV tiene efectos neuroprotectores a través de la estimulación alostérica de AMPK (Dasgupta and Milbrandt, 2007).

Por otro lado, QCT reduce la muerte neuronal inducida por glutamato *in vitro* en el hipocampo (Yang *et al.* 2013) y en la retina (Nakayama *et al.* 2011), así como el daño neuronal en un modelo *in vivo* de isquemia cerebral focal (Pandey *et al.* 2011). Además, recientemente se reportó que prevenía la degeneración hipocampal mediada por hipoxia a través de la modulación de la expresión de SIRT1 (Liu *et al.* 2015). Sin embargo, los estudios sobre los efectos de estos compuestos en modelos experimentales de ENM son escasos.

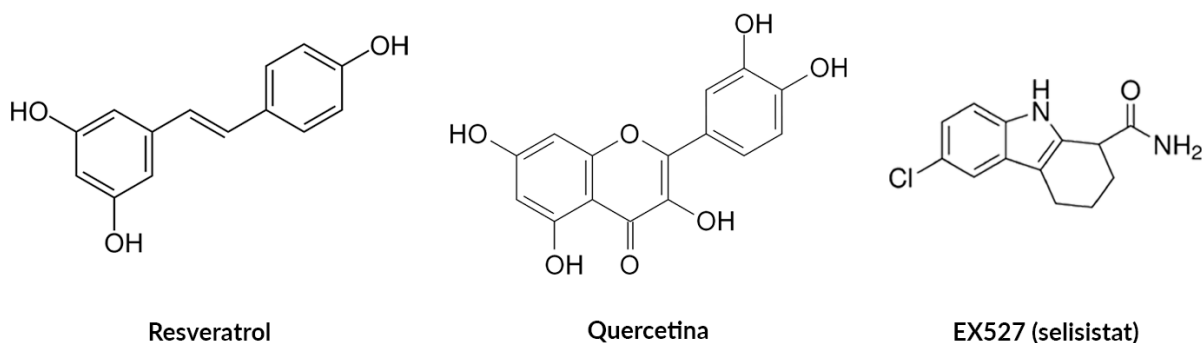


Figura 4.7. Estructuras moleculares de resveratrol, quercetina y EX527 (selisstat). Resveratrol y quercetina son polifenoles activadores de sirtuinas, mientras que EX527 es un potente y selectivo inhibidor de SIRT1.

También se han identificado algunos inhibidores endógenos de SIRT1, como la proteína suprimido en cáncer de mama 1 (DBC1, *deleted in breast cancer 1*) (Kim *et al.* 2008). La metilación de SIRT1 disminuye su actividad enzimática (Revollo & Li 2013), al igual que el producto nicotinamida (Seto & Yoshida 2014). La inhibición de las sirtuinas es de gran interés en ciertas áreas terapéuticas, como es el cáncer. Es por ello que se han identificado y generado una gran variedad de compuestos sintéticos con capacidad variable para inhibir SIRT1, como análogos de nicotinamida, de NAD⁺, derivados de hidroxinaftaldehído, tiobarbituratos e inhibidores de cinasas (Schiedel *et al.* 2017). El primer inhibidor selectivo sintético de SIRT1 fue EX527 (o selisstat), con una concentración inhibitoria al 50% (IC₅₀) de 98 nM; hasta la fecha es uno de los inhibidores más potentes identificados (Napper *et al.* 2005) (Figura 4.7). De hecho, este compuesto es seguro y bien tolerado en pacientes con enfermedad de Huntington (Reilmann *et al.* 2014, Süßmuth *et al.* 2015). Hasta la fecha, ningún inhibidor de SIRT1 ha sido evaluado en modelos animales o pacientes con ENM.

SIRT1 y sus blancos como estrategia terapéutica en enfermedades de neurona motora

Hasta hace poco se comenzó a reconocer que SIRT1 podría experimentar cambios durante el curso de la ELA (para una revisión detallada véase Tang *et al.* 2017). Por ejemplo, la expresión de SIRT1 está aumentada en la corteza cerebral (especialmente en la capa de neuronas piramidales), el hipocampo, el tálamo y la médula espinal de ratones transgénicos hSOD1^{G93A} en etapa sintomática

(Lee *et al.* 2012). En tejido post-mortem de pacientes con ELA estos hallazgos fueron similares: SIRT1, SIRT2 y SIRT5 están sobre-expresadas en las neuronas de la médula espinal, aunque en la corteza cerebral se encontró menos abundancia del mRNA de SIRT1 y 2 (Körner *et al.* 2013).

Además, se ha acumulado evidencia que confirma el efecto protector de la actividad de SIRT1 en modelos de ELA familiar, en especial de aquellos derivados del ratón transgénico hSOD1^{G93A} (Tang 2017). En cultivos corticales primarios obtenidos de ratones transgénicos se observó que RSV protege de la muerte neuronal y que dicho efecto dependía de la activación de SIRT1 (Kim *et al.* 2007a). De manera similar, en un estudio *in vitro* de células 4.1 de la médula espinal ventral parecidas a NMs, transfectadas con hSOD1^{G93A}, se encontró que la expresión de SIRT1 se encontraba disminuida y que RSV prevenía la muerte neuronal (Wang *et al.* 2011). Por otra parte, en modelos *in vivo* en el mismo ratón transgénico la activación de SIRT1 mediante la administración crónica de RSV retrasa el inicio de la enfermedad y extiende la esperanza de vida (Han *et al.* 2012, Mancuso *et al.* 2014, Song *et al.* 2014). Este efecto protector en la esperanza de vida ha sido confirmado en un ratón doble transgénico hSOD1^{G93A} que también sobre-expresa SIRT1 en el cerebro y en la médula espinal, aunque el inicio de la enfermedad no tuvo cambios (Watanabe *et al.* 2014).

Los mecanismos a través de los cuales SIRT1 brinda efectos neuroprotectores en los modelos de ELA no han sido esclarecidos, aunque algunos estudios han brindado información relevante. Por ejemplo, la sobre-expresión de SIRT1 en el ratón transgénico resultó en deacetilación, e inactivación, de la proteína de choque térmico 1 y de p53 (Han *et al.* 2012). En un estudio *in vitro* de NMs en las que se inducía muerte a través de varios mecanismos (como excitotoxicidad, sobre-expresión de hSOD1^{G93A}, de p150^{glued} mutante o del receptor de andrógenos con expansión de poliglutaminas), la expresión dirigida de FoxO3a al núcleo a través de métodos farmacológicos o de manipulación genética evitaba la muerte neuronal (Mojsilovic-Petrovic *et al.* 2009). En contraste, FoxO3a también induce la sobre-expresión del ligando de Fas en NMs en cultivo derivadas de factores tróficos, lo que precipita muerte neuronal (Barthélémy *et al.* 2004). PGC1- α también participa en la fisiopatología de la ELA, puesto que se han encontrado expresión disminuida de este cofactor en el músculo y en la médula espinal de ratones transgénicos y de pacientes con ELA esporádica (Thau *et al.* 2012). Incluso, PGC1- α podría servir como una estrategia terapéutica, puesto que la sobre-expresión dirigida de este cofactor en las neuronas del ratón transgénico mejoró la supervivencia y el desempeño en las tareas motoras (Zhao *et al.* 2011). Sin embargo, otro estudio con ratones dobles transgénicos no encontró aumento de la esperanza de vida, aunque se observó mejoría en el desempeño de las tareas y disminución en la muerte neuronal (Liang *et al.* 2011).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La excitotoxicidad mediada por glutamato es uno de los mecanismos primordiales propuestos para explicar la degeneración neuronal en las enfermedades de neurona motora, como en la esclerosis lateral amiotrófica. Abundante evidencia señala que la activación del receptor de tipo AMPA está implicado en este proceso. Basados en estos antecedentes, en nuestro laboratorio se diseñó un modelo de excitotoxicidad crónica en la médula espinal *in vivo* que depende de la administración del agonista exógeno AMPA. Esta metodología también nos ha permitido evaluar el potencial efecto protector de numerosas estrategias.

Investigaciones previas realizadas en el laboratorio han encontrado que la estimulación de la liberación de glutamato endógeno, mediante el bloqueo de canales K_v con 4AP, provoca que la concentración extracelular de glutamato aumente en varias regiones del sistema nervioso central, como el hipocampo y el estriado. Este tratamiento conduce a excitotoxicidad y muerte neuronal que es evitada con la administración de antagonistas de receptores ionotrópicos de glutamato. En la médula espinal, por su parte, la administración de 4AP *in vivo* en un modelo agudo (mediante microdiálisis) aumenta la concentración de glutamato extracelular, resultando en fasciculaciones en los miembros pélvicos, sugestivas de hiperexcitabilidad. Sin embargo, este tratamiento no provoca degeneración de neuronas motoras. Es posible que la duración del tratamiento no sea suficiente para precipitar neurodegeneración.

La estimulación crónica de la liberación de glutamato endógeno podría constituir una forma de provocar excitotoxicidad más cercana a la que ocurre en las enfermedades de neurona motora. Sin embargo, esta forma de provocar excitotoxicidad no ha sido evaluada en nuestro modelo *in vivo* de infusión crónica a la médula espinal mediante minibombas osmóticas. También, la caracterización de los mecanismos neuroquímicos que subyacen los efectos de la liberación de glutamato endógeno podría otorgar indicios para entender mejor la degeneración de las neuronas motoras *in vivo*.

Por otro lado, la caracterización de blancos terapéuticos y el desarrollo de potenciales tratamientos es un área prioritaria en las enfermedades de neurona motora, puesto que son trastornos degenerativos con mortalidad uniforme. Hasta la fecha, no existen estrategias terapéuticas para detener o aminorar la progresión de la parálisis ni la muerte de las NMs. Se ha demostrado que en la esclerosis lateral amiotrófica existen alteraciones en el metabolismo energético y en la regulación transcripcional que podría subyacer, e incluso explicar, la degeneración selectiva de NMs.

Las sirtuinas son la clase III de las HDACs y dependen de NAD^+ para llevar a cabo su actividad catalítica. Estas proteínas regulan la actividad de muchas otras vías de señalización a través de su actividad de deacetilasa. Se ha propuesto que, dada su relación con NAD^+ , las sirtuinas sirven como enlace entre el estado energético celular con la expresión génica a través de cambios epigenéticos. SIRT1 es la sirtuina más abundantemente expresada en el sistema nervioso central de los mamíferos, incluidas las NMs espinales. Existe evidencia de que la expresión y la actividad de SIRT1 se encuentran

disminuidas en modelos *in vivo* de ELA así como en tejido del SNC de pacientes. En modelos *in vitro* de ELA se ha encontrado que revertir estos cambios disminuye la degeneración de NMs.

La evidencia de los efectos protectores de la modulación de la actividad de sirtuinas en NMs es escasa, aunque los resultados en trabajos *in vitro* sugiere que se podría tratar de una estrategia plausible. Es por ello que evaluamos el potencial efecto neuroprotector de la activación crónica de SIRT1 en nuestro modelo de neurodegeneración espinal inducido por excitotoxicidad crónica *in vivo*.

6. OBJETIVOS

Como se ha establecido en las secciones ORGANIZACIÓN DE LA TESIS y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, esta tesis está dividida en dos partes que consistieron en la exploración de los mecanismos neuroquímicos y en estrategias de neuroprotección en la degeneración excitotóxica de las neuronas motoras de la médula espinal *in vivo*. Es por ello que cada parte cuenta con sus propios objetivos, como se detallan a continuación.

6.1. EFECTOS SOBRE LAS NEURONAS MOTORAS DE LA ESTIMULACIÓN CRÓNICA DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO ENDÓGENO EN LA MÉDULA ESPINAL *IN VIVO*.

Objetivo general

Evaluar los efectos de la infusión crónica de 4AP en la médula espinal *in vivo* sobre la conducta motora y el número de neuronas motoras, y los mecanismos neuroquímicos que los subyacen.

Objetivos particulares

- I. Estudiar el papel de los receptores ionotrópicos de glutamato, de tipo NMDA y AMPA, en los efectos observados por la infusión de 4AP.
- II. Estudiar el papel del receptor de GABA_A en los efectos observados por la infusión de 4AP.
- III. Evaluar el potencial efecto neuroprotector de la activación crónica de receptores de GABA_A contra la excitotoxicidad inducida por AMPA en la médula espinal.
- IV. Evaluar el efecto de la infusión crónica de NMDA en la médula espinal sobre la conducta motora y el número de neuronas motoras.

6.2. LAS SIRTUINAS COMO MECANISMO PROTECTOR EN UN MODELO DE NEURODEGENERACIÓN DE NEURONAS MOTORAS ESPINALES POR EXCITOTOXICIDAD CRÓNICA.

Objetivo general

Evaluar el potencial efecto protector de la infusión crónica de los polifenoles RSV y QCT en la médula espinal *in vivo* sobre la conducta motora y el número de neuronas motoras en un modelo de neurodegeneración inducido por excitotoxicidad crónica.

Objetivos particulares

- I. Describir si existe expresión de la proteína SIRT1 en la médula espinal lumbar de rata en condiciones fisiológicas, así como su distribución .

- II. Evaluar el efecto de la infusión crónica de RSV en la médula espinal sobre la conducta motora, el número de neuronas motoras y el número de células gliales (astrocitos y microglia) en condiciones de excitotoxicidad crónica mediada por AMPA.
- III. Evaluar el efecto de la infusión crónica de QCT en la médula espinal sobre la conducta motora, el número de neuronas motoras y el número de células gliales (astrocitos y microglia) en condiciones de excitotoxicidad crónica mediada por AMPA.
- IV. Estudiar la contribución de la actividad de SIRT1 a los efectos observados resultantes de la infusión crónica de RSV y de QCT.
- V. Evaluar el efecto de la inhibición crónica de SIRT1 en la médula espinal sobre la conducta motora, el número de neuronas motoras y el número de células gliales (astrocitos y microglia) en condiciones basales y de excitotoxicidad crónica mediada por AMPA.
- VI. Evaluar el efecto de la inhibición crónica de las otras clases de deacetilasas de histonas en la médula espinal sobre la conducta motora y el número de neuronas motoras en condiciones basales y de excitotoxicidad crónica mediada por AMPA.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas macho Wistar (280 a 300 gramos) en todos los experimentos. Los animales fueron manejados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (*Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*) y con estándares internacionales para el bienestar de los animales de investigación (incluyendo las guías ARRIVE -*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*). También hubo autorización del Comité Institucional para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio (número de aprobación del protocolo RTI21-14).

Todos los animales fueron resguardados en un ambiente controlado (vivario del Instituto de Fisiología Celular, UNAM), con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo anestesia general. Se llevaron a cabo todas las medidas necesarias para disminuir y minimizar el sufrimiento y el estrés de los animales durante los procedimientos experimentales, y para utilizar la menor cantidad de animales posible sin perder poder estadístico.

Preparación de minibombas osmóticas

Con el propósito de realizar administraciones crónicas de los fármacos directamente a la médula espinal, se utilizaron minibombas osmóticas marca Alzet, modelo 2004 (Durect Corp.; Cupertino, CA, EUA). Estas minibombas tienen un volumen promedio de ~250 μL y un flujo 6 $\mu\text{L}/\text{día}$, para alcanzar una duración promedio de aproximadamente 28 días. Las minibombas se componen de un tubo dosificador y de la minibomba *per se*. El tubo dosificador fue modificado, pegando un tramo de tubo de vinilo de 3-4 mm con adhesivo líquido instantáneo de cianoacrilato (Loctite 495, Henkel; Düsseldorf, Alemania), para lograr la administración dirigida de los contenidos a la bomba a una cánula y, luego, a la médula espinal.

Las minibombas osmóticas fueron primero llenadas con las soluciones de los compuestos, en las concentraciones indicadas (Tabla 7.1), y después se terminaron de ensamblar con la colocación del tubo dosificador modificado. Estas bombas requieren un período de incubación bajo parámetros fisiológicos de temperatura y osmolaridad durante 40 horas antes de alcanzar el flujo estable que señala el fabricante. Para tal efecto, las minibombas osmóticas, tras haber sido llenadas con las soluciones de los compuestos en las concentraciones indicadas y del ensamble del tubo modificador, fueron incubadas en solución salina al 0.9% a 35.5-37.0° C por 48 horas previo a su implante quirúrgico en los animales.

Para el caso de los polifenoles (RSV, QCT y EX) se calculó la concentración necesaria para que, de acuerdo con las características que se detallaban en cada lote de minibombas osmóticas (volumen total y flujo promedio), fuesen infundidos en la médula espinal 1 o 10 nanomolas por día (nm/d) de fármaco.

TABLA 7.1. FÁRMACOS Y CONCENTRACIONES UTILIZADAS

Fármaco	Abreviatura	Concentración utilizada	Efecto farmacológico
Solución salina fisiológica	SS	0.9%	Ninguno; tomado como control según se indique.
PBS 0.1 M/dimetilsulfóxido al 3%	Control	No aplica	Ninguno; tomado como control según se indique.
4-aminopiridina ¹	4AP	35 mM	Bloqueador de canales de potasio dependientes de voltaje
Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico ^{1,2}	AMPA	7.5 mM	Activador de receptores ionotrópicos de glutamato tipo AMPA
Ácido N-metil-D-aspartico ¹	NMDA	7.5 mM	Activador de receptores ionotrópicos de glutamato tipo NMDA
Dizocilpina ¹	MK801	1 mM	Bloqueador de receptores ionotrópicos de glutamato tipo NMDA
2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahidrobenzo[f]quinoxalina-7-sulfonamida ¹	NBQX	1 mM	Bloqueador de receptores ionotrópicos de glutamato tipo AMPA
Metbromuro de bicuculina ¹	BIC	5 mM	Bloqueador de receptores ionotrópicos de GABA _A
Muscimol ¹	MUSC	10 mM	Activador de receptores ionotrópicos de GABA _A
Resveratrol ²	RSV	1 o 10 nanomolas/día	Activador de SIRT1, a evaluar
Quercetina ²	QCT	1 o 10 nanomolas/día	Activador de SIRT1, a evaluar
EX527 ²	EX	1 o 10 nanomolas/día	Inhibidor de SIRT1, a evaluar
Butirato de sodio ²	But	20 mM	Inhibidor de HDACs clásicas

1. Fármacos disueltos en solución salina al 0.9%. 2. Fármacos disueltos en PBS 0.1 M/dimetilsulfóxido al 3%. NMDA, 4-AP, But, BIC y MUSC fueron comprados de Sigma Aldrich (Darmstadt, Alemania), mientras que AMPA, MK801 y NBQX fueron comprados de Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido).

Implante quirúrgico de las minibombas osmóticas

Se utilizó el procedimiento descrito por Tovar-y-Romo *et al.* (2007) con algunas modificaciones menores, como se describe a continuación. Los animales fueron anestesiados con isoflurano al 5.0% en carbógeno (una mezcla de gas compuesto de 95% O₂/5% CO₂), en una cámara de inducción anestésica, a razón de 2 L/min por 4 minutos. Después fueron montados en una unidad de cirugía

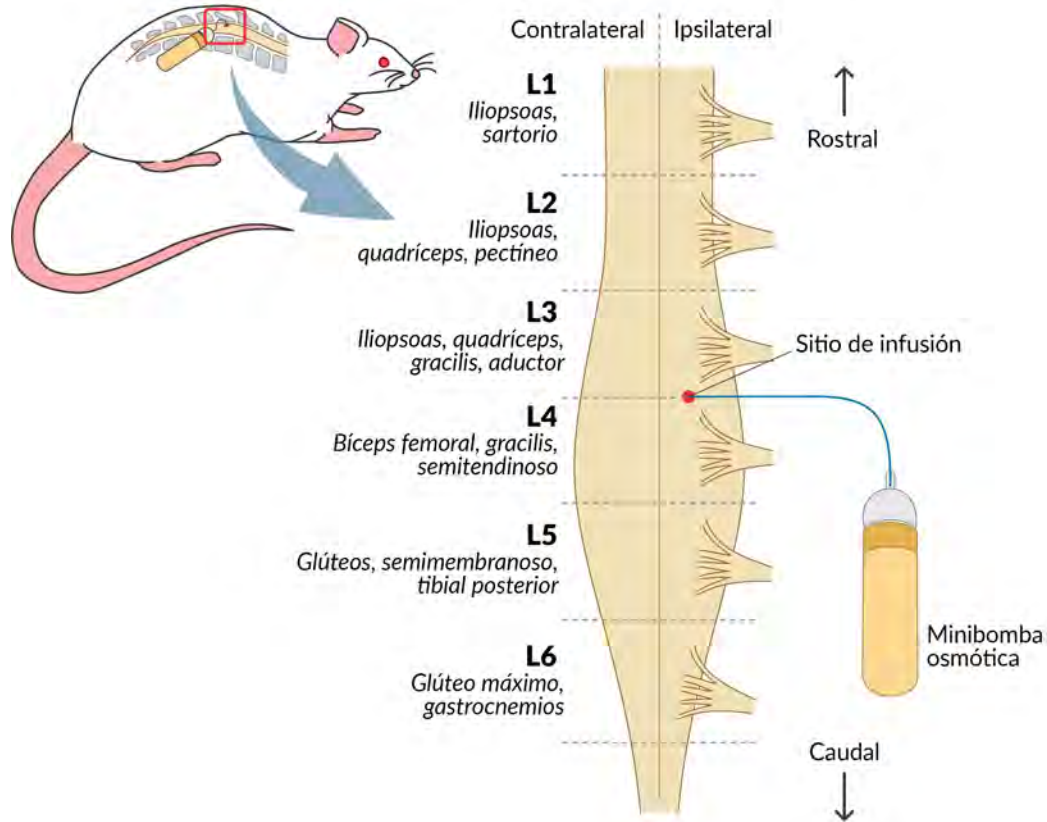


Figura 7.1. Esquema del modelo crónico de infusión en la médula espinal de ratas *in vivo* mediante minibombas osmóticas. A los animales se le coloca la minibomba osmótica en un espacio subcutáneo. Mediante una cánula (línea azul), la minibomba infunde sus contenidos, a lo largo de hasta 28 días continuos, directamente al tejido de la médula espinal que se elija (Sitio de infusión). En este modelo el sitio de infusión es entre los mielómeros L3 y L4, que inervan los músculos de las extremidades traseras de la ratona (véase Tabla 4.2). Los componentes del modelo (médula espinal y minibomba osmótica) no están a escala.

espinal estereotáctica; la concentración de isoflurano fue gradualmente disminuida hasta mantenerla en 1.5-2.0%, mientras que el flujo de carbógeno fue mantenida en 2 L/min a lo largo del procedimiento.

Los animales fueron marcados en la base de la cola con un número consecutivo con un marcador permanente, se les rasuró la espalda (en la región torácica y lumbar) y se desinfectó la piel con etanol al 70%. Se realizó una incisión en el plano sagital mediano, de 3.5-4.0 cm de largo, en la espalda del animal. Se separó la piel y se disecó la fascia y los tejidos subyacentes para exponer adecuadamente el músculo dorsal ancho y sus inserciones en los procesos espinosos de la columna vertebral lumbar. Luego, se identificó el proceso espinoso de la vértebra L3, el tejido muscular y conectivo fueron disecados y retirados para visualizar la lámina vertebral. Esta vértebra es fácilmente identificable por la inserción tendinosa en el extremo más rostral del dorsal ancho en la columna vertebral.

Una vez que se limpió la lámina vertebral, el proceso espinoso fue desgastado en su totalidad con un taladro Mototool Dremel 3000 (Racine, WI, EUA) al que se le adaptó una fresa para odontología

(modelo HP-2, SS White Technologies Inc.; Lakewood, NJ, EUA). Se realizó un trépano de ~1 mm de diámetro en la lámina izquierda al cual se le fijó un tornillo de acero inoxidable (3.7 mm de largo y 1 mm de diámetro). Luego, auxiliado con un estereoscopio, se realizó un trépano rectangular de ~2 mm de ancho y ~4 mm de largo hasta que se logró la visualización de la porción dorsal de la médula espinal. Con un gancho metálico, elaborado en el laboratorio, cuidadosamente se retiraron las meninges para exponer el tejido de la médula espinal. La permeabilidad de una cánula, previamente elaborada en el laboratorio, fue probada con solución salina o PBS filtrados. Las cánulas consisten en tubos plásticos de ~1 cm de longitud a los que se les pega, mediante cemento epóxico y pegamento de cianoacrilato líquido (Loctite 495), en un extremo un capilar de vidrio de sílice fundida de 1 mm de longitud, 50 μm de diámetro interno y 80 μm de diámetro externo (no. de catálogo CV0508, VitroCom Inc.; Mountain Lakes, NJ, EUA). La cánula fue colocada en una unidad estereotáxica y dirigida hacia el trépano en la lámina derecha. Con ayuda de las guías milimétricas de la unidad estereotáxica se avanzó, en el plano vertical, hacia el tejido de la médula espinal 0.8-1.0 mm. Se tuvieron precauciones de que la inserción del capilar de vidrio no dañara estructuras vasculares y que estuviera en la zona anatómica correcta, entre los mielómeros L3 y L4 (Figura 7.1).

Se vertió cemento dental acrílico recién preparado sobre la lámina de la vértebra L3 y se permitió que fraguara en el lugar. El cemento acrílico asegura que la cánula no se desplazará puesto que se adhiere al tornillo metálico colocado en la lámina izquierda; además, protege a la médula espinal que ha quedado expuesta. Se separó, mediante disección roma, la piel del músculo en el lado derecho a la incisión, con el propósito de crear un espacio subcutáneo donde sería colocada la minibomba osmótica. Luego de colocar la minibomba osmótica en el espacio subcutáneo, se embonó la tubería plástica de la cánula (el extremo libre) al tubo adaptador de vinilo adherido en el laboratorio. Las zonas pertinentes fueron cuidadosamente secadas con algodón o gasas, y se colocó adhesivo líquido instantáneo de cianoacrilato. El objetivo de este procedimiento es administrar de manera continua y directa los fármacos cuyos efectos se desea estudiar en el asta ventral de la médula espinal, donde se encuentran las NMs.

Finalmente, la incisión en la espalda fue cerrada con clips quirúrgicos de acero inoxidable, se administró una dosis única intraperitoneal de antibiótico (enrofloxacino, 2.5 mg/kg en dosis única; Bayer Animal Health; Ciudad de México, México), y los animales fueron colocados en un colchón caliente y con carbógeno suplementario hasta que recuperaron la conciencia. Después, fueron colocados en sus cajas y se les permitió recuperarse en el vivario 24 horas.

Evaluación de la conducta motora

De cuatro a cinco días previos al implante quirúrgico de la minibomba osmótica, los animales fueron habituados a caminar en un rodillo elevado giratorio (Rotarod, Columbus Instruments Int.; Columbus, OH, EUA) por 120 segundos, iniciando en 10 rpm y con una aceleración de 0.2 rpm/s. Después del implante de la minibomba osmótica, los animales fueron evaluados una vez al día, por 5 a 15 días (de acuerdo con el experimento realizado) y se registró el tiempo para caer (en segundos) del rodillo giratorio en tres ocasiones; el tiempo máximo permitido fue de 120 s. El intento en el que se

registró el mayor tiempo para caer fue tomado en cuenta para realizar las gráficas y el análisis estadístico. Se realizó el primero registro el mismo día que se realizó el implante quirúrgico (día 0), unas horas antes del mismo; este valor se consideró el basal.

También, se midió la fuerza de empuje, en ponds (1 pond = 0.009807 Newtons) de ambas extremidades traseras mediante un medidor de fuerza de agarre (TSE Systems; Chesterfield, MO, EUA). Los animales se colocaron en una rejilla metálica acoplada a un componente piezoeléctrico, y fueron entrenadas a empujar la rejilla al jalar gentilmente la cola del animal. Se realizaron tres intentos y entre cada intento se permitió al animal descansar el tiempo suficiente; siempre se evaluó primero el tiempo para caer de Rotarod y luego la fuerza de empuje. Se utilizó para las gráficas y el análisis estadístico sólo el valor mas elevado de fuerza de los tres intentos. De manera similar a la prueba de Rotarod, los animales fueron entrenados de cuatro a cinco días previos al implante de la minibomba osmótica. También, se registró la fuerza de empuje de las patas traseras de los animales unas horas antes del procedimiento (día 0), y ese valor se tomó como basal. Se midió la fuerza de empuje diario, por 5 a 15 días, de acuerdo al tratamiento utilizado, y los valores de fuerza obtenidos fueron normalizados con respecto al valor basal.

Perfusión y fijación

Al finalizar el experimento los animales fueron perfundidos y fijados con paraformaldehído al 4% en PBS (Tovar-y-Romo *et al.* 2007). Para tal efecto, los animales fueron anestesiados con 1.5 ml de pentobarbital intraperitoneal. Cuando se alcanzó anestesia profunda (y antes de que se presentara paro cardiorrespiratorio), la caja torácica fue expuesta y la parrilla costal cortada para exponer el corazón. Se realizó un corte amplio en la aurícula derecha y se insertó una aguja, conectada mediante tubería plástica a una bomba peristáltica (modelo 7553-70 6-600 rpm; Cole-Parmer Instrument Company; Vernon Hills, IL, EUA), en el ápice del ventrículo izquierdo. Aproximadamente 250 mL de solución salina al 0.9% a 4° C fueron perfundidos, seguidos de ~250 mL de una solución de paraformaldehído al 4% en PBS 0.1 M. Se tomaron precauciones para recolectar el excedente utilizado de la solución de paraformaldehído expulsado desde la aurícula derecha para ser procesados de acuerdo a como lo indica la Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005 (*Características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos*). Terminado el procedimiento, se realizó una nueva incisión en la espalda del animal, y se disecó la región dorsal. Se retiró el implante de acrílico y se recuperó la bomba; para cada experimento se revisó que la minibomba osmótica estuviera aún conectada mediante la tubería plástica y que el sistema de infusión fuese permeable (apretando ligeramente la minibomba y observando que saliera líquido del lado del implante). Con una alicata y tijeras se cortó y recuperó el segmento de tejido correspondiente a la región lumbar de la columna vertebral, y con solución salina fría en una jeringa se expulsó la médula espinal lumbar del canal vertebral.

El tejido fue post-fijado en la misma solución de paraformaldehído por al menos 48 horas a 4° C, y luego fue deshidratado y crioprotegido en soluciones con concentraciones gradualmente incrementadas de sacarosa en PBS (10, 20 y 30%; 24 a 48 horas cada una). Finalizado este período, se

recortó el exceso de tejido recuperado, conservando 2 mm a cada lado (rostral y caudal) de la región donde visualmente se apreciaba la inserción del capilar de sílice fundido de la cánula. Los fragmentos de médula espinal fueron embebidos en una formulación líquida de glicoles y resinas (Tissue-Tek O.C.T. 4583, Sakura Finetek USA Inc.; Torrance, CA, EUA) en cubetas pequeñas de papel aluminio preparadas en la laboratorio, y se incubaron de 5 a 10 minutos a -70°C . Luego, en un criotomo (modelo CM1850, Leica Biosystems; Buffalo Grove, IL, EUA) a -20°C se obtuvieron 50 secciones transversales de $40\ \mu\text{m}$ de grosor y se conservaron en PBS hasta ser teñidas.

Tinción histológica y conteo de NMs

Se tomaron para tinción de Nissl (o de violeta de cresilo) entre 15 y 20 secciones consecutivas que incluyeran el punto de entrada del tubo capilar (sitio de infusión) y fueron montadas en portaobjetos gelatinizados. Se dejaron secar por 24 horas por lo menos, para luego ser sometidos a la secuencia de tratamientos para tinción de Nissl (Tabla 7.2).

TABLA 7.2. SECUENCIA UTILIZADA PARA TINCIÓN DE NISSL (VIOLETA DE CRESILO)

Paso	Tratamiento	Tiempo	Paso	Tratamiento	Tiempo
1	Xileno	10 minutos	7	Agua desionizada	10 segundos
2	Etanol 100%	10 minutos	8	Etanol 70%	3 minutos
3	Etanol 90%	10 minutos	9	Etanol 90%	5 minutos
4	Etanol 70%	5 minutos	10	Etanol 100%	5 minutos
5	Agua desionizada	5 segundos	11	Xileno	10 minutos
6	Violeta de cresilo al 0.25%	30 minutos			

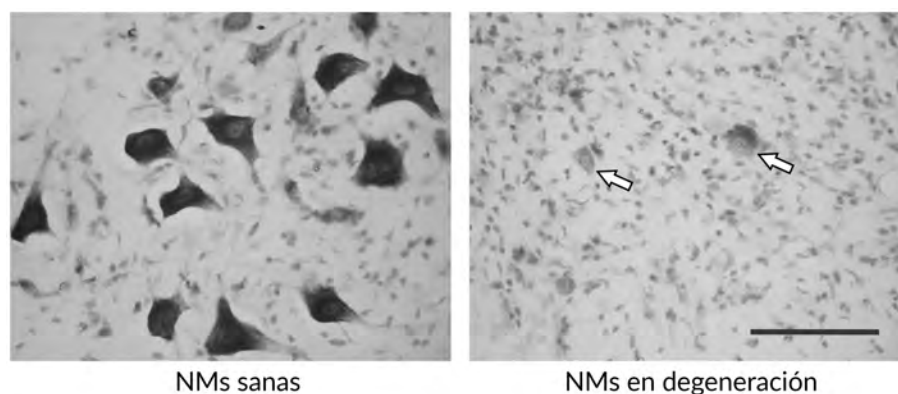


Figura 7.2. Fotomicrografías representativas de alto aumento de NMs sanas del lado contralateral de la médula espinal de una rata tratada con AMPA (izquierda) y de NMs en degeneración en el lado ipsilateral a la infusión (derecha, flecha blancas). Escala $100\ \mu\text{m}$.

El número de NMs morfológicamente sanas fue determinado manualmente en un microscopio óptico Nikon Eclipse E600 (Nikon Instruments; Melville, NY, EUA), con un objetivo 20X, en las astas ventrales ipsilateral y contralateral al sitio de infusión, en por lo menos 15 secciones transversales en las que el sitio de infusión fuese claramente visible. En caso de que no se apreciara el sitio de infusión, el experimento era excluido del análisis (incluyendo los datos obtenidos en las tareas conductuales motoras). Las NMs son neuronas multipolares, con citoplasma intensamente teñido, soma grande (diámetro >20 μm), y con núcleo y nucleólo fácilmente distinguibles; sólo las neuronas que cumplieran con estas características eran contadas (Figura 7.2). Se tomaron fotografías con una cámara digital Nikon montada en el microscopio óptico, con un objetivo 20X, de las astas ventrales ipsilateral y contralateral secciones representativas de cada grupo de tratamiento. Las imágenes obtenidas en formato .jpeg fueron modificadas *off-line* para ajustar brillo, contraste, saturación de color y recortar espacios vacíos.

Marcaje inmunohistofluorescente y microscopía confocal

Se realizó inmunomarcaje fluorescente doble con diferentes combinaciones de anticuerpos primarios con dos propósitos: 1) estudiar la distribución celular de SIRT1 y 2) realizar conteo de células astrogliales y microgliales. En ambos casos se realizó el mismo protocolo. Tras obtener secciones transversales de médula espinal fijada de 40 μm (ver sección 4.4. Materiales y métodos, *Perfusión y fijación*) en flotación en PBS 0.1 M, se realizaron los pasos detallados en la Tabla 7.3.

TABLA 7.3. SECUENCIA UTILIZADA PARA INMUNOMARCAJE FLUORESCENTE

Paso	Tratamiento	Solución utilizada	Tiempo
1	Permeabilización	PBS 0.1 M-Tritón X-100 0.3%	10 minutos
2	Bloqueo	PBS 0.1 M-Tritón X-100 0.3% v/v-ASB 5% w/v	120 minutos
3	Incubación con anticuerpo primario ¹	PBS 0.1 M-Tritón X-100 0.3% v/v-ASB 5% w/v-anticuerpos primarios (diluciones indicadas).	48 horas
4	Lavados (3x)	PBS 0.1 M-Tritón X-100 0.3%	10 minutos
5	Revelado ²	PBS 0.1 M-Tritón X-100 0.3% v/v-anticuerpos secundarios (diluciones indicadas).	120 minutos
6	Lavados (3x) ²	PBS 0.1 M-Tritón X-100 0.3%	10 minutos

Todos los pasos se realizaron en secciones de tejido en flotación, en agitación constante, a temperatura ambiente (a menos que se especifique lo contrario). ASB, albúmina de suero bovino.

1. Este paso se realizó a 4° C; 2. Estos pasos se realizaron en oscuridad.

Al finalizar, entre 3 y 5 secciones de tejido fueron montadas en portaobjetos tratados con xileno con medio de montaje fluorescente simple (Dako Inc.; Carpinteria, CA, USA, para el conteo de células gliales) o con DAPI (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA, para los ensayos de localización de SIRT1), y se conservaron a 4° C, en oscuridad, hasta su visualización. Los anticuerpos primarios y

secundarios utilizados fueron obtenidos de casas comerciales, y sus características se detallan en la Tabla 7.4.

Las imágenes fluorescentes fueron obtenidas en un microscopio confocal Zeiss LSM710 (Oberkochen, Alemania). Los parámetros de visualización (intensidad del láser, ganancia, *digital offset* y apertura confocal) fueron ajustados manualmente primero en los tejidos obtenidos del grupo control y después usado en el resto de los grupos. Para el conteo de las células gliales de la sustancia gris ventral se obtuvieron imágenes de rebanadas ópticas cada 2.5 μm hasta abarcar el grosor completo del tejido con un objetivo 20X. Estas imágenes estuvieron compuestas por dos canales: verde para GFAP/FITC y rojo para Iba1/AlexaFluor 647. Se obtuvieron proyecciones de máxima intensidad *off-line* con el programa FIJI (Schindelin *et al.* 2012).

TABLA 7.4. CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS UTILIZADOS

Blanco (no. de catálogo)	Isotipo, clonalidad	Especie de origen	Especies blanco	Dilución
Anticuerpos primarios¹				
SIRT1	IgG1, monoclonal	Ratón	Rata, ratón, humano	1:50
MAP2 (<i>microtubule associated protein</i>)	IgY, policlonal	Pollo	Rata, ratón, humano	1:1000
GFAP (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)	IgY, policlonal	Pollo	Rata, ratón, humano	1:1000
Iba1 (<i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>)	IgG1, monoclonal	Conejo	Rata, ratón, humano	1:500
Anticuerpos secundarios²				
IgG, conjugado con AlexaFluor 647	IgG, policlonal	Burro	Conejo	1:200
IgY, conjugado con FITC (<i>fluorescein isothiocyanide</i>)	IgG, policlonal	Cabra	Pollo	1:200
IgG, conjugado con FITC	IgG, policlonal	Cabra	Ratón	1:200

1. Todos los anticuerpos primarios fueron obtenidos de Abcam (Cambridge, Reino Unido); 2. Todos los anticuerpos secundarios fueron comprados de Life Technologies (Waltham, MA, EUA).

Conteo de células gliales *off-line*

Se obtuvo una imagen compuesta en formato .ism por cada lado (ipsilateral y contralateral) de cada rebanada de tejido de médula espinal. Al menos 3 rebanadas fueron analizadas por animal, de 5 animales por grupo. Puesto que observamos que en el sitio de inserción de la cánula induce astrogliosis (aunque no microgliosis), incluso en los grupos control, sólo se analizaron los datos obtenidos del lado contralateral.

Para realizar el conteo automatizado de las partículas positivas al inmunomarcaje con GFAP y con Iba1, interpretadas como astrocitos y células microgliales respectivamente, se diseñó un macro en lenguaje de programación Java compatible con Image J (Schneider *et al.* 2012). Este macro instruyó a FIJI que abriera los archivos de las imágenes .ism, que separara los canales (como se describió arriba, verde para GFAP y rojo para Iba1) y que creara y guardara imágenes compuestas con profundidad de 16 bits en formato TIFF, en carpetas separadas (una para GFAP y otra para Iba1). Luego, estas imágenes TIFF fueron sometidas a empalmes en Z, suavizado y aplicación automática de umbral con el método *Max Entropy*. Se crearon versiones binarias de cada empalme de las imágenes TIFF y se realizó el análisis automatizado de las partículas. Para el caso de los astrocitos se contaron partículas positivas a GFAP $>10 \mu\text{m}^2$ y para el caso de las células microgliales se contaron partículas positivas a Iba1 $>19.5 \mu\text{m}^2$. Este tamaño fue elegido con base en el perfil del histograma de frecuencias de las partículas mostrado por la herramienta *Analyze particles* de FIJI. Además, un investigador cegado a los resultados, realizó un conteo manual independiente de una muestra de las imágenes obteniendo resultados comparables a los del conteo automatizado.

El macro también fue diseñado para obtener el área de tejido fotografiado usando las imágenes TIFF del canal verde (FITC/GFAP). Estas imágenes fueron empalmadas en Z, suavizadas y se les aplicó el método automático de umbral *Moments*. Luego, el área completa de la imagen fue cuantificada con la herramienta *Measure*. El número de partículas por área (expresado como $\mu\text{m}^2 \times 10^5$) fue usada para calcular las medidas de tendencia central y de dispersión de cada animal.

Análisis estadístico

Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas en el programa GraphPad Prism versión 5.0 (La Jolla, CA, EUA). En todos los casos se obtuvieron parámetros de estadística descriptiva (expresadas en el texto y en las gráficas como la media \pm error estándar de la media). Posteriormente, los grupos de datos fueron sometidos a la prueba omnibus de D'Agostino-Pearson de bondad de ajuste a la normalidad, con α fijado a 0.05. En todos los casos se rechazó la hipótesis nula, por lo que sólo se aplicaron pruebas paramétricas para los análisis subsecuentes.

Para los datos obtenidos de las tareas conductuales (tiempo para caer y fuerza de empuje normalizada) se realizó análisis de la variancia (ANOVA) de dos vías (tiempo de infusión en días y tipo de tratamiento), con α fijado a dos colas de 0.05. Para detectar diferencias entre grupos y tiempos de infusión, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni o de Tukey, según se indique. Para los datos obtenidos del conteo de NMs y del conteo de células gliales se realizó ANOVA de una vía (tipo de tratamiento), con α fijado a dos colas de 0.05. Para detectar diferencias entre grupos de tratamiento, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Un valor $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo, el cual fue ajustado en caso de que se realizaran comparaciones múltiples.

8. RESULTADOS

8.1. EFECTO SOBRE LAS NEURONAS MOTORAS DE LA ESTIMULACIÓN CRÓNICA DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO ENDÓGENO EN LA MÉDULA ESPINAL *IN VIVO*

La infusión crónica de 4AP induce alteraciones en la conducta motora, que son empeoradas por bicuculina

La infusión de 4AP causó alteraciones de la conducta motora en las extremidades pélvicas (o traseras) de los animales tratados, que se manifestaron como contracciones y fasciculaciones musculares episódicas que aparecían más frecuentemente en la extremidad ipsilateral. Los animales parecían estar bajo estrés cuando ocurrían estas alteraciones, puesto que presentaban vocalizaciones, acicalaban de manera compulsiva la extremidad afectada, en ocasiones se removían el pelo y presentaban accesos de carrera. Estas alteraciones episódicas comenzaron dentro de las primeras 3 a 5 horas después del implante de la minibomba, duraban unos pocos minutos, tenían una frecuencia muy variable (no cuantificada) y frecuentemente eran observados durante o inmediatamente después de la prueba de rotarod. Estas alteraciones disminuyeron su frecuencia, duración e intensidad progresivamente hasta el día 7 a 10, en los que eran rara vez observados.

Las alteraciones motoras eran evidentes durante la evaluación con el rotarod como una reducción progresiva, aunque transitoria, en el tiempo para caer que fue estadísticamente diferente sólo en el día 5; no se observaron cambios en la evaluación de la fuerza de empuje, aunque observamos un modesto incremento no significativo en la fuerza desde el día 10 hasta el día 15 (Figuras 8.1A y B, fila superior).

