



**PEDECIBA BIOLOGÍA**  
**Sub-área Biología Celular y Molecular**

**TESIS DE MAESTRÍA**

**ESTUDIO DE LA UNIÓN NEUROMUSCULAR EN ESTADÍO ASINTOMÁTICO Y  
SINTOMÁTICO DEL MODELO EXPERIMENTAL DE ESCLEROSIS LATERAL  
AMIOTRÓFICA SOD1G93A EN RATAS.**

**Dra. Sofía Natalia Cerri Fassio**

**Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular**  
**Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE - MEC)**

**Laboratorio de Biología del Desarrollo (Departamento de Histología y  
Embriología – Facultad de Medicina - UDELAR)**

*Directora de tesis: Dra. Silvia Olivera-Bravo*

*Co-directora de tesis: Dra. Carmen Bolatto*

**Tribunal:**

Presidente: Dra. Giselle Prunell

Vocales: Dres. Marta Marco y José Manuel Verdes

**26 de Mayo de 2022**

## **AGRADECIMIENTOS**

*Al tribunal por aceptar corregir mi tesis.*

*A mis tutoras por orientarme con paciencia y constancia.*

*A los integrantes del Departamento y del Instituto por acompañarme durante el proceso.*

*A Mamá y Mauri por el apoyo constante y por recordarme siempre que puedo lograr lo que me proponga.*

*A Rodrigo por ser mi cable a tierra y compañero.*

## RESUMEN

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la muerte de motoneuronas superiores e inferiores, atrofia y parálisis muscular progresiva que conducen a la muerte, en la mayoría de los casos dentro de los 5 años posteriores al diagnóstico. La ELA es una enfermedad predominantemente esporádica, sin embargo, el 10% de los casos se transmite por herencia y desarrolla un cuadro clínico indistinguible de la enfermedad idiopática. La expresión de genes humanos defectuosos vinculados a la ELA ha llevado a la generación de modelos preclínicos que recapitulan los síntomas de la enfermedad humana. Uno de los modelos más robustos consiste en la sobreexpresión en roedores de la mutación G93A de la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1) humana. Los modelos SOD1G93A han llevado a proponer que la ELA es una enfermedad no autónoma celular, es decir la enzima humana mutada debe ser sobreexpresada en dos linajes celulares diferentes como motoneuronas y astrocitos o microglía para desencadenar la enfermedad, y han permitido dilucidar los principales mecanismos patogénicos. Sin embargo, el papel del músculo y de la unión neuromuscular (UNM) en el comienzo y progresión de la ELA aún está en debate. Mientras que algunos autores proponen que la neurodegeneración es anterógrada y comienza a nivel del cuerpo de la motoneurona, otra corriente propone que comienza en la terminal nerviosa o en la UNM. Dado que la UNM es la sinapsis que media la comunicación entre músculos y motoneuronas, la misma se verá afectada en cualquiera de las dos teorías propuestas. En este trabajo, se analizaron y cuantificaron los componentes presinápticos y postsinápticos de las UNM de músculo Extensor Digital Largo (EDL) y sóleo de ratas SOD1G93A asintomáticas (120 días) y sintomáticas (~200 días) y en ratas hermanas no transgénicas de cada edad. Se realizó el inmunomarcado del neurofilamento pesado del componente presináptico y la unión irreversible de la sonda  $\alpha$ -bungarotoxina a los receptores nicotínicos postsinápticos. En animales sintomáticos, el estudio se complementó con el análisis histológico y de expresión y actividad de metaloproteinasas de matriz en fibras musculares y con la evaluación sobre los mismos de los efectos de la violaceína, un compuesto antioxidante que no fue analizado anteriormente en enfermedades neurodegenerativas. Nuestros resultados permiten afirmar que existe: i- alteración significativa en los componentes de la UNM en ratas sintomáticas incluyendo la pérdida casi total de los componentes presinápticos y postsinápticos, fibras musculares heterogéneas con signos patológicos tales como atrofia (área total reducida y menor relación área de músculo/área total), mayor presencia de colágeno y de mastocitos degranulantes; ii- atrofia muscular que podría deberse al aumento de actividad inflamatoria y lítica que es sugerida por el aumento en la expresión y actividad de las metaloproteinasas de matriz 2 y 9 en músculo sóleo; iii- por primera vez reportamos los efectos protectores de la violaceína en la UNM y en el músculo en el modelo SOD1G93A en rata. En resumen, los datos aportados por esta tesis permiten proponer que en la UNM se observan alteraciones significativas en animales sintomáticos y son parcialmente prevenibles por la violaceína, lo que sitúa a la UNM como un blanco terapéutico temprano que debe ser estudiado en profundidad para intentar enlentecer la progresión de la enfermedad.

# Contenido

INTRODUCCIÓN	6
ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA	6
Generalidades	6
SOD1 mutadas como modelos experimentales de ELA	11
POSIBILIDADES TERAPÉUTICAS PARA LA ELA	12
Violaceína como posible fármaco neuroprotector	13
UNIÓN NEUROMUSCULAR	14
UNM en condiciones patológicas	17
UNM en ELA – estado actual del conocimiento	19
METALOPROTEINASAS DE MATRIZ	20
MMPs y UNM en la ELA	21
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	23
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
JUSTIFICACIÓN DE LOS OBJETIVOS PROPUESTOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	23
ANIMALES	23
GENOTIPADO MEDIANTE PCR	24
TRATAMIENTO CON VIOLACEÍNA	26
PROCESAMIENTO DE ANIMALES Y DISECCIÓN DE MÚSCULOS	26
Disección de músculo sóleo y EDL	26
INMUNOFLUORESCENCIA PARA RECONOCIMIENTO DE LA UNM	27
Teasing o peinado de las fibras musculares en EDL y SÓLEO	27
Incubación con anticuerpos primarios	28
Incubación con anticuerpos secundarios	28
Montaje	28
OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES DE LA UNM	28
INCLUSIÓN DE MÚSCULO SÓLEO EN PARAFINA INCLUIDO [BANCROFT Y GAMBLE 1997]	29
ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL MÚSCULO SÓLEO INCLUIDO [BANCROFT Y GAMBLE 1997]	30
Hematoxilina - Eosina	30
Tricrómicos	32
ANÁLISIS DE MMPS EN MÚSCULO SÓLEO	33
Inmunomarcado	33
Procesamiento de muestras para zimografía	33

Determinación de proteínas	33
Zimografía en gelatina	34
ANÁLISIS DE DATOS	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LAS UNM EN MÚSCULO EDL DE ANIMALES TRANSGÉNICOS ASINTOMÁTICOS Y SINTOMÁTICOS	35
Descripción de los componentes de la UNM analizados	35
Determinación de los diámetros de fibras y frecuencia de diámetros en animales No Tg y Tg	39
Análisis morfométrico de la UNM de EDL – medida de los componentes pre y postsinápticos	40
Análisis morfométrico de la UNM de EDL – evaluación de la cobertura (“coverage”) sináptica	43
Resumen de la cuantificación de UNMs en EDL de animales NoTg y Tg	45
ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA UNM DE LOS MÚSCULOS EDL Y SÓLEO EN ANIMALES TG SINTOMÁTICOS Y NO TG DE LA MISMA EDAD	47
Análisis morfométrico y comparativo de la UNM de EDL y sóleo relativos a los diámetros de fibra	48
RESPUESTAS DEL MÚSCULO SÓLEO AL TRATAMIENTO CON VIOLACEÍNA	53
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	60
CONCLUSIONES	60
PERSPECTIVAS	60
REFERENCIAS	61
ANEXO	81

# INTRODUCCIÓN

## ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

### Generalidades

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva, actualmente incurable, que causa debilidad muscular, discapacidad y la muerte del paciente, observándose una supervivencia media de tres a cinco años posterior al diagnóstico. La ELA es una de las múltiples enfermedades degenerativas de las motoneuronas y produce la afectación selectiva y la pérdida progresiva de las motoneuronas que inervan los músculos estriados. Esta degeneración se da tanto en las motoneuronas superiores de la corteza motora y sus proyecciones corticobulbares y corticoespinales como en las motoneuronas inferiores del tronco encefálico y la médula espinal. La ELA fue descrita por primera vez en el siglo XIX por Charcot, un neurólogo francés que correlacionó los síntomas clínicos con las lesiones anatómicas y diferenció esta enfermedad de otras patologías neurológicas denominándose así al encontrar los haces corticoespinales laterales degenerados (esclerosis lateral) en pacientes con gran pérdida de masa muscular (amiotrófica) [Rowland 2001].

Las causas exactas que generan esta patología siguen siendo desconocidas aunque la misma puede asociarse a factores de tipo genéticos y no genéticos. La etiología no genética o esporádica representa a 90 - 95% de los casos de ELA, mientras que las causas genéticas constituyen entre el 5 al 10% de los casos, tratándose la mayoría de una herencia autosómica dominante y en algunas ocasiones muy esporádicas, una herencia autosómica recesiva a través de genes mitocondriales o ligados al cromosoma X [Al-Chalabi y Hardiman 2013]. Actualmente se conocen algunos de los genes involucrados en la enfermedad (*C9ORF72*, *SOD1*, *TDP43*, *FUS*, *NCS-1*) y también algunos genes que indican susceptibilidad para desarrollarla (*NEK1*, *KIF5A*, *ATXN2*, *EPHA4*). Todos ellos están involucrados en una variedad de funciones celulares, como por ejemplo el procesamiento de ARN, autofagia, transporte vesicular y metabolismo energético [Zufiría y cols. 2016]. Otros genes relacionados con el procesamiento genético que también están implicados en la patogenia de la ELA son los que codifican la familia de proteínas FET, de la cual *FUS* es uno de sus miembros [Bertolotti y cols. 1996] y cuyas mutaciones parecen estar implicadas en un 4% de los casos de ELA familiar y menos de un 1% de los de ELA esporádico [Mackenzie y cols. 2010]. Una investigación reciente, sugiere la existencia de un vínculo directo entre las vías de señalización de *FUS* y la UNM, provocando formas agresivas de la enfermedad [Picchiarelli y cols. 2019]. Otros estudios se relacionan con la proteína agrina, una proteína que se sintetiza en las motoneuronas, se transporta a través de los axones, se libera en los terminales motores y se incorpora a la lámina basal en la hendidura sináptica [Cohen y Godfrey 1992]. Se ha propuesto que la agrina es crítica en la organización y diferenciación postsináptica basándose en sus patrones de expresión y de actividad y su alteración podría participar en el inicio o en la progresión de la ELA.

En cuanto a la epidemiología, las tasas de incidencia de la ELA en Europa y América del Norte oscilan entre 1.5 y 2.7 por 100.000 personas/año, mientras que las tasas de prevalencia oscilan entre 2.7 y 7.4 por 100.000 personas/año. En los Estados Unidos, las tasas de ELA son más altas entre las personas blancas en comparación con las de otros grupos étnicos [Mehta 2014]. La incidencia de ELA aumenta con cada década, especialmente después de los 40 años y alcanza su punto máximo a los 74 años, disminuyendo posteriormente [Worms 2001]. En Uruguay, la cantidad de personas con ELA es similar a la de otras partes del mundo, con una incidencia de 1.42 cada 100.000 habitantes/año y una prevalencia de 1.2 casos por cada 100.000 habitantes [Vázquez 2008], sin embargo la sobrevida es menor probablemente debido a diferencias entre los sistemas sanitarios [Gil 2009].

El diagnóstico de ELA se basa en criterios clínicos entre los que se incluyen la presencia de signos relacionados a motoneuronas superiores e inferiores, la progresión de la enfermedad y la ausencia de una explicación alternativa. No existe hasta el momento una prueba diagnóstica única que pueda confirmar o excluir por completo el diagnóstico de enfermedad de las motoneuronas. Consideraremos que estamos frente a un paciente con ELA cuando lo sugieren la anamnesis y el examen físico, que son respaldados por estudios de electrodiagnóstico y no son excluidos por estudios de laboratorio ni de neuroimagen. Los pacientes de ELA presentan síntomas progresivos consistentes con la disfunción de las motoneuronas superiores e inferiores presentes en uno de los cuatro segmentos del cuerpo (craneal/bulbar, cervical, torácica y lumbosacra), seguido de la propagación a otros segmentos durante un período de meses a años. El curso de la enfermedad es insidiosamente progresivo sin períodos de remisión de los síntomas y puede acompañarse con una pérdida de peso involuntaria y atrofia muscular [Chaudhuri 1995; Vázquez 2008].

Entre los signos y síntomas asociados al daño de la motoneurona superior se describen espasticidad, movimientos alternos rápidos y lentos con reflejos aumentados, trastornos de la marcha de tipo espástico, rigidez, lentitud y falta de coordinación de los movimientos tanto en miembros superiores como en miembros inferiores y espasmos espontáneos de los flexores. Cuando hay afectación de la motoneurona inferior se describe debilidad; reflejos reducidos; atrofia muscular y fasciculaciones. Los fenómenos que se consideran excluyentes para el diagnóstico de la enfermedad son las alteraciones de la motilidad ocular que incluyen paresia supranuclear de la mirada, temblor u otros movimientos involuntarios, ataxia cerebelosa, síntomas extrapiramidales y disfunción autonómica. Se considera un síndrome denominado de ELA más (plus) si una o más de estas características ocurren en un paciente con ELA típica [Chaudhuri 1995].

Se han diseñado criterios diagnósticos para ELA con fines científicos para garantizar la inclusión adecuada de pacientes en los ensayos clínicos y para permitir la asignación de certeza diagnóstica. Los criterios de la Federación Mundial de Neurología de El Escorial, conocidos como criterios de Airlie House incluyen los signos de las neuronas motoras superiores e inferiores ya mencionados y la progresión de los síntomas a lo largo del tiempo [Chaudhuri 1995]. Según la certeza diagnóstica de la evaluación clínica, los pacientes pueden clasificarse en "ELA definida", "ELA probable" o "ELA posible" teniendo en cuenta que las categorías de certeza diagnóstica no predicen necesariamente la progresión de la enfermedad [Traynor 2000; Turner 2020]. En 2019 se propusieron criterios de diagnóstico simplificados denominados "criterios de Gold Coast" [Shefner 2020]. En algunas ocasiones, la evaluación clínica de pacientes con signos y síntomas de enfermedad de la motoneurona no cumple los criterios de diagnóstico de ELA, siendo algunas veces adquiridos en la evolución de la enfermedad y en otros, los síntomas siguen siendo consistentes con un fenotipo más restringido de enfermedad de la motoneurona. Por otra parte, las pruebas genéticas no han sido tradicionalmente una parte rutinaria de la evaluación diagnóstica de la ELA, pero es importante destacar que hay pruebas genéticas disponibles para buscar mutaciones causales en varios genes y es posible identificar la mutación patogénica en aproximadamente el 80% de los pacientes con ELA de etiología familiar.

### ***Mecanismos patológicos participantes en la ELA***

Si bien existe consenso de que la ELA parece ser una enfermedad multifactorial donde la edad es un factor de riesgo, junto con los factores genéticos y ambientales, se desconocen los mecanismos conducentes a la enfermedad. Además, se acepta que los mecanismos que

conducen a la enfermedad en casos esporádicos pueden ser mucho más complejos y al menos tan heterogéneos como los descritos para las formas familiares. Se acepta además, que en cualquier caso e independiente del agente o condición desencadenante, una vez iniciado el proceso patológico, una cascada de alteraciones metabólicas y celulares precipitan un círculo vicioso en la ELA, tal como ocurre en otras enfermedades neurodegenerativas, que favorece la progresión de la enfermedad [Zufiría y cols. 2016]. Por lo tanto, las anomalías en las funciones neuronales a menudo están relacionadas con la combinación de alteraciones a varios niveles desde el procesamiento de genes hasta alteraciones funcionales complejas.

Entre los mecanismos patológicos implicados en la patogénesis de la ELA se incluyen excitotoxicidad, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, deficiencias en el transporte axonal, formación de agregados proteicos, metabolismo aberrante del ARN y las proteínas dentro de las neuronas motoras, junto con cambios patológicos en las células gliales circundantes [Ince y cols. 2011; Kuzma-Kozakiewicz y Kwiecinski 2011]. Además, las deficiencias y alteraciones específicas de los músculos también pueden contribuir a la enfermedad, en particular a la pérdida de la inervación muscular y al desarrollo de los síntomas de la enfermedad [Dupuis y cols. 2003]. La ELA es, por lo tanto, una enfermedad multisistémica compleja que implica la perturbación de varias vías celulares en varios tipos de células cuyas interacciones aún se desconocen [Boillee y cols. 2006].

La excitotoxicidad mediada por glutamato fue uno de los primeros mecanismos propuestos en ELA. El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el Sistema Nervioso Central (SNC), es liberado al espacio extracelular por los terminales presinápticos y activa receptores de glutamato facilitando la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  en la neurona postsináptica. Los estímulos excitatorios deben ser rápidos y transitorios para conseguir un correcto funcionamiento sin producir excitotoxicidad. Para ello, el glutamato debe ser retirado rápidamente de la hendidura postsináptica por transportadores de glutamato, siendo el más abundante el EAAT2/GLT1 (Transportador de aminoácidos excitatorios de tipo 2) presente en astrocitos [Taylor y cols. 2016]. Los niveles elevados de glutamato en el espacio extracelular producidos por pérdida selectiva de EAAT2 producen la excitotoxicidad, lo que conlleva a una hiperactivación de los receptores postsinápticos [Riancho y cols. 2019] produciéndose una entrada masiva y constante de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior de la neurona. Ello provoca una alteración de la homeostasis del calcio, la activación de rutas proteolíticas y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). La excitotoxicidad puede además dañar organelos intracelulares y aumentar los niveles de mediadores proinflamatorios [Kiernan y cols. 2011]. Las motoneuronas son muy sensibles al daño excitotóxico por glutamato ya que carecen de proteínas fijadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  y además son ricas en receptores de glutamato de tipo AMPA, lo que las hace más permeables al calcio y por tanto más vulnerables a un desajuste en las concentraciones de este catión [Laslo y cols. 2001]. La sobreexpresión del transportador EAAT2 en ratones transgénicos SOD1 mutantes es uno de los hallazgos claves que respaldan el papel de la excitotoxicidad en la fisiopatología de la ELA dado que generó un retraso en la aparición de deficiencias motoras [Turner y cols. 2013].

La implicancia del estrés oxidativo en la patogénesis de la ELA ha sido ampliamente descrita por varios autores, afectando al ADN y ARN, proteínas y lípidos dentro de las áreas patológicamente afectadas en los pacientes [Shaw y cols. 1995; Beal y cols. 1997; Fitzmaurice y cols. 1997] y en modelos celulares y animales de la enfermedad [Ferrante y cols. 1997; Andrus y cols. 1998; Menzies y cols. 2002]. Los biomarcadores de estrés oxidativo se encuentran en orina, líquido cefalorraquídeo, sangre y tejidos de pacientes de ELA y algunos antioxidantes o capturadores de radicales libres han mostrado resultados promisorios en modelos preclínicos de la enfermedad, lo que sugiere un papel del estrés oxidativo en la promoción de la progresión de

la enfermedad [Crow y cols. 2005; Marden y cols. 2007; Harraz y cols. 2008]. En este sentido, la edavarona que fue aprobada muy recientemente como terapia para la enfermedad es un eliminador de radicales libres asociados a oxígeno (ROS) y a nitrógeno (RNS). Además, este mecanismo, nocivo por sí mismo, también puede exacerbar otros mecanismos que contribuyen a la neurodegeneración en la ELA [Barber y cols. 2006; Rao y Weiss 2004; Rakhit y cols. 2002].

Además, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial están directamente interrelacionados entre sí, lo que ayuda desde ambos lados a la elevación de los RNS y ROS. Los ROS pueden causar mutaciones en el ADN mitocondrial, permeabilidad de la membrana mitocondrial y afectar la homeostasis del  $Ca^{2+}$ , además de mejorar la oxidación de lípidos y la carbonilación de las proteínas. Por lo tanto, independientemente de si el estrés oxidativo es una causa primaria de neurodegeneración o una consecuencia secundaria de otro insulto negativo como la disfunción mitocondrial, la evidencia sugiere que es un factor importante que contribuye a la pérdida de motoneuronas en la ELA.

Respecto de las alteraciones en el transporte axonal, las motoneuronas son células grandes altamente polarizadas que poseen axones de gran longitud lo que constituye una característica anatómica excepcional y única. El transporte axonal, dependiente de ATP, es vital para el abastecimiento de componentes esenciales como el ARN, las proteínas y los organelos celulares a los compartimentos axonales y a las estructuras sinápticas de la UNM [Ferraiuolo y cols. 2011]. Este transporte ocurre, de manera anterógrada desde el soma hacia la UNM mediado por kinesinas dependientes de microtúbulos y de manera retrógrada, mediante dineínas desde el axón hacia el soma [Pasinelli y Brown 2006]. La alteración en el citoesqueleto axonal, se da especialmente a nivel de los neurofilamentos y ocurre en la ELA esporádica y en la familiar [Taylor y cols. 2016], aunque el mecanismo causante de la alteración en el transporte axonal no está claro. Se ha considerado que las alteraciones en este transporte son secundarias a múltiples desórdenes como la disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y agregados proteicos; sin embargo, en los últimos años se han identificado mutaciones en genes que codifican proteínas directamente implicadas en el transporte axonal como DCTN (dinactina-1), PFN1 (Profilina-1), TUBA4A (tubulina  $\alpha$ -4A), KIFAP3 (Proteína 3 asociada a kinesina) y NEFH (neurofilamento pesado), que podrían participar en la alteración de dicho transporte [Hardiman y cols. 2017].

También se reporta que muchos de los mecanismos patogénicos propuestos para desempeñar un papel en la ELA resultan en la aparición de agregados proteicos lo que constituye una de las características claves en la enfermedad. De hecho, la evidencia sugiere que todos los aspectos del control de calidad de las proteínas se ven afectados en la ELA, incluyendo la traducción de proteínas debido a alteraciones del metabolismo de ARNm, así como el plegamiento y el transporte de proteínas, la autofagia, la inhibición del proteasoma y el estrés de retículo endoplasmático (RE) [Ferraiuolo y cols. 2011; Benbrook y Long, 2012]. En este sentido, en la patogenia de ELA se ha generado evidencia que involucra el sistema ubiquitina proteasoma a través del cual la mayoría de las proteínas mal plegadas o agregadas normalmente se degradan. Se ha demostrado en tejido post-mortem de pacientes y en modelos celulares de ELA que la actividad del proteasoma se reduce significativamente en las motoneuronas [Urushitani y cols. 2002; Cheroni y cols. 2009; Kabashi y cols. 2012]. Los ratones knock-out que carecen de la proteína transportadora de receptores 3 (Rpt3) que es esencial para la formación del proteosoma 26S, desarrollan síntomas similares a la ELA que incluyen debilidad muscular, degeneración de motoneuronas y aparición de agregados citoplasmáticos que contienen a la proteína nuclear TDP43, FUS y a la proteína optineurina en el citosol de las motoneuronas [Tashiro y cols. 2012].

Por otra parte, la proteína CHIP (cuyo nombre deriva de su interacción con la proteína Hsc70) es una co-chaperona que inhibe el replegamiento y la actividad ATPasa de la proteína 70 de shock térmico (Hsp70) [Alberti y cols. 2003], posee una actividad ligasa de ubiquitina E3 [Ballinger y cols. 1999; Murata y cols. 2003; Rosser y cols. 2007] que media la ubiquitinación de Hsp70 y la dirige hacia el proteasoma para su degradación [Connell y cols. 2001; Marques y cols. 2006]. La regulación positiva de CHIP participa en la toxicidad inducida por  $\alpha$ -sinucleína, el daño oxidativo y el estrés proteosómico [Shin y cols. 2005; Dikshit y Jana, 2007] y su sobreexpresión reduce la agregación de proteínas y la toxicidad en modelos celulares de neurodegeneración [Sahara y cols. 2005; Adachi y cols. 2007; Ishigaki y cols. 2007]. En modelos de ELA vinculados a SOD1, CHIP parece reducir los niveles de SOD1 disminuyendo su citotoxicidad [Choi y cols. 2004]. Para esta acción se requiere la formación del complejo SOD1-Hsc70 ya que SOD1 por sí sola no es un sustrato de CHIP [Urushitani y cols. 2004], además de la interacción con Hsp70, ya que la falta de esta proteína conduce a una degradación deteriorada y a la acumulación de agregados proteicos.

Otro mecanismo celular asociado con la patogenia de la ELA, es la autofagia, un proceso celular por el cual se degradan los componentes citoplasmáticos dentro de los lisosomas y se reciclan y distribuyen para funciones celulares importantes, en especial durante períodos de estrés o ayuno. Este proceso consta de pasos secuenciales entre los que se incluyen secuestro, transporte a los lisosomas, degradación y utilización de productos de degradación y está mediado por un organelo único llamado autofagosoma. A diferencia de lo que ocurre con el sistema ubiquitina-proteasoma, que reconoce específicamente a proteínas ubiquitinadas para la degradación proteasomal, se piensa que la autofagia es un sistema de degradación no selectivo importante en varias enfermedades neurodegenerativas. En pacientes de ELA esporádica se describen inclusiones patológicas rodeadas de proteínas involucradas en autofagia y positivas para ubiquitina, lo que es consistente además con alteraciones en el proteasoma [Kalmár y cols. 2014]. Signos patológicos asociados a disminución de la actividad autofágica por un lado o disminución de los niveles de sus inhibidores por otro, también se describen en el modelo murino SOD1 de ELA y se asocian a los depósitos proteicos descritos en estos modelos [Li y cols. 2008; Zhang y cols. 2011]. A su vez, la disminución de la capacidad autofágica junto a aumentos de marcadores de estrés oxidativo y estrés de RE regulados al alza en la médula espinal y las células del asta anterior de pacientes de ELA, sugiere que las fallas conjuntas de los mecanismos proteo-estáticos pueden conducir a la degeneración de las poblaciones neuronales susceptibles en la enfermedad.

En cuanto a la participación de las células gliales en la ELA, en esta enfermedad ocurre un proceso denominado gliosis reactiva o reactividad glial donde las células gliales participan en la muerte y en reemplazan las motoneuronas tras su degeneración y muerte. Las células gliales presentes en el ambiente donde las motoneuronas están dañadas y muriendo muestran características diferentes a las que poseen en condiciones fisiológicas. En términos generales, las células gliales reactivas disminuyen sus propiedades de soporte y defensa a las motoneuronas como la disminución de neurotrofinas y de moléculas asociadas a mecanismos de protección y ganan propiedades tóxicas incluyendo la liberación de citoquinas proinflamatorias, de factores prooxidantes y de radicales libres, entre otros. Ello puede ocurrir a nivel de motoneuronas inferiores o superiores. La médula espinal se vuelve atrófica, las raíces ventrales se adelgazan y hay una pérdida de fibras mielinizadas grandes en los nervios motores. Los músculos afectados muestran atrofia por denervación con evidencia de reinervación, como la agrupación de tipos de fibras. La patología en los sistemas no motores, como las columnas posteriores, se puede observar en las formas familiares de ELA. Si bien la afectación sensorial no es evidente desde el punto de vista clínico, la densidad de las fibras sensoriales mielinizadas se reduce en

aproximadamente un 30% en los nervios periféricos [Bradley 1983] y la presencia de gliosis crónica el cuadro de daño. Además, cuando las motoneuronas corticales (piramidales y de Betz) desaparecen, se genera una pérdida axonal retrógrada que fomenta la emergencia de gliosis en el tracto corticoespinal dando como resultado cambios bilaterales en la sustancia blanca que puede observarse en las imágenes de resonancia magnética del cerebro de pacientes con ELA.

## SOD1 mutadas como modelos experimentales de ELA

En el año 1993 se reportaron once mutaciones en el gen de la enzima Cu, Zn superóxido dismutasa 1 citosólica (SOD1) en trece casos familiares de ELA, indicando claramente la asociación entre las mutaciones en el gen *SOD1* y la enfermedad. Este gen está localizado en el cromosoma 21q22.1 [Rosen y cols. 1993] y sus mutaciones aparecen en hasta el 15% de los casos de ELA familiar y en un 2% de ELA esporádica [Volk y cols. 2018]. A la fecha se han identificado más de 180 mutaciones del gen codificante de SOD1, aunque no está claro si todas las mutaciones son causantes de ELA o si están asociadas a la misma. En un principio se pensaba que estas mutaciones implicaban una falla en la función catalítica de la SOD1, generando un aumento de radicales libres tóxicos para las células. Posteriormente se ha demostrado que aparte de la posible pérdida de función de SOD1, lo que es controvertido, la formación de agregados de la parte proteica de esta enzima (apoenzima) que se depositan dentro de la célula o de sus organelos participa y afecta a diversos procesos moleculares y celulares en la patología [Robberecht y Philips 2013]. Estudios recientes sugieren que estos agregados proteicos pueden tener propiedades semejantes a los priones y podrían tener un rol en la etiología de la enfermedad. Según esta hipótesis, la proteína mutada mal plegada se propagaría y transmitiría sus propiedades de plegamiento erróneo a las proteínas nativas produciéndose una agregación tóxica [Mathis y cols. 2019]. Además de su participación en los casos familiares y en algunos esporádicos, el interés de las mutaciones de SOD1 en ELA reside en el valor de los modelos animales generados a partir de las mismas.

Se han desarrollado numerosos modelos experimentales en diversos organismos vivos que abarcan desde levaduras hasta roedores para comprender los diferentes mecanismos patológicos involucrados en la ELA. Mientras que los modelos en animales inferiores han sido herramientas genéticas poderosas que ofrecen ventajas relacionadas con su corta vida y fácil manejo, la distancia evolutiva con los sistemas nerviosos de los mamíferos constituye una limitación importante cuando se estudia neurodegeneración humana [Arends y cols. 2016; Youssef y cols. 2016; Gitler y cols. 2017]. Los modelos murinos poseen sistemas más cercanos a la anatomía y a la complejidad del cerebro humano, pero su ciclo vital hace necesaria la sobreexpresión de muchas copias de las proteínas humanas mutantes para imitar la enfermedad [Ilieva y Maragakis 2017], aumentando el riesgo de que la cantidad de copias sobreexpresadas influyan por sí mismas en el modelo. A pesar de estas desventajas, los modelos en roedores aparecen como los mejores enfoques para estudiar los mecanismos patogénicos involucrados en ELA.

Los primeros modelos exitosos de ELA, que aún son extensamente empleados, se desarrollaron sobre-expresando diferentes mutaciones únicas de la SOD1 humana (SOD1G93A, SOD1G37R, SOD1G85R) en ratas [Howland y cols. 2002] y en ratones [Gurney y cols. 1994; Pioro y Mitsumoto 1996; Joyce y cols. 2011; Philips y Rothstein 2015]. La mayoría de estos modelos causan un síndrome motor progresivo dependiente de la edad que imita algunas características patológicas de la enfermedad humana que como se dijo antes no parecen derivar de la pérdida de la actividad catalítica de SOD1 sino de una ganancia de funciones tóxicas aún desconocidas [Kaur y cols. 2016; Nardo y cols. 2016; Yamanaka y Komine 2017]. Además, en forma similar a lo que ocurre en pacientes donde sobreviven algunas motoneuronas por causas desconocidas, en

algunos modelos dependientes de SOD1, en particular en el modelo SOD1G93A, se han descrito dos tipos diferentes de motoneuronas: las "perdedoras" o ramas denervadas y las "compensadoras" o ramas reinervantes, que presentan diferente "susceptibilidad" a las propiedades tóxicas de SOD1G93A [Schaefer y Sanes 2005]. Aunque todavía faltan datos sólidos para confirmar esta hipótesis se cree que las neuronas perdedoras y compensadoras están sujetas a diferentes influencias de las interneuronas vecinas, astrocitos o microglía y de la vasculatura [Oosthuyse y Moons 2001], apoyando de esta forma, la propuesta de la ELA como enfermedad no-autónoma celular, donde las células neuronales se influyen mutuamente tanto en su sobrevivencia como en su funcionalidad.

Sin embargo, a pesar del éxito de los modelos que sobreexpresan SOD1, que no se han reflejan en la sobreexpresión de otras proteínas involucradas como TDP43 o C9ORF72, parte de las complicaciones que surgen del estudio de los modelos SOD1 se deben a que hasta el momento no se ha podido comprender cómo mutaciones únicas en una proteína pueden provocar las cascadas patológicas de ELA en los modelos animales y cómo esas cascadas pueden finalmente causar un evento neuropatológico común que se caracteriza por la agregación y acumulación de inclusiones proteicas neuronales que, además, son encontradas en otras condiciones neurodegenerativas incluyendo la enfermedad de Alzheimer [Blokhuys y cols. 2013; Corbier y Sellier 2017]. Además, este panorama se complejiza más, cuando se trata de casos esporádicos que son de etiología desconocida y donde el diagnóstico clínico se produce en etapas tardías, lo que dificulta no solo la modelización de estas enfermedades sino también la búsqueda de alternativas terapéuticas que puedan modular o inhibir el avance de la enfermedad.

## POSIBILIDADES TERAPÉUTICAS PARA LA ELA

Aunque se han logrado avances significativos en la comprensión de los componentes críticos involucrados en ELA, esta enfermedad continúa no solo siendo incurable, sino que la disponibilidad de alternativas terapéuticas es muy escasa. El Riluzol es el único fármaco conocido que tiene impacto en la supervivencia de la ELA [Miller y cols. 2012]. Este derivado benzotiazol cuyo mecanismo neuroprotector todavía se desconoce, se supone a partir de observaciones, que disminuye la acción excitatoria del glutamato, bloqueando su transmisión. Se han realizado estudios observacionales que han confirmado el beneficio de este fármaco, sin embargo, su mecanismo de acción preciso en la ELA aún no está claro [Turner y cols. 2002; Mitchell y cols. 2006; Kennel y cols. 2000], aunque se sabe que retarda la necesidad de apoyo respiratorio a pacientes avanzados. La teofilina y la cafeína pueden disminuir la velocidad de eliminación de este fármaco que generalmente es bien tolerado y los efectos adversos más importantes son gastrointestinales y hepáticos existiendo ocasionalmente neutropenia [Weber y cols. 2004].

Edravos (Edaravona), un fármaco aprobado para el tratamiento de ELA en 2015 en Japón y Corea y en 2017 en Estados Unidos [Rothstein 2017], es un atrapador de radicales libres que se cree reduce el estrés oxidativo vinculado a la patogenia de la ELA. Se ha visto en algunos ensayos controlados aleatorios que enlentece el deterioro funcional en algunos pacientes con la enfermedad. Si bien la evidencia del beneficio de la Edaravona es más clara en pacientes con ELA temprana, se necesitan datos adicionales de registros y estudios de seguimiento para aclarar su utilidad en pacientes en diferentes etapas de la enfermedad. Además, es un fármaco extremadamente caro lo que lo vuelve accesible para la gran mayoría de pacientes.

Al día de hoy, se ha abordado la enfermedad a través de todos los mecanismos fisiopatológicos descritos (alteraciones en la transcripción y en el procesamiento de los ARN, alteraciones en el metabolismo proteico, excitotoxicidad y alteración de la homeostasia del calcio, estrés oxidativo, alteración del citoesqueleto y del transporte axonal, disfunción mitocondrial o neuroinflamación) [Musarò 2013]; sin embargo, no se ha logrado una cura eficaz de la enfermedad. Actualmente, Masitinib, un inhibidor de tirosina quinasas, se encuentra en estudios de fase clínica III. Masitinib ha producido una mejora funcional en los pacientes tratados y que en combinación con el Riluzol retrasó la progresión de la enfermedad sin presentar efectos adversos significativos [Scott 2017]. Otros compuestos que están siendo evaluados en fases clínicas más tempranas son el Fingolimod, un modulador de la inmunidad que ha finalizado estudios de fase clínica IIa [Berry y cols. 2017], Ibudilast, un inhibidor de la fosfodiesterasa 4 que se encuentra en estudios clínicos de fase I-II y Mexiletine, un bloqueante de los canales de sodio que protege a las motoneuronas de la muerte por excitotoxicidad y está en estudios de fase I-II [Weiss y cols. 2016].

Dado que todos estos fármacos poseen una ventana terapéutica estrecha es necesario continuar la búsqueda de alternativas para el tratamiento de esta enfermedad y de nuevos estudios de fases clínicas más tempranas con potenciales nuevos fármacos. Por otra parte, es necesario el conocimiento de todos los tipos celulares participantes en la enfermedad ya que podrían ser blancos farmacológicos relevantes a los que se pudiera prestar atención junto con las neuronas.

### Violaceína como posible fármaco neuroprotector

La violaceína (3-[1,2-dihydro-5-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)-2-oxo-3H-pyrrol-3-ylidene]-1,3-dihydro-2H-indol-2-one) es un pigmento alcaloide indólico producido por varios tipos diferentes de cepas bacterianas, entre las que se encuentran *Chromobacterium*, *Janthinobacterium*, *Alteromonas*, *Duganella*, *Massilia*, *Pseudoalteromonas* y *Collimonas*, entre otros [Durán y cols. 2012; Choi y cols. 2015b; Alem y cols. 2020]. Este compuesto es producido por la fusión de dos moléculas provenientes del aminoácido triptófano al menos para *Chromobacterium violaceum* [Hoshino 2011] y otras cepas bacterianas. La producción de este pigmento se ve afectada por muchos parámetros de crecimiento fisicoquímicos como la temperatura y el pH así como por los componentes del cultivo de crecimiento y también por el procedimiento de cultivo como el tamaño del inóculo y la alimentación [Pantanella y cols. 2007; Yang y cols. 2007; Lu y cols. 2009; Choi y cols. 2015a]. Los experimentos dirigidos a comprender el papel de la producción de violaceína por cepas bacterianas mostraron que este pigmento está involucrado en la resistencia bacteriana a diferentes parámetros como la irradiación UV y la baja temperatura [Mojib y cols. 2013] y su producción está influenciada por moléculas de señalización [Wang y cols. 2008].

La violaceína posee múltiples actividades antimicrobianas, antiparasitarias, antiinflamatorias, antioxidantes, antivirales y antitumorales [Lopes y cols. 2009; Durán y cols. 2012; Choi y cols. 2015b]. Se destaca por ejemplo, la presencia de actividad antitumoral a concentraciones muy bajas (50% de inhibición de células viables a concentraciones de 1 a 3  $\mu\text{M}$ ) en líneas celulares derivadas de melanoma [Melo y cols. 2000], cáncer de colon [De Carvalho y cols. 2006] y líneas celulares de cáncer de mama [Bromberg y cols. 2010; Alshatwi y col. 2016]. Además, la violaceína sensibiliza las células derivadas del cáncer colorrectal al 5-fluorouracilo, un agente de quimioterapia de uso común, por lo que se ha propuesto como terapia acompañante de la quimioterapia [Kodach y cols. 2006].

La violaceína también presenta un extenso rango de propiedades relacionadas con el control de la inflamación entre las que se incluyen el mantenimiento del equilibrio entre las

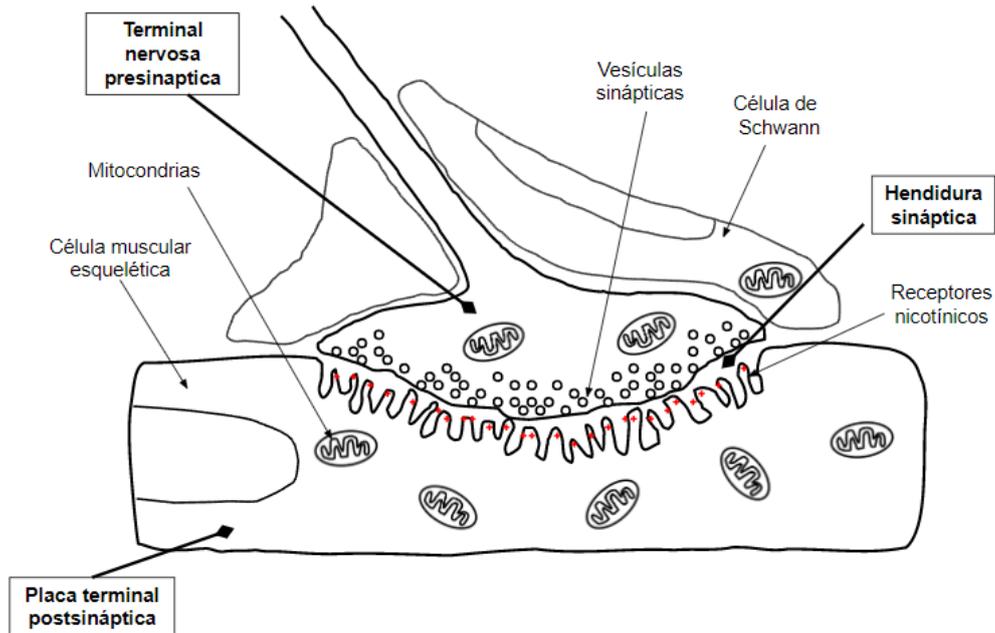
citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias [Venegas y cols. 2019] y la modulación de los niveles del factor de TNF- $\alpha$  [Platt y cols. 2014] o interleuquina (IL)-6 [Verinaud y cols. 2015]. Curiosamente, algunas de estas acciones incluyen la inhibición de la actividad proteolítica de la MMP-2 y la regulación a la baja de las interacciones que controlan la migración celular y la invasión en líneas celulares de cáncer de mama. Estas propiedades han llevado a proponer que la violaceína podría tener un papel en el control de fenotipos gliales deletéreos y con alta proliferación descritos en modelos preclínicos de ELA como los que empleamos en este trabajo [Díaz-Amarilla y cols. 2011]. A este respecto, estudios anteriores de nuestro grupo, reportaron la acción selectiva de violaceína sobre cultivos de astrocitos aberrantes obtenidos de ratas terminales SOD1G93A [Otero y cols. 2019].

Sin embargo, a pesar del múltiple espectro de acciones de la violaceína incluyendo el control de la inflamación y de la proliferación de células gliales implicadas en la formación o integrantes de los gliomas, hasta el momento no se han investigado los efectos de este compuesto en modelos animales de enfermedades del SNC incluyendo las neurodegenerativas como la ELA. Trabajos anteriores realizados por Gabriel Otero y cols. [2019] muestran que la violaceína fue capaz de disminuir la viabilidad de los astrocitos aberrantes (AbAs) aislados de animales terminales de la mutación hSOD1G93A, sugiriendo fuertemente que podría tener efectos sobre este modelo cuando se realizan tratamientos in vivo.

## UNIÓN NEUROMUSCULAR

La **Unión Neuromuscular** (UNM) fue descrita por primera vez a nivel de microscopía óptica por el fisiólogo alemán Wilhelm Friedrich Kuhne (1837–1900) [Shepherd y cols. 1997]. La UNM es la sinapsis química que permite la comunicación unidireccional entre el nervio periférico y el músculo. Esta sinapsis se caracteriza por su estructura compleja y especializada y su tamaño muy pequeño ( $\sim 30 \mu\text{m}$  de largo) en comparación con la longitud de la fibra muscular que inerva que pueden ser de menos de 1 cm (por ejemplo, el músculo intercostal) hasta más de 20 cm (por ejemplo, el músculo sartorio, que es el músculo largo del muslo). Normalmente, cada fibra del músculo esquelético tiene una sola UNM donde el axón motor se comunica con la fibra muscular. Las UNM de humanos son típicamente más pequeñas, menos complejas y más fragmentadas que las de modelos animales murinos ampliamente estudiadas [Jones y cols. 2017], pero las UNM humanas exhiben un grado de plegamiento de la membrana postsináptica que es mayor que la de cualquier otra especie [Slater 2017].

La UNM es el componente fundamental en la transducción de las señales de las neuronas motoras y en la activación de la contracción del músculo esquelético de una manera rápida y precisa. Posee algunas características típicas que colaboran para que su función esencial esté asegurada entre las que se incluyen un gran número de zonas activas en las terminales que genera una liberación masiva del neurotransmisor acetilcolina (ACh), un aumento en la eficiencia de la activación de sus receptores (AChR), la generación de potencial sináptico por la agrupación de AChR en la cresta de los pliegues de unión postsinápticos junto con su alineación en las zonas activas y la rápida degradación de ACh por acetilcolinesterasa (AChE) permitiendo que el proceso ocurra en el tiempo de la transmisión [Ohno y cols. 1998; Tintignac, Brenner y cols. 2015].



**Esquema 1.** Esquema donde se muestran los principales componentes de UNM.

En la estructura de la UNM se distinguen tres regiones claramente diferentes que son necesarias para generar la contracción de los músculos esqueléticos: la terminal nervosa presináptica, la hendidura sináptica y la región de la placa terminal postsináptica ubicada en la fibra muscular como se observa en el esquema 1. Al llegar a la fibra muscular, la primera región de la UNM es la región presináptica que consiste en una estructura nerviosa terminal especializada bastante diferente al resto del axón, ya que en este sitio, el axón de la neurona motora pierde su vaina de mielina para formar un complejo de 100 a 200 terminaciones nerviosas ramificadas llamadas botones sinápticos o terminales axónicas motoras desde donde se liberará la ACh que es el ligando de los receptores nicotínicos presentes en la membrana del músculo estriado voluntario [Campanari 2016]. En esta región se pueden encontrar canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, canales de  $K^{+}$ , gran cantidad de mitocondrias y las vesículas sinápticas conteniendo ACh. Cada vesícula sináptica tiene alrededor de 5000 a 10000 moléculas de este neurotransmisor y en su membrana están presentes las proteínas sinaptotagmina y sinaptobrevina que forman parte de la familia de las proteínas de membrana asociadas a vesículas que participan en los mecanismos de fusión de la misma y de liberación de la ACh. Cuando ocurre la despolarización de la membrana axonal, el potencial de acción viaja provocando la apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje lo que resulta en el ingreso de iones de  $Ca^{2+}$  en la terminal nerviosa produciendo una depolarización de la membrana presináptica. Las vesículas sinápticas migran hacia la membrana y se fusionan con las zonas activas, para lo cual, diferentes proteínas de la membrana de las vesículas sinápticas y de la membrana terminal nerviosa desempeñan un rol importante para posibilitar la liberación del neurotransmisor [Yokoyama y cols. 1997].

El espacio ubicado entre la terminal nerviosa y la membrana muscular, denominado hendidura sináptica, es el sitio donde se libera la ACh. Este espacio posee una medida aproximada de 50 nm y contiene en su interior una forma especializada de matriz extracelular llamada lámina basal sináptica [Sanes 2003] que es crucial para la alineación, organización e integridad estructural de la UNM. Los principales componentes de la lámina basal incluyen diferentes lamininas ( $\alpha$ -4 y 5,  $\beta$ 2) y colágenos (cadenas  $\alpha$ -3-6 del colágeno IV), agrina y

neurogranina [Shi y cols. 2012]. En esta región se encuentra la AChE, que se encuentra unida a la lámina basal gracias a una cola de colágeno denominada ColQ que es similar al colágeno específico de la UNM y tiene como función principal anclar a la enzima que hidroliza la ACh, evitando que se prolongue su efecto [Ohno y cols. 1998].

La región postsináptica es una estructura especializada dentro de la membrana de la fibra muscular y contiene complejos pliegues que aumentan el área de superficie. En esta región se encuentran numerosos receptores AChR nicotínicos, que son complejos de cinco subunidades de proteínas con cada subunidad conteniendo cuatro segmentos transmembrana dispuestos formando un canal iónico central. Cada AChR nicotínico tiene dos sitios de unión de ACh. Cuando esos dos sitios se ocupan hay un cambio conformacional en la estructura del receptor que abre el canal central y permite un aumento en la conductancia de  $\text{Na}^+$ , la entrada de este ion y por lo tanto, un cambio local en el potencial de la membrana muscular (potencial de placa terminal, EPP) desde -90 mV a -45 mV. La interacción ACh/AChR es determinante para que ocurra un cambio de permeabilidad en el sarcolema, la liberación masiva de  $\text{Ca}^{2+}$ , la activación de proteínas involucradas en la contracción (actina, miosina) y la consecuente contracción muscular. Para prevenir la despolarización y la contracción muscular sostenidas, y para permitir la repolarización, la AChE metaboliza la ACh a colina y acetato. La colina es mayormente captada por la neurona presináptica para reutilizarla en la síntesis de ACh [Slater 2015; 2017].

Es importante destacar que la UNM es una sinapsis “todo o nada”. Si el EPP no alcanza el umbral para la apertura de los canales de  $\text{Na}^{2+}$ , o si no hay suficientes canales de  $\text{Na}^+$  en los pliegues postsinápticos para generar un potencial de acción, la contracción muscular no se produce. En organismos sanos, el EPP es suficiente para alcanzar el umbral y los canales de  $\text{Na}^{2+}$  se concentran en las profundidades de los pliegues postsinápticos donde pueden abrirse eficientemente debido al cambio de voltaje. Este es el margen de seguridad, o factor de seguridad de la transmisión neuromuscular, que permite que la UNM continúe funcionando bajo diversas condiciones fisiológicas o de estrés. En casos de enfermedad, este margen de seguridad puede reducirse en las placas terminales individuales, o en muchas de ellas, lo que conduce a una reducción de la transmisión neuromuscular y a la debilidad muscular [Wood y Slater 2001].

La UNM es una sinapsis tripartita, constituida por las regiones pre- y postsinápticas y las células de Schwann perisinápticas, o terminales, o teloglia, que rodean la UNM y de las cuales hay cada vez más evidencia de que contribuyen a la formación, transmisión, mantenimiento y reparación de la sinapsis [Feng y Ko 2008]. Estas células parecen tener funciones similares a los astrocitos a nivel del SNC y parte de sus características están asociadas a la sinapsis a las que pertenecen. Es decir, las células de Schwann perisinápticas de músculos rápidos tienen mayores niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a la inervación sináptica que las de los músculos lentos. Las células de Schwann perisinápticas juegan un papel activo en el desarrollo de la UNM y en el mantenimiento y remodelado de la placa terminal neuromuscular del adulto. Se ha demostrado que durante el desarrollo, estas células migran en asociación con los axones en crecimiento y se ubican cerca de la UNM justo antes de los contactos músculo-nervio [Feng y Ko 2008]. Experimentos *in vivo* demostraron que las células de Schwann perisinápticas aumentan su número antes del período de crecimiento sináptico y desempeñan un papel de guía durante el crecimiento y la inervación de los axones. Por el contrario, la falta de ellas puede inducir una pérdida completa de las sinapsis durante el desarrollo o determinar defectos presinápticos y postsinápticos en la UNM [Koirala y Reddy 2003].

A su vez, el músculo esquelético es una fuente de señales que influyen no solo en la supervivencia de las motoneuronas y el crecimiento axonal, sino también en el mantenimiento

de la UNM [Kablar y Rudnicki 1999]. Se ha demostrado que durante situaciones de reinervación, el agotamiento inducible de células satélite adultas puede afectar la regeneración y la morfología de la UNM [Liu y Wei-LaPierre 2015], sugiriendo que el músculo esquelético y el nervio se influyen mutuamente mediante un vínculo fundamental para su supervivencia y acción. En este sentido, dependiendo del patrón de estimulación del nervio motor que es mediado por la UNM, las fibras de los músculos esqueléticos se pueden clasificar según sus propiedades contráctiles y metabólicas como de contracción rápida o lenta [Hughes 1998]. Las fibras lentas o de tipo 1 como las que se describen en el músculo sóleo contienen un gran número de mitocondrias, un metabolismo aeróbico alto y una mayor resistencia a la fatiga como es el caso del músculo sóleo. Las fibras rápidas o de tipo 2 poseen un número relativamente escaso de mitocondrias, un metabolismo aeróbico bajo y una menor resistencia a la fatiga tal como se describe en el músculo extensor digital largo (EDL) [Billat 2002]. La influencia sobre las propiedades contráctiles ha sido demostrada en experimentos de reinervación cruzada donde los músculos rápidos se vuelven lentos cuando son reinervados por un nervio lento, mientras que los músculos lentos se convierten en rápidos cuando son inervados por un nervio rápido [Buller y Eccles 1960]. Es decir, la actividad mantenida de la motoneurona promueve el fenotipo de fibra lenta, mientras que su activación intermitente da como resultado la generación de fibras rápidas [Olson y Williams 2000], indicando por tanto un papel de la UNM como intermediaria de la modulación de la respuesta muscular dirigida por la motoneurona.

## UNM en condiciones patológicas

Varias condiciones, como el envejecimiento, el desuso, la insuficiencia cardíaca, la diabetes, el cáncer y los trastornos de la transmisión neuromuscular, conducen a un profundo desgaste y debilidad muscular, que pueden llevar a la pérdida/atrofia de masa muscular y a la fragmentación y pérdida de funcionalidad de la UNM. Además, los cambios estructurales en la UNM pueden contribuir a la debilidad muscular, a la alteración de la actividad de la motoneurona y a la pérdida de fibras musculares [Chang y cols. 1999; Magranmi y Cortez 2014; Iyer y cols. 2021]. El conocimiento de las alteraciones de la UNM ha surgido de investigaciones en roedores, particularmente en ratones, y del estudio del efecto de neurotoxinas específicas provenientes del veneno de serpientes *Bungarus multicinctus* (familia *Elapidae*) que contienen  $\alpha$ -bungarotoxina ( $\alpha$ -Btx) que se une irreversiblemente a los AChR nicotínicos ya que la evidencia en músculo humano aún es escasa [Chang 1999]. Usando estos modelos ha sido posible determinar que en algunas enfermedades como la ELA, ocurre una pérdida progresiva patológica de masa muscular asociada a altos niveles de daño oxidativo, a la disminución del número de vesículas sinápticas y a la presencia de mitocondrias alteradas en la región de la placa terminal de la UNM [Magranmi y Cortez 2014], donde la alteración morfológica de la UNM parece ser un signo patológico temprano.

Las enfermedades de la UNM en general producen debilidad muscular que puede variar o no con la actividad [Lindstrom y cols. 1976; Vincent y Newsom-Davis 1985; Engel y cols. 2015]. Los trastornos de la UNM que resultan en debilidad que mejora o permanece sin cambios con el ejercicio generalmente se asocian con disfunción del aparato presináptico o de los componentes de la hendidura sináptica. La mayoría de estos trastornos se asocian con amplitudes reducidas de los potenciales de acción muscular compuestos en respuesta a estímulos nerviosos motores únicos, pero con amplitudes aumentadas después de una estimulación rápida del nervio. En las alteraciones que varían con la estimulación repetida, como en el caso de las miastenias “verdaderas”, la debilidad empeora con la contracción o el trabajo muscular sostenido y mejora con el reposo. Estas alteraciones se asocian generalmente a defectos en la región postsináptica de la UNM.

Entre las alteraciones de la región presináptica de la UNM asociadas a causas genéticas se encuentran: a) la deficiencia de la enzima colín-acetiltransferasa (ChAT), lo que provoca una disminución progresiva del contenido de ACh en las vesículas sinápticas durante la actividad, y por lo tanto, una reducción del EPP y del margen de seguridad de la transmisión neuromuscular. Se describe hipotonía, parálisis muscular y episodios de apnea; b) la deficiencia de sinaptotagmina 2 que detecta los aumentos de la concentración de  $Ca^{2+}$  en la terminal nerviosa y actúa sobre otras proteínas para iniciar la liberación de ACh en el espacio sináptico. Esta alteración produce debilidad muscular en las extremidades, pérdida de los reflejos tendinosos y una amplitud reducida del EPP; c) la escasez de vesículas sinápticas alterando la liberación cuántica de ACh, disminuyendo la probabilidad de alcanzar los umbrales para que el EPP se dispare; d) anticuerpos contra los canales de  $Ca^{2+}$  voltaje dependientes presentes en la terminal presináptica causando el síndrome miasténico de Lambert Eaton que produce debilidad muscular [Vincent y Newsom-Davis 1985] y podría estar asociado a la deficiencia de sinaptotagmina 2 según algunos autores [Engel y cols. 2015]; e) síndrome de Guillain Barré y sus variantes como el síndrome de Miller Fisher: son neuropatías autoinmunes inflamatorias agudas que conducen a desmielinización y daño axonal, en algunos casos están asociadas a infección por patógenos que preceden al inicio de los síntomas y desencadenan una respuesta inmunitaria cruzada mediada por células y anticuerpos contra gangliósidos que son expresados en la UNM y provocan cambios mediados por el complemento afectando los canales de  $Na^{+}$  dependientes de voltaje [Engel y cols. 2015]. Las alteraciones de la UNM en estas condiciones se determinan fundamentalmente por pruebas genéticas, análisis de la morfología de la UNM mediante microscopía electrónica y análisis de la neurotransmisión [Engel et al. 2015].

Las alteraciones en el espacio sináptico incluyen: a) deficiencia de la AChE ocasionando apnea y debilidad generalizada que persiste durante toda la vida y terminaciones nerviosas adelgazadas y b) síndrome congénito miasténico asociado a deficiencia de la laminina- $\beta$ 2, uno de los componentes de la lámina basal. En estos casos se describen terminaciones nerviosas anormalmente pequeñas que explican la disminución de la liberación cuántica, hendidura sináptica ensanchada y pliegues de unión simplificados.

El análisis de las enfermedades que principalmente involucran componentes de la porción postsináptica de la UNM muestra a la *miastenia gravis* como la más común. Esta enfermedad se caracteriza por debilidad muscular fatigable o contracción muscular sostenida en algunos casos y es causada por la presencia de autoanticuerpos contra los AChR nicotínicos que se unen a los mismos impidiendo la transmisión de la información a los músculos. Los autoanticuerpos contra los AChR son capaces de activar el complemento y se describe que podrían bloquear directamente los sitios de unión de ACh inhibiendo la apertura del canal iónico, entrecruzar receptores acelerando su endocitosis y degradación y activando del complemento favoreciendo el daño a la membrana muscular. De acuerdo con estas acciones, se describe inflamación y desensamblaje transitorios de la placa terminal y posteriormente un reensamblaje con disminución significativa del número de AChR nicotínicos en la membrana muscular, aumento de la internalización y degradación de estos receptores y como consecuencia una simplificación progresiva y retracción de la placa terminal [Lindstrom y cols. 1976; Vincent y Newsom-Davis 1985]. Los síndromes miasténicos congénitos son causados por mutaciones en aproximadamente 30 genes que codifican para proteínas esenciales para la integridad de la transmisión neuromuscular, son de menor incidencia que la *miastenia gravis* y pueden afectar a cualquier porción de la UNM [Lindstrom y cols. 1976; Vincent y Newsom-Davis 1985]. Los organofosforados, las toxinas botulínicas y la  $\alpha$ -Btx pueden alterar la funcionalidad de la UNM

por unirse irreversiblemente a la AChE en el caso de los organofosforados o a los AChR nicotínicos. Estas alteraciones generalmente son transitorias y duran hasta la síntesis de las nuevas proteínas.

## UNM en ELA – estado actual del conocimiento

La ELA constituye uno de los mejores ejemplos de interacción deficiente entre los nervios y músculos. Como hemos mencionado anteriormente, la ELA es una enfermedad caracterizada por una degeneración progresiva de las motoneuronas superiores de la corteza motora y las motoneuronas inferiores en el tronco encefálico y la médula espinal. La muerte de estas neuronas produce espasticidad, debilidad y atrofia de los músculos, progresando a parálisis. Mediante la UNM, los músculos y los nervios se comunican a través de la conexión sináptica del sistema nervioso periférico, encargándose de procesos vitales cruciales, como los movimientos voluntarios del cuerpo y la respiración [Rudolf y Khan 2019], por lo que la afectación en los músculos y/o en los nervios puede alterar la funcionalidad y/o la estructura de la UNM.

Varios estudios provenientes de modelos SOD1 en ratón, sugieren que la ELA es una axonopatía distal en la que los cambios patológicos comienzan pre-clínicamente con la denervación de las placas motoras terminales del músculo, reinervación en el tejido muscular sin ningún signo patológico a nivel del soma de las motoneuronas y luego continúan en un patrón de "muerte" que da como resultado la pérdida de motoneuronas [Fischer y cols. 2004; Gould 2006]. Además, diversas moléculas de superficie de la fibra muscular son capaces de interactuar con la agrina, una proteína esencial para la organización de la placa terminal que es secretada por las terminales nerviosas, entre ellas el receptor de la tirosín-kinasa específica del músculo (MuSK), una proteína transmembrana que es selectivamente expresada por la célula muscular y colocaliza con los AChR nicotínicos. Estudios recientes han demostrado que la modulación de la señalización de agrina mediante terapia génica [Miyoshi y cols. 2017] y la estimulación de MuSK [Cantor y cols. 2018] puede aumentar la actividad motora y la vida útil del ratón SOD1G93A al ralentizar la denervación muscular. Además, los resultados de estudios de atrofia muscular y desmantelamiento de la UNM en estos modelos SOD1 [Hegedus y Putman 2008] sugieren que el efecto tóxico local de SOD1G93A es un determinante principal de la patología muscular asociada a la ELA y que las señales retrógradas del músculo al nervio pueden contribuir al daño de la sinapsis y del axón [Lepore y cols. 2019].

Otras publicaciones reportan que los cambios tempranos de la transmisión neuromuscular comienzan mucho antes de la aparición de los síntomas motores apoyando la noción de que el desmantelamiento de la UNM puede ocurrir independientemente de la degeneración de la motoneurona y puede representar una sospecha patogénica temprana de defectos de comunicación entre los músculos y los nervios. Sin embargo, otros autores mantienen la hipótesis y presentan evidencia de que el daño comienza en la motoneurona y se propaga posteriormente hacia la UNM [Howland y cols. 2002; Kiernan y cols. 2011].

Durante la progresión de la ELA, la denervación muscular se acompaña de cambios en el perfil de la fibra muscular con una pérdida de preferencia de la fibra de contracción rápida, debido a la mayor vulnerabilidad de las neuronas motoras de innervación de fatiga rápida y a las señales específicas liberadas por las células gliales [De Winter y Vo 2006]. Otro de los aspectos que resultan altamente comprometidos tanto en pacientes con ELA como en modelos de ratas es la alteración de la homeostasis metabólica y del equilibrio energético, donde el gasto energético es mayor que el aportado por la ingesta y se asocia a una mayor demanda de energía y a un metabolismo lipídico anormal [Funalot y Desport 2009]. De hecho, un estudio reciente reveló que los pacientes con ELA comienzan a perder peso casi 10 años antes del inicio clínico de

la enfermedad y muestran una mayor ingesta diaria de energía para compensar el elevado consumo energético [Huisman y Seelen 2015]. Asimismo, el modelo de ratón SOD1G93A muestra alteraciones energéticas similares que incluyen el aumento del gasto energético y un hipermetabolismo concomitante del músculo esquelético [Dupuis y González de Aguilar 2004]. Otro reporte ha señalado que las alteraciones metabólicas en este modelo puede ser distinto de la denervación y que la acumulación específica SOD1G93A en el músculo es capaz de inducir cambios metabólicos en las vías de la glucosa y los lípidos, independientemente de la degeneración de las motoneuronas y la denervación muscular precedente [Dobrowolny y Lepore 2018]. Estos datos sugieren que algunos de los cambios metabólicos representan parte de los primeros signos de las alteraciones morfológicas y funcionales que ocurren en las terminales nerviosas motoras. Entre los componentes celulares, las mitocondrias disfuncionales representan reguladores clave de los cambios metabólicos [Barrett y cols. 2011; Carri y Cozzolino 2011; Villegas y cols. 2014]. De hecho, el tratamiento con un fármaco protector de mitocondrias pudo preservar la función y la estructura de la UNM en el modelo de ratón con ELA en las últimas etapas de la enfermedad, lo que sugiere un papel central de las mitocondrias en la patología [Barrett y cols. 2011; Barrett y cols. 2016]. El análisis de un modelo de ratón transgénico que sobreexpresa la potente proteína desacopladora mitocondrial (UCP1) exclusivamente en el músculo esquelético reveló que la expresión específica del músculo de UCP1 induce un deterioro dependiente de la edad de la UNM [Dupuis y cols. 2009]. Este defecto se correlacionó con signos progresivos de denervación, apoyando la idea del papel crucial del músculo esquelético en la homeostasis nerviosa [Dupuis y González de Aguilar 2009].

## METALOPROTEINASAS DE MATRIZ

La matriz extracelular está formada por diversos componentes entre los que se encuentran proteoglicanos, glucosaminoglicanos, proteínas estructurales tales como colágeno y elastina, proteínas de adhesión como fibronectina y laminina y una familia de proteasas denominadas metaloproteasas de matriz (MMPs) [Cascales 2010]. Las MMPs son una familia de endoproteasas dependientes de zinc sintetizadas por numerosas células de todos los linajes incluyendo los neurales (neuronas y glías), que actúan activamente no sólo en la remodelación de la matriz extracelular sino también en las interacciones célula-célula y célula-matriz [Murphy y Nagase 2008]. Dentro de los factores que estimulan la síntesis de las MMPs se encuentran el PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas); EGF (factor de crecimiento epidérmico); VEGF (factor de crecimiento de endotelio vascular); FGF-2 (factor de crecimiento de fibroblastos de tipo 2) y TNF $\alpha$  (factor de necrosis tumoral alfa), entre otros [Hagemann y cols. 2004; Stetler-Stevenson 2008; Ito y cols. 2009; Park y Chung, 2011].

Estas proteasas, son capaces de activar factores de crecimiento, receptores de superficie y moléculas de adhesión, regulan la estructura de la matriz extracelular, participan en la reproducción, crecimiento, desarrollo, reorganización tisular, crecimiento longitudinal axonal, angiogénesis [Johnson y cols. 2014], remodelación tisular asociada a neovascularización [Forsyth y cols. 1999], diferenciación neuronal y alargamiento axonal [Chambaut-Guerin y cols. 2000]. Las MMPs también juegan un papel importante en la remodelación sináptica, la regeneración neuronal y la remielinización y están implicadas en varios procesos patológicos, como daño celular, muerte celular, degeneración de neuronas motoras y pérdida de la función motora. También participan en la degradación de la barrera hematoencefálica y del líquido cefalorraquídeo y facilitan la invasión neural por los leucocitos en las enfermedades inflamatorias del sistema nervioso [Azeh y cols. 1998]. La actividad de las MMPs se encuentra regulada por inhibidores específicos conocidos como inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) [Cascales 2010]. Estos inhibidores son sintetizados por macrófagos tisulares y los

fibroblastos y pueden clasificarse en tres tipos. TIMP-1 inhibe potencialmente la actividad de la mayoría de las MMPs con excepción de MT1-MMP y MMP-2 y es sintetizado por neutrófilos, linfocitos, mastocitos. TIMP-2 también inhibe la actividad de la mayoría de las MMPs, exceptuando MMP-9, y es sintetizada al igual que el TIMP 1 por células endoteliales, dendríticas y hematopoyéticas. TIMP-3 inhibe la actividad tanto de MMPs-1, -2, -3, -9, así como de MT1-MMPs [Coronato 2012].

Se han descrito 25 miembros de la familia MMPs, que se clasifican en cinco subfamilias dependiendo de su función y estructura en colagenasas, gelatinasas, estromelisininas, metaloproteasas de membrana (MT-MMPs) y otras MMPs. La estructura de las MMPs comprende varios dominios comunes a la mayoría de ellas los cuales son necesarios para el desplazamiento intracelular de la enzima hasta la membrana y que es eliminado después de la secreción de la proteasa; así como un dominio con capacidad enzimática latente. La gelatinasa A (MMP-2) y B (MMP-9) son dos miembros que han demostrado, entre otros, degradar gelatina y colágeno tipo IV de la membrana basal. MMP-2, tiene un peso molecular de 72 kDa y también digiere colágenos I, II y III, siendo expresada en condiciones normales por las células del estroma de la mayoría de los tejidos como macrófagos, mastocitos, fibroblastos, células dendríticas, endoteliales y hematopoyéticas. La MMP-9, de 92 kDa, está casi ausente en tejidos normales y se encuentra limitada a monocitos y macrófagos [Kessenbrock 2010].

### MMPs y UNM en la ELA

Las MMPs están implicadas en la patogenia de varias enfermedades neurológicas como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, el accidente cerebrovascular, la lesión de la médula espinal y la ELA [Yong y cols. 1998; Fang y cols. 2010]. Las MMPs generalmente pueden alterar la integridad estructural de las sinapsis y la red neuronal y podrían contribuir a la pérdida de la función motora [Fang y cols. 2010]. Muchas enfermedades con componente motor se han relacionado con el deterioro de la estructura y función de la UNM respecto a la matriz extracelular o lámina basal donde las MMPs podrían participar. La remodelación de la lámina basal en la UNM es un proceso relevante y necesario para mantener la estabilidad, permitir el crecimiento o desestabilizar y eliminar sinapsis. Se ha visto que no se forman UNM, por ejemplo en ratones que carecen de agrina o de MuSK. Por lo tanto, la matriz extracelular es fundamental para la formación de la sinapsis y la actividad sináptica y controla la estructura y la función de las moléculas en la lámina basal alterando la activación de los componentes enzimáticos incluyendo las MMPs. Si bien la actividad de las MMPs es muy baja en condiciones normales [Lambert 2004; Kessenbrock 2010], en condiciones de daño, la actividad de las mismas es modulada a distintos niveles por citoquinas inflamatorias, hormonas e interacciones célula a célula [Romí 2011; Łukaszewicz-Zajac y cols. 2014]. A su vez, las MMPs pueden convertir algunas citoquinas proinflamatorias en sus formas activas como la interleuquina 1 $\beta$  que es activada por MMP-2, MMP-3 y MMP-9, sugiriendo que las MMPs pueden promover procesos inflamatorios que podrían afectar la remodelación de la lámina basal y por tanto la estabilidad y estructuración de la UNM [Łukaszewicz-Zajac y cols. 2014]. Aún no se dispone de datos que muestren claramente la relación entre los radicales libres (estrés oxidativo) y el estado de activación de las MMPs. Sin embargo, se ha correlacionado el daño oxidativo a las proteínas en la ELA contribuye a la muerte neuronal y al desarrollo de especies reactivas de oxígeno para impulsar la expresión y la activación de las MMPs.

Se ha correlacionado a las MMPs con alteraciones en la UNM en ratones mutantes nulos para la MMP-3 donde se observan pliegues sinápticos aumentados y agregados de AChR en la superficie. Asimismo se han localizado otras MMPs (MMP-2, -7 y -9) en la UNM, en los vasos sanguíneos y en el perineuro de las ramas terminales nerviosas. En el caso de la ELA, se ha

descrito que la MMP-9 aumenta con el grado de neurodegeneración de las neuronas piramidales de la corteza motora y la médula espinal, en el lóbulo frontal y occipital, seguida de una disminución de la MMP-2 en los astrocitos. Además, se observó una regulación positiva de MMP-9 y MMP-2 en la médula espinal de ratones SOD1G93A [Lorenz y cols. 2006; Fang y cols. 2010]. Los distintos reportes sugieren que el aumento de la actividad de MMP-9 cuando se libera en la sinapsis puede destruir la integridad estructural de la matriz circundante [Lim y Backstrom 1996]. En músculos de pacientes con ELA, también se describió un aumento de MMP-9 y, en menor medida, de MMP-2 y MMP-7. Se propone que la expresión distinta de las MMPs puede reflejar diferentes etapas de atrofia muscular después de la denervación [Schoser y Blottner 1999]. En el tejido cerebral *post-mortem* de pacientes de ELA, así como en el plasma y el LCR, se informa un aumento de MMP-9 y TIMP-1 [Lorenz y cols. 2003; Fang y cols. 2010].

Sin embargo, existen controversias con respecto a la expresión de MMPs en LCR. Se describe que el nivel de MMP-9 en LCR de pacientes con ELA disminuye y tiene una tendencia a disminuir aún más con el empeoramiento del estado clínico [Fang y cols. 2010]. La expresión muy baja de MMP-9 en el LCR, podría deberse a la baja penetración de esta enzima a través de la barrera hematoencefálica, a su mayor inhibición por el aumento del nivel de su inhibidor (TIMP-1), a la degradación proteolítica intratecal aumentada y al aclaramiento físico directo. Contrariamente a estos resultados, otros reportes proponen que no existe correlación entre la MMP-9 en el LCR y el tiempo de duración de la enfermedad [Schoser y Blottner 2001] y que el LCR de pacientes con ELA, MMP-9, así como TIMP-1, son normales o están significativamente aumentados [Rosenberg 2009]. También se describió, el aumento de los niveles de MT-MMP-1 y MMP-2 en el LCR lo que podría estar relacionado con una mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica que se describe aproximadamente el 46% de los pacientes con esta patología [Apostolski y Nikolic 1991].

En cuanto a los valores séricos, se describe que en el suero de pacientes con ELA, la MMP-9 está elevada, especialmente en casos graves [Beuche y cols. 2000; Demestre y Parkin-Smith 2005; Renaud y Leppert 2007; Fang y cols. 2010; Niebroj-Dobosz y cols. 2010; Kaplan y cols. 2014; Łukaszewicz-Zajac y cols. 2014]. Aún se desconoce el origen de los niveles elevados de MMPs y de su inhibidor TIMP-1 en el suero de los pacientes con ELA, aunque se ha propuesto que los mismos podrían derivar de axones afectados y/o de músculos denervados [Kherif y Dehaupas 1998], o podrían reflejar la degeneración en curso de las neuronas motoras y de los músculos y/o pueden estar asociados con su remodelación. El aumento de la expresión de las MMPs también puede ser secundaria y ser consecuencia del estrés oxidativo.

Por otra parte, los niveles de MMPs están contrabalanceados por los niveles de sus inhibidores, principalmente de TIMP-1 y TIMP-2. También se propone que como el sistema MMP/TIMP regula las interacciones neuroinmunes, el nivel elevado de algunas de las MMP en el LCR puede reflejar la activación del sistema inmunológico o podría resultar de una pérdida de equilibrio entre las MMPs y sus inhibidores. Aunque no está claro el papel de los cambios en el nivel de MMP/TIMP, las alteraciones en el equilibrio de MMP-9 y TIMP-1 pueden predisponer a procesos patológicos. A pesar de que el estímulo para los cambios de MMP/TIMP en la ELA sigue siendo desconocido y su papel en la patogenia de la ELA no está claro, algunos autores han propuesto que el análisis de las MMPs en suero podría usarse como factor pronóstico o puede ser un marcador potencial para monitorear los efectos del tratamiento o de la progresión de la enfermedad [Fang y cols. 2010]. Para aumentar la controversia respecto de las MMPs y ELA, otros reportes han descrito que las motoneuronas que expresan MMP-9 son las que sufrirán degeneración, lo que ha llevado a proponer a Kaplan y cols. [2014] que la expresión de esta

enzima es determinante en la progresión de la enfermedad en modelos dependientes [Kaplan y cols. 2014] o independientes donde su sola inhibición fue neuroprotectora [Spiller y cols. 2019].

## HIPÓTESIS

Como la UNM es una unidad anatómica y funcional que se afecta tempranamente en la ELA, las intervenciones terapéuticas dirigidas a varios mecanismos subyacentes al daño, podrían preservar su morfología y funcionalidad, fundamentalmente si se aplican antes de la aparición de los síntomas.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento de los cambios que sufre la UNM en el modelo SOD1G93A en rata y evaluar la violaceína como posible agente terapéutico.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar el análisis morfométrico de las UNM presentes en el músculo rápido EDL en animales transgénicos SOD1G93A en estadio asintomáticos y sintomáticos.
2. Realizar el análisis comparativo de la UNM de los músculos EDL y sóleo en animales transgénicos SOD1G93A en estadio sintomáticos evaluando parámetros morfométricos y MMP2 y MMP9.
3. Evaluar la capacidad de preservación de la UNM en animales transgénicos SOD1G93A tratados con violaceína desde un estadio asintomático tardío hasta la fase terminal de la enfermedad.

## JUSTIFICACIÓN DE LOS OBJETIVOS PROPUESTOS

La literatura reporta que el daño en la UNM comienza en los músculos rápidos, por lo tanto, el análisis profundo de los distintos componentes de la UNM del músculo EDL en estadios asintomáticos y sintomáticos bien definidos y comparando con los controles respectivos permitirá conocer cuál/es parámetros se afectan más temprano (Objetivo Específico 1). Por otra parte, si bien se muestra que el daño muscular parece ser similar en músculos rápidos y lentos, no se encontraron datos del análisis comparativo profundo de la UNM en ambos tipos de músculos en ratas y son escasos en ratones. El Objetivo Específico 2 permitirá conocer si los componentes de la UNM son afectados por igual en músculos rápidos y lentos o si tienen alguna respuesta particular al respecto. El Objetivo Específico 3 permitirá conocer si una sustancia con potencial neuroprotector como la violaceína podría preservar la UNM y la masa muscular de animales transgénicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ANIMALES

Todos los procedimientos realizados con animales estuvieron de acuerdo con los códigos internacionales que regulan el uso de animales para experimentación y fueron aprobados por el

Comité de Ética de Uso de Animales (CEUA) del IIBCE (N° 004/09/2015 y 001/11/2021) y bajo la ley de experimentación animal N° 18.611. Los animales empleados son machos que pertenecen a la cepa Sprague Dawley (SD) y forman parte de una colonia cerrada originada con 2 ratas machos hemicigotos NTac: SD-TgN (hSOD1G93A) L26H (Taconic) (Tg) que fueron desarrollados por [Howland y cols. 2002] y 6 ratas hembras no transgénicas (NoTg) compradas a Jackson Laboratory.

Los animales transgénicos (Tg) sobreexpresan el gen de la enzima humana SOD1 con la mutación puntual Glicina por Alanina en la posición 93 (hSOD1G93A). Los harenes fueron realizados en el Bioterio del IIBCE, estuvieron compuestos por 1 macho Tg y 3 hembras No Tg. En todos los casos, las condiciones de cría se mantuvieron estables (temperatura controlada, 12 h de ciclo luz/oscuridad y acceso a agua y comida a voluntad). El mantenimiento de los animales estuvo a cargo del personal del Bioterio institucional, mientras que el marcado y el genotipado de los mismos fue parte de las tareas desarrolladas en esta tesis. Para todas las aproximaciones experimentales se emplearon animales Tg portadores de la mutación y los hermanos negativos (NoTg).

## GENOTIPADO MEDIANTE PCR

El genotipado de ratas neonatas es un paso fundamental para el reconocimiento de los animales Tg y NoTg dado que los signos y síntomas de la enfermedad se manifiestan en animales adultos. Por ello, el mismo debe realizarse en los primeros días posteriores al nacimiento siguiendo un protocolo tomado de Vargas y cols. (2006). En primer lugar, los animales se marcaron bajo la piel con tinta china en distintos lugares (patas, manos, cola) aprovechando la condición de alopecia de los neonatos. Posteriormente, luego de 30 min de UV y bajo campana se prepararon los tubos conteniendo 200 µL de buffer de digestión GNTK (50 mM de KCl, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 10mM de Tris-HCl pH 8.5, 0.01% de gelatina, 0.45% de Nonidet P-40 y 0.45% de Tween 20®) y 100 µg/mL de proteinasa K (New England BioLabs Inc, #P8102S). Luego se limpió la cola de cada animal con etanol 70%, se cortaron 2-5 mm de cola con bisturí estéril, se colocaron en un tubo Eppendorf conteniendo GNTK y se incubaron en termobloque durante 30 min a 55°C que es la temperatura óptima de acción de la proteinasa K. Luego se inactivó la proteinasa K incubando las muestras a 95°C durante 10 min y se centrifugó brevemente. Se tomó 1 µL de la misma conteniendo ADN genómico para agregarlo a la mezcla de la reacción de PCR de la siguiente composición:

Stock	Concentración	Volumen (µL)
H2O para PCR	-	14,2
PCR buffer (Perkin Elmer) 10X	1X	2
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,5 mM	0,6
dNTP's 5 mM (Invitrogen)	0,2 mM	0,8
Cebadores 10 µM	0,2 µM	0,4
Taq Polimerasa 5U/µL	0,25 U/µL	1
Volumen Final	-	19

Los cebadores utilizados que reconocen parte de la secuencia de la hSOD1G93A fueron comprados a Integrated DNA Technologies (IDT, USA) y su secuencia es la siguiente: Forward: 5' GTG GCA TCA GCC CTA ATC CA 3' Reverse: 5' CAC CAG TGT GCG GCC AAT GA 3' La mezcla de reacción de PCR se calculó para el número de tubos más 1 (n + 1), teniendo en cuenta la inclusión de un blanco. Los tubos se mantuvieron en hielo para inhibir la actividad de la Taq polimerasa y después de agregar 1,0 µL de la solución del sobrenadante conteniendo ADN, se introdujeron en un termociclador Biometra® T1.

Amplificación: La configuración de temperaturas y tiempos establecidos para cada paso de la amplificación fue la siguiente:

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Propósito
95	2	Activación de la Taqpol
95	0,5	Desnaturalización de ADN
60	0,5	Unión del Cebador
72	0,5	Elongación
72	5	Completar amplicones de ADN simple hebra

Electroforesis: Para visualizar los amplicones generados durante la amplificación previa, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida 6% en buffer Tris Borato EDTA (TBE, de composición: 90 mM Tris, 89 mM de Ácido Bórico, 2 mM EDTA) empleando peines de 1,5 mm de espesor. Los geles de poliacrilamida, con frecuencia son utilizados para caracterizar proteínas y ADN de bajo peso molecular entre 80pb y 300pb [McGookin 1988; Stellwagen 2009]. En este caso los amplicones esperados son de 160 pb, por lo que es preferible utilizar geles de poliacrilamida en vez de agarosa dado que estos últimos poseen un nivel de resolución mucho menor que los de poliacrilamida ya que no permiten separar moléculas de ADN que difieren en tamaño menos de 50 pb. La técnica consiste en la elaboración de una fina capa de gel de acrilamida adherida a una lámina de vidrio por la cual el ADN migra debido a su carga negativa cuando es sometido a un campo eléctrico. La distancia de migración depende del tamaño de la molécula y de la densidad del gel. Gracias a que la densidad de carga de ADN es constante, las distintas moléculas sólo se diferenciarán por su peso molecular, y como estamos hablando de polímeros de nucleótidos, podemos simplificar esto como “su tamaño”. La técnica se llevó a cabo en cinco pasos: montaje de la cámara de electroforesis, preparación de la solución de poliacrilamida y llenado de la cámara de electroforesis, pre-corrída del gel, corrída de las muestras y tinción del gel. Para la preparación de un gel de 10 mL con 15 pocillos se agregaron los siguientes reactivos en el orden que son nombrados, 8 mL de TBE 1X, 2 mL de stock de bis-acrilamida (30/1), 100 µL de persulfato de amonio 10% y 10 µL de TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina). En cada uno de los pocillos del gel se cargaron 5 µL del producto de PCR más 1,5 µL de buffer de carga 6X de composición: 0,25% azul de bromofenol, 0,25% de xilén-cianol FF, 30 % de Glicerol, en H<sub>2</sub>O destilada. La electroforesis se realizó a 80 V (40 mA) durante 40 minutos.

Revelado del gel en plata: el revelado de la PCR nos permite discriminar entre los animales positivos para la mutación SOD1G93A de los NoTg, mediante la detección de la presencia o ausencia del amplicón. Para lograr esta discriminación se realiza la tinción argéntica del gel de poliacrilamida conteniendo las muestras de la amplificación, como se describe a continuación: se desmonta el gel en una solución de fijación (500 µL de Ácido Acético y 13,7 mL de Etanol 100% en 100 mL de H<sub>2</sub>O destilada) y se mantiene en agitación suave durante 10 min. Posteriormente se recupera la solución fijadora y el gel se incuba durante 10 min en una solución 0.2% de AgNO<sub>3</sub> en H<sub>2</sub>O destilada. Luego de recuperar la solución de plata, el gel se lava rápidamente tres veces con H<sub>2</sub>O destilada para quitar el exceso de plata no unido al ADN y se incuba con la solución de revelado (3 g de NaOH y 500 µL de formaldehído en 100 mL de H<sub>2</sub>O destilada). Finalmente, el gel se mantiene en la solución de revelado con agitación suave hasta divisar nítidamente las bandas que indiquen los animales positivos y la ausencia de las mismas que permite identificar los no positivos.

Genotipado de ratas adultas: Este procedimiento tiene el mismo principio y los mismos reactivos que el de ratas neonatas con variaciones referentes a los tiempos de digestión de colas debido a la diferencia de edad. Luego de haber cumplido un mes de nacidas, las ratas fueron destetadas y marcadas con orificios en las orejas, siguiendo un código específico que permite identificarlas en todo momento. Una semana después se cortó aproximadamente 5 mm de la cola y se colocó en un tubo Eppendorf® con 300 µL de buffer de digestión de cola (TBD del inglés *Tail Digestion Buffer* de composición: 50 mM de Tris pH 8, 50 mM de EDTA y 0.5% de SDS). Posteriormente se agregaron 185 µL de TBD + 15 µL de proteinasa K (20mg/mL > 30U/mg). Las muestras se incubaron durante 15 min a 65°C para inactivar posibles ADNasas y posteriormente se incubó a 50°C toda la noche. Al día siguiente se incubó durante 15 min a 95°C para inactivar la proteinasa K y evitar la degradación de la Taq polimerasa. Se centrifugó 10 min a 12.000g con el fin de sedimentar los restos de tejido sin digerir; se tomaron 10 µL del sobrenadante y se llevó a una dilución 1/20 en agua. De esta dilución se tomó 1,0 µL para realizar la PCR y se prosiguió del mismo modo que lo previamente descrito para el genotipado de neonatos.

## TRATAMIENTO CON VIOLACEÍNA

Para cumplir con el tercer objetivo se emplearon 18 ratas Tg y 18 ratas NoTg que recibieron 8 inyecciones intraperitoneales, una por semana, de 300 mmoles/Kg de violaceína o igual volumen de vehículo (0.5% DMSO) desde el día 150 y se dejaron vivir hasta que los animales Tg no tratados (inyectados con vehículo) alcanzaron el estadio final (190-205 días) [Olivera-Bravo y cols. 2022].

## PROCESAMIENTO DE ANIMALES Y DISECCIÓN DE MÚSCULOS

Se procesaron simultáneamente animales de cada condición experimental y de la misma edad. Para los objetivos 1 y 2 se procesaron simultáneamente animales Tg y NoTg de la misma edad y del mismo batch de nacimientos. Para realizar el tercer objetivo se procesaron simultáneamente 4 animales: no tratados que fueron inyectados con vehículo (Tg y NoTg) y tratados que fueron inyectados con violaceína (Tg y NoTg). Cada animal recibió una inyección intraperitoneal de 90/10 mg/kg de ketamina: xilazina, se sacrificó por decapitación y los músculos sóleos y EDL, se disecaron bajo hielo, destinando la mitad del tejido para ensayos bioquímicos y la otra mitad para análisis de UNM y músculo.

### Disección de músculo sóleo y EDL

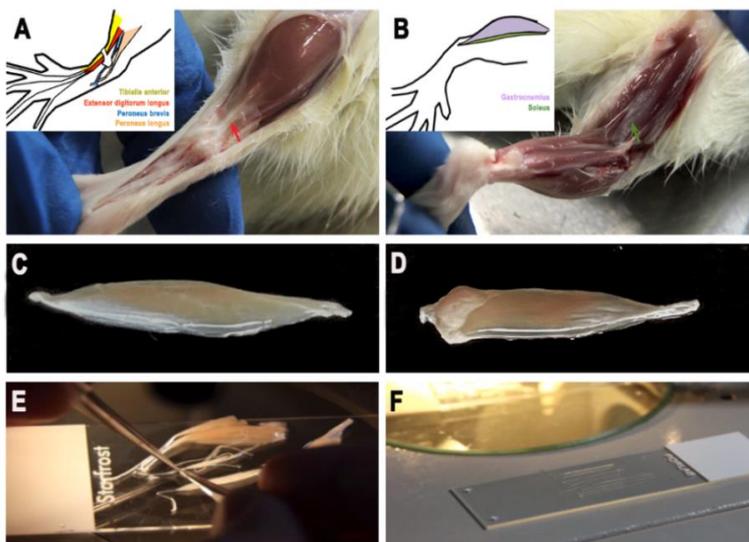
Este procedimiento se realizó de acuerdo a Bolatto, Olivera y Cerri [2021]. Para la disección del músculo EDL se colocó al animal con el abdomen hacia arriba (decúbito dorsal, flecha roja en Figura 1A), se limpió con etanol 70% y se realizó una incisión inicial con un bisturí entre los dedos de los pies hacia la extremidad trasera. Se quitó la piel, tirando de ella hacia arriba hasta que la rodilla de la rata quedó expuesta. Para encontrar el EDL, se siguió el trayecto de los tendones del pie hasta el ligamento anular que rodea los tendones, se levantaron ambos tendones y se eligió el que hace que los dedos se muevan hacia arriba (lo que nos confirma la identificación del tendón EDL). Se realizó un corte en este sector con tijeras unibanda, se sostuvo el tendón con pinzas finas y se separó lentamente el músculo EDL del músculo tibial anterior, el peroneo corto y el peroneo, asegurándonos de que el músculo estaba separado y no había recibido ningún daño. Para aislar completamente el músculo, se cortó el tendón unido a la rodilla de la rata con tijeras unibanda. Un músculo disecado (Figura 1C) se destinó a análisis de las UNM siendo sumergido en 5 mL de paraformaldehído (PFA) al 0.5% por 24 h a 4°C. El otro músculo se congeló a -80°C para ser empleado en análisis bioquímicos.

Al momento de disecar el músculo sóleo (músculo de contracción lenta, flecha verde en Figura 1B) se volteó al animal quedando con el abdomen hacia abajo y se limpió con alcohol. A través de la piel, se cortó el tendón del calcáneo con un bisturí quirúrgico. Con la ayuda de las pinzas biológicas y las tijeras unibanda, se separó el músculo gastrocnemio de los huesos, creando un "párpado muscular". El sóleo permanece en el lado interno del párpado muscular y se identificó por ser de color rojo y con una morfología plana. Con un par de pinzas finas, se levantó el tendón del sóleo que se encuentra por encima del músculo gastrocnemio y se realizó un corte del tendón levantando todo el músculo mientras se cortaron algunos de los puntos de unión con elementos neurovasculares. Finalmente, para liberar completamente el músculo sóleo, se cortó el fascículo sóleo que forma el tendón del calcáneo. Igual que en el proceso de disección de EDL, al finalizar se sumergió el músculo disecado (Figura 1D) en 5 mL de PFA al 0.5% por 24 h a 4°C.

## INMUNOFLOURESCENCIA PARA RECONOCIMIENTO DE LA UNM

### Teasing o peinado de las fibras musculares en EDL y SÓLEO

Este procedimiento también se realizó de acuerdo a Bolatto, Olivera y Cerri [2021]. Una vez que los músculos permanecieron durante 24 h de fijación, se enjuagaron los músculos con 6 mL de solución salina de Dulbecco (DPBS cuya composición en mg/ml es la siguiente: CaCl<sub>2</sub> 133; MgCl<sub>2</sub> 100; KCl 200; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200; NaCl 8000; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1143.56; NaHCO<sub>3</sub> 36; D-Glucosa 1000; Piruvato de Sodio 110) por 3 veces durante 10 minutos cada uno antes de aislar las fibras musculares. Para aislar las fibras, se colocó uno de los músculos en un portaobjetos de microscopio y con un estereomicroscopio, se sujetaron suavemente uno de los tendones con un par de pinzas finas (Figura 1D). Luego, con otras pinzas biológicas, se pellizó el tendón lentamente para separar las fibras musculares tirando hacia arriba el tejido hacia el tendón del músculo opuesto repitiendo el proceso hasta obtener múltiples paquetes pequeños y aislados. Al finalizar, las fibras aisladas se colocaron con cuidado en un portaobjeto pre-tratado (silanizado), manteniendo todas las fibras en orden para que no se superpongan y dejando al aire para que se sequen durante 24 h (Figura 1F).



**Figura 1:** A-B: Identificación anatómica del músculo EDL (flecha roja) y del músculo sóleo (flecha verde) y esquema de los mismos. C-D: Músculos EDL y sóleos disecados y fijados. E: Imagen de un músculo que está siendo peinado. F: Fibras peinadas secándose en portaobjeto silanizado previo a comenzar el inmunomarcado y marcado con pruebas fluorescentes.

## Incubación con anticuerpos primarios

Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente, excepto en los casos donde se indica lo contrario. La forma más eficaz de eliminar las diferentes soluciones sin desprender fibras del portaobjetos es utilizar una jeringa de insulina. Para iniciar el proceso de inmunotinción, se rodearon las fibras musculares aisladas secas con un bolígrafo que repele el agua (PAP PEN), creando una barrera impermeable. Para hidratar las fibras musculares, se agregaron 200  $\mu$ L de agua destilada durante 5 minutos y luego se cambió por 200  $\mu$ L de DPBS durante 5 minutos. Luego se inició el marcado por inmunofluorescencia: en primer lugar, las fibras se incubaron con 300  $\mu$ l de un tampón de bloqueo (BB: 50 mM de glicina, 1% de BSA y 1% de Triton X-100) durante 30 min. Posteriormente se procedió a la incubación con el anticuerpo primario a una concentración sugerida por los fabricantes y con BB como medio de dilución. Para detectar el componente presináptico de la UNM, en estos experimentos se utilizaron 400  $\mu$ L de una dilución 1/800 del anticuerpo monoclonal SMI32 (# SMI-32P, Covance) o SMI31 (# SMI-31P, Covance), que reconocen al neurofilamento pesado (H) no fosforilado (SMI32) o fosforilado (SMI31), respectivamente. Cada incubación con anticuerpo primario se realizó a 4° C durante la noche (opcionalmente, la incubación se puede realizar a 37°C durante 1 h).

## Incubación con anticuerpos secundarios

Luego de la incubación con cada anticuerpo primario, los mismos se retiraron y las fibras se lavaron 3 veces (10 min cada lavado) con 500  $\mu$ L de DPBS y la última vez con BB. Luego del último lavado, se agregó una dilución 1/1000 del anticuerpo secundario en BB. Para los experimentos de esta tesis, se usaron 500  $\mu$ L de Alexa Fluor 488 de cabra anti-ratón (# A 11008, Invitrogen) para reconocer a SMI32 o SMI31. Para identificar el elemento postsináptico de las UNM, se añadió una dilución 1/300 de  $\alpha$ -Bungarotoxina ( $\alpha$ -Btx) conjugado a biotina-XX (1196, Invitrogen) a la dilución del anticuerpo secundario. La mezcla que contenía el anticuerpo secundario y la  $\alpha$ -Btx se incubó durante 2 h a temperatura ambiente o 1 h a 37°C, protegida de la luz. Luego de este tiempo, se retiró el excedente del anticuerpo secundario y la  $\alpha$ -Btx, se realizaron 3 lavados durante 10 min cada uno con 500  $\mu$ L de DPBS y un lavado final con BB. La muestra luego se incubó con 500  $\mu$ l de una dilución de 1/1000 en BB de estreptavidina Alexa Fluor 555 (S21381, Invitrogen) durante 1 h a temperatura ambiente. Se retiró la solución de estreptavidina y se realizaron 3 lavados de 10 min con 500  $\mu$ L de DPBS previo al montaje de las fibras.

## Montaje

Para este paso fue necesario elaborar medio de montaje consistente en 4 partes de Tris-HCl 1.5 M pH 8.8: 1 parte de glicerol. Con el mismo se cubrieron todas las fibras empleándose una punta de pipeta de 200  $\mu$ L para esparcir con cuidado el medio de montaje para garantizar una inmersión completa de todas las fibras marcadas. Previo a la colocación de los cubreobjetos, se colocaron 4 puntos de esmalte de uñas transparente en el portaobjetos del microscopio como si fueran los vértices de un cuadrado y se dejaron secar 1-2 min. Los cubreobjetos se colocaron sobre esos 4 puntos con la ayuda de pinzas para asegurar la exactitud de los movimientos y evitar así el aplastamiento de los tejidos y la generación de burbujas de aire.

## OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES DE LA UNM

Las imágenes de inmunofluorescencias fueron obtenidas en microscopio confocal Olympus FV300 o Zeiss700 con los láseres correspondientes a las distintos fluoróforos (405, 488, 546 nm). Se realizaron apilados de imágenes (Z-stacks) para observar la totalidad de la placa terminal de la

UNM y su componente presináptico. La resolución empleada en todos los casos fue de 1024 x 1024 y la distancia entre cada plano óptico de 1  $\mu\text{m}$ .

El análisis de las imágenes obtenidas en el microscopio confocal de alta resolución fue realizado utilizando el programa ImageJ (NIH) o el programa Photoshop CC 2017 [Bolatto, Olivera-Bravo y Cerri 2021]. Para ello, las imágenes se pasaron al formato TIF y se analizaron los diferentes canales por separado. Se fijó un umbral (*threshold*) único para todas las imágenes de una misma serie de datos para evitar que se midieran señales de ruido o que los diferentes parámetros influyeran sobre los resultados.

Para obtener los valores del área total de la UNM, se seleccionó el borde externo de la placa terminal empleando la herramienta *polygon selections* de ImageJ midiéndose la misma con la opción "*Measure*". De igual manera se seleccionó el borde interno marcando todos los contornos de la región dentro de la placa, obteniéndose el área total de los mismos. El área de la placa terminal o área postsináptica fue determinada por la resta del área externa menos el área interna. El área presináptica, que se define como el área con inmunofluorescencia positiva anti-neurofilamento, se obtiene de la misma manera que la calculada para el área total de la UNM, es decir delimitando el borde externo de la marca positiva que está dentro del territorio de la placa.

Todos estos parámetros se utilizaron para determinar el índice de densidad postsináptica (área postsináptica/área total) y cobertura (área presináptica/área postsináptica). Un índice de densidad postsináptica más alto implica una placa terminal más densa -o más compacta-, mientras que una cobertura más pequeña refleja una interacción mucho más pobre entre la terminal nerviosa y la placa terminal (ambas compatibles con un proceso de denervación). En este trabajo, dado que se detectaron formas de neurofilamentos fosforiladas y no fosforiladas a nivel del terminal nervioso, se calcularon la relación de señal presináptica fosforilada/no fosforilada y la relación de cobertura fosforilada/no fosforilada.

## INCLUSIÓN DE MÚSCULO SÓLEO EN PARAFINA INCLUIDO [BANCROFT Y GAMBLE 1997]

Una vez que la pieza de músculo fue fijada, es necesario prepararla para darle consistencia y firmeza suficientes para poder obtener cortes delgados por congelación o por inclusión, para lo que se debe embeber la muestra, y hacer penetrar dentro de la pieza, en una sustancia homogénea, solidificable por polimerización (resina) o por enfriamiento (parafina) y que además pueda ser dividida en secciones delgadas sin que se rompa. Esta sustancia debe ser ópticamente neutra o susceptible de ser eliminada y debe colaborar con la preservación de la muestra por largo periodo de tiempo. Como la mayoría de los medios de inclusión no son hidrosolubles, si queremos que la sustancia de inclusión penetre la muestra debemos deshidratar el tejido sustituyéndolo por un líquido miscible con el medio de inclusión.

En oportunidad de esta tesis, se realizó la inclusión en parafina, la cual se usa para incluir muestras que serán observadas en microscopía óptica. La parafina es una sustancia de aspecto seroso formada por hidrocarburos saturados procedentes de la destilación del petróleo, a temperatura ambiente es sólida y su temperatura de fusión está entre 40 y 70°C. Antes de la inclusión se procedió a la deshidratación mediante pasajes sucesivos de la muestra en concentraciones crecientes de etanol (70, 90 y 100 %), sumergiendo durante 90 min en cada concentración y en un volumen que superaba entre 10 a 15 veces el volumen de la pieza. La agitación de la pieza en alcohol y el aumento de la temperatura aceleran los tiempos de deshidratación.

El paso posterior a la deshidratación fue el aclaramiento o desalcoholización donde se transfiere el tejido a un líquido que es miscible con el alcohol 100% y con la parafina y que se denomina solvente o sustancia intermediaria. Estos compuestos pueden ser xilol, benceno, cloroformo u óxido de propileno. Todas estas sustancias son normalmente aclarantes, por lo que comprobando la translucidez de la pieza podemos cerciorarnos de la penetración de la sustancia intermedia en el tejido. El tiempo de incubación de la pieza para algunos de estos líquidos intermediarios no debe de ser excesivo puesto que estas sustancias endurecen las piezas y producen problemas para el corte. En el protocolo empleado por nosotros, realizamos 2 pasajes de 90 min de cloroformo cada uno.

Por último se realizaron 3 baños en parafina para lograr la eliminación total del solvente intermediario y la impregnación completa de la pieza. Los recipientes que contienen el material de parafina deben estar en la estufa y destapados para lograr la eliminación por evaporación del intermediario. Una vez completada la inclusión es necesario obtener un bloque sólido que contenga el tejido a seccionar. El mismo se obtiene por solidificación homogénea de la parafina situada alrededor y dentro de la pieza y se efectúa trasladando las muestras del segundo baño de parafina por intermedio de piezas precalentadas a un molde donde se vierte parafina virgen y allí se coloca la pieza. Hay distintos tipos de moldes, en cuanto a forma y material. Es común usar barras de Leuckart, que consisten en una pieza plana de bronce y dos barras deslizantes en forma de L que pueden variar la capacidad del molde según la situación. La superficie de corte debe estar colocada plana sobre el fondo del recipiente. Cuando la parafina del molde se endurece se debe desmoldar, pudiéndose guardar por largo tiempo a temperatura ambiente.

Una vez desmoldado el bloque, su contorno debió ser emparejado con un cuchillo, dándosele la forma de pirámide trunca, dejando entre el bloque y la pieza un margen de parafina de 2 a 3 mm, cuidando de preservar estos bordes paralelos. Para pegar los bloques a la platina del micrótopo se utilizan espátulas calentadas para lograr la adherencia de los bloques a la platina por fundición en la parafina.

Las muestras se cortaron a 6 micras de espesor, en micrótopo de rotación Spencer 820. Las láminas con los cortes se dejaron secar en estufa a 37°C y luego cuando comenzó el desparafinado, 30 minutos en estufa de 60°C.

## ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL MÚSCULO SÓLEO INCLUIDO [BANCROFT Y GAMBLE 1997]

Como se mencionó previamente, para observar las características morfológicas de las células y tejidos es necesario teñirlos, lo que puede implicar el uso de uno o varios colorantes de modo simultáneo o sucesivo. Un colorante es todo material que puesto en contacto con un soporte apropiado se fija sobre él por afinidad química, de forma duradera y le transmite su color.

Existen 2 tipos de tinciones, las vitales que son colorantes que pueden ser captados de forma selectiva por células vivas y se inyecta en el animal vivo y las tinciones supravitales donde el colorante se agrega a las células una vez que fue extraído del organismo. En esta oportunidad, las tinciones utilizadas fueron Hematoxilina – Eosina (HE), Tricrómico de Cajal – Gallego y Tricrómico de Masson y se clasifican dentro del segundo grupo de tinciones.

### Hematoxilina - Eosina

La hematoxilina se extrae del parénquima del tallo del árbol *Haematoxylon campechianum*. La molécula de hematoxilina es incolora y requiere ser oxidada para convertirse en una molécula

coloreada que recibe el nombre de hemateína. La oxidación puede ser de forma natural o artificial. De manera natural, la hematoxilina se deja al aire durante varias semanas e incluso meses y se oxida por efecto del aire y de la luz. Este proceso se llama maduración y en el mismo la hematoxilina adquiere un color muy intenso que se mantiene durante largo tiempo. La oxidación artificial consiste en el añadido de un oxidante químico y es el procedimiento más utilizado actualmente, suele ser instantáneo, pero presenta algunas desventajas entre las que se encuentran la menor vida media de la sustancia y problemas de hiperoxidación entre otros. Como la hemateína posee poca afinidad por los tejidos; las hematoxilas siempre requieren un mordiente, que generalmente consiste en sales de aluminio o, en casos más especiales, de hierro, cobre o plomo. En general, la mayor parte de las hematoxilas son tinciones progresivas, donde la coloración depende del tiempo de incubación y de su concentración; ejemplos de este tipo de tinción es la de hematoxilina-eosina de Meyer. Por lo tanto podemos decir que la hematoxilina es un colorante débil, que con el agregado de un mordiente se transforma en poderoso, por lo tanto es una coloración indirecta. También es una sustancia progresiva, que suele usarse combinada con eosina o PAS (ácido peryódico de Schiff); es aniónica (básica, con afinidad por lo ácido), por lo que tiñe núcleos y ribosomas de color violeta. Diferente a la hematoxilina, la eosina es un colorante regresivo de tipo catiónico (ácido, con afinidad a lo básico) que tiñe proteínas y al citoplasma de rosado. Es soluble en agua y en alcoholes, lo que le confiere mucha versatilidad para la tinción histológica. La eosina es un colorante artificial que puede tener dos fórmulas diferentes (la eosina Y que es la tetrabromofluoresceína y es comúnmente conocida como eosina amarilla y la eosina B que es la dibromodinitrofluoresceína y también es conocida como eritrosina B azulada) pero que como colorantes se comportan iguales, aunque en histología la más usada es la eosina Y. Ambos tipos están disponibles comercialmente y solo se diferencian por el número de átomos de bromo: la Y tiene cuatro átomos de bromo por molécula de eosina y la B, dos átomos de bromo por molécula de eosina.

Para realizar la técnica se comenzó con el desparafinado (la eliminación de la parafina de la lámina). Este paso es fundamental debido a que la parafina es una sustancia opaca por lo si permanece restos en la lámina, durante la observación microscópica, su presencia limitará la visualización nítida de los tejidos. Además como la parafina es hidrofóbica no permite el pasaje de los colorantes, ya que estos se utilizan en soluciones acuosas. Para proceder a la desparafinación, se utilizó xilol, una sustancia intermediaria miscible en la parafina y en el alcohol.

Luego se realizó la hidratación del tejido, utilizando alcoholes de concentración decreciente, es decir que aumentan la cantidad de agua de la solución. La hidratación se realiza porque el colorante es hidrosoluble y de otra forma no penetraría en el tejido. Es importante constatar que el desparafinado haya sido completo y luego se lavó con agua destilada para asegurarse que no queden restos de minerales procedentes del agua corriente de manera de proteger los pasos siguientes.

Después se agregó el colorante, primero hematoxilina durante 10 minutos debido que es un colorante progresivo y no se elimina en los siguientes pasos. Como ya mencionamos, la hematoxilina es de color rojo, pero necesita ser virado para que cambie su color a violeta de manera de distinguirlo de la eosina que es rosada. El virado se realizó poniendo el preparado cuidadosamente bajo agua corriente durante 10 minutos, debido a que esta contiene minerales, por lo que sustituye los baños realizados con agua sulfurosa. Luego se lavó con agua destilada para eliminar los minerales para que no interfiera en los pasos siguientes.

Se agregó eosina durante 2 minutos. Este es un colorante regresivo, por lo que el lavado y la deshidratación posterior debe realizarse rápidamente ya que si no podría eliminarse por completo el colorante del tejido.

La deshidratación se realizó con concentraciones de alcoholes crecientes (primero 95 y luego 100%). Es necesario deshidratar para poder montar el preparado, ya que el medio de montaje (bálsamo de Canadá) es hidrofóbico. Mientras que no se realice el montaje del preparado este se debe de mantener en xilol para que no se seque, ya que esto provocaría la retracción del tejido. El montaje es necesario para poder preservar en tiempo y proteger la pieza.

## Tricrómicos

Las tinciones tricrómicas buscan resaltar fibras colágenas del tejido conjuntivo respecto del resto de las estructuras tisulares (músculo, células epiteliales), que se colorean en tonalidades diversas.

La técnica de Tricrómico Cajal-Gallego implica el uso de 3 colorantes, uno nuclear, la fucsina básica de Ziehl acetificada (solución madre de fucsina de Ziehl, agua destilada y ácido acético) y 2 coloraciones citoplasmáticas, el ácido pícrico y el índigo carmín.

La coloración citoplasmática no es por unión sino que por deposición, actuando en base al tamaño del colorante. Los colorantes de mayor tamaño molecular se desplazan de los tejidos a los colorantes de menor tamaño molecular. El índigo carmín es el colorante de mayor tamaño molecular, es un colorante natural y es de color azul. El ácido pícrico es el colorante de menor tamaño molecular, es artificial y es de color amarillo. El colágeno por ser la estructura tisular más permeable, se tiñe de azul claro por el índigo carmín. El citoplasma se va a teñir de amarillo por el ácido pícrico ya que es una estructura poco permeable. El músculo como tiene una permeabilidad intermedia, se tiñe de verde, ya que toma ambos colorantes. La fucsina es una estructura quinoide, de color rojo, que no tiñe por depósito, sino que forma uniones covalentes, de forma regresiva. Los núcleos así como el mucus se tienen de color violeta rojizo por la fucsina.

El desparafinado siempre es el primer paso a realizar como se mencionó anteriormente.

Luego se realizó la hidratación del tejido, utilizando alcoholes de concentración decreciente, igual que para la tinción anterior, se agregó agua corriente para eliminar el alcohol y se lavó con agua destilada. Se agregó la fucsina acetificada por goteo durante 3-5 minutos. Se lavó con agua destilada para proteger el siguiente paso y eliminar el exceso de fucsina. Luego se agregó el virofijador, que contiene formol y ácido acético, con el fin de virar el color de la fucsina de rojo a violeta, además de eliminar el exceso de fucsina acetificada durante 5 minutos. Se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de virofijador y proteger el siguiente paso nuevamente y por último el colorante combinado pícrico índigo carmín, por goteo durante 6 minutos. Posteriormente se lavó con agua acetificada al 1% durante 1 minuto. El lavado debe ser rápido ya que la coloración de pícrico índigo carmín se puede perder. La deshidratación se realizó con concentraciones de alcoholes crecientes (primero 95 y luego 100%) y por último se montó la pieza.

La técnica de Tricrómico de Masson, como su nombre indica, también emplea tres colorantes: la hematoxilina, la fucsina y el azul de metilo. Esta tinción es muy útil para poner de manifiesto las fibras de colágeno, y el conectivo en general, en comparación con células musculares o epitelios. Su uso es común en el diagnóstico de procesos tumorales.

El proceso de tinción se inició con el desparafinado e hidratado de la pieza. Se lavó con agua destilada y se añadió Hematoxilina de Mayer durante 10 minutos. Pasado este tiempo se procedió a realizar el virado en agua corriente por 10 minutos y posteriormente al lavado con agua destilada. Durante 5 minutos se dejó la pieza con fucsina ácida 1% + ácido acético 0.5% para luego lavar con agua destilada. Se agregó Ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico por 5 minutos y se dejó escurrir. Por último se agregó azul de metilo por 2 minutos, y posteriormente se lavó con agua destilada. Durante 2 minutos permaneció el tejido con agua acetificada 1%. Se deshidrató rápidamente con alcohol 100% y se realizó el aclaramiento con xilol. Por último se realizó el montaje con Bálsamo de Canadá.

## ANÁLISIS DE MMPS EN MÚSCULO SÓLEO

### Inmunomarcado

Se pegaron secciones de 6  $\mu\text{m}$  de músculo obtenidas con micrótopo en portaobjetos xilanizados y se dejaron secar a 37°C durante 24 h, luego se desparafinaron usando un procedimiento estándar (xileno 100%, 10 min, 2 veces, alcohol 100%, 5 min, 3 veces, alcohol 70%, 5 min, 2 veces, agua destilada, 5 min). Luego se lavaron 3 veces con PBS (5 min cada lavado) y se procedió a la recuperación antigénica con proteinasa K 0.25 mg/ml a 37°C durante 10 min. Se lavó 3 veces con PBS, se permeabilizó 20 min con Tritón X-100 0.1%, se bloqueó con PBS: BSA 5% (60 min, temperatura ambiente) y se incubó con anticuerpos anti-MMP-2 (1:300, #436000, Invitrogen) y anti-MMP-9 (1/300, #PA5-13199, Invitrogen) en cámara húmeda, toda la noche y a 4°C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS, se incubó con anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón conjugados a fluoróforos que emiten en rojo y en verde respectivamente (90 min, temperatura ambiente). Luego de ese tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS (10 min cada uno) y se realizó en montaje con glicerol/DAPI 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

### Procesamiento de muestras para zimografía

Se diseccionaron los músculos frescos y en hielo se realizaron cortes de 5mm aproximadamente y se colocaron los trozos de tejido en 200  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis para tejido, al cual se le agregó 2  $\mu\text{L}$  de Tritón X-100 y 0.2  $\mu\text{L}$  de SDS 10%. El tejido se sonicó mediante 3 pulsaciones, con un *duty cycle* 50% en sonicador estándar y en presencia de hielo. Luego de aproximadamente 10 min se repitió nuevamente el sonicado. Es importante que en todo momento la muestra se mantenga en frío con el fin de preservar la actividad enzimática de la muestra. Se centrifugó a 4°C por 10 min y 12000g y se separó el sobrenadante en un eppendorf, descartándose el pellet. Es necesario destacar que de no proceder inmediatamente con el análisis, las muestras se deben preservar en freezer a -80°C (Olivera-Bravo y cols. 2022).

### Determinación de proteínas

Se utilizó el método colorimétrico del ácido bicinonónico (BCA) (Pierce BCA protein assay kit, 23225). Se preparó la curva de calibración realizando el primer punto de la curva correspondiente a una concentración de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  partiendo de una solución de albúmina sérica bovina (BSA) de 10mg/mL. A partir de esta solución, en hielo, se realizaron diluciones seriadas según la siguiente tabla:

Concentración ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Volumen toma ( $\mu\text{L}$ )	Volumen PBS ( $\mu\text{L}$ )
1000	50	450
750	375	125
500	333	167
375	375	125
250	333	167
125	250	250
65	260	240

Luego, en placa de 96 pocillos se sembraron 8-10  $\mu\text{L}$  de cada concentración de estándar, de blanco o de muestra por duplicado y 80-100  $\mu\text{L}$  de la mezcla del kit. Se incubó 30 min a 37°C y se leyó a 562 nm. Se restaron los valores de los blancos y se realizó la curva de calibración aceptándose las que presentan un  $R^2 \geq 0.985$ . De la misma se interpolan los valores de concentración de cada muestra.

### Zimografía en gelatina

La zimografía es una técnica electroforética experimental que se utiliza para determinar la actividad hidrolítica de algunas enzimas denominadas proteasas en un sistema biológico. Se realiza con poliacrilamida y a diferencia de las electroforesis de proteínas más simples, la polimerización de la poliacrilamida se realiza en presencia de gelatina soluble para analizar la actividad de MMP-2 y MMP-9 que son gelatinasas. De esta manera el gel resultante de la polimerización contiene gelatina (colágeno desnaturalizado). Luego de realizar la corrida electroforética, el gel se lava en una solución con Tritón-X100 al 2.5% y se incuba en un buffer apropiado que favorece la actividad de las proteasas (buffer de desarrollo). El resultado de este tipo de geles, es que en la zona donde se ubicó una proteasa, la gelatina habrá sido degradada. Esta degradación se revela tiñendo el gel con colorantes que tengan afinidad por proteínas, observándose una región blanca donde hubo degradación de la gelatina.

El ensayo de zimografía en gel fue realizado según Marco y cols. [2020]. Se utilizó 1 % de gelatina apta para cultivo celular y se co-polimerizó en gel de poliacrilamida al 8 %. Empleando geles de 15 carriles, se cargaron 0,5  $\mu\text{L}$  de cada muestra de homogenato en cada carril y se sometieron a electroforesis a 100 V durante aproximadamente 3 h empleando el sistema Miniprotean II (BioRad, Reino Unido). En cada gel se sembró igual cantidad de proteínas y de MMP-2 y MMP-9 recombinantes que fueron empleadas como control positivo. Luego de la corrida electroforética, el gel se desmontó, se lavó 2 veces a temperatura ambiente con Triton X-100 al 2,5 % durante 30 minutos, se enjuagó 3 veces en agua destilada y se incubó durante 18 h a 37 °C en un tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.6, suplementado con 25 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 200 mM de NaCl y 0.005 % Brij 35. Después de la incubación, el gel se tiñó con 1 % de Coomassie Brilliant Blue R-250 preparado en metanol al 40 % y ácido acético glacial al 10 %. Luego se procedió a desteñir el gel, agitando suavemente en metanol 40 % y ácido acético glacial al 10 % hasta percibir bandas claras en los lugares de degradación de la gelatina. El cálculo de las masas moleculares aparentes de las bandas gelatinolíticas se realizó por referencia a MMP-9 y -2 recombinantes empleadas como patrones. El área de cada banda se determinó con el programa ImageJ (NIH) y se expresó como unidades absolutas (UA).

## ANÁLISIS DE DATOS

Se procesaron entre 7 y 10 animales por cada condición experimental y por edad. Las notaciones empleadas en esta tesis son las siguientes: -NoTga: animal NoTg de la misma edad que el Tg asintomático; -TgA: animal transgénico asintomático; -NoTgs: animal no Tg de la misma edad que el Tg sintomático; -TgS: Tg sintomático; -NoTg VEH (vehículo) oTg VEH: animal NoTg o Tg tratado con vehículo; -NoTg VIOL (violaceína) o Tg VIOL (violaceína): animal NoTg o Tg tratado con violaceína. Se analizaron al menos 75 UNM en cada condición experimental. La mitad de los músculos se destinó a inmunofluorescencia y la otra mitad a zimografía. Cada aproximación experimental se realizó al menos 3 veces en forma independiente empleando duplicados o triplicados de cada condición.

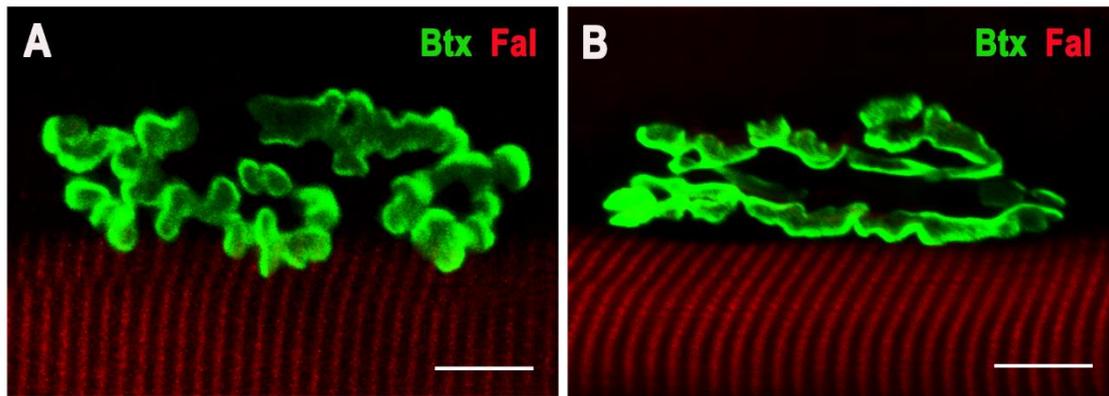
Las imágenes que se muestran en las figuras son representativas de las que se obtuvieron durante este trabajo. Los datos graficados se representan como la media  $\pm$  SEM. La comparación de datos se realizó con ANOVA ordinario y comparaciones múltiples como *post hoc* usando el programa Graphpad 8.2 utilizando el test Tukey's. Se consideró estadísticamente significativo para  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LAS UNM EN MÚSCULO EDL DE ANIMALES TRANSGÉNICOS ASINTOMÁTICOS Y SINTOMÁTICOS

#### Descripción de los componentes de la UNM analizados

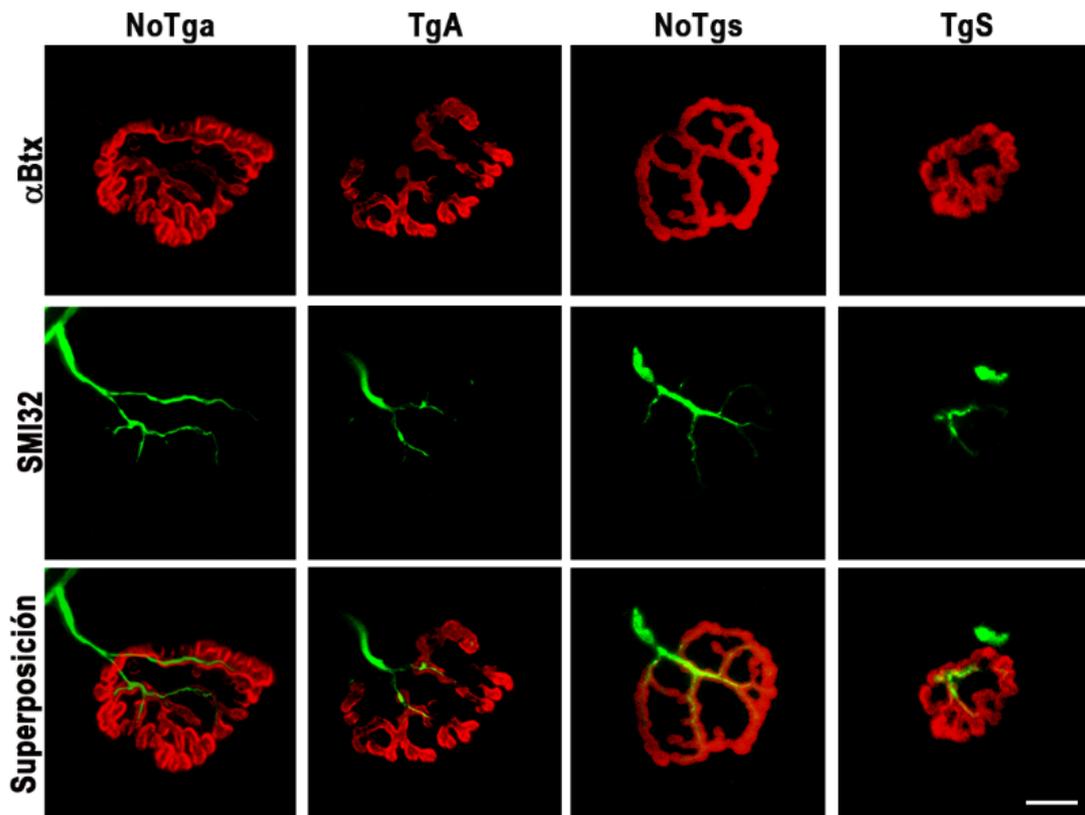
Tal como se muestra en la Figura 1, los protocolos empleados para diseccionar los músculos EDL y sóleo y para peinar las fibras para acceder a marcar las UNM, fueron de calidad suficiente para obtener preparaciones que preservaron la morfología esperada, y permitieron resultados reproducibles. En cuanto a la morfología de las UNM, la Figura 2 muestra una fibra muscular aislada con los filamentos de la banda I de los sarcómeros marcados con faloidina conjugada a rodamina (rojo). La faloidina-rodamina (R415, Invitrogen) tiñe los filamentos de actina de animales o plantas en cultivos celulares o secciones de tejido permeabilizadas y fijadas con formaldehído [Kraft y cols. 1995]. En este caso en particular, la tinción con faloidina permitió ver las estriaciones manteniendo la periodicidad y el aspecto similar a los mostrados en la literatura para fibras bien preservadas. Esta figura también muestra la postsinapsis de las UNM marcadas con  $\alpha$ -Bungarotoxina (Btx), un péptido de 74 aminoácidos extraído del veneno de la serpiente *Bungarus multicinctus*, que se une irreversiblemente a los AChR nicotínicos presentes en la postsinapsis de la UNM [Lindstrom y cols. 1991]. A diferencia del empleo usual de  $\alpha$ -Btx conjugada a un fluoróforo que se puede observar directamente por epifluorescencia o microscopía confocal, en este trabajo, se empleó  $\alpha$ -Btx conjugada a biotina que luego fue reconocida con avidina o estreptavidina fluorescente para visualizar a los receptores nicotínicos. La selección de  $\alpha$ -Btx conjugada a biotina permitió, por un lado, seleccionar los colores de los fluoróforos a emplear y por otro, multiplicar la señal y aumentar la especificidad de la misma debido al uso de estreptavidina que se une a varias moléculas de biotina.



**Figura 2: A-B: Apilado de imágenes en el eje Z de una fibra muscular aislada de músculo EDL (A) y de sóleo (B) marcada con faloidina-rodamina (Fal, rojo) y placa terminal, marcada con bungarotoxina (Btx, verde). La faloidina permite ver las estriaciones de la fibra, en tanto la  $\alpha$ -Btx se une irreversiblemente a los AChR nicotínicos presentes en la postsinapsis de la UNM. Esta marca específica permitió evidenciar las diferencias morfológicas en la postsinapsis de las UNM entre los músculos EDL y sóleo, mostrando la del EDL un territorio más redondeado, mientras que la del sóleo parece más elongada con un eje longitudinal predominante. Barra de calibración: 10  $\mu$ m.**

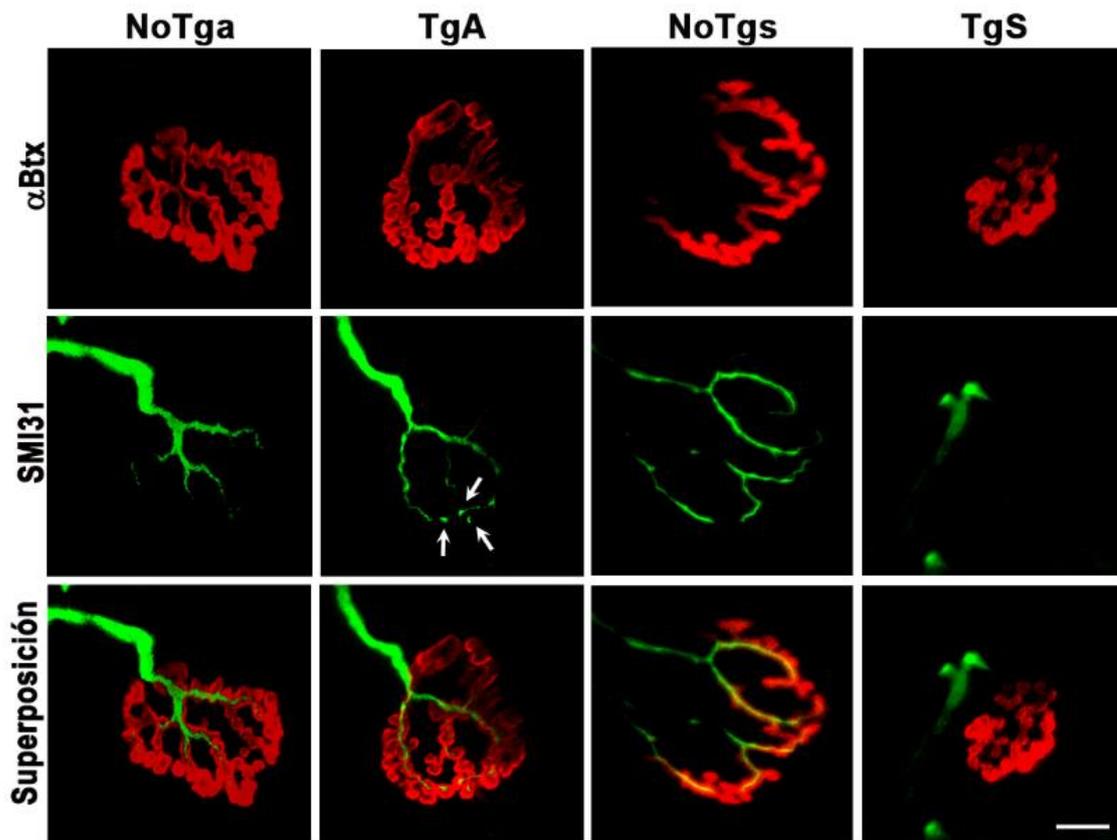
En tanto, el marcado del componente presináptico se realizó empleando dos anticuerpos específicos dirigidos a neurofilamento pesado (en algunos casos también a neurofilamento M), sin fosforilar (SMI32) y fosforilado (SMI31), los cuales, de acuerdo a la hoja del fabricante no presentan reactividad cruzada<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> (<https://www.biologend.com/en-us/products/purified-anti-neurofilament-h-nf-h-nonphosphorylated-antibody-11475?GroupID=BLG15643>; <https://www.biologend.com/en-us/products/purified-anti-neurofilament-h-nf-h-phosphorylated-antibody-11476?GroupID=BLG15643>).



**Figura 3: Apilado de imágenes confocales en el eje Z de los componentes de la UNM de músculos EDL de animales de 120 (NoTga y TgA) y de ~200 días (NoTgs y TgS). El componente postsináptico fue marcado con  $\alpha$ -Btx (rojo) y el componente presináptico (neurofilamento H no fosforilado) fue reconocido por el anticuerpo SMI32 (verde). Mientras que con la edad, los animales NoTg muestran una consolidación de la placa terminal adquiriendo la forma de “pretzel” descrita, los animales TgS muestran la disminución dramática y la simplificación de la señal positiva en ambos componentes. Barra de calibración: 20  $\mu$ m.**

La especificidad del anticuerpo SMI32 que reconoce neurofilamento H sin fosforilar se atribuye a que este anticuerpo se une a un epítipo no fosforilado y la reacción de unión se impide porque dicho epítipo se enmascara cuando está fosforilado. A su vez, el anticuerpo SMI31 no reconoce el neurofilamento H sin fosforilar, lo cual fue demostrado cuando se trataron muestras con fosfatasas, dando negativa la reactividad a SMI31 en las muestras que fueron desfosforiladas.



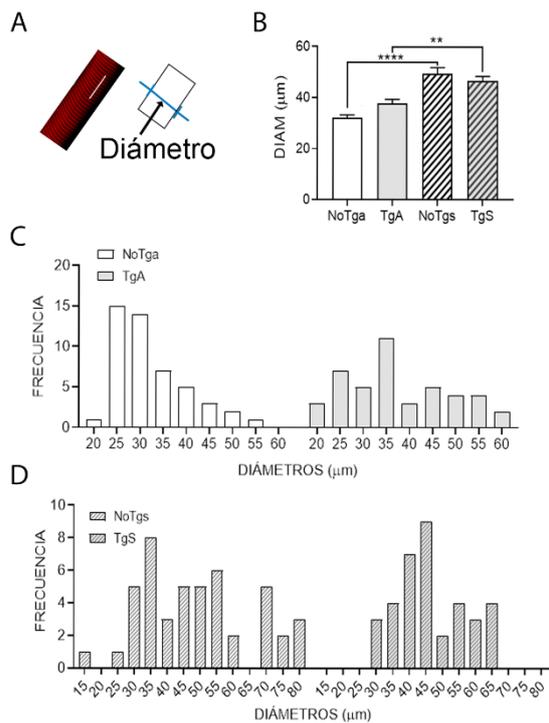
**Figura 4: Apilado de imágenes confocales en el eje Z de los componentes de la UNM de músculos EDL de ratas de 120 (NoTga y TgA) y de ~200 días (NoTgs y TgS).** El componente postsináptico fue marcado con  $\alpha$ -Btx (rojo) igual que en la figura anterior y evidencia la atrofia en el animal TgS respecto de los demás animales. El componente presináptico fue reconocido por el anticuerpo SMI31 (neurofilamento H fosforilado, verde). Esta marca y los planos elegidos permiten evidenciar claramente el solapamiento entre ambas marcas (flechas blancas) y la completa pérdida de contacto en las mismas en el animal TgS. Barra de calibración: 20  $\mu$ m.

Las imágenes confocales de los planos apilados de las UNM del EDL con estos marcadores muestran la aposición precisa entre los elementos pre- y postsinápticos en los animales NoTgs de ambas edades y en el TgA (Figuras 3 y 4). Sin embargo, en los animales transgénicos se observó una clara diferencia entre los asintomáticos (TgA) y los sintomáticos (TgS), mostrando estos últimos, disminuciones en la marca en la presinapsis y en la postsinapsis que llevan a la pérdida de las características morfológicas observadas en animales NoTg. En cuanto a la postsinapsis, se obtuvieron resultados en la UNM empleando el anticuerpo que reconoce el neurofilamento sin fosforilar (Figura 3) y el que reconoce el neurofilamento fosforilado (Figura 4). En ambos casos, en los animales NoTg, de la misma edad que los Tg asintomáticos (TgA), es decir 120 días, y de los NoTg de la misma edad que los TgS (180-200 días), se observa que las postsinapsis marcadas con  $\alpha$ -Btx están bien desarrolladas, son altamente tortuosas, presentan la forma de pretzel descrita y están en estrecha aposición con la parte presináptica. A su vez, el marcado de la presinapsis, muestra las señales de neurofilamento H que se dividen y llegan a contactar con las regiones postsinápticas. En cambio, en los animales Tg sintomáticos (TgS) se observó una reducción dramática de las postsinapsis y de la presinapsis, apareciendo las disminuciones de la presinapsis como las de mayor entidad. Estos resultados muestran una atrofia significativa de las UNM, lo que está de acuerdo, y

morfológicamente es muy similar, a lo que se ha mostrado previamente en ratas sintomáticas que portan la misma mutación [Dupois y Echániz-Laguna 2010; Miquel y cols. 2016; Trías y cols. 2017]. Para cuantificar los cambios observados entre animales Tg asintomáticos (TgA) y sintomáticos (TgS), dado que hay una diferencia de edad significativa atribuible al lapso entre el comienzo de los síntomas y la evolución de los mismos hacia un estadio tardío o terminal [Howland y cols. 2002] y que los animales que empleamos tienen un retraso aún mayor en la aparición de síntomas [Díaz-Amarilla y cols. 2011; Jiménez-Riani y cols. 2014; Olivera-Bravo y cols. 2022], decidimos primero realizar el análisis de los diámetros de las fibras musculares y parametrizar los estudios de la UNM respecto del diámetro de cada fibra cuya/s UNM/s fueron cuantificadas. Este análisis de diámetros en general no se hace, comparándose directamente los componentes de las UNMs en valores de áreas absolutas.

## Determinación de los diámetros de fibras y frecuencia de diámetros en animales No Tg y Tg

El análisis comparativo de los diámetros de las fibras de EDL (con las medidas tomadas en forma perpendicular a las secciones de cada fibra, tal como se muestra en el esquema de la figura 5), indicó un aumento del tamaño de la fibra muscular con la edad tanto en animales asintomáticos como en sintomáticos.



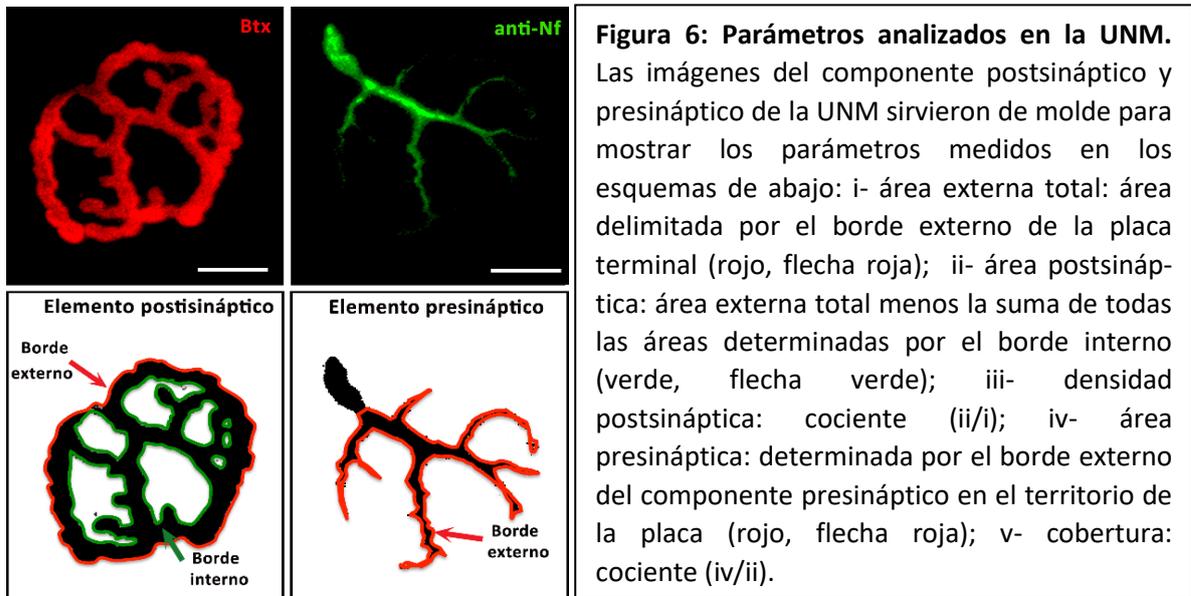
**Figura 5: Diámetros de fibras de EDL en ratas de 120 y ~200 días de vida. A:** Fibra aislada marcada con faloidina y esquema de medida del diámetro perpendicular a la fibra. **B:** Promedio de los diámetros de los EDL de todos los animales analizados, evidenciando el aumento significativo con la edad. **C, D:** Histogramas de frecuencias de diámetros en animales NoTg y Tg, resaltando fundamentalmente que en TgS, la distribución de tamaños es mucho más estrecha que el TgA. Las medidas representadas en todas las figuras son la media±SEM.

En esta figura, la medida del plano perpendicular fue dibujado para indicar cómo se midieron los diámetros de cada fibra (Figura 5A). La medida fue realizada al menos a un diámetro de distancia desde donde está ubicada la UNM porque la presencia de la misma ocasiona un aumento localizado del diámetro. Los valores promedios de diámetros muestran un aumento de la medida en todas las condiciones (Figura 5B) y el análisis estadístico indicó un aumento significativo con la edad en animales NoTg ( $p < 0.0001$ ) y en Tg ( $p < 0.01$ ). El análisis de la distribución de diámetros a los 120 días (Figura 5C) mostró que los animales NoTg presentaron fibras con diámetros de distribución normal, siendo la frecuencia mayor (moda) la correspondiente a 25 μm y que los valores mayores disminuyen en forma de campana hasta 55

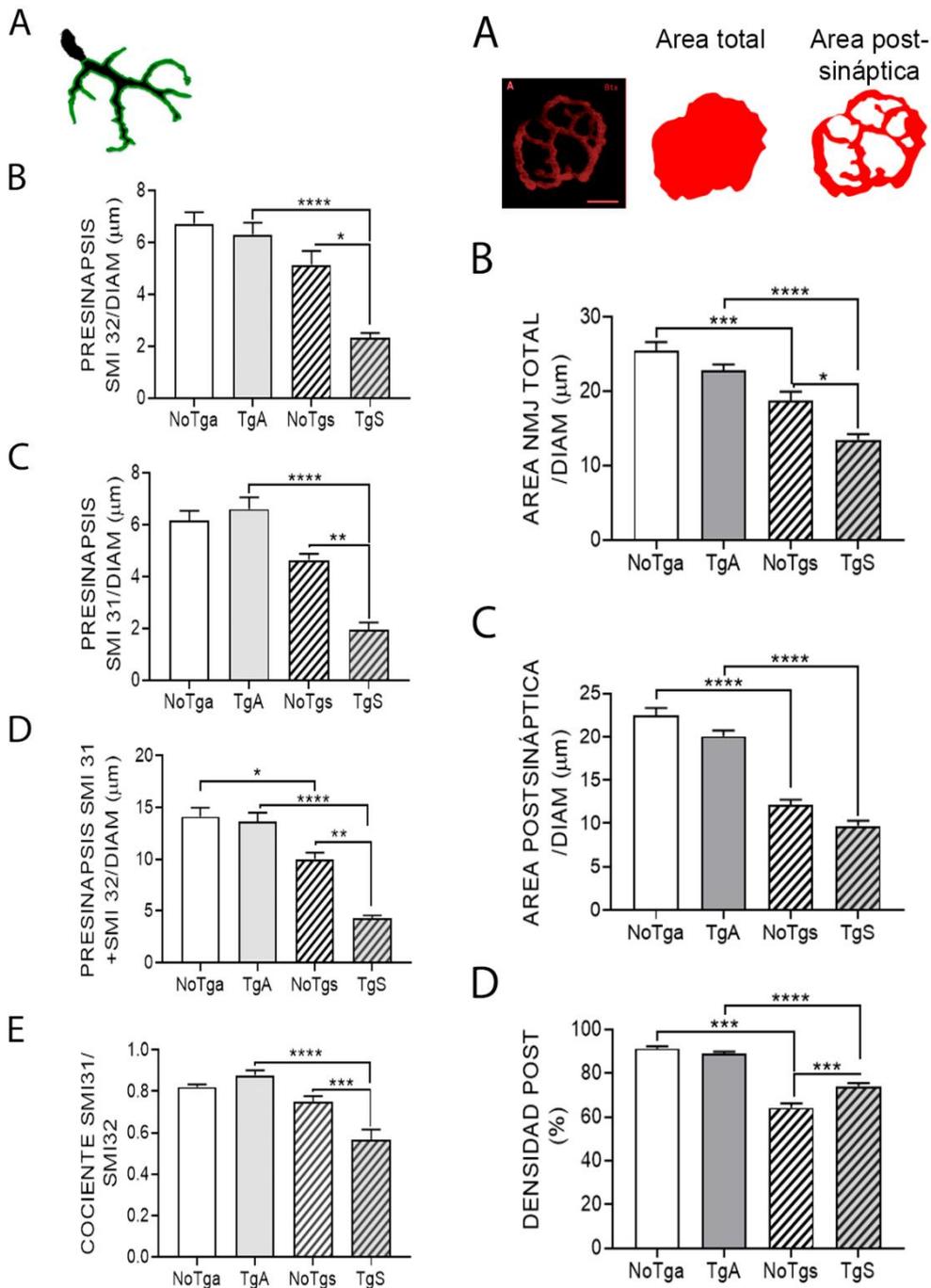
$\mu\text{m}$ . En los TgA, la distribución fue mucho más extendida y aplanada con dos modas (los dos valores de frecuencia mayor) a 25 y 35  $\mu\text{m}$ , sugiriendo que a esa edad las fibras son de tamaño uniforme. En las edades correspondientes a animales sintomáticos, los valores de los NoTgs fueron más extendidos (entre 25 y 80  $\mu\text{m}$ ) y aplanados, pero conservaron la distribución de tipo gaussiana con un máximo menos claro que el observado en los animales más jóvenes. Las frecuencias mayores se observaron entre los 35 y los 55  $\mu\text{m}$ . En los animales TgS se observó una distribución gaussiana con valores entre 35 y 65  $\mu\text{m}$  y con máximos entre 40 y 45  $\mu\text{m}$ . Comparando las gráficas en C y en D se observa que las distribuciones de las dos edades para animales NoTg mantiene la normalidad pero la curva se atenúa mucho a la edad mayor sugiriendo que las fibras tienen tamaños similares y parecen estar estabilizadas. En cambio, en los animales Tg, la distribución mantiene el rango de frecuencias, pero ocurre el proceso contrario que en NoTg. En los TgS, la distribución acentúa la curvatura y parece irse estrechando, mostrando los extremos las frecuencias menores. Los datos obtenidos parecen estar de acuerdo con la escasa literatura encontrada. Aunque el trabajo encontrado no indica la edad de los animales, salvo referirse a que son animales adultos, se puede considerar que los valores obtenidos en esta tesis están en el rango de los reportados por Feng y cols. (2012) donde el análisis de los diámetros de las fibras aisladas de EDL en 6 machos y 6 hembras ratas Sprague-Dawley salvajes dieron valores promedios de diámetros de  $56.57 \pm 2.47 \mu\text{m}$ . No encontramos datos sobre la distribución de los diámetros a distintas edades en ratas. Sin embargo, los perfiles de distribución en animales NoTg y TgA que determinamos parecen, más allá de la distancia entre especies, similares a las presentadas en estudios realizados en ratones controles de 270 y de 360 días [Banker y Robbins 1983; Louboutin y cols. 1993].

### Análisis morfométrico de la UNM de EDL – medida de los componentes pre y postsinápticos

El análisis cuantitativo de los componentes de la UNM, fundamentalmente de la postsinapsis, viene siendo realizado desde un tiempo considerable [Fahim 1995] y actualmente se han desarrollado aplicaciones para programas de análisis de imágenes que permiten el estudio sistemático de los distintos componentes de la UNM [Jones y cols. 2016; Bohem y cols. 2020; Minty y cols. 2020]. En nuestro caso, decidimos realizar el análisis cuantitativo de los distintos componentes de la UNM en forma manual luego de obtener imágenes en Z-stack de fibras peinadas y aisladas con los componentes presinápticos y postsinápticos marcados.



Para realizar esta aproximación, hemos delimitado los distintos componentes como se muestra en la Figura 6 donde se muestra como se miden todas las áreas (área externa de la postsinapsis, área interna de la postsinapsis, área postsináptica, área presináptica) y las relaciones de interés: densidad postsináptica (área sináptica/área externa) y cobertura (área presináptica/área postsináptica). La medida del área del componente presináptico que contacta con la postsinapsis (Figura 7A, borde verde) se realizó con los dos anticuerpos que reconocen el neurofilamento pesado: SMI32 (Figura 3) y SMI31 (Figura 4). Todos los valores de áreas fueron parametrizados al diámetro de la fibra de cada UNM medida. Los resultados obtenidos midiendo el componente presináptico reconocido con SMI32 indican que no hubo cambios entre los animales NoTg a pesar de la diferencia de edad y que hubo una disminución significativa en los animales TgS respecto del TgA ( $p < 0.0001$ ) y del NoTgs ( $p < 0.01$ ) (Figura 7B).



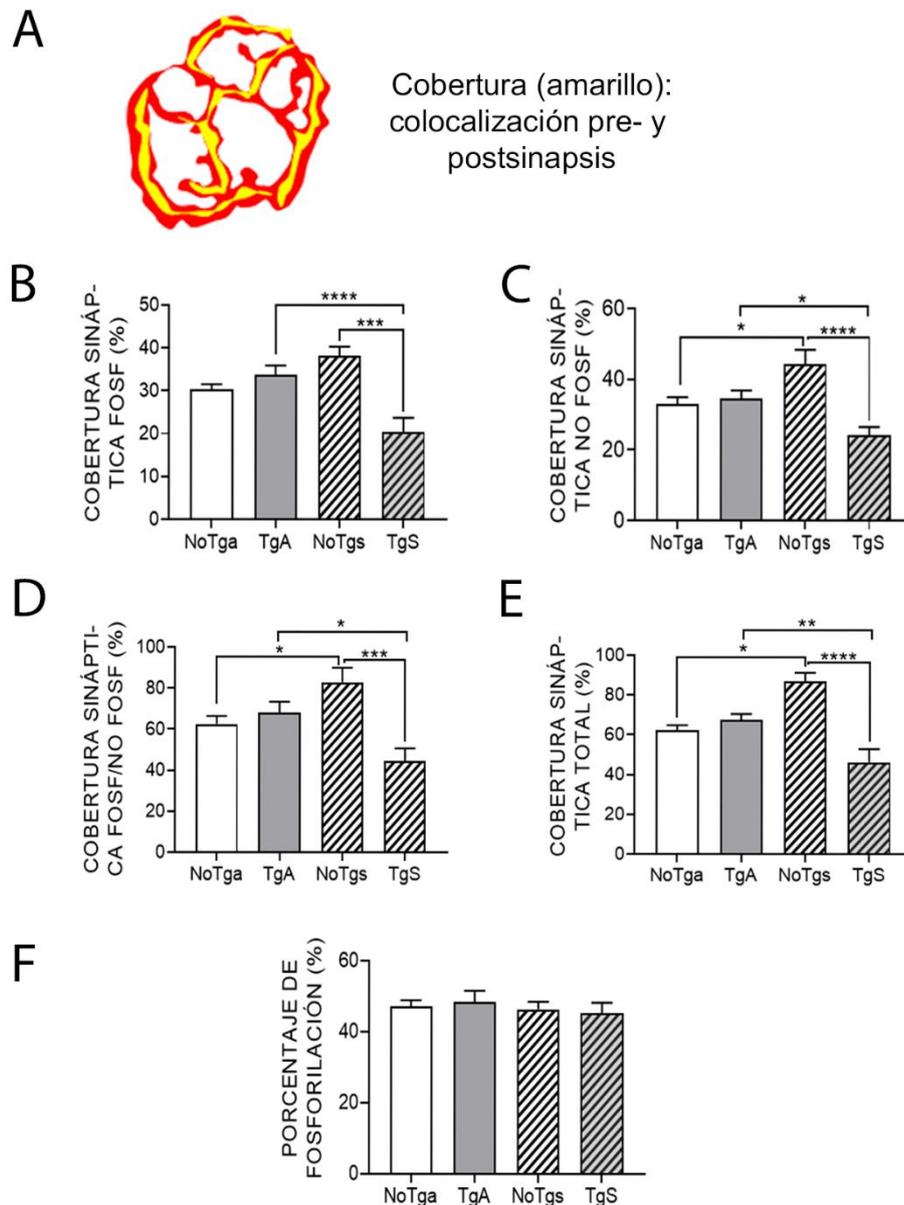
**Figura 7 (izquierda): Análisis del componente presináptico de la UNM. A:** Esquema indicando la medida en el territorio de la placa terminal. **B, C:** Gráficas de las áreas presinápticas no fosforilada y fosforilada mostrando disminución en TgS respecto de TgA y de los NoTg de su misma edad. **D:** Gráfica del área presináptica total evidenciando por primera vez, la disminución significativa en animales NoTg. **E:** Cociente entre las áreas fosforilada y no fosforilada con diferencias significativas del TgS con el TgA y con el NoTg de su misma edad. **Figura 8 (derecha): Análisis del componente postsináptico de la UNM. A:** Esquema del área total externa y del área postsináptica medidas. **B, C:** Gráficas del área total y del área postsináptica de UNMs mostrando disminución significativa con la edad en NoTg y en Tg. **D:** Gráfico de la densidad postsináptica mostrando disminución significativa entre animales NoTg, entre Tg y entre TgS y NoTg de la misma edad. Todos los datos fueron parametrizados a los diámetros de las fibras musculares individuales medidas en cada condición por separado.

Cuando se analizaron los mismos parámetros en las imágenes obtenidas con SMI31, no hubo cambio entre los animales NoTg y se observó disminución significativa en los animales TgS respecto de los TgA ( $p < 0.0001$ ) y de los TgS respecto de los NoTgs ( $p < 0.01$ ) (Figura 7C). El análisis de la suma de las áreas del componente presináptico no fosforilado y fosforilado en los animales de todas las condiciones experimentales (Figura 7D) permitió observar una diferencia significativa debida a la edad entre los animales NoTg ( $p < 0.05$ ) y Tg ( $p < 0.0001$ ), con el valor menor en los animales más viejos. Sin embargo, cuando se realizó el cociente entre los componentes fosforilados y sin fosforilar (Figura 7F), no se encontró diferencias entre NoTg mientras que en los Tg las diferencias se mantuvieron entre asintomáticos y sintomáticos ( $p < 0.0001$ ) y entre sintomático y NoTg de la misma edad ( $p < 0.001$ ).

La medida de las áreas postsinápticas (Figura 8A) incluyó la determinación del área externa delimitada por el borde externo que deja un área esquematizada en rojo entero y el área postsináptica propiamente dicha que está delimitada por la presencia de receptores nicotínicos (área roja en el esquema de la derecha) que es menor al área externa. Estas medidas indicaron que el área externa total de las placas terminales de EDL sufrieron una disminución en animales TgS vs TgA ( $p < 0.0001$ ), TgS vs NoTgs ( $p < 0.005$ ) y de NoTgs vs NoTga ( $p < 0.001$ ), respectivamente (Figura 8B). En tanto, también se observaron diferencias significativas pero de mayor grado, en el área postsináptica en animales TgS vs TgA ( $p < 0.0001$ ) y entre NoTgs vs NoTga ( $p < 0.0001$ ). No se observaron diferencias significativas entre TgS y sus hermanos NoTg de la misma edad en el área postsináptica (Figura 8C), lo que sugiere que el componente postsináptico se mantiene en el músculo EDL de animales Tg sintomáticos. Dado que el cociente entre el área postsináptica y el área externa total determina el parámetro denominado densidad postsináptica [Bolatto, Olivera-Bravo y Cerri 2021], al calcular dicho parámetro para los animales de todas las condiciones (Figura 8D) encontramos diferencias significativas entre animales TgS y TgA ( $p < 0.0001$ ) y NoTgs vs NoTga ( $p < 0.0001$ ). Llamativamente se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre TgS y NoTgs, con un valor mayor en el TgS, que podría atribuirse a la presencia de la SOD1 mutada.

### Análisis morfométrico de la UNM de EDL – evaluación de la cobertura (“coverage”) sináptica

El índice de cobertura calculado como el cociente entre el área del componente presináptico y el área del componente postsináptico expresado como porcentaje es ampliamente utilizado para evaluar el estado de inervación e indica el grado de solapamiento entre ambos componentes en 2D o en 3D dependiendo de las aproximaciones empleadas [Park 2015; Bolatto, Olivera-Bravo y Cerri 2021; Mejia Maza y cols. 2021].



**Figuras 9: Análisis de la cobertura sináptica o grado de solapamiento entre componentes pre- y post- sinápticos de la UNM. A:** Esquema indicando el solapamiento entre el componente pre- y el post-sináptico en amarillo. **B, C:** Gráficas de la cobertura presinápticas no fosforilada y fosforilada, mostrando disminución en TgS respecto de los asintomáticos y de los NoTg de su misma edad. En los NoTg se observa una tendencia al aumento de este parámetro con la edad, que se vuelve significativo en la cobertura no fosforilada. **D:** Cociente entre las coberturas fosforilada y sin fosforilar, mostrando aumento en los NoTg con la edad y disminución significativa entre Tg y entre TgS y los NoTg de la misma edad. **E:** Cobertura presináptica total evidenciando la misma tendencia que en 9D. **F:** Porcentaje de fosforilación similar en todos los animales. Los datos fueron parametrizados a los diámetros de cada fibra.

Se considera que las UNMs "totalmente inervadas" presentan un índice de cobertura total (fosforilada más no fosforilada) del orden del 50%, las "parcialmente inervadas" tienen coberturas entre  $\geq 20\%$  y  $\leq 50\%$  y se consideran "denervadas" cuando este índice es menor al 20%

[Bolatto, Olivera-Bravo y Cerri 2021; Mejia Maza y cols. 2021]. El cálculo de la cobertura sináptica, representada como el área amarilla en la Figura 9A, muestra que la cobertura fosforilada (Figura 9B) disminuyó significativamente cuando se compara los TgS con los TgA ( $p < 0.0001$ ) y los TgS con sus hermanos no transgénicos de la misma edad ( $p < 0.001$ ). Cuando se determinó la cobertura no fosforilada, se observó que hay una disminución significativa en TgS vs TgA ( $p < 0.05$ ) y TgS con NoTgs ( $p < 0.0001$ ) (Figura 9C) y un aumento significativo cuando se comparó NoTgs respecto de NoTga ( $p < 0.05$ ). La relación de coberturas determinadas con anticuerpos que reconocen neurofilamento H fosforilado respecto del no fosforilado mostró la misma tendencia que cuando se determinaron las coberturas fosforiladas solamente (Figura 9D). A su vez, el cálculo de la cobertura total (fosforilada sumada a no fosforilada, Figura 9E) mostró la misma tendencia que las gráficas anteriores.

Los valores obtenidos indican que los animales NoTg y el TgA presentan UNMs que están totalmente inervadas, mientras los animales TgS tienen valores menores del 50% indicando que están parcialmente denervadas como ha sido reportado anteriormente [Jones y cols. 2016; Bolatto, Olivera-Bravo, Cerri 2021]. La disminución de la cobertura refleja una interacción mucho más pobre entre la terminal nerviosa y la placa terminal, lo que es compatible con un proceso de denervación como se observa en las UNM de las ratas TgS. El aumento en este parámetro en los animales NoTg, parece en cambio, indicar un proceso de maduración de la UNM en animales adultos. El empleo de este parámetro, permitió determinar que la cobertura del neurofilamento fosforilado (Figura 9B) presenta valores más bajos que la obtenida con el neurofilamento no fosforilado (Figura 9C), lo que es esperable para motoneuronas donde la mayor proporción del neurofilamento H a nivel de la UNM está defosforilado. [Tsang et al. 2000]. No obstante, cuando se analizó el estado de fosforilación en todos los animales analizados (Figura 9F) no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de fosforilación entre animales NoTg y Tg ni tampoco entre animales Tg asintomáticos y sintomáticos. Esta última relación a su vez, permitió descartar que haya una pérdida de neurofilamentos fosforilados como algunos autores proponen como evento temprano en la patogénesis de la ELA [Tsang y cols. 2000].

### Resumen de la cuantificación de UNMs en EDL de animales NoTg y Tg

Nos pareció conveniente resumir todos los parámetros analizados para evidenciar los cambios que se observan entre ratas Tg asintomáticas y sintomáticas y en sus hermanos NoTg de la misma edad (Tabla 1).

<b>PARÁMETRO (n=75, N=7)</b>	<b>NoTga</b>	<b>TgA</b>	<b>NoTgs</b>	<b>TgS</b>
<i>Diám fibra (<math>\mu\text{m}</math>)</i>	32,07 $\pm$ 1,13	37,65 $\pm$ 1,67	49,35 $\pm$ 2,43	46,57 $\pm$ 1,74
<i>Área pres. fosforilada/diám (<math>\mu\text{m}</math>)</i>	6,62 $\pm$ 0,36	6,62 $\pm$ 0,45	4,65 $\pm$ 0,25	1,95 $\pm$ 0,28
<i>Área pres. no fosforilada/diám (<math>\mu\text{m}</math>)</i>	7,44 $\pm$ 0,40	6,99 $\pm$ 0,59	5,35 $\pm$ 0,53	2,34 $\pm$ 0,18
<i>Área pres. total/diám (<math>\mu\text{m}</math>)</i>	14,06 $\pm$ 0,76	13,61 $\pm$ 1,04	10,00 $\pm$ 0,78	4,29 $\pm$ 0,46
<i>Area pres. fosforilada/no fosforilada</i>	0,89 $\pm$ 0,01	0,95 $\pm$ 0,02	0,87 $\pm$ 0,03	0,57 $\pm$ 0,05
<i>Área total externa/diám (<math>\mu\text{m}</math>)</i>	25,52 $\pm$ 1,11	22,81 $\pm$ 0,81	18,73 $\pm$ 1,22	13,48 $\pm$ 0,75
<i>Area postsináptica/diám (<math>\mu\text{m}</math>)</i>	22,48 $\pm$ 0,85	20,05 $\pm$ 0,69	12,11 $\pm$ 0,63	9,72 $\pm$ 0,57
<i>Densidad postsináptica (%)</i>	91,34 $\pm$ 1,01	88,91 $\pm$ 0,98	64,28 $\pm$ 1,98	74,11 $\pm$ 1,42
<i>Cobertura fosforilada (%)</i>	29,44 $\pm$ 2,44	33,02 $\pm$ 3,69	38,40 $\pm$ 2,66	20,00 $\pm$ 3,39
<i>Cobertura no fosforilada (%)</i>	33,10 $\pm$ 2,73	34,86 $\pm$ 2,51	44,18 $\pm$ 3,50	24,07 $\pm$ 2,28
<i>Cobertura total (%)</i>	62,54 $\pm$ 2,45	67,88 $\pm$ 3,45	82,58 $\pm$ 3,75	44,07 $\pm$ 3,25
<i>Cobertura fosforilada/no fosforilada (%)</i>	88,95 $\pm$ 3,15	94,72 $\pm$ 4,33	86,91 $\pm$ 4,02	83,10 $\pm$ 4,31
<i>Porcentaje de fosforilación (%)</i>	47,08 $\pm$ 1,70	48,64 $\pm$ 3,04	46,50 $\pm$ 2,09	45,38 $\pm$ 2,94

Tabla 1. Resumen de parámetros evaluados en músculo EDL de ratas NoTg y Tg asintomáticas y sintomáticas. Los datos se representan como la media  $\pm$  S.E.M.

Como se evidencia en la Tabla 1, hay diferencias en los diámetros de las fibras aisladas entre 120 y 180-200 días. La parametrización de cada parámetro respecto del diámetro de las fibras para cada situación permitió una comparación más precisa. Además, el aumento de los diámetros de las fibras en los animales NoTg evidenció los cambios asociados al desarrollo y maduración de estos animales, por lo que entendimos que al comparar animales Tg asintomáticos y sintomáticos estábamos frente a dos factores determinantes que influenciaban los resultados: la diferencia de edad por un lado y la transgénesis por otro. Una forma de evaluar la diferencia de edad que encontramos fue realizar los cocientes de cada parámetro entre animales NoTg por un lado y entre animales Tg por el otro (Tabla 2).

<b>PARÁMETRO (n=75, N=7)</b>	<b>NoTgs/NoTga</b>	<b>TgS/TgA</b>
<i>Diám fibra (<math>\mu\text{m}</math>)</i>	1,54 $\pm$ 0,05	1,24 $\pm$ 0,04
<i>Área presináptica fosforilada/diám (<math>\mu\text{m}</math>)</i>	0,70 $\pm$ 0,07	0,29 $\pm$ 0,03
<i>Área presináptica no fosforilada/diám (<math>\mu\text{m}</math>)</i>	0,72 $\pm$ 0,07	0,33 $\pm$ 0,04
<i>Área presináptica total/diám (<math>\mu\text{m}</math>)</i>	0,71 $\pm$ 0,08	0,31 $\pm$ 0,04
<i>Relación área presináptica fosforilada/no fosforilada</i>	0,98 $\pm$ 0,06	0,60 $\pm$ 0,06
<i>Área total externa/diám (<math>\mu\text{m}</math>)</i>	0,73 $\pm$ 0,08	0,59 $\pm$ 0,06
<i>Area postsináptica/diám (<math>\mu\text{m}</math>)</i>	0,54 $\pm$ 0,05	0,48 $\pm$ 0,04
<i>Densidad postsináptica (%)</i>	0,70 $\pm$ 0,09	0,83 $\pm$ 0,10
<i>Cobertura fosforilada (%)</i>	1,30 $\pm$ 0,07	0,61 $\pm$ 0,07
<i>Cobertura no fosforilada (%)</i>	1,33 $\pm$ 0,04	0,69 $\pm$ 0,05
<i>Cobertura total (%)</i>	1,32 $\pm$ 0,05	0,65 $\pm$ 0,04
<i>Relación cobertura fosforilada/no fosforilada (%)</i>	0,98 $\pm$ 0,04	0,88 $\pm$ 0,03
<i>Porcentaje de fosforilación (%)</i>	0,98 $\pm$ 0,07	0,93 $\pm$ 0,04

Tabla 2. Resumen de relaciones de parámetros evaluados en músculo EDL de ratas de 180-200 días/120 días. Los datos se representan como la media  $\pm$  S.E.M. Las casillas en azul claro indican disminuciones significativas entre animales Tg y NoTg, mientras que en violeta se indica un aumento significativo al comparar las relaciones de parámetros entre Tg y NoTg.

Esta tabla permitió evidenciar que en adultos jóvenes NoTg, el diámetro de las fibras musculares de EDL aumenta en promedio alrededor del 50% mientras que en los Tg es del orden del 20%. Entendemos que esta diferencia en los aumentos refleja la atrofia que los animales Tg están sufriendo con el transcurso de la enfermedad. Respecto de los otros parámetros, en animales NoTg se observa que con la edad hay una disminución de  $\sim$ 30% en el componente presináptico, tanto fosforilado como no fosforilado, mientras que en los Tg la disminución es del orden del  $\sim$ 70%, claramente indicando una influencia de la enfermedad que se suma a la de la edad. Además se encontró una disminución mucho más acentuada en el área presináptica fosforilada respecto de la no fosforilada en los animales Tg en comparación con los NoTg que es del orden  $\sim$ 40%. Esta comparación evidenció que hay una pérdida mayor de la fosforilación con el transcurso de la edad y de la enfermedad que de otra forma no pudo verse. Este dato podría ser el que refleje los cambios en la fosforilación previamente reportados con el transcurso de la ELA [Tsang y cols. 2000].

En cuanto al componente postsináptico, el área total externa disminuyó  $\sim$ 27% y el área postsináptica propiamente dicha  $\sim$ 46% en ratas NoTg, indicando que con la edad, los animales NoTg tienen placas terminales menos compactas [Bolatto, Olivera-Bravo y Cerri 2021], lo que se traduce en una disminución de la densidad postsináptica en  $\sim$ 30%. En tanto, en los animales Tg, el área total externa de la placa terminal disminuyó  $\sim$ 40% mientras que el área postsináptica solo disminuyó  $\sim$ 52%, lo que lleva a una densidad postsináptica que se redujo en mucho menor

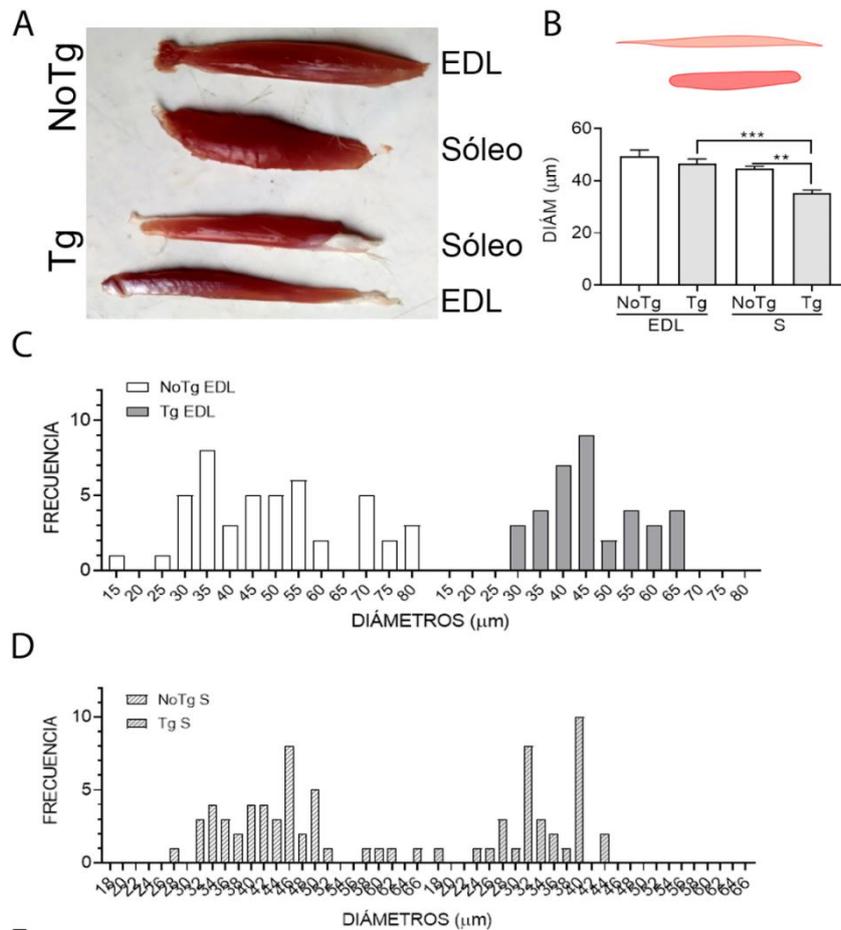
medida (~17%) que en los animales NoTg. Sin embargo, este valor no implica una mejora funcional, sino que el área total externa (el territorio de la placa terminal) se redujo mucho más que el área postsináptica como tal.

La edad también afectó las relaciones entre los componentes pre- y post- sinápticos tal como se observa al comparar los cocientes de las coberturas determinadas en NoTg y en Tg. Mientras que con la edad, las coberturas (fosforilada, sin fosforilar y total) en NoTg aumentaron ~30%, en Tg fue a la inversa y todos los valores disminuyeron ~30% atribuible fundamentalmente a la preservación del área postsináptica observada anteriormente.

En resumen, para el objetivo específico 1, se ha realizado el análisis morfométrico de las UNM presentes en el músculo EDL peinado. Se ha optado por hacer un análisis manual en todas las UNM que mantuvieron la morfología esperada y las señales en ambos componentes. Esta modalidad permite un análisis individualizado de cada UNM a expensas del tiempo y del menor número de UNM analizadas respecto de los procedimientos automatizados [Jones y cols. 2016; Mejía Maza y cols. 2021], pero se tiene la seguridad que se han analizado UNM con parámetros de preservación adecuados. Además, se han parametrizado los valores respecto del diámetro de cada fibra donde hay UNM presentes. Entendemos que esta aproximación permite realizar una comparación más precisa de los componentes en forma menos dependiente de la edad.

## ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA UNM DE LOS MÚSCULOS EDL Y SÓLEO EN ANIMALES TG SINTOMÁTICOS Y NO TG DE LA MISMA EDAD

Dado que la literatura reporta que hay diferencias importantes entre las UNMs de los diferentes músculos [Prakash 1996; Jones y cols. 2016; Mech y cols. 2020; Mejía Maza y cols. 2021], estudiamos algunos de los parámetros más importantes en músculo EDL y sóleo de ratas Tg sintomáticas y de ratas NoTg de la misma edad que fueron procesadas simultáneamente. La Figura 10A muestra las fotografías de los músculos EDL y sóleo de ratas Tg y NoTg de 210 días de edad, disecados y sin ningún procesamiento posterior, evidenciando que los músculos de los animales Tg tienen una notoria disminución del tamaño. Sin embargo, cuando se analizaron los diámetros de las fibras peinadas de cada músculo, los diámetros de las fibras aisladas de EDL entre animales Tg y NoTg no tuvieron diferencias significativas, mientras que las fibras de los sóleos de las ratas Tg tuvieron diámetros transversales significativamente menores que los de las fibras de NoTg ( $p < 0.01$ ; Figura 10B). A su vez, las fibras de los sóleos de Tg sintomáticas fueron de diámetro menor que los las fibras de EDL ( $p < 0.001$ ). Por lo tanto, la disminución del tamaño de EDL podría deberse a la pérdida de fibras enteras. Esta idea parece corroborarse al observar la distribución de diámetros de fibras de EDL de ratas NoTg y Tg que muestran que hay menor dispersión en los tamaños de las fibras, perdiéndose las de diámetros muy pequeños y las de diámetros más grandes (Figura 10C). En cuanto al sóleo, el espectro de diámetro de frecuencias también se estrechó, pero respecto de los diámetros de fibras en animales NoTgs, los sóleos de las ratas Tg perdieron sobre todo fibras de diámetros más grandes (Figura 10D). La figura 10E resume los resultados de las Figuras 10C y 10D y permite evidenciar que en animales Tg la distribución de tamaños de fibras aisladas se estrecha en ambos músculos, pero en el sóleo, la pérdida de diámetros mayores es más notoria.



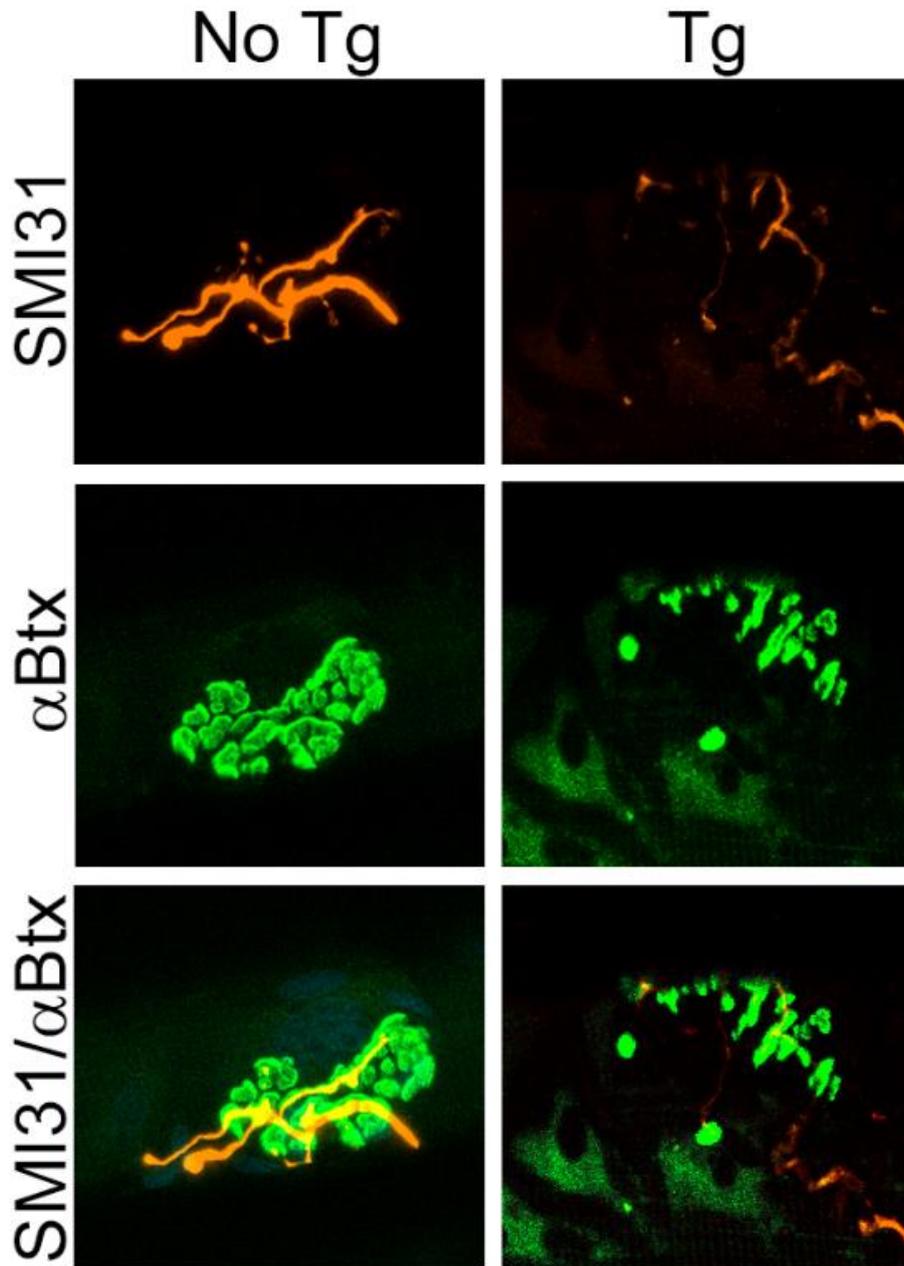
**Figura 10: Comparación de los diámetros de fibras de EDL y de sóleo en ratas Tg y NoTg de ~200 días de vida. A:** Fotografías de músculos frescos aislados de ratas hermanas de la misma edad, evidenciando la notoria disminución del tamaño en el TgS respecto del NoTgs. Los animales fueron procesados y disecados simultáneamente. **B:** Diámetros de las fibras aisladas de todos los animales analizados, evidenciando que las fibras de EDL de animales NoTg y Tg no tienen diferencias significativas. En el sóleo, hay diferencias entre NoTg y Tg y a nivel de fibra aislada, son de diámetro menor que las del EDL. **C-D:** Distribución de frecuencias mostrando patrones de tamaños heterogéneos y difíciles de comparar. Sin embargo, los diámetros de fibras aisladas de sóleo son menos dispersos que los de EDL, lo que se acentúa en los TgS. Las medidas representadas son media±SEM. La edad ~200 representa el momento en que los animales Tg alcanzan el estado terminal y son procesados junto a los NoTg de su misma edad. No se puede dar una fecha exacta debido a la variabilidad en ±10 días en este momento [Olivera-Bravo y cols. 2022]. Se analizaron 70-75 UNM provenientes de 7 animales de cada condición experimental.

### Análisis morfométrico y comparativo de la UNM de EDL y sóleo relativos a los diámetros de fibra

Las UNMs de sóleo se analizaron empleando el anticuerpo SMI31 que reconoce neurofilamento H fosforilado y α-Btx como marcador de la placa terminal. La Figura 11 muestra las UNM típicas de sóleos de rata NoTg y Tg sintomática donde la morfología del componente presináptico y postsináptico es diferente a las UNM de EDL mostradas previamente.

La UNM del animal NoTg muestra un componente presináptico claramente definido que presenta una apariencia distinta a la observada en las UNM de EDL (Figuras 3, 4) y un componente postsináptico también de apariencia diferente (tal como se observó en la Figura 2),

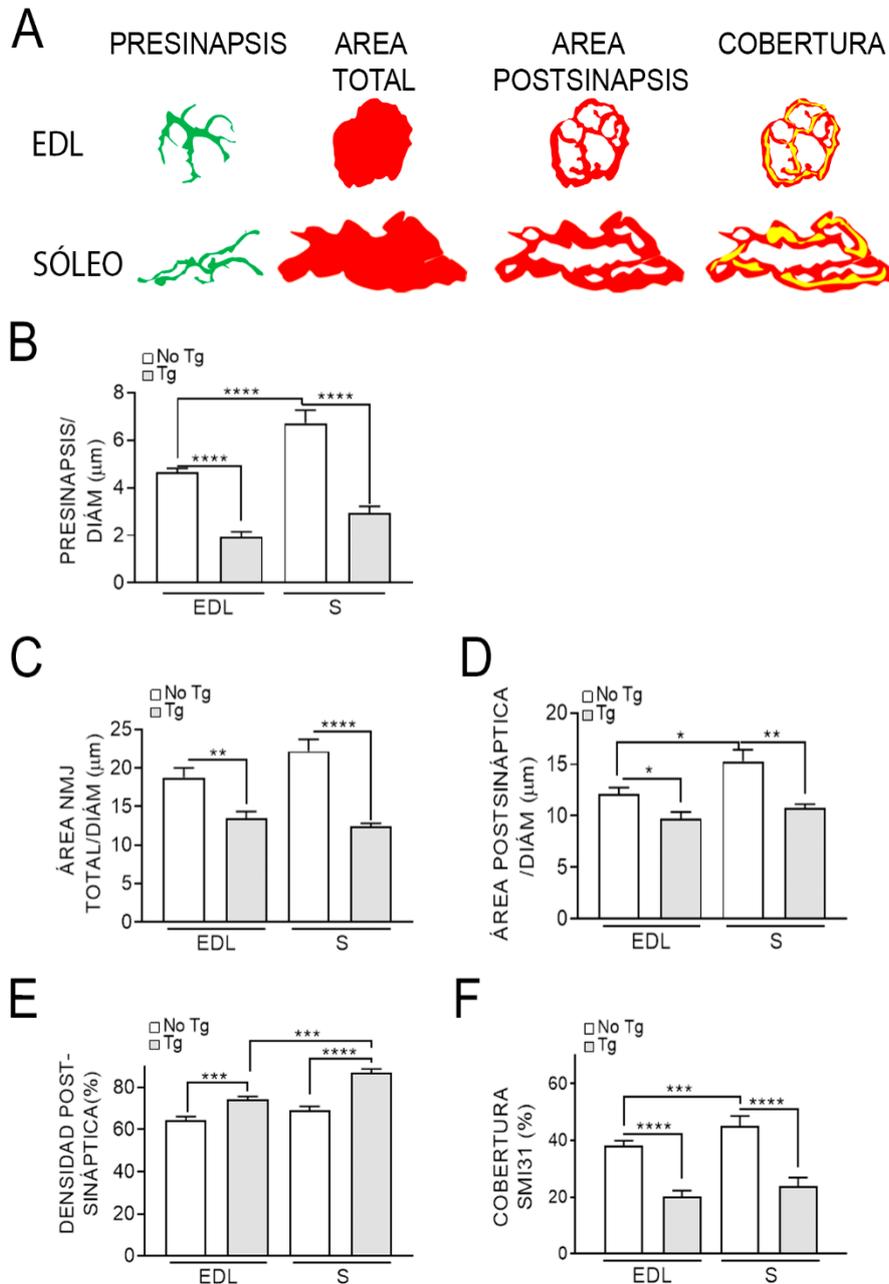
siendo en el sóleo, más alargado y aparentemente más compacto. La UNM del animal Tg fotografiado muestra, respecto del hermano NoTg de la misma edad, una disminución dramática de los componentes presinápticos y postsinápticos.



**Figura 11: Apilado de imágenes confocales en eje Z de los componentes de la UNM de músculos sóleos de ratas NoTg y Tg de ~200 días.** El componente presináptico fue reconocido por el anticuerpo SMI31 que reconoce el neurofilamento H fosforilado (naranja). La distribución parece más extendida sobre la placa terminal en el animal NoTg y desaparece en su gran mayoría en el Tg. El componente postsináptico fue marcado con  $\alpha$ -Btx (verde) y permite mostrar una placa terminal compacta y tortuosa en el animal NoTg y atrofia y simplificación evidente en el animal Tg. Barra de calibración: 20  $\mu$ m.

En la Figura 12A se muestran los esquemas de las UNM más representativas de los músculos EDL y sóleo, resumiendo los cambios observados en las áreas totales externas, las áreas postsinápticas claramente definidas por placas terminales de diferente forma y disposición y un mayor grado de compactación al menos aparente en la placa terminal del sóleo. El análisis comparativo de los parámetros analizados indicó que en animales NoTg, las presinapsis fosforiladas de los sóleos tienen un área parametrizada al diámetro mayor que los EDL (Figura 12B,  $p < 0.0001$ ) y para los animales Tg, que la pérdida del área del componente presináptico es similar para ambos tipos de músculos respecto de sus controles respectivos en los animales NoTg. En lo referente al área externa total (Figura 12C), los animales NoTg presentan un área

parametrizada por el diámetro que tiende a ser mayor en el sóleo que en EDL. Sin embargo, la disminución en el Tg es similar en ambos tipos de músculos. En cuanto al área postsináptica parametrizada por el diámetro, en NoTg se observó lo mismo que en el componente presináptico (Figura 12D), es decir los valores mayores se encontraron en sóleos, pero en Tg los valores alcanzados son similares en EDL y sóleo.



**Figura 12: Análisis comparativo de los componentes pre- y postsinápticos de la UNM de EDL y sóleo de animales de ~200 días.** **A:** Esquema de las UNM típicas de EDL y de sóleo en animales NoTg de la misma edad. **B-F:** Gráficas que muestran las áreas presináptica fosforilada (**B**), total (**C**) y postsináptica (**D**), además de la densidad postsináptica (**E**) y la cobertura (**F**) de UNMs de músculos EDL y sóleo (S) de animales NoTg y TgS. Los animales NoTg mostraron mayores valores en las áreas presinápticas y postsinápticas de S frente a EDL, mientras que en los Tg fueron menores que los NoTg y de valor similar entre los distintos músculos. Contrariamente, la densidad postsináptica fue mayor en los animales Tg respecto de los NoTg para ambos músculos y los valores en S fueron significativamente mayores que en EDL, sugiriendo un grado de compactación mayor en el sóleo. La cobertura mostró los mayores valores en NoTg respecto de Tg. En NoTg, este valor fue significativamente mayor en el sóleo que en EDL, mientras que fueron similares en Tg. Todos los datos fueron parametrizados a los diámetros de fibra respectivos.

Llamativamente ambos músculos mostraron en animales Tgs respecto de NoTgs, un aumento de la densidad postsináptica, debido fundamentalmente a la retracción del área externa total en ambos casos (Figura 12E). La misma tendencia, pero de disminución significativa en este caso, se observó en la cobertura, donde en ambos músculos se determinaron descensos

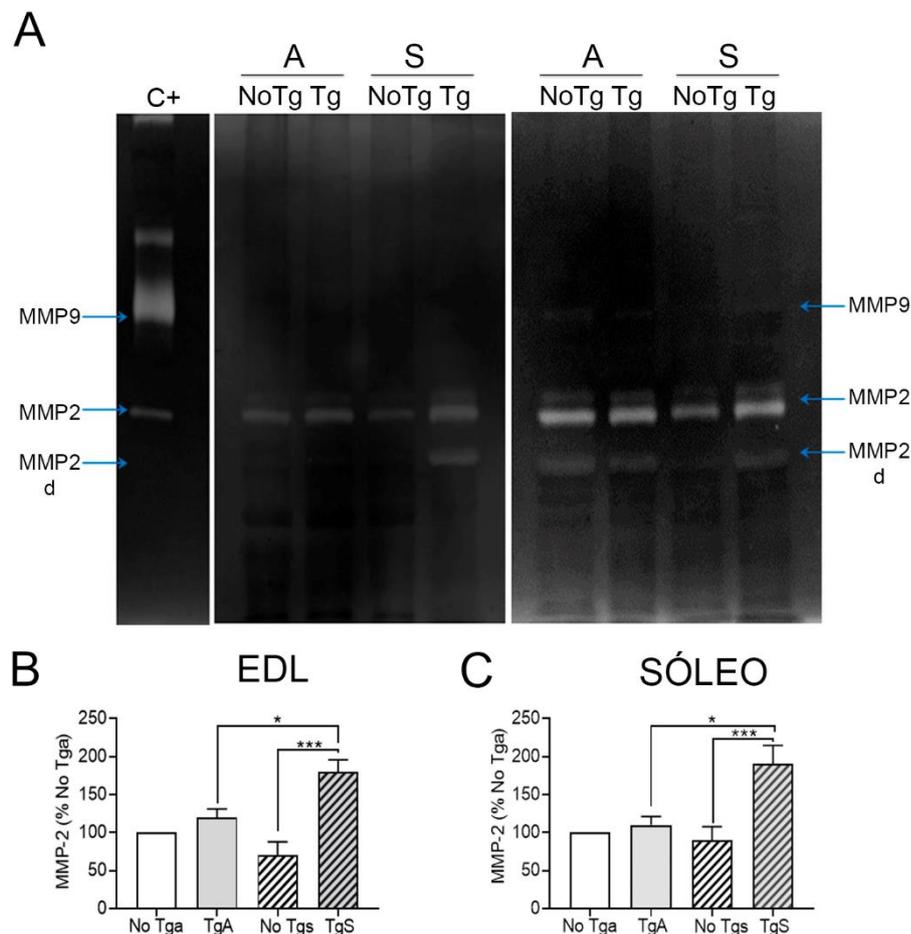
del ~50% (Figura 12F). Dado que al comparar EDL y sóleo, los valores mayores de áreas parametrizados por el diámetro de los componentes pre- y post-sinápticos se dieron en sóleo y los descensos fueron a valores absolutos similares, al comparar Tg con NoTg, las pérdidas más significativas en los componentes pre- y postsinápticos se encontraron en el sóleo respecto del EDL.

Como se dijo anteriormente, las diferencias morfológicas y morfométricas entre las UNM de músculos de roedores diferentes se conocen y se han evaluado desde mucho tiempo [Prakash 1996]. Los resultados previos de los análisis morfométricos realizados en sóleo y EDL de ratas revelaron una correlación positiva entre el área sináptica y el diámetro de la fibra. Es decir, el área sináptica en las fibras del sóleo que son lentas es mayor que las fibras rápidas del EDL, pero la relación entre el área de la UNM y el tamaño de la fibra fue similar en ambos músculos [Waerhaug y Lomo 1994; Woods y Slater 1997]. Nuestros datos no están de acuerdo con estos reportes y mostraron que en animales NoTg las relaciones de áreas presinápticas y postsinápticas y la cobertura, todas parametrizadas al diámetro de fibra aislada, fueron mayores en sóleo que en EDL (Figura 10 B-D, F), mientras que la densidad postsináptica no cambió. Debemos destacar que muchas de los datos reportados previamente surgieron de análisis precisos de microscopía electrónica de transmisión, mientras que los que hemos determinado en este trabajo surgen de imágenes 3D obtenidas por microscopía confocal. Además, los resultados de otros autores generalmente proporcionan datos de áreas totales sin tomar en cuenta el diámetro de la fibra [Jones y cols. 2016; Mejia Maza y cols. 2021].

Hay escasos estudios que comparan el músculo EDL y el sóleo en modelos experimentales de ELA, de hecho el único que realiza esta comparación en ratón SOD1G93A es el de Kalmar y cols. [2012]. Sin embargo, más allá de que estos resultados no son directamente comparables a los que se obtienen con ratas SOD1G93A debido a que además de ser especies distintas, el curso temporal de la enfermedad es diferente y la expresión de la misma en ratones es solo a nivel de tracto inferior [Izrael y cols. 2018], Kalmar y cols. [2012] reportaron que la denervación es la alteración significativa más temprana, comienza en etapas asintomáticas y en EDL es mucho mayor que en sóleo. Lamentablemente no podemos afirmar nada en etapas asintomáticas ya que no analizamos sóleo. Sin embargo, durante el estadio sintomático los datos de degeneración de la UNM que obtuvimos fueron similares en EDL y sóleo, tendiendo a ser de mayor grado en sóleo. En lo referente a la postsinapsis, estos autores reportaron una disminución significativa en el tamaño de placas terminales en los músculos de las extremidades posteriores de ratones SOD1G93A, reducción que atribuyen a la disminución de la actividad sináptica en la UNM. Otros estudios realizados en ratas macho Fisher adultos que recibieron corticosterona desde los 3 hasta los 5 meses, mostraron que hubo cambios degenerativos en la UNM que fueron más pronunciados en los músculos EDL de contracción rápida que en el sóleo de contracción lenta, lo que sugiere que el patrón o la cantidad de actividad afectan el resultado del tratamiento con corticosterona [Fahim 1995]. El autor mostró que el tratamiento crónico con corticosterona disminuyó el diámetro del sóleo en un 20% y del EDL en un 34%. El mismo autor determinó que en las UNMs de los músculos sóleos expuestos a corticosterona se determinó una significativa disminución (20%) del área nerviosa terminal, de la densidad de las vesículas sinápticas (57%) junto a un aumento del 30% en la hendidura sináptica (30%). En lo referente al EDL se observó una disminución del 50% en las terminales nerviosas, disminución del 25% en la densidad de vesículas sinápticas y un aumento de la hendidura sináptica del 10%. Llamativamente, en este modelo de ELA, la disminución del área presináptica en el músculo EDL de animales Tg fue de ~50% siendo muy similar a lo reportado for Fahim [1995]. Dicha similitud no se observó para el mismo parámetro en el sóleo de ratas Tg, ya que fue de ~40% (Figura 12B), siendo el doble de lo

obtenido por Fahim [1995].

Actividad gelatinasa en músculos de animales NoTg y Tg



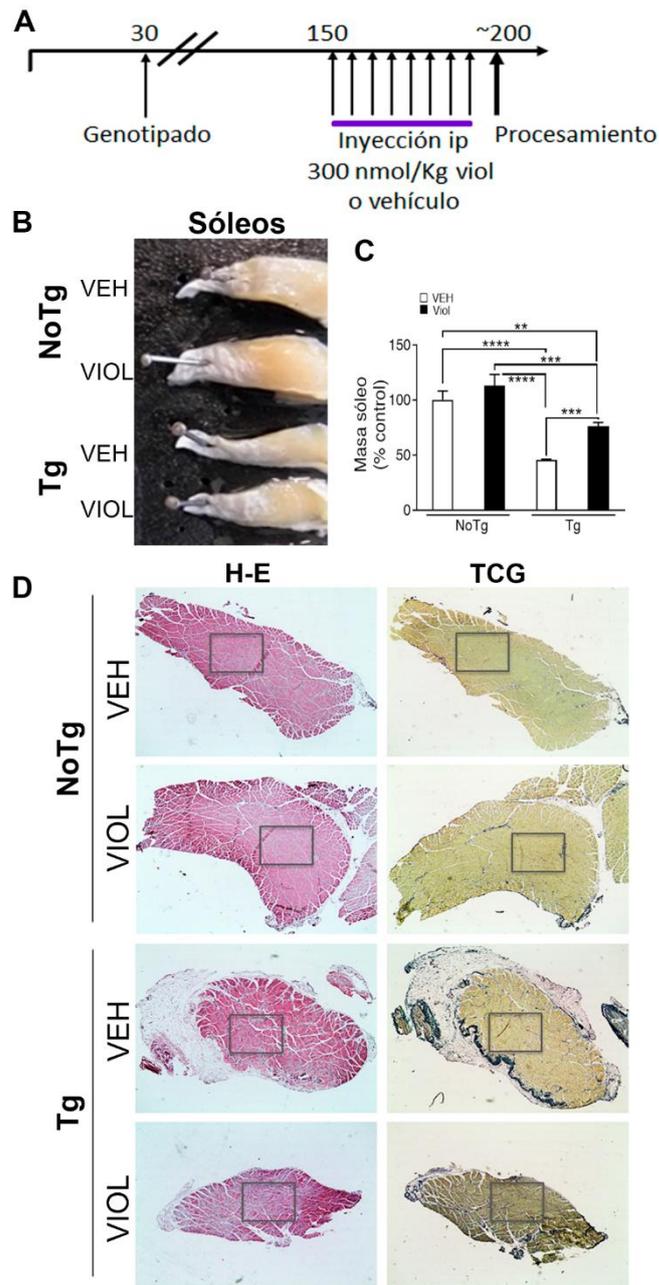
**Figura 13. Zimogramas de homogenatos de EDL y sóleo de ratas Tg y NoTg. A:** Zimogramas en gel mostrando las actividades gelatinolíticas de MMP-2 y MMP-9 en homogenatos de EDL (izquierda) y de sóleo (derecha) de animales NoTg y Tg en estadios asintomáticos (A) y sintomáticos (S). Nótese la menor actividad de ambas gelatinasas en EDL comparado con sóleo incluyendo la ausencia de MMP-9 en EDL y de cantidades apenas detectables en algunas condiciones en el sóleo y el aumento de MMP-2 y MMP-2 desnaturalizada (d) en sóleo. El carril aislado de la izquierda (C+) muestra los controles positivos que se corrieron en cada gel. En todas las condiciones se sembró la misma cantidad de proteína. **B, C:** Actividad de MMP-2 expresada como porcentaje de la actividad mostrada en los animales NoTga (de la misma edad que los TgA) en EDL (**B**) y en sóleo (**C**), indicando ausencia de cambios en los NoTg y aumento en los TgS vs TgA y también en TgS respecto de los animales NoTg de su misma edad. La gráfica muestra la media±SEM de tres experimentos diferentes.

Consecuente con los indicios de un mayor proceso degenerativo en sóleo que en EDL que se refleja a nivel de la UNM de las ratas de nuestra colonia, la zimografía en gel de los homogenatos de los músculos EDL y sóleo en estadios sintomáticos y asintomáticos mostró señal más intensa en la MMP-2 en ambos músculos en ratas Tg (Figura 13). Los aumentos fueron significativos

respecto a los TgA ( $p < 0.05$ ) y de los NoTg de 200 días ( $p < 0.001$ ) tanto para EDL (Figura 13B) como para sóleo (Figura 13C). Aunque el porcentaje de aumento fue similar para ambos tipos de músculos, pero los sóleos parecen tener mayor actividad basal, a juzgar por los zimogramas y su cuantificación. En cambio, la actividad en EDL y sóleo de animales NoTg de 120 y 200 días no mostró cambios significativos. Hay diversos trabajos publicados que muestran aumentos de la actividad de MMP-2 y MMP-9 en suero, en líquido cefalorraquídeo, en corteza y en médula espinal de modelos experimentales de ELA y de pacientes de la enfermedad [Beuche y cols. 2000; Renaud y Leppert 2007; Fang y cols. 2010; Niebroj-Dobosz y cols. 2010; Kaplan y cols. 2014; Łukaszewicz-Zajac y cols. 2014], pero no se encontraron datos específicos para estas gelatinasas en músculo. Por lo tanto, aunque no se puedan comparar los resultados obtenidos con reportes previos, los mismos indican que respecto de los NoTg, los animales Tg sintomáticos tienen niveles de actividad enzimática aumentada (Figura 13), lo que es consistente con un proceso neuroinflamatorio/neurodegenerativo progresivo tal como ha sido descrito desde el inicio en este modelo de ELA [Howland y cols. 2002].

## RESPUESTAS DEL MÚSCULO SÓLEO AL TRATAMIENTO CON VIOLACEÍNA

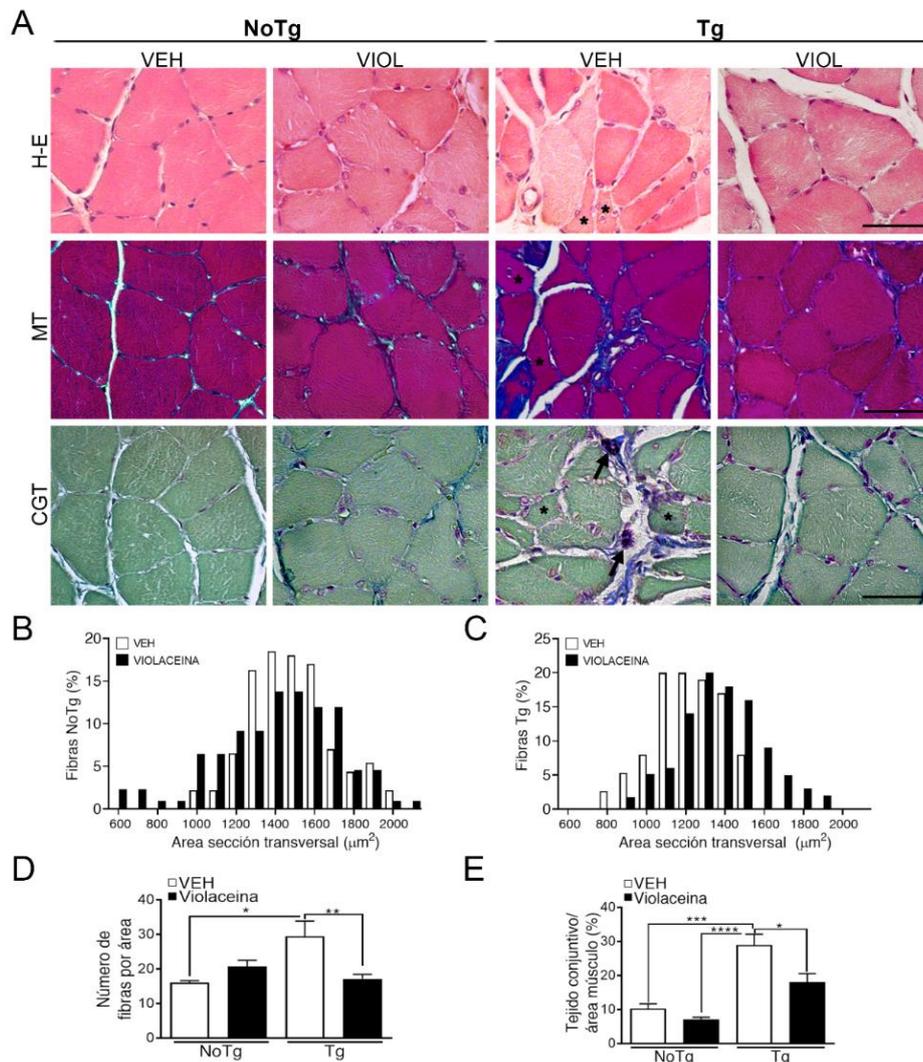
Finalmente, para evaluar la capacidad de preservación de la UNM en animales tratados con el compuesto protector violaceína partiendo de un estadio asintomático tardío hasta la fase terminal de la enfermedad, tratamos animales NoTg y Tg asintomáticos confirmados desde los 150 días de vida hasta los 200 días con vehículo o con violaceína de acuerdo al protocolo mostrado en la Figura 14A. Como se muestra en las imágenes de la Figura 14B y en las masas de los sóleos determinadas en animales de todas las condiciones (Figura 14C), el tratamiento con violaceína permitió preservar una parte significativa de la masa del sóleo en animales Tg que fueron tratados con violaceína de acuerdo al protocolo antes mencionado. Además el análisis histológico de los músculos sóleos de ratas NoTg y Tg tratadas con vehículo (DMSO 0.5%) o con violaceína permitió observar panorámicamente masas musculares más homogéneas en los músculos Tg de animales que fueron tratados con violaceína (Figura 14D). Cuando esas sesiones de músculos fueron observadas al microscopio (Figura 15) se pudo determinar que la violaceína ayudó a prevenir las características musculares anormales de la ELA que se recapitulan en los modelos SOD1G93A en rata [Howland y cols. 2002; Trías y cols. 2017; Bolatto, Olivera-Bravo y Cerri 2021].



**Figura 14: Esquema de tratamiento y efectos de violaceína sobre músculo sóleo.** **A:** Tratamiento desde el día 150 hasta el 200 de ratas NoTg y Tg de la misma edad, inyectando violaceína (300 nmol/semana) o vehículo (igual volumen de 0.5% DMSO). **B, C:** Preservación del tamaño del sóleo en animales Tg tratados y cuantificación de dichos efectos. La violaceína preservó parte de la masa muscular en Tg pero no afectó a los NoTg. **D:** Vista topográfica de sesiones de sóleo de las distintas condiciones experimentales evidenciando las alteraciones histológicas en Tg sin tratar mientras que el Tg tratado muestra mayor homogeneidad en las fibras musculares. Aumentos: 2x

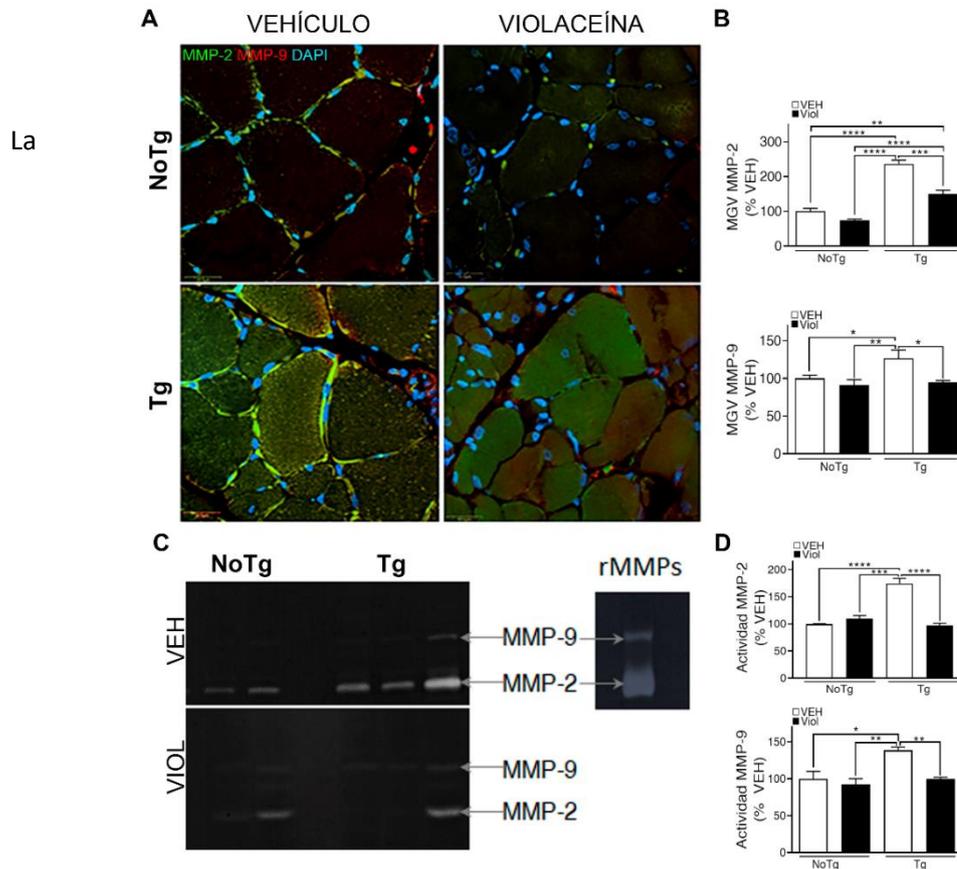
Las tinciones con H-E y tricrómico de Masson y de Cajal Gallego en los músculos sóleo de cada condición experimental mostraron que en comparación con los NoTg, los músculos de ratas Tg que no fueron tratados evidenciaron signos patológicos claros que incluyeron la presencia de fibras atroficas y mastocitos desgranulados (flecha), un área muscular reducida y aumento significativo en la deposición de colágeno (azul en las imágenes media e inferior). En cambio, la sección de músculo sóleo de animales Tg tratados con violaceína exhibió una mejor uniformidad en el diámetro de las fibras, menos tejido conectivo y una apariencia general más cercana a la de los animales NoTg (Figura 15A). El análisis de los diámetros de las fibras mostró una distribución similar de áreas de sección transversal en ratas NoTg, independientemente del tratamiento con violaceína (Figura 15B). Sin embargo, en ratas Tg, hubo un cambio en la frecuencia hacia secciones transversales más grandes al comparar los animales que recibieron violaceína con los animales no tratados que recibieron vehículo (Figura 15C). La violaceína también previno el aumento del ~30 % en el número de fibras musculares por área en ratas Tg tratadas frente a las no tratadas ( $p < 0.01$ ) (Fig. 15D), mientras que no afectó los valores en los animales NoTg (Figura 15E). Con respecto al colágeno, las ratas Tg no tratadas o tratadas con violaceína mostraron

aumentos del  $\sim 190\%$  ( $p < 0.001$ ) y del  $\sim 100\%$  ( $p < 0.01$ ) respectivamente en la deposición de colágeno respecto de las ratas NoTg (Fig. 15E).



**Figura 15: Análisis histológico del músculo sóleo luego del tratamiento con violaceína. A:** Imágenes representativas de cortes transversales de fibras musculares teñidas con H-E y con tricrómicos de Masson (MT) y de Cajal-Gallego (CGT). Los animales NoTg mostraron fibras musculares de tamaño y morfología similar y colágeno ordenado (azul en MT o CGT). En cambio, los Tg no tratados presentaron fibras musculares atróficas (asteriscos), fibrosis evidenciada por abundantes fibras de colágeno que aparecen desordenadas y mastocitos (flechas en la tinción CGT) cerca de las fibras atróficas. Los Tg tratados con violaceína mostraron menores signos patológicos: menos fibras atróficas, menores áreas de colágeno y apariencia general más cercana a los NoTg. Calibración:  $50\ \mu\text{m}$ . **B, C:** Distribución del área de la sección transversal del sóleo en ratas NoTg y Tg tratadas con vehículo (columnas blancas) o con violaceína (columnas negras). Los Tg tratados mostraron un desplazamiento del pico de frecuencia de tamaños hacia los valores más grandes. **D:** Número de fibras musculares por área en cada condición, mostrando aumento en Tg no tratados y valores similares en Tg tratados con violaceína y NoTg. **E:** Cuantificación de las áreas de colágeno en MT evidenciando aumento en las ratas Tg no tratadas en comparación con las NoTg o con las Tg tratadas.

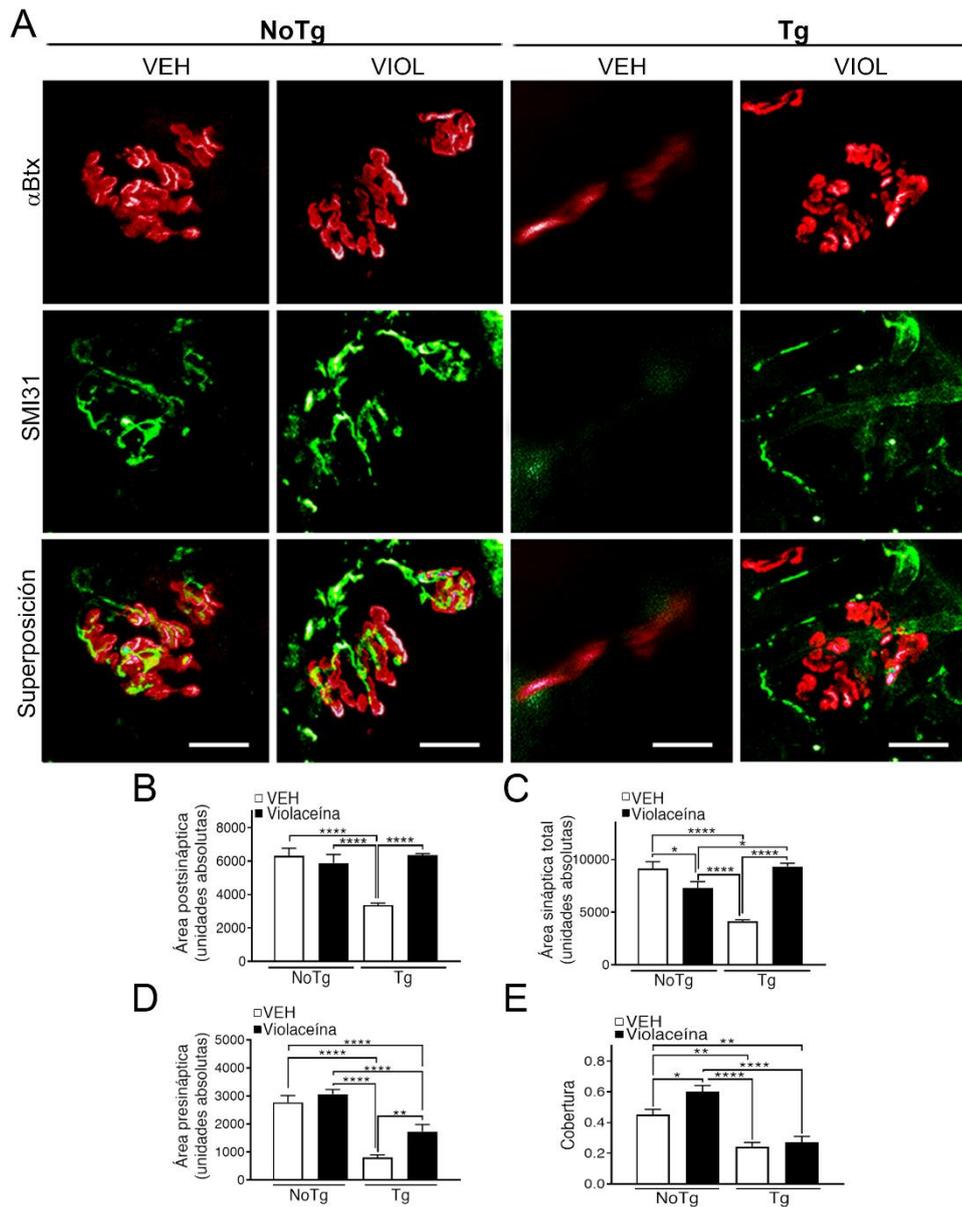
Como MMP-2 y -9 juegan un papel importante en la neuroinflamación y aumentan en la ELA [Beuche y cols. 2000; Renaud y Leppert 2007; Fang y cols. 2010; Niebroj-Dobosz y cols. 2010; Kaplan y cols. 2014; Łukaszewicz-Zajac y cols. 2014] lo que podría estar en estrecha relación con la atrofia muscular progresiva y habíamos observado aumento de MMP-2 en animales TgS (Figura 13), hemos analizado los efectos de la violaceína en la inmunorreactividad y las actividades de MMP-2 y -9 en muestras de sóleo (Fig. 16).



**Figura 16: MMP-2 y MMP-9 en sóleos de animales Tg y NoTg que recibieron vehículo o violaceína.** **A:** Inmunofluorescencias de sesiones transversas del músculo sóleo incubadas con anticuerpos anti-MMP-2 (verde) y anti-MMP-9 (rojo). Los músculos NoTg mostraron señales positivas asociadas al sarcolema y los Tg tuvieron la misma señal aumentada y expresión en el sarcoplasma. Las secciones de Tg tratadas con violaceína mostraron señales bajas asociadas al sarcolema y una tinción heterogénea en el sarcoplasma con fibras atroficas enriquecidas en MMP-9 (rojo). Los núcleos se marcaron con DAPI. Calibración: 20 μm. **B:** Cuantificación de los efectos de la violaceína sobre la inmunorreactividad de MMP-2 y -9 evaluada por MGV. Los aumentos de MMP-2 y -9 en muestras Tg no tratadas y tratadas frente a muestras NoTg fueron parcialmente prevenidos por la violaceína. **C:** Zimogramas en gel mostrando las actividades gelatinolíticas de MMP-2 y MMP-9 en homogenatos de sóleo de animales NoTg y Tg que recibieron vehículo (arriba) o violaceína (abajo). Nótese que la violaceína disminuyó las actividades de ambas gelatinasas. El carril aislado de la derecha muestra los controles (MMP-2 y -9 recombinantes) que se corrieron en cada gel. **D:** Cuantificación de los efectos de la violaceína sobre las actividades de MMP-2 y -9 indicando que inhibió parcialmente los aumentos observados en ratas Tg no tratadas.

La inmunofluorescencia realizada con anticuerpos específicos para cada gelatinasa (Fig.16A) mostró señales positivas asociadas con el sarcolema en secciones de músculo NoTg, pero las ratas Tg mostraron además una inmunorreactividad punteada dentro de las fibras musculares. La violaceína provocó una disminución general de la inmunorreactividad intracelular de MMP-2 en los animales Tg tratados frente a los no tratados ( $p < 0,01$ ) (Fig. 16B). Se observaron hallazgos similares con las señales de MMP-9, con la violaceína anulando el aumento observado en las muestras de Tg y acercando sus valores a los de los animales NoTg ( $p < 0,05$ ) (Fig. 16B). Los ensayos de zimografía en gel (Figura 16C) mostraron una mayor actividad de MMP-2 en homogeneizados musculares de muestras de Tg no tratadas (zimograma superior) frente a las tratadas con violaceína (zimograma inferior) o frente a las muestras de sóleo de ratas NoTgs. La violaceína también inhibió la escasa actividad de MMP-9 observada en animales Tg. A su vez, la cuantificación de cada señal mediante la herramienta de análisis de gel de ImageJ indicó que la violaceína disminuyó la actividad de los Tg tratados frente a los no tratados (~50 %,  $p < 0,0001$ ) llevando a valores similares que los NoTg (Figura 16D). En cuanto a la actividad de MMP-9, aunque fue mucho menor que la de MMP-2, la violaceína la disminuyó como se observa al comparar muestras de ratas Tg tratadas con Tg no tratadas ( $p < 0,01$ ).

Finalmente, al analizar las acciones de la violaceína en la arquitectura y los componentes de UNM (Figura 17), no se observaron efectos significativos en los animales NoTg. Al comparar las condiciones de ratas Tg tratadas con violaceína, frente a las no tratadas, la violaceína mejoró parcialmente los componente post- y presináptico, como lo indican las señales de  $\alpha$ -Btx y SM31 más altas (Figura 17A). La cuantificación de las áreas positivas a  $\alpha$ -Btx ( $p < 0,0001$ ) y a las áreas sinápticas totales ( $p < 0,0001$ ) (Figuras 17B, C), así como áreas mayores positivas a SM31 ( $p < 0,01$ ; Figura 17D). Sin embargo, la relación de cobertura no se modificó en las ratas Tg tratadas con violaceína frente a las no tratadas y se mantuvo en ~ 50 % de la cobertura mostrada en las ratas NoTg (Figura 17E), indicando que más allá de los efectos protectores de la violaceína, la funcionalidad de la UNM no pudo ser preservada.



**Figura 17: Efectos de la violaceína en las UNM de músculo sóleo. A:** Z-stack de la UNM de cada condición experimental mostrando la alineación entre la marca de SMI31 (verde) y de  $\alpha$ -Btx (rojo) en ratas NoTg, la desaparición casi completa de ambos componentes en UNM de ratas Tg no tratadas y la notable preservación del elemento postsináptico junto con una señal mejorada del componente presináptico en las UNM de ratas Tg tratadas con violaceína. Calibración: 20  $\mu$ m. **B, C:** Cuantificación del área sináptica total y del área postsináptica mostrando disminuciones en ratas Tg no tratadas versus Tg tratadas o NoTg. **D:** Evaluación del componente presináptico fosforilado con valores reducidos en Tg no tratada y tratadas respecto de NoTg. Sin embargo, los Tg tratados mostraron la mitad de la pérdida observada en los Tg no tratados. **E:** Análisis cuantitativo de la relación de cobertura indicando que la violaceína no influyó en este parámetro en las ratas Tg tratadas versus las no tratadas.

Por lo tanto, las administraciones semanales de 300 nmol/kg de violaceína a animales Tg provocaron músculos y UNM mejor conservados, lo que sugiere que la violaceína tiene una capacidad potencial para retrasar la progresión de la enfermedad. Las ratas Tg tratadas mostraron una pérdida menor de masa muscular y áreas de colágeno disminuidas, así como una preservación significativa de los componentes postsinápticos de la UNM en comparación con los

animales Tg no tratados. El control del aumento de colágeno, que se ha descrito como participante en la producción aumentada de componentes de la matriz extracelular que conducen a la fibrosis, que muy recientemente se ha sugerido como un rasgo común que se correlaciona con la progresión de la ELA [González y cols. 2017; Apolloni y D'Ambrosi 2022] también son señales protectoras significativas dado que recientemente se ha informado que la fibrosis en los músculos esqueléticos afecta la función y la regeneración, siendo una de las principales causas de debilidad muscular [Mahdy 2019]. Sin embargo, la falta de mejora en la cobertura de la UNM indica que más allá de la preservación de cada componente principal de la UNM por separado, la funcionalidad de esta sinapsis no pudo ser mantenida por el tratamiento con violaceína. De todos modos, los efectos que la violaceína ha producido a nivel muscular son promisorios y abren la ventana a nuevos diseños experimentales por una parte, y aporta evidencia sobre las propiedades protectoras de este compuesto [Konzen y cols. 2006; Verinaud y cols. 2015; Platt y cols. 2014; Alem y cols. 2020; Olivera-Bravo y cols. 2022].

# CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

## CONCLUSIONES

El estudio de componentes muy importantes de la UNM en ratas macho SOD1G93A Tg y NoTg de la misma edad permitió conocer:

- que el aumento de la edad modifica el diámetro de las fibras musculares en forma significativa.

- que los componentes pre y post-sinápticos de la UNM fueron afectados en las ratas Tg (parametrizados por el diámetro) comparados con ratas NoTg de la misma edad y del mismo sexo.

- que los efectos del daño sobre la UNM fueron más acentuados en soleo que en EDL cuando se compararon animales Tg sintomáticos.

- que los resultados preliminares observados en MMP2 y MMP9 no son de la magnitud reportada en la literatura y que no parecen explicar en gran medida la atrofia sistémica observada en el modelo.

- que la violaceína fue capaz de preservar fundamentalmente el componente postsináptico de la UNM en músculo sóleo de animales Tg sintomáticos, sin embargo no pudo preservar el porcentaje de cobertura indicando que aunque preservó lo morfológico no pudo preservar lo funcional.

## PERSPECTIVAS

- Profundizar en el estudio de los efectos de la edad y de la mutación SOD1G93A en la UNM y en las fibras de músculos EDL y soleo en animales Tg y NoTg (por ejemplo 120, 150, 180, 210 días).

- Analizar otros componentes de la UNM, en particular las células gliales y las células satélites, dado que podrían ser posibles blancos de la acción de la violaceína (Olivera-Bravo y cols. 2022).

- Profundizar en el estudio de los efectos de la violaceína sobre el músculo en particular en la preservación de las fibras y de los parámetros que son más afectados en los animales Tg.

- Comenzar a estudiar los mecanismos subyacentes a la protección ejercida por la violaceína.

- Correlacionar los cambios en la UNM con los cambios a nivel del músculo y de la médula espinal para conocer los cambios que sufren estas unidades funcionales a lo largo de la progresión de la enfermedad.

## REFERENCIAS

Adachi, H., Waza, M., Tokui, K., Katsuno, M., Minamiyama, M., Tanaka, F., y cols.. (2007). CHIP overexpression reduces mutant androgen receptor protein and ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model. *J Neurosci* 27, 5115–5126.

Alberti S, Esser C, Höhfeld J. BAG-1--a nucleotide exchange factor of Hsc70 with multiple cellular functions. *Cell Stress Chaperones*. 2003 Fall;8(3):225-31. doi: 10.1379/1466-1268(2003)008<0225:bnfoh>2.0.co;2. PMID: 14984055; PMCID: PMC514875.

Albuquerque EX, Barnard EA, Porter CW, Warnick JE. The density of acetylcholine receptors and their sensitivity in the postsynaptic membrane of muscle endplates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974 Jul; 71(7):2818-22. doi: 10.1073/pnas.71.7.2818.

Al-Chalabi A, Hardiman O. The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol*. 2013 Nov;9(11):617-28. doi: 10.1038/nrneurol.2013.203.

Alem D, Marizcurrena JJ, Saravia V, Davyt D, Martinez-Lopez W, Castro-Sowinski S. Production and antiproliferative effect of violacein, a purple pigment produced by an Antarctic bacterial isolate. *World J Microbiol Biotechnol*. 2020 Jul 18;36(8):120. doi: 10.1007/s11274-020-02893-4.

Alshatwi AA, Subash-Babu P, Antonisamy P. Violacein induces apoptosis in human breast cancer cells through up regulation of BAX, p53 and down regulation of MDM2. *Exp Toxicol Pathol*. 2016 Jan;68(1):89-97. doi: 10.1016/j.etp.2015.10.002.

Andrus PK, Fleck TJ, Gurney ME, Hall ED. Protein oxidative damage in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*. 1998 Nov;71(5):2041-8. doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.71052041.x. PMID: 9798929.

Apolloni S, D'Ambrosi N. Fibrosis as a common trait in amyotrophic lateral sclerosis tissues. *Neural Regen Res*. 2022 Jan;17(1):97-98. doi: 10.4103/1673-5374.314302.

Apostolski S, Nikolić J, Bugarski-Prokopljević C, Miletić V, Pavlović S, Filipović S. Serum and CSF immunological findings in ALS. *Acta Neurol Scand*. 1991 Feb;83(2):96-8. doi: 10.1111/j.1600-0404.1991.tb04656.x.

Arends MJ, White ES, Whitelaw CB. Animal and cellular models of human disease. *The Journal of Pathology*. 2016. Jan;238(2):137-40. doi: 10.1002/path.4662.

Azeh I, Mäder M, Smirnov A, Beuche W, Nau R, Weber F. Experimental pneumococcal meningitis in rabbits: the increase of matrix metalloproteinase-9 in cerebrospinal fluid correlates with leucocyte invasion. *Neurosci Lett*. 1998 Nov 13;256(3):127-30. doi: 10.1016/s0304-3940(98)00776-9.

Balice-Gordon RJ, Lichtman JW. Long-term synapse loss induced by focal blockade of postsynaptic receptors. *Nature*. 1994 Dec 8;372(6506):519-24. doi: 10.1038/372519a0.

Ballinger CA, Connell P, Wu Y, Hu Z, Thompson LJ, Yin LY, Patterson C. Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol.* 1999 Jun;19(6):4535-45. doi: 10.1128/MCB.19.6.4535. PMID: 10330192; PMCID: PMC104411.

Bancroft, J. D. y Gamble, M. *Theory and Practice of Histological Techniques.* 5th edn. London, Churchill Livingstone, 1997.

Banker BQ, Kelly SS, Robbins N. Neuromuscular transmission and correlative morphology in young and old mice. *J Physiol.* 1983 Jun;339:355-77. doi: 10.1113/jphysiol.1983.sp014721.

Barber SC, Mead RJ, Shaw PJ. Oxidative stress in ALS: a mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Nov-Dec;1762(11-12):1051-67. doi: 10.1016/j.bbadis.2006.03.008. Epub 2006 Apr 4. PMID: 16713195.

Barrett EF, Barrett JN, David G. Mitochondria in motor nerve terminals: function in health and in mutant superoxide dismutase 1 mouse models of familial ALS. *J Bioenerg Biomembr.* 2011 Dec;43(6):581-6. doi: 10.1007/s10863-011-9392-1.

Beal MF, Ferrante RJ, Browne SE, Matthews RT, Kowall NW, Brown RH Jr. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1997 Oct;42(4):644-54. doi: 10.1002/ana.410420416. PMID: 9382477.

Benbrook DM, Long A. Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis. *Exp Oncol.* 2012 Oct;34(3):286-97. PMID: 23070014.

Berry JD, Paganoni S, Atassi N, Macklin EA, Goyal N, Rivner M, Simpson E, Appel S, Grasso DL, Mejia NI, Mateen F, Gill A, Vieira F, Tassinari V, Perrin S. Phase IIa trial of fingolimod for amyotrophic lateral sclerosis demonstrates acceptable acute safety and tolerability. *Muscle Nerve.* 2017 Dec;56(6):1077-1084. doi: 10.1002/mus.25733.

Bertolotti A, Lutz Y, Heard DJ, Chambon P, Tora L. hTAF(II)68, a novel RNA/ssDNA-binding protein with homology to the pro-oncoproteins TLS/FUS and EWS is associated with both TFIID and RNA polymerase II. *EMBO J.* 1996 Sep 16;15(18):5022-31. PMID: 8890175; PMCID: PMC452240.

Beuche W, Yushchenko M, Mäder M, Maliszewska M, Felgenhauer K, Weber F. Matrix metalloproteinase-9 is elevated in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport.* 2000 Nov 9;11(16):3419-22. doi: 10.1097/00001756-200011090-00003.

Billat, V. (2002). El músculo: transformación energética .En *Fisiología y metodología del entrenamiento* (Cap. 2). Barcelona, España. Paidotribo.

Blokhuis AM, Groen EJ, Koppers M, van den Berg LH, Pasterkamp RJ. Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica.* 2013. Jun;125(6):777-94. doi: 10.1007/s00401-013-1125-6.

Boehm I, Alhindi A, Leite AS, Logie C, Gibbs A, Murray O, Farrukh R, Pirie R, Proudfoot C, Clutton R, Wishart TM, Jones RA, Gillingwater TH. Comparative anatomy of the mammalian neuromuscular junction. *J Anat.* 2020 Nov;237(5):827-836. doi: 10.1111/joa.13260.

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 Jun 2;312(5778):1389-92. doi: 10.1126/science.1123511. PMID: 16741123.

Bolatto C, Olivera-Bravo S, Cerri S. Dissection of Single Skeletal Muscle Fibers for Immunofluorescent and Morphometric Analyses of Whole-Mount Neuromuscular Junctions. *J Vis Exp.* 2021 Aug 14;(174). doi: 10.3791/62620.

Bradley WG, Good P, Rasool CG, Adelman LS. Morphometric and biochemical studies of peripheral nerves in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1983 Sep;14(3):267-77. doi: 10.1002/ana.410140304.

Bromberg MB, Brownell AA, Forshew DA, Swenson M. A timeline for predicting durable medical equipment needs and interventions for amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph Lateral Scler.* 2010;11(1-2):110-5. doi: 10.3109/17482960902835970.

Buller AJ, Eccles JC, Eccles RM. Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses. *J Physiol.* 1960 Feb;150(2):417-39. doi: 10.1113/jphysiol.1960.sp006395.

Campanari ML, García-Ayllón MS, Ciura S, Sáez-Valero J, Kabashi E. Neuromuscular Junction Impairment in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Reassessing the Role of Acetylcholinesterase. *Front Mol Neurosci.* 2016 Dec 27;9:160. doi: 10.3389/fnmol.2016.00160.

Cantor S, Zhang W, Delestrée N, Remédio L, Mentis GZ, Burden SJ. Preserving neuromuscular synapses in ALS by stimulating MuSK with a therapeutic agonist antibody. *Elife.* 2018 Feb 20;7:e34375. doi: 10.7554/eLife.34375.

Carri MT, Cozzolino M. SOD1 and mitochondria in ALS: a dangerous liaison. *J Bioenerg Biomembr.* 2011 Dec;43(6):593-9. doi: 10.1007/s10863-011-9394-z.

Cascales M, Álvarez-Gómez JA. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *An R Acad Nac Farm,* 2010, 76 (1): 59-84.

Chambaut-Guérin AM, Hérigault S, Rouet-Benzineb P, Rouher C, Lafuma C. Induction of matrix metalloproteinase MMP-9 (92-kDa gelatinase) by retinoic acid in human neuroblastoma SKNBE cells: relevance to neuronal differentiation. *J Neurochem.* 2000 Feb;74(2):508-17. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.740508.x.

Chang CC. Looking back on the discovery of alpha-bungarotoxin. *J Biomed Sci.* 1999 Nov-Dec;6(6):368-75. doi: 10.1007/BF02253668. PMID: 10545772.

Chaudhuri KR, Crump S, al-Sarraj S, Anderson V, Cavanagh J, Leigh PN. The validation of El Escorial criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: a clinicopathological study. *J Neurol Sci.* 1995 May;129 Suppl:11-2. doi: 10.1016/0022-510x(95)00050-c. PMID: 7595600.

Cheroni C, Marino M, Tortarolo M, Veglianesi P, De Biasi S, Fontana E, Zuccarello LV, Maynard CJ, Dantuma NP, Bendotti C. Functional alterations of the ubiquitin-proteasome system in motor neurons of a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2009 Jan 1;18(1):82-96. doi: 10.1093/hmg/ddn319. Epub 2008 Sep 29. PMID: 18826962; PMCID: PMC3298865.

Choi J-S, Cho S, Park SG, Park BC and Lee DH (2004) Co-chaperone CHIP associates with mutant Cu/Zn-superoxide dismutase proteins linked to familial amyotrophic lateral sclerosis and promotes their degradation by proteasomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 321, 574–583

Choi SY, Kim S, Lyuck S y cols. (2015a) High-level production of violacein by the newly isolated *Duganella violaceinigra* str. NI28 and its impact on *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep* 5:1–12. <https://doi.org/10.1038/srep15598>.

Choi SY, Yoon K, Il Lee J, Mitchell RJ (2015b) Violacein: properties and production of a versatile bacterial pigment. *Biomed Res Int* 2015:1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/465056>

Choi SY, Yoon KH, Lee JI, Mitchell RJ. Violacein: Properties and Production of a Versatile Bacterial Pigment. *Biomed Res Int.* 2015;2015:465056. doi: 10.1155/2015/465056. Epub 2015 Aug 3.

Cohen MW, Godfrey EW. Early appearance of and neuronal contribution to agrin-like molecules at embryonic frog nerve-muscle synapses formed in culture. *J Neurosci.* 1992 Aug;12(8):2982-92. doi: 10.1523/JNEUROSCI.12-08-02982.1992. PMID: 1322981; PMCID: PMC6575655.

Connell P, Ballinger CA, Jiang J, Wu Y, Thompson LJ, Höhfeld J, Patterson C. The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol.* 2001 Jan;3(1):93-6. doi: 10.1038/35050618. PMID: 11146632.

Corbier C, Sellier C. C9ORF72 is a GDP/GTP exchange factor for Rab8 and Rab39 and regulates autophagy. *Small GTPases.* 2017 Jul 3;8(3):181-186. doi: 10.1080/21541248.2016.1212688. Epub 2016 Aug 5. PMID: 27494456; PMCID: PMC5584738.

Coronato S, Laguens G. Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *Med (Buenos Aires).* 2012; 72: 495- 502.67.

Crow JP, Calingasan NY, Chen J, Hill JL, Beal MF. Manganese porphyrin given at symptom onset markedly extends survival of ALS mice. *Ann Neurol.* 2005 Aug;58(2):258-65. doi: 10.1002/ana.20552. PMID: 16049935.

de Carvalho DD, Costa FT, Duran N, Haun M. Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells. *Toxicol In Vitro*. 2006 Dec;20(8):1514-21. doi: 10.1016/j.tiv.2006.06.007. Epub 2006 Jul 1. PMID: 16889929.

De Winter F, Vo T, Stam FJ, Wisman LA, Bär PR, Niclou SP, van Muiswinkel FL, Verhaagen J. The expression of the chemorepellent Semaphorin 3A is selectively induced in terminal Schwann cells of a subset of neuromuscular synapses that display limited anatomical plasticity and enhanced vulnerability in motor neuron disease. *Mol Cell Neurosci*. 2006 May-Jun;32(1-2):102-17. doi: 10.1016/j.mcn.2006.03.002.

Demestre M, Parkin-Smith G, Petzold A, Pullen AH. The pro and the active form of matrix metalloproteinase-9 is increased in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2005 Feb;159(1-2):146-54. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.09.015.

Díaz-Amarilla P, Olivera-Bravo S, Trias E, Cragolini A, Martínez-Palma L, Cassina P, Beckman J, Barbeito L. Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Nov 1;108(44):18126-31. doi: 10.1073/pnas.1110689108.

Dikshit P, Jana NR. The co-chaperone CHIP is induced in various stresses and confers protection to cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Jun 8;357(3):761-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.04.018. Epub 2007 Apr 11. PMID: 17442270.

Dobrowolny G, Lepore E, Martini M, Barberi L, Nunn A, Scicchitano BM, Musarò A. Metabolic Changes Associated With Muscle Expression of SOD1<sup>G93A</sup>. *Front Physiol*. 2018 Jul 10;9:831. doi: 10.3389/fphys.2018.00831.

Dupuis L, di Scala F, Rene F, de Tapia M, Oudart H, Pradat PF, Meininger V, Loeffler JP. Up-regulation of mitochondrial uncoupling protein 3 reveals an early muscular metabolic defect in amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J*. 2003 Nov;17(14):2091-3. doi: 10.1096/fj.02-1182fje. Epub 2003 Sep 18. PMID: 14500553.

Dupuis L, Gonzalez de Aguilar JL, Echaniz-Laguna A, Eschbach J, Rene F, Oudart H, Halter B, Huze C, Schaeffer L, Bouillaud F, Loeffler JP. Muscle mitochondrial uncoupling dismantles neuromuscular junction and triggers distal degeneration of motor neurons. *PLoS One*. 2009;4(4):e5390. doi: 10.1371/journal.pone.0005390.

Dupuis L, Gonzalez de Aguilar JL, Oudart H, de Tapia M, Barbeito L, Loeffler JP. Mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis: a trigger and a target. *Neurodegener Dis*. 2004;1(6):245-54. doi: 10.1159/000085063. PMID: 16908975.

Duran M, Ponezi AN, Faljoni-Alario A, Teixeira MFS, Justo GZ, Duran N. Potential applications of violacein: A microbial pigment. *Med Chem Res*. 2012; 21:1524–1532. doi:10.1007/s00044-011-9654-9.

Durán N, Fávoro WJ, Brocchi M, Justo GZ, Castro GR, Durán M, Nakazato G. Patents on Violacein: A Compound with Great Diversity of Biological Activities and Industrial Potential. *Recent Pat Biotechnol*. 2021 Oct 4;15(2):102-111. doi: 10.2174/2213476X07666201221111655.

Eisen A, Pant B, Stewart H. Cortical excitability in amyotrophic lateral sclerosis: a clue to pathogenesis. *Can J Neurol Sci.* 1993 Feb;20(1):11-6. doi: 10.1017/s031716710004734x.

Engel AG, Shen XM, Selcen D, Sine SM. Congenital myasthenic syndromes: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Lancet Neurol.* 2015 Apr;14(4):420-34. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70201-7. Erratum in: *Lancet Neurol.* 2015 May;14(5):461.

Fahim MA. Chronic corticosterone treatment-induced ultrastructural changes at rat neuromuscular junction. *Anat Rec.* 1995 Jul;242(3):424-431.

Fang L, Teuchert M, Huber-Abel F, Schattauer D, Hendrich C, Dorst J, et al. MMP-2 and MMP-9 are elevated in spinal cord and skin in a mouse model of ALS. *J Neurol Sci.* 2010;294:51-56. doi: 10.1016/j.jns.2010.04.005.

Favero M, Busetto G, Cangiano A. Spike timing plays a key role in synapse elimination at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jun 19;109(25):E1667-75. doi: 10.1073/pnas.1201147109.

Feng X, Zhang T, Ralston E, Ludlow CL. Differences in neuromuscular junctions of laryngeal and limb muscles in rats. *Laryngoscope.* 2012 May;122(5):1093-8. doi: 10.1002/lary.23218.

Feng Z, Ko CP. The role of glial cells in the formation and maintenance of the neuromuscular junction. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1132:19-28. doi: 10.1196/annals.1405.016.

Ferraiuolo L, Kirby J, Grierson AJ, Sendtner M, Shaw PJ. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2011 Nov;7(11):616-30. doi: 10.1038/nrneurol.2011.152.

Ferrante RJ, Shinobu LA, Schulz JB, Matthews RT, Thomas CE, Kowall NW, Gurney ME, Beal MF. Increased 3-nitrotyrosine and oxidative damage in mice with a human copper/zinc superoxide dismutase mutation. *Ann Neurol.* 1997 Sep;42(3):326-34. doi: 10.1002/ana.410420309. PMID: 9307254.

Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA, Glass JD. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol.* 2004 Feb;185(2):232-40. doi: 10.1016/j.expneurol.2003.10.004.

Fitzmaurice PS, Shaw IC, Kleiner HE, Miller RT, Monks TJ, Lau SS, Mitchell JD, Lynch PG. Evidence for DNA damage in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 1996 Jun;19(6):797-8. PMID: 8609941.

Forsyth PA, Wong H, Laing TD, Rewcastle NB, Morris DG, Muzik H, Leco KJ, Johnston RN, Brasher PM, Sutherland G, Edwards DR. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Br J Cancer.* 1999 Apr;79(11-12):1828-35. doi: 10.1038/sj.bjc.6690291.

Funalot B, Desport JC, Sturtz F, Camu W, Couratier P. High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*. 2009 Apr;10(2):113-7. doi: 10.1080/17482960802295192.

Gil JM, Rego AC. The R6 lines of transgenic mice: a model for screening new therapies for Huntington's disease. *Brain Res Rev*. 2009 Mar;59(2):410-31. doi: 10.1016/j.brainresrev.2008.12.001.

Gitler AD, Dhillon P, Shorter J. Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope. *Disease Models y Mechanisms*. 2017. May 1;10(5):499-502. doi: 10.1242/dmm.030205.

Gonzalez D, Contreras O, Rebolledo DL, Espinoza JP, van Zundert B, Brandan E. ALS skeletal muscle shows enhanced TGF- $\beta$  signaling, fibrosis and induction of fibro/adipogenic progenitor markers. *PLoS One*. 2017 May 16;12(5):e0177649. doi: 10.1371/journal.pone.0177649.

Gould TW, Buss RR, Vinsant S, Prevette D, Sun W, Knudson CM, Milligan CE, Oppenheim RW. Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *J Neurosci*. 2006 Aug 23;26(34):8774-86. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2315-06.2006.

Grady RM, Akaaboune M, Cohen AL, Maimone MM, Lichtman JW, Sanes JR. Tyrosine-phosphorylated and nonphosphorylated isoforms of alpha-dystrobrevin: roles in skeletal muscle and its neuromuscular and myotendinous junctions. *J Cell Biol*. 2003 Mar 3;160(5):741-52. doi: 10.1083/jcb.200209045.

Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, y cols.. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*. 1994 Jun 17;264(5166):1772-5. doi: 10.1126/science.8209258. Erratum in: *Science* 1995 Jul 14;269(5221):149. PMID: 8209258.

Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trümper L, Balkwill FR, Binder C. Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1543-9.

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 Oct 5;3:17071. doi: 10.1038/nrdp.2017.71. Erratum in: *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Oct 20;3:17085.

Harraz MM, Marden JJ, Zhou W, Zhang Y, Williams A, Sharov VS, Nelson K, Luo M, Paulson H, Schöneich C, Engelhardt JF. SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *J Clin Invest*. 2008 Feb;118(2):659-70. doi: 10.1172/JCI34060. PMID: 18219391; PMCID: PMC2213375.

Hegedus J, Putman CT, Tyreman N, Gordon T. Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol*. 2008 Jul 15;586(14):3337-51. doi: 10.1113/jphysiol.2007.149286.

Hoshino T. Violacein and related tryptophan metabolites produced by *Chromobacterium violaceum*: biosynthetic mechanism and pathway for construction of violacein core. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011 Sep;91(6):1463-75. doi: 10.1007/s00253-011-3468-z.

Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Feb 5;99(3):1604-9. doi: 10.1073/pnas.032539299.

Hughes SM. Muscle development: electrical control of gene expression. *Curr Biol*. 1998 Dec 3;8(24):R892-4. doi: 10.1016/s0960-9822(07)00554-4.

Huisman MH, Seelen M, van Doormaal PT, de Jong SW, de Vries JH, van der Kooij AJ, de Visser M, Schelhaas HJ, van den Berg LH, Veldink JH. Effect of Presymptomatic Body Mass Index and Consumption of Fat and Alcohol on Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol*. 2015 Oct;72(10):1155-62. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.1584.

Ilieva H, Maragakis NJ. Motoneuron Disease: Basic Science. In: Beart P, Robinson M, Rattray M, Maragakis NJ, editors. *Avances in Neurobiology 15: Neurodegenerative Diseases Pathology, Mechanisms, and Potential Therapeutic Targets*. Cham: Springer; 2017. P. 163-190. doi: 10.1007/978-3-319-57193-5.

Ince PG, Highley JR, Kirby J, Wharton SB, Takahashi H, Strong MJ, Shaw PJ. Molecular pathology and genetic advances in amyotrophic lateral sclerosis: an emerging molecular pathway and the significance of glial pathology. *Acta Neuropathol*. 2011 Dec;122(6):657-71. doi: 10.1007/s00401-011-0913-0. Epub 2011 Nov 22. PMID: 22105541.

Ishigaki S, Niwa J, Yamada S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Urano F, Sobue G. Dofin-CHIP chimeric proteins potently ubiquitylate and degrade familial ALS-related mutant SOD1 proteins and reduce their cellular toxicity. *Neurobiol Dis*. 2007 Feb;25(2):331-41.

Ito I, Fixman ED, Asai K, et al. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta modulate the expression of matrix metalloproteinases and migratory function of human airway smooth muscle cells. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 1370-80.

Iyer SR, Shah SB, Lovering RM. The Neuromuscular Junction: Roles in Aging and Neuromuscular Disease. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(15):8058.

Izrael M, Slutsky SG, Admoni T, Cohen L, Granit A, Hasson A, Itskovitz-Eldor J, Krush Paker L, Kuperstein G, Lavon N, Yehezkel Ionescu S, Solmesky LJ, Zaguri R, Zhuravlev A, Volman E, Chebath J, Revel M. Safety and efficacy of human embryonic stem cell-derived astrocytes following intrathecal transplantation in SOD1G93A and NSG animal models. *Stem Cell Res Ther*. 2018 Jun 6;9(1):152. doi: 10.1186/s13287-018-0890-5.

Jablecki CK, Berry C, Leach J. Survival prediction in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 1989 Oct;12(10):833-41. doi: 10.1002/mus.880121008.

Johns SLM, Ishaque A, Khan M, Yang YH, Wilman AH, Kalra S. Quantifying changes on susceptibility weighted images in amyotrophic lateral sclerosis using MRI texture analysis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2019 Aug;20(5-6):396-403. doi: 10.1080/21678421.2019.1599024.

Johnson JL, Jenkins NP, Huang WC, Di Gregoli K, Sala-Newby GB, Scholtes VP, Moll FL, Pasterkamp G, Newby AC. Relationship of MMP-14 and TIMP-3 expression with macrophage activation and human atherosclerotic plaque vulnerability. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:276457. doi: 10.1155/2014/276457. Epub 2014 Aug 24. PMID: 25301980; PMCID: PMC4163186.

Jones RA, Harrison C, Eaton SL, Llaverro Hurtado M, Graham LC, Alkhamash L, Oladiran OA, Gale A, Lamont DJ, Simpson H, Simmen MW, Soeller C, Wishart TM, Gillingwater TH. Cellular and Molecular Anatomy of the Human Neuromuscular Junction. *Cell Rep.* 2017 Nov 28;21(9):2348-2356. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.008.

Jones RA, Reich CD, Dissanayake KN, Kristmundsdottir F, Findlater GS, Ribchester RR, Simmen MW, Gillingwater TH. NMJ-morph reveals principal components of synaptic morphology influencing structure-function relationships at the neuromuscular junction. *Open Biol.* 2016 Dec;6(12):160240. doi: 10.1098/rsob.160240. Erratum in: *Open Biol.* 2017 Jan;7(1): PMID: 27927794; PMCID: PMC5204123.

Joyce PI, Fratta P, Fisher EM, Acevedo-Arozena A. SOD1 and TDP-43 animal models of amyotrophic lateral sclerosis: recent advances in understanding disease toward the development of clinical treatments. *Mammalian Genome.* 2011. Aug;22(7-8):420-48. doi: 10.1007/s00335-011-9339-1.

Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, Bouchard JP, Lacomblez L, Pochigaeva K, Salachas F, Pradat PF, Camu W, Meininger V, Dupre N, Rouleau GA. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet.* 2008 May;40(5):572-4. doi: 10.1038/ng.132. Epub 2008 Mar 30. PMID: 18372902.

Kablar B, Rudnicki MA. Development in the absence of skeletal muscle results in the sequential ablation of motor neurons from the spinal cord to the brain. *Dev Biol.* 1999 Apr 1;208(1):93-109. doi: 10.1006/dbio.1998.9184.

Kalmar B, Edet-Amana E, Greensmith L. Treatment with a coinducer of the heat shock response delays muscle denervation in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler.* 2012 Jun;13(4):378-92.

Kalmar B, Lu CH, Greensmith L. The role of heat shock proteins in Amyotrophic Lateral Sclerosis: The therapeutic potential of Arimoclomol. *Pharmacol Ther.* 2014 Jan;141(1):40-54. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.08.003. Epub 2013 Aug 23. PMID: 23978556.

Kaplan A, Spiller KJ, Towne C, Kanning KC, Choe GT, Geber A, Akay T, Aebischer P, Henderson CE. Neuronal matrix metalloproteinase-9 is a determinant of selective neurodegeneration. *Neuron.* 2014 Jan 22;81(2):333-48.

Kaur SJ, McKeown SR, Rashid S. Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene*. 2016. Feb 15;577(2):109-18. doi: 10.1016/j.gene.2015.11.049.

Keller-Peck CR, Feng G, Sanes JR, Yan Q, Lichtman JW, Snider WD. Glial cell line-derived neurotrophic factor administration in postnatal life results in motor unit enlargement and continuous synaptic remodeling at the neuromuscular junction. *J Neurosci*. 2001 Aug 15;21(16):6136-46. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-16-06136.2001.

Kennel P, Revah F, Bohme GA, Bejuit R, Gallix P, Stutzmann JM, Imperato A, Pratt J. Riluzole prolongs survival and delays muscle strength deterioration in mice with progressive motor neuronopathy (pmn). *J Neurol Sci*. 2000 Nov 1;180(1-2):55-61. doi: 10.1016/s0022-510x(00)00423-8.

Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010 Apr 2;141(1):52-67. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015.

Kherif S, Dehaupas M, Lafuma C, Fardeau M, Alameddine HS. Matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in denervated muscle and injured nerve. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1998 Aug;24(4):309-19. doi: 10.1046/j.1365-2990.1998.00118.x.

Kiaei M, Kipiani K, Calingasan NY, Wille E, Chen J, Heissig B, Rafii S, Lorenzl S, Beal MF. Matrix metalloproteinase-9 regulates TNF-alpha and FasL expression in neuronal, glial cells and its absence extends life in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*. 2007 May;205(1):74-81. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.01.036.

Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, Burrell JR, Zoing MC. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. 2011 Mar 12;377(9769):942-55. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61156-7.

Kodach LL, Bos CL, Durán N, Peppelenbosch MP, Ferreira CV, Hardwick JC. Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*. 2006 Mar;27(3):508-16. doi: 10.1093/carcin/bgi307.

Koirala S, Reddy LV, Ko CP. Roles of glial cells in the formation, function, and maintenance of the neuromuscular junction. *J Neurocytol*. 2003 Jun-Sep;32(5-8):987-1002. doi: 10.1023/B:NEUR.0000020637.71452.3c.

Kraft T, Messerli M, Rothen-Rutishauser B, Perriard JC, Wallimann T, Brenner B. Equilibration and exchange of fluorescently labeled molecules in skinned skeletal muscle fibers visualized by confocal microscopy. *Biophys J*. 1995 Oct;69(4):1246-58. doi: 10.1016/S0006-3495(95)80018-4.

Kuzma-Kozakiewicz M, Kwiecinski H. New therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Ther Targets*. 2011 Feb;15(2):127-43. doi: 10.1517/14728222.2011.542152. Epub 2010 Dec 7. PMID: 21133819.

Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004 Mar;49(3):187-98. doi: 10.1016/j.critrevonc.2003.09.008.

Laslo P, Lipski J, Funk GD. Differential expression of Group I metabotropic glutamate receptors in motoneurons at low and high risk for degeneration in ALS. *Neuroreport*. 2001 Jul 3;12(9):1903-8. doi: 10.1097/00001756-200107030-00027.

Lee, Young Il. "Developmental neuromuscular synapse elimination: Activity-dependence and potential downstream effector mechanisms." *Neuroscience letters* vol. 718 (2020): 134724. doi:10.1016/j.neulet.2019.134724.

Lepore E, Casola I, Dobrowolny G, Musarò A. Neuromuscular Junction as an Entity of Nerve-Muscle Communication. *Cells*. 2019 Aug 16;8(8):906. doi: 10.3390/cells8080906.

Liang Li, Xiaojie Zhang y Weidong Le (2008) Altered macroautophagy in the spinal cord of SOD1 mutant mice, *Autophagy*, 4:3, 290-293, DOI: [10.4161/auto.5524](https://doi.org/10.4161/auto.5524)

Lim GP, Backstrom JR, Cullen MJ, Miller CA, Atkinson RD, Tökés ZA. Matrix metalloproteinases in the neocortex and spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurochem*. 1996 Jul;67(1):251-9. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.67010251.x.

Lindstrom J, Schoepfer R, Conroy W, Whiting P, Das M, Saedi M, Anand R. The nicotinic acetylcholine receptor gene family: structure of nicotinic receptors from muscle and neurons and neuronal alpha-bungarotoxin-binding proteins. *Adv Exp Med Biol*. 1991;287:255-78. doi: 10.1007/978-1-4684-5907-4\_22.

Lindstrom J. Immunological studies of acetylcholine receptors. *J Supramol Struct*. 1976;4(3):389-403. doi: 10.1002/jss.400040310.

Liu W, Wei-LaPierre L, Klose A, Dirksen RT, Chakkalakal JV. Inducible depletion of adult skeletal muscle stem cells impairs the regeneration of neuromuscular junctions. *Elife*. 2015 Aug 27;4:e09221. doi: 10.7554/eLife.09221.

Lopes SC, Blanco YC, Justo GZ, Nogueira PA, Rodrigues FL, Goelnitz U, Wunderlich G, Facchini G, Brocchi M, Duran N, Costa FT. Violacein extracted from *Chromobacterium violaceum* inhibits *Plasmodium* growth in vitro and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 May;53(5):2149-52. doi: 10.1128/AAC.00693-08.

Lorenzl S, Albers DS, LeWitt PA, Chirichigno JW, Hilgenberg SL, Cudkowicz ME, Beal MF. Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases are elevated in cerebrospinal fluid of neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci*. 2003 Mar 15;207(1-2):71-6. doi: 10.1016/s0022-510x(02)00398-2.

Lorenzl S, Narr S, Angele B, Krell HW, Gregorio J, Kiaei M, Pfister HW, Beal MF. The matrix metalloproteinases inhibitor Ro 28-2653 [correction of Ro 26-2853] extends survival in transgenic ALS mice. *Exp Neurol*. 2006 Jul;200(1):166-71. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.01.026.

Louboutin JP, Fichter-Gagnepain V, Thaon E, Fardeau M. Morphometric analysis of mdx diaphragm muscle fibres. Comparison with hindlimb muscles. *Neuromuscul Disord*. 1993 Sep-Nov;3(5-6):463-9. doi: 10.1016/0960-8966(93)90098-5.

Lu, Y. Wang, L., Xue, Y., Zhang, C., Xing, X. H., Lou, K., y cols.. (2009). Production of violet pigment by a newly isolated psychrotrophic bacterium from a glacier in Xinjiang, China. *Biochem. Eng. J.* 43, 135-141. doi: 10.1016/j.bej.2008.09.009.

Łukaszewicz-Zajęc M, Mroczko B, Słowik A. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Neural Transm (Vienna)*. 2014 Nov;121(11):1387-97. doi: 10.1007/s00702-014-1205-3.

Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol*. 2010 Oct;9(10):995-1007. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70195-2. PMID: 20864052.

Magrané J, Cortez C, Gan WB, Manfredi G. Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models. *Hum Mol Genet*. 2014 Mar 15;23(6):1413-24. doi: 10.1093/hmg/ddt528.

Mahdy MAA. Skeletal muscle fibrosis: an overview. *Cell Tissue Res*. 2019 Mar;375(3):575-588. doi: 10.1007/s00441-018-2955-2.

Marco, M, Boragno, D, Rodríguez, P, Mestre Cordero, V, Pereira, N, Berasain, P, Cadenas, F, Rodríguez, C, Moreira, A, Simoff, X, Bianchi, V, Barindelli, A, Fielitz, P, Olivera-Bravo, S Gelatinasas como marcadores de consumo crónico de alcohol: un estudio piloto en Uruguay. *Anales de la Facultad de Medicina* 2020; 7(1). [Internet]. 2020. [citado: 2022, abril] 6 p.

Marden JJ, Harraz MM, Williams AJ, Nelson K, Luo M, Paulson H, Engelhardt JF. Redox modifier genes in amyotrophic lateral sclerosis in mice. *J Clin Invest*. 2007 Oct;117(10):2913-9. doi: 10.1172/JCI31265. PMID: 17853944; PMCID: PMC1974865.

Marques, C., Guo, W. M., Pereira, P., Taylor, A., Patterson, C., Evans, P. C., y cols.. (2006). The triage of damaged proteins: degradation by the ubiquitin-proteasome pathway or repair by molecular chaperones. *FASEB J*. 20, 741–743. doi: 10.1096/fj.05-5080fje

Mathis S, Goizet C, Soulages A, Vallat JM, Masson GL. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: A review. *J Neurol Sci*. 2019 Apr 15;399:217-226. doi: 10.1016/j.jns.2019.02.030.

McGookin R. Purification of synthetic oligonucleotides by preparative gel electrophoresis. *Methods Mol Biol*. 1988;4:215-20. doi: 10.1385/0-89603-127-6:215.

Mech AM, Brown AL, Schiavo G, Sleigh JN. Morphological variability is greater at developing than mature mouse neuromuscular junctions. *J Anat*. 2020 Oct;237(4):603-617. doi: 10.1111/joa.13228.

Mehta P, Kaye W, Raymond J, y cols.. Prevalence of Amyotrophic Lateral Sclerosis — United States, 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2018;67:216–218. doi: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6707a3externalicon>.

Mejia Maza A, Jarvis S, Lee WC, Cunningham TJ, Schiavo G, Secrier M, Fratta P, Sleigh JN, Fisher EMC, Sudre CH. NMJ-Analyser identifies subtle early changes in mouse models of neuromuscular disease. *Sci Rep.* 2021 06 10; 11(1):12251.

Melo PS, Maria SS, Vidal BC, Haun M, Durán N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2000;36: 539-543.

Menzies FM, Cookson MR, Taylor RW, Turnbull DM, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Dong L, Figlewicz DA, Shaw PJ. Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 2002 Jul;125(Pt 7):1522-33. doi: 10.1093/brain/awf167. PMID: 12077002.

Miller RG, Mitchell JD, Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Mar 14;2012(3):CD001447. doi: 10.1002/14651858.CD001447.pub3.

Minty G, Hoppen A, Boehm I, Alhindi A, Gibb L, Potter E, Wagner BC, Miller J, Skipworth RJE, Gillingwater TH, Jones RA. aNMJ-morph: a simple macro for rapid analysis of neuromuscular junction morphology. *R Soc Open Sci.* 2020 Apr 15;7(4):200128. doi: 10.1098/rsos.200128.

Mitchell JD, O'brien MR, Joshi M. Audit of outcomes in motor neuron disease (MND) patients treated with riluzole. *Amyotroph Lateral Scler.* 2006 Jun;7(2):67-71. doi: 10.1080/14660820500396984.

Miyoshi S, Tezuka T, Arimura S, Tomono T, Okada T, Yamanashi Y. *DOK7* gene therapy enhances motor activity and life span in ALS model mice. *EMBO Mol Med.* 2017 Jul;9(7):880-889. doi: 10.15252/emmm.201607298.

Mojib N, Farhoomand A, Andersen DT, Bej AK (2013) UV and cold tolerance of a pigment-producing Antarctic *Janthinobacterium* sp. *Ant5-2. Extremophiles* 17:367–378. doi:10.1007/s00792-013-0525-9.

Murata, S., Chiba, T., and Tanaka, K. (2003). CHIP: a quality-control E3 ligase collaborating with molecular chaperones. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 572-578.

Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med.* 2008 Oct;29(5):290-308. doi: 10.1016/j.mam.2008.05.002. Epub 2008 May 24.

Musarò A. Understanding ALS: new therapeutic approaches. *FEBS J.* 2013 Sep;280(17):4315-22. doi: 10.1111/febs.12087.

Nardo y cols. 2016; Nardo G, Trolese MC, de Vito G, Cecchi R, Riva N, Dina G, Heath PR, Quattrini A, Shaw PJ, Piazza V, Bendotti C. Immune response in peripheral axons delays disease

progression in SOD1G93A mice. *Journal of Neuroinflammation*. 2016. 13(1),261. doi:10.1186/s12974-016-0732-2.

Niebroj-Dobosz I, Janik P, Sokołowska B, Kwiecinski H. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol*. 2010 Feb;17(2):226-31. doi: 10.1111/j.1468-1331.2009.02775.x.

Ohno K, Anlar B, Ozdirim E, Brengman JM, DeBleecker JL, Engel AG. Myasthenic syndromes in Turkish kinships due to mutations in the acetylcholine receptor. *Ann Neurol*. 1998 Aug;44(2):234-41. doi: 10.1002/ana.410440214. PMID: 9708546.

Olivera-Bravo S, Bolatto C, Otero Damianovich G, Stancov M, Cerri S, Rodríguez P, Boragno D, Hernández Mir K, Cuitiño MN, Larrambembere F, Isasi E, Alem D, Canclini L, Marco M, Davyt D, Díaz-Amarilla P. Neuroprotective effects of violacein in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Rep*. 2022 Mar 15;12(1):4439. doi: 10.1038/s41598-022-06470-7.

Olson EN, Williams RS. Calcineurin signaling and muscle remodeling. *Cell*. 2000 Jun 23;101(7):689-92. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80880-6.

Oosthuyse B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, Theilmeier G, Dewerchin M, Laudenbach V, Vermynen P, Raat H, Acker T, Vlemingckx V, Van Den Bosch L, Cashman N, Fujisawa H, Drost MR, Sciot R, Bruyninckx F, Hicklin DJ, Ince C, Gressens P, Lupu F, Plate KH, Robberecht W, Herbert JM, Collen D, Carmeliet P. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet*. 2001 Jun;28(2):131-8. doi: 10.1038/88842.

Pantanella F, Berlutti F, Passariello C, Sarli S, Morea C, Schippa S. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *J Appl Microbiol*. 2007 Apr;102(4):992-9. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03155.x.

Park CH, Chung JH. Epidermal growth factor-induced matrix metalloproteinase-1 expression is negatively regulated by p38 MAPK in human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci* 2011; 64: 134-41.

Park H, Park S, Yang YH, Choi KY. Microbial synthesis of violacein pigment and its potential applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2021 Sep;41(6):879-901. doi: 10.1080/07388551.2021.1892579.

Park KH. Mechanisms of Muscle Denervation in Aging: Insights from a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Aging Dis*. 2015 Oct 1;6(5):380-9.

Pasinelli P, Brown RH. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci*. 2006 Sep;7(9):710-23. doi: 10.1038/nrn1971.

Philips T, Rothstein JD. Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Protoc Pharmacol*. 2015 Jun 1;69:5.67.1-5.67.21. doi: 10.1002/0471141755.ph0567s69.

Picchiarelli G, Demestre M, Zuko A, Been M, Higelin J, Dieterlé S, Goy MA, Mallik M, Sellier C, Scekcic-Zahirovic J, Zhang L, Rosenbohm A, Sijlmans C, Aly A, Mersmann S, Sanjuan-Ruiz I, Hübers A, Messaddeq N, Wagner M, van Bakel N, Boutillier AL, Ludolph A, Lagier-Tourenne C, Boeckers TM, Dupuis L, Storkebaum E. FUS-mediated regulation of acetylcholine receptor transcription at neuromuscular junctions is compromised in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci*. 2019 Nov;22(11):1793-1805. doi: 10.1038/s41593-019-0498-9.

Pioro EP, Mitsumoto H. Animal models of ALS. *Journal of Clinical Neuroscience*. 1995-1996. 3(6):375-85.

Platt D, Amara S, Mehta T, Vercuyssee K, Myles EL, Johnson T, Tiriveedhi V. Violacein inhibits matrix metalloproteinase mediated CXCR4 expression: potential anti-tumor effect in cancer invasion and metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Dec 5;455(1-2):107-12. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.124.

Prakash YS, Miller SM, Huang M, Sieck GC. Morphology of diaphragm neuromuscular junctions on different fibre types. *J Neurocytol*. 1996 Feb;25(2):88-100.

Rakhit R, Cunningham P, Furtos-Matei A, Dahan S, Qi XF, Crow JP, Cashman NR, Kondejewski LH, Chakrabartty A. Oxidation-induced misfolding and aggregation of superoxide dismutase and its implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem*. 2002 Dec 6;277(49):47551-6. doi: 10.1074/jbc.M207356200. Epub 2002 Sep 27. PMID: 12356748.

Rao SD, Weiss JH. Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS pathogenesis. *Trends Neurosci*. 2004 Jan;27(1):17-23. doi: 10.1016/j.tins.2003.11.001. PMID: 14698606.

Renaud S, Leppert D. Matrix metalloproteinases in neuromuscular disease. *Muscle Nerve*. 2007 Jul;36(1):1-13. doi: 10.1002/mus.20772.

Riancho J, Gonzalo I, Ruiz-Soto M, Berciano J. Why do motor neurons degenerate? Actualization in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurologia (Engl Ed)*. 2019 Jan-Feb;34(1):27-37. English, Spanish. doi: 10.1016/j.nrl.2015.12.001.

Robberecht W, Philips T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci*. 2013 Apr;14(4):248-64. doi: 10.1038/nrn3430.

Romi F, Helgeland G, Gilhus NE. Heat-shock proteins in clinical neurology. *Eur Neurol*. 2011;66(2):65-9. doi: 10.1159/000329373.

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B, Van den Bergh R, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1993;362:59-62.

Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol*. 2009 Feb;8(2):205-16. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70016-X.

Rosser, M. F. N., Washburn, E., Muchowski, P. J., Patterson, C., and Cyr, D. M. (2007) Chaperone Functions of the E3 Ubiquitin Ligase CHIP. *J. Biol. Chem.* 282, 22267–22277

Rothstein JD. Edaravone: A new drug approved for ALS. *Cell.* 2017 Nov 2;171(4):725. doi: 10.1016/j.cell.2017.10.011.

Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med.* 2001 May 31;344(22):1688-700. doi: 10.1056/NEJM200105313442207.

Rudolf R, Deschenes MR, Sandri M. Neuromuscular junction degeneration in muscle wasting. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2016 May;19(3):177-81. doi: 10.1097/MCO.000000000000267.

Sahara N, Murayama M, Mizoroki T, Urushitani M, Imai Y, Takahashi R, Murata S, Tanaka K, Takashima A. In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation. *J Neurochem.* 2005 Sep;94(5):1254-63. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03272.x. PMID: 16111477.

Sanes JR. The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *J Biol Chem.* 2003 Apr 11;278(15):12601-4. doi: 10.1074/jbc.R200027200. Epub 2003 Jan 29. PMID: 12556454.

Schaefer AM, Sanes JR, Lichtman JW. A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Comp Neurol.* 2005 Sep 26;490(3):209-19. doi: 10.1002/cne.20620.

Schoser BG, Blottner D. Matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-7 and MMP-9 in denervated human muscle. *Neuroreport.* 1999 Sep 9;10(13):2795-7. doi: 10.1097/00001756-199909090-00018.

Schoser BG, Wehling S, Blottner D. Cell death and apoptosis-related proteins in muscle biopsies of sporadic amyotrophic lateral sclerosis and polyneuropathy. *Muscle Nerve.* 2001 Aug;24(8):1083-9. doi: 10.1002/mus.1114.

Scott A. On the treatment trail for ALS. *Nature.* 2017; 18;550(7676):S120S121.

Shaw PJ, Ince PG, Falkous G, Mantle D. Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Ann Neurol.* 1995 Oct;38(4):691-5. doi: 10.1002/ana.410380424. PMID: 7574472.

Shefner JM, Al-Chalabi A, Baker MR, Cui LY, de Carvalho M, Eisen A, Grosskreutz J, Hardiman O, Henderson R, Matamala JM, Mitsumoto H, Paulus W, Simon N, Swash M, Talbot K, Turner MR, Ugawa Y, van den Berg LH, Verdugo R, Vucic S, Kaji R, Burke D, Kiernan MC. A proposal for new diagnostic criteria for ALS. *Clin Neurophysiol.* 2020 Aug;131(8):1975-1978. doi: 10.1016/j.clinph.2020.04.005.

Shepherd GM, Erulkar SD. Centenary of the synapse: from Sherrington to the molecular biology of the synapse and beyond. *Trends Neurosci.* 1997 Sep;20(9):385-92. doi: 10.1016/s0166-2236(97)01059-x. PMID: 9292963.

Shi, L., A.K. Fu, and N.Y. Ip, Molecular mechanisms underlying maturation and maintenance of the vertebrate neuromuscular junction. *Trends Neurosci*, 2012. 35(7): p. 441-53.

Shin LM, Wright CI, Cannistraro PA, Wedig MM, McMullin K, Martis B y cols. (2005). A functional magnetic resonance imaging study of amygdala and medial prefrontal cortex responses to overtly presented fearful faces in posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry* 62: 273–281.

Slater CR. The functional organization of motor nerve terminals. *Prog Neurobiol*. 2015 Nov;134:55-103. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.09.004. Epub 2015 Oct 9.

Slater CR. The Structure of Human Neuromuscular Junctions: Some Unanswered Molecular Questions. *Int J Mol Sci*. 2017 Oct 19;18(10):2183. doi: 10.3390/ijms18102183.

Spiller KJ, Khan T, Dominique MA, Restrepo CR, Cotton-Samuel D, Levitan M, Jafar-Nejad P, Zhang B, Soriano A, Rigo F, Trojanowski JQ, Lee VM. Reduction of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) protects motor neurons from TDP-43-triggered death in rNLS8 mice. *Neurobiol Dis*. 2019 Apr;124:133-140. doi: 10.1016/j.nbd.2018.11.013.

Stellwagen NC. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis*. 2009 Jun;30 Suppl 1(Suppl 1):S188-95. doi: 10.1002/elps.200900052.

Stetler-Stevenson WG. The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Cancer Metastasis Rev* 2008; 27: 57-66.

Talbot JD, Barrett JN, Nonner D, Zhang Z, Wicomb K, Barrett EF. Preservation of neuromuscular function in symptomatic SOD1-G93A mice by peripheral infusion of methylene blue. *Exp Neurol*. 2016 Nov;285(Pt A):96-107. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.08.013.

Tashiro Y, Urushitani M, Inoue H, Koike M, Uchiyama Y, Komatsu M, Tanaka K, Yamazaki M, Abe M, Misawa H, Sakimura K, Ito H, Takahashi R. Motor neuron-specific disruption of proteasomes, but not autophagy, replicates amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem*. 2012 Dec 14;287(51):42984-94. doi: 10.1074/jbc.M112.417600. Epub 2012 Oct 24. PMID: 23095749; PMCID: PMC3522293.

Taylor JP, Brown RH Jr, Cleveland DW. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*. 2016 Nov 10;539(7628):197-206. doi: 10.1038/nature20413.

Tintignac LA, Brenner HR, Rüegg MA. Mechanisms Regulating Neuromuscular Junction Development and Function and Causes of Muscle Wasting. *Physiol Rev*. 2015 Jul;95(3):809-52. doi: 10.1152/physrev.00033.2014.

Traynor BJ, Codd MB, Corr B, Forde C, Frost E, Hardiman O. Amyotrophic lateral sclerosis mimic syndromes: a population-based study. *Arch Neurol*. 2000 Jan;57(1):109-13. doi: 10.1001/archneur.57.1.109.

Tsang YM, Chiong F, Kuznetsov D, Kasarskis E, Geula C. Motor neurons are rich in non-phosphorylated neurofilaments: cross-species comparison and alterations in ALS. *Brain Res.* 2000 Apr 7;861(1):45-58.

Turner MR, Bakker M, Sham P, Shaw CE, Leigh PN, Al-Chalabi A. Prognostic modelling of therapeutic interventions in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2002 Mar;3(1):15-21. doi: 10.1080/146608202317576499.

Turner MR, Barohn RJ, Corcia P, Fink JK, Harms MB, Kiernan MC, Ravits J, Silani V, Simmons Z, Statland J, van den Berg LH; Delegates of the 2nd International PLS Conference, Mitsumoto H. Primary lateral sclerosis: consensus diagnostic criteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2020 Apr;91(4):373-377. doi: 10.1136/jnnp-2019-322541.

Turner MR, Bowser R, Bruijn L, Dupuis L, Ludolph A, McGrath M, Manfredi G, Maragakis N, Miller RG, Pullman SL, Rutkove SB, Shaw PJ, Shefner J, Fischbeck KH. Mechanisms, models and biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2013 May;14 Suppl 1(0 1):19-32. doi: 10.3109/21678421.2013.778554.

Urushitani M, Kurisu J, Tateno M, Hatakeyama S, Nakayama K, Kato S, Takahashi R. CHIP promotes proteasomal degradation of familial ALS-linked mutant SOD1 by ubiquitinating Hsp/Hsc70. *J Neurochem.* 2004; 90:231–244. [PubMed: 15198682]

Urushitani M, Kurisu J, Tsukita K, Takahashi R. Proteasomal inhibition by misfolded mutant superoxide dismutase 1 induces selective motor neuron death in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 2002 Dec;83(5):1030-42. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.01211.x. PMID: 12437574.

Vargas MR, Pehar M, Cassina P, Beckman JS, Barbeito L. Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR-dependent motor neuron apoptosis. *J Neurochem.* 2006 May;97(3):687-96. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03742.x.

Vázquez MC, Ketzoian C, Legnani C, Rega I, Sánchez N, Perna A, Penela M, Aguirrezábal X, Druet-Cabanac M, Medici M. Incidence and prevalence of amyotrophic lateral sclerosis in Uruguay: a population-based study. *Neuroepidemiology.* 2008;30(2):105-11. doi: 10.1159/000120023.

Venegas FA, Köllisch G, Mark K, Diederich WE, Kaufmann A, Bauer S, Chavarría M, Araya JJ, García-Piñeres AJ. The Bacterial Product Violacein Exerts an Immunostimulatory Effect Via TLR8. *Sci Rep.* 2019 Sep 20;9(1):13661. doi: 10.1038/s41598-019-50038-x.

Verinaud L, Lopes SC, Prado IC, Zanucoli F, Alves da Costa T, Di Gangi R, Issayama LK, Carvalho AC, Bonfanti AP, Niederauer GF, Duran N, Costa FT, Oliveira AL, Höfling MA, Machado DR, Thomé R. Violacein Treatment Modulates Acute and Chronic Inflammation through the Suppression of Cytokine Production and Induction of Regulatory T Cells. *PLoS One.* 2015 May 4;10(5):e0125409. doi: 10.1371/journal.pone.0125409..

Villegas R, Martinez NW, Lillo J, Pihan P, Hernandez D, Twiss JL, Court FA. Calcium release from intra-axonal endoplasmic reticulum leads to axon degeneration through mitochondrial dysfunction. *J Neurosci*. 2014 May 21;34(21):7179-89. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4784-13.2014.

Vincent A, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptor antibody as a diagnostic test for myasthenia gravis: results in 153 validated cases and 2967 diagnostic assays. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1985 Dec;48(12):1246-52. doi: 10.1136/jnnp.48.12.1246. PMID: 4087000; PMCID: PMC1028609.

Volk AE, Weishaupt JH, Andersen PM, Ludolph AC, Kubisch C. Current knowledge and recent insights into the genetic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Med Genet*. 2018;30(2):252-258. doi: 10.1007/s11825-018-0185-3. Epub 2018 Jul 13.

Waerhaug O, Lømo T. Factors causing different properties at neuromuscular junctions in fast and slow rat skeletal muscles. *Anat Embryol (Berl)*. 1994 Aug;190(2):113-25.

Wang Y, Ikawa A, Okaue S, Taniguchi S, Osaka I, Yoshimoto A, Kishida Y, Arakawa R, Enomoto K. Quorum sensing signaling molecules involved in the production of violacein by *Pseudoalteromonas*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008 Jul;72(7):1958-61. doi: 10.1271/bbb.80090.

Wang Y, Ikawa A, Okaue S, Taniguchi S, Osaka I, Yoshimoto A, Kishida Y, Arakawa R, Enomoto K. Quorum sensing signaling molecules involved in the production of violacein by *Pseudoalteromonas*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008 Jul;72(7):1958-61. doi: 10.1271/bbb.80090.

Weber G, Bitterman H. Riluzole-induced neutropenia. *Neurology*. 2004 May 11;62(9):1648. doi: 10.1212/01.wnl.0000123015.48097.9a.

Weiss MD, Macklin EA, Simmons Z, Knox AS, Greenblatt DJ, Atassi N, Graves M, Parziale N, Salameh JS, Quinn C, Brown RH Jr, Distad JB, Trivedi J, Shefner JM, Barohn RJ, Pestronk A, Swenson A, Cudkowicz ME; Mexiletine ALS Study Group. A randomized trial of mexiletine in ALS: Safety and effects on muscle cramps and progression. *Neurology*. 2016 Apr 19;86(16):1474-81. doi:10.1212/WNL.0000000000002507.

Wood SJ, Slater CR. Safety factor at the neuromuscular junction. *Prog Neurobiol*. 2001 Jul;64(4):393-429. doi: 10.1016/s0301-0082(00)00055-1.

Wood SJ, Slater CR. The contribution of postsynaptic folds to the safety factor for neuromuscular transmission in rat fast- and slow-twitch muscles. *J Physiol*. 1997 Apr 1;500 ( Pt 1)(Pt 1):165-76.

Worms PM. The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. *J Neurol Sci*. 2001 Oct 15;191(1-2):3-9. doi: 10.1016/s0022-510x(01)00630-x.

Yamanaka K, Komine O. The multi-dimensional roles of astrocytes in ALS. *Neurosci Res*. 2018 Jan;126:31-38. doi: 10.1016/j.neures.2017.09.011.

Yang L, Xiong H, Lee O, Qi SH, Qian PY (2007) Effect of agitation on violacein production in *Pseudoalteromonas luteoviolacea* isolated from a marine sponge. *Letters in applied microbiology* 44 (6) : 625-630.

Yokoyama CT, Sheng ZH, Catterall WA. Phosphorylation of the synaptic protein interaction site on N-type calcium channels inhibits interactions with SNARE proteins. *J Neurosci.* 1997 Sep 15;17(18):6929-38. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-18-06929.1997. PMID: 9278528; PMCID: PMC6573282.

Yong VW, Krekoski CA, Forsyth PA, Bell R, Edwards DR. Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci.* 1998 Feb;21(2):75-80. doi: 10.1016/s0166-2236(97)01169-7.

Yoon KH, Lee TY, Moon JH, Choi SY, Choi YJ, Mitchell RJ, Il Lee J. Consumption of Oleic Acid During Matriphagy in Free-Living Nematodes Alleviates the Toxic Effects of the Bacterial Metabolite Violacein. *Sci Rep.* 2020 May 15;10(1):8087. doi: 10.1038/s41598-020-64953-x.

Youssef SA, Capucchio MT, Rofina JE, Chambers JK, Uchida K, Nakayama H, Head E. Pathology of the Aging Brain in Domestic and Laboratory Animals, and Animal Models of Human Neurodegenerative Diseases. *Vet Pathol.* 2016 Mar;53(2):327-48. doi: 10.1177/0300985815623997.

Zhang X, Li L, Chen S, Yang D, Wang Y, Zhang X, Wang Z, Le W. Rapamycin treatment augments motor neuron degeneration in SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy.* 2011 Apr;7(4):412-25. doi: 10.4161/auto.7.4.14541. Epub 2011 Apr 1. PMID: 21193837.

Zufiría M, Gil-Bea FJ, Fernández-Torrón R, Poza JJ, Muñoz-Blanco JL, Rojas-García R, Riancho J, López de Munain A. ALS: A bucket of genes, environment, metabolism and unknown ingredients. *Prog Neurobiol.* 2016 Jul;142:104-129. doi: 10.1016/j.pneurobio.2016.05.004. Epub 2016 May 26. PMID: 27236050.

# ANEXO

## SOLUCIONES Y GELES USADOS PARA ZIMOGRFÍA

### Solución de Acrilamida/Bis-acrilamida

Acrilamida..... 40,25g

Bis- Acrilamida.....1,25 g

H<sub>2</sub>O dd.....100 mL

✓ Pesar exactamente la cantidad indicada de acrilamida y Bis- acrilamida con mucho cuidado. Utilizar guantes y limpiar con papel higiénico húmedo el área en caso de haber volcado.

✓ Agregar el volumen de agua. Dado que el volumen final de la solución será mayor (aprox 150mL) es deseable utilizar pipeta aforada y pesar adecuadamente para garantizar la reproducibilidad de la técnica. Mezclar en agitador con pastilla.

✓ Filtrar por 0,45 µm y desgasear

✓ Guardar en heladera

✓ Tener cuidado de introducir pipetas o punteros limpios.

✓ Si tuviese cualquier precipitado, por mínimo que sea, descartar por la pileta haciendo correr abundante agua. Recuerde que tanto la acrilamida como la Bis-Acrilamida son muy tóxicos en su forma monomérica.

### Buffer para preparar el gel de corrida (Tris 1,5 M pH 8,8)

Tris-base .....36.3g

H<sub>2</sub>O dd c.s.p .....200.0mL

Ajustar el pH a 8.8 agregando HCl conc.

Importante: Si al ajustar el pH, este alcanza un valor inferior al deseado, tire la solución y prepárela nuevamente. Nunca agregue soda para llevarlo a 8,8 ya que la fuerza iónica se verá afectada. Nunca utilice tris-HCl en lugar de Tris-base

### Buffer para preparar el gel concentrador (Tris 0,5 M pH 6,8)

Tris-base .....3.0g

H<sub>2</sub>O dd c.s.p .....50.0mL

Ajustar el pH a 6.8 agregando HCl concentrado

Importante: Si al ajustar el pH, este alcanza un valor inferior al deseado, tire la solución y prepárela nuevamente. Nunca agregue soda para llevarlo a 6,8 ya que la fuerza iónica se verá afectada. Nunca utilice tris-HCl en lugar de Tris-base.

### Preparación de gelatina:

Gelatina.....60 mg

H<sub>2</sub>O destilada c.s.p..... 14mL.

Disolver la gelatina en vaporera homogeneizando con pipeta Pasteur, asegurarse de que quede bien disuelta.

GEL DE POLIACRILAMIDA DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA 8%

<b>Gel Running 8%</b>	Volumen	<b>Gel Concentrador 4%</b>	Volumen
Gelatina	4.6 mL	H <sub>2</sub> O	4.1 mL
Tris 1.5 M pH 8.8	2.5 mL	Tris pH 6.8	750 µL
SDS 10%	100 µL	SDS 10%	60 µL
Acrilamida 30%	2.7 mL	Acrilamida 30%	1 mL
APS 10%	100 µL	APS 10%	60 µL
TEMED	6 µL	TEMED	6 µL

GEL DE POLIACRILAMIDA DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA 10%

<b>Gel Running 10%</b>	Volumen	<b>Gel Concentrador 4%</b>	Volumen
H <sub>2</sub> O dd	5.9 mL	H <sub>2</sub> O	4.1 mL
Tris 1.5 M pH 8.8	3.8 mL	Tris 1.0 M pH 6.8	750 µL
SDS 10%	150 µL	SDS 10%	60 µL
Acrilamida 30%	5 mL	Acrilamida 30%	1 mL
APS 10%	150 µL	APS 10%	60 µL
TEMED	6 µL	TEMED	6 µL

- Al colocar la solución de los geles en los vidrios, estos deben estar bien limpios y secos y corroborar en su armado de que estos no pierdan con H<sub>2</sub>O destilada.
- Respetar el orden de agregado de los reactivos.
- Se utiliza isopropanol que no se mezcla con el gel, para evitar burbujas, para inhibir el contacto con O<sub>2</sub> que afecta la polimerización. Luego del polimerizado se saca el isopropanol y se realizan varios lavados con H<sub>2</sub>O destilada. Luego se seca con papel de filtro.

**Solución colorante:**

Coomassie Blue R-250..... 5g  
Metanol..... 50mL  
Ácido Acético.....100 mL  
H<sub>2</sub>O dd..... 850 mL

Disolver completamente el colorante en metanol antes de agregar el ac. Acético y el agua. Filtrar por Watman N°2 utilizando embudo Buchner. Trabajar en campana

**Solución decolorante**

Etanol.....40 %  
Ácido acético .....10%  
H<sub>2</sub>O..... csp 100%

### **Buffer de corrida (10x) pH 8.3**

Tris Base.....30.3 g  
Glicina..... 144.1g  
SDS..... 10g  
+ H<sub>2</sub>O destilada vol. Final 1.0 L

Normalmente no es necesario ajustar pH. Guardar a temperatura ambiente.

### **Solución de SDS 10%**

Lauril sulfato de sodio (SDS) ..... 5,0 g  
H<sub>2</sub>O destilada c.s.p .....50mL

Guardar a temperatura ambiente para evitar la precipitación del SDS. En invierno puede ser necesario mantener la solución en estufa.

### **Buffer de tratamiento de la muestra 2x (Vol. 10 mL)**

Solución de Tris 0.5 M, pH 6.8.....2,5 mL  
Solución de SDS 10%.....4.0 mL  
Glicerol .....2.0 mL  
Dithiothreitol (DTT) ..... 0.31 g (0.2mL)  
Azul de bromofenol .....0.2 mg  
H<sub>2</sub>O destilada c.s.p .....10.0mL

En lugar de 0.31 g de DTT, puede utilizarse 0.2mL de 2- mercaptoetanol.

Guardar en heladera

### **Buffer de tratamiento de la muestra 6X (vol. 10 mL)**

Solución de Tris 0.5 M, pH 6.8.....7.0 mL  
SDS.....1.0 g  
Glicerol .....3.0 mL  
Dithiothreitol (DTT) ..... 0.93 g (0.2mL)  
Azul de bromofenol .....1.2 mg

Guardar en heladera

### **Buffer de electroforesis (10X)**

**(0,25 M Tris, 1,92 M Glicina, 1% SDS, pH 8,3)**

Tris- base .....30.3 g  
Glicina .....144.1 g

SDS .....10 g

H<sub>2</sub>O destilada c.s.p .....1.0 L

- Se guarda a T. ambiente, no refrigerar porque el SDS precipitará.
- En el momento de hacer la electroforesis se diluye 10 veces con H<sub>2</sub>O destilada de forma de preparar el volumen necesario (200 a 250mL)
- Evitar la introducción de pipetas u otros, que puedan alterar la composición del buffer, recuerde que alguien más lo usará.
- La re- utilización del buffer de electroforesis 1X queda a criterio del usuario, no obstante se recomienda no usar más de 2 veces y guardarlo debidamente identificado y separado del material de uso común.

Nota: Normalmente no es necesario ajustar el pH del buffer, por lo que es absolutamente necesario ser riguroso al pesar los reactivos y llevar a volumen con H<sub>2</sub>O destilada en lugar de agregar 1 L.

### **Solución de PBS 10x**

Pesar en balanza analítica:

- 80.0 de g NaCl
- 2.0 g de KCl
- 12 g de Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>
- 2.0 g de KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>
- H<sub>2</sub> O dest. Csp: 1000 mL.

Mezclar los solutos con 850 mL de H<sub>2</sub>O destilada, en agitador magnético durante 3hs hasta disolución total. Completar el volumen total en probeta y guardar a temperatura ambiente.

### **Buffer de lisis**

100 ml de PBS 10Mm, Ph 7.4 conteniendo 4Mm de EDTA y una tableta de inhibidor de proteasa SIGMAFAST™