



AGENCIA NACIONAL
DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN



PEDECIBA Biología - Neurociencias

Universidad de la República

Efectos inmunomoduladores de un compuesto derivado del ácido benzoico en un modelo de neurodegeneración

Estudiante: MSc. Sofía Ibarburu

Orientador: Dr. Luis Barbeito

Co-Orientador: Dr. Emiliano Trias

Tribunal:

Dr. Flavio Zolessi

Dra. Mercedes Segovia

Dra. Eugenia Isasi

Agradecimientos

Quiero agradecer...

...en Primer lugar a mis tutores Luis y Emiliano

...a mis compañeros de laboratorio Valentina, Mariangeles, Cecilia, Catalina y Lucas.

...a Flavio Zolessi, Mercedes Segovia y Eugenia Isasi, integrantes del tribunal, que aceptaron amablemente corregir este trabajo.

...a los integrantes de mi CAS, a Nathalia Vitoreira y nuevamente a Flavio Zolessi y Mercedes Segovia por acompañarme en su rol de CAS durante estos años.

...A Mariana, Jorge, Virginia y Carlos del Laboratorio Biología Vascular y desarrollo de fármacos del Institut Pasteur de Montevideo.

...A Karen y Mariela de la Unidad de Biología celular del Institut Pasteur de Montevideo

...A Paula, Sergio y Andrés integrantes de la unidad de Biotecnología en animales de laboratorio del Institut Pasteur de Montevideo

...a Natalia, Hugo y Bruno del Laboratorio de Neuroinflamación y Terapia Génica del Institut Pasteur de Montevideo

...a mis amigos y a mi familia, de quien he tenido, tengo y tendré siempre, apoyo incondicional.

¡Gracias!

Índice

Publicaciones y co-autorías generadas durante el Proyecto de Doctorado	5
Resumen	6
Introducción	10
Antecedentes.....	15
1. Esclerosis Lateral Amiotrófica	15
2. Modelos animales de ELA.....	16
2.1 Principales mecanismos patogénicos.....	17
3. Neuroinflamación y microambiente celular neurodegenerativo en la ELA.....	21
3.1 Microglía	23
3.2 Astrocitos	29
3.3 Células inmunitarias.....	34
4. Componente degenerativo en la vía motora periférica en la ELA y el papel de la neuroinflamación	40
5. Estrategias terapéuticas que tienen como objetivo la neuroinflamación	43
6. NF- κ B como blanco terapéutico para modular la neuroinflamación	45
6.1 Aproximaciones farmacológicas para modular la vía proinflamatoria NF- κ B	47
7. (E)-4-(2-nitrovinyl) ácido benzoico (BANA): un compuesto con el potencial de inhibir NF- κ B.....	48
Hipótesis	50
Objetivo.....	51
Objetivos específicos.....	51
Resultados.....	52
1. BANA inhibe la activación de la vía NF- κ B en modelos celulares y animales de inflamación.	52
2. BANA inhibe la activación de la vía NF- κ B en microglías en cultivo.	55
3. La activación de la vía NF- κ B se encuentra aumentada en la microglía de la médula espinal en pacientes con ELA.	57
4. El tratamiento con BANA en ratas hSOD1 ^{G93A} sintomáticas disminuye la activación de la vía NF- κ B y la microgliosis en la médula espinal.	59
5. La administración de BANA disminuye la astrogliosis y la emergencia de células gliales aberrantes en ratas hSOD1 ^{G93A}	64
6. La administración de BANA previene el aumento de la expresión de SCF en astrocitos reactivos, y la infiltración de mastocitos en la médula espinal en ratas hSOD1 ^{G93A}	66
7. BANA previene la infiltración de mastocitos y enlentece la degeneración de la vía motora periférica	68