La co-infusión de MK801 con 4AP previno casi por completo las fasciculaciones y las contracciones musculares inducidas por 4AP, aunque no hubo diferencias estadísticas en los valores obtenidos en rotarod y en la fuerza de empuje. Por otro lado, la co-infusión de NBQX parcialmente suprimió los efectos conductuales de la administración de 4AP aunque, de manera similar que con MK801, los resultados obtenidos en las tareas conductuales fueron similares a los de 4AP (Figuras 8.1A y B, fila inferior). Las infusiones aisladas de NBQX o de MK801 no resultaron en efectos en la conducta motora (datos no mostrados).

Luego se evaluó el efecto de la infusión de bicuculina para explorar el papel del GABA_AR en las alteraciones motoras inducidas por 4AP. Los animales tratados con la infusión aislada de bicuculina mostraron alteraciones conductuales leves, como acicalado ocasional y lengüetazos en la extremidad ipsilateral, y no hubo cambios significativos en los valores obtenidos en las pruebas de rotarod o de fuerza de empuje en comparación con el grupo control. La co-infusión de bicuculina con 4AP exacerbó la intensidad de las fasciculaciones y la frecuencia del acicalado inducido por 4AP, lo que se acompañó de una disminución en el tiempo para caer de rotarod y en una tendencia hacia la reducción en los valores de fuerza de empuje en comparación con los valores del grupo tratado sólo con 4AP (Figura 8.1A y B, fila central).

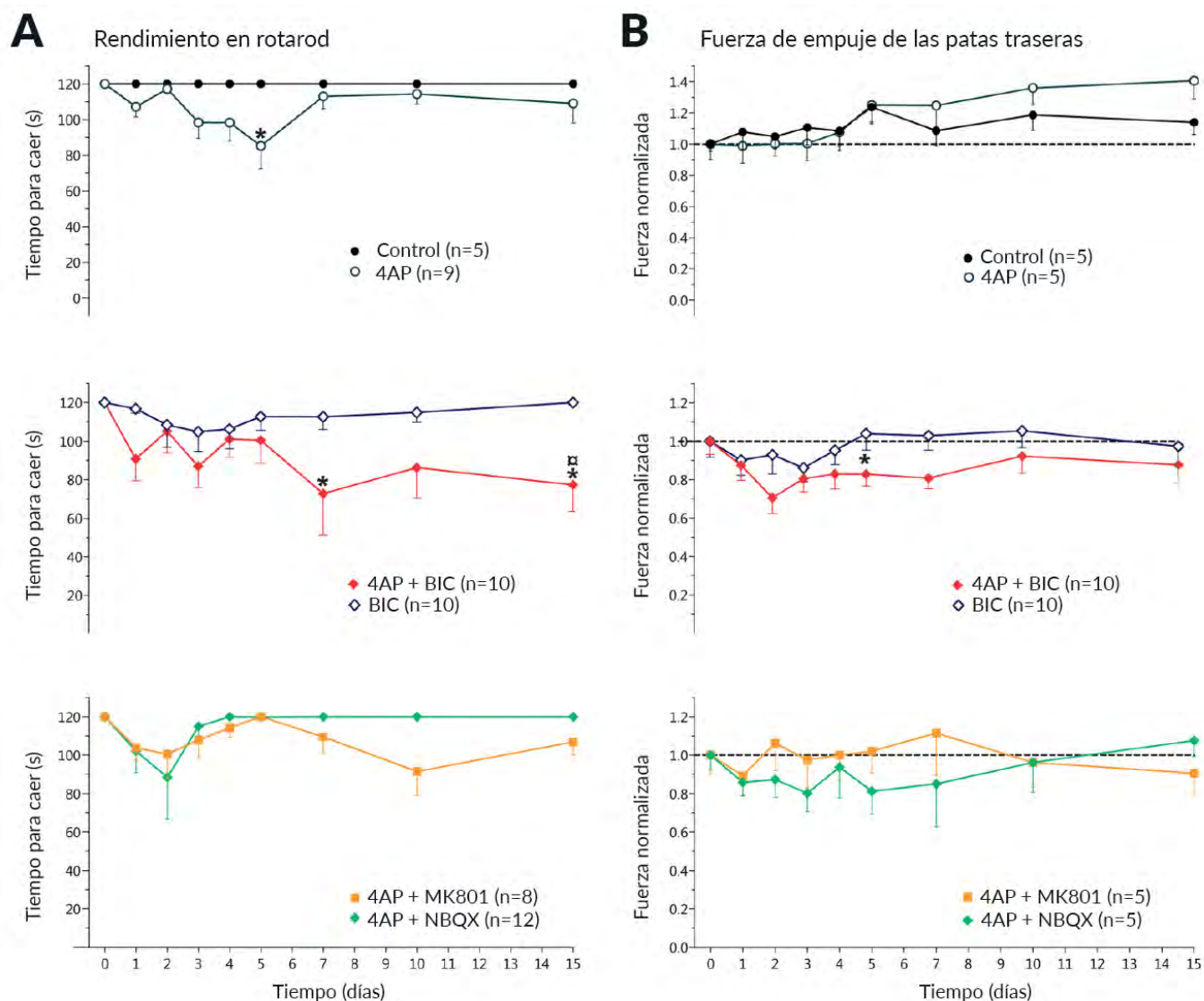


Figura 8.1. Efectos conductuales de la infusión crónica de 4AP en la médula espinal de la rata *in vivo*. **A)** Resultados del desempeño en rotarod expresados como el tiempo para caer (en segundos) para cada una de las condiciones experimentales. *Fila superior*, la infusión de 4AP causa disminución reversible en el tiempo para caer significativamente diferente del Control sólo en el día 5 (* $p < 0.05$). *Fila central*, el tratamiento con bicuculina no resultó en cambios significativos en el tiempo para caer, mientras que la co-infusión con 4AP+bicuculina produjo una reducción reversible en el tiempo para caer, distinto al Control en los días 5 y 15 (* $p < 0.05$) y a 4AP en el día 15 ($p < 0.05$). *Fila inferior*, la co-infusión de NBQX o MK801 con 4AP mejoró parcialmente el tiempo para caer, sin ser diferente de los valores del grupo Control o 4AP. **B)** Resultados de la evaluación de la fuerza de empuje de las extremidades traseras normalizado al valor basal (día 0, antes del implante de la minibomba osmótica). *Fila superior*, el grupo Control presentó un incremento gradual, hasta el 10%, de la fuerza hasta el día 15 en comparación con valores basales, mientras el grupo 4AP también tuvo un incremento gradual, aunque no significativamente distinto, de la fuerza (hasta el 30% más) hasta el día 15. *Fila central*, el tratamiento con bicuculina no resultó en cambios en la fuerza en lo 15 días de evaluación, mientras que la co-infusión de 4AP + bicuculina resultó en una disminución de la fuerza durante los 15 días de tratamiento, que sólo fue significativamente diferente en el día 5 (* $p < 0.05$ versus Control). *Fila inferior*, la co-infusión de NBQX o de MK801 con 4AP no resultó en cambios en la fuerza. ANOVA de seguida de prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni en todos los casos.

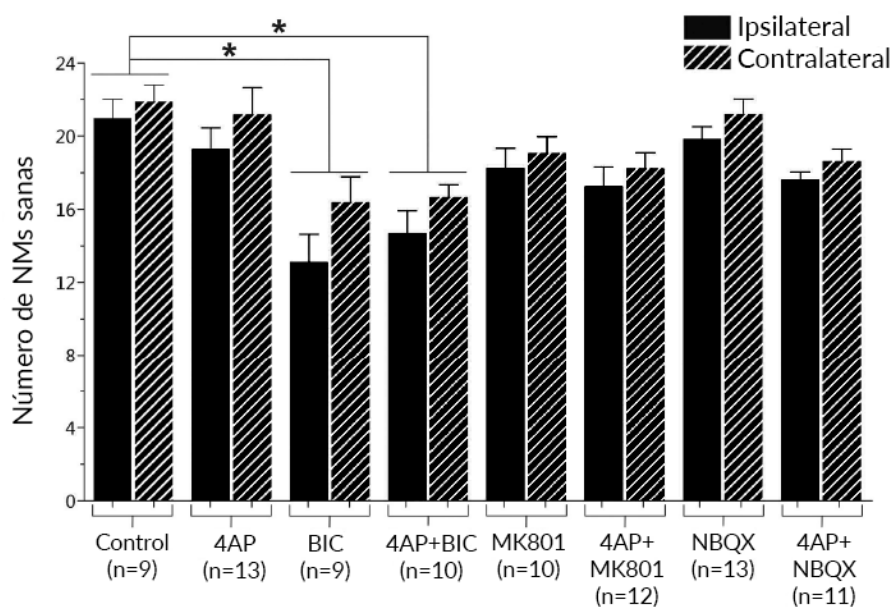


Figura 8.2. Resultados de la cuantificación de NMs de la médula espinal lumbar tras la infusión crónica de 4AP y de otros compuestos *in vivo*. La infusión de bicuculina aislada o co-infundida con 4AP redujeron el número de NMs de manera similar, mientras que la infusión de 4AP y del resto de los tratamientos mostrados no produjo cambios en el número de NMs en comparación con el grupo control. * $p < 0.001$ versus Control; ANOVA de una vía seguida de prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

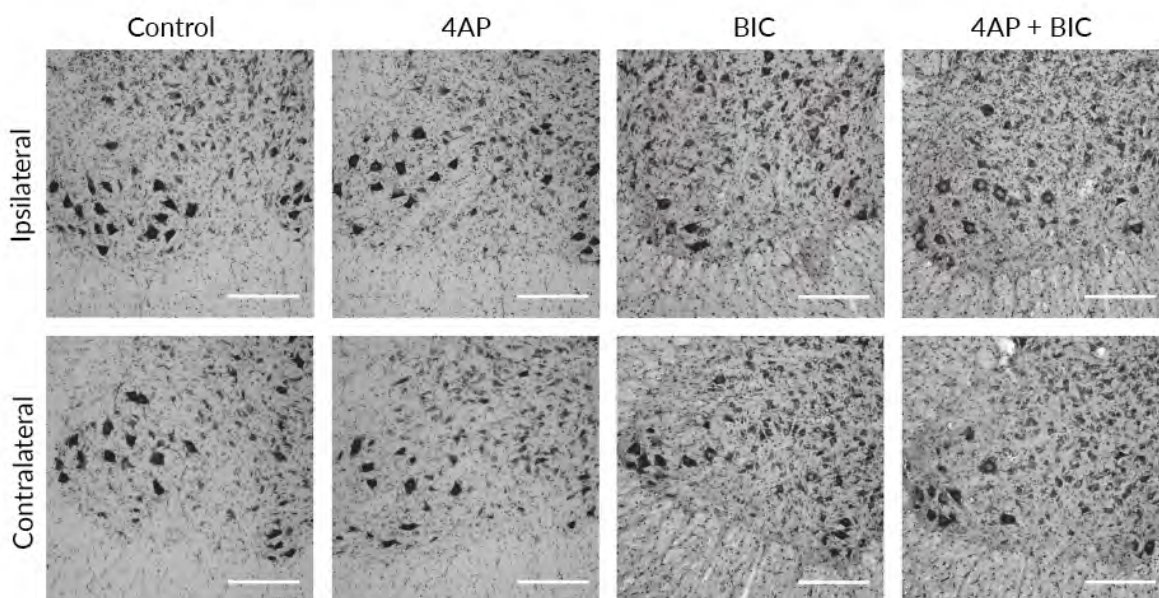


Figura 8.3. Micrografías representativas del asta ventral de secciones de médula espinal teñidas con técnica de Nissl, en donde se pueden distinguir las NMs (somas neuronales grandes, multipolares, intensamente teñidos y con núcleos prominentes), tras 15 días de infusión de los tratamientos indicados. La fila superior muestra imágenes del lado ipsilateral al sitio de infusión, mientras que la fila inferior muestra el lado contralateral. Escala 250 μm .

La bicuculina, pero no 4AP, induce degeneración de NMs

A pesar de los cambios conductuales obtenidos con la infusión de 4AP no encontramos pérdida de NMs cuando realizamos la cuantificación en el tejido de la médula espinal mediante tinción de Nissl en comparación con el grupo control (20.9 ± 3.1 versus 19.3 ± 4.1 en el lado ipsilateral y 21.8 ± 2.7 versus 21.1 ± 5.3 en el lado contralateral). Ni NBQX ni MK801, aislados o co-infundidos con 4AP, produjeron cambios en el número de NMs. Por el contrario, la infusión de bicuculina causó una disminución significativa del ~38% del número de NMs en el asta ventral ipsilateral respecto al valor del grupo control (13.1 ± 4.5 versus 20.9 ± 3.1) y una reducción del ~25% en el lado contralateral (16.4 ± 4.1 versus 21.8 ± 2.7); esta reducción también alcanzó significancia estadística cuando se comparó a los resultados de la infusión de 4AP aislada, aunque sólo en el lado ipsilateral. La co-infusión de 4AP con bicuculina resultó en una disminución del número de NMs similar a la provocada por la infusión aislada de bicuculina (Figuras 8.2 y 8.3).

La activación crónica de GABA_AR con muscimol no previene la parálisis ni la degeneración de NMs inducidas por AMPA

Los resultados previos indican que la infusión de 4AP produce hiperexcitabilidad motora mediada por la activación de receptores ionotrópicos de glutamato en la médula espinal *in vivo* que es insuficiente para inducir degeneración de NM. Por el contrario, el bloqueo crónico de GABA_AR resulta deletéreo. Es por ello que, para evaluar el papel de la inhibición mediada por receptores de GABA en la excitotoxicidad mediada por sobreactivación del receptor de glutamato de tipo AMPA, infundimos muscimol de manera aislada o en combinación con AMPA. El tratamiento con muscimol provocó debilidad muscular severa y persistente en ambas extremidades pélvicas, que en algunos animales se manifestó como parálisis sin fenómenos asociados (como autotomía, como sucede en el caso de los animales infundidos con AMPA). Este efecto comenzó 1 o 2 días después del implante de la

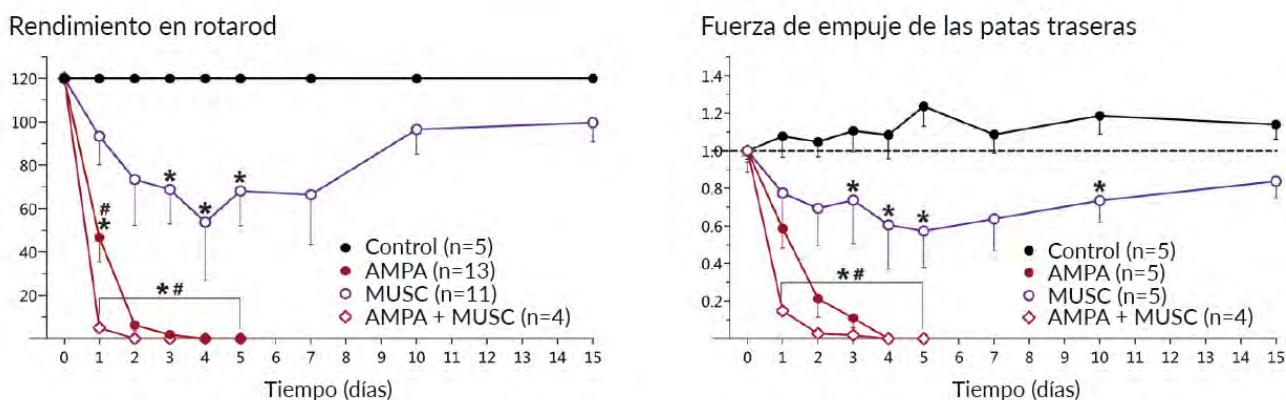


Figura 8.4. Efectos sobre la conducta motora de la infusión crónica de muscimol (MUSC) o de AMPA, aislados o en combinación, en la médula espinal *in vivo*. **Izquierda.** Resultados del desempeño en rotarod. **Derecha.** Resultados del desempeño en la evaluación de la fuerza de empuje normalizada. El número de animales en cada grupo se encuentra indicado en cada caso. * $p < 0.05$ versus control y # $p < 0.05$ versus MUSC; ANOVA de dos vías seguida de prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni.

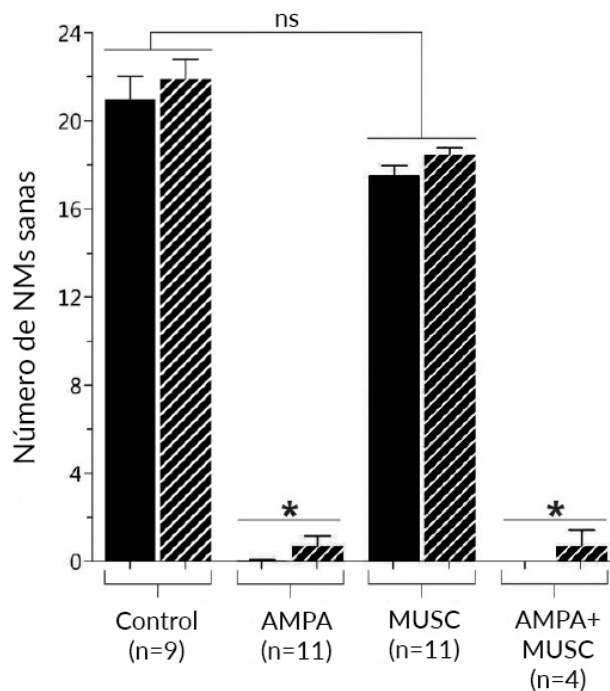


Figura 8.5. Resultados de la cuantificación de NMs de la médula espinal lumbar tras la infusión crónica *in vivo* de MUSC y de AMPA, aislados o en combinación. La infusión por 5 días de AMPA y de AMPA + MUSC resultó en una reducción significativa del número de NMs sanas, mientras que 15 días de infusión de MUSC no modificó el número de NMs en comparación con el grupo control. * $p < 0.01$ versus control; ANOVA de una vía seguida de prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

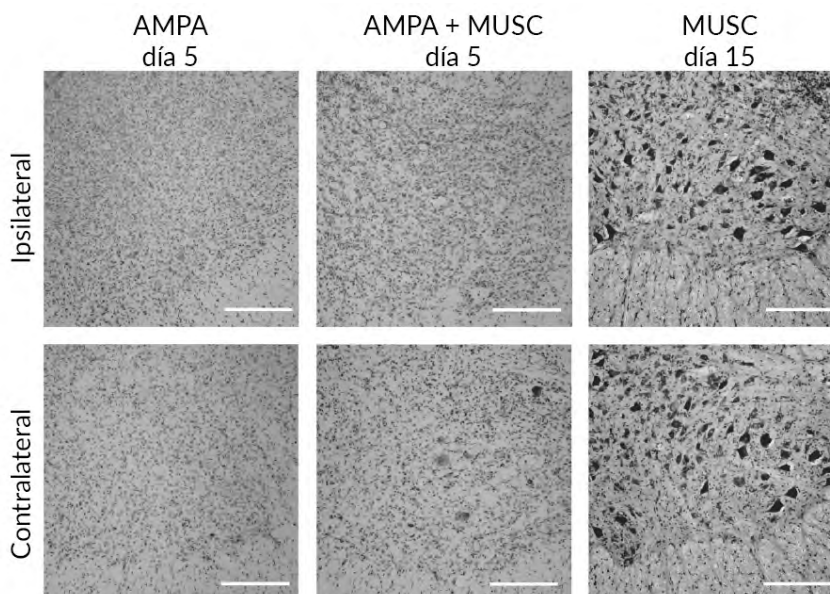


Figura 8.6. Micrografías representativas del asta ventral de secciones de médula espinal obtenidas tras 15 días de infusión de MUSC o tras 5 días de infusión de AMPA y de AMPA + MUSC. La fila superior muestra imágenes del lado ipsilateral al sitio de infusión, mientras que la fila inferior muestra el lado contralateral. Escala 250 μm .

minibomba osmótica y progresivamente disminuyó durante los 15 días de tratamiento, aunque nunca alcanzó recuperación completa con conducta similar a la del grupo control. Estas alteraciones motoras resultaron en reducciones significativas en el tiempo para caer de rotarod en los días 3, 4 y 5 (Figura 8.4, izquierda), así como reducciones significativas en la fuerza de empuje en los días 3, 4, 5 y 10 (Figura 8.4, derecha).

Como se ha descrito previamente (Tovar-y-Romo *et al.* 2007), en este trabajo observamos que la infusión crónica AMPA causó parálisis gradual e irreversible de las extremidades pélvicas de todos los animales tratados, que se relacionó en las pruebas conductuales con una disminución progresiva y sostenida del tiempo para caer de rotarod y de la fuerza de empuje. La parálisis comenzó en el día 1 en la extremidad ipsilateral y empeoró gradualmente hasta el día 5, cuando los animales presentaban parálisis completa de ambas extremidades. En este grupo los experimentos fueron detenidos al día 5 porque los animales ya no podía alimentarse por sí mismos y comenzaron a presentar autotomía de las extremidades pélvicas. La co-infusión de muscimol con AMPA provocó parálisis de inicio más temprano y más severo en comparación con la provocada por la infusión aislada de AMPA, así como reducciones del tiempo para caer y de la fuerza de empuje. Ningún animal en este grupo presentó autotomía, en contraste con la infusión aislada de AMPA. Los valores obtenidos en las tareas motoras en este grupo fueron significativamente diferentes de los valores de los grupos control e infundido sólo con muscimol (Figura 8.4).

El análisis histológico mostró que la infusión de muscimol provocó una reducción no significativa del número de NMs. En contraste, como se esperaba, la parálisis inducida por la infusión de AMPA estuvo acompañada de una pérdida casi completa de NMs. La co-infusión de muscimol no modificó la degeneración de NMs inducida por AMPA (Figuras 8.5 y 8.6).

La activación crónica de los receptores de glutamato de tipo NMDA ocasiona debilidad reversible y neurodegeneración

También evaluamos los efectos de la activación crónica de los receptores de glutamato de tipo NMDA en la conducta motora y en la histología de la médula espinal. Para ello se infundió NMDA [7.5 mM] por 15 días. Encontramos que este tratamiento disminuye el tiempo para caer de rotarod desde el día 1 y que este efecto se mantiene hasta el día 10, a partir de entonces los valores obtenidos en rotarod regresaron al estado basal. Los valores de tiempo para caer fueron significativamente diferentes del grupo Control los días 2, 3 y 5 ($*p < 0.05$). En contraste, la fuerza de empuje de las patas traseras no presentó cambios significativos, aunque se observó una tendencia a presentar valores de fuerza menores en comparación con el Control (Figura 8.7).

También observamos que el número de NMs sanas fue significativamente menor tras el tratamiento con NMDA en comparación con el grupo Control (4.6 ± 1.5 versus 19.3 ± 4.1 en el lado ipsilateral y 12.3 ± 1.8 versus 21.1 ± 5.3 en el lado contralateral) (Figura 8.8).

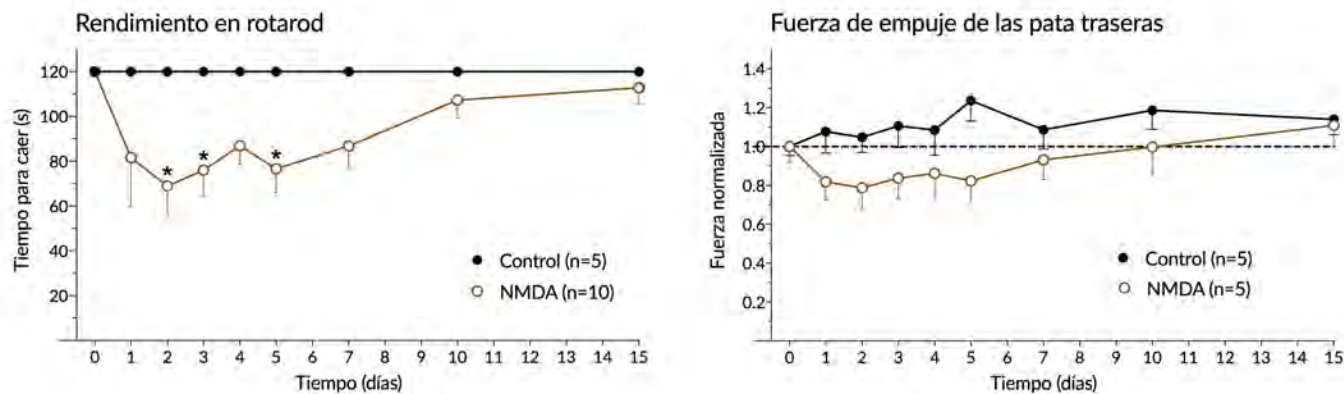


Figura 8.7. Efectos sobre la conducta motora de la infusión crónica de NMDA en la médula espinal *in vivo*. **Izquierda.** Resultados del desempeño en rotarod. **Derecha.** Resultados del desempeño en la evaluación de la fuerza de empuje normalizada. El número de animales en cada grupo se encuentra indicado en cada caso. * $p < 0.05$ versus control; ANOVA de dos vías seguida de prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni.

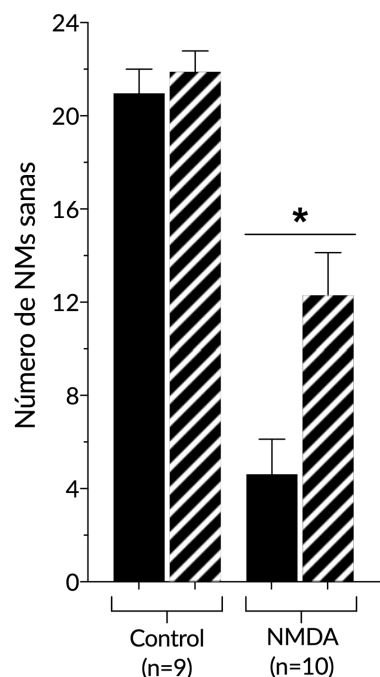


Figura 8.8. Resultados de la cuantificación de NMs de la médula espinal lumbar tras la infusión crónica *in vivo* de NMDA. La infusión por 15 días resultó en una reducción significativa del número de NMs sanas. * $p < 0.01$ versus control; ANOVA de una vía seguida de prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

8.2. LAS SIRTUINAS COMO MECANISMO PROTECTOR EN UN MODELO DE NEURODEGENERACIÓN DE NEURONAS MOTORAS ESPINALES POR EXCITOTOXICIDAD CRÓNICA

SIRT1 se expresa sólo en las neuronas en la médula espinal

Realizamos inmunofluorescencia doble en rebanadas de tejido de médula espinal de animales intactos para describir la localización celular de la expresión de SIRT1. Observamos que el inmunomarcaje para SIRT1 se encuentra ampliamente distribuido en la sustancia gris ventral de la médula espinal, en especial en el soma y los núcleos (marcados con DAPI) de células positivas al

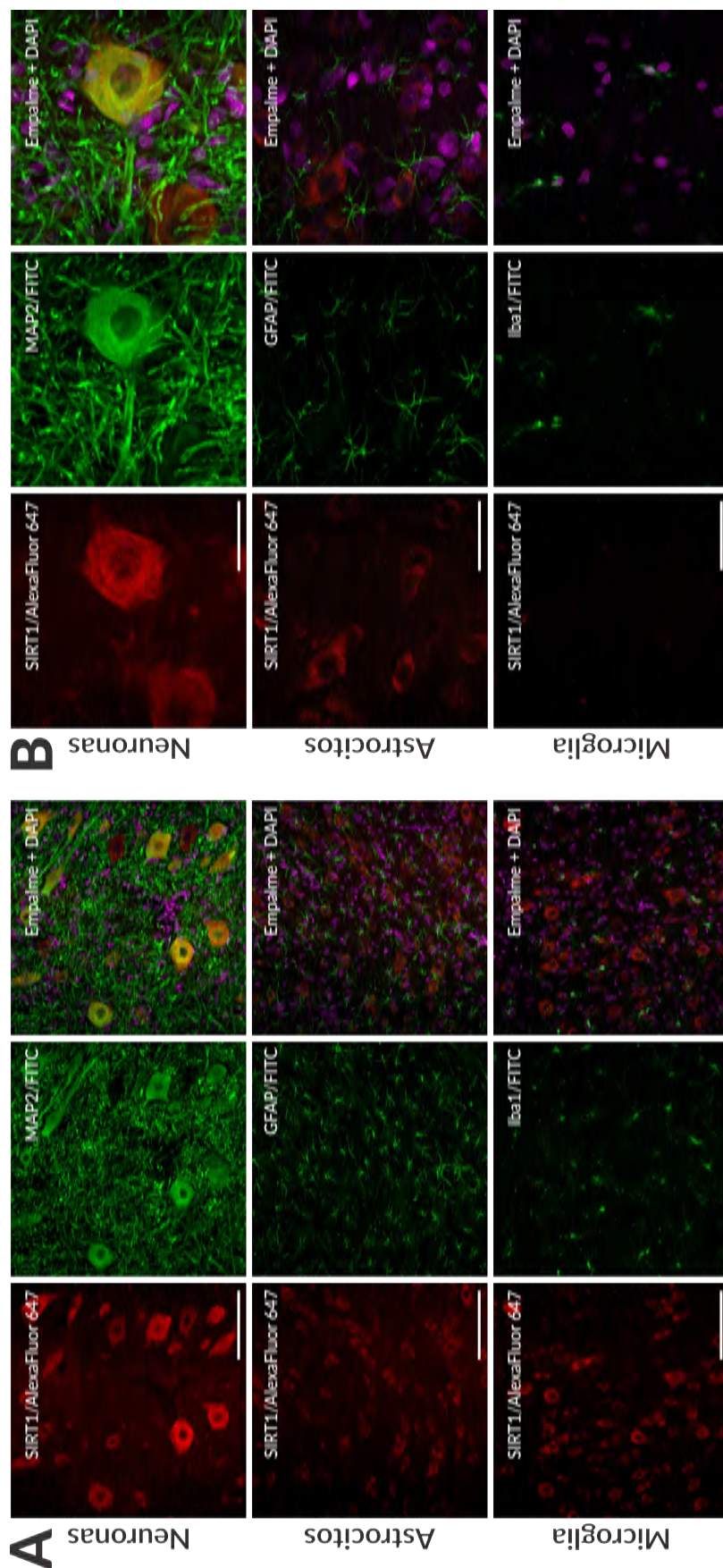


Figura 8.9. SIRT1 se expresa en los somas neuronales de la médula espinal lumbar, incluyendo las NMs. **a)** Proyecciones de máxima intensidad representativas de imágenes de inmunohistofluorescencia por microscopía confocal de la médula espinal de ratas intactas marcadas con anticuerpos anti-SIRT1 (rojo, columnas izquierda y derecha), anti-MAP2 (verde, fila señalada como Neuronas), anti-GFAP (verde, fila señalada como Astrocytos) y anti-Iba1 (verde, fila señalada como Microglia). En las imágenes empalmadas (columna derecha, con tinción de DAPI en magenta) se observa que hay co-localización del marcaje contra SIRT1 sólo en los somas y núcleos neuronales, incluyendo los de las NMs (en amarillo). Escala, 100 µm. **b)** Proyecciones de máxima intensidad de imágenes por microscopía confocal de alta magnificación; el inmunomarcaje y el código de colores son los mismos que los del panel **a**. El inmunomarcaje contra SIRT1 no fue detectado en células marcadas contra GFAP (fila señalada como Astrocytos) o contra Iba1 (fila señalada como Microglia). Escala, 50 µm. Las imágenes fueron obtenidas de tres secciones no consecutivas de médula espinal de 5 animales diferentes; en todos los casos se encontraron resultados similares.

inmunomarcaje con anticuerpo anti-MAP2 (que corresponden a neuronas). En células marcadas con anticuerpos anti-GFAP (astrocitos) y anti-Iba1 (células microgliales) no se encontró expresión de SIRT1 (Figura 8.9).

Cambios en la conducta motora inducidos por la infusión de AMPA, RSV, QCT o EX527

Para este proyecto utilizamos una concentración menor de AMPA (1 mM) puesto que la concentración utilizada previamente (7.5 mM) induce parálisis y neurodegeneración muy rápidamente, lo que evitar observar los efectos de los polifenoles estudiados. Este esquema de tratamiento ya había sido reportado anteriormente en el laboratorio y los resultados del tratamiento con AMPA 1 mM por 10 días fueron similares a datos previamente reportados (Netzahualcoyotzi & Tapia 2015). Los animales con este tratamiento mostraron parálisis gradual, aunque incompleta, de las extremidades pélvicas, que comenzó en la extremidad ipsilateral y posteriormente afectó la extremidad contralateral. Este efecto se evidenció como cambios en el rendimiento en las tareas motoras, respecto al grupo control, a partir del día 1 y hasta el día de 10 de infusión (Figura 8.10A, panel izquierdo). De manera consistente, encontramos que el tiempo para caer en rotarod disminuyó de manera abrupta en los primeros tres días (desde 65.0 ± 16.0 segundos en el día 1, hasta 33.5 ± 5.9 segundos en el día 3), y luego llegó a un valor meseta de ~ 57 segundos hasta el final del experimento. Por el contrario, en la evaluación de la fuerza de empuje el tratamiento con AMPA no provocó reducciones significativas de la fuerza, aunque se observó una tendencia (reducción de $\sim 33\%$ en el día 5 respecto a los valores basales; Figura 8.10A, panel derecho).

La infusión aislada de RSV (a razón de 10 nm/d) no alteró los resultados de la conducta motora respecto al grupo control (datos no mostrados). La co-infusión de RSV, ya sea a 1 nm/d o a 10 nm/d, con AMPA 1 mM no previno la disminución en el tiempo para caer de rotarod inducido por AMPA, a excepción del día 3 con la infusión de 1 nm/d ($p < 0.01$). Exploramos la potencial contribución de la activación de SIRT1 por RSV mediante un inhibidor potente y selectivo de SIRT1, EX527 (Gertz *et al.*, 2013). Con-infundimos RSV 1 nm/d y AMPA 1 mM con EX527 10 nm/d para asegurar que SIRT1 permaneciera inhibida. Este tratamiento resultó en un ligero, aunque transitorio, incremento en el tiempo para caer de rotarod comparado con AMPA ($p < 0.05$ sólo en los días 2 y 3), pero que de manera global no fue diferente de los valores obtenidos con la infusión de RSV 1 nm/d + AMPA (Figura 8.10B, paneles izquierdos). No observamos cambios en la fuerza de empuje de manera global, aunque hubo diferencias cuando se comparó con los valores del grupo control con los valores obtenidos con la infusión de RSV 1 nm/d + AMPA en los días 4 y 7, y con los valor obtenido el día 7 en el grupo RSV 1nm/d + AMPA + EX527 (Figura 8.10B, paneles derechos).

La infusión aislada de QCT no indujo reducciones en el tiempo para caer de rotarod o de fuerza de empuje durante los 10 días de infusión (datos no mostrados). También encontramos que ambas dosis evaluadas, 1 y 10 nm/d, QCT previno la parálisis inducida por AMPA de acuerdo con la pevaluación realizada por rotarod; se encontraron diferencias significativas a partir del día 2 de infusión y durante los 10 días de tratamiento ($p < 0.01$ versus AMPA para ambas concentraciones). El papel de SIRT1 en los efectos mediados por QCT también se estudió con EX527 a 10 nm/d. La co-infusión de

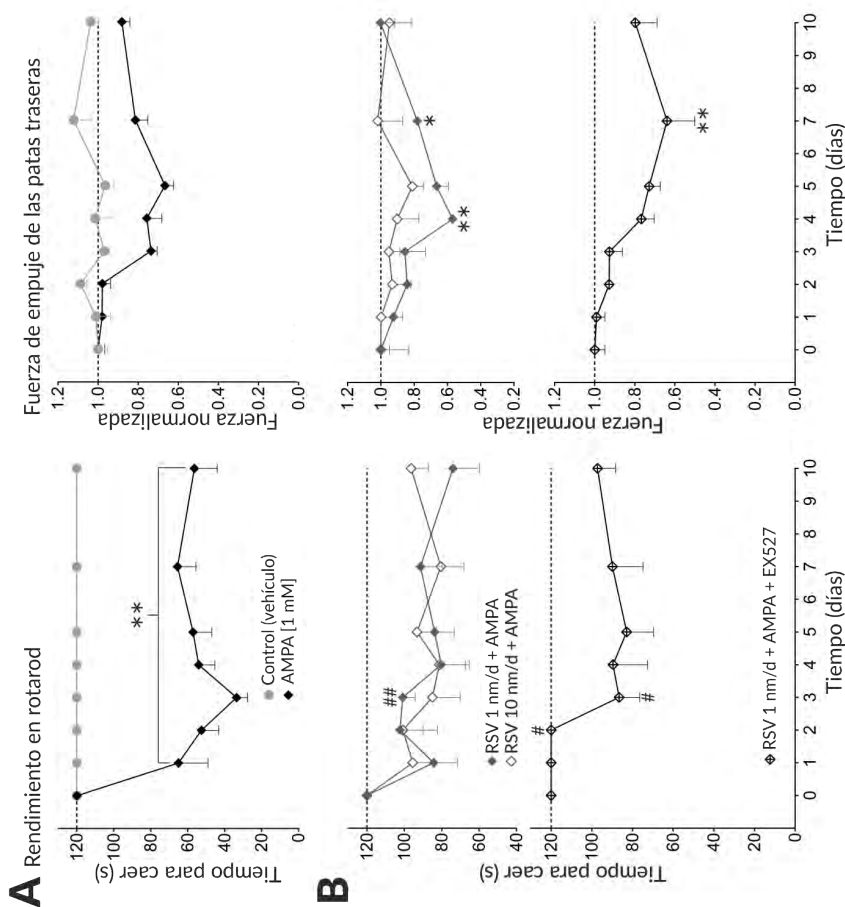


Figura 8.10. Efectos de la infusión crónica de RSV, QCT o EX527 sobre el desempeño en las tareas motoras con o sin excitotoxicidad inducida por AMPA. **a)** Resultados de la prueba de rotarod y de la medición de la fuerza de empuje, como se indica, durante los 10 días de la infusión continua de vehículo (grupo control) o de AMPA. **b)** Resultados de la infusión de RSV, aislada o con AMPA o EX527, como se indica. **c)** Resultados de la infusión de QCT, aislada o con AMPA o EX527. **d)** Efectos de la infusión de EX527, aislada o con AMPA. El número de animales por tratamiento se encuentra indicado entre paréntesis para cada caso. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ versus control, # $p < 0.05$ y ## $p < 0.01$ versus AMPA; ANOVA de dos vías seguida de prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

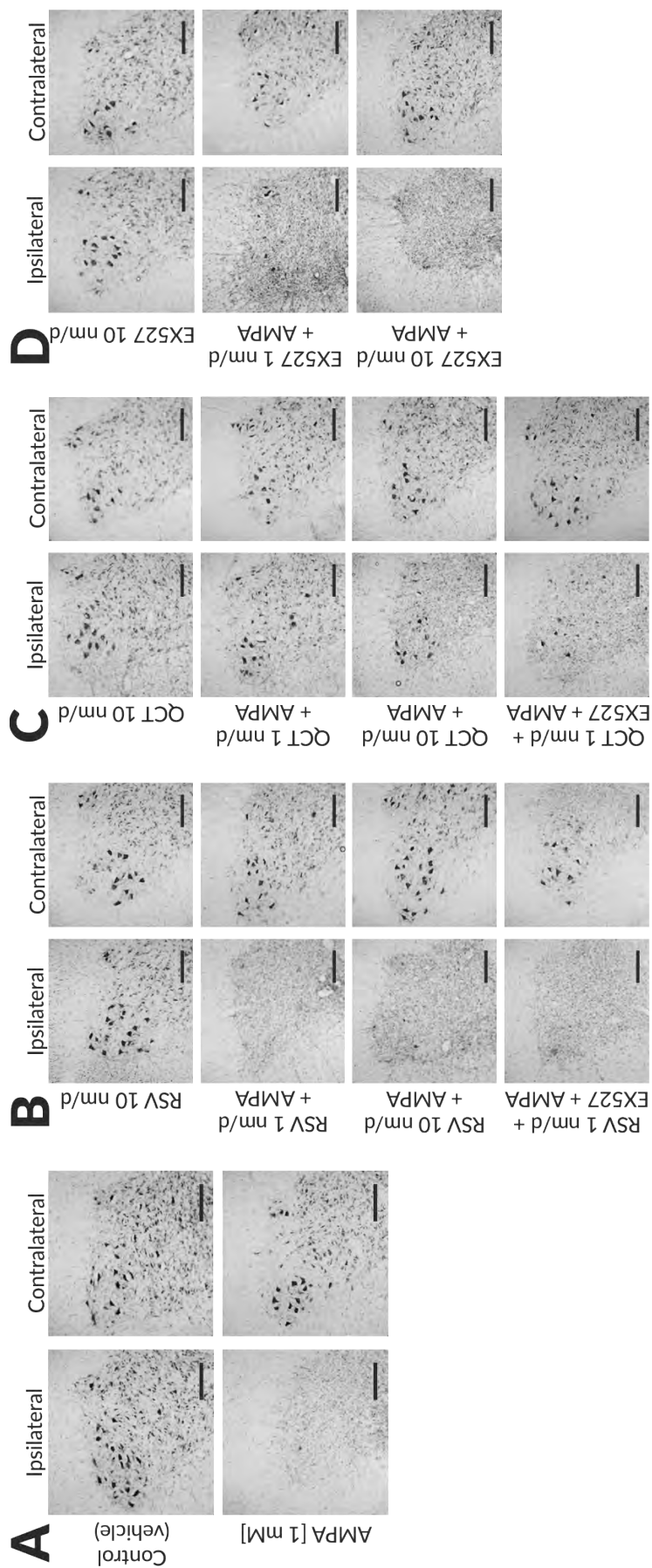


Figura 8.11. La degeneración de NMs es prevenida por la infusión de QCT, pero no por la de RSV. Micrografías representativas de la región ventral ipsilateral y contralateral de secciones de médula espinal lumbar teñidas con técnica de Nissl de animales tratados durante 10 días con infusión continua de: **A)** vehículo (control) o AMPA, **B)** RSV aislado o co-infundido con AMPA y/o EX527, **C)** QCT aislado o co-infundido con AMPA y/o EX527, y **D)** EX527 aislado o co-infundido con AMPA. Escala 250 μm .

EX527 con QCT 1 nm/d + AMPA provocó que el tiempo para caer de rotarod fuese reducido en los días 2 y 3, en comparación con los valores del grupo infundido con AMPA ($p < 0.05$). Sin embargo, cuando estos valores se compararon con los del grupo QCT 1 nm/d + AMPA no se observaron diferencias significativas, aunque se observó una clara tendencia a la reducción en el tiempo para caer desde el día 4 hasta el día 10 (Figura 8.10C, paneles izquierdos). En la evaluación de la fuerza de empuje la infusión de QCT no resultó en diferencias respecto a los valores obtenidos del grupo control o el de AMPA y, de manera similar a lo encontrado con rotarod, se observó una tendencia a valores reducidos de fuerza cuando EX527 fue co-infundido con QCT 1nm/d + AMPA (Figura 8.10C, paneles derechos).

La infusión aislada de EX527 no resultó en cambios en el tiempo para caer ni en los valores de fuerza de empuje (Figura 8.10D, panel izquierdo). La co-infusión de EX527, a 1 o 10 nm/d, con AMPA no provocó incrementos en el tiempo para caer de rotarod respecto a los valores del grupo AMPA, aunque se observó que el valor del día 3 era significativamente mayor ($p < 0.01$). No se apreciaron diferencias significativas en la evaluación de la fuerza de empuje en ninguno de los grupos estudiados, aunque una clara tendencia a valores reducidos de fuerza fue evidente con ambas dosis respecto a los valores del grupo control y sólo en un día hubo diferencias significativas ($p < 0.05$ en el día 7) (Figura 8.10D, paneles derechos).

Efectos de la infusión de RSV, QCT o EX527 en la degeneración de NMs inducida por AMPA

Observamos que en el lado ipsilateral a la infusión de AMPA por 10 días, en secciones de médula espinal teñidas con la técnica de Nissl, no había NMs; en el lado contralateral, sólo apreciamos una pérdida leve de estas neuronas (Figura 8.11A). Cuando realizamos la cuantificación, $>90\%$ de las NMs habían degenerado en el lado ipsilateral del grupo tratado con AMPA en comparación con el grupo control (0.4 ± 0.3 versus 14.1 ± 0.6), mientras que en el lado contralateral quedaban aproximadamente 60% de las NMs (8.7 ± 1.0 versus 15.0 ± 0.6 , $p < 0.01$; Figura 8.12A).

La infusión aislada de RSV no indujo cambios en la histología de la médula espinal ventral ni en el número de NMs. La infusión por 10 días de RSV no previno la neurodegeneración inducida por AMPA (Figura 8.11B). La cuantificación de NMs reveló que no hubo cambios, cuando se comparó con los valores del grupo AMPA, en el lado ipsilateral (0.9 ± 0.3 para RSV 1 nm/d, y 0.6 ± 0.5 para RSV 10 nm/d) ni en el lado contralateral (11.8 ± 0.5 para RSV 1 nm/d, y 11.5 ± 1.9 para RSV 10 nm/d). De manera similar, el tratamiento de EX527 en combinación con RSV 1 nm/d + AMPA tampoco provocó cambios en la histología de la médula espinal o en el número de NMs en comparación a los resultados obtenidos con la infusión aislada de AMPA (0.1 ± 0.0 en el lado ipsilateral y 9.3 ± 0.9 en el lado contralateral), aunque estos valores fueron estadísticamente diferentes de aquellos del grupo control ($p < 0.05$; Figura 8.12B).

QCT mejoró los cambios histológicos en la médula espinal (Figura 8.11C) y previno la disminución en el número de NMs inducido por AMPA, especialmente en el lado ipsilateral a la infusión (6.4 ± 1.3 para QCT 1 nm/d + AMPA, y 4.8 ± 1.1 para QCT 10 nm/d + AMPA; $p < 0.05$ en ambos casos). La

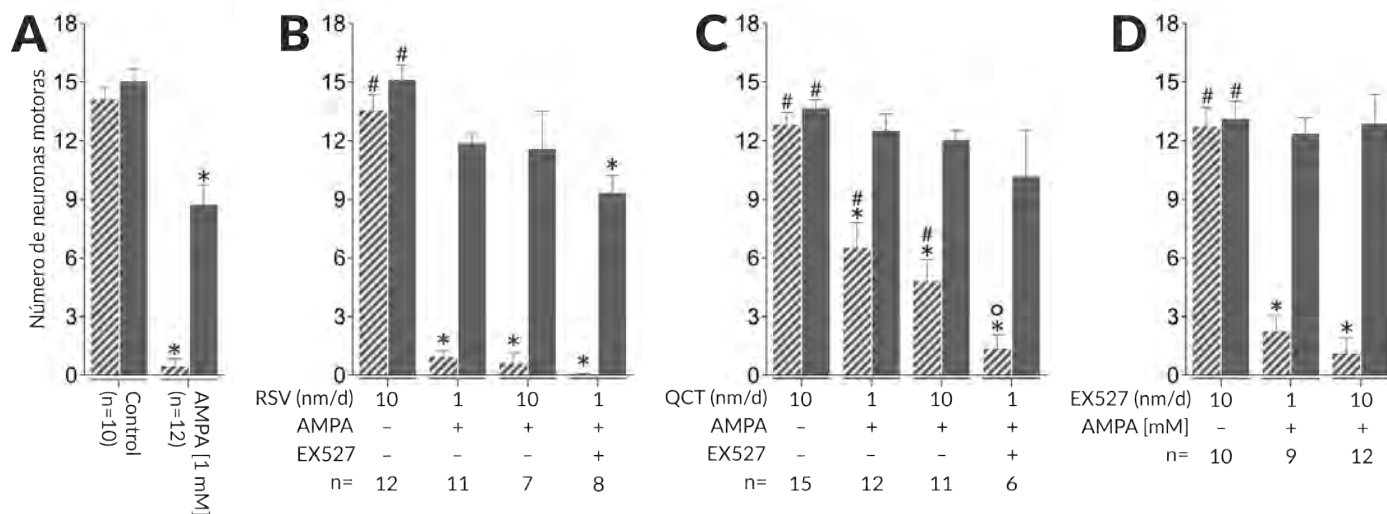


Figura 8.12. Resultados del análisis cuantitativo de neuronas motoras sanas: **A)** vehículo (control) o AMPA, **B)** RSV aislado o co-infundido con AMPA y/o EX527, **C)** QCT aislado o co-infundido con AMPA y/o EX527, y **D)** EX527 aislado o co-infundido con AMPA. El número de animales por tratamiento se encuentra indicado en cada caso. * $p < 0.05$ versus control, # $p < 0.05$ versus AMPA y ° $p < 0.05$ versus QCT 1 nm/d + AMPA; ANOVA de dos vías seguida de prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

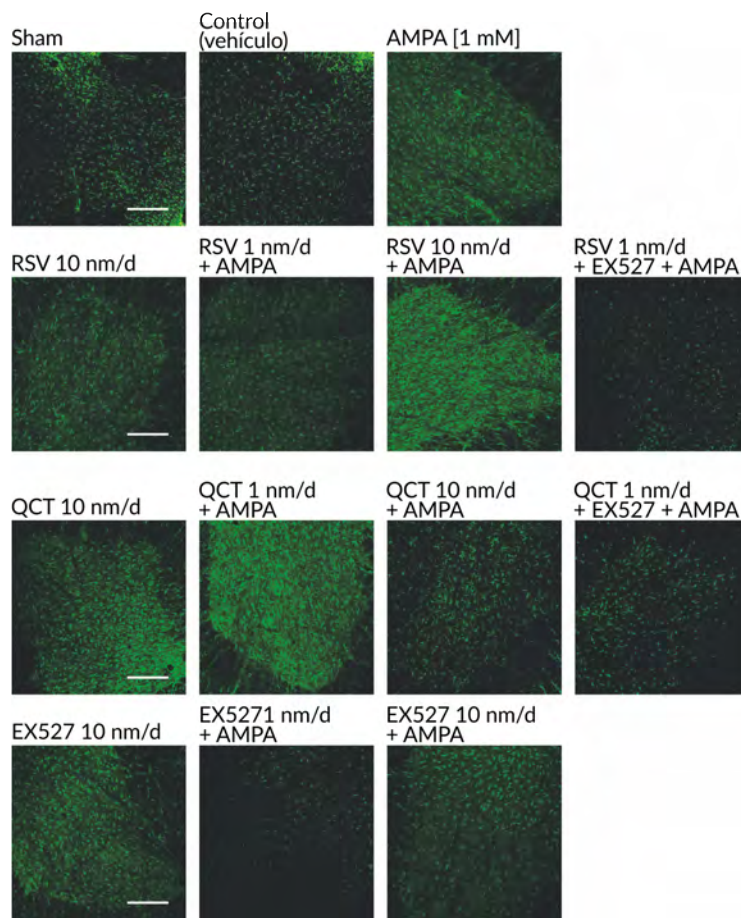


Figura 8.13. Efecto de la infusión de RSV, QCT o EX527 en el número de astrocitos espinal durante excitotoxicidad crónica inducida por AMPA. Proyecciones de máxima intensidad representativas de imágenes por microscopía confocal fluorescente de secciones del asta ventral de la médula espinal lumbar con inmunomarcaje para GFAP/FITC del lado contralateral al sitio de infusión de animales tratados durante 10 días con infusión continua de los tratamientos indicados. Escala 200 μm .

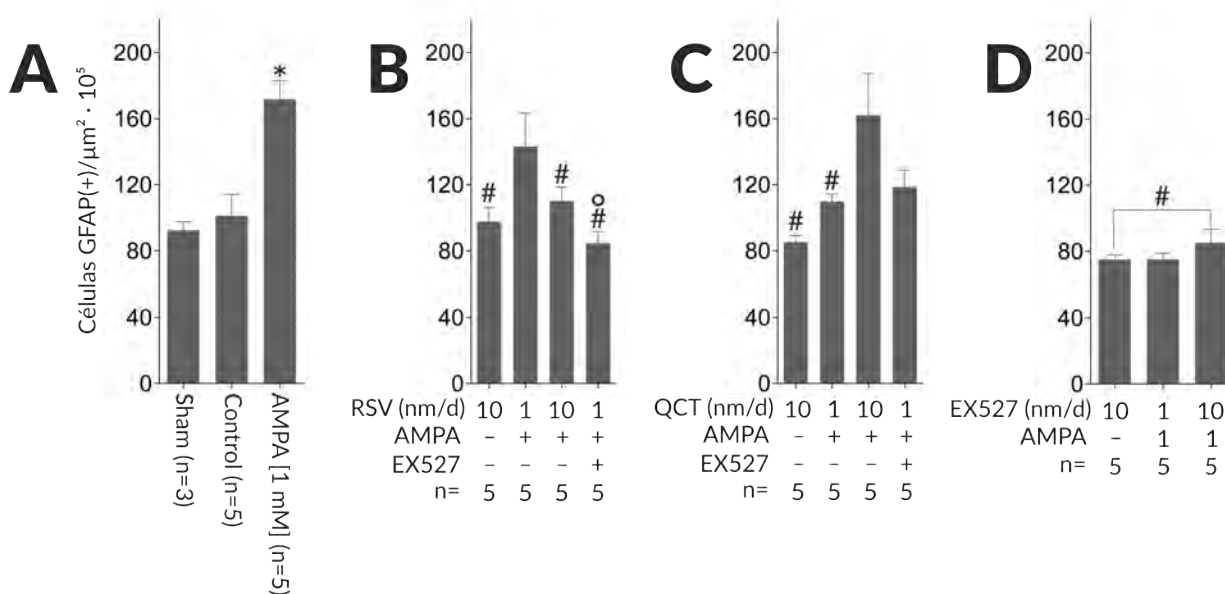


Figura 8.14. Resultados del conteo de partículas GFAP(+) tras la infusión de: **A)** sham, vehículo (control) y AMPA, **B)** RSV aislado o co-infundido con AMPA y/o EX527, **C)** QCT aislado o co-infundido con AMPA y/o EX527, y **D)** EX527 aislado o co-infundido con AMPA. El número de animales por tratamiento se encuentra indicado entre paréntesis para cada caso. * $p < 0.05$ versus control, # $p < 0.05$ versus AMPA y ° $p < 0.05$ versus RSV 1 nm/d + AMPA; ANOVA de una vía seguida de prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

adición de EX527 a la infusión de QCT 1nm/d + AMPA provocó una reducción estadísticamente significativa en el número de NMs en el lado ipsilateral, en comparación con el valor del grupo QCT 1 nm/d + AMPA (1.3 ± 0.7 versus 6.4 ± 1.3 , $p = 0.027$; Figura 8.12C).

La infusión aislada de EX527 a razón de 10 nm/d por 10 días resultó en una histología de la médula espinal ventral (Figura 8.11D) y en número de NMs similar a los del grupo control (Figura 8.12D). La co-infusión de EX527 con AMPA provocó cambios histológicos y valores del número de NMs similares a los del grupo con la infusión aislada de AMPA (Figuras 8.11D y 8.12D).

Efectos de la infusión de AMPA, RSV, QCT o EX527 en el número de astrocitos y de células microgliales

El conteo de células gliales en el lado contralateral reveló que el número de partículas GFAP(+) no cambia en condiciones control (infusión de vehículo por 10 días) en comparación con los animales con cirugía sham (92.3 ± 5.2 versus 101.1 ± 12.9 , $p = 0.85$) (Figuras 8.13 y 8.14A, respectivamente). En contraste, observamos que el número de partículas Iba(+) se duplicó, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas (48.0 ± 14.0 versus 17.4 ± 2.7 , $p = 0.06$) (Figuras 8.15 y 8.16D, respectivamente). Este cambio era esperado, puesto que la inserción del capilar de vidrio dentro del tejido de la médula espinal podría inducir muerte celular y señalización inflamatoria, como ya ha sido descrito con previamente con el implante de materiales rígidos en el sistema nervioso de roedores

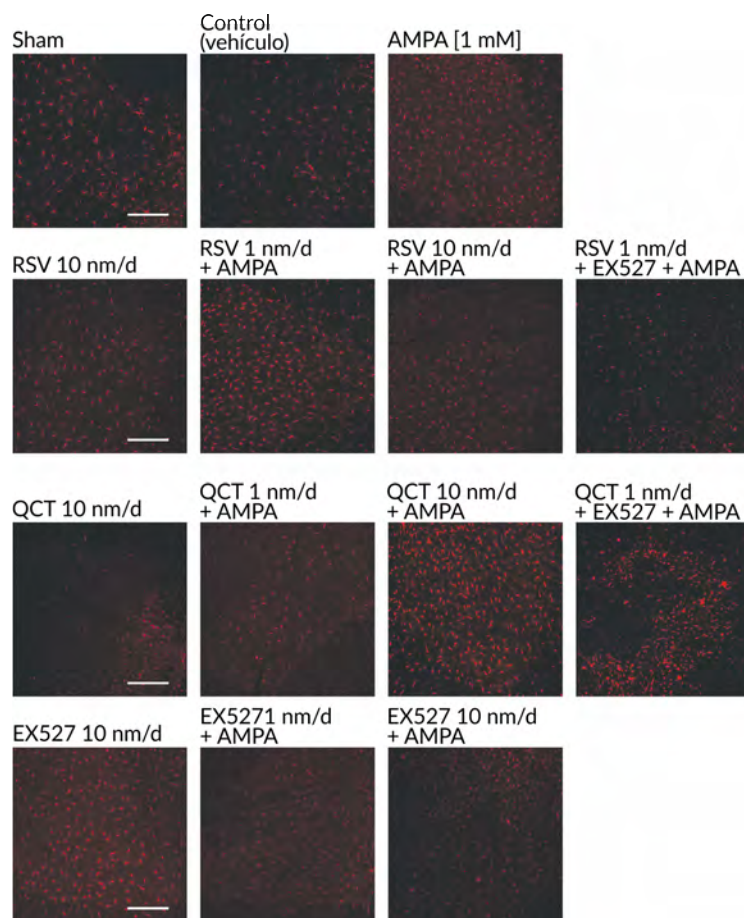


Figura 8.15. Efecto de la infusión de RSV, QCT o EX527 en el número de células microgliales espinales durante excitotoxicidad crónica inducida por AMPA. Proyecciones de máxima intensidad representativas de imágenes por microscopía confocal fluorescente de secciones del asta ventral de la médula espinal lumbar con inmunomarcaje para Iba1/AlexaFluor 546 del lado contralateral al sitio de infusión de animales tratados durante 10 días con infusión continua de los tratamientos indicados. Escala 200 μm .

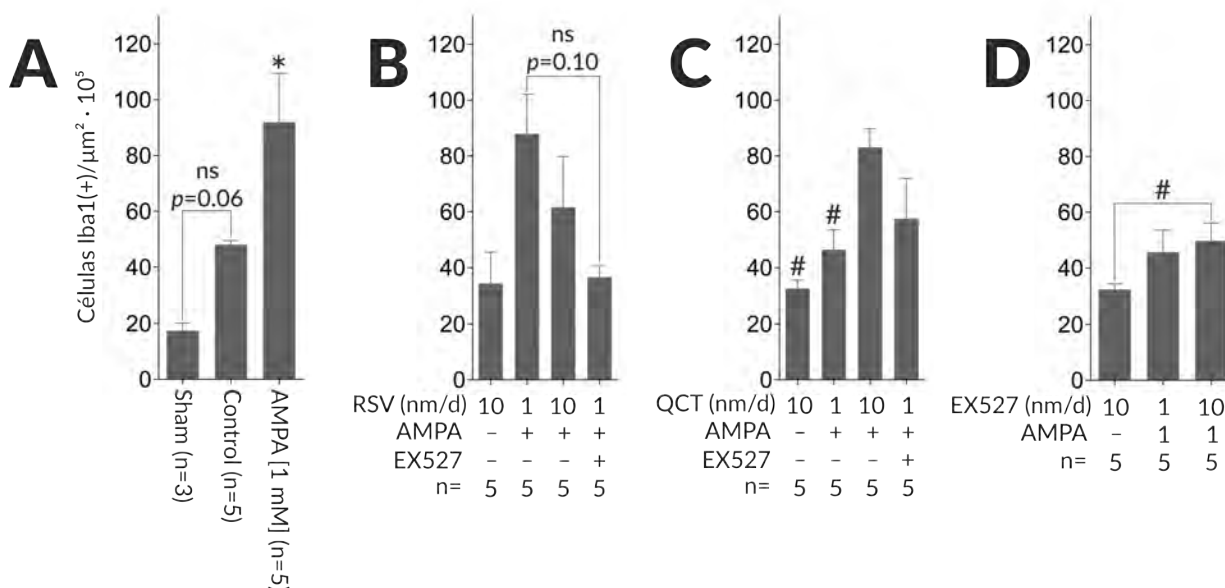


Figura 8.16. Resultados del conteo de partículas Iba1(+) tras la infusión de: **A)** sham, vehículo (control) y AMPA, **B)** RSV aislado o co-infundido con AMPA y/o EX527, **C)** QCT aislado o co-infundido con AMPA y/o EX527, y **D)** EX527 aislado o co-infundido con AMPA. El número de animales por tratamiento se encuentra indicado entre paréntesis para cada caso. ns: no significativo; * $p < 0.05$ versus control y # $p < 0.05$ versus AMPA; ANOVA de una vía seguida de prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

(Moshayedi *et al.* 2014). El tratamiento con AMPA también duplicó, en comparación con los valores del grupo control, el número de partículas GFAP(+) (171.7 ± 11.1 versus 101.1 ± 12.9 ; Figuras 8.13 y 8.14A) y de partículas Iba1(+) (91.9 ± 17.4 versus 48.0 ± 1.4 , Figuras 8.15 y 8.16A).

La infusión aislada de RSV, a 10 nm/d, no produjo cambios en comparación con el grupo control en el número de partículas GFAP(+) ni Iba1(+). El incremento en el número de partículas GFAP(+) inducido por AMPA fue prevenido por el tratamiento con RSV a 10 nm/d (171.7 ± 11.1 versus 110.1 ± 8.3 , $p=0.03$; Figuras 8.13 y 8.14B); en contraste, el incremento de partículas Iba1(+) inducido por AMPA no fue alterado por RSV (87.8 ± 14.2 para RSV 1 nm/d y 61.6 ± 18.2 para RSV 10 nm/d versus 91.9 ± 17.4 , $p=0.99$ y $p=0.59$, respectivamente; Figuras 8.15 y 8.16B). La infusión de EX527 con RSV 1nm/d + AMPA previno el incremento del número de partículas GFAP(+) inducidos por AMPA ($p<0.05$ versus AMPA y versus RSV 1nm/d + AMPA), aunque no así con el número de partículas Iba1(+), aunque se observó una tendencia hacia la reducción.

La infusión aislada de QCT no causó cambios, en comparación con los valores del grupo control, en el número de partículas GFAP(+) (85.1 ± 4.0 versus 101.1 ± 12.9 , $p=0.97$) ni Iba1(+) (57.4 ± 14.4 versus 48.0 ± 1.4 , $p=0.87$). La infusión de QCT evitó el incremento en el número de partículas con

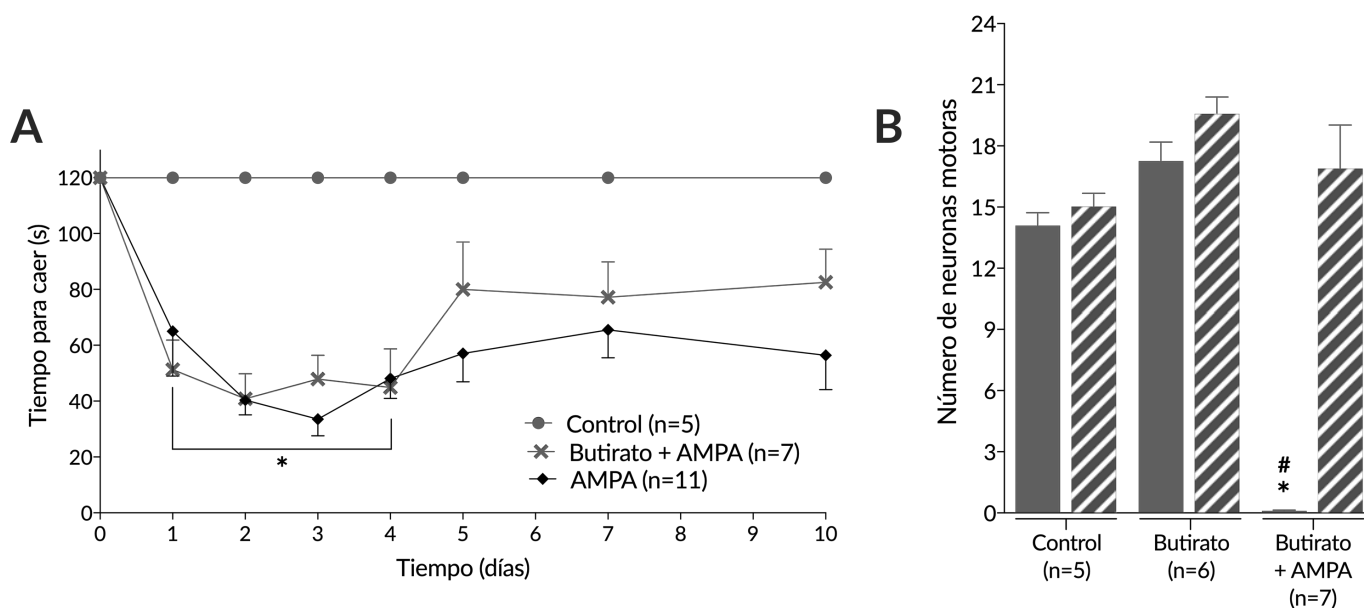


Figura 8.17. Resultados del efecto de la infusión crónica de butirato de sodio en la excitotoxicidad ocasionada por AMPA. **A)** La co-infusión de butirato con AMPA no evitó la disminución en el tiempo para caer inducido por AMPA. Como comparación se muestran los mismos datos de los animales tratados con AMPA y del grupo Control (Figura 8.10A). * $p<0.05$ versus control; ANOVA de dos vías seguida de prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. **B)** El tratamiento combinado de butirato y AMPA tuvo una pérdida casi completa de NMs en el lado ipsilateral. Por su parte, la infusión aislada de butirato no provocó ningún cambio en el número de NMs. Como comparación, se muestra el número de NMs del grupo Control (Figura 8.12A); * $p<0.05$ versus control y # $p<0.05$ versus butirato; ANOVA de una vía seguida de prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

inmunomarcaje glial inducido por AMPA, aunque sólo a 1 nm/d (109.8 ± 4.5 versus 171.7 ± 11.1 para partículas GFAP(+), $p=0.018$, Figuras 8.13 y 8.14C; y 46.3 ± 7.1 versus 91.9 ± 17.4 para partículas Iba1(+), $p=0.049$, Figuras 8.15 y 8.16C); la dosis de 10 nm/d no tuvo efectos. La adición de EX527 a la infusión de QCT 1 nm/d + AMPA no redujo el número de partículas GFAP(+) (118.6 ± 10.1 versus 109.8 ± 4.5 , $p=0.99$) ni Iba1(+) ($p=0.96$).

La infusión aislada de EX527 resultó en un número de partículas gliales similar a los del grupo control (75.0 ± 2.8 versus 101.1 ± 12.9 , $p=0.28$ para partículas GFAP(+), Figuras 8.13 y 8.14D; 32.3 ± 2.0 versus 48.0 ± 1.4 , $p=0.66$ para partículas Iba1(+), Figuras 8.15 y 8.16D). El tratamiento con EX527 redujo significativamente el número de partículas gliales en condiciones excitotóxicas, sin observar un efecto dosis dependiente, y con valores similares a los de condiciones control ($p < 0.01$ para el número de partículas GFAP(+) y $p < 0.05$ para el número de partículas Iba1(+)).

La infusión de crónica de butirato de sodio no previene de la parálisis ni la neurodegeneración inducida por AMPA

Para determinar si el efecto de QCT es inespecífico sobre otras clases de HDACs, estudiamos la infusión de butirato de sodio (But), en concentración 20 mM, sólo en combinación con AMPA a lo largo de 15 días. Encontramos que la infusión aislada de But no ocasiona cambios en la conducta motora (datos no mostrados) ni en el número de NMs en comparación con el grupo Control (17.3 ± 0.9 versus 14.1 ± 0.6 en el lado ipsilateral, 19.6 ± 0.8 versus 15.0 ± 0.6 en el lado contralateral; $p=0.19$) (Figura 8.17B).

Los animales tratados con But en co-infusión con AMPA presentaron parálisis gradual e irreversible, con valores similares a los tratados con AMPA solo (Figura 8.17A) Sin embargo, sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo Control los días 1 al 4. De manera similar, hubo una pérdida casi completa de NMs en los animales co-infundidos con But y AMPA en el lado ipsilateral (0.1 ± 0.04 , $p < 0.0001$ versus el grupo Control), aunque no se observaron cambios en el lado contralateral (16.9 ± 2.1 , $p=0.99$ versus el grupo Control).

9. DISCUSIÓN

9.1. LA ESTIMULACIÓN CRÓNICA DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO ENDÓGENO EN LA MÉDULA ESPINAL *IN VIVO* NO PROVOCA MUERTE DE NMS

La excitotoxicidad, un proceso patológico fundamental involucrado en la degeneración de las NMs, puede ser provocado mediante la alteración de la fisiología presináptica con dos mecanismos: 1) bloqueando la recaptura de glutamato liberado o 2) estimulando la liberación endógena de glutamato. Aunque hay evidencia de que el primer mecanismo está implicado en la muerte excitotóxica de las ENMs en los humanos (Rothstein *et al.* 1992), experimentos con modelos animales *knock-out* del transportador de glutamato GLT1 no han establecido causalmente este mecanismo a la degeneración de las NMs (Stoffel *et al.* 2004). Hallazgos realizados en el laboratorio coinciden en que la inhibición de la recaptura de glutamato no es un mecanismo relevante de neurodegeneración del SNC de roedores *in vivo*, ya sea de manera aguda (Massieu *et al.* 1995, Corona & Tapia 2004, Tovar-y-Romo & Tapia 2006) o crónica (Tovar-y-Romo *et al.* 2009b).

En este trabajo utilizamos una estrategia para provocar la liberación de glutamato endógeno a través de la infusión crónica de 4AP en la médula espinal, puesto que la perfusión aguda causa evidencia conductual de hiperexcitabilidad (fasciculaciones y contracciones musculares) aunque los animales estuvieran anestesiados. Sin embargo, dicha perfusión aguda no provoca muerte de NMs incluso cuando la concentración de glutamato extracelular era transitoriamente elevada hasta 5 veces del valor basal inmediatamente tras la administración de 4AP (Corona & Tapia 2004). Además, estos resultados contrastan con observaciones previas en las que la perfusión de 4AP con microdiálisis estimula la liberación de glutamato endógeno, actividad ictal conductual y electroencefalográfica y muerte neuronal excitotóxica en el cuerpo estriado (Morales-Villagran & Tapia 1996) y el hipocampo (Peña & Tapia 1999, 2000) en la rata *in vivo*. Los efectos de la 4AP en la concentración extracelular de glutamato en el hipocampo, por ejemplo, ocurren inmediatamente tras la administración aunque se requiere activación persistente (por al menos 60 minutos) de los receptores de tipo NMDA para que ocurra muerte neuronal (Ayala & Tapia, 2005).

Nuestros resultados muestran que, de manera similar a lo que ocurre con la administración aguda, el tratamiento crónico con 4AP *in vivo* no causa muerte de NMs espinales ni parálisis aunque provocó hiperexcitabilidad, manifestada como fasciculaciones y contracciones musculares. Aunque no determinamos la frecuencia ni la intensidad de estas manifestaciones conductuales, éstas eran lo suficientemente importantes para reflejarse en cambios del rendimiento en las tareas motoras: en el rotarod como una tendencia a disminuir el tiempo para caer y un discreto aumento en la fuerza de empuje de las patas traseras. Ambos cambios alcanzaron su máxima expresión a los 5 días posteriores al inicio de la infusión. Tampoco se observaron cambios en el número de NMs tras 15 días de infusión continua de 4AP.

Para confirmar que estos resultados son secundarios al incremento en la neurotransmisión glutamatérgica bloqueamos crónicamente los receptores de glutamato de tipo NMDA y AMPA y encontramos que este bloqueo evita la aparición de las alteraciones en la conducta motora de manera tardía en el experimento (hasta los días 3-5). Por lo tanto, nuestros datos señalan que la

neurotransmisión glutamatérgica es aumentada por 4AP en la médula espinal y que este aumento explica la hiperexcitabilidad en la conducta observada. La importancia de la transmisión glutamatérgica en el control de la excitabilidad de las NMs espinales está bien establecida, ya sea mediada por receptores de tipo NMDA (Kudo & Yamada 1987) o AMPA (Pook *et al.* 1993), aunque estos datos provienen de experimentos realizados en preparaciones *in vitro*.

De manera interesante, la activación crónica de los receptores de tipo NMDA, mediante la infusión de este agonista por 15 días, resulta en disminución en el tiempo para caer de rotarod. Asimismo, observamos neurodegeneración de NMs. Esto contrasta con las observaciones realizadas previamente en el laboratorio, en el que la exposición de la médula espinal a NMDA mediante microdiálisis no precipitó degeneración de NMs (Corona & Tapia 2004). También contrasta con el hallazgos presentados en este trabajo, puesto que 4AP provoca la activación de estos receptores, como se demostró con la co-infusión con MK801. Estos datos sugieren que las NMs son menos susceptibles a la activación sostenida de los receptores de tipo NMDA, en comparación a la activación de la actuación de los receptores de tipo AMPA. Esto podría deberse a que se requiere que la activación del receptor NMDA ocurra durante periodos más prolongados. Sin embargo, Ionov & Roslavteva (2012) reportaron que la aplicación única intratecal de NMDA y bicuculina resulta en neurodegeneración en la médula espinal. Otra posibilidad es que los receptores de tipo NMDA en las NMs espinales sean menos permeables a Ca^{2+} . En efecto, en rebanadas de médula espinal se observó que las NMs son más susceptibles a la activación del receptor de tipo AMPA en comparación con los de tipo NMDA y que esto se acompañaba de menores elevaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y menor amortiguación del Ca^{2+} en las mitocondrias (Sen *et al.* 2008). Es decir, el Ca^{2+} que ingresa por los receptores de tipo AMPA tiende a ser acumulado de manera preferencial en las mitocondrias, aunque la base molecular de este fenómeno no ha quedado determinado.

El glutamato endógeno no es el único neurotransmisor liberado por la estimulación provocada por 4AP. En efecto, en el laboratorio se ha demostrado que el GABA también es liberado por la infusión *in vivo* de 4AP en el cuerpo estriado (Morales-Villagran & Tapia 1996), en el hipocampo (Peña & Tapia 1999) y en la médula espinal (Corona & Tapia 2004). Es por esta observaciones que establecimos la hipótesis de que el GABA endógeno, y la consecuente activación de su GABA_{A} R, podría servir de contrapeso a los potenciales efectos de la liberación de glutamato endógeno inducida por 4AP. Los datos que obtuvimos con el tratamiento con bicuculina demuestran las propiedades neurotóxicas para las NMs espinales del bloqueo crónico del GABA_{A} R. Sin embargo, los cambios observados, tanto en la degeneración de NMs como en la conducta motora, no fueron tan rápidos ni tan severos en comparación con la infusión crónica de AMPA (Tovar-y-Romo *et al.* 2007). Los datos sobre la conducta motora también pusieron de manifiesto que el bloqueo de GABA_{A} R potencia los efectos excitadores de 4AP, que esto es insuficiente para aumentar la degeneración de NMs inducida por bicuculina. Por tanto, parece que la activación de GABA_{A} R debido a la liberación de GABA endógeno estimulado por 4AP no explica la falta de neurotoxicidad del tratamiento crónico de 4AP.

Este hallazgo fue inesperado, puesto que la activación de GABA_{A} R ha mostrado consistentemente ser protectora en modelos de trastornos neurodegenerativos en los que la

excitotoxicidad juega un papel un importante (Rudolph & Knoflach 2011). Además, los GABA_ARs on expresados por la NMs espinales (Bohlhalter *et al.* 1996) y son relevante para ejercer inhibición tónica (Castro *et al.* 2011) y su actividad ha sido implicado en ENMs (Ramírez-Jarquín *et al.* 2014). En efecto, se han reportado varias alteraciones en el control inhibitorio de la excitabilidad sináptica mediado por GABA en modelos de ENM, como cambios en la composición de subunidades y afinidad por el ligando (Carunchio *et al.* 2008) y disminución en la expresión de GABA_ARs (Petri *et al.* 2003). Estos datos sugieren que insuficiente neurotransmisión inhibitoria GABAérgica podría contribuir a la degeneración de NMs. Los resultados con bicuculina están de acuerdo con estos hechos y están apoyados por un reciente reporte en otro modelo *in vivo* de muerte excitotóxica de NM inducida por una única administración intratecal de NMDA y bicuculina (Ionov & Roslavteva 2012).

Puesto que la excitotoxicidad implica que hay desbalance en la excitación y en la inhibición, lo que resulta en estimulación excitatoria exagerada, postulamos que restaurando la inhibición a través de la sobreactivación farmacológica de los GABA_ARs, con muscimol, en las NMs podría prevenir la degeneración mediada por AMPA. Encontramos que muscimol no disminuye la degeneración excitotóxica de NM, aunque previene las contracciones musculares y la autotomía de las patas traseras inducidas por AMPA. Adicionalmente notamos que la progresión de la parálisis era más rápida, manifestada como descenso más marcado en el tiempo para caer de rotarod y en la fuerza de empuje de las extremidades traseras. Es posible que la abrumadora inhibición producida por muscimol induce “parálisis funcional” sin afectar la activación de receptores de AMPA ni causar degeneración de NMs. Esta conclusión esta apoyada por la parálisis parcial conductual inducida por el tratamiento sólo con muscimol. Aunque la duración de la infusión de muscimol fue diferente de la infusión de AMPA + muscimol ambos tratamiento son comparables, puesto que no se observó muerte neuronal tras 15 días de infusión de muscimol, mientras que la pérdida de NMs fue casi completa tras sólo 5 días de infusión de AMPA + muscimol. Hasta donde tenemos conocimiento este es el primer reporte de los efectos de la activación de GABA_AR en la médula espinal *in vivo* e indica que la neurotransmisión inhibitoria es incapaz de prevenir la excitación excesiva causa por la sobreactivación de los receptores de glutamato de tipo AMPA. Otra manera de evaluar el papel de la neurotransmisión GABAérgica en condiciones de excitación excesiva podría ser mediante la infusión de 4AP y muscimol, aunque muscimol sólo añadiría a la activación de GABA_ARs ya lograda por la liberación de GABA endógeno mediada por 4AP y, por tanto, no sería posible distinguir la contribución de la activación de GABA_AR provocada por esta co-infusión. Estos resultado están de acuerdo con nuestras previas observaciones que demuestran que los fármacos que potencian la neurotransmisión GABAérgica no son protectores para las convulsiones y la neurodegeneración dependientes de NMDA inducidas por 4AP en el hipocampo *in vivo* (Peña & Tapia 2000) y con la falta de mejoría de la severidad clínica de la enfermedad con el uso de fármacos agonistas de GABA_AR en pacientes con ELA (Miller *et al.* 2001).

Aunque es posible que la estimulación de la liberación de otros neurotransmisores podría ejercer efectos protectores en las NMs espinales *in vivo* (Ramírez-Jarquín *et al.* 2014) no exploramos esa posibilidad. Por ejemplo, aunque se han documentado alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica (Borasio *et al.* 1998) y en la serotoninérgica y dopaminérgica (Bertel *et al.* 1991) en pacientes con ELA hay muy poca evidencia de su papel en la degeneración excitotóxica de NMs.

Proponemos que la hiperexcitación producida sólo a través de la modulación directa de los receptores (ya sea a través del bloqueo de receptores inhibitorios o activación de receptores excitadores) tiene un papel causal en la muerte excitotóxica de las NMs, al menos en modelos *in vivo* relevantes. En vista de todos estos hallazgos, es difícil establecer un modelo unificado de los mecanismos presinápticos de la excitotoxicidad mediada por 4AP en el SNC mamífero. Serán necesarias mejores estrategias metodológicas para simultáneamente diseccionar el papel de los muchos (si no es que todos) los sistemas neurotransmisores involucrados en los efectos de 4AP.

9.2. EL EFECTO NEUROPROTECTOR DE QUERCETINA CONTRA LA EXCITOTOXICIDAD CRÓNICA EN LA MÉDULA ESPINAL *IN VIVO* ES MEDIADO POR SIRT1

La excitotoxicidad es un mecanismo fundamental de neurodegeneración en las ENM. En este trabajo hemos ampliado la caracterización de nuestro modelo de muerte de NM por excitotoxicidad crónica *in vivo*. Además de la parálisis y de la pérdida de NMs, hemos demostrado cuantitativamente que la infusión de AMPA induce un incremento en el número de células astrogliales y de la microglia, es decir, induce astro- y microgliosis. Este hallazgo ya había sido reportado previamente por nuestro grupo, pero sólo de manera cualitativa (Tovar-y-Romo *et al.* 2007). Varios estudios han establecido el papel crucial de las células gliales en la degeneración de NMs (para una amplia revisión, véase Lasiene & Yamanaka 2011), lo cual será discutido más adelante.

También, cabe señalar que en este estudio se utilizó una concentración de AMPA menor ([1 mM]) puesto que resulta en una pérdida incompleta de NMs y en una progresión más gradual de la parálisis, a diferencia de la concentración de AMPA utilizada en estudios previos de nuestro grupo ([7.5 mM]) (ref). Esta última concentración provoca muerte de NMs completa y rápida, así como parálisis bilateral completa y autotomía de los miembros traseros. Por lo tanto, la concentración [1 mM] nos permitió establecer un modelo más cercano al escenario clínico y en donde los potenciales efectos neuroprotectores de los fármacos utilizados no fuesen pasados por alto (Netzahualcoyotzi & Tapia 2015).

Los polifenoles han surgido como agentes terapéuticos atractivos para varias enfermedades humanas, incluyendo el cáncer, síndrome metabólico y neurodegeneración (Ebrahimi & Schluesener 2012, Upadhyay & Dixit 2015). En el caso de los trastornos neurodegenerativos, varias características de estos fármacos los hacen atractivos: su seguridad y tolerabilidad, su capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica, y su probada efectividad en varios modelos experimentales (Pandareesh *et al.* 2015). La efectividad de los polifenoles puede ser explicada porque poseen varios blancos moleculares, que incluyen a las sirtuinas y, por supuesto, SIRT1 (Lazo-Gómez *et al.* 2013, Ayissi *et al.* 2014). En este trabajo estudiamos el efecto de dos polifenoles en nuestro modelos de degeneración de NMs por excitotoxicidad crónica *in vivo*, con resultados mixtos.

Primero, observamos que RSV, un compuesto activador de sirtuinas (CAS), cuyo blanco principal reportado es SIRT1 (Kaeberlein *et al.* 2015), no protegió de la pérdida de NMs ni de la parálisis inducida por AMPA. Este fue un resultado no esperado, puesto que numerosos antecedentes reportan su prometedor potencial como agente neuroprotector. Por ejemplo, se ha demostrado que RSV

previene la muerte neuronal en modelos de neurodegeneración excitotóxica *in vitro* (Moldzio *et al.* 2013, Quincozes-Santos *et al.* 2014) e *in vivo* (Wang *et al.* 2004); en dichos trabajos, la excitotoxicidad fue inducida mediante agonistas directos de receptores de glutamato ionotrópicos. Sin embargo, no hay estudios que evalúen el potencial efecto neuroprotector de RSV en algún modelo de muerte de NMs que se base en la excitotoxicidad como mecanismo primario.

De la misma manera, pocos estudios han explorado el papel de RSV en modelos experimentales de pérdida de NMs. RSV reduce la degeneración espontánea de neuronas corticales *in vitro* transfectadas con hSOD1^{G93A} (Kim *et al.* 2007) y aumenta la expresión de SIRT1 en neuronas tipo-NM transfectadas con hSOD1^{G93A} en cultivo (Wang *et al.* 2014). *In vivo*, tres estudios encontraron que RSV extiende la supervivencia de ratones transgénicos hSOD1^{G93A} (Han *et al.* 2012, Mancuso *et al.* 2014 y Song *et al.* 2014). Estos estudios atribuyeron los efectos protectores de RSV a un aumento de la actividad o de la expresión de SIRT1. De manera interesante, ninguno de ellos realizó experimentos para corroborar la contribución de SIRT1 en sus hallazgos, por ejemplo, mediante ARN silenciadores interferentes, animales *knock out* condicionales, fármacos inhibitorios o ensayos enzimáticos. Esto podría implicar que el efecto de RSV sobre la expresión o actividad de SIRT1 podría ser un epifenómeno. En efecto, resultados recientes sugieren que RSV podría no ser un CAS directo (Behr *et al.* 2009) y que otros blancos, como la proteín-cinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK) (Dasgupta & Millbrandt 2007), deben ser considerados. También se ha sugerido que los efectos neuroprotectores de RSV no están relacionados a la activación de SIRT1 (Tang 2010).

Las diferencias en los resultados observados entre los estudios previamente comentados y los nuestros podrían ser causados por factores metodológicos. La elección de modelo de estudio es crítico para la interpretación correcta. Todos los estudios previos utilizaron el modelo de ELA de ratones transgénicos hSOD1^{G93A}, mientras que en este trabajo se obtuvieron los resultados de ratas silvestres a las que se les indujo excitotoxicidad mediada por AMPA crónica sólo en la médula espinal. También es necesario considerar las dosis y el modo de administración de los CAS. En el trabajo de Mancuso *et al.* (2014) el RSV fue administrado a través de una dieta enriquecida en concentraciones tan elevadas como 160 mg/kg/día, por 8 a 12 semanas. Song *et al.* (2014) realizaron administraciones intraperitoneales diarias por más de 80 días. Sin embargo, RSV es sujeto a metabolismo de primer paso de manera intensa, y tiene muy poca biodisponibilidad (Walle *et al.* 2004) lo que podría socavar los resultados de esos estudios. Nosotros evitamos estos problemas administrando directamente los polifenoles (RSV o QCT) directamente en el tejido de la médula espinal, donde el daño excitotóxico estaba siendo producido. No obstante, sólo administramos RSV por 10 días, mientras que en los otros estudios se utilizó un período más largo.

Algunas similitudes también son relevantes. Por ejemplo, Mancuso *et al.* (2014) encontró que RSV previene la microgliosis y la astrogliosis inducida por la actividad tóxica del transgen hSOD1^{G93A}, mientras que nosotros encontramos que RSV disminuye la astrogliosis inducida por AMPA, aunque no la microgliosis. También, este estudio identificó que SIRT1 se expresa en el núcleo y citoplasma de las NMs, de manera muy similar a los hallazgos que obtuvimos. Sin embargo, estos autores no investigaron si las células gliales expresan SIRT1. Además, los estudios de Song *et al.* (2014) y de

Mancuso *et al.* (2014) coinciden en que RSV ejerce sus efectos protectores, en última instancia, aumentan la actividad respiratoria mitocondrial. En efecto, en el laboratorio se ha reportado con anterioridad que la administración de sustratos energéticos detiene las alteraciones en la función de los complejos respiratorios inducidos por AMPA en la médula espinal, y que este efecto está asociado con un aumento en la supervivencia de las NMs y con una mejoría en el rendimiento en las tareas motoras (Santa-Cruz *et al.* 2016). Estos hallazgos refuerzan la idea que la excitotoxicidad crónica mediada por AMPA y la expresión del transgen tóxico hSOD1^{G93A} comparten mecanismos comunes que finalmente llevan a la degeneración de NMs. Independientemente de estas cuestiones metodológicas, RSV no tuvo ningún efecto neuroprotector en nuestras condiciones experimentales y proponemos que las vías moleculares activadas por RSV no son relevantes para proteger las NMs. En concordancia, en un estudio reciente se reportó que RSV no protegió a las neuronas hipocampales de ratas juveniles tratadas con ácido kaínico (Friedman *et al.* 2013).

Después, evaluamos los potenciales efectos de QCT y encontramos que previene de manera notoria la parálisis, demostrado como un aumento en el tiempo para caer en la prueba de Rotarod, además de provocar un efecto neuroprotector moderado, aunque significativo. No observamos una relación dosis-respuesta, aunque los efectos benéficos fueron observados con la dosis más baja (de 1 nanomola/día). QCT también provocó una disminución de la astrogliosis y de la microgliosis inducida por AMPA, pero sólo en la dosis más baja.

Estudios previos han demostrado que QCT es neuroprotectora contra estímulos excitotóxicos, y le atribuyen estos resultados a la capacidad antioxidante de QCT. Por ejemplo, QCT detuvo la muerte neuronal y la disfunción mitocondrial causada por NMDA y por ADP con hierro *in vitro* (Silva *et al.* 2008). También, en un modelo de lesión cerebral por isquemia-reperfusión *in vivo* QCT disminuyó el volumen del infarto cerebral, mejoró las deficiencias neuroconductuales y redujo los niveles de nitritos y de malonildialdehído, ambos marcadores de estrés oxidativo (Pandey *et al.* 2011). Sin embargo, en estos trabajos no se determinó si QCT es un recolector (*scavenger*) directo de especies reactivas oxidantes (derivada de oxígeno o de nitrógeno) o activa vías moleculares relacionadas a defensas antioxidantes. A pesar de estos antecedentes, consideramos que los resultados observados con QCT son independientes de su actividad antioxidante. Esta aseveración deriva de estudios realizados en el laboratorio, en los que se demostraron que prácticamente no hay especies reactivas de nitrógeno en el tejido espinal sometido a excitotoxicidad mediada por AMPA (Santa-Cruz & Tapia 2014) y, de manera relevante, que la administración de moléculas antioxidantes clásicas (como el glutatión y el ascorbato) directamente a la médula espinal, ya sea de manera aguda (Santa-Cruz & Tapia 2014) o crónica (Netzahualcoyotzi & Tapia 2014), no confieren protección a las NMs sometidas al estímulo excitotóxico de la administración de AMPA.

Son escasos los estudios que exploran los efectos de QCT en enfermedades de neurona motora. Por ejemplo, se ha observado que la supervivencia de NMs espinales embrionarias de rata es incrementada por QCT (Ternaux & Portalier 2002). También, QCT tiene algunos efectos benéficos en cultivos de células humanas no neurales obtenidos de pacientes afectados por atrofia espinal muscular (Uzunalli *et al.* 2015) y por ELA familiar por SOD1 mutante (Said Ahmed *et al.* 2000). En el primer caso,

QCT incrementó los niveles del gen SMN 2 (*survival of motor neuron 2*) en fibroblastos, mientras que en el segundo trabajo se encontró que QCT ejercía un efecto antioxidante en linfocitos. Hasta donde sabemos, no hay reportes que estudien los efectos de QCT en ratones transgénicos con hSOD1^{G93A}.

De manera muy interesante, encontramos en este trabajo que los efectos benéficos de QCT fueron parcialmente suprimidos por el inhibidor específicos de SIRT1, EX527. Este resultado sugiere que SIRT1 es activado por QCT y que este efecto es responsable, al menos en parte, de la acción neuroprotectora de este polifenol. SIRT1 está ampliamente expresada en el sistema nervioso central de los mamíferos (Zakhary *et al.* 2010), especialmente en células neuronales, en sus núcleos y citoplasma (Mancuso *et al.* 2014). Como se mencionó previamente, otros mecanismos distintos a la actividad antioxidante de QCT podrían explicar los hallazgos encontrados y, de acuerdo a resultados de otros grupos (véase arriba), mecanismos de acción múltiples se han definido actualmente (Kawabata *et al.* 2015). En efecto, la activación del eje SIRT1/AMPK fue el mecanismo por el que se explicó el aumento en la viabilidad de neuronas cultivadas infectadas por virus del herpes simple 1 mediado por QCT (Leyton *et al.* 2015). También, en un modelo *in vivo* de lesión cerebral hipobárica-ipóxica QCT detuvo el deterioro cognitivo a través del aumento en la expresión de SIRT1 y la consecuente activación del coactivador 1 alfa del receptor gamma del proliferador de peroxisomas activado (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* -PGC1- α), uno de los reguladores maestros de la biogénesis mitocondrial (Liu *et al.* 2015).

La manera en la que la activación de SIRT1 confiere protección a neuronas susceptibles a degenerar es un área que se encuentra bajo investigación activa. Lo que ha quedado demostrado es la gran cantidad de vías moleculares en las que SIRT1 se encuentra involucrada, la mayoría posiblemente entrecruzadas en una compleja red de señalización que relaciona el estrés metabólico y el energético con cambios en la expresión génica a través de modificaciones epigenéticas (por ejemplo, por deacetilación de histonas) y modulación de la maquinaria transcripcional (para una revisión amplia del tema véase Ng *et al.* 2015). Dependiendo del modelo y de las condiciones experimentales consideradas serán las vías de señalización moduladas por SIRT1. Dada la poca especificidad de los polifenoles, las estrategias experimentales que involucran directamente la expresión del gen SIRT1 son más adecuadas para su estudio. Por ejemplo, en ratones dobles transgénicos para hSOD1^{G93A} y que , además, sobre-expresan SIRT1 de manera específica en el sistema nervioso central se observó una supervivencia aumentada; este efecto fue atribuido, en parte, a la activación del sistema de chaperonas factor de choque térmico 1/proteínas de choque térmico 70 inducible (Watanabe *et al.* 2014). Este hallazgo contrasta con las vías moleculares descritas previamente, por lo que este estudio resalta que es inadecuado realizar generalizaciones respecto a los mecanismos de neuroprotección.

Además, estudiamos los efectos de la inhibición crónica de SIRT1 en nuestro modelos de muerte de MNs espinales por excitotoxicidad crónica a través de la infusión del inhibidor EX527. De manera interesante, la infusión crónica aislada de este inhibidor no afecta la conducta motora ni induce muerte de NMs. Aunque la expresión de SIRT1 en el hipocampo parece ser esencial para la función cognitiva y la plasticidad sináptica en roedores (Michan *et al.* 2010), no hay estudios hasta ahora que investiguen el papel de SIRT1 en la fisiología de la médula espinal. Posteriormente, nos preguntamos si la infusión

de EX527 empeoraría la parálisis y la muerte de NMs por excitotoxicidad crónica. De manera inesperada, no observamos un aumento del déficit conductual ni de la degeneración de NMs. Evidencia experimental sólida obtenida de estudios *in vitro* señala que la excitotoxicidad conduce a estrés energético, determinado como disminución en la cantidad de NAD(P)⁺ (Schuchmann *et al.* 1999, Heinemann *et al.* 2002). Hay que recordar que NADH es el sustrato utilizado por SIRT1 para realizar su actividad catalítica de deacetilación (Feldman *et al.* 2012). Por tanto, el agotamiento de NAD⁺ en condiciones excitotóxicas resultará en una disminución de la actividad catalítica de SIRT1, lo que llevaría a que en neuronas bajo estrés no sea posible activar las vías de señalización promotoras de supervivencia dependientes de SIRT1 (demostrado recientemente por Wang *et al.* 2013).

No obstante, la actividad de SIRT1 podría resultar en efectos no esperados: el consumo de NAD⁺ en neuronas que ya se encuentran con alta demanda energética podría llevarlas a la activación de vías de muerte celular, por ejemplo, a través de la actividad aumentada de la poli(ADP)ribosa polimerasa (Martire *et al.* 2015). De hecho, estudios recientes han señalado que la inhibición de SIRT1 (con nicotinamida), o el *knock down*, podría ser beneficiosa para supervivencia neuronal bajo condiciones de excitotoxicidad (Liu *et al.* 2008, Liu *et al.* 2009). o de estrés oxidativo (Li *et al.* 2008). Por lo tanto, proponemos que la falta de empeoramiento de la muerte de NMs por EX527 podría deberse a un incremento en la disponibilidad de NAD⁺ para otras vías de supervivencia, como la rescate del estado energético celular, como ha sido sugerido en un modelo *in vivo* de neurodegeneración por priones (Zhou *et al.* 2015).

Por otro lado, los hallazgos de los efectos de RSV, QCT y EX527 sobre la astrogliya y la microglia sugieren que su abundancia no está relacionada con la protección neuronal. Esto implicaría que las vías moleculares moduladas por estos fármacos operan de manera independiente en NMs y en células gliales; esto está en contradicción con los mecanismos propuestos de muerte celular no autónoma para explicar la fisiopatología de las enfermedades de neurona motora (Ilieva *et al.* 2009).

Los efectos de los polifenoles RSV y QCT en las células gliales han sido abordados previamente en otros estudios, aunque su papel en condiciones excitotóxicas no ha sido estudiado exhaustivamente. Nosotros observamos que la infusión de RSV, a razón de 10 nanomolas/día, reduce sólo el número de astrocitos. En concordancia, Wang *et al.* (2004) observaron un efecto similar en el hipocampo *in vivo* tras provocar lesión excitotóxica mediada por ácido kaínico, mientras que Gibovan & Plamodon (2015) replicaron este hallazgo en un modelo de lesión cerebral por isquemia-reperfusión. Estos autores también encontraron que RSV redujo la proliferación y la activación de la microglia, aunque nosotros no observamos ese efecto. La infusión de QCT resultó en una reducción en el número de astrocitos y de células microgliales, pero sólo en la concentración más baja de 1 nanomola/día. En contraste con RSV, no hemos identificado otros estudios que exploren los efectos de QCT en células gliales bajo condiciones excitotóxicas. Sin embargo, en otro modelos de neurodegeneración, QCT previno la activación microglial tras la exposición a 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺, una neurotoxina que provoca degeneración de neuronas estriatales y parkinsonismo) *in vitro* (Bournival *et al.* 2012), mientras que en un modelo de la enfermedad de Huntington *in vivo*, inducido por a administración de ácido 3-nitropropiónico, QCT redujo la proliferación microglial, aunque no afectó el

número de astrocitos (Chakraborty *et al.* 2014). Nosotros observamos que este efecto no se producía con la dosis de 10 nanomolas/día, lo que parece ser contradictorio. Como se mencionó previamente, QCT tiene numerosos mecanismos de acción (Kawabata *et al.* 2015) y algunos de los efectos benéficos observados en la microglia (y en las NMs) en la dosis menor podrían haberse perdido debido a que otro blanco molecular estaba siendo preferentemente modulado.

De manera inesperada, los aumentos en el número de las células astrogliales y microgliales inducidos por AMPA fueron completamente suprimidos por el tratamiento con EX527. No se han realizado estudios que investiguen los posibles efectos de este fármaco en células gliales, hasta donde tenemos conocimiento, y los pocos estudios realizados sugieren un efecto contrario. Por ejemplo, Cheng *et al.* (2014) encontraron que la actividad de SIRT1 induce un fenotipo anti-inflamatorio en astrocitos en cultivo a través de un aumento en la actividad de SOD2 y de la catalasa. Respecto a la microglia, se ha observado que la deficiencia en la expresión de SIRT1 promueve un fenotipo pro-inflamatorio a través de un aumento de la transcripción de interleucina 1- β (Cho *et al.* 2015). Además, SIRT1 es fundamental para evitar la muerte neuronal por el péptido relacionado al amiloide β inducida por la microglia a través de reducir la señalización del NF- κ B.

Finalmente, corroboramos que el efecto benéfico de QCT era debido a la activación de SIRT1 y no a la inhibición de otras HDACs. En efecto, las HDACs parecen estar involucradas en las fisiopatología de la ELA. Un estudio con tejido post-mortem de pacientes con ELA reportó que la expresión de HDAC2 disminuye y de HDAC11 aumenta en la médula espinal (Janssen *et al.* 2010), mientras que un ensayo *in vitro* las mutaciones en TDP-43, en asociación con FUS, parecen aumentar la expresión de HDAC6 (Kim *et al.* 2010). Encontramos que la inhibición de las HDACs clásicas con un inhibidor no específico, el butirato de sodio, no protege de la muerte neuronal ni de la parálisis inducida por excitotoxicidad crónica. Esto está de acuerdo con resultados en el ratón transgénico hSOD1^{G93A} en los que la inhibición farmacológica de las HDACs de clase II no modificó la esperanza de vida, a pesar de que incrementó la expresión de los transportadores de glutamato EAAT2 (Lapucci *et al.* 2017) y que mejoró el rendimiento en las tareas motoras en las fases iniciales de la enfermedad (Buonvicino *et al.* 2018). Sin embargo, la administración a ratones transgénicos de tricostatina A, un inhibidor inespecífico y potente, resultó ser protector (Yoo & Ko 2011), así como el valproato, otro inhibidor inespecífico, en cultivos neuronales sometidos a excitotoxicidad mediada por glutamato (Nagańska *et al.* 2015). Estos resultados contradictorios podrían indicar que la inhibición de las clases I y IV es la responsable de la neuroprotección. En efecto, la HDAC11, el único miembro de la clase IV, es la HDAC mas expresada en el sistema nervioso (Broide *et al.* 2007) y su expresión aumenta en pacientes con ELA (Janssen *et al.* 2010). En contraste, los ratones *knock-out* de HDAC11 son viables y no presentan fenotipos deletéreos obvios (Bryant *et al.* 2017). Sin embargo, hasta donde tenemos conocimiento, no se ha estudiado el papel de esta deacetilasa en la degeneración de las NMs espinales en modelos experimentales de ELA.

10. CONCLUSIONES

Para la primera parte del proyecto, en la que se exploró el efecto de la administración crónica de 4AP *in vivo*, se concluyó que:

- I. Estimular crónicamente la liberación de glutamato endógeno no precipita degeneración de neuronas motoras en la médula espinal, pero estimula hiperexcitabilidad.
- II. La hiperexcitabilidad secundaria a la liberación de glutamato endógeno depende de la activación de receptores de tipos NMDA y de tipo AMPA.
- III. La sobre-activación crónica del receptor de tipo NMDA, así como el bloqueo de la inhibición mediada por el receptor GABA_A, provocan excitotoxicidad en las neuronas motoras de la médula espinal, aunque estas neuronas son menos susceptibles a estos estímulos.
- IV. La sobre-inhibición, mediada por el receptor GABA_A, no contrarresta la neurodegeneración excitotóxica mediada por AMPA, por lo que parece no ser un blanco terapéutico para las enfermedades de neurona motora.

Para la segunda parte del proyecto, en la que se exploró el efecto de la administración de polifenoles en la médula espinal *in vivo*, se concluyó que:

- I. SIRT1 se expresa exclusivamente en las neuronas de la médula espinal y, por tanto, los efectos de su activación son dependientes de este tipo celular.
- II. Quercetina, pero no resveratrol, protege a las neuronas motoras de la excitotoxicidad mediada por AMPA a través de la activación de SIRT1.
- III. La activación de SIRT1 podría constituir una estrategia terapéutica para las enfermedades de neurona motora.
- IV. La abundancia de los astrocitos y de la microglia, no está relacionada con la protección de las neuronas motoras ejercida por la modulación de la actividad de SIRT1.
- V. La inhibición de las HDACs clásicas no previene de los efectos negativos de la excitotoxicidad mediada por AMPA.

11. PERSPECTIVAS

Dados los hallazgos en los mecanismos neuroquímicos de los efectos de la liberación de glutamato endógeno y la modulación de los receptores responsables de la inhibición y de la excitación de las NMs en la médula espinal, propongo estas perspectivas:

- I. Determinar el papel de otros neurotransmisores que podría haber sido liberados por la administración de 4AP en la susceptibilidad de la NMs a sufrir muerte por excitotoxicidad. De maneaa particular, la serotonina modula de manera muy relevante la excitabilidad de las NMs y uno de sus receptores, el 5HT-3, además es ionotrópico excitatorio.
- II. Estudiar la expresión de receptores metabotrópicos de glutamato y su rol en la modulación de la liberación de neurotransmisor endógeno provocado por 4AP. El tratamiento con 4AP provoca cambios reversibles en la conducta motora, apreciables sobre todo en el rendimiento en rotarod. La inhibición provocada por los mGluRs podría explicar este fenómeno.
- III. Examinar cambios post-traduccionales o en el nivel de expresión de receptores post-sinápticos, como NMDA y GABAA. De la misma manera, los cambios en la conducta motora en los animales bajo tratamiento crónico con BIC, MUS y NMDA fueron reversibles, lo cual podría deberse a modulación en la abundancia o sensibilidad de estos receptores a sus ligandos.

Respecto al segundo proyecto, en donde se observó el efecto neuroprotector de la activación de SIRT1, propongo estas perspectivas:

- I. Explorar el potencial efecto neuroprotector de la activación de otras sirtuinas. En especial SIRT3 es un candidato atractivo por su rol en la energética mitocondrial y por el papel tan importante de la mitocondria en la neurodegeneración inducida por excitotoxicidad.
- II. Explorar otros mecanismos responsables de la neuroprotección mediada por SIRT1. La activación de SIRT1 podría conducir a disminución de la concentración intracelular de NAD⁺. Algunas enzimas, como las PARP, utilizan NAD⁺ como sustrato. Estas enzimas suelen conducir a muerte celular bajo condiciones de estrés. Es posible que los efectos benéficos de la activación de SIRT1 sean por inhibición de las PARP.
- III. Estudiar cómo cambia la expresión de otras sirtuinas bajo condiciones de excitotoxicidad, puesto que esto podría explicar, en parte, los efectos deletéreos de la muerte neuronal mediada por AMPA.

... sospecho que la especie humana –la única– está por extinguirse y que la Biblioteca perdurará: iluminada, solitaria, infinita, perfectamente inmóvil, armada de volúmenes preciosos, inútil, incorruptible, secreta.

JORGE LUIS BORGES
La biblioteca de Babel, 1941

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Chalabi A, Hardiman O, Kiernan MC, Chiò A, Rix-Brooks B, van den Berg LH. Amyotrophic lateral sclerosis: moving towards a new classification system. *Lancet Neurol.* 2016; 15: 1182–94.
- Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1964; 51: 786–794.
- Arias C, Arrieta I, Massieu L, Tapia R. Neuronal damage and MAP2 changes induced by the glutamate transport inhibitor dihydrokainate and by kainate in rat hippocampus *in vivo*. *Exp Brain Res.* 1997; 116(3): 467–476.
- Ay M, Luo J, Langley M, et al. Molecular mechanisms underlying protective effects of quercetin against mitochondrial dysfunction and progressive dopaminergic neurodegeneration in cell culture and MitoPark transgenic mouse models of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2017; 141(5): 766–782.
- Ayala GX, Tapia R. Late N-methyl-D-aspartate receptor blockade rescues hippocampal neurons from excitotoxic stress and death after 4-aminopyridine-induced epilepsy. *Eur J Neurosci.* 2005; 22: 3067–3076.
- Ayissi VB, Ebrahimi A, Schluesener H. Epigenetic effects of natural polyphenols: a focus on SIRT1-mediated mechanisms. *Mol Nutr Food Res.* 2014; 58(1): 22–32.
- Azevedo C, Saiardi A. Why always lysine? The ongoing tale of one of the most modified amino acids. *Adv Biol Regul.* 2016; 60: 144–150.
- Bano D, Ankarcona M. Beyond the critical point: An overview of excitotoxicity, calcium overload and the downstream consequences. *Neurosci Lett.* 2018; 663: 79–85.
- Barthélémy C, Henderson CE, Pettmann B. Foxo3a induces motoneuron death through the Fas pathway in cooperation with JNK. *BMC Neurosci.* 2004; 5: 48.
- Basso M, Massignan T, Samengo G, Cheroni C, De Biasi S, Salmona M, Bendotti C, Bonetto V. Insoluble mutant SOD1 is partly oligoubiquitinated in amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Biol Chem.* 2006; 281(44): 33325–35.
- Beher D, Wu J, Cumine S, et al. Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity. *Chem Biol Drug Des.* 2009; 74(6): 619–624.
- Bergles DE, Diamond JS, Jahr CE. Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Curr Opin Neurobiol.* 1999; 9: 293–298.
- Bertel O, Malessa S, Sluga E, Hornykiewicz O. Amyotrophic lateral sclerosis: changes of noradrenergic and serotonergic transmitter systems in the spinal cord. *Brain Res.* 1991; 566: 54–60.
- Blizzard CA, Lee KM, Dickson TC. Inducing chronic excitotoxicity in the mouse spinal cord to investigate lower motor neuron degeneration. *Front Neurosci.* 2016; 10: 76.
- Bohlhalter S, Weinmann O, Mohler H, Fritschy JM. Lamina compartmentalization of GABA_A-receptor subtypes in the spinal cord: an immunohistochemical study. *J Neurosci.* 1996; 16:283–297.
- Boillée S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science.* 2006; 312(5778): 1389–1392.
- Bonifacino T, Musazzi L, Milanese M, Seguni M, Marte A, Gallia E, Cattaneo L, Onofri F, Popoli M, Bonanno G. Altered mechanisms underlying the abnormal glutamate release in amyotrophic lateral sclerosis at a pre-symptomatic stage of the disease. *Neurobiol Dis.* 2016; 95: 122–33.
- Borasio GD, Linke R, Schwarz J, Schlamp V, Abel A, Mozley PD, et al. Dopaminergic deficit in amyotrophic lateral sclerosis assessed with [¹²³I] IPT single photon emission computed tomography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1998; 65: 263–265.

- Bordone L, Cohen D, Robinson A, Motta MC, van Veen E, Czopik A, Steele AD, Crowe H, Marmor S, Luo J, Gu W, Guarente L. SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell*. 2007; 6: 759-767.
- Bournival J, Plouffe M, Renaud J, Provencher C, Martinoli MG. Quercetin and sesamin protect dopaminergic cells from MPP⁺-induced neuroinflammation in a microglial (N9)-neuronal (PC12) coculture system. *Oxid Med Cell Longev*. 2012; 2012: 921-941.
- Brini M, Cali T, Ottolini D, Carafoli E. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cell Mol Life Sci*. 2014; 71(15): 2787-2814.
- Broide RS, Redwine JM, Aftahi N, Young W, Bloom FE, Winrow CJ. Distribution of histone deacetylases 1-11 in the rat brain. *J Mol Neurosci*. 2007; 31: 47-58.
- Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*. 2017; 377(2): 162-172.
- Buonvicino D, Felici R, Ranieri G, Caramelli R, Lapucci A, Cavone L, Muzzi M, Di Pietro L, Bernardini C, Zwergel C, Valente S, Mai A, Chiarugi A. Effects of class II-selective histone deacetylase inhibitor on neuromuscular function and disease progression in SOD1-ALS mice. *Neuroscience*. 2018; 379: 228-238.
- Bryant DT, Landles C, Papadopoulou AS, Benjamin AC, Duckworth JK, Rosahl T, Benn CL, Bates GP. Disruption to schizophrenia-associated gene Fez1 in the hippocampus of HDAC11 knockout mice. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 11900.
- Cantó C, Auwerx J. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol*. 2009; 20: 98-105.
- Carta M, Fièvre S, Gorlewicz A, Mulle C. Kainate receptors in the hippocampus. *Eur J Neurosci*. 2014; 39(11): 1835-1844.
- Carunchio I, Mollinari C, Pieri M, Merlo D, Zona C. GAB(A) receptors present higher affinity and modified subunit composition in spinal motor neurons from a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci*. 2008; 28: 1275-1285.
- Castro A, Aguilar J, Andres C, Felix R, Delgado-Lezama R. GABA_A receptors mediate motoneuron tonic inhibition in the turtle spinal cord. *Neuroscience*. 2011; 192: 74-80.
- Chakraborty J, Singh R, Dutta D, Naskar A, Rajamma U, Mohanakumar KP. Quercetin improves behavioral deficiencies, restores astrocytes and microglia, and reduces serotonin metabolism in 3-nitropropionic acid-induced rat model of Huntington's Disease. *CNS Neurosci Ther*. 2014; 20(1): 10-19.
- Charcot JM, Joffroy A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive: avec lésions de la substance grise et des faisceaux antérolatéraux de la moelle épinière. Paris: *Masson*. 1869.
- Chen D, Steele AD, Hutter G, Bruno J, Govindarajan A, Easlson E, Lin SJ, Aguzzi A, Lindquist S, Guarente L. The role of calorie restriction and SIRT1 in prion-mediated neurodegeneration. *Exp Gerontol*. 2008; 43: 1086-1093.
- Chen J, Zhou Y, Mueller-Steiner S, et al. SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling. *J Biol Chem*. 2005; 280(48): 40364-40374.
- Chen XY, Wolpaw JR. Triceps surae motoneuron morphology in the rat: a quantitative light microscopic study. *J Comp Neurol*. 1994; 343: 143-157.
- Cheng Y, Takeuchi H, Sonobe Y, et al. Sirtuin 1 attenuates oxidative stress via upregulation of superoxide dismutase 2 and catalase in astrocytes. *J Neuroimmunol*. 2014; 269(1-2): 38-43.
- Chiò A, Battistini S, Calvo A, Caponnetto C, Conforti FL, Corbo M, Giannini F, Mandrioli J, Mora G, Sabatelli M; ITALSGEN Consortium, Ajmone C, Mastro E, Pain D, Mandich P, Penco S, Restagno G, Zollino M, Surbone A. Genetic counselling in ALS: facts, uncertainties and clinical suggestions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014; 85(5): 478-85.
- Cho SH, Chen JA, Sayed F, et al. SIRT1 deficiency in microglia contributes to cognitive decline in aging and neurodegeneration via epigenetic regulation of IL-1 β . *J Neurosci*. 2015; 35(2): 807-818.

- Choudhary C, Weinert BT, Nishida Y, Verdin E, Mann M. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15(8): 536-50.
- Chua HC, Chebib M. GABA_A receptors and the diversity in their structure and pharmacology. *Adv Pharmacol.* 2017; 79: 1-34.
- 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): 988-997.
- Corona JC, Tapia R. Ca²⁺-permeable AMPA receptors and intracellular Ca²⁺ determine motoneuron vulnerability in rat spinal cord *in vivo*. *Neuropharmacology.* 2007; 52: 1219-1228.
- Corona JC, Tapia R. Calpain inhibition protects spinal motoneurons from the excitotoxic effects of AMPA *in vivo*. *Neurochem Res.* 2008; 33(8): 1428-1434.
- Corona JC, Tovar-y-Romo LB, Tapia R. Glutamate excitotoxicity and therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Ther Targets.* 2007; 11(11): 1415-1428.
- Conn PJ. Physiological roles and therapeutic potential of metabotropic glutamate receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 1003: 12-21.
- Costa LG, Garrick JM, Roquè PJ, Pellacani C. Mechanisms of neuroprotection by quercetin: counteracting oxidative stress and more. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 2986796.
- Cudkovicz M, McKenna-Yasek D, Sapp P, Chin W, Geller B, Hayden D, Horvitz H, Brown R. Epidemiology of SOD1 mutations in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1997; 41: 210-212.
- Dasgupta B, Milbrandt J. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(17): 7217-7222.
- Dejesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron.* 2011;72:245-256.
- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(14):1818-1892.
- Deng HX, Chen W, Hong ST, Boycott KM, Gorrie GH, Siddique N, et al. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature.* 2011; 477(7363): 211-5
- de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J.* 2003; 370(Pt 3): 737-49.
- Diana A, Pillai R, Bongioanni P, O'Keefe AG, Miller RG, Moore DH. Gamma aminobutyric acid (GABA) modulators for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017; 1: CD006049.
- Dong SY, Guo YJ, Feng Y, Cui XX, Kuo SH, Liu T, Wu YC. The epigenetic regulation of HIF-1 α by SIRT1 in MPP(+) treated SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016; 470(2): 453-459.
- Donmez G, Wang D, Cohen DE, Guarente L. SIRT1 suppresses beta-amyloid production by activating the alpha-secretase gene ADAM10. *Cell.* 2010; 142: 320-332.
- Donmez G, Arun A, Chung CY, McLean PJ, Lindquist S, Guarente L. SIRT1 protects against a-synuclein aggregation by activating molecular chaperones. *J Neurosci.* 2012; 32: 124-132.
- Donnelly CJ, Zhang PW, Pham JT, et al. RNA toxicity from the ALS/FTD C9ORF72 expansion is mitigated by antisense intervention. *Neuron.* 2013; 80(2): 415-428.
- Drake RL, Vogl AW, Mitchell AWM, editors. Gray's Anatomy for students, 3rd edition. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2015.
- Ebrahimi A, Schluesener H. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: potentials and pitfalls. *Ageing Res Rev.* 2012; 11(2): 329-345.

- Feldman JL, Dittenhafer-Reed KE, Denu JM. Sirtuin catalysis and regulation. *J Biol Chem.* 2012; 287(51): 42419-42427.
- Friedman LK, Goldstein B, Rafiuddin A, Roblejo P, Friedman S. Lack of resveratrol neuroprotection in developing rats treated with kainic acid. *Neuroscience.* 2013; 230: 39-49.
- Foerster BR, Callaghan BC, Petrou M, Edden RA, Chenevert TL, Feldman EL. Decreased motor cortex γ -aminobutyric acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 2012; 78(20): 1596-1600.
- Fogarty MJ. Driven to decay: excitability and synaptic abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Bull.* 2018; 140: 318-333.
- Furuyama T, Kiyama H, Sato K, Park HT, Maeno H, Takagi H, Tohyama M. Region-specific expression of subunits of ionotropic glutamate receptors (AMPA-type, KA-type and NMDA receptors) in the rat spinal cord with special reference to nociception. *Brain Res Mol Brain Res.* 1993; 18(1-2):141-51.
- Gertz M, Fischer F, Nguyen GT, et al. Ex-527 inhibits Sirtuins by exploiting their unique NAD⁺-dependent deacetylation mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(30): E2772-81.
- Ghasemi M, Brown RH Jr. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018; 8(5): a024125.
- Ghezzi F, Monni L, Corsini S, Rauti R, Nistri A. Propofol protects rat hypoglossal motoneurons in an in vitro model of excitotoxicity by boosting GABAergic inhibition and reducing oxidative stress. *Neuroscience.* 2017; 367: 15-33.
- Giblin W, Skinner ME, Lombard DB. Sirtuins: guardians of mammalian healthspan. *Trends Genet.* 2014; 30(7): 271-86.
- Girbovan C, Plamondon H. Resveratrol downregulates type-1 glutamate transporter expression and microglia activation in the hippocampus following cerebral ischemia reperfusion in rats. *Brain Res.* 2015; 1608: 203-214.
- Greger IH, Watson JF, Cull-Candy SG. Structural and functional architecture of AMPA-type glutamate receptors and their auxiliary proteins. *Neuron.* 2017; 94(4): 713-730.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliando J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science.* 1994; 264(5166): 1772-5.
- Haidet-Phillips AM, Hester ME, Miranda CJ, Meyer K, Braun L, Frakes A, Song S, Likhite S, Murtha MJ, Foust KD, Rao M, Eagle A, Kammesheidt A, Christensen A, Mendell JR, Burghes AH, Kaspar BK. Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat Biotechnol.* 2011; 29(9): 824-828.
- Han S, Choi JR, Soon Shin K, Kang SJ. Resveratrol upregulated heat shock proteins and extended the survival of G93A-SOD1 mice. *Brain Res.* 2012;1483:112-117.
- Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A, Corr EM, Logroscino G, Robberecht W, Shaw PJ, Simmons Z, van den Berg LH. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2017; 3: 17071.
- Hassel B, Dingledine R. 17. Glutamate and glutamate receptors. In Brady ST, Siegel GJ, Albers RW, Price DL, editors. *Basic neurochemistry: principles of molecular, cellular and medical neurobiology.* Oxford: Academic Press; 2012. p. 342-366.
- Heckman CJ, Enoka RM. Motor unit. *Compr Physiol.* 2012;2(4):2629-2682.
- Heckman CJ, Mottram C, Quinlan K, Theiss R, Schuster J. Motoneuron excitability: the importance of neuromodulatory inputs. *Clin Neurophysiol.* 2009;120:2040-2054.
- Heinemann U, Buchheim K, Gabriel S, Kann O, Kovacs R, Schuchmann S. Cell death and metabolic activity during epileptiform discharges and status epilepticus in the hippocampus. *Prog Brain Res.* 2002;135:197-210.
- Heise C, Kayalioglu G. Cytoarchitecture of the spinal cord. In: Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G, editors. *The Spinal Cord, a Christopher and Dana Reeve Foundation text and atlas.* London: Academic Press; 2009. p. 1-7.
- Herskovits AZ, Guarente L. SIRT1 in neurodevelopment and brain senescence. *Neuron.* 2014; 81(3): 471-83.

- Holstege G. Descending motor pathways and the spinal motor system: limbic and non-limbic components. *Prog Brain Res.* 1991;87:307-421.
- Hori YS, Kuno A, Hosoda R, Horio Y. Regulation of FOXOs and p53 by SIRT1 modulators under oxidative stress. *PLoS One.* 2013; 8(9): e73875.
- Ichiyama RM, Broman K, Edgerton VR, Havton LA. Ultrastructural synaptic features differ between alpha- and gamma-motoneurons innervating the tibialis anterior muscle in the rat. *J Comp Neurol.* 2006;499(2):306-15.
- Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol.* 2009;187(6):761-772.
- Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature.* 2000; 403: 795-800.
- Inoue A, Fujimoto D. Enzymatic deacetylation of histone. *Biochem Biophys Res Commun.* 1969; 36: 146-150.
- Ionov ID, Roslavtseva LA. Coadministration of bicuculline and NMDA induces paraplegia in the rat. *Brain Res.* 2012; 1451: 27-33.
- Janssen C, Schmalbach S, Boeselt S, Sarlette A, Dengler R, Petri S. Differential histone deacetylase mRNA expression patterns in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010; 69(6): 573-81.
- Jessell TM, Sanes JR. Patterning the nervous system. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ, editors. Principles of Neural Science. New York: McGraw-Hill; 2013. p. 1165-1186.
- Jeong H, Cohen DE, Cui L, Supinski A, Savas JN, Mazzulli JR, Yates JR 3rd, Bordone L, Guarente L, Krainc D. Sirt1 mediates neuroprotection from mutant huntingtin by activation of the TORC1 and CREB transcriptional pathway. *Nat Med.* 2012; 18: 159-165.
- Jeong JK, Moon MH, Lee YJ, Seol JW, Park SY. Autophagy induced by the class III histone deacetylase Sirt1 prevents prion peptide neurotoxicity. *Neurobiol Aging.* 2013; 34: 146-156.
- Jiang M, Wang J, Fu J, Du L, Jeong H, West T, Xiang L, Peng Q, Hou Z, Cai H, et al. Neuroprotective role of Sirt1 in mammalian models of Huntington's disease through activation of multiple Sirt1 targets. *Nat Med.* 2012; 18: 153-158.
- Joo HY, Yun M, Jeong J, Park ER, Shin HJ, Woo SR, Jung JK, Kim YM, Park JJ, Kim J, Lee KH. SIRT1 deacetylates and stabilizes hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) via direct interactions during hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 462(4): 294-300.
- Kaeberlein M, McDonagh T, Heltweg B, et al. Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J Biol Chem.* 2005; 280(17): 17038-17045.
- Kaeberlein M, McVey M, Guarente L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* 1999; 13: 2570-2580.
- Kanfi Y, Naiman S, Amir G, Peshti V, Zinman G, Nahum L, Bar-Joseph Z, Cohen HY. The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature.* 2012; 483(7388): 218-221.
- Kauppinen A, Suuronen T, Ojala J, Kaarniranta K, Salminen A. Antagonistic crosstalk between NF- κ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cell Signal.* 2013; 25(10): 1939-1948.
- Kaur SJ, McKeown SR, Rashid S. Mutant SOD1 mediated pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Gene.* 2016; 577(2): 109-118.
- Kawabata K, Mukai R, Ishisaka A. Quercetin and related polyphenols: new insights and implications for their bioactivity and bioavailability. *Food Funct.* 2015; 6(5): 1399-1417.
- Kayalioglu G (2009a). The spinal nerves. In: Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G, editors. The Spinal Cord, a Christopher and Dana Reeve Foundation text and atlas. London: Academic Press; 2009. p. 37-56.

- Kayalioglu G (2009b). The vertebral column and spinal meninges. In: Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G, editors. *The Spinal Cord*, a Christopher and Dana Reeve Foundation text and atlas. London: Academic Press; 2009. p. 17-36.
- Kim D, Nguyen MD, Dobbin MM, et al. SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J*. 2007a;26(13):3169-3179.
- Kim EJ, Kho JH, Kang MR, Um SJ. Active regulator of SIRT1 cooperates with SIRT1 and facilitates suppression of p53 activity. *Mol Cell*. 2007b; 28(2): 277-90.
- Kim JE, Chen J, Lou Z. DBC1 is a negative regulator of SIRT1. *Nature*. 2008; 451(7178): 583-586.
- Kim SH, Shanware NP, Bowler MJ, Tibbetts RS. Amyotrophic lateral sclerosis-associated proteins TDP-43 and FUS/TLS function in a common biochemical complex to co-regulate HDAC6 mRNA. *J Biol Chem*. 2010; 285(44): 34097-105.
- King AE, Woodhouse A, Kirkcaldie MTK, Vickers JC. Excitotoxicity in ALS: Overstimulation, or overreaction? *Exp Neurol*. 2016; 275: 162-171.
- Klar AJ, Fogel S, Macleod K. MAR1 – A regulator of the HMa and HMalpha loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1979; 93: 37–50.
- Körner S, Boselt S, Thau N, Rath KJ, Dengler R, Petri S. Differential sirtuin expression patterns in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) postmortem tissue: neuroprotective or neurotoxic properties of sirtuins in ALS? *Neurodegener Dis*. 2013;11(3):141-152.
- Kostera-Pruszczyk A, Niebroj-Dobosz I, Emeryk-Szajewska B, Karwanska A, Rowinska-Marcinska K. Motor unit hyperexcitability in amyotrophic lateral sclerosis vs amino acids acting as neurotransmitters. *Acta Neurol Scand*. 2002; 106: 34–38.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007; 128(4): 693-705.
- Kudo N, Yamada T. N-methyl-D,L-aspartate-induced locomotor activity in a spinal cord-hindlimb muscles preparation of the newborn rat studied *in vitro*. *Neurosci Lett*. 1987; 75: 43–48.
- Lapucci A, Cavone L, Buonvicino D, Felici R, Gerace E, Zwergel C, Valente S, Mai A, Chiarugi A. Effect of Class II HDAC inhibition on glutamate transporter expression and survival in SOD1-ALS mice. *Neurosci Lett*. 2017; 656: 120-125.
- Lasiene J, Yamanaka K. Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res Int*. 2011;2011:718987.
- Lazo-Gomez R, Ramirez-Jarquin UN, Tovar-y-Romo LB, Tapia R. Histone deacetylases and their role in motor neuron degeneration. *Front Cell Neurosci*. 2013; 7: 243.
- Lazo-Gomez R, Tapia R. Motor alterations induced by chronic 4-aminopyridine infusion in the spinal cord *in vivo*: role of glutamate and GABA receptors. *Front Neurosci*. 2016; 10: 200.
- Lee JC, Shin JH, Park BW, et al. Region-specific changes in the immunoreactivity of SIRT1 expression in the central nervous system of SOD1(G93A) transgenic mice as an *in vivo* model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res*. 2012;1433:20-28.
- Leyton L, Hott M, Acuna F, et al. Nutraceutical activators of AMPK/Sirt1 axis inhibit viral production and protect neurons from neurodegenerative events triggered during HSV-1 infection. *Virus Res*. 2015;205:63-72.
- Li, X. SIRT1 and energy metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2013; 45: 51–60.
- Li Y, Xu W, McBurney MW, Longo VD. SirT1 inhibition reduces IGF-1/IRS-2/Ras/ERK1/2 signaling and protects neurons. *Cell Metab*. 2008;8(1):38-48.
- Liang H, Ward WF, Jang YC, Bhattacharya A, Bokov AF, Li Y, et al. PGC-1alpha protects neurons and alters disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Muscle Nerve*. 2011; 44: 947–956.
- Lim MA, Selak MA, Xiang Z, et al. Reduced activity of AMP-activated protein kinase protects against genetic models of motor neuron disease. *J Neurosci*. 2012;32(3):1123-1141.

- Liu D, Gharavi R, Pitta M, Gleichmann M, Mattson MP. Nicotinamide prevents NAD⁺ depletion and protects neurons against excitotoxicity and cerebral ischemia: NAD⁺ consumption by SIRT1 may endanger energetically compromised neurons. *Neuromolecular Med.* 2009;11(1):28-42.
- Liu D, Pitta M, Mattson MP. Preventing NAD(+) depletion protects neurons against excitotoxicity: bioenergetic effects of mild mitochondrial uncoupling and caloric restriction. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1147:275-282.
- Liu P, Zou D, Yi L, et al. Quercetin ameliorates hypobaric hypoxia-induced memory impairment through mitochondrial and neuron function adaptation via the PGC-1 α pathway. *Restor Neurol Neurosci.* 2015;33(2):143-157.
- Logroscino G, Piccininni M, Marin B, Nichols E, Abd-Allah F, Abdelalim A and the GBD 2016 Motor Neuron Disease Collaborators. Global, regional, and national burden of motor neuron diseases 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2018;17(12):1083-1097.
- Lorenzo LE, Barbe A, Portalier P, Fritschy JM, Bras H. Differential expression of GABAA and glycine receptors in ALS-resistant vs. ALS-vulnerable motoneurons: possible implications for selective vulnerability of motoneurons. *Eur J Neurosci.* 2006; 23(12): 3161-3170.
- Malessa S, Leigh PN, Bertel O, Sluga E, Hornykiewicz O. Amyotrophic lateral sclerosis: glutamate dehydrogenase and transmitter amino acids in the spinal cord. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1991; 54(11): 984-988.
- Mancuso R, del Valle J, Modol L, Martinez A, Granado-Serrano AB, Ramirez-Núñez O, Palla's M, Portero-Otin M, Osta R, Navarro X. Resveratrol improves motoneuron function and extends survival in SOD1(G93A) ALS mice. *Neurotherapeutics.* 2014; 11: 419-432.
- Martin LJ. Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of a programmed cell death mechanism. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999;58:459-71.
- Martin LJ, Chang Q. Inhibitory synaptic regulation of motoneurons: a new target of disease mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurobiol.* 2012; 45(1): 30-42.
- Martínez HR, Molina-López JF, Cantú-Martínez L, González-Garza MT, Moreno-Cuevas JE, Couret-Alcaraz P, Treviño SA, Webb-Vargas Y, Caro E, Gil-Valadez A, Santos-Guzmán J, Hernandez-Torre M. Survival and clinical features in Hispanic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph Lateral Scler.* 2011;12(3):199-205.
- Massieu L, Morales-Villagran A, Tapia R. Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an *in vivo* microdialysis study. *J Neurochem.* 1995; 64:2262-2272.
- Massieu L, Tapia R. 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoxaline protects against both AMPA and kainate-induced lesions in rat striatum *in vivo*. *Neuroscience.* 1994; 59(4): 931-938.
- Massieu L, Thedinga KH, McVey M, Fagg GE. A comparative analysis of the neuroprotective properties of competitive and uncompetitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists *in vivo*: implications for the process of excitotoxic degeneration and its therapy. *Neuroscience.* 1993; 55(4): 883-892.
- Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol* 2013; 698: 6-18.
- Meyer H, Bug M, Bremer S. Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nat Cell Biol.* 2012; 14(2): 117-23.
- Michan S, Li Y, Chou MM, et al. SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. *J Neurosci.* 2010; 30(29): 9695-9707.
- Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J.* 2007; 404: 1-13.
- Milanese M, Zappettini S, Onofri F, et al. Abnormal exocytotic release of glutamate in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 2011; 116(6): 1028-1042.
- Miller RG, Moore DHIII, Gelinas DF, Dronsky V, Mendoza M, Barohn RJ, et al. Phase III randomized trial of gabapentin in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 2001; 56, 843-848.
- Min SW, Sohn PD, Cho SH, Swanson RA, Gan L. Sirtuins in neurodegenerative diseases: an update on potential mechanisms. *Front Aging Neurosci.* 2013;5:53.

- Mohan R, Tosolini AP, Morris R. Segmental distribution of the motor neuron columns that supply the rat hindlimb: a muscle/motor neuron tract-tracing analysis targeting the motor end plates. *Neuroscience*. 2015;307:98-108
- Mojsilovic-Petrovic J, Nedelsky N, Boccitto M, Mano I, Georgiades SN, Zhou W, *et al.* FOXO3a is broadly neuroprotective *in vitro* and *in vivo* against insults implicated in motor neuron diseases. *J Neurosci*. 2009; 29: 8236-8247.
- Moldzio R, Radad K, Krewenka C, Kranner B, Duvigneau JC, Rausch WD. Protective effects of resveratrol on glutamate-induced damages in murine brain cultures. *J Neural Transm*. 2013;120(9):1271-1280.
- Morales-Villagran A, Tapia R. Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum *in vivo*. *Neurochem Int*. 1996; 28: 35-40.
- Moshayedi P, Ng G, Kwok JC, *et al.* The relationship between glial cell mechanosensitivity and foreign body reactions in the central nervous system. *Biomaterials*. 2014;35(13):3919-3925.
- Mudò G, Mäkelä J, Di Liberto V, Tselykh TV, Olivieri M, Piepponen P, Eriksson O, Mälkiä A, Bonomo A, Kairisalo M, *et al.* Transgenic expression and activation of PGC-1 α protect dopaminergic neurons in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci*. 2012; 69: 1153-1165.
- Nagańska E, Matyja E, Taraszewska A, Rafałowska J. Protective effect of valproic acid on cultured motor neurons under glutamate excitotoxic conditions. Ultrastructural study. *Folia Neuropathol*. 2015; 53(4): 309-316.
- Nakayama M, Aihara M, Chen YN, Araie M, Tomita-Yokotani K, Iwashina T. Neuroprotective effects of flavonoids on hypoxia-, glutamate-, and oxidative stress-induced retinal ganglion cell death. *Mol Vis*. 2011;17:1784-1793.
- Napper AD, Hixon J, McDonagh T, Keavey K, Pons JF, Barker J, Yau WT, Amouzegh P, Flegg A, Hamelin E, Thomas RJ, Kates M, Jones S, Navia MA, Saunders J, DiStefano PS, Curtis R. Discovery of indoles as potent and selective inhibitors of the deacetylase SIRT1. *J Med Chem*. 2005; 48: 8045-8054.
- Netzahualcoyotzi C, Tapia R. Degeneration of spinal motor neurons by chronic AMPA-induced excitotoxicity *in vivo* and protection by energy substrates. *Acta Neuropathol Commun*. 2015; 3: 27.
- Neumann M. Molecular neuropathology of TDP-43 proteinopathies. *Intl J Mol Sci*. 2009; 10: 232-246.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2006; 314(5796): 130-133.
- Ng F, Wijaya L, Tang BL. SIRT1 in the brain-connections with aging-associated disorders and lifespan. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:64.
- Nimmagadda VK, Bever CT, Vattikunta NR, Talat S, Ahmad V, Nagalla NK, Trisler D, Judge SI, Royal W 3rd, Chandrasekaran K, *et al.* Overexpression of SIRT1 protein in neurons protects against experimental autoimmune encephalomyelitis through activation of multiple SIRT1 targets. *J Immunol*. 2013; 190: 4595-4607.
- Offord J, Isom LL. Drugging the undruggable: gabapentin, pregabalin and the calcium channel $\alpha_2\delta$ subunit. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2015; 51(4): 246-256.
- Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*. 1969; 164(3880): 719-21.
- Olsen RW, Li GD. 18. GABA. In Brady ST, Siegel GJ, Albers RW, Price DL, editors. Basic neurochemistry: principles of molecular, cellular and medical neurobiology. Oxford: Academic Press; 2012. p. 367-376.
- Okamoto K, Hirai S, Amari M, *et al.* Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis immunostained with rabbit anti-cystatin C serum. *Neurosci Lett*. 1993;162:125-8.

- Pallos J, Bodai L, Lukacsovich T, Purcell JM, Steffan JS, Thompson LM, Marsh JL. Inhibition of specific HDACs and sirtuins suppresses pathogenesis in a *Drosophila* model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 2008; 17: 3767–3775.
- Pandareesh MD, Mythri RB, Srinivas Bharath MM. Bioavailability of dietary polyphenols: Factors contributing to their clinical application in CNS diseases. *Neurochem Int.* 2015;89:198-208.
- Pandey AK, Hazari PP, Patnaik R, Mishra AK. The role of ASIC1a in neuroprotection elicited by quercetin in focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 2011;1383:289-299.
- 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: 2006–2014.
- 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; 101:547–561.
- Petralia RS, Wang YX, Mayat E, Wenthold RJ. Glutamate receptor subunit 2-selective antibody shows a differential distribution of calcium-impermeable AMPA receptors among populations of neurons. *J Comp Neurol.* 1997; 385(3): 456-76.
- Petri S, Kollewe K, Grothe C, Hori A, Dengler R, Bufler J, Krampfl K. GABA(A)-receptor mRNA expression in the prefrontal and temporal cortex of ALS patients. *J Neurol Sci.* 2006; 250: 124–132.
- Piao YS, Wakabayashi K, Kakita A, *et al.* Neuropathology with clinical correlations of sporadic amyotrophic lateral sclerosis: 102 autopsy cases examined between 1962 and 2000. *Brain Pathol.* 2003; 13: 10–22.
- Pinard A, Seddik R, Bettler B. GABA_B receptors: physiological functions and mechanisms of diversity. *Adv Pharmacol.* 2010; 58: 231-55.
- Plaitakis A, Constantakakis E, Smith J. The neuroexcitotoxic amino acids glutamate and aspartate are altered in the spinal cord and brain in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1998; 24: 446–449.
- Quincozes-Santos A, Bobermin LD, Tramontina AC, *et al.* Oxidative stress mediated by NMDA, AMPA/KA channels in acute hippocampal slices: neuroprotective effect of resveratrol. *Toxicol Vitro.* 2014; 28(4): 544-551.
- Rafalski VA, Ho PP, Brett JO, Ucar D, Dugas JC, Pollina EA, Chow LM, Ibrahim A, Baker SJ, Barres BA, *et al.* Expansion of oligo- dendrocyte progenitor cells following SIRT1 inactivation in the adult brain. *Nat Cell Biol.* 2013; 15: 614–624.
- Rall W, Burke RE, Holmes WR, Jack JJ, Redman SJ, Segev I. Matching dendritic neuron models to experimental data. *Physiol Rev.* 1992;72(4 Suppl):S159-186.
- Ramirez-Jarquín UN, Lazo-Gomez R, Tovar-y-Romo LB, Tapia R. Spinal inhibitory circuits and their role in motor neuron degeneration. *Neuropharmacology.* 2014; 82: 101–107.
- Ramirez-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.
- Reilmann R, Squitieri F, Priller J, Saft C, Mariotti C, Suessmuth SD, Nemeth AH, Tabrizi SJ, Quarrell O, *et al.* Safety and tolerability of selisistat for the treatment of Huntington's disease: Results from a randomised, double-blind, placebo-controlled phase II trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2014; 85: A102.
- Rekling JC, Funk GD, Bayliss DA, Dong XW, Feldman JL. Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiol Rev.* 2000; 80(2):767-852.
- Renton AE, Majounie E, Waite A, Simon-Sanchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L, *et al.* A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron.* 2011; 72: 257–268.
- Rexed B. A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol.* 1954; 100: 297–379.
- Revollo JR, Li X. The ways and means that fine tune Sirt1 activity. *Trends Biochem Sci.* 2013; 38(3): 160-167.

- Robberecht W, Philips T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci*. 2013; 14(4):248-64.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1993; 362: 59-62.
- Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*. 1992 ;326(22): 1464-8.
- Rudolph U, Knoflach F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABA_A receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov*. 2011; 10: 685-697.
- Saberi S, Stauffer JE, Schulte DJ, Ravits J. Neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis and its variants. *Neurol Clin*. 2015;33(4):855-76.
- Said Ahmed M, Hung WY, Zu JS, Hockberger P, Siddique T. Increased reactive oxygen species in familial amyotrophic lateral sclerosis with mutations in SOD1. *J Neurol Sci*. 2000;176(2):88-94.
- Sadler TW. Embryology of neural tube development. *Am J Med Genet - Semin Med Genet*. 2005. 135C(1):2-8.
- Santa-Cruz LD, Guerrero-Castillo S, Uribe-Carvajal S, Tapia R. Mitochondrial dysfunction during the early stages of excitotoxic spinal motor neuron degeneration *in vivo*. *ACS Chem Neurosci*. 2016; 7(7): 886-896.
- 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, Komori T, Iwata M. Excitatory amino acid transporter 1 and 2 immunoreactivity in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2000; 100: 138-144.
- Schiedel M, Robaa D, Rumpf T, Sippl W, Jung M. The current state of NAD⁺-dependent histone deacetylases (sirtuins) as novel therapeutic targets. *Med Res Rev*. 2018; 38(1): 147-200.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-682.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671-675.
- Schuchmann S, Buchheim K, Meierkord H, Heinemann U. A relative energy failure is associated with low-Mg²⁺ but not with 4-aminopyridine induced seizure-like events in entorhinal cortex. *J Neurophysiol*. 1999;81(1):399-403.
- Sen I, Joshi DC, Joshi PG, Joshi NB. NMDA and non-NMDA receptor-mediated differential Ca²⁺ load and greater vulnerability of motor neurons in spinal cord cultures. *Neurochem Int*. 2008; 52(1-2): 247-55.
- Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014; 6(4): a018713.
- Sidorova-Darmos E, Wither RG, Shulyakova N, et al. Differential expression of sirtuin family members in the developing, adult, and aged rat brain. *Front Aging Neurosci*. 2014;6(DEC):333.
- Silva B, Oliveira PJ, Dias A, Malva JO. Quercetin, kaempferol and biapigenin from *Hypericum perforatum* are neuroprotective against excitotoxic insults. *Neurotox Res*. 2008;13(3-4):265-279.
- Song L, Chen L, Zhang X, Li J, Le W. Resveratrol ameliorates motor neuron degeneration and improves survival in SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:483501.
- 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): 73-78.
- Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2008;319:1668-1672.

- Staats KA, van den Bosch L. (2014) Excitotoxicity and Amyotrophic Lateral Sclerosis. In: Kostrzewa R. (eds) Handbook of Neurotoxicity. Springer, New York, NY
- Stoffel W, Korner R, Wachtmann D, Keller BU. Functional analysis of glutamate transporters in excitatory synaptic transmission of GLAST1 and GLAST1/EAAC1 deficient mice. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004; 128: 170-181.
- Sun H, Kawahara Y, Ito K, Kanazawa I, Kwak S. Slow and selective death of spinal motor neurons *in vivo* by intrathecal infusion of kainic acid: implications for AMPA receptor-mediated excitotoxicity in ALS. *J Neurochem*. 2006; 98(3): 782-791.
- Süssmuth SD, Haider S, Landwehrmeyer GB, Farmer R, Frost C, Tripepi G, Andersen CA, Di Bacco M, *et al*. An exploratory double-blind, randomized clinical trial with selisistat, a SirT1 inhibitor, in patients with Huntington's disease. *Br J Clin Pharmacol*. 2015; 79: 465-476.
- Swash M, Desai J. Motor neuron disease: classification and nomenclature. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2000; 1(2): 105-12.
- Szabo I, Zoratti M. Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiol Rev*. 2014; 94: 519-608.
- Takuma H, Kwak S, Yoshizawa T, Kanazawa I. 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. *Ann Neurol*. 1999; 46: 806-815.
- Tang BL. Resveratrol is neuroprotective because it is not a direct activator of Sirt1-A hypothesis. *Brain Res Bull*. 2010; 81(4-5): 359-361.
- Tang BL. Could Sirtuin Activities Modify ALS Onset and Progression? *Cell Mol Neurobiol*. 2017; 37(7): 1147-1160.
- Taylor JP, Brown RH Jr, Cleveland DW. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*. 2016; 539(7628):197-206.
- Ternaux JP, Portalier P. Effect of quercetine on survival and morphological properties of cultured embryonic rat spinal motoneurons. *Neurosci Lett*. 2002;332(1):33-36.
- Thau N, Knippenberg S, Korner S, Rath KJ, Dengler R, Petri S. Decreased mRNA expression of PGC-1alpha and PGC-1alpha-regulated factors in the SOD1G93A ALS mouse model and in human sporadic ALS. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012; 71: 1064-1074.
- Tiryaki E, Horak HA. ALS and other motor neuron diseases. *Contin (Minneapolis)*. 2014;20(5 Peripheral Nervous System Disorders):1185-1207.
- Tölle TR, Berthele A, Zieglgänsberger W, Seeburg PH, Wisden W. The differential expression of 16 NMDA and non-NMDA receptor subunits in the rat spinal cord and in periaqueductal gray. *J Neurosci*. 1993; 13(12): 5009-5028.
- Tovar-y-Romo LB, Santa-Cruz LD, Tapia R. Experimental models for the study of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener*. 2009a; 4: 31.
- 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*. 2009b; 54: 186-191.
- 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).
- Tovar-y-Romo LB, Tapia R. Cerebral neurons of transgenic ALS mice are vulnerable to glutamate release stimulation but not to increased extracellular glutamate due to transport blockade. *Exp Neurol*. 2006; 199:281-290.
- 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):913-922.
- Turkin VV, O'Neill D, Jung R, Larkov A, Hamm TM. Characteristics and organization of discharge properties in rat hindlimb motoneurons. *J Neurophysiol*. 2010;104(3):1549-1565.
- Umehiya M, Berger AJ. Properties and function of low- and high-voltage-activated Ca²⁺ channels in hypoglossal motoneurons. *J Neurosci*. 1994;14:5652-5660.

- Upadhyay S, Dixit M. Role of Polyphenols and Other Phytochemicals on Molecular Signaling. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:504253.
- Uzunalli G, Bora-Tatar G, Dayangac-Erden D, Erdem-Yurter H. Effects of flavonoid quercetin on survival of motor neuron gene expression. *Cell Biol Int*. 2015;39(3):350-354.
- Valle C, Salvatori I, Gerbino V, et al. Tissue-specific deregulation of selected HDACs characterizes ALS progression in mouse models: pharmacological characterization of SIRT1 and SIRT2 pathways. *Cell Death Dis*. 2014; 5: e1296.
- Van den Berg-Vos RM, Van den Berg LH, Visser J, de Visser M, Franssen H, Wokke JH. The spectrum of lower motor neuron syndromes. *J Neurol*. 2003; 250(11): 1279-1292.
- Vaquero A, Scher M, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol Cell*. 2004; 16(1): 93-105.
- 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: 1055-1066.
- Vucic S, Rothstein JD, Kiernan MC. Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: Insights from pathophysiological studies. *Trends Neurosci*. 2014; 37(8): 433-442.
- Vyklicky V, Korinek M, Smejkalova T, Balik A, Krausova B, Kaniakova M, Lichnerova K, Cerny J, Krusek J, Dittert I, Horak M, Vyklicky L. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol Res*. 2014; 63 Suppl 1: S191-S203.
- Wang J, Zhang Y, Tang L, Zhang N, Fan D. Protective effects of resveratrol through the up-regulation of SIRT1 expression in the mutant hSOD1-G93A-bearing motor neuron-like cell culture model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*. 2011; 503(3): 250-255.
- Wang Q, Yu S, Simonyi A, Rottinghaus G, Sun GY, Sun AY. Resveratrol protects against neurotoxicity induced by kainic acid. *Neurochem Res*. 2004; 29(11): 2105-2112.
- Wang S, Yang X, Lin Y, et al. Cellular NAD depletion and decline of SIRT1 activity play critical roles in PARP-1-mediated acute epileptic neuronal death in vitro. *Brain Res*. 2013; 1535: 14-23.
- Watanabe S, Ageta-Ishihara N, Nagatsu S, et al. SIRT1 overexpression ameliorates a mouse model of SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis via HSF1/HSP70i chaperone system. *Mol Brain*. 2014; 7: 62.
- Watson C, Kayalioglu G. The organization of the spinal cord. In: Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G, editors. *The Spinal Cord, a Christopher and Dana Reeve Foundation text and atlas*. London: Academic Press; 2009. p. 1-7.
- Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G, Heise C. Atlas of the Rat Spinal Cord. In: Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G, editors. *The Spinal Cord, a Christopher and Dana Reeve Foundation text and atlas*. London: Academic Press; 2009. p. 238-306.
- Westenbroek RE, Hoskins L, Hoskins WA. Localization of Ca²⁺ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J Neurosci*. 1998; 18: 6319-6330.
- Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci*. 2008; 11(3): 251-253.
- Yang EJ, Kim GS, Kim JA, Song KS. Protective effects of onion-derived quercetin on glutamate-mediated hippocampal neuronal cell death. *Pharmacogn Mag*. 2013; 9(36): 302-308.
- Yoo YE, Ko CP. Treatment with trichostatin A initiated after disease onset delays disease progression and increases survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*. 2011; 231(1): 147-59.
- Yuan J, Pu M, Zhang Z, Lou Z. Histone H3-K56 acetylation is important for genomic stability in mammals. *Cell Cycle*. 2009; 8(11): 1747-1753.

- Zakhary SM, Ayubcha D, Dileo JN, *et al.* Distribution analysis of deacetylase SIRT1 in rodent and human nervous systems. *Anat Rec.* 2010; 293(6): 1024-1032.
- Zhang LN, Hao L, Wang HY, *et al.* Neuroprotective effect of resveratrol against glutamate-induced excitotoxicity. *Adv Clin Exp Med.* 2015; 24(1): 161-165.
- Zhao W, Varghese M, Yemul S, Pan Y, Cheng A, Marano P, *et al.* Peroxisome proliferator activator receptor gamma coactivator-1alpha (PGC- 1alpha) improves motor performance and survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Neurodegener.* 2011; 6: 51.
- Zhou M, Ottenberg G, Sferrazza GF, *et al.* Neuronal death induced by misfolded prion protein is due to NAD⁺ depletion and can be relieved *in vitro* and *in vivo* by NAD⁺ replenishment. *Brain.* 2015; 138(Pt 4): 992-1008.
- Zu T, Liu Y, Bañez-Coronel M, Reid T, Pletnikova O, Lewis J, Miller TM, Harms MB, Falchook AE, Subramony SH, Ostrow LW, Rothstein JD, Troncoso JC, Ranum LP. RAN proteins and RNA foci from antisense transcripts in C9ORF72 ALS and frontotemporal dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(51): E4968-4977.

13. ANEXOS

13.1. ARTÍCULO DE REVISIÓN

Lazo-Gómez R, Ramírez-Jarquín UN, Tovar-y-Romo LB, Tapia R. Histone deacetylases and their role in motor neuron degeneration. *Front Cell Neurosci* (2013), Dec, 5; 7:243. doi: 10.3389/fncel.2013.00243.

13.2. ARTÍCULO ORIGINAL

Lazo-Gómez R and Tapia R. Motor alterations induced by chronic 4-aminopyridine infusion in the spinal cord *in vivo*: role of glutamate and GABA receptors. *Front Neurosci* (2016) May 9; 10:200. doi: 10.3389/fnins.2016.00200.

13.3. ARTÍCULO ORIGINAL

Lazo-Gómez R and Tapia R. Quercetin prevents spinal motor neuron degeneration induced by chronic excitotoxic stimulus by a sirtuin 1-dependent mechanism. *Transl Neurodegener* (2017) Nov 21;6:31. doi: 10.1186/s40035-017-0102-8.



Histone deacetylases and their role in motor neuron degeneration

Rafael Lazo-Gómez, Uri N. Ramírez-Jarquín, Luis B. Tovar-y-Romo and Ricardo Tapia*

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, D. F., México

Edited by:

Manoj K. Jaiswal, Center for Neuroscience and Regenerative Medicine, USA

Reviewed by:

Thomas G. Oertner, University of Hamburg, Germany
John Weiss, University of California, Irvine, USA

*Correspondence:

Ricardo Tapia, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, D. F., México
e-mail: rtapia@ifc.unam.mx

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease, characterized by the progressive loss of motor neurons. The cause of this selective neuronal death is unknown, but transcriptional dysregulation is recently emerging as an important factor. The physical substrate for the regulation of the transcriptional process is chromatin, a complex assembly of histones and DNA. Histones are subject to several post-translational modifications, like acetylation, that are a component of the transcriptional regulation process. Histone acetylation and deacetylation is performed by a group of enzymes (histone acetyltransferases (HATs) and deacetylases, respectively) whose modulation can alter the transcriptional state of many regions of the genome, and thus may be an important target in diseases that share this pathogenic process, as is the case for ALS. This review will discuss the present evidence of transcriptional dysregulation in ALS, the role of histone deacetylases (HDACs) in disease pathogenesis, and the novel pharmacologic strategies that are being comprehensively studied to prevent motor neuron death, with focus on sirtuins (SIRT) and their effectors.

Keywords: amyotrophic lateral sclerosis, neurodegeneration, neuroprotection, transcription dysregulation, histone deacetylases, sirtuins

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by the death of upper and lower motor neurons. There are two type of ALS based on the presence of an identified mutation as a cause of the disease. The familial type (fALS) is most commonly caused by mutations in the superoxide dismutase type 1 (SOD1) gene, for which there is a widely studied transgenic mouse model; however fALS represents only about 10% of cases. The most common type of ALS is called sporadic (sALS), but because there are no identified etiologic factors, validated experimental models lack for this type of the disease. Nevertheless, disease progression and pathologic characteristics in both, fALS and sALS, are similar. Also, in both types of the disease, motor neuron degeneration has been associated with the same mechanisms, such as glutamate-mediated excitotoxicity, inflammatory events, axonal transport deficits, oxidative stress and mitochondrial dysfunction (for recent reviews see Corona et al., 2007; Santa-Cruz et al., 2012).

Besides these factors, a novel mechanism that may be involved in motor neuron death and other neurodegenerative diseases is transcriptional dysfunction, which consists of aberrations of the molecular machinery that regulates gene expression, especially at the transcriptional levels through the manipulation of epigenetic marks (Robberecht and Philips, 2013). These marks are covalent modifications of the chromatin components, DNA and histone proteins, carried out by several key enzymes that finely modulate the status of these marks. Among these marks, histone acetylation has been characterized as an important mechanism

in the regulation of the opening of chromatin configuration leading to increased transcription (Kouzarides, 2007). The status of histone acetylation strongly depends on the activity of histone deacetylases (HDACs), a widely conserved family of enzymes that catalyze the removal of acetyl groups from histones and from other proteins. This family, which includes sirtuins (SIRT), has been shown to be important for several cellular processes, such as cell death and stress responses, which makes them attractive for the study of their pathogenic role and as potential therapeutic targets (Haigis and Sinclair, 2010).

This paper will review, first the evidence of transcriptional dysregulation in ALS, then the role of the different members of the HDACs family in disease pathogeny and as therapeutic candidates, and finally the role of SIRT and their effectors in ALS.

RELEVANCE OF HISTONE ACETYLATION IN GENE EXPRESSION

Protein acetylation is an important postranslational modification that regulates numerous cellular functions, such as microtubule dynamics and intracellular transport (Hubbert et al., 2002), development (Bhaumik et al., 2007), metabolism (Cantó et al., 2009), and transcriptional regulation through chromatin remodeling (Kouzarides, 2007).

In eukaryotic cells, including neurons, the genome is organized through the association of DNA with protein complexes, an assembly called chromatin. The most abundant proteins are histones, and these proteins assemble themselves into octamers, composed of two copies of the histones types H2A, H2B, H3 and H4. Around the octamer, ~147 bp of DNA is wrapped,

forming the basic unit of chromatin, the nucleosome. Nucleosomes further organize themselves in increasingly complex structures, all of which are subject to modulation, by changing the accessibility of the regulatory regions of DNA (such as promoters, enhancers, silencers or insulators) to the transcriptional machinery, ultimately affecting gene expression (Zhou et al., 2011). This regulation can be accomplished through covalent modifications of the chromatin components: in the DNA it occurs through cytosine methylation and hydroxymethylation, and in the histones through methylation, ubiquitinylation, sumoylation, phosphorylation and acetylation of selected aminoacid residues (Kouzarides, 2007). In general terms, gene expression is directly proportional the level of histone acetylation; because of this, the regulation of this posttranslational modification is essential for gene homeostasis. Such regulation depends on two groups of enzymes: histone acetyltransferases (HATs) and HDACs, and drastic alterations to this control of gene expression can be deleterious, as has been proven in various tumor cell models (Frew et al., 2009). Therefore, the upregulation of the expression of a given gene can be accomplished by stimulating the activity of HATs or by inhibiting the activity of HDACs (Kazantsev and Thompson, 2008). Currently, research on HATs and on their possible protective effects on neurodegenerative processes is scarce and no specific activators are known, whereas information on HDACs has become the subject of many studies (Selvi et al., 2010). Although histones are not the only target of these enzymes, and in some instances they are not a target at all, the name HDACs is preserved for historical reasons. They constitute a family integrated in a complex network of intracellular signaling participating through acetylation/deacetylation reactions, with numerous protein substrates and multiple physiological consequences depending on the protein involved (de Ruijter et al., 2003; Kazantsev and Thompson, 2008).

EVIDENCE OF TRANSCRIPTIONAL DYSREGULATION IN ALS

There is evidence that transcriptional dysregulation could contribute to, and possibly be the cause of, some neurodegenerative disorders. This was first proposed for Huntington's disease (Cha, 2000) and relevant findings have been encountered in experimental in vitro and in vivo models of Alzheimer's (Robakis, 2003) and Parkinson's diseases (Yacoubian et al., 2008). In the case of ALS, there is also evidence of transcriptional dysregulation and alterations in the transcriptome in both the sporadic (Figueroa-Romero et al., 2012) and the familial (Kirby et al., 2005) types of the disease. Although the mechanisms and causal relationships have yet to be elucidated, it has been proposed that neuronal protein inclusions, such as those formed by mutated SOD1 or TDP43 (43-kDa transactivator response region (TAR) DNA-binding domain protein) which have been found in ALS and in frontotemporal dementia, could cause their toxicity by acting as surface attractants that sequester vital components of the transcriptional machinery, as was first proved for huntingtin (Cha, 2000). For example, in a screening study to identify targets that disrupt SOD1 aggregates in cultured cells, HDAC inhibition was shown to prevent aggregate formation (Corcoran et al., 2004).

Transcription might also be altered indirectly by modifications of other regulatory components of the transcriptional process, such as HDAC activity. For example, in a *Drosophila* model of polyglutamine neurodegeneration, it was shown that the upregulation of HDACs can ameliorate neuronal death due to a selective transcriptional repression of the CGG repeat-containing gene (Todd et al., 2010). Also, HDAC inhibition is protective for cultured motor neurons against excitotoxicity, a mechanism known to be involved in ALS pathophysiology, due to their ability to modulate gene expression (Kanai et al., 2004). Hence, although the role of transcriptional dysfunction in neurodegenerative diseases is still under study, there is increasing evidence for a role of HDACs in the neurodegenerative processes through the modulation of transcriptional machinery.

HISTONE DEACETYLASES: ROLE OF CLASSES I AND II IN MOTOR NEURON DEGENERATION

Based on structural, localization and functional criteria, HDAC superfamily is composed of five classes. First, in the next paragraphs, we will focus on the "typical" HDACs (11 enzymes, classified in classes I, IIa, IIb and IV), their distribution and the evidence of their role in ALS. The role of SIRT (seven enzymes that constitute class III or "atypical" HDACs) will be addressed later.

Class I and II HDACs are Zn²⁺-dependent enzymes. Class I include HDAC1, HDAC2, HDAC3 and HDAC8, which are localized in the nucleus and ubiquitously expressed in mammalian tissues (except HDAC8, which is muscle-specific). Broadly speaking, these enzymes are involved in the regulation of gene-specific transcription through the formation of stable transcriptional complexes (de Ruijter et al., 2003). Of these, HDAC2 and HDAC3 seem to have a more important role in the physiology of the central nervous system. Broide et al. (2007) described the distribution of 11 HDACs mRNAs in 50 screened areas of the rat brain, using high-resolution in situ hybridization; HDAC2 and HDAC3 were widely expressed in all areas, especially those of the limbic system (amygdala, piriform cortex, olfactory bulb and hippocampus) and in the granule cell layer of cerebellum, and at the cellular level were found in neurons and oligodendrocytes. In a recent report, a similar distribution of HDAC2 was found in the mouse brain, as well as a moderate expression in primary and secondary motor cortices, and Rexed's laminae 4–9 of the cervical spinal cord (where motor neurons reside). Again, HDAC2 was noted only in neurons and oligodendrocytes, within the nucleus (Yao et al., 2013). Due to their ubiquitous expression in brain and spinal cord, these HDACs have also been implicated in ALS. Janssen et al. (2010) found in ALS patients that HDAC2 expression was upregulated in motor cortex (in layers III–V, where upper motor neuron are located) and in spinal cord grey matter, particularly in the nuclei of motor neurons; they interpreted this result as a protective role of HDAC2 in ALS pathogenesis, although the mechanisms of this effect were not detailed. Regarding this issue, in an in vitro study Kernochan et al. (2005) reported that HDAC inhibition increased promoter activity of the survival motor neuron 2 gene, and this was associated with HDAC2 levels.

Class IIa –HDACs 4, 5, 7 and 9– shuffle between the nucleus and the cytoplasm, and their substrates have not been defined; they have histone deacetylase activity only by interacting with HDAC3 (de Ruijter et al., 2003). HDAC4 and 5 expressions were high in all screened areas, and their locations mimic that of class I HDACs (Broide et al., 2007).

Class IIb is composed of HDAC6 and HDAC10. Again, HDAC10 substrates have not been defined, but it is known that it associates with HDAC3 (de Ruijter et al., 2003). HDAC6 is an unusual enzyme, in the sense that it has two catalytic domains and functions in the cytoplasm where it deacetylates α -tubulin and alters microtubule stability (Hubbert et al., 2002). Furthermore, inhibition of this enzyme stimulates autophagy and the proteasome system in a *Drosophila* model of spinal muscular atrophy (a neurodegenerative disease of spinal motor neurons) resulting in increased survival (Pandey et al., 2007). In the rat brain, its expression is low (Broide et al., 2007) and no changes were noted in ALS patients (Janssen et al., 2010). Nevertheless, evidence of the role of HDAC6 in ALS is emerging. In a recent work it was found that TDP43 and fused in sarcoma/translated in liposarcoma (FUS/TLS), which are proteins that regulate RNA processing and have been found to be mutated in some cases of ALS, interact with each other forming a ribonucleoprotein complex that regulates the expression of HDAC6 through its mRNA stability (Kim et al., 2010).

Class IV HDAC only member, HDAC11, is localized in the cell nucleus and is structurally different from the other classes (Kazantsev and Thompson, 2008). Although its functions are poorly understood, recent reports indicate that this HDAC is abundantly and almost exclusively expressed in the mammalian nervous system, within oligodendrocytes (Liu et al., 2008), and also plays an important role in the maturation of this cell type (Liu et al., 2009b). In other study in the rat brain, HDAC11 expression was found to be ubiquitously distributed, in both neurons and oligodendrocytes; in fact, this HDAC displayed the highest levels of expression of all HDACs (Broide et al., 2007). In nervous tissue of ALS patients, including the ventral horn of the spinal cord, the nucleus and the cytoplasm of motor neurons showed decreased HDAC11 mRNA levels (Janssen et al., 2010).

PROTECTIVE EFFECTS OF HDAC INHIBITION

Chen et al. (2012) addressed the role of class I and II HDACs in an experimental model of acute stroke in rodents. There was progressive decline of mRNA levels of HDACs 1, 2, 5 and 9 in cerebral cortex, while HDACs 3, 6 and 11 mRNA levels were transiently increased. In addition, in an in vitro model of glucose-oxygen deprivation, they reported that selective inhibition of HDAC3 and HDAC6 promoted neuronal survival.

Currently there is an ample battery of small-molecule HDACs inhibitors, that were initially developed to halt cell proliferation in cancer experimental models; HDACs inhibitors are classified as hydroxamate-based (vorinostat, valproic acid (VPA), sodium butyrate, trichostatin A, 4-phenyl butyrate, MC1568 –class II selective–, and tubucin –HDAC6 specific–), and benzamide-based (MS275, compound 106). Their potencies and selectivities vary, but most of them can be considered pan-HDACs inhibitors (Kazantsev and Thompson, 2008).

Several of these compounds have been studied in the transgenic SOD1 mouse model. Trichostatin A induced a modest improvement in motor function and survival as well as protection against motor neuron death, axonal degeneration, muscle atrophy and neuromuscular junction denervation; these effects were attributed to reduced gliosis and upregulation of the glutamate transporter (GLT-1) in the spinal cord (Yoo and Ko, 2011).

VPA is a drug currently in clinical use for other neurological disorders (such as epilepsy and bipolar disorder) due to its numerous mechanisms of action, including HDAC inhibition (Monti et al., 2009). VPA was tested in vivo in the transgenic ALS SOD1 mice, where it did not improve survival or motor performance, but it did improve the acetylation status in the spinal cord through the restoration of the cAMP response element binding protein (CREB) levels in motor neurons and slightly prevented motor neuron death (Rouaux et al., 2007). VPA has already been tested in ALS patients in one clinical trial, showing no benefits in survival or in disease progression in doses commonly used to treat epilepsy (Piepers et al., 2009).

Sodium phenylbutyrate (SPB), another pan-HDAC inhibitor, was shown to extend survival and motor performance in the transgenic ALS SOD1 animal model, and these effects were attributed to an upregulation in the expression of nuclear factor κ B (NF- κ B), the active form of the inhibitory subunit of NF- κ B (i- κ B) and of beta cell lymphoma 2 (bcl-2) proteins, all involved in survival and stress responses (Ryu et al., 2005). SPB efficacy has been tested also in combinations with other agents with different mechanisms of action, in the same experimental model. For example, the combination of SPB with riluzole potentiated the beneficial effects of SPB on survival and motor performance, although the authors did not address the possible mechanisms (Del Signore et al., 2009). SPB has also been tested in combination with an antioxidant agent (AEOL 10150), where it was found that this combination extended survival more than either treatment alone (Petri et al., 2006). Finally, it is worth to emphasize that SPB has already been tested in a phase 2 clinical trial, where its effects on histone acetylation status, safety and tolerability were addressed; no toxic effects were noted, and significant increases were observed in the blood histone acetylation status, but the therapeutic efficacy of such treatment was not studied (Cudkowicz et al., 2009).

HISTONE DEACETYLASES: ROLE OF SIRTUINS IN MOTOR NEURON DEGENERATION

Class III HDACs, also called SIRT, are the most divergent class from the rest of the family. This class includes seven members (SIRT1 to SIRT7) with various cellular localizations and preferred enzymatic targets, but what makes unique this class is the dependence of nicotine adenine dinucleotide (NAD⁺) to perform their catalytic deacetylation and mono-ADP-ribosyl transferase activities (Michan and Sinclair, 2007). SIRT1, SIRT2, SIRT3 and SIRT5 have predominant histone deacetylase activity (Haigis and Sinclair, 2010). SIRT1, SIRT6 and SIRT7 are located in the nucleus. SIRT1 has a preference for euchromatin and can be shuttled to the cytoplasm, depending on the cell type and the developmental stage (Tanno et al., 2007). SIRT6 tends to associate with heterochromatin and SIRT7 is located in the nucleolus.

SIRT2 resides mostly in the cytoplasm, having an important role in regulation cytoskeletal dynamics. SIRT3, SIRT4 and SIRT5 are mitochondrial (Michan and Sinclair, 2007).

SIRT are named after the silent information regulator 2 (*sir2*) gene in yeast. When overexpressed, the product of this gene extended the lifespan of budding yeast by repressing genomic instability (Kaeberlein et al., 1999). After that discovery, it was learned that SIR2-like genes or SIRT are found in most organisms, where they regulate basic vital functions. In mammals, sirtuin activation or overexpression do not extend lifespan, but appear to be involved in the benefits of calorie restriction, are responsive to environmental stimuli (e.g., daylight and cell stress), and play important roles in numerous human diseases, such as cancer, diabetes, cardiovascular disease and neurodegeneration (Haigis and Sinclair, 2010).

The catalytic deacetylase activity of SIRT is performed on histones and on other proteins, and this ability place SIRT in a privileged position to exert their actions on the genome through direct and indirect pathways. Among the non-histone protein substrates, the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC1- α ; Cantó and Auwerx, 2009) and the forkhead box O3a (FoxO3a) transcription factor (Zhao et al., 2011b) are two of the most studied, and their relation to ALS will be discussed below. Also, SIRT play an important role as cellular energy sensors (Smith et al., 2000), due to their dependence on NAD⁺ as a substrate (Imai et al., 2000); in humans, SIRT1-3 and 5 have shown in vitro NAD⁺-dependent deacetylating activity (Smith et al., 2000). Therefore, SIRT provide a connection between cellular energy states and transcriptional control (Li, 2013).

SIRT have a widespread distribution in the mammalian tissues, including the nervous system. In the mouse, rat and human CNS, SIRT1 mRNA localization was found to be ubiquitous and prominent in various tissues (such as all regions of spinal cord, hippocampus, basal ganglia, brain stem and cerebellum); SIRT1 expression is confined to the neuronal nucleus in parvalbumin (GABAergic) and tyrosine hydroxylase (dopaminergic) neurons (Zakhary et al., 2010). SIRT1 expression was increased in cerebral cortex (especially in the pyramidal cell layer), hippocampus, thalamus and spinal cord in symptomatic SOD1 G93A mice, but spinal motor neurons were not studied in detail; these changes were interpreted as a stress response to the neurotoxic form of SOD1 (Lee et al., 2012).

PROTECTIVE EFFECTS OF SIRTUINS ACTIVATION

In contrast to other HDACs, the activity of SIRT in the CNS results in neuroprotection. Among the agents with protective action are the polyphenols (vegetal compounds that serve hormonal and protective function in these organisms), particularly resveratrol, which is present in grapes and in red wine, and SRT1720, a synthetic compound derived from resveratrol. These compounds activate selectively both SIRT1 and SIRT2, whereas activators of the remaining SIRT have not yet been described (Kazantsev and Thompson, 2008).

There is a paucity of studies that address SIRT role in ALS pathology. In primary cortical cultures of transgenic SOD1 G93A mice, resveratrol protected against neuron death, and this pro-

tection was due to the activation of SIRT1 (Kim et al., 2007). In agreement with these results, in another in vitro study of SOD1 G93A murine motor neurons, it was found that SIRT1 expression was downregulated, and resveratrol prevented neuronal death (Wang et al., 2011). However, the neuroprotection exerted by resveratrol may be due to the stimulation of the activities of other enzymes such as AMP protein kinase (Dasgupta and Milbrandt, 2007). In our laboratory we have recently found that the administration of resveratrol directly in the lumbar spinal cord in rats delays the progress of motor deficits induced by chronic AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionate) infusion in the lumbar spinal cord (Lazo-Gómez and Tapia, in preparation, an in vivo model of excitotoxic motor neuron death (Tovar-y-Romo et al., 2007).

The downstream effectors of SIRT that confer protection in neurodegenerative settings are beginning to be elucidated. For example, in a transgenic mouse model of Huntington's disease, SIRT1 overexpression exerted its beneficial effects through the deacetylation of FoxO3a and p53 (Jiang et al., 2012). This relation has not been explicitly addressed in ALS experimental models, but there is evidence of the role of SIRT1 effectors in motor neuron death. FoxO3a is a transcriptional factor involved in determining cell fate (survival or apoptosis) in stressful situations, such as starvation and oxidative stress. It has been shown that SIRT1 modulates FoxO3a activities through the deacetylation of specific lysine residues, resulting in activation or inhibition, and this depends on the deacetylated lysine position or on FoxO3a cellular location (nucleus or cytoplasm) (Eijkelenboom and Burgering, 2013). In an in vitro study of motor neuron death induced by several insults (excitotoxicity, the overexpression of mutant SOD1, of mutant p150^{glued} or of poly-glutamin expanded androgen receptor), targeted expression of FoxO3a to the nucleus (where it can modulate the transcription of its target genes) by genetic or pharmacologic means prevented neuron death (Mojsilovic-Petrovic et al., 2009). This is in contrast with other in vitro studies, where motor neuron cultures deprived of trophic support were found to overexpress Fas ligand (FasL), due to FoxO3a translocation to the nucleus, thus resulting in cell death (Barthélémy et al., 2004). The reason for this discrepancy is not clear, but it could be due to differences in the death process triggered by the various insults used, which might be regulated in different ways by FoxO3a.

Another well studied SIRT1 effector is PGC1- α , a transcriptional coactivator involved in the modulation of the responses necessary to overcome cellular energetic deficiencies, such as the stimulation of mitochondrial biogenesis and the respiratory rate, and the increase of the uptake and metabolism of energy substrates. SIRT1 physically interacts with, deacetylates and activates PGC1- α (Cantó and Auwerx, 2009). It has been shown that PGC1- α plays a role in ALS pathology, because decreased mRNA and protein levels of this coactivator were found in both transgenic mice and in patients with the sporadic form of the disease, in muscle and in spinal cord tissues (Thau et al., 2012). Moreover, PGC1- α may play a therapeutic role, as shown by two studies in the transgenic mouse model. Zhao et al. (2011a) used a targeted overexpression of PGC1- α in neurons of SOD1 transgenic mice, which modestly increased survival and significantly improved

motor performance; these changes were due to the restoration of mitochondrial activities. This is in contrast to the findings of other study in a double transgenic mouse overexpressing PGC1- α and mutant SOD1 in all tissues, showing that survival was not increased albeit motor performance improved and motor neuron loss was ameliorated. An augmentation of the excitatory amino acid transporter protein 2 (EAAT2) in astrocytes was noted in the double transgenic, suggesting that PGC1- α could exert its beneficial effects through other mechanisms (Liang et al., 2011). Regarding other sirtuin isoforms, such as SIRT3, a mitochondrial sirtuin, Song et al. (2013) showed, in primary spinal motor neuronal cell cultures of transgenic SOD1 G93A mice, that the overexpression of SIRT3 and of PGC1- α protected against mitochondrial fragmentation and neuronal cell death, although the authors did not demonstrate the relation between SIRT3 and PGC1- α .

These findings indicate that sirtuin activation protects against motor neuron degeneration, although some findings in different experimental models suggest that activators may protect through other mechanisms (Tang, 2010) or even that sirtuin inhibition may be protective. For example, in a model of brain ischemia sirtuin inhibition through nicotinamide administration conferred neuroprotection by preserving NAD⁺ cellular levels (Liu et al., 2009a).

CONCLUSION

The opportunities for a really effective therapy for ALS are scarce, and therefore HDAC inhibition and sirtuin activation merit further investigation. Studies on the modification of the activity of these enzymes in in vitro and in vivo experimental models of neurodegeneration, including ALS, have given valuable information suggesting potential therapeutic opportunities for this disease. Nevertheless, the mechanisms underlying such effects are poorly understood and their clarification is necessary for designing more specific and potent treatment strategies. Accumulated evidence on sirtuin activation has provided valuable information about the molecular pathways that could be relevant to halt motor neuron degeneration, such as those related to cellular energetic state and PGC1- α . Not all types of HDACs have been evaluated in ALS models and the effects, toxicity, dosage, timing, and mode of administration of specific drugs that inhibit HDAC or activate SIRT have not been established. Of note is the fact that the most widely used model of ALS in which these strategies have been studied is the transgenic rodent with mutations in the human SOD1 gene, but this represent only about 2% of all ALS cases. Novel experimental models of motor neuron degeneration in vivo are clearly needed before safely moving these drugs to clinical trials for a disorder that has proved recalcitrant to all, past and current, therapeutic procedures.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (project IN201013) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México (project 128229). Rafael Lazo-Gómez and Uri N. Ramírez-Jarquín are recipients of a CONACyT scholarship.

REFERENCES

- Barthélémy, C., Henderson, C. E., and Pettmann, B. (2004). Foxo3a induces motoneuron death through the Fas pathway in cooperation with JNK. *BMC Neurosci.* 5:48. doi: 10.1186/1471-2202-5-48
- Bhaumik, S. R., Smith, E., and Shilatifard, A. (2007). Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1008–1016. doi: 10.1038/nsmb1337
- Broide, R. S., Redwine, J. M., Aftahi, N., Young, W., Bloom, F. E., and Winrow, C. J. (2007). Distribution of histone deacetylases 1–11 in the rat brain. *J. Mol. Neurosci.* 31, 47–58. doi: 10.1007/bf02686117
- Cantó, C., and Auwerx, J. (2009). PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr. Opin. Lipidol.* 20, 98–105. doi: 10.1097/mol.0b013e328328d0a4
- Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., et al. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458, 1056–1060. doi: 10.1038/nature07813
- Cha, J. H. (2000). Transcriptional dysregulation in Huntington's disease. *Trends Neurosci.* 23, 387–392. doi: 10.1016/s0166-2236(00)01609-x
- Chen, Y. T., Zang, X. F., Pan, J., Zhu, X. L., Chen, F., Chen, Z. B., et al. (2012). Expression patterns of histone deacetylases in experimental stroke and potential targets for neuroprotection. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 39, 751–758. doi: 10.1111/j.1440-1681.2012.05729.x
- Corcoran, L. J., Mitchison, T. J., and Liu, Q. (2004). A novel action of histone deacetylase inhibitors in a protein aggregates disease model. *Curr. Biol.* 14, 488–492. doi: 10.1016/j.cub.2004.03.003
- Corona, J. C., Tovar-y-Romo, L. B., and Tapia, R. (2007). Glutamate excitotoxicity and therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin. Ther. Targets* 11, 1415–1418. doi: 10.1517/14728222.11.11.1415
- Cudkovicz, M. E., Andres, P. L., Macdonald, S. A., Bedlack, R. S., Choudry, R., Brown, R. H., et al. (2009). Phase 2 study of sodium phenylbutyrate in ALS. *Amyotroph. Lateral Scler.* 10, 99–106. doi: 10.1080/17482960802320487
- Dasgupta, B., and Milbrandt, J. (2007). Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104, 7217–7222. doi: 10.1073/pnas.0610068104
- de Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., and van Kuilenburg, A. B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* 370, 737–749. doi: 10.1042/bj20021321
- Del Signore, S. J., Amante, D. J., Kim, J., Stack, E. C., Goodrich, S., Cormier, K., et al. (2009). Combined riluzole and sodium phenylbutyrate therapy in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Amyotroph. Lateral Scler.* 10, 85–94. doi: 10.1080/17482960802226148
- Eijkelenboom, A., and Burgering, B. M. (2013). FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 83–97. doi: 10.1038/nrm3507
- Figueroa-Romero, C., Hur, J., Bender, D. E., Delaney, C. E., Cataldo, M. D., Smith, A. L., et al. (2012). Identification of epigenetically altered genes in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 7:e52672. doi: 10.1371/journal.pone.0052672
- Frew, A. J., Johnstone, R. W., and Bolden, J. E. (2009). Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. *Cancer Lett.* 280, 125–133. doi: 10.1016/j.canlet.2009.02.042
- Haigis, M. C., and Sinclair, D. A. (2010). Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu. Rev. Pathol.* 5, 253–295. doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092250
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., et al. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417, 455–458. doi: 10.1038/417455a
- Imai, S., Armstrong, C. M., Kaerberlein, M., and Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795–800. doi: 10.1038/35001622
- Janssen, C., Schmalbach, S., Boeselt, S., Sarlette, A., Dengler, R., and Petri, S. (2010). Differential histone deacetylase mRNA expression patterns in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69, 573–581. doi: 10.1097/nen.0b013e3181ddd404
- Jiang, M., Wang, J., Fu, J., Du, L., Jeong, H., West, T., et al. (2012). Neuroprotective role of Sirt1 in mammalian models of Huntington's disease through activation of multiple Sirt1 targets. *Nat. Med.* 18, 153–158. doi: 10.1038/nm.2558

- Kaerberlein, M., McVey, M., and Guarente, L. (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* 13, 2570–2580. doi: 10.1101/gad.13.19.2570
- Kanai, H., Sawa, A., Chen, R. W., Leeds, P., and Chuang, D. M. (2004). Valproic acid inhibits histone deacetylase activity and suppresses excitotoxicity-induced GAPDH nuclear accumulation and apoptotic death in neurons. *Pharmacogenomics J.* 4, 336–344. doi: 10.1038/sj.tpj.6500269
- Kazantsev, A. G., and Thompson, L. M. (2008). Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 854–868. doi: 10.1038/nrd2681
- Kernochan, L. E., Russo, M. L., Woodling, N. S., Huynh, T. N., Avila, A. M., Fischbeck, K. H., et al. (2005). The role of histone acetylation in SMN gene expression. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1171–1182. doi: 10.1093/hmg/ddi130
- Kim, D., Nguyen, M. D., Dobbin, M. M., Fischer, A., Sananbenesi, F., Rodgers, J. T., et al. (2007). SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J.* 26, 3169–3179. doi: 10.1038/sj.emboj.7601758
- Kim, S. H., Shanware, N. P., Bowler, M. J., and Tibbetts, R. S. (2010). Amyotrophic lateral sclerosis-associated proteins TDP-43 and FUS/TLS function in a common biochemical complex to co-regulate HDAC6 mRNA. *J. Biol. Chem.* 285, 34097–34105. doi: 10.1074/jbc.m110.154831
- Kirby, J., Halligan, E., Baptista, M. J., Allen, S., Heath, P. R., Holden, H., et al. (2005). Mutant SOD1 alters the motor neuronal transcriptome: implications for familial ALS. *Brain* 128, 1686–1706. doi: 10.1093/brain/awh503
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.005
- Lee, J. C., Shin, J. H., Park, B. W., Kim, G. S., Kim, J. C., Kang, K. S., et al. (2012). Region-specific changes in the immunoreactivity of SIRT1 expression in the central nervous system of SOD1(G93A) transgenic mice as an in vivo model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res.* 1433, 20–28. doi: 10.1016/j.brainres.2011.11.019
- Li, X. (2013). SIRT1 and energy metabolism. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 45, 51–60. doi: 10.1093/abbs/gms108
- Liang, H., Ward, W. F., Jang, Y. C., Bhattacharya, A., Bokov, A. F., Li, Y., et al. (2011). PGC-1 α protects neurons and alters disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Muscle Nerve* 44, 947–956. doi: 10.1002/mus.22217
- Liu, D., Gharavi, R., Pitta, M., Gleichmann, M., and Mattson, M. P. (2009a). Nicotinamide prevents NAD⁺ depletion and protects neurons against excitotoxicity and cerebral ischemia: NAD⁺ consumption by SIRT1 may endanger energetically compromised neurons. *Neuromolecular Med.* 11, 28–42. doi: 10.1007/s12017-009-8058-1
- Liu, H., Hu, Q., D'Ercole A. J., and Ye, P. (2009b). Histone deacetylase 11 regulates oligodendrocyte-specific gene expression and cell development in OL-1 oligodendroglia cells. *Glia* 57, 1–12. doi: 10.1002/glia.20729
- Liu, H., Hu, Q., Kaufman, A., D'Ercole, A. J., and Ye, P. (2008). Developmental expression of histone deacetylase 11 in the murine brain. *J. Neurosci. Res.* 86, 537–543. doi: 10.1002/jnr.21521
- Michan, S., and Sinclair, D. (2007). Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem. J.* 404, 1–13. doi: 10.1042/bj20070140
- Mojsilovic-Petrovic, J., Nedelsky, N., Boccitto, M., Mano, I., Georgiades, S. N., Zhou, W., et al. (2009). FOXO3a is broadly neuroprotective in vitro and in vivo against insults implicated in motor neuron diseases. *J. Neurosci.* 29, 8236–8247. doi: 10.1523/jneurosci.1805-09.2009
- Monti, B., Polazzi, E., and Contestabile, A. (2009). Biochemical, molecular and epigenetic mechanisms of valproic acid neuroprotection. *Curr. Mol. Pharmacol.* 2, 95–109. doi: 10.2174/1874-470210902010095
- Pandey, U. B., Nie, Z., Batlevi, Y., McCray, B. A., Ritson, G. P., Nedelsky, N. B., et al. (2007). HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* 447, 859–863. doi: 10.1038/nature05853
- Petri, S., Kiaei, M., Kipiani, K., Chen, J., Calingasan, N. Y., Crow, J. P., et al. (2006). Additive neuroprotective effects of a histone deacetylase inhibitor and a catalytic antioxidant in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 22, 40–49. doi: 10.1016/j.nbd.2005.09.013
- Piepers, S., Veldink, J. H., de Jong, S. W., van der Tweel, I., van der Pol, W. L., Uijtendaal, E. V., et al. (2009). Randomized sequential trial of valproic acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 66, 227–234. doi: 10.1002/ana.21620
- Robakis, N. K. (2003). An Alzheimer's disease hypothesis based on transcriptional dysregulation. *Amyloid* 10, 80–85. doi: 10.3109/13506120309041729
- Robberecht, W., and Philips, T. (2013). The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 248–264. doi: 10.1038/nrn3430
- Rouaux, C., Panteleeva, I., Rene, F., Gonzalez de Aguilar, J. L., Echaniz-Laguna, A., Dupuis, L., et al. (2007). Sodium valproate exerts neuroprotective effects in vivo through CREB-binding protein-dependent mechanisms but does not improve survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *J. Neurosci.* 27, 5535–5545. doi: 10.1523/jneurosci.1139-07.2007
- Ryu, H., Smith, K., Camelo, S. I., Carreras, I., Lee, J., Iglesias, A. H., et al. (2005). Sodium phenylbutyrate prolongs survival and regulates expression of anti-apoptotic genes in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *J. Neurochem.* 93, 1087–1098. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03077.x
- Santa-Cruz, L. D., Ramirez-Jarquín, U. N., and Tapia, R. (2012). "Role of mitochondrial dysfunction in motor neuron degeneration in ALS," in *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, ed M. H. Maurer (In Tech, Rijeka, Croatia). 197–224.
- Selvi, B. R., Cassel, J. C., Kundu, T. K., and Boutillier, A. L. (2010). Tuning acetylation levels with HAT activators: therapeutic strategy in neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1799, 840–853. doi: 10.1016/j.bbarm.2010.08.012
- Smith, J. S., Brachmann, C. B., Celic, I., Kenna, M. A., Muhammad, S., Starai, V. J., et al. (2000). A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 6658–6663. doi: 10.1073/pnas.97.12.6658
- Song, W., Song, Y., Kincaid, B., Bossy, B., and Bossy-Wetzel, E. (2013). Mutant SOD1G93A triggers mitochondrial fragmentation in spinal cord motor neurons: neuroprotection by SIRT3 and PGC-1 α . *Neurobiol. Dis.* 51, 72–81. doi: 10.1016/j.nbd.2012.07.004
- Tang, B. L. (2010). Resveratrol is neuroprotective because it is not a direct activator of Sirt1 - A hypothesis. *Brain Res. Bull.* 81, 359–361. doi: 10.1016/j.brainresbull.2009.12.007
- Tanno, M., Sakamoto, J., Miura, T., Shimamoto, K., and Horio, Y. (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *J. Biol. Chem.* 282, 6823–6832. doi: 10.1074/jbc.m609554200
- Thau, N., Knippenberg, S., Korner, S., Rath, K. J., Dengler, R., and Petri, S. (2012). Decreased mRNA expression of PGC-1 α and PGC-1 α -regulated factors in the SOD1G93A ALS mouse model and in human sporadic ALS. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71, 1064–1074. doi: 10.1097/nen.0b013e318275df4b
- Todd, P. K., Oh, S. Y., Krans, A., Pandey, U. B., Di Prospero, N. A., Min, K. T., et al. (2010). Histone deacetylases suppress CGG repeat-induced neurodegeneration via transcriptional silencing in models of fragile X tremor ataxia syndrome. *PLoS Genet.* 6:e1001240. doi: 10.1371/journal.pgen.1001240
- Tovar- γ -Romo, L. B., Zepeda, A., and 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. doi: 10.1097/nen.0b013e3181567c16
- Wang, J., Zhang, Y., Tang, L., Zhang, N., and Fan, D. (2011). Protective effects of resveratrol through the up-regulation of SIRT1 expression in the mutant hSOD1-G93A-bearing motor neuron-like cell culture model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 503, 250–255. doi: 10.1016/j.neulet.2011.08.047
- Yacoubian, T. A., Cantuti-Castelvetri, I., Bouzou, B., Asteris, G., McLean, P. J., Hyman, B. T., et al. (2008). Transcriptional dysregulation in a transgenic model of Parkinson disease. *Neurobiol. Dis.* 29, 515–528. doi: 10.1016/j.nbd.2007.11.008
- Yao, Z. G., Zhang, L., Huang, L., Zhu, H., Liu, Y., Ma, C. M., et al. (2013). Regional and cell-type specific distribution of HDAC2 in the adult mouse brain. *Brain Struct. Funct.* 218, 563–573. doi: 10.1007/s00429-012-0416-3
- Yoo, Y. E., and Ko, C. P. (2011). Treatment with trichostatin A initiated after disease onset delays disease progression and increases survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* 231, 147–159. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.06.003
- Zakhary, S. M., Ayubcha, D., Dileo, J. N., Jose, R., Leheste, J. R., Horowitz, J. M., et al. (2010). Distribution analysis of deacetylase SIRT1 in rodent and human nervous systems. *Anat. Rec. (Hoboken)* 293, 1024–1032. doi: 10.1002/ar.21116
- Zhao, W., Varghese, M., Yemul, S., Pan, Y., Cheng, A., Marano, P., et al. (2011a). Peroxisome proliferator activator receptor gamma coactivator-1 α (PGC-1 α) improves motor performance and survival in a mouse model of

- amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Neurodegener.* 6:51. doi: 10.1186/1750-1326-6-51
- Zhao, Y., Wang, Y., and Zhu, W. G. (2011b). Applications of post-translational modifications of FoxO family proteins in biological functions. *J. Mol. Cell Biol.* 3, 276–282. doi: 10.1093/jmcb/mjr013
- Zhou, V. W., Goren, A., and Bernstein, B. E. (2011). Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat. Rev. Genet.* 12, 7–18. doi: 10.1038/nrg2905

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 06 August 2013; paper pending published: 11 October 2013; accepted: 16 November 2013; published online: 05 December 2013.

Citation: Lazo-Gómez R, Ramírez-Jarquín UN, Tovar-y-Romo LB and Tapia R (2013) Histone deacetylases and their role in motor neuron degeneration. *Front. Cell. Neurosci.* 7:243. doi: 10.3389/fncel.2013.00243

This article was submitted to the journal *Frontiers in Cellular Neuroscience*.

Copyright © 2013 Lazo-Gómez, Ramírez-Jarquín, Tovar-y-Romo and Tapia. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Motor Alterations Induced by Chronic 4-Aminopyridine Infusion in the Spinal Cord *In vivo*: Role of Glutamate and GABA Receptors

Rafael Lazo-Gómez and Ricardo Tapia *

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, México

OPEN ACCESS

Edited by:

Francisco Ciruela,
Universitat de Barcelona, Spain

Reviewed by:

Sulev Kõks,
University of Tartu, Estonia
Julio Benitez,
University of Extremadura, Spain
Paluri Sai Shantanu Rao,
University of Findlay, USA

*Correspondence:

Ricardo Tapia
rtapia@ifc.unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Neuropharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Neuroscience

Received: 05 February 2016

Accepted: 25 April 2016

Published: 09 May 2016

Citation:

Lazo-Gómez R and Tapia R (2016)
Motor Alterations Induced by Chronic
4-Aminopyridine Infusion in the Spinal
Cord *In vivo*: Role of Glutamate and
GABA Receptors.
Front. Neurosci. 10:200.
doi: 10.3389/fnins.2016.00200

Motor neuron (MN) degeneration is the pathological hallmark of MN diseases, a group of neurodegenerative disorders clinically manifested as muscle fasciculations and hyperreflexia, followed by paralysis, respiratory failure, and death. Ample evidence supports a role of glutamate-mediated excitotoxicity in motor death. In previous work we showed that stimulation of glutamate release from nerve endings by perfusion of the K⁺-channel blocker 4-aminopyridine (4-AP) in the rat hippocampus induces seizures and neurodegeneration, and that AMPA infusion in the spinal cord produces paralysis and MN death. On these bases, in this work we have tested the effect of the chronic infusion of 4-AP in the spinal cord, using implanted osmotic minipumps, on motor activity and on MN survival, and the mechanisms underlying this effect. 4-AP produced muscle fasciculations and motor deficits assessed in two motor tests, which start 2–3 h after the implant, which ameliorated spontaneously within 6–7 days, but no neurodegeneration. These effects were prevented by both AMPA and NMDA receptors blockers. The role of GABA_A receptors was also explored, and we found that chronic infusion of bicuculline induced moderate MN degeneration and enhanced the hyperexcitation produced by 4-AP. Unexpectedly, the GABA_AR agonist muscimol also induced motor deficits and failed to prevent the MN death induced by AMPA. We conclude that motor alterations induced by chronic 4-AP infusion in the spinal cord *in vivo* is due to ionotropic glutamate receptor overactivation and that blockade of GABAergic neurotransmission induces MN death under chronic conditions. These results shed light on the role of glutamatergic and GABAergic neurotransmission in the regulation of MN excitability in the spinal cord.

Keywords: motor neuron degeneration, excitotoxicity, spinal cord, 4-aminopyridine, glutamate receptors, GABA_A receptor

INTRODUCTION

Motor neuron (MN) degeneration in the spinal cord and/or in the cerebral cortex is the common pathological hallmark of MN diseases, which include a wide spectrum of heterogeneous neurodegenerative disorders. The loss of MNs leads to characteristic symptoms: initially hyperreflexia, muscle fasciculations, fatigue, weakness, cramps and later paralysis, and respiratory failure. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), spinal muscular atrophy, and spinal and bulbar muscular atrophy are some examples of MN disorders and, although having a relatively

low prevalence, they all cause great morbidity and are uniformly fatal (Tiryaki and Horak, 2014). In spite of extensive research, no common cause of this selective MN degeneration has been identified and several hypotheses have been proposed, including glutamate-mediated excitotoxicity, mitochondrial dysfunction and energy failure, protein aggregation, endoplasmic reticulum stress, and RNA metabolism aberrations, among others (Dion et al., 2009).

Glutamate-mediated excitotoxicity is a key mechanism in neuronal death in most experimental models of MN disorders. It is possible to elicit excitotoxic neuronal death by different mechanisms, including: (1) pharmacological blockade of glutamate uptake; (2) stimulating endogenous glutamate release; and (3) overactivation of postsynaptic AMPA and NMDA types glutamate receptors (Mehta et al., 2013). Previous work from our group has established the differential efficacy of these strategies in triggering neurodegeneration in several regions of the rat nervous system *in vivo*. We have repeatedly shown that the infusion of the glutamate transport blocker pyrrolidine dicarboxylic acid by microdialysis or osmotic minipumps fails to provoke hyperexcitation and neuronal degeneration, even when inducing remarkable increases (up to 20-fold) in extracellular glutamate concentration, in the striatum (Massieu et al., 1995), hippocampus (Peña and Tapia, 1999), cerebral cortex (Tovar-y-Romo and Tapia, 2006), and spinal cord (Corona and Tapia, 2004; Tovar-y-Romo et al., 2009a). In the hippocampus, such increase due to transport blockade may even paradoxically protect against excitotoxicity due to inhibition of glutamate release by activation of presynaptic metabotropic glutamate receptors (Vera and Tapia, 2012).

Conversely, infusing 4-AP *in vivo* through microdialysis triggers behavioral and electroencephalographic seizures, as well as excitotoxic neuronal death, in the rat striatum (Morales-Villagran and Tapia, 1996) and hippocampus (Peña and Tapia, 1999, 2000). These effects are caused by a transient stimulation of the release of endogenous glutamate from nerve endings and the consequent overactivation of glutamate receptors, as demonstrated by the potent protective effect of the NMDA receptor antagonists MK-801 and CPP, and of the AMPA receptor antagonist NBQX.

4-AP perfusion by microdialysis in the lumbar spinal cord also induced a notable transient (30 min) increase in the extracellular concentration of glutamate as well as motor behavioral effects, such as fasciculations, twitching and muscle cramps in the hindlimbs, for up to 2 h, even when the rats were anesthetized, suggesting a muscular hyperexcitability state analogous to that of seizures; however, no significant MN degeneration was observed. In contrast, the microdialysis perfusion of AMPA induced MN death and hindlimb paralysis (Corona and Tapia, 2004), effects that were prevented by specific blockers of the Ca²⁺-permeable AMPA receptors and by intracellular Ca²⁺ chelators (Corona and Tapia, 2007). Since these excitotoxic effects induced by the

microdialysis perfusion occur very rapidly, in less than 12 h, we developed a different model by chronically infusing drugs during several days through osmotic minipumps directly in the lumbar spinal cord tissue in behaving rats (Tovar-y-Romo et al., 2007). In this chronic experimental setting we showed that chronic AMPA receptor activation also induces MN degeneration and bilateral paralysis, while, as previously stated, glutamate uptake blockade does not cause MN degeneration even with a 12-fold increase in extracellular glutamate concentration (Tovar-y-Romo et al., 2009a).

In view of the above results, we considered relevant to elucidate if the chronic administration of 4-AP through osmotic minipumps in the spinal cord is also capable of eliciting MN degeneration and paralysis. We found that this chronic 4-AP infusion caused motor behavior deficits during several days and muscular signs of hyperexcitation, but since no MN degeneration or paralysis occurred we hypothesized that this might be due to a combined activation of both excitatory glutamatergic input on MNs and of GABAergic local inhibitory spinal circuits, whose function as modulators of motor activity has been clearly established (Martin and Chang, 2012; Ramirez-Jarquín et al., 2014). In fact, we and others have shown that the stimulatory action of 4-AP on the release of neurotransmitters is not specific for glutamate but involves also GABA (Jankowska et al., 1977; Morales-Villagran and Tapia, 1996; Peña and Tapia, 1999). Therefore, we also tested the effect of the GABA_AR antagonist and agonist bicuculline and muscimol, respectively, on the excitotoxic effects of both 4-AP and AMPA. Our results indicate that chronic alterations of GABAergic neurotransmission are notably involved in the 4-AP-induced hyperexcitation mediated by overactivation of glutamate receptors and that may induce MN death.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult Wistar male rats (280–300 g) were used in all of the experiments and were handled in accordance with the Rules for Research and Health Matters (Mexico) and with international standards of research animal welfare (including ARRIVE guidelines), and with approval of the Institutional Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (protocol approval number RTI21-14). All animals were housed in a controlled laboratory environment with a 12 h light/dark cycle, and fed with regular animal chow and water *ad libitum*. All surgical procedures were performed under general anesthesia, and every effort was made to minimize animal suffering during experimental procedures.

Drugs and Osmotic Minipump Preparation

All drugs were dissolved in isotonic saline solution (SS). Osmotic minipumps (Alzet model 2004, volume ~250 µL, flow rate 6 µl/day) were filled with the different solutions containing the used drugs at the following concentrations: SS as control, AMPA 7.5 mM, 4-AP 35 mM, MK-801 1 mM, NBQX 1 mM, bicuculline methbromide 5 mM, muscimol 10 mM, or a mixture of drugs, as indicated in Results, 48 h before the surgical implantation,

Abbreviations: NMDAR, N-methyl-D-aspartate glutamate receptor; AMPAR, α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate glutamate receptor; GABA_AR, γ-aminobutyric acid type A receptor; 4-AP, 4-aminopyridine; MN, Motor neuron; ALS, Amyotrophic lateral sclerosis.

and were incubated at 37.0° in SS for flow rate stabilization. These concentrations were chosen on the basis of previous results from our laboratory (Peña and Tapia, 1999, 2000; Corona and Tapia, 2004; Tovar-y-Romo et al., 2007) and of preliminary experiments. AMPA, MK801, and NBQX were purchased from Tocris Bioscience, and 4-AP, bicuculline methbromide, and muscimol from Sigma Aldrich.

Surgical Osmotic Minipump Implantation

The procedure for osmotic minipump implantation was performed essentially as previously described (Tovar-y-Romo et al., 2007), with minor modifications. Briefly, animals were anesthetized with 5.0% isoflurane in a 95% O₂/5% CO₂ mixture and placed in a stereotaxic spinal unit. Later on, isoflurane concentration was gradually diminished to 1.5–2.0% as the surgery was performed. After shaving and disinfection, a median sagittal incision, 3.5–4 cm long, was made in the back of the animal and the underlying fascia and muscle tissue were dissected until appropriate visualization of the T10 vertebral lamina was achieved (at the spinal L3 level). The spinous process was removed with a drill, and a ~2 mm diameter hole was drilled in the right lamina until the spinal cord tissue was visualized and the meninges were carefully removed with a metallic hook. A stainless-steel screw (3.7 mm long, 1 mm diameter) was fixed in the left lamina. A fused silica glass filament probe (1 mm long, 50 μm internal diameter, 80 μm external diameter, VitroCom Inc.) was carefully advanced down into the spinal cord in a vertical fashion with the aid of the three-dimensional manipulator of the stereotaxic unit; previously, this glass probe was attached and glued to a plastic tubing ~1 cm long, and during surgery this tube was connected and fixed with cyanoacrylate glue to the osmotic minipump. During all these procedures great care was taken to avoid damage to the spinal cord tissue. Dental cement was poured and let dry on the T10 vertebra, to fix both the screw and the cannula on place. Osmotic minipumps were subcutaneously placed in the back of the animal, at the right side of the vertebral column. This procedure aims to directly and continuously administer the tested drugs in the spinal cord tissue, at a rate of 0.25 μl/h up to 25 days, in the vicinity of lamina IX, where motor neurons reside. Finally, the skin incision was closed with surgical stainless-steel clips, anesthesia was withdrawn, and animals received a single intraperitoneal antibiotic shot and were monitored until full consciousness was recovered.

Behavioral Assessment

Four to five days prior to surgery, rats were trained to walk during 120 s on an accelerating Rotarod (Columbus Instruments, USA), starting from 10 rpm (0.2 rpm/s of acceleration). Time to fall from the instrument was recorded, up to a limit of 120 s. Also, grip strength of both hind limbs was measured by placing the animals on their hind limbs on the metallic mesh of a grip strength meter (TSE Systems, USA) and gently pulling the tail to induce the animals to escape from the examiner; measurement was not considered if the animals, when attempting to escape, used their forelimbs. The maximum force displayed by the instrument in every trial was recorded in ponds, later converted to Newtons (1 pond = 0.009807 N), and normalized to values

obtained the day before surgery (day 0). In both tests the best time, or the greater force, out of three trials was recorded. Great care was taken to avoid excessive distress in the animals, and appropriate time between trials was given to the animals to rest. These behavioral motor tasks were assessed on a daily basis for 5 or for 15 days (depending on the experiment) and, on these cutoff times, animals were sacrificed and fixed/perfused for histology.

Histological Processing

After the time for behavioral assessment was concluded, rats were perfused and fixed for histological analyses as previously described (Tovar-y-Romo et al., 2007). Briefly, animals were deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital, the rib cage was cut to expose the heart, and a wide cut in the right atria was made. A needle, connected to a peristalsis pump, was inserted into the left ventricle and ~250 ml of ice cold normal saline were perfused, followed by ~250 ml of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. The back was dissected, the acrylic implant removed, and the lumbar spinal cord tissue was recovered by pushing it out of the vertebral canal with cold saline solution in a syringe. Tissue was postfixed for 48 h at 4.0°C, then dehydrated in increasingly concentrated sucrose solutions (10, 20, and 30%), and the region where the cannula was inserted was visually identified and used for study. Approximately 50 transverse sections (40 μm thick) were obtained in a cryostat, and the slices that showed the fused silica filament entry point were used for analyses and, of these, 15–20 slices were stained with cresyl violet (Nissl staining) for further analysis. The number of morphologically healthy MNs (multipolar neurons with clear cytoplasm, soma diameter >20 μm and distinguishable nucleus) was counted in the ipsilateral and contralateral ventral horns.

Statistical Analysis

All statistical analyses were carried out in GraphPad Prism 5 using a two way ANOVA (in the case of behavioral tasks) followed by a Bonferroni's *post-hoc* test, or a one way ANOVA (for number of healthy MN) followed by a Tukey's *post-hoc* test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Chronic 4-AP Infusion Induces Motor Behavior Alterations, that are Enhanced by Bicuculline

4-AP infusion caused motor behavior alterations in the hindlimbs of treated animals manifested as episodic muscle cramps and fasciculations that appeared frequently in the ipsilateral hindlimb. Animals seemed distressed when these alterations occurred, since they squealed, compulsively groomed the affected hindlimb, and even removed the overlying fur, and had occasional running fits. These episodic alterations started within 3 to 5 h after minipump implantation and lasted a few minutes with a variable frequency, but were often observed during or immediately after the rotarod tests. They progressively diminished in frequency, duration and intensity up to day 7 to 10, and subsequently were rarely observed.

These motor alterations were evidenced in the rotarod test as a progressive, but transitory, reduction in the time to fall, reaching significant difference only at day 5; in the grip strength assessment there were no changes, although we observed a slight non-significant increase in grip strength from day 10 until 15 (Figures 1A,B, top row). MK-801 co-infused with 4-AP almost completely prevented the fasciculations and muscle cramps induced by 4-AP, although the rotarod test and the hindlimb grip strength assessment did not show significant differences with respect to 4-AP alone (Figures 1A,B, bottom row). NBQX co-infused with 4-AP also partially suppressed the overexcitation induced by 4-AP and, again, the results obtained from the motor behavioral tasks were very similar to those of 4-AP treatment (Figure 1, bottom row). NBQX and M801 alone did not affect any of the parameters studied (not shown).

Then we tested the effect of bicuculline to explore the role of GABA_AR in the 4-AP-induced motor alterations. Animals treated with bicuculline alone displayed only slight behavioral

changes, such as occasional grooming and licking of the ipsilateral hindlimb, and did not alter significantly the rotarod performance nor the hindlimb grip strength. Co-infusion of bicuculline with 4-AP enhanced the intensity of fasciculations and the frequency of grooming induced by 4-AP; this was reflected in a decrease in the time to fall from the rotarod and in a trend to reduce the strength values as compared to 4-AP alone (Figure 1, middle row).

Bicuculline, but Not 4-AP, Induces MN Degeneration

In spite of the motor behavioral changes obtained with 4-AP infusion we did not find loss of MNs when we assessed the spinal cord tissue with Nissl staining (20.9 ± 3.1 vs. 19.3 ± 4.1 MNs ipsilateral side; 21.8 ± 2.7 vs. 21.1 ± 5.3 MNs contralateral side, compared to control). Neither NBQX nor MK-801, alone or in combination with 4-AP, altered the number of healthy MNs (Figures 2A,B). However, unexpectedly, bicuculline infusion

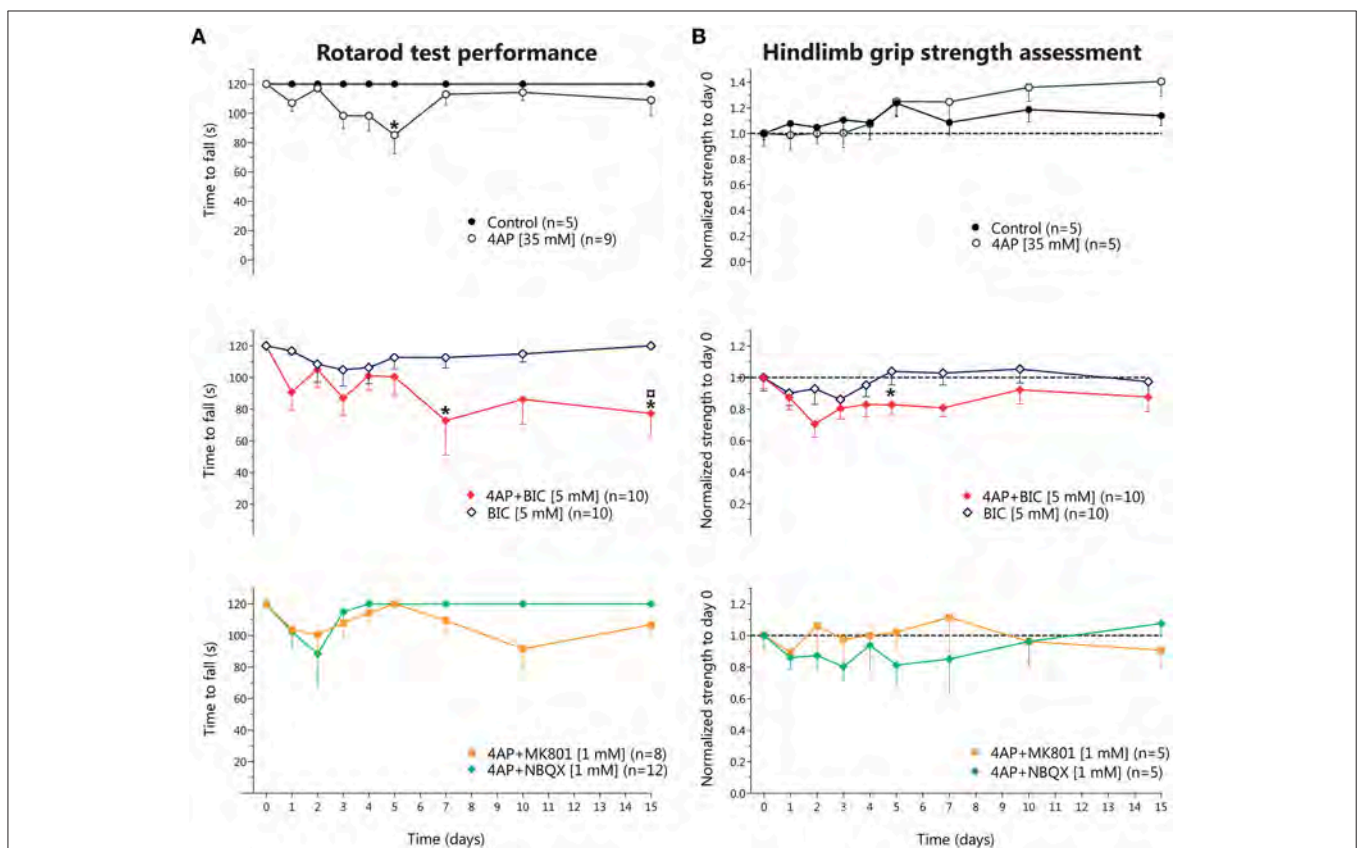


FIGURE 1 | Behavioral effects of chronic 4-aminopyridine infusion in the rodent spinal cord *in vivo*. (A) Results of rotarod test performance expressed as the time to fall (in seconds) in each of the experimental conditions. Top, 4-AP infusion causes a reversible decrease in the time to fall significantly different to Control only at day 5 (two-way ANOVA, Bonferroni's *post-hoc*; $p < 0.05$). Middle, bicuculline treatment did not result in significant changes, while 4-AP + bicuculline co-infusion produced an irreversible reduction in the time to fall, different to Control at days 5 and 15, and to 4-AP at day 15 (two-way ANOVA, Bonferroni's *post-hoc*; $*p < 0.05$ vs. control; $p < 0.05$ vs. 4-AP). Bottom, Co-infusion of NBQX or of MK-801 with 4-AP partially improved time to fall, attaining results not different from Control or from 4-AP. (B) Results of hindlimb strength assessment normalized to baseline values (day 0, before osmotic minipump implantation). Top, Control group displayed a gradual increase in strength up to a ~10% at day 15 respect to baseline values, while 4-AP also displayed a non-significant gradual increase in strength up to ~30% at day 15. Middle, bicuculline treatment did not result in changes in strength in the 15 days of evaluation, while co-infusion of 4-AP + bicuculline resulted in a tendency to decrease strength during the 15 days of treatment, reaching significance only at day 5 (two-way ANOVA, Bonferroni's *post-hoc*; $*p < 0.05$ vs. Control). Bottom, Co-infusion of NBQX or of MK-801 with 4-AP did not result in changes in strength.

caused a significant $\sim 38\%$ loss of MNs in the ipsilateral ventral horn with respect to control (13.1 ± 4.5 vs. 20.9 ± 3.1 MNs) and a $\sim 25\%$ reduction in the contralateral side (16.4 ± 4.1 vs. 21.8 ± 2.7 MNs); this reduction was also significant with respect to 4-AP alone, albeit only in the ipsilateral side. Co-infusion of 4-AP with bicuculline resulted in loss of MNs similar to that caused by bicuculline alone.

Chronic GABA_AR Activation with Muscimol Does Not Prevent Paralysis Induced by AMPA Receptor Overactivation

The above results indicate that 4-AP infusion produce a glutamate-receptor-mediated motor hyperexcitability state in the spinal cord *in vivo* albeit not sufficient to induce MN degeneration, whereas blockade of GABA_AR was deleterious. So, to test the role of GABA-mediated inhibition in the excitotoxic effect of glutamate receptor overactivation, we infused muscimol alone or in combination with AMPA. Muscimol treatment provoked severe and long-lasting weakness in both hindlimbs, that in some animals manifested as paralysis with no other phenomena (such as autotomy, as is the case of AMPA-treated animals), starting at day 1 or 2, that progressively recovered throughout the 15 days' timeline but never reached control values again. Such motor alterations decreased the time to fall from rotarod significantly at days 3, 4, and 5 (Figure 3A), as well as a similar significant reduction in the grip strength at days 3, 4, 5, and 10 (Figure 3B).

As previously described (Tovar-γ-Romo et al., 2007), chronic AMPA infusion induced a gradual and irreversible paralysis of the hindlimbs of all treated animals, manifested in the motor behavioral tasks as a progressive and irreversible diminution in the time to fall from rotarod and as reduction in the strength in both hindlimbs. The paralysis started on day 1 with the ipsilateral hindlimb and gradually progressed up to day 5, when animals were completely paralyzed in both hindlimbs. In this group, the

experiments were stopped at day 5 because animals could no longer feed themselves and started to autotomize their hindlimbs. When muscimol was co-infused with AMPA, we observed an earlier onset and more severe paralysis, and an earlier, and greater reduction of the time to fall and in grip strength as compared to AMPA treatment, but no animals in this group displayed autotomy, as opposed to the AMPA-alone group. The values obtained were significantly different from control and from muscimol-alone treatment in both tasks (Figures 3A,B, respectively).

Chronic GABA_AR Activation with Muscimol Does Not Prevent MN Degeneration Induced by AMPA

Histological analysis showed that muscimol infusion induced a non-significant slight reduction in MN number. In contrast, as expected, after AMPA infusion the paralysis observed correlated with the previously reported almost total loss of MNs (Tovar-γ-Romo et al., 2007). Co-infusion with muscimol did not modify the remarkable MN degeneration induced by AMPA (Figure 4).

DISCUSSION

Excitotoxicity, a fundamental mechanism of MN degeneration, can be elicited by perturbing the presynaptic physiology in two means: (1) blocking the uptake of released glutamate, or (2) stimulating endogenous glutamate release. For the former, although there is evidence that implicate it as a mechanism of excitotoxic death in human MN disease (Rothstein et al., 1992), experimental studies using genetic knockout of the GLT1 glutamate transporter in mice have failed to causally link this finding to MN degeneration (Stoffel et al., 2004). Indeed, as was stated in the Introduction, work done by our group do not support glutamate uptake inhibition as an important mechanism in models of neurodegeneration *in vivo* in several regions

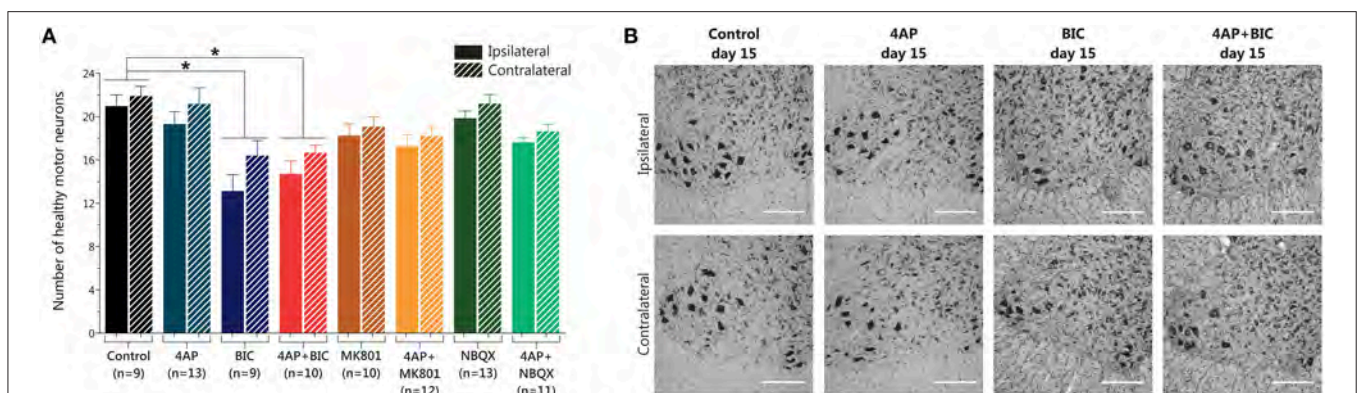
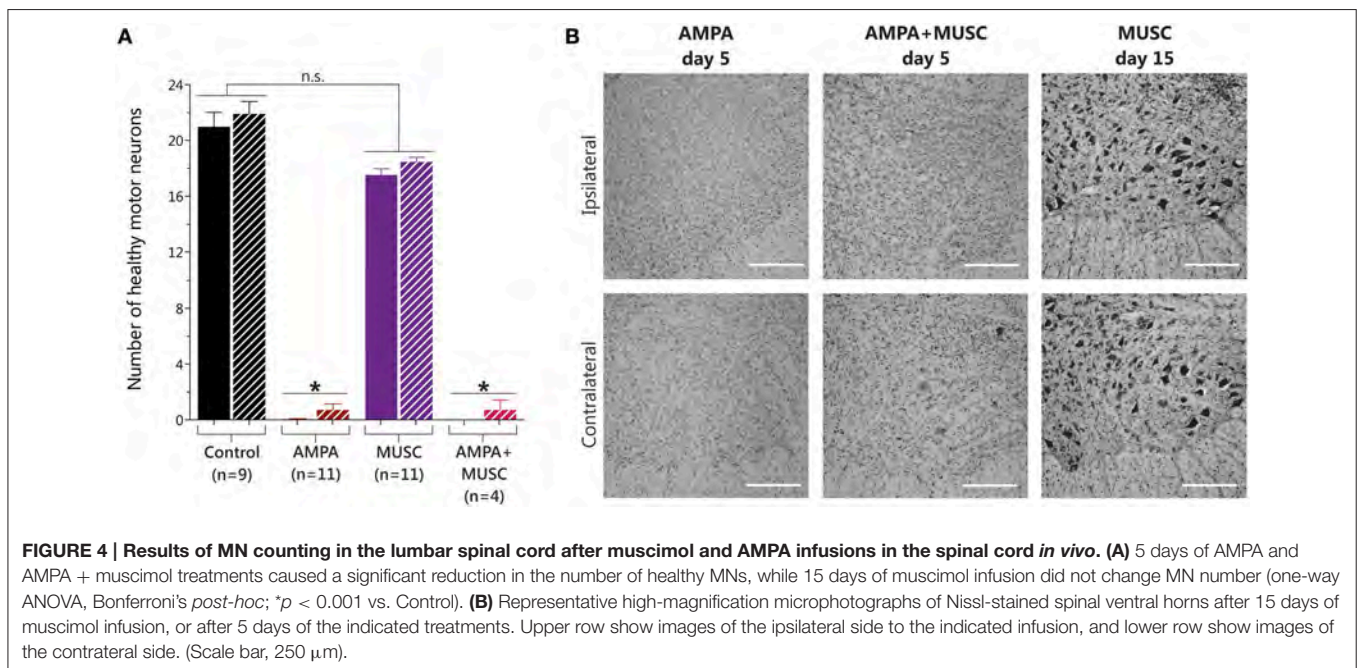
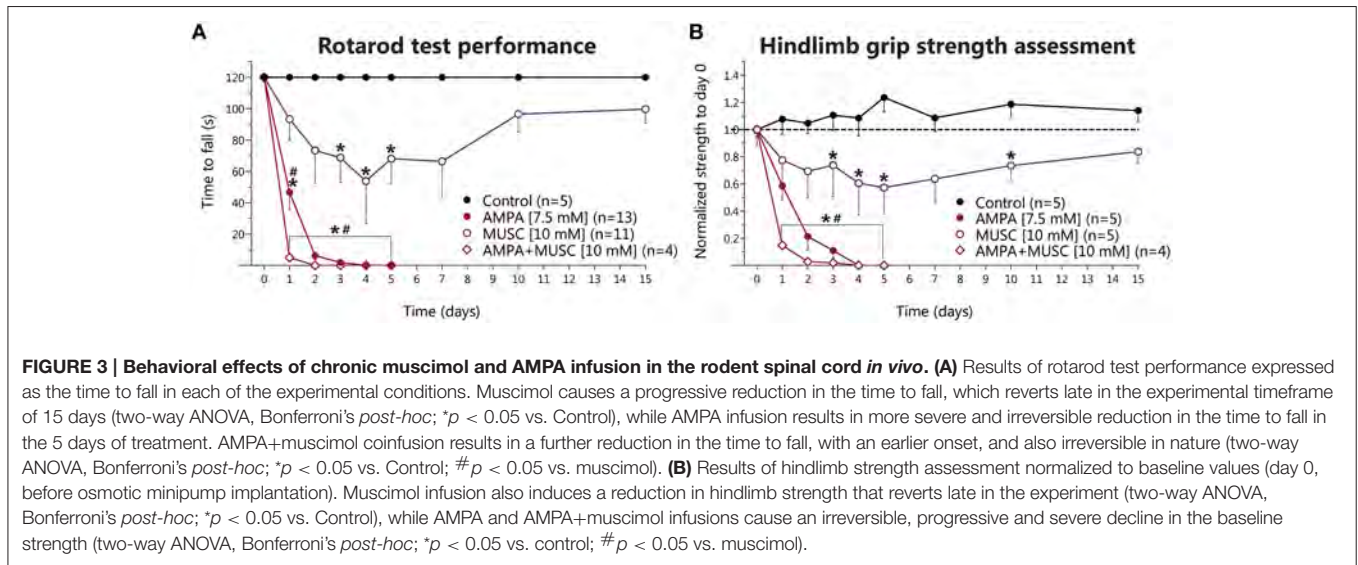


FIGURE 2 | Results of MN counting in the lumbar spinal cord after 15 days of 4-AP infusion and other compounds in the spinal cord *in vivo*. (A)

Bicuculline-alone and 4-AP + bicuculline treatments induce a reduction in the number of MNs of similar magnitude (one-way ANOVA, Bonferroni's *post-hoc*; $*p < 0.001$ vs. Control), while 4-AP infusion and the other shown treatments did not produce changes in the number of MNs. (B) Representative high-magnification microphotographs of Nissl-stained spinal ventral horns, where motor neurons reside (large, multipolar, intensely stained neuronal somas with prominent nuclei) after 15 days of the indicated treatments. Upper row show images of the ipsilateral side to the indicated infusion, and lower row show images of the contralateral side. (Scale bar, 250 μ m).



of the rodent central nervous system in an acute (Massieu et al., 1995; Corona and Tapia, 2004; Tovar-y-Romo and Tapia, 2006) or in a chronic setting (Tovar-y-Romo et al., 2009b). In the present work we have used the later strategy in a chronic model of 4-AP administration in the spinal cord, in view that its acute perfusion caused behavioral evidence of hyperexcitability (muscle fasciculations and cramps), although animals were anesthetized, but no MN degeneration even when it transiently stimulated up to 5-fold glutamate release immediately after its administration (Corona and Tapia, 2004). In addition, these results contrast with our previous findings showing that infusing 4-AP through microdialysis stimulates the release of endogenous glutamate and triggers immediate behavioral and

EEG seizure activity and delayed excitotoxic glutamate-mediated neuronal death in the rat striatum (Morales-Villagran and Tapia, 1996) and hippocampus (Peña and Tapia, 1999, 2000). The effects of 4-AP on extracellular glutamate in the hippocampus were achieved almost immediately after its administration, and persistent activation (for at least 60 min) of the NMDA glutamate receptor is required for neuronal death (Ayala and Tapia, 2005).

Our present results show that, similarly to the acute administration, chronic 4-AP treatment *in vivo* failed to provoke spinal MN death and paralysis, although it did result in a hyperexcitability state manifested as muscle cramps and fasciculations. Though in this work we did not directly measure

the frequency or intensity of those behavioral manifestations, these were enough to provoke changes in either behavioral motor tasks: in rotarod as a trend toward a decrease in the time to fall, and in hindlimb grip assessment as a trend toward an increase in strength, which reached a maximum at day 5. Although MN number was assessed after 15 days of continuous 4-AP infusion, and no changes observed, it is difficult to envisage that MN degeneration could occur at 5 days but not being detected at 15 days. In order to confirm that these results are secondary to an increase in glutamatergic neurotransmission, suggestively due to 4-AP-mediated stimulation of endogenous glutamate release, we examined the NMDA and AMPA types glutamate receptors and found that their chronic blockade prevented the motor behavior late in the experiment (until day 3–5). Therefore, our data indicate that glutamatergic neurotransmission is enhanced in the spinal cord by 4-AP, and that this may account for the behavioral hyperexcitability observed. The importance of glutamatergic transmission in the excitability control of spinal cord MNs is well established, both for the NMDA (Kudo and Yamada, 1987) and AMPA receptors (Pook et al., 1993), albeit these data were obtained through *in vitro* preparations.

Endogenous glutamate is not the only neurotransmitter which release is stimulated by 4-AP infusion, as GABA release has also been demonstrated by our group in the striatum (Morales-Villagran and Tapia, 1996), hippocampus (Peña and Tapia, 1999), and spinal cord (Corona and Tapia, 2004) *in vivo*. So, we hypothesized that endogenous GABA, and the consequent activation of its GABA_AR, might counterbalance the potential neurotoxic effects of 4-AP-induced release of endogenous glutamate. The data we obtained from bicuculline treatment demonstrates the neurotoxic properties of chronic GABA_AR blockade for the spinal cord MNs, though they neither develop as rapidly or as severe, both in motor behavior and in MN loss, as chronic AMPA infusion (Tovar-y-Romo et al., 2007). The behavioral data also reveal that GABA_AR blockade potentiates the excitatory effect of 4-AP, but this is insufficient to enhance the bicuculline-induced MN degeneration. Thus, it seems that GABA_AR activation due to 4-AP-released endogenous GABA has no role in the lack of neurotoxic action of chronic 4-AP treatment.

This finding was unanticipated, since GABA_AR activation has consistently shown to be protective in models of neurodegenerative disorders where excitotoxicity has an important role (Rudolph and Knoflach, 2011). Also, GABA_ARs are expressed in spinal MNs (Bohlhalter et al., 1996), play an important role exerting tonic inhibition (Castro et al., 2011), and their activity has been implicated in MN disease (Ramirez-Jarquín et al., 2014). Indeed, several alterations in the GABA-mediated inhibitory control of synaptic excitability have been reported in models of MN disease: changes in subunit composition and ligand affinity (Carunchio et al., 2008) and decrease in GABA_AR expression (Petri et al., 2003). These data suggest that inhibitory GABAergic neurotransmission failure may contribute to MN degeneration. Our results with bicuculline are in agreement with this

statement, and are supported by a recent report in another *in vivo* model of MN excitotoxic death induced by a single intrathecal administration of NMDA and bicuculline (Ionov and Roslavtseva, 2012).

Since excitotoxicity implies an imbalance in excitatory and inhibitory inputs, with a resulting exaggeration of excitatory drive, we assumed that restoring inhibition by pharmacologically overactivating GABA_AR in MNs might prevent the AMPA-mediated degeneration. We found that muscimol did not result in an amelioration of excitotoxic MN degeneration, although it prevented the muscle cramps and hindlimb autotomy induced by AMPA. In addition, we noticed an acceleration of paralysis progression as manifested by a steeper decline in the time to fall and in the hindlimb grip strength values. We suggest that the overwhelming inhibitory drive produced by muscimol induced a “functional paralysis,” without affecting the AMPA receptor activation causing MN degeneration. This conclusion is supported by the behavioral partial paralysis induced by treatment with muscimol alone. Although the duration of muscimol infusion was different from the AMPA + muscimol infusion, it is possible to compare both treatments because no MN death was observed after 15 days of muscimol alone, while MN loss was almost complete after only 5 days of AMPA + muscimol. Therefore, no further neuronal loss were probable after 5 days. To the best of our knowledge, this is the first report on the effects of GABA_AR activation in the spinal cord *in vivo*, and indicates that inhibitory neurotransmission fails to prevent the excessive excitation caused by glutamate AMPA receptor overactivation. Another way to test the role of GABAergic neurotransmission in conditions of excessive excitatory drive would be to infuse 4-AP and muscimol, but muscimol would only add to the GABA_AR activation already being achieved by the 4-AP-mediated release of endogenous GABA, and therefore the contribution of GABA_AR activation could not be distinguished by this co-infusion. These results are largely in agreement with our previous work demonstrating a lack of protective effect of GABAergic neurotransmission-facilitating drugs in the NMDAR-dependent 4-AP-induced seizures and neurodegeneration in the hippocampus *in vivo* (Peña and Tapia, 2000), and with the lack of amelioration of clinical severity with the use of GABAergic drugs in ALS patients (Miller et al., 2001).

Although it might be possible that the stimulation of the release of other neurotransmitters may exert protective roles on spinal MNs *in vivo* (Ramirez-Jarquín et al., 2014) we did not explore that possibility. For instance, alterations in dopaminergic (Borasio et al., 1998) and serotonergic and noradrenergic (Bertel et al., 1991) neurotransmission have been documented in ALS patients, but there is scarce evidence of their role in excitotoxic MN degeneration. We propose that hyperexcitation produced only through direct receptor modulation (either inhibitory receptor blockade or excitatory receptor activation) may have a causal role in excitotoxic MN death, at least in relevant *in vivo* models. In view of our present, and of previous findings, it is challenging to establish a unifying model for the presynaptic mechanisms of excitotoxicity mediated by 4-AP throughout the mammalian nervous system. Better methodological strategies are

necessary to dissect simultaneously the role of the many (if not every) neurotransmitter systems involved in the effects of 4-AP across the central nervous system.

In summary, we found that chronic 4-AP infusion in the spinal cord *in vivo* does not elicit MN degeneration but does produce motor behavior alterations, and these partially depend on ionotropic glutamate receptor activation, indicating that they are due to endogenous glutamate released by 4-AP. Also, we established that chronic GABA_AR blockade produces MN degeneration and that this effect is not potentiated by 4-AP. However, chronic GABA_AR activation produces transitory paralysis, probably because of overinhibition of MN activity, but no MN degeneration, and this effect does not counterbalance the excitotoxic effects of chronic AMPA receptor activation.

REFERENCES

- Ayala, G. X., and 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. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04509.x
- Bertel, O., Malessa, S., Sluga, E., and Hornykiewicz, O. (1991). Amyotrophic lateral sclerosis: changes of noradrenergic and serotonergic transmitter systems in the spinal cord. *Brain Res.* 566, 54–60. doi: 10.1016/0006-8993(91)91680-Y
- Bohlhalter, S., Weinmann, O., Mohler, H., and Fritschy, J. M. (1996). Laminar compartmentalization of GABA_A-receptor subtypes in the spinal cord: an immunohistochemical study. *J. Neurosci.* 16, 283–297.
- Borasio, G. D., Linke, R., Schwarz, J., Schlamp, V., Abel, A., Mozley, P. D., et al. (1998). Dopaminergic deficit in amyotrophic lateral sclerosis assessed with [1-123] IPT single photon emission computed tomography. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 65, 263–265. doi: 10.1136/jnnp.65.2.263
- Carunchio, I., Mollinari, C., Pieri, M., Merlo, D., and Zona, C. (2008). GAB(A) receptors present higher affinity and modified subunit composition in spinal motor neurons from a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurosci.* 28, 1275–1285. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06436.x
- Castro, A., Aguilar, J., Andres, C., Felix, R., and Delgado-Lezama, R. (2011). GABA_A receptors mediate motoneuron tonic inhibition in the turtle spinal cord. *Neuroscience* 192, 74–80. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.06.073
- Corona, J. C., and 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. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02383.x
- Corona, J. C., and Tapia, R. (2007). Ca²⁺-permeable AMPA receptors and intracellular Ca²⁺ determine motoneuron vulnerability in rat spinal cord *in vivo*. *Neuropharmacology* 52, 1219–1228. doi: 10.1016/j.neuropharm.2006.12.008
- Dion, P. A., Daoud, H., and Rouleau, G. A. (2009). Genetics of motor neuron disorders: new insights into pathogenic mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* 10, 769–782. doi: 10.1038/nrg2680
- Ionov, I. D., and Roslavtseva, L. A. (2012). Coadministration of bicuculline and NMDA induces paraplegia in the rat. *Brain Res.* 1451, 27–33. doi: 10.1016/j.brainres.2012.03.015
- Jankowska, E., Lundberg, A., Rudomin, P., and Sykova, E. (1977). Effects of 4-aminopyridine on transmission in excitatory and inhibitory synapses in the spinal cord. *Brain Res.* 136, 387–392. doi: 10.1016/0006-8993(77)90816-2
- Kudo, N., and Yamada, T. (1987). N-methyl-D,L-aspartate-induced locomotor activity in a spinal cord-hindlimb muscles preparation of the newborn rat studied *in vitro*. *Neurosci. Lett.* 75, 43–48. doi: 10.1016/0304-3940(87)90072-3
- Martin, L. J., and Chang, Q. (2012). Inhibitory synaptic regulation of motoneurons: a new target of disease mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Neurobiol.* 45, 30–42. doi: 10.1007/s12035-011-8217-x

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RT designed and supervised the experiments, analyzed the results and wrote the final version of the manuscript. RL designed and carried out the experiments, analyzed the results and wrote the manuscript draft.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México (Projects 128229 and 240817), and by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (Project IN201013). RL is recipient of a CONACyT scholarship, and this work is part of his doctoral thesis in Biomedical Sciences.

- Massieu, L., Morales-Villagran, A., and 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, 2262–2272. doi: 10.1046/j.1471-4159.1995.64052262.x
- Mehta, A., Prabhakar, M., Kumar, P., Deshmukh, R., and Sharma, P. L. (2013). Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur. J. Pharmacol.* 698, 6–18. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.10.032
- Miller, R. G., Moore, D. H. II, Gelinas, D. F., Dronsky, V., Mendoza, M., Barohn, R. J., et al. (2001). Phase III randomized trial of gabapentin in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 56, 843–848. doi: 10.1212/WNL.56.7.843
- Morales-Villagran, A., and Tapia, R. (1996). Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum *in vivo*. *Neurochem. Int.* 28, 35–40. doi: 10.1016/0197-0186(95)00064-F
- Peña, F., and 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., and 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. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00400-0
- Petri, S., Krampfl, K., Hashemi, F., Grothe, C., Hori, A., Dengler, R., et al. (2003). Distribution of GABAA receptor mRNA in the motor cortex of ALS patients. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 1041–1051. doi: 10.1093/jnen/62.10.1041
- Pook, P., Brugger, F., Hawkins, N. S., Clark, K. C., Watkins, J. C., and Evans, R. H. (1993). A comparison of the actions of agonists and antagonists at non-NMDA receptors of C fibres and motoneurons of the immature rat spinal cord *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.* 108, 179–184. doi: 10.1111/j.1476-5381.1993.tb13459.x
- Ramirez-Jarquín, U. N., Lazo-Gomez, R., Tovar-y-Romo, L. B., and Tapia, R. (2014). Spinal inhibitory circuits and their role in motor neuron degeneration. *Neuropharmacology* 82, 101–107. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.10.003
- Rothstein, J. D., Martin, L. J., and Kuncl, R. W. (1992). Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 326, 1464–1468. doi: 10.1056/NEJM199205283262204
- Rudolph, U., and Knoflach, F. (2011). Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 685–697. doi: 10.1038/nrd3502
- Stoffel, W., Korner, R., Wachtmann, D., and Keller, B. U. (2004). Functional analysis of glutamate transporters in excitatory synaptic transmission of GLAST1 and GLAST1/EAAC1 deficient mice. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 128, 170–181. doi: 10.1016/j.molbrainres.2004.06.026
- Tiryaki, E., and Horak, H. A. (2014). ALS and other motor neuron diseases. *Continuum (Minneapolis)* 20(5 Peripheral Nervous System Disorders), 1185–1207. doi: 10.1212/01.con.0000455886.14298.a4

- Tovar-y-Romo, L. B., Santa-Cruz, L. D., and Tapia, R. (2009a). Experimental models for the study of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Neurodegener.* 4:31. doi: 10.1186/1750-1326-4-31
- Tovar-y-Romo, L. B., Santa-Cruz, L. D., Zepeda, A., and Tapia, R. (2009b). Chronic elevation of extracellular glutamate due to transport blockade is innocuous for spinal motoneurons *in vivo*. *Neurochem. Int.* 54, 186–191. doi: 10.1016/j.neuint.2008.09.015
- Tovar-y-Romo, L. B., and Tapia, R. (2006). Cerebral neurons of transgenic ALS mice are vulnerable to glutamate release stimulation but not to increased extracellular glutamate due to transport blockade. *Exp. Neurol.* 199, 281–290. doi: 10.1016/j.expneurol.2005.11.005
- Tovar-y-Romo, L. B., Zepeda, A., and 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. doi: 10.1097/nen.0b013e3181567c16
- Vera, G., and 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. doi: 10.1002/jnr.23006

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Lazo-Gómez and Tapia. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

RESEARCH

Open Access



Quercetin prevents spinal motor neuron degeneration induced by chronic excitotoxic stimulus by a sirtuin 1-dependent mechanism

Rafael Lazo-Gomez and Ricardo Tapia*

Abstract

Background: Excitotoxicity is a mechanism of foremost importance in the selective motor neuron degeneration characteristic of motor neuron disorders. Effective therapeutic strategies are an unmet need for these disorders. Polyphenols, such as quercetin and resveratrol, are plant-derived compounds that activate sirtuins (SIRT1s) and have shown promising results in some models of neuronal death, although their effects have been scarcely tested in models of motor neuron degeneration.

Methods: In this work we investigated the effects of quercetin and resveratrol in an in vivo model of excitotoxic motor neuron death induced by the chronic infusion of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) into the rat spinal cord tissue. Quercetin and resveratrol were co-infused with AMPA and motor behavior and muscle strength were assessed daily for up to ten days. Then, animals were fixed and lumbar spinal cord tissue was analyzed by histological and immunocytological procedures.

Results: We found that the chronic infusion of AMPA [1 mM] caused a progressive motor neuron degeneration, accompanied by astrogliosis and microgliosis, and motor deficits and paralysis of the rear limbs. Quercetin infusion ameliorated AMPA-induced paralysis, rescued motor neurons, and prevented both astrogliosis and microgliosis, and these protective effects were prevented by EX527, a very selective SIRT1 inhibitor. In contrast, neither resveratrol nor EX527 alone improved motor behavior deficits or reduced motor neuron degeneration, albeit both reduced gliosis.

Conclusions: These results suggest that quercetin exerts its beneficial effects through a SIRT1-mediated mechanism, and thus SIRT1 plays an important role in excitotoxic neurodegeneration and therefore its pharmacological modulation might provide opportunities for therapy in motor neuron disorders.

Keywords: Motor neuron disorder, Quercetin, Resveratrol, Sirtuin, Excitotoxicity

Background

Motor neuron disorders (MNDs) are a heterogeneous group of neurodegenerative diseases pathologically characterized by the loss of MNs, which notably include amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and spinal muscular atrophy (SMA). Chronic MN loss leads to gradually increasing weakness and paralysis, and ultimately to respiratory failure and death. These disorders are uniformly fatal, thus it is a

priority to characterize the basic mechanisms that cause MN degeneration as a mean to develop appropriate therapeutic interventions [1].

Glutamatergic excitatory neurotransmission is a fundamental process in the mammalian brain, but an excessive activation of glutamate receptors results in excitotoxic neuronal death [2]. Although several hypotheses have been advanced to explain the selective degeneration of MNs, there is ample evidence of a role of excitotoxicity in MND, especially for ALS, although a causal relationship remains to be established (for in-depth reviews see [3, 4]). For example, increased concentrations of glutamate have

* Correspondence: rtapia@ifc.unam.mx
División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito exterior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, Mexico

been found in cerebrospinal fluid of ALS patients [5], and in synaptosomes obtained from human mutated superoxide dismutase G93A gene (hSOD1^{G93A}) transgenic mice, an animal model of familial ALS, an increased basal release of glutamate has been documented [6, 7].

Our group designed an *in vivo* experimental model of chronic MN death in healthy rats through the infusion of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) directly in the lumbar spinal cord, using osmotic minipumps. With this model we replicated several important characteristics of MND: its chronic course, its onset in adulthood, and the fact that most of the cases are sporadic [8]. This approach has allowed us to study some of the basic mechanisms underlying excitotoxic MN death [9–11], and also to test potential strategies for neuroprotection, such as growth factors [12, 13] and energy substrates [14, 15].

Polyphenols are plant-derived compounds that have emerged as a promising therapeutic approach for several neurodegenerative disorders [16, 17]. This beneficial effect has been attributed to the allosteric activation of sirtuin 1 (SIRT1), the first member of the class III of oxidized nicotinic adenine dinucleotide (NAD⁺)-dependent histone deacetylases [18].

Among the vast amount of polyphenolic compounds discovered, resveratrol (RSV) and quercetin (QCT) are two of the most promising molecules. RSV is a well-documented sirtuin activating compound (STAC), and has shown neuroprotective effects *in vitro* and *in vivo* models of excitotoxic neuronal degeneration [19]. QCT has been shown to reduce glutamate-induced hippocampal [20] and retinal [21] neuronal death *in vitro*, as well as neuronal damage in an *in vivo* model of focal cerebral ischemia [22]. In addition, it was recently reported to be protective in a model of hypoxia-mediated hippocampal neurodegeneration by modulating SIRT1 expression [23]. However, studies on the effects of these compounds in experimental models of MND are scarce. Therefore, we explored the possible neuroprotective effects of RSV and QCT in our established model of chronic AMPA-induced excitotoxic spinal MN degeneration *in vivo*, and the involvement of SIRT1 as the mechanism of neuroprotection exerted by these polyphenols.

Methods

Animals

Adult Wistar male rats (280–300 g) were used in all of the experiments and were handled in accordance with the Rules for Research and Health Matters (Mexico), with international standards of research animal welfare (including ARRIVE guidelines), and with approval of the Institutional Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (protocol approval number RTI21–14). All animals were housed in a controlled laboratory environment

with a 12 h light/dark cycle, and fed with regular animal chow and water *ad libitum*. All surgical procedures were performed under general anesthesia, and every effort was made to minimize the number of animals used, as well as animal suffering during experimental procedures.

Drugs and osmotic minipump preparation

All drugs were dissolved in vehicle solution that consisted in a mixture of isotonic saline solution and 3% *v/v* dimethylsulfoxide. Osmotic minipumps (Alzet model 2004, volume ~250 μ L, flow rate 6 μ L/day; Durect, Cupertino, CA, USA) were filled with the indicated solutions, which were vehicle only (control group), AMPA [1 mM], and/or RSV, QCT and EX527, at concentrations calculated in such a way that the osmotic minipump delivered 1 nanomole/day (nm/d) or 10 nm/d, or a mixture of drugs, as indicated in Results.

Our group has previously reported that chronic infusion of AMPA into the rat spinal cord *in vivo* induces paralysis, MN degeneration and astrogliosis [12, 24]. In these studies a 7.5 mM concentration was used and this caused a relatively rapid (~3 days) paralysis and MN death, which makes testing potential neuroprotective drugs difficult. Therefore, we selected a lower concentration (1 mM) that we had previously shown to produce a more gradual and reproducible paralysis, MN degeneration and spinal cord gliosis, features characteristic of MNDs [12]. The concentrations of the remaining drugs were chosen on the basis of preliminary experiments. (R,S)-AMPA was purchased from Tocris Bioscience (Bristol, United Kingdom), and RSV, QCT and EX527 from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Surgical procedures for osmotic minipump implantation

Osmotic minipumps were prepared 48 h before surgical implantation, and were incubated at 37.0 °C in saline solution for flow rate stabilization. The procedure for osmotic minipump implantation was performed essentially as previously described [12], with minor modifications. Briefly, animals were anesthetized with 5.0% isoflurane in a 95% O₂/5% CO₂ mixture and placed in a spinal unit, and isoflurane concentration was gradually diminished to 1.5–2.0% as the surgery was performed. After shaving and disinfection, a median sagittal incision, ~4 cm long, was made in the back and the underlying fascia and muscle tissue were dissected until appropriate visualization of the L3 vertebral lamina was achieved. The spinous process was removed with a drill, and a ~2 mm diameter hole was drilled in the right lamina until the spinal cord tissue was visualized and the meninges were carefully removed with a metallic hook. A stainless-steel screw (3.7 mm long, 1 mm diameter) was fixed in the left lamina. A fused silica capillary (1 mm long, 50 μ m internal diameter, 80 μ m external diameter; VitroCom Inc.,

Mountain Lakes, NJ, USA) was carefully advanced down into the spinal cord in a vertical fashion 0.8 to 1 mm; this capillary was attached to a plastic tube (cannula) that was connected, and fixed with cyanoacrylate glue, to the osmotic minipump. During all these procedures great care was taken to avoid unnecessary damage to the spinal cord tissue. Dental cement was poured and let dry on the L3 vertebra, to fix both the screw and the cannula on place. Osmotic minipumps were subcutaneously placed in the back of the animal, at the right side of the vertebral column. Finally, the skin incision was closed with surgical stainless-steel clips, anesthesia was withdrawn, and animals received a single intraperitoneal antibiotic shot and were monitored until recovery (see Additional file 1: Figure S1A for details). In addition to control group, where vehicle was infused into the spinal cord tissue, a group of sham surgeries was performed to assess the potential effect of the cannula's glass capillary insertion into the spinal cord on the proliferation of astroglial and microglial cells. These surgical procedures were identical to those previously described until laminectomy completion, except no cannula and no osmotic minipump were implanted. Animals subjected to these sham surgeries were perfused/ fixed, as described below, 10 days after the procedure.

Behavioral assessment

Four to five days prior to surgery, rats were trained to walk during 120 s on an accelerating Rotarod (Columbus Instruments, Columbus, OH, USA), starting from 10 rpm (0.2 rpm/s of acceleration). Time to fall from the instrument was recorded, up to a limit of 120 s. Also, grip strength of both hind limbs was measured by placing the animals on their hind limbs on the metallic mesh of a grip strength meter (TSE Systems, Chesterfield, MO, USA) and gently pulling the tail to induce the animals to escape from the examiner; data was disregarded if the animals, when attempting to escape, used their forelimbs. The maximum force displayed by the instrument in every trial was recorded in ponds, and normalized to values obtained the day before surgery (day 0). In both tests the best time, or the greater force, out of three trials was recorded. Great care was taken to avoid excessive distress of the animals, and appropriate time between trials was given to animals for rest. These behavioral motor tasks were assessed daily for 10 days and, on this cutoff time, animals were sacrificed and fixed/perfused for histology.

Perfusion/fixation and Nissl staining

Behavioral assessment was concluded 10 days after minipump implantation, and rats were perfused and fixed for histological analyses as previously described [12]. Briefly, animals were deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital, the rib cage

was cut to expose the heart, and a wide cut in the right atria was made. A needle, connected to a peristalsis pump, was inserted into the left ventricle and ~250 ml of ice cold normal saline were perfused, followed by ~250 ml of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. The back was dissected, the acrylic implant removed, and the lumbar spinal cord tissue was obtained by pushing it out of the vertebral canal with cold saline solution in a syringe. Tissue was postfixed for 48 h at 4.0 °C, then dehydrated in increasingly concentrated sucrose solutions (10, 20 and 30%), and the region where the cannula was inserted was visually identified and used for study. Approximately 100 transverse sections (40 µm thick) were obtained in a cryostat, and the slices that showed the cannula's capillary glass track were used for analyses and, of these, 6–8 were processed for immunocytochemistry (see below), and 15 to 20 slices were stained with cresyl violet (Nissl staining) (for further details see Additional file 1: Figure S1B). The number of morphologically healthy MNs (multipolar neurons with clear cytoplasm, soma diameter > 20 µm and distinguishable nucleus) was counted in the ipsilateral and contralateral ventral horns (for a histological comparison of healthy and degenerating MNs see Additional file 1: Figure S1C). Micrographs were obtained with digital Nikon camera attached to a Nikon Eclipse optic microscope (Melville, NY, USA), with a 10X objective, of the ventral gray matter. All images were minimally manipulated *off-line*, with cropping and brightness/contrast adjusted to ensure better visualization of MNs.

Immunocytochemistry and confocal microscopy

To study the expression pattern of SIRT1 in the spinal cord tissue, double immunocytochemistry was performed on floating tissue sections of intact rats for SIRT1 and microtubule associated protein 2 (MAP2), ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1), or glial fibrillary acidic protein (GFAP). To perform glial cell counting in treated animals, double immunocytochemistry was performed for GFAP and Iba1 on floating tissue sections. First, sections were permeabilized with PBS 0.1 M/Triton X-100 0.3% v/v solution for 10 min; all subsequent procedures were carried on this solution. Then, tissue sections were blocked with bovine albumin 5% w/v for 120 min, and later incubated in the same blocking solution with primary antibody at 4.0 °C for 48 h with gentle shaking. Primary antibodies were used at the following dilutions: chicken anti-MAP2, 1:1000; chicken anti-GFAP, 1:1000; rabbit anti-Iba1, 1:500; and mouse anti-SIRT1, 1:50. All primary antibodies were purchased from Abcam (Cambridge, MA, USA). Later, primary antibodies were washed thrice, and antibody binding was revealed with the following secondary antibodies in the indicated dilutions: goat anti-chicken IgY

FITC, 1:200; donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 647, 1:200; goat anti-mouse IgG FITC, 1:200. All secondary antibodies were purchased from Life Technologies (Waltham, MA, USA). Tissue sections were exposed for 120 min to secondary antibodies in the dark and at room temperature, and then they were washed thrice before mounting in xylene-treated glass slides with simple fluorescent mounting medium (Dako Inc., Carpinteria, CA, USA, for glial cell counting) or with DAPI-containing mounting medium (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA, for SIRT1 location assessment). Fluorescence imaging was performed in a Zeiss LSM 710 (Oberkochen, Germany) confocal microscope. Imaging parameters (laser intensity, gain, digital offset, confocal aperture) were manually adjusted initially on tissues obtained from control group, and later on used on all other preparations. For glial cell counting, stacks were composed of images obtained every 2.5 μm that spanned the complete thickness of the tissue, with a 20X objective, of the ventral gray matter, composed of two channels: green for GFAP/FITC imaging and red for Iba1/AlexaFluor 647 imaging. Maximal intensity projections and merged images were obtained off-line with FIJI program [25].

Glial cell counting analysis off-line

An .lsm format composite image was obtained for each side of each slice of spinal cord tissue. At least 3 slices were analyzed per animal of 5 animals per group. Since we observed that cannula insertion, even in control groups, induced astrogliosis (although no microgliosis), we only used the data obtained from the contralateral side to cannulae insertion for analysis. To perform the automated counting of GFAP(+) and Iba1(+) particles, interpreted as astrocytes and microglial cells respectively, an Image J [26] programming language-based macro was designed. This macro instructed FIJI to open and split.lsm image channels (as described above, green for GFAP(+) particles and red for Iba1(+) particles), and to create and save composite 16-bit depth TIFF format images in separate folders, one for GFAP and one for Iba1. Then these TIFF images were subjected to Z-stacking, smoothing, and automated thresholding with the Max Entropy method. Binary versions of each Z-stack TIFF image were obtained, and automated particle analysis was carried on. For astroglial cells, GFAP(+) particles $>10 \mu\text{m}^2$ were counted, and for microglial cells, Iba1(+) particles $>19.5 \mu\text{m}^2$ were counted. This threshold was chosen based on the profile of the whole-particle frequency histograms displayed by the Analyze Particles tool of FIJI. In addition, a researcher, blinded to the results of this study, independently and manually counted a sample of the images, with comparable results obtained to those of the automated counting. Also, this macro obtained the area of tissue photographed, using

the GFAP/FITC channel TIFF images previously obtained. These images were Z-stacked, smoothed, and the Moments method of automated thresholding was applied. Then, the whole area of the image was quantified with the Measure tool. The number of particles in an area of ($\mu\text{m}^2 \times 10^5$) was used to calculate the mean values and standard deviation for each animal.

Statistical analysis

All statistical analyses were carried out in GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, USA). After checking data (time to fall, normalized grip strength, MN counting, GFAP+ particle counting and Iba1+ particle counting) followed a normal distribution with the D'Agostino-Pearson omnibus normality test, parametric versions of hypothesis testing were performed. A two-way ANOVA (in the case of behavioral tasks) followed by Tukey's post hoc test, or a one-way ANOVA (for number of healthy MN, and glial cell counting) followed by Tukey's post hoc test were used. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

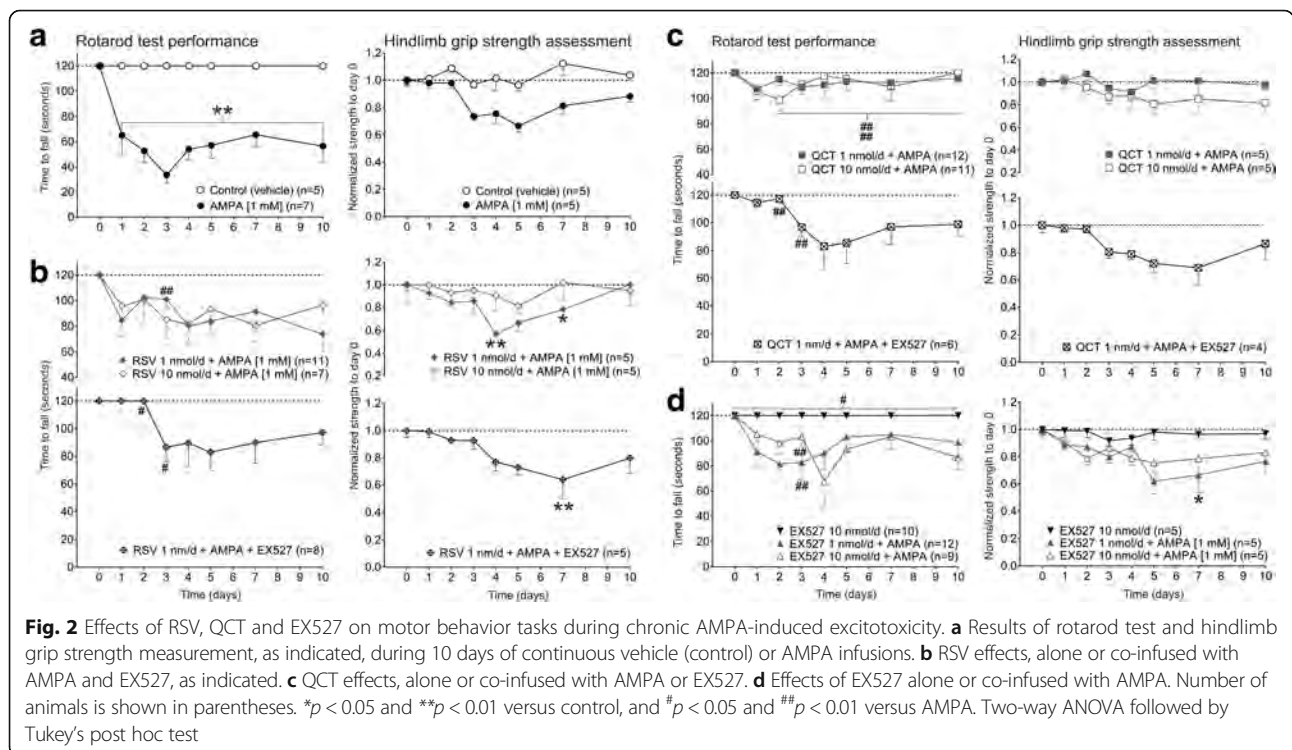
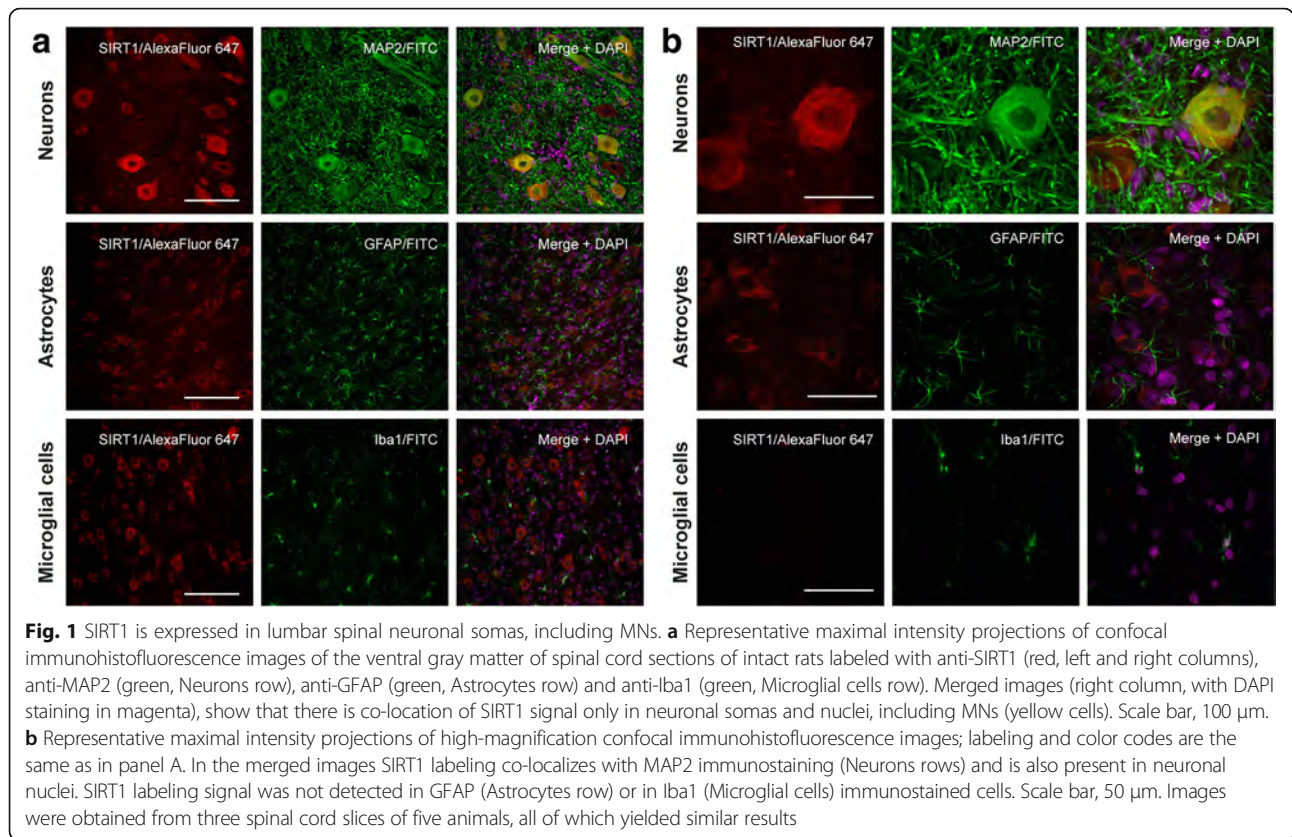
SIRT1 is expressed in neuronal cells in the spinal cord, but is absent in glial cells

We performed double immunohistochemistry in the spinal cord tissue slices of intact rats to describe the cellular location of SIRT1 expression. We observed that SIRT1 is widely expressed in the ventral gray matter of the spinal cord, especially in the soma and nuclei (DAPI-labeling) of MAP2-positive cells (neurons), but it was not found in GFAP(+) (astrocytes) and Iba1(+) (microglia) cells. (Fig. 1).

Motor behavior tasks changes induced by AMPA, RSV, QCT or EX527

The results of treatment with 1 mM AMPA for 10 days replicated previously reported data [12]. Treated animals showed a gradual, but incomplete, paralysis of the hindlimbs, beginning in the ipsilateral limb and later involving the contralateral one. This change was different from control group performance from day 1 until day 10 of infusion (Fig. 2a, left panel). Also, it is noteworthy that time to fall abruptly diminishes during the first three days (from 65.0 ± 16.0 s at day 1 until 33.5 ± 5.9 s at day 3), and then reaches a plateau value at ~ 57 s until day 10. As opposed, in the hindlimb grip strength assessment AMPA treatment did not induce significant strength reductions, although a trend towards lower values was observed ($\sim 33\%$ reduction from basal conditions at day 5; Fig. 2a, right panel).

RSV-alone infusion (at 10 nm/d) did not change motor behavior performance, as assessed by rotarod or hindlimb strength changes (data not shown). RSV, either at



1 nm/d or at 10 nm/d, co-infused with AMPA [1 mM] did not prevent the AMPA-induced decline in rotarod test performance, except for a significant protection ($p < 0.01$) at day 3 with the 1 mM concentration. We further explored the potential contribution of SIRT1 activation by RSV, so we used the very potent and selective inhibitor EX527 [27]. We co-infused RSV at 1 nm/d and AMPA [1 mM] with EX527 at 10 nm/d to ensure SIRT1 remained inhibited while RSV exerted its effects. This co-infusion resulted in a slight and transitory improvement in the time to fall from rotarod as compared to AMPA ($p < 0.05$ only at days 2 and 3), but was not different from the RSV 1 nm/day + AMPA group values (Fig. 2b, left panels). No changes in hindlimb grip strength were observed, although statistical significance was reached as compared to control at days 4 and 7 in the RSV 1 nm/d + AMPA group, and at day 7 in the RSV 1 nm/d + AMPA + EX527 group (Fig. 2b, right panels).

QCT-alone infusion did not induce reductions in time to fall or strength loss throughout the 10 days of infusion (data not shown). We also found that at both doses tested, 1 and 10 nm/d, QCT almost completely prevented the AMPA-induced paralysis, being significantly different from day 2 and throughout the 10 days of infusion ($p < 0.01$ versus AMPA for both concentrations), as assessed by rotarod. SIRT1 role in the QCT-mediated effects was also studied with EX527 at 10 nm/d. EX527 added to the infusion of QCT 1 nm/day + AMPA resulted in a reduced time to fall at days 2 and 3 when compared to AMPA ($p < 0.05$). However, when compared to QCT 1 nm/day + AMPA group values, a clear trend to diminished time to fall is observed from day 4 until day 10, although no significance was reached (Fig. 2c, left panels). In the hindlimb grip strength assessment (Fig. 2c, right panels), QCT-infusion resulted in no significant differences respect to AMPA or to control values, and a clear trend to reduced strength is noted when EX527 is added to QCT 1 nm/day + AMPA treatment, as well.

EX527-alone treatment did not result in reductions in the time to fall in rotarod test or in the hindlimb strength assessment (Fig. 2d, left panel). EX527 co-infused, at 1 and 10 nm/d, with AMPA did not show an increase in the time to fall from rotarod as compared to AMPA value, although a significant increased value was observed at day 3 ($p < 0.01$). No significant differences were appreciated in the hindlimb grip strength assessment in any group studied, although a clear trend toward reduced strength is observed in both doses when compared to control values ($p < 0.05$ only at day 7) (Fig. 2d, right panels).

Effects of RSV, QCT or EX527 on AMPA-induced MN degeneration

An almost complete absence of MNs in the ipsilateral side to the infusion was observed in Nissl stained

sections of the spinal cords of animals treated with AMPA after 10 days of continuous infusion, whereas in the contralateral side only a modest loss was evident (Fig. 3a). When quantified, more than 90% of MNs were lost in the ipsilateral side in the AMPA group (0.4 ± 0.3 versus 14.1 ± 0.6), whereas in the contralateral side remained approximately 60% of MNs as compared to control (8.7 ± 1.0 versus 15.0 ± 0.6 , $p < 0.01$; Fig. 3e, left histogram).

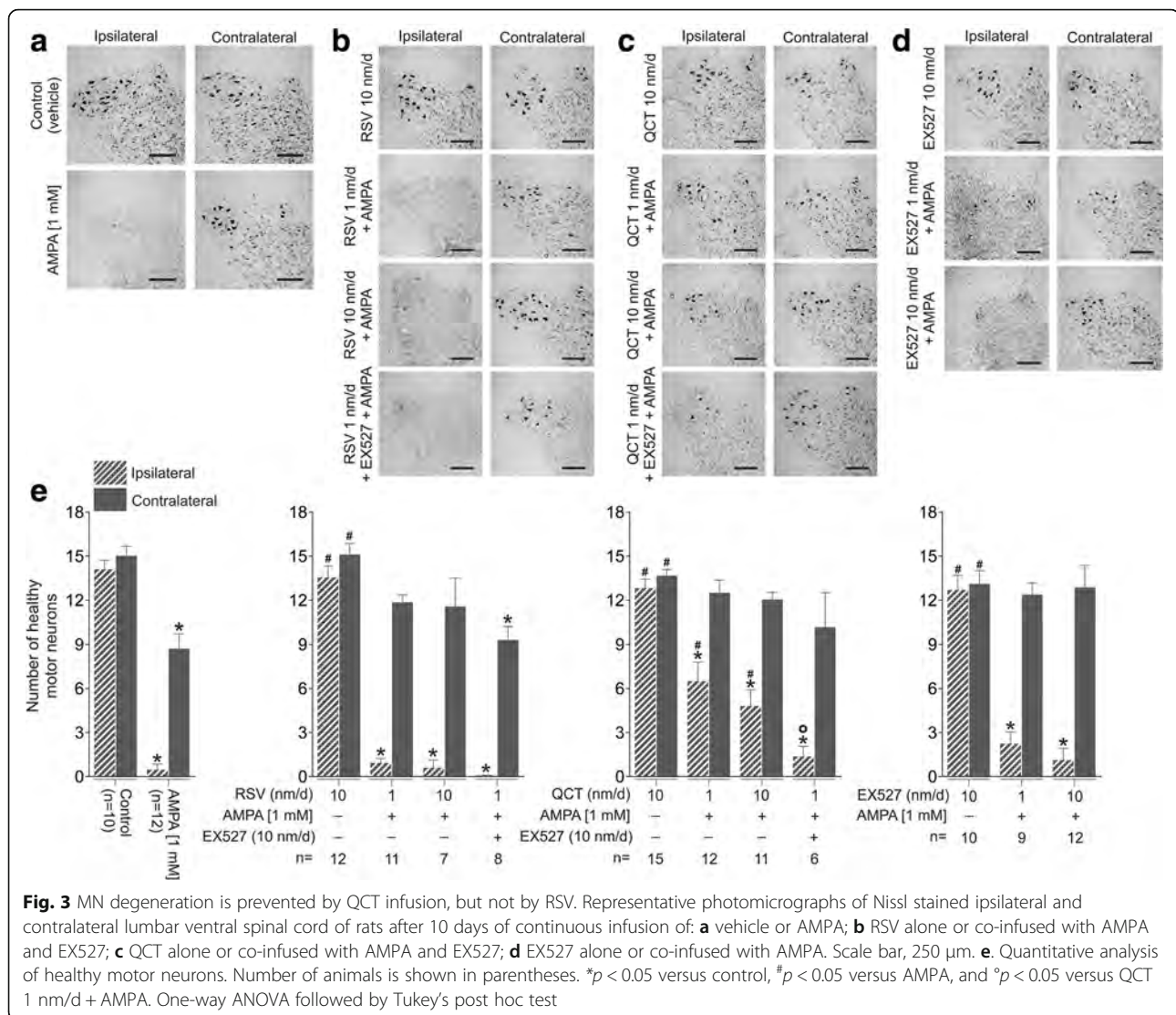
RSV-alone infusion did not change ventral spinal cord histology or MN number. RSV did not prevent the neurodegeneration provoked by AMPA after 10 days of infusion (Fig. 3b). MN quantification revealed no changes, both ipsilateral (0.9 ± 0.3 for RSV 1 nm/d and 0.6 ± 0.5 for 10 nm/d) and contralateral (11.8 ± 0.5 for RSV 1 nm/d and 11.5 ± 1.9 for 10 nm/d) to the infusion, when compared to AMPA (Fig. 3e, middle left histogram). Likewise, EX527 treatment in combination with RSV 1 nm/d + AMPA did not change spinal cord histology or MN number when compared to AMPA-alone infusion (0.1 ± 0.0 ipsilateral and 9.3 ± 0.9 contralateral versus 0.4 ± 0.3 ipsilateral and 8.7 ± 1.0 contralateral), although this values were significantly different to control values ($p < 0.05$; Fig. 3e, middle left histogram).

QCT ameliorated histological changes in the spinal cord (Fig. 3c), and prevented excitotoxic MN number diminution, especially in the ipsilateral side to the infusion (0.4 ± 0.3 in AMPA versus 6.4 ± 1.3 for QCT 1 nm/d + AMPA, $p < 0.05$; and 4.8 ± 1.1 for QCT 10 nm/d + AMPA, $p < 0.05$; Fig. 3e, middle right histogram). EX527-added infusion to QCT 1 nm/d + AMPA treatment induced a statistically significant reduction in MN number in the ipsilateral side when compared to QCT 1 nm/d + AMPA (1.3 ± 0.7 versus 6.4 ± 1.3 , $p = 0.027$, Fig. 3e, middle right histogram).

EX527-alone at 10 nm/d, even after 10 days of infusion, showed a ventral spinal cord histology (Fig. 3e) and MN number similar to control values (Fig. 3e, right histogram). EX527 co-infused with AMPA resulted in spinal cord histology similar to that of AMPA-treated animals (Fig. 3d), and MN number values not different to the AMPA group values (Fig. 3e, right histogram).

Effects of AMPA, RSV, QCT or EX527 on astrocytes and microglia number

Glial cell counting in the contralateral side revealed that GFAP(+) particle number does not change in control conditions (vehicle infusion for 10 days) as compared to sham (92.3 ± 5.2 versus 101.1 ± 12.9 , $p = 0.85$) (Figs. 4 and 5a). However, we observed a more than 2-fold increase in Iba1(+) particle number, which however did not reach significance (48.0 ± 1.4 versus 17.4 ± 2.7 , $p = 0.06$) (Figs. 6 and 7a). We expected this change, since glass capillary insertion into the spinal cord tissue might



induce cell death and inflammatory signaling, as has previously been described with stiff materials (such as borosilicate glass) implanted in the rodent brain [28]. AMPA treatment, as expected, was associated with a significant ~2-fold increase, as compared to control group values, in GFAP(+) particle (171.7 ± 11.1 versus 101.1 ± 12.9 , Figs. 4 and 5a) and Iba1(+) particle (91.9 ± 17.4 versus 48.0 ± 1.4 , Figs. 6 and 7a) number.

RSV-alone infusion (at 10 nm/d) did not change GFAP(+) particle (97.5 ± 8.7 versus 101.1 ± 12.9 in control, $p > 0.99$) or Iba1(+) particle numbers. AMPA-induced GFAP(+) particle number increase was prevented by RSV treatment, only at 10 nm/d (171.7 ± 11.1 versus 110.1 ± 8.3 , $p = 0.03$; Figs. 4 and 5b), but Iba1(+) particle number was not altered at neither RSV rate of infusion (87.8 ± 14.2 for 1 nm/d and 61.6 ± 18.2 for 10 nm/d versus 91.9 ± 17.4 , $p = 0.99$ and 0.593 , respectively; Figs. 6 and 7b). In contrast, adding EX527-infusion

to RSV 1 nm/d + AMPA treatment prevented GFAP(+) particle number increase ($p < 0.05$ versus AMPA and $p < 0.05$ versus RSV 1 nm/day + AMPA), although no significant changes in Iba1(+) particle number were attained, even when a clear trend towards a reduction was appreciated.

QCT-alone infusion did not cause changes in glial cell number when compared to control values, either in GFAP(+) particles (85.1 ± 4.0 versus 101.1 ± 12.9 , $p = 0.97$) or in Iba1(+) particles (57.4 ± 14.4 versus 48.0 ± 1.4 , $p = 0.87$). QCT prevented GFAP(+) and Iba1(+) particle number increases induced by AMPA, although only at the 1 nm/d dose (171.7 ± 11.1 versus 109.8 ± 4.5 for GFAP(+) particle number, $p = 0.018$, Figs. 4 and 5c; and 46.3 ± 7.1 versus 91.9 ± 17.4 for Iba1(+) particle number, $p = 0.049$, Figs. 6 and 7c), while the larger dose did not have any effect. Adding EX527-infusion to QCT 1 nm/d + AMPA treatment did not significantly reduce

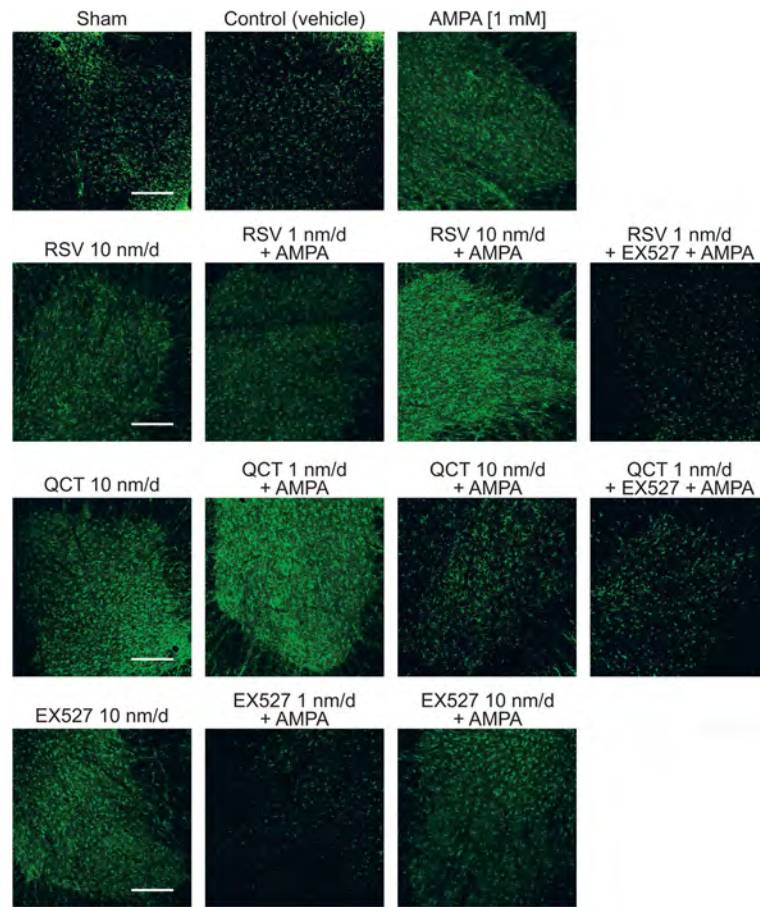


Fig. 4 Effect of RSV, QCT and EX527 on spinal astroglial cell number during chronic AMPA-induced excitotoxicity. Representative maximal intensity projections of fluorescent confocal micrographs of GFAP/FITC-immunostained lumbar ventral spinal cord sections of rats contralateral to the side of infusion after 10 days of the indicated treatments. Quantitative analysis is shown in Fig. 5. Scale bar, 200 μm

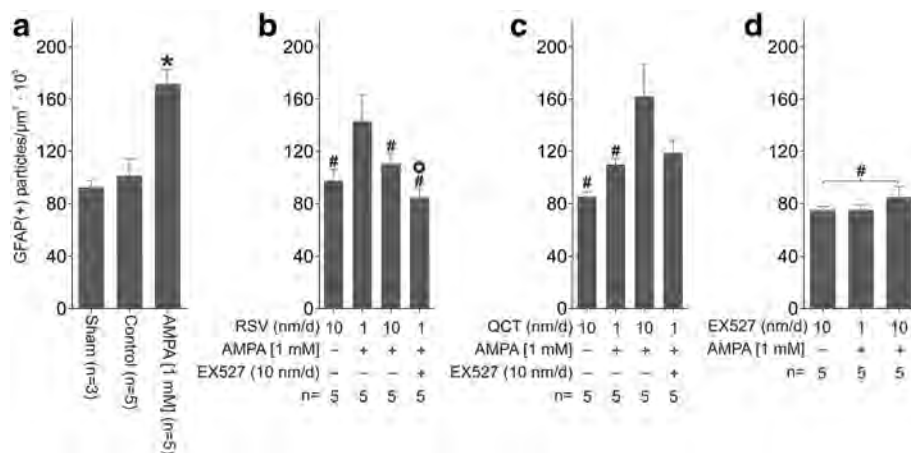


Fig. 5 Quantification of GFAP-labeled particles in the ventral horn contralateral to the infusion site. **a** Sham, and control and AMPA infusions. **b** RSV alone or co-infused with AMPA and EX527. **c** QCT alone or co-infused with AMPA and EX527. **d** EX527 alone or co-infused with AMPA. Number of animals is indicated below each column. * $p < 0.05$ versus control, # $p < 0.05$ versus AMPA, ° $p < 0.05$ versus RSV 1 nm/d + AMPA. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test

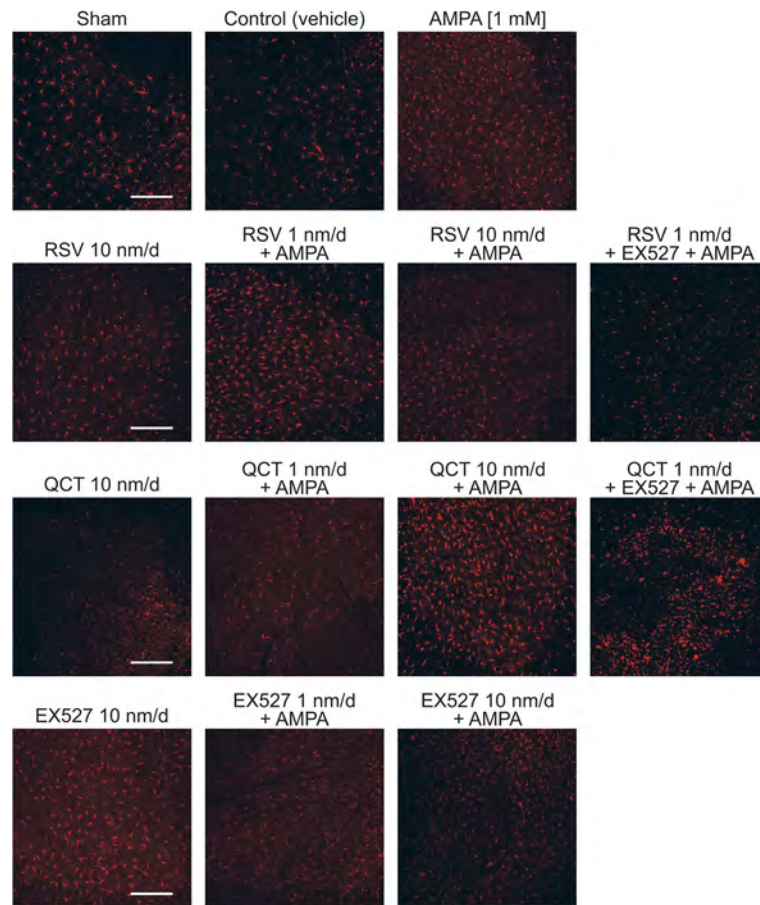


Fig. 6 Effect of RSV, QCT and EX527 on spinal microglial cell number during chronic AMPA-induced excitotoxicity. Representative maximal intensity projections of fluorescent confocal micrographs of Iba1/AlexaFluor 546-immunostained lumbar ventral spinal cord sections of rats contralateral to the side of infusion after 10 days of the indicated treatments. Quantitative analysis is shown in Fig. 7. Scale bar, 200 μm

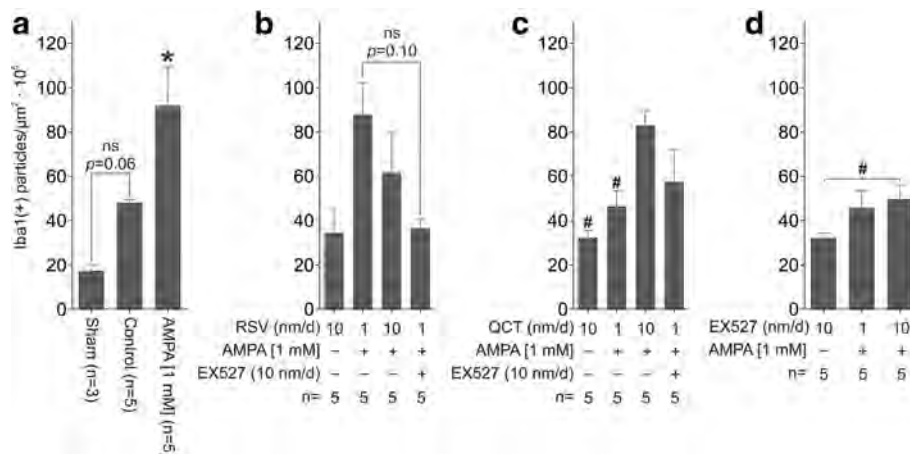


Fig. 7 Quantification of Iba1-labeled particles in the ventral horn contralateral to the infusion site. **a** Sham, and control and AMPA infusions. **b** RSV alone or co-infused with AMPA and EX527. **c** QCT alone or co-infused with AMPA and EX527. **d** EX527 alone or co-infused with AMPA. Number of animals is indicated below each column. * $p < 0.05$ versus control, and # $p < 0.05$ versus AMPA. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test

the GFAP(+) particle (118.6 ± 10.1 versus 109.8 ± 4.5 in QCT 1 nm/day + AMPA, $p = 0.99$) or Iba1(+) particle ($p = 0.96$ versus QCT 1 nm/day + AMPA) number, although a clear trend is evident.

EX527-alone treatment resulted in glial number similar to control values (75.0 ± 2.8 versus 101.1 ± 12.9 , $p = 0.28$ for GFAP(+) particles, Figs. 4 and 5d; 32.3 ± 2.0 versus 48.0 ± 1.4 , $p = 0.66$ for Iba1(+) particles, Figs. 6 and 7d). GFAP(+) and Iba1(+) particle numbers resulted markedly reduced by EX527 treatment in AMPA-induced excitotoxic conditions, without a dose-related effect, reaching values similar to control conditions ($p < 0.01$ versus AMPA for GFAP(+) particle quantification, and $p < 0.05$ versus AMPA for Iba1(+) particle quantification).

Discussion

In this work we investigated the effects of the polyphenols RSV and QCT in our model of excitotoxic MN death and, since polyphenols' efficacy has been attributed to SIRT1 activation [29], we also addressed the involvement of this sirtuin activity to the effects observed.

SIRT1 was located in the nuclei and cytoplasm of neurons, including those of MNs, of the lumbar spinal cord of intact rats. These results are similar to those recently reported in the spinal MNs of transgenic hSOD1^{G93A} mouse [30], whereas data from another group showed that SIRT1 is widely expressed in the brain and spinal cord of healthy humans and rodents, but restricted to the nuclei of neurons [31]. In post-mortem spinal cord tissue of ALS patients SIRT1 mRNA is increased [32], whereas in the hSOD1^{G93A} mouse a study reported increased levels of SIRT in the spinal cord [33], and according to another report this level decreases with disease progression [34]. We did not observe SIRT1 immunolabeling in astrocytes and microglial cells, which differs from the finding that SIRT1 is expressed in cultured mouse astrocytes [35], so this differences might be due to the different species and experimental conditions (in vivo and in vitro). In agreement, an exhaustive study of the expression pattern of sirtuins in the rat nervous tissue found that SIRT1 is present at low concentrations in whole tissue homogenates of the spinal cord, while in vitro is more abundant in neurons than in astrocytes [36].

RSV, classically described as a STAC that preferentially targets SIRT1 [37], did not exert significant protection against AMPA-induced paralysis or MN loss, although it prevented the AMPA-induced increase in the number of astrocytes, while it had no effect on microglial cell number. This was an unexpected result, given the numerous works supporting its potential as a protective agent in models of excitotoxic neuronal death. For example, RSV prevented glutamate-induced neuronal death in brain slices cultures [38], as well as neuronal loss in a model

of kainate-induced brain injury in vivo [39]. However, few studies have explored the role of RSV in experimental models of MN loss. RSV was shown to reduce spontaneous degeneration of primary cortical neurons transfected with hSOD1^{G93A} [40], and to upregulate SIRT1 expression in a culture of hSOD1^{G93A}-transfected MN-like cells [41]. This was corroborated in vivo in two studies, where RSV extended the survival of the transgenic hSOD1^{G93A} mice [30, 42], a result attributed to an upregulation of SIRT1 activity and to a prevention in spinal microgliosis and astrogliosis, as well as to an improvement of mitochondrial respiratory function. Although in the present work we did not address mitochondrial function, previous research from our group support the notion that AMPA-induced excitotoxicity involves energy disruption. Indeed, energy substrates administration prevents the alterations of mitochondrial respiratory complexes induced by AMPA in the spinal cord, and this is associated with MN survival and improved motor behavior performance [14, 15]. These findings reinforce the idea that AMPA-mediated chronic excitotoxicity and expression of hSOD1^{G93A} share common mechanisms that prompts MN degeneration.

Regardless of these similarities, RSV was not neuroprotective under our experimental conditions. In this respect, SIRT1 activation by RSV was not confirmed in the studies mentioned previously [30, 40–42], which might imply that RSV effects could be unrelated to SIRT1 expression or activation. In fact, results from recent work suggest that RSV might not be a STAC [43], and that other targets merit consideration, such as AMP-activated protein kinase (AMPK) [44]. Further, it has been suggested that the neuroprotective actions of RSV are not related to SIRT1 activation [45]. We propose that the activation of other molecular pathways by RSV, such as AMPK, might be deleterious for MN survival under AMPA-induced excitotoxic conditions in vivo, as has been shown in the hSOD1^{G93A} transgenic mice [46]. In agreement, it was recently reported that RSV did not protect hippocampal neurons in rat pups treated with kainic acid [47].

QCT exerted a remarkable effect preventing AMPA-induced paralysis, as evidenced by the performance in the rotarod test, as well as a moderate reduction in MN loss. These results were independent of the dose used, and were significant even with the lowest dose of 1 nanomole/day. QCT also diminished the astrogliosis and microgliosis induced by AMPA, but only at the lower dose. Previous studies have demonstrated that QCT is neuroprotective under excitotoxic conditions, albeit these results have been ascribed to the antioxidant capacity of QCT. For example, QCT protected against neuronal death and mitochondrial dysfunction caused by N-methyl-D-aspartate and adenosine diphosphate plus

iron in vitro [48]. Also, in a model of cerebral ischemia-reperfusion injury in vivo, QCT diminished infarct volume, improved behavioral deficits and reduced the levels of nitrite and malonyl dialdehyde, both markers of oxidant stress [22]. Whether QCT is a direct scavenger of reactive oxidant species or activates molecular pathways related to oxidant defenses was not addressed in these studies. We consider that the results observed in the present work are independent of QCT antioxidant activity, because we have shown previously that under similar experimental conditions reactive nitrogen species are nearly absent in spinal cord tissue [49] and, more importantly, that classical antioxidant molecules, such as glutathione and ascorbate, do not confer protection against neither acute [15] or chronic [14] excitotoxic damage to spinal cord MNs.

Data on the effects of QCT in the MND setting are very scarce. QCT increased survival of motor neuron 2 gene mRNA in cultured fibroblasts from patients affected by SMA [50], and increased survival of cultured lymphocytes obtained from familial ALS patients caused by the mutated SOD1 [51]. To the best of our knowledge, no studies investigating QCT effects in MND models have been carried out. However, the survival of embryonic spinal MNs from rats was increased by QCT [52].

Interestingly, we found that QCT beneficial effects were partially suppressed by the specific inhibitor of SIRT1, EX527, and that SIRT1 is located in neuronal cells in the spinal cord, specifically in their nucleus and cytoplasm, similarly to previous findings [30]. These results lead us to propose that QCT activates SIRT1, and that this is probably the mechanism of its protective action, rather than its antioxidant activity, as discussed above. In agreement, QCT-mediated survival in cultured neurons in a model of herpes simplex virus 1 infection was ascribed to the increase in SIRT1/AMPK axis activation [53]. In a model of hypobaric-hypoxic brain injury in vivo, QCT prevented cognitive deterioration through SIRT1 upregulation and consequent activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1- α), one of the master regulators of mitochondrial biogenesis [23]. Further, in an in vitro model of dopaminergic neuronal death induced by 6-hydroxydopamine and MitoPark, QCT prevented neuronal death through the activation of the protein kinase D/cAMP response element binding protein/PGC1- α axis, which led to the augmentation of mitochondrial biogenesis and function [54]. These studies suggest that QCT may exert its beneficial effects ultimately improving neuronal energetic state irrespective of its molecular targets.

How does SIRT1 activation protect endangered neurons? Intense research has evidenced that SIRT1 is involved in a vast amount of molecular pathways, most of them intertwined in a complex signaling network that

links energetic and metabolic stress to changes in gene expression through epigenetic modifications (histone deacetylation) and modulation of the transcriptional machinery (for a review on the subject see [55]). Which signaling pathway is activated by SIRT1 depends on the experimental model and conditions. Given the relative lack of specificity of the polyphenols, genetic strategies are most suitable to specifically study SIRT1. For example, in a study of double transgenic mice that overexpress SIRT1 in the central nervous system and also harbor the hSOD1^{G93A} mutation, an increased survival was observed, partly due to activation of the heat shock factor 1/inducible heat shock protein 70 chaperone system [56].

Interestingly, the chronic infusion of the SIRT1 inhibitor EX527 alone did not affect motor behavior or induced MN loss. Although SIRT1 expression in the hippocampus seems essential for normal cognitive function and synaptic plasticity in mice [57], no studies have investigated the role of SIRT1 in spinal cord physiology. We hypothesized that EX527 infusion would enhance excitotoxic MN loss and paralysis, since SIRT1 activity would be impaired. Surprisingly, no additional motor behavioral deficits or MN degeneration were observed. Robust experimental evidence in vitro has pointed out that excitotoxicity unequivocally leads to energetic stress, commensurate with reducing amounts of NAD(P)⁺ [58, 59]. Since NAD⁺ is SIRT1's required substrate for its catalytic activity [60], NAD⁺ depletion in excitotoxic conditions would result in SIRT1 activity downregulation, which will affect the signaling pathways necessary for survival of the stressed neurons, as has been recently shown [61]. In contrast, SIRT1 activity could also have deleterious effects: consumption of NAD⁺ in an already energetically compromised neuron may trigger cell death pathways activation, for example through enhanced poly(ADP)ribose polymerase activity [62]. In fact, recent studies have pointed out that SIRT1 inhibition (with nicotinamide) or knock-down may be beneficial for neuronal survival during excitotoxicity [63, 64] or oxidative stress [65]. Therefore, we propose that the lack of enhancement of MN death by EX527 might be due to an increased availability of NAD⁺ for other prosurvival pathways, such as energy restoration, as has been suggested in an in vivo model of prion-related neurodegeneration [66].

Besides paralysis and MN loss, we quantitatively confirmed that AMPA infusion induces an increase in astroglial and microglial cells in the spinal cord. This finding was previously reported by our group, but only qualitatively [12]. Numerous studies have already established the crucial role of glial cells in MN degeneration [67]. Our present findings suggest that the abundance of astroglial and microglial cells is not related to neuronal protection, since QCT protection was not accompanied

by a reduction in glial cell number. This implies that the molecular pathways modulated by RSV and QCT operate independently on MNs and glial cells, which argues against non-autonomous cell death mechanisms [68].

Conclusions

In summary, chronic AMPA-mediated excitotoxicity in the lumbar spinal cord *in vivo* induces MN death, manifested as hindlimb paralysis, as well as astrogliosis and microgliosis. The SIRT1 activator QCT prevents excitotoxic MN death, paralysis and gliosis, in part through a SIRT1-dependent mechanism, because the specific inhibitor EX527 partially suppressed QCT-exerted neuroprotective effects. RSV and EX527 had no effect on the AMPA-mediated excitotoxic spinal neurodegeneration. These results contribute to establish polyphenols as promising therapeutic targets in neurodegeneration, and offer insights into their possible mechanisms of action.

Additional file

Additional file 1: Figure S1. Procedure for the chronic infusion of drugs through osmotic minipumps into the L3-L4 segment of the spinal cord and effect of the drugs used. **(A)** Schematic representation of the site of infusion in the rat spinal cord (red dot), viewed from the animal's dorsum; the innervated hindlimb muscles by the respective spinal segments is indicated. **(B)** Representative low-magnification photomicrographs of Nissl stained lumbar spinal cord slices after 10 days of continuous infusion of the indicated treatments. Black arrows indicate the site of the cannula insertion. Note the effects of treatments (nm/d indicates nanomoles/day) on the MNs in the ventral horns, which are shown at higher magnification in Fig. 3. Scale bar, 500 μ m. **(C)** Representative high magnification photomicrographs of the healthy MNs of the contralateral side of an AMPA-treated rat (left) and of the degenerating MNs (right, white arrows) of the corresponding infused side (marked by squares in the low magnification micrograph of the AMPA-treated spinal cord). Scale bar, 100 μ m. (JPEG 2065 kb)

Abbreviations

ALS: Amyotrophic lateral sclerosis; AMPA: α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; AMPK: Adenosine mononucleotide phosphate-activated protein kinase; GFAP: Glial fibrillary acidic protein; hSOD1^{G93A}: Human mutated superoxide dismutase, with substituted glycine to alanine in position 93; Iba1: Ionized calcium-binding adapter molecule 1; MAP2: Microtubule associated protein 2; MN: Motor neuron; MNDs: Motor neuron disorders; NAD, NAD(P): Nicotine adenine dinucleotide (phosphate); QCT: Quercetin; RSV: Resveratrol; SIRT1: Sirtuin; SMA: Spinal muscular atrophy; STAC: Sirtuin activating compound

Acknowledgements

Not applicable.

Funding

This work was done under the auspice of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, protocol approval number 240817) and of Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM (protocol approval number IN204516). RLG is recipient of a CONACyT doctoral scholarship.

Availability of data and materials

The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

The two authors jointly designed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. RLG carried out the experiments. RT supervised and approved the general project. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

RLG is a doctoral student enrolled in Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas at Universidad Nacional Autónoma de México, and this work is part of his doctoral thesis.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 10 July 2017 Accepted: 3 November 2017

Published online: 21 November 2017

References

1. Tiryaki E, Horak HA. ALS and other motor neuron diseases. *Contin (Minneapolis)*. 2014;20:1185–207.
2. Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol*. 2013;698:6–18.
3. King AE, Woodhouse A, Kirkcaldie MTK, Vickers JC. Excitotoxicity in ALS: overstimulation, or overreaction? *Exp Neurol*. 2016;275:162–71.
4. Staats KA, Van den Bosch L. Excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *Handb. Neurotox. New York: Springer Science+Business Media*; 2014. p. 1209–22.
5. Spreux-Varoquaux O, Bensimon G, Lacomblez L, Salachas F, Pradat PF, Le Forestier N, 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;193:73–8.
6. Milanese M, Zappettini S, Onofri F, Musazzi L, Tardito D, Bonifacino T, et al. Abnormal exocytotic release of glutamate in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*. 2011;116:1028–42.
7. Bonifacino T, Musazzi L, Milanese M, Seguni M, Marte A, Gallia E, et al. Altered mechanisms underlying the abnormal glutamate release in amyotrophic lateral sclerosis at a pre-symptomatic stage of the disease. *Neurobiol Dis*. 2016;95:122–33.
8. Tovar-y-Romo LB, Santa-Cruz LD, Tapia R. Experimental models for the study of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener*. 2009;4:31.
9. 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;89:988–97.
10. Corona JC, Tovar-y-Romo LB, Tapia R. Glutamate excitotoxicity and therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Ther Targets*. 2007;11:1415–28.
11. Ramirez-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.
12. 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;66:913–22.
13. 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;4:121–9.
14. Netzahualcoyotzi C, Tapia R. Degeneration of spinal motor neurons by chronic AMPA-induced excitotoxicity *in vivo* and protection by energy substrates. *Acta Neuropathol Commun*. 2015;3:27.
15. Santa-Cruz LD, Guerrero-Castillo S, Uribe-Carvajal S, Tapia R. Mitochondrial dysfunction during the early stages of Excitotoxic spinal motor neuron degeneration *in vivo*. *ACS Chem Neurosci*. 2016;7:886–96.
16. Ebrahimi A, Schluesener H. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: potentials and pitfalls. *Ageing Res Rev*. 2012;11:329–45.

17. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18:1818–92.
18. Min SW, Sohn PD, Cho SH, Swanson RA, Gan L. Sirtuins in neurodegenerative diseases: an update on potential mechanisms. *Front Aging Neurosci*. 2013;5:53.
19. Zhang LN, Hao L, Wang HY, HN S, Sun YJ, Yang XY, et al. Neuroprotective effect of resveratrol against glutamate-induced excitotoxicity. *Adv Clin Exp Med*. 2015;24:161–5.
20. Yang EJ, Kim GS, Kim JA, Song KS. Protective effects of onion-derived quercetin on glutamate-mediated hippocampal neuronal cell death. *Pharmacogn Mag*. 2013;9:302–8.
21. Nakayama M, Aihara M, Chen YN, Araie M, Tomita-Yokotani K, Iwashina T. Neuroprotective effects of flavonoids on hypoxia-, glutamate-, and oxidative stress-induced retinal ganglion cell death. *Mol Vis*. 2011;17:1784–93.
22. Pandey AK, Hazari PP, Patnaik R, Mishra AK. The role of ASIC1a in neuroprotection elicited by quercetin in focal cerebral ischemia. *Brain Res*. 2011;1383:289–99.
23. Liu P, Zou D, Yi L, Chen M, Gao Y, Zhou R, et al. Quercetin ameliorates hypobaric hypoxia-induced memory impairment through mitochondrial and neuron function adaptation via the PGC-1 α pathway. *Restor Neurol Neurosci*. 2015;33:143–57.
24. Lazo-Gomez R, Tapia R. Motor alterations induced by chronic 4-Aminopyridine infusion in the spinal cord in vivo: role of glutamate and GABA receptors. *Front Neurosci*. 2016;10:200.
25. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9:676–82.
26. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9:671–5.
27. Gertz M, Fischer F, Nguyen GT, Lakshminarasimhan M, Schutkowski M, Weyand M, et al. Ex-527 inhibits Sirtuins by exploiting their unique NAD⁺-dependent deacetylation mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:E2772–81.
28. Moshayedi P, Ng G, Kwok JC, Yeo GS, Bryant CE, Fawcett JW, et al. The relationship between glial cell mechanosensitivity and foreign body reactions in the central nervous system. *Biomaterials*. 2014;35:3919–25.
29. Ayissi VB, Ebrahimi A, Schluesener H. Epigenetic effects of natural polyphenols: a focus on SIRT1-mediated mechanisms. *Mol Nutr Food Res*. 2014;58:22–32.
30. Mancuso R, del Valle J, Modol L, Martinez A, Granada-Serrano AB, Ramirez-Nunez O, et al. Resveratrol improves motoneuron function and extends survival in SOD1(G93A) ALS mice. *Neurotherapeutics*. 2014;11:419–32.
31. Zakhary SM, Ayubcha D, Dileo JN, Jose R, Leheste JR, Horowitz JM, et al. Distribution analysis of deacetylase SIRT1 in rodent and human nervous systems. *Anat Rec*. 2010;293:1024–32.
32. Komer S, Boselt S, Thau N, Rath KJ, Dengler R, Petri S. Differential sirtuin expression patterns in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) postmortem tissue: neuroprotective or neurotoxic properties of sirtuins in ALS? *Neurodegener Dis*. 2013;11:141–52.
33. Lee JC, Shin JH, Park BW, Kim GS, Kim JC, Kang KS, et al. Region-specific changes in the immunoreactivity of SIRT1 expression in the central nervous system of SOD1(G93A) transgenic mice as an in vivo model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res*. 2012;1433:20–8.
34. Valle C, Salvatori I, Gerbino V, Rossi S, Palamiuc L, Rene F, et al. Tissue-specific deregulation of selected HDACs characterizes ALS progression in mouse models: pharmacological characterization of SIRT1 and SIRT2 pathways. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1296.
35. Cheng Y, Takeuchi H, Sonobe Y, Jin S, Wang Y, Horiuchi H, et al. Sirtuin 1 attenuates oxidative stress via upregulation of superoxide dismutase 2 and catalase in astrocytes. *J Neuroimmunol*. 2014;269:38–43.
36. Sidorova-Darmos E, Wither RG, Shulyakova N, Fisher C, Ratnam M, Aarts M, et al. Differential expression of sirtuin family members in the developing, adult, and aged rat brain. *Front Aging Neurosci*. 2014;6:333.
37. Kaeberlein M, McDonagh T, Heltweg B, Hixon J, Westman EA, Caldwell SD, et al. Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J Biol Chem*. 2005;280:17038–45.
38. Moldzio R, Radad K, Krewenka C, Kranner B, Duvigneau JC, Rausch WD. Protective effects of resveratrol on glutamate-induced damages in murine brain cultures. *J Neural Transm*. 2013;120:1271–80.
39. Wang Q, Yu S, Simonyi A, Rottinghaus G, Sun GY, Sun AY. Resveratrol protects against neurotoxicity induced by kainic acid. *Neurochem Res*. 2004;29:2105–12.
40. Kim D, Nguyen MD, Dobbin MM, Fischer A, Sananbenesi F, Rodgers JT, et al. SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J*. 2007;26:3169–79.
41. Wang J, Zhang Y, Tang L, Zhang N, Fan D. Protective effects of resveratrol through the up-regulation of SIRT1 expression in the mutant hSOD1-G93A-bearing motor neuron-like cell culture model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*. 2011;503:250–5.
42. Song L, Chen L, Zhang X, Li J, Le W. Resveratrol ameliorates motor neuron degeneration and improves survival in SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:483501.
43. Behr D, Wu J, Cumine S, Kim KW, SC L, Atangan L, et al. Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity. *Chem Biol Drug Des*. 2009;74:619–24.
44. Dasgupta B, Milbrandt J. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:7217–22.
45. Tang BL. Resveratrol is neuroprotective because it is not a direct activator of Sirt1-a hypothesis. *Brain Res Bull*. 2010;81:359–61.
46. Lim MA, Selak MA, Xiang Z, Krainc D, Neve RL, Kraemer BC, et al. Reduced activity of AMP-activated protein kinase protects against genetic models of motor neuron disease. *J Neurosci*. 2012;32:1123–41.
47. Friedman LK, Goldstein B, Rafiuddin A, Roblejo P, Friedman S. Lack of resveratrol neuroprotection in developing rats treated with kainic acid. *Neuroscience*. 2013;230:39–49.
48. Silva B, Oliveira PJ, Dias A, Malva JO. Quercetin, kaempferol and biapigenin from *Hypericum Perforatum* are neuroprotective against excitotoxic insults. *Neurotox Res*. 2008;13:265–79.
49. Santa-Cruz LD, Tapia R. Role of energy metabolic deficits and oxidative stress in excitotoxic spinal motor neuron degeneration in vivo. *ASN Neuro*. 2014;6:83–93.
50. Uzunalli G, Bora-Tatar G, Dayangac-Erden D, Erdem-Yurter H. Effects of flavonoid quercetin on survival of motor neuron gene expression. *Cell Biol Int*. 2015;39:350–4.
51. Said Ahmed M, Hung WY, JS Z, Hockberger P, Siddique T. Increased reactive oxygen species in familial amyotrophic lateral sclerosis with mutations in SOD1. *J Neurol Sci*. 2000;176:88–94.
52. Ternaux JP, Portalier P. Effect of quercetin on survival and morphological properties of cultured embryonic rat spinal motoneurons. *Neurosci Lett*. 2002;332:33–6.
53. Leyton L, Hott M, Acuna F, Caroca J, Nunez M, Martin C, et al. Nutraceutical activators of AMPK/Sirt1 axis inhibit viral production and protect neurons from neurodegenerative events triggered during HSV-1 infection. *Virus Res*. 2015;205:63–72.
54. Ay M, Luo J, Langley M, Jin H, Anantharam V, Kanthasamy A, et al. Molecular mechanisms underlying protective effects of Quercetin against mitochondrial dysfunction and progressive Dopaminergic Neurodegeneration in cell culture and MitoPark transgenic mouse models of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2017;141:766–82.
55. Ng F, Wijaya L, Tang BL. SIRT1 in the brain-connections with aging-associated disorders and lifespan. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:64.
56. Watanabe S, Ageta-Ishihara N, Nagatsu S, Takao K, Komine O, Endo F, et al. SIRT1 overexpression ameliorates a mouse model of SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis via HSF1/HSP70 α chaperone system. *Mol Brain*. 2014;7:62.
57. Michan S, Li Y, Chou MM, Parrella E, Ge H, Long JM, et al. SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. *J Neurosci*. 2010;30:9695–707.
58. Schuchmann S, Buchheim K, Meierkord H, Heinemann U. A relative energy failure is associated with low-Mg²⁺ but not with 4-aminopyridine induced seizure-like events in entorhinal cortex. *J Neurophysiol*. 1999;81:399–403.
59. Heinemann U, Buchheim K, Gabriel S, Kann O, Kovacs R, Schuchmann S. Cell death and metabolic activity during epileptiform discharges and status epilepticus in the hippocampus. *Prog Brain Res*. 2002;135:197–210.
60. Feldman JL, Dittenhafer-Reed KE, Denu JM. Sirtuin catalysis and regulation. *J Biol Chem*. 2012;287:42419–27.
61. Wang S, Yang X, Lin Y, Qiu X, Li H, Zhao X, et al. Cellular NAD depletion and decline of SIRT1 activity play critical roles in PARP-1-mediated acute epileptic neuronal death in vitro. *Brain Res*. 2013;1535:14–23.
62. Martire S, Mosca L, D'Erme M. PARP-1 involvement in neurodegeneration: a focus on Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mech Ageing Dev*. 2015;146–148:53–64.
63. Liu D, Gharavi R, Pitta M, Gleichmann M, Mattson MP. Nicotinamide prevents NAD⁺ depletion and protects neurons against excitotoxicity and cerebral ischemia: NAD⁺ consumption by SIRT1 may endanger energetically compromised neurons. *NeuroMolecular Med*. 2009;11:28–42.
64. Liu D, Pitta M, Mattson MP. Preventing NAD(+) depletion protects neurons against excitotoxicity: bioenergetic effects of mild mitochondrial uncoupling and caloric restriction. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1147:275–82.

65. Li Y, Xu W, McBurney MW, Longo VD. SirT1 inhibition reduces IGF-1/IRS-2/Ras/ERK1/2 signaling and protects neurons. *Cell Metab.* 2008;8:38–48.
66. Zhou M, Ottenberg G, Sferrazza GF, Hubbs C, Fallahi M, Rumbaugh G, et al. Neuronal death induced by misfolded prion protein is due to NAD⁺ depletion and can be relieved in vitro and in vivo by NAD⁺ replenishment. *Brain.* 2015;138:992–1008.
67. Lasiene J, Yamanaka K. Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res Int.* 2011;2011:718987.
68. Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol.* 2009;187:761–72.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