8. La administración de BANA previene significativamente la patología de las motoneuronas espinales en ratas hSOD1 ^{G93A}	72
9. La administración de BANA enlentece significativamente la progresión de la parálisis en las ratas hSOD1 ^{G93A}	76
Discusión	78
Conclusiones y Perspectivas	87
Métodos.....	89
1. Ensayo de citotoxicidad del BANA en cultivos celulares: sulforodamina B.....	89
2. Estudio de la translocación nuclear de NF-κB:	89
3. Cultivo celular de microglía hSOD1 ^{G93A}	91
4. Análisis de la expresión de genes dependientes de la vía NF-κB por RT-qPCR.....	91
5. Análisis de la activación de la vía NF-κB <i>in vivo</i>	93
6. Inmunohistoquímica de médula espinal humana.	94
7. Inmunohistoquímica de médula espinal de ratas transgénicas hSOD1 ^{G93A}	94
8. Análisis de la gliosis en el asta ventral de la médula espinal lumbar.	95
9. Análisis de la infiltración de mastocitos en la médula espinal	96
10. Análisis de la expresión de SCF en astrocitos de la médula espinal	96
11. Análisis de número y tamaño de motoneuronas.	96
12. Análisis de terminales sinápticas contactando a las motoneuronas en la médula espinal.....	97
13. Histología y análisis de músculo de ratas transgénicas hSOD1 ^{G93A}	97
14. Histología y análisis de ciático y raíces de ratas transgénicas hSOD1 ^{G93A}	99
15. Ensayo de supervivencia en ratas transgénicas hSOD1 ^{G93A}	100
16. Determinación del comienzo y final de la enfermedad.	100
17. Determinación de los niveles plasmáticos de BANA.	101
18. Análisis estadístico.	101
Referencias.....	102

Publicaciones y co-autorías generadas durante el Proyecto de Doctorado

1. **The pathogenic role of c-Kit⁺ mast cells in the spinal motor neuron-vascular niche in ALS.** Kovacs M, Alamón C, Maciel C, Varela V, Ibarburu S, Tarragó L, King PH, Si Y, Kwon Y, Hermine O, Barbeito L, Trias E. Acta Neuropathol Commun. 2021 Aug 13;9(1):136. doi: 10.1186/s40478-021-01241-3. PMID: 34389060
2. BATTHYÁNY, Carlos; BARBEITO, Luis; ESCANDE, Carlos; IBARBURU, Sofía; LÓPEZ, Gloria Virginia; PORCAL QUINTA, Arturo Williams; INGOLD, Mariana; COLELLA, Lucia; TRIAS, Emiliano. **ELECTROPHILIC NITROALKENE BENZOIC ACID DERIVATES AS THERAPEUTIC DRUGS IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS (ALS) AND OTHER NEURODEGENERATIVE CONDITIONS.** WO/2021/079010. 2021 Apr. 29. Available from: <https://lens.org/179-672-186-225-033>*
3. **A Nitroalkene Benzoic Acid Derivative Targets Reactive Microglía and Prolongs Survival in an Inherited Model of ALS via NF- κ B Inhibition.** Ibarburu S, Kovacs M, Varela V, Rodríguez-Duarte J, Ingold M, Invernizzi P, Porcal W, Arévalo AP, Perelmutter K, Bollati-Fogolín M, Escande C, López GV, King P, Si Y, Kwon Y, Batthyány C, Barbeito L, Trias E. Neurotherapeutics. 2021 Jan;18(1):309-325. doi: 10.1007/s13311-020-00953-z.*
4. **Schwann cells orchestrate peripheral nerve inflammation through the expression of CSF1, IL-34, and SCF in amyotrophic lateral sclerosis.** Trias E, Kovacs M, King PH, Si Y, Kwon Y, Varela V, Ibarburu S, Moura IC, Hermine O, Beckman JS, Barbeito L. Glia. 2020 Jun;68(6):1165-1181. doi: 10.1002/glia.23768.
5. **CD34 Identifies a Subset of Proliferating Microglial Cells Associated with Degenerating Motor Neurons in ALS.** Kovacs M, Trias E, Varela V, Ibarburu S, Beckman JS, Moura IC, Hermine O, King PH, Si Y, Kwon Y, Barbeito L. Int J Mol Sci. 2019 Aug 9;20(16):3880. doi: 10.3390/ijms20163880.PMID: 31395804.
6. **Emergence of Microglía Bearing Senescence Markers During Paralysis Progression in a Rat Model of Inherited ALS.** Trias E, Beilby PR, Kovacs M, Ibarburu S, Varela V, Barreto-Núñez R, Bradford SC, Beckman JS, Barbeito L. Front Aging Neurosci. 2019 Feb 28;11:42. doi: 10.3389/fnagi.2019.00042. eCollection 2019.PMID: 30873018
7. **Mast cells and neutrophils mediate peripheral motor pathway degeneration in ALS.** Trías E, King PH, Si Y, Kwon Y, Varela V, Ibarburu S, Kovacs M, Moura IC, Beckman JS, Hermine O, Barbeito L. JCI Insight. 2018 Oct 4;3(19):e123249. doi: 10.1172/jci.insight.123249.PMID: 30282815

* Esta publicación y patente forman parte del capítulo “Resultados”

Resumen

Las enfermedades neurodegenerativas tienen una prevalencia creciente en la sociedad moderna cada vez más longeva. La ciencia busca comprender los mecanismos patogénicos subyacentes para ofrecer intervenciones preventivas o terapéuticas. Una característica común de las enfermedades neurodegenerativas es la neuroinflamación crónica, que involucra la activación de células gliales y la infiltración de células inmunes. Nuestro grupo de investigación y otros, han contribuido a demostrar el papel de la neuroinflamación en la degeneración y muerte de las motoneuronas en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), una enfermedad neurodegenerativa que afecta a las motoneuronas y produce parálisis muscular. La neuroinflamación en la ELA se asocia a la emergencia de microglías y astrocitos con actividad neurotóxica. Existen evidencias que fármacos que modulan la neuroinflamación en la ELA pueden tener un efecto "modificador de la enfermedad", ralentizando la progresión de la enfermedad y aumentando la supervivencia. Actualmente varios fármacos con actividad inmunomoduladora están siendo analizados en ensayos clínicos en pacientes con ELA.

En este contexto, este proyecto tuvo por objetivo caracterizar los efectos neuroprotectores de un nuevo fármaco derivado del ácido benzoico con actividad dual anti-neuroinflamatoria y citoprotectora en modelos celulares y animales de ELA. Este compuesto, el (E)-4-(2-nitrovinil) ácido benzoico (BANA), fue desarrollado por grupos de investigación nacionales (Institut Pasteur de Montevideo y Universidad de la República). La adición de un grupo nitroalqueno al ácido benzoico le confiere una actividad electrofílica a este último, confiriéndole la potencialidad de inhibir vías pro-inflamatorias y activar vías citoprotectoras.

En cultivos celulares de microglía con fenotipo inflamatorio, el tratamiento con BANA tuvo un efecto dosis-dependiente en la disminución de la proliferación celular y el fenotipo inflamatorio. Este efecto estuvo asociado a la inhibición de la activación de la vía NF- κ B por parte del compuesto, evidenciado por la inhibición de la translocación nuclear de la subunidad p65 en microglías activadas. El efecto inhibitorio que ejerce el BANA sobre la vía NF- κ B fue evidenciado también en modelos celulares y animales reporteros de la vía NF- κ B.

La administración diaria oral de BANA en el modelo murino de ELA (ratas transgénicas hSOD1^{G93A}), comenzando al inicio de la fase sintomática, fue capaz de reducir la neuroinflamación. En la médula espinal, la astrocitosis y microgliosis disminuyó significativamente, así como el número de microglía con NF- κ B-p65 nuclear en el asta ventral. BANA también disminuyó significativamente la inflamación en el sistema nervioso periférico y músculos esqueléticos denervados, principalmente la infiltración de mastocitos. A destacar, el tratamiento con BANA se asoció a una preservación del número y tamaño de motoneuronas espinales y de las uniones neuro-musculares inervadas, sugiriendo la protección de la vía motora. Finalmente, el tratamiento con BANA aumentó significativamente la supervivencia de las ratas ELA, en un 30%.

Nuestros resultados sugieren que el BANA podría tener un efecto neuroprotector en un modelo de ELA, modulando la respuesta inflamatoria a través de la inhibición de la vía NF- κ B. Si bien los efectos inhibidores de BANA sobre la activación de NF- κ B son sistémicos y posiblemente involucran varios tipos celulares, la microglía NF- κ B-positiva que rodea a las motoneuronas espinales en degeneración y la activación periférica de macrófagos y mastocitos podrían ser blancos celulares primarios del BANA. El fármaco podría también actuar de manera indirecta en el resto del microambiente celular degenerativo de la ELA, protegiendo en última instancia la integridad de las motoneuronas espinales. Los resultados obtenidos en el presente trabajo proporcionan evidencias que apoyan la utilización del BANA como potencial terapia farmacológica para enlentecer la progresión de la parálisis en la ELA.

Abstract

Neurodegenerative diseases have a growing prevalence in the increasingly long-lived modern society. Current research seeks to understand the underlying pathogenic mechanisms to offer preventive or therapeutic interventions. A common feature of neurodegenerative diseases is chronic neuroinflammation, which involves glial cell activation as well as immune cell infiltration. Our research group has extensively contributed to demonstrating the role of neuroinflammation in the neurodegeneration process and death of motor neurons in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), a paradigmatic disease involving motoneurons and leading to muscular paralysis. Neuroinflammation in ALS is associated to the emergence of neurotoxic phenotypes of astrocytes and microglia. Evidence indicates that drugs that modulate neuroinflammation in ALS can have a "disease-modifying" effect, slowing disease progression and eventually increasing survival. Several drugs with immunomodulatory activity are currently being analyzed in clinical trials in patients with ALS.

In this context, this project aimed to characterize the neuroprotective effects of a new drug derived from benzoic acid with dual anti-neuroinflammatory and cytoprotective activity in cellular and animal models of ALS. This compound, (E)-4-(2-nitrovinyl) benzoic acid (BANA), was developed by Uruguayan research groups (at Institut Pasteur Montevideo and Facultad de Química, Udelar). The addition of a nitroalkene group to benzoic acid confers an electrophilic activity to the latter, allowing cytoprotective pathways to be activated and pro-inflammatory pathways to be inhibited.

In microglia cell cultures with an inflammatory phenotype, BANA treatment had a dose-dependent effect decreasing cell proliferation and inhibiting the inflammatory phenotype. This effect was associated with the inhibition of the NF- κ B pathway activation by the compound, evidenced by the inhibition of nuclear translocation of the p65 subunit in activated microglia. The inhibitory effect exerted by BANA on the NF- κ B pathway was also evidenced in NF- κ B reporter cell and animal models.

Daily oral administration of BANA in the murine model of ALS (hSOD1^{G93A} transgenic rats) beginning at the onset of the symptomatic phase was able to reduce neuroinflammation. In the spinal cord, astrogliosis and microgliosis as well as the number of microglia with nuclear expression of NF- κ B-p65 in the ventral horn were significantly decreased. BANA also significantly decreased inflammation in the peripheral nervous system and affected skeletal muscles, particularly mast cell infiltration. Of note, treatment with BANA was associated with preservation of the number and size of spinal motor neurons and innervated neuromuscular junctions, suggesting significant protection of the motor pathway. Finally, BANA treatment significantly increased the survival of ALS rats, by 30%.

Our results suggest that BANA could have a neuroprotective effect in an ALS model, modulating the inflammatory response through the inhibition of the NF- κ B pathway. Although the inhibitory effects of BANA on NF- κ B activation are systemic and possibly involve multiple cell types, NF- κ B-positive microglia surrounding degenerating spinal motor neurons and peripheral activation of macrophages and mast cells could be primary cellular targets of BANA. The drug could also act indirectly on the rest of the degenerative cellular microenvironment of ALS, ultimately protecting the integrity of spinal motor neurons. The results obtained in this study provide evidence that supports the use of BANA as a potential pharmacological therapy to slow the progression of paralysis in ALS.

Introducción

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un grupo de patologías caracterizadas por la degeneración y muerte de grupos de neuronas que lleva al deterioro funcional progresivo (1,2). En la mayoría de los casos, las enfermedades neurodegenerativas son progresivas y en etapas avanzadas generan condiciones inhabilitantes, pérdida de la autonomía y muerte prematura (3). La incidencia de alguna de estas enfermedades como la Enfermedad de Alzheimer (EA), la Enfermedad de Parkinson (EP) y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), ha adquirido un carácter epidémico con el aumento de la expectativa de vida de la población en las últimas décadas, generando un impacto socioeconómico significativo (4). Actualmente, no existen tratamientos efectivos que permitan detener o enlentecer de forma significativa la progresión de la neurodegeneración (5), por lo que la identificación de estrategias terapéuticas y el desarrollo de nuevos fármacos neuroprotectores representan uno de los mayores desafíos de la neurociencia actual.

Si bien se conoce parcialmente la etiología y mecanismos patogénicos que subyacen a las enfermedades neurodegenerativas, un fenómeno patológico común que se asocia a la muerte de neuronas y al carácter progresivo de la neurodegeneración, es la neuroinflamación crónica (6,7). La neuroinflamación se puede definir como la respuesta inflamatoria que se desencadena en el sistema nervioso en respuesta a estímulos nocivos, como traumas, infecciones o condiciones neurodegenerativas. La neuroinflamación está mediada por células gliales (microglía y astrocitos), que a su vez interactúan con células del sistema inmune (mastocitos, monocitos, linfocitos y neutrófilos, entre otros) y con la microvasculatura (7–10). Durante las últimas décadas, numerosos grupos de investigación se han enfocado en la búsqueda de estrategias terapéuticas que logren inhibir esta respuesta inflamatoria para enlentecer la progresión de la neurodegeneración. Algunas evidencias muestran que la utilización de fármacos que tienen como blanco distintas vías involucradas en la neuroinflamación podrían tener un efecto modulador de la progresión lesional de estas enfermedades (11,12),

dejando en evidencia la correlación entre la activación de la neuroinflamación y la progresión de la degeneración neuronal.

Nuestro grupo de investigación ha realizado aportes significativos en la descripción de los mecanismos de acción y el desarrollo de fármacos con efectos neuroprotectores y anti-inflamatorios en modelos murinos de ELA (13–16). La ELA, es una enfermedad neurodegenerativa paradigmática, paralizante, que se caracteriza por la degeneración y pérdida progresiva de motoneuronas superiores e inferiores (17,18). Numerosas evidencias muestran que la emergencia de astrocitos y microglías activadas con fenotipo inflamatorio y neurotóxico, en el microambiente celular que rodea a las motoneuronas, juega un papel central en el daño producido a las mismas, y se correlaciona con la degeneración progresiva a lo largo del neuroeje (19–25). De la misma manera, numerosos autores han mostrado que a lo largo de la vía motora periférica, tanto en los nervios como en los músculos esqueléticos, se constituye un ambiente inflamatorio sostenido, como consecuencia de la degeneración de los nervios periféricos y activación de las células de Schwann (26–31). A nivel central, el componente neuroinflamatorio, estrechamente vinculado a la infiltración de células inmunes desde la periferia, también está asociado a cambios significativos en la microvasculatura y defectos en la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica y hemato-espinal (32–35).

Este trabajo de tesis está precedido por numerosas investigaciones que muestran cómo la neuroinflamación crónica, se correlaciona con la progresión lesional de la neurodegeneración en la ELA, tanto en modelos animales como en pacientes (36–38). Nuestro laboratorio ha contribuido al desarrollo preclínico de estrategias farmacológicas terapéuticas que logran modular la neuroinflamación, inhibiendo la actividad de células gliales e inmunes activadas (14,30,39,40). La evidencia acumulada en los últimos años, ha puesto de manifiesto que la neuroinflamación, constituye un blanco terapéutico relevante para lograr modificar o enlentecer la progresión de la ELA. Una de las vías involucradas en la orquestación de la inflamación, y que juega un rol significativo en distintos procesos celulares y moleculares citotóxicos asociados a la progresión de la ELA, y otras enfermedades neurodegenerativas, es la vía NF- κ B (41–46).

Durante mis estudios de doctorado nos propusimos como uno de los objetivos principales identificar fármacos que pudieran modular la neuroinflamación a través de la inhibición selectiva de la vía NF- κ B. Nuestra hipótesis establecía que la modulación farmacológica de esta vía, podría modificar la neuroinflamación mediada por células gliales e inmunes resultando en neuroprotección y enlentecimiento de la progresión de la enfermedad.

Actualmente existen numerosos ensayos clínicos que están evaluando diferentes fármacos para tratar la progresión de la ELA, que sigue siendo una enfermedad huérfana de tratamientos curativos (47,48), por lo que la búsqueda y caracterización de nuevos compuestos constituye una necesidad. Por ello, en este trabajo enfocamos las investigaciones en algunos de los modelos celulares y animales más utilizados para estudiar los procesos patogénicos que tienen lugar en la ELA y la búsqueda de nuevos compuestos (49–51). En particular, utilizamos un modelo de rata que sobreexpresa un gen humano de la SOD1, que presenta una mutación de una glicina por una alanina en el codón 93 (hSOD1^{G93A}) (52). Dicha mutación es suficiente para desencadenar una enfermedad en los animales que se asemeja en gran medida a la ELA que se observa en humanos. Los modelos de ratones y ratas que sobreexpresan mutaciones de la SOD1^{G93A}, han sido considerados como el “gold-standard” para estudiar los fenómenos celulares y moleculares asociados a la degeneración en la ELA, así como para la realización de ensayos preclínicos en la búsqueda de nuevos fármacos (49).

El diseño y desarrollo de fármacos novedosos con propiedades anti-inflamatorias ha sido el objetivo de algunos grupos de investigación y empresas startups “*spin-off*” del Institut Pasteur de Montevideo y la Universidad de la República. La búsqueda de fármacos para tratar enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico y enfermedades neurodegenerativas ha dado lugar a la generación de numerosas patentes de invención, algunas de las cuales son parte de esta tesis de doctorado (53). En particular, durante este trabajo de tesis enfocamos los esfuerzos en la validación y caracterización de un nuevo compuesto desarrollado en colaboración con los laboratorios mencionados. Esta nueva molécula mostraba una potente actividad inhibitoria en cultivos de microglía activada aisladas de un modelo de ratas que sobreexpresan la SOD1 mutante. Los efectos del fármaco

sobre estas células y en otros modelos celulares eran potentes y específicos, y se diferenciaba de otros compuestos estudiados, por lo que su estudio en profundidad ameritaba una nueva línea de investigación en nuestro grupo.

El fármaco estudiado es un derivado nitroalqueno del ácido benzoico, el (E)-4-(2-nitrovinyl) ácido benzoico (BANA). El ácido benzoico, es un ácido carboxílico aromático que se encuentra de forma natural en las plantas, de baja toxicidad y que se utiliza ampliamente como conservante, antiséptico y analgésico (54–56). Además, se ha demostrado que ejerce efectos neuroprotectores en modelos experimentales de la Enfermedad de Alzheimer (57) y Enfermedad de Parkinson (58). Como ocurre con otras moléculas, la adición de un grupo nitroalqueno le confiere al ácido benzóico una actividad electrofílica (59–62). Los electrófilos se definen como una especie química capaz de aceptar un par de electrones de un enlace covalente, confiriéndoles un efecto anti-inflamatorio y citoprotector, al reaccionar con intermediarios nucleofílicos de vías de señalización celular pro-inflamatorias, como es el caso de vía proinflamatoria NF- κ B, en donde se ha descrito que compuestos electrofílicos actúan alquilando cisteínas de las subunidades p65 y p50, inhibiendo la translocación y unión al ADN (60).

Publicaciones recientes generadas por nuestro grupo aportaron evidencia adicional sobre la efectividad terapéutica de compuestos electrofílicos que comparten propiedades con el BANA (13). Los derivados electrofílicos de ácidos grasos (nitro-oleico y nitro-araquidónico), que se forman en respuesta a situaciones de daño, pudiendo modular la inflamación al activar vías citoprotectoras e inhibir vías pro-inflamatorias (63), han demostrado ser neuroprotectores en modelos murinos de ELA (13). Estos fármacos también se podrían comparar en su reactividad con el fármaco electrofílico dimetilfumurato (DMF), actualmente aprobado para el tratamiento de la Esclerosis Múltiple (64,65) y que está siendo estudiado para el tratamiento de la ELA (66).

En este contexto, durante mi doctorado desarrollé la línea investigación que tuvo como objetivo principal determinar si el BANA podría constituir una molécula novedosa que pudiera enlentecer la progresión de la ELA en un modelo murino de

la enfermedad. Durante estas investigaciones, determinamos que el BANA es un inhibidor potente de la vía NF- κ B y por lo tanto actúa reduciendo de manera significativa la neuroinflamación a lo largo de la vía motora (67). Esto resulta en una protección significativa de las motoneuronas de la médula espinal en el modelo de ratas hSOD1^{G93A} cuando son tratadas con BANA, en comparación con el grupo control (67). En la vía motora periférica, la administración diaria de BANA logra enlentecer la degeneración del nervio ciático, y el músculo esquelético, disminuyendo la denervación de las uniones neuromusculares. Esta neuroprotección de las vías motoras se traduce en una mayor sobrevivencia de los animales tratados con BANA, en comparación con los tratados con el vehículo (67).

Este trabajo de tesis dio lugar a una publicación en una revista arbitrada internacional (67), y a una patente de invención (53). Consideramos que los resultados obtenidos representan un aporte significativo al área del conocimiento y aporta las bases conceptuales para el desarrollo de una nueva clase terapéutica para el tratamiento de la neurodegeneración, usando moléculas con un grupo nitroalqueno como el BANA, con capacidad de inhibir la vía pro-inflamatoria NF- κ B.

Antecedentes

1. Esclerosis Lateral Amiotrófica

La ELA es considerada una enfermedad neurodegenerativa paradigmática que afecta principalmente a las motoneuronas superiores e inferiores (17), generando una parálisis y atrofia muscular progresiva, que lleva a la muerte del paciente en aproximadamente 3 a 5 años (17,68). Los síntomas característicos de ELA son: i) debilidad y atrofia muscular progresiva, seguido por parálisis progresiva, ii) fasciculaciones asociadas a la denervación muscular, y iii) exaltación de los reflejos tendinosos, que reflejan la pérdida de control inhibitorio por la degeneración de la vía cortico-espinal (17). Esta enfermedad afecta principalmente a individuos de edad media y avanzada (50-70 años). En personas de entre 60 y 69 años, la incidencia de ELA es de 1.5 casos cada 100.000, incrementándose en personas de mayor edad. Por esto, se considera al envejecimiento como un factor de riesgo significativo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la ELA (69,70). En Uruguay, la cantidad de personas que padecen esta enfermedad es similar a la de otros países, con una incidencia de 1,42 cada 100.000 habitantes/año (71).

La ELA fue descrita por primera vez en 1869 por el clínico y neurobiólogo Jean-Martin Charcot (72). El término “esclerosis lateral” hace referencia a la lesión esclerosante en la parte lateral de la médula espinal, correspondiente a la degeneración masiva de axones del tracto cortico-espinal, y el término “amiotrófica”, denota la atrofia de los músculos esqueléticos denervados (72). Aproximadamente un tercio de los pacientes comienzan con síntomas bulbares, y usualmente presentan disartria y disfagia (17,18). Los casos restantes comienzan con síntomas en las extremidades, principalmente con debilidad y atrofia muscular. La progresión lesional en la ELA sigue un patrón de contigüidad regional (17), un mecanismo posiblemente dependiente de la respuesta glial y neuroinflamatoria.

El 90% de los casos de ELA se conocen como esporádicos, donde no hay antecedentes familiares, mientras que el 10% restante se conocen como casos familiares, causados por mutaciones en diversos genes que son heredadas. Se han

descrito más de 25 genes con mutaciones puntuales asociados a la ELA familiar, siendo los más prevalentes el gen que codifica para la proteína TAR 43 de unión al ADN (TDP-43) (73,74), el gen que codifica para la proteína FUS (75–77), de unión al ARN, el gen que codifica para la proteína C9ORF72 (78), y el gen que codifica para la enzima citosólica Cu/Zn superóxido dismutasa 1 (SOD1) (79). Un 20% de los casos familiares están asociados a más de 100 mutaciones puntuales en el gen de la SOD1 (80,81). El desarrollo de la ELA en portadores de mutaciones SOD1 no está asociado a una pérdida de la función catalítica de esta enzima, sino a una ganancia de función que la vuelve neurotóxica a nivel celular, promoviendo la formación de agregados proteicos, la inhibición del proteasoma, disfunción del retículo endoplásmico y mitocondrias, entre otros mecanismos (82,83). La identificación de mutaciones de la SOD1 permitió el desarrollo de modelos murinos de la enfermedad (ratas y ratones) (52,84), los cuales han permitido por casi tres décadas, avanzar en la comprensión de los mecanismos patogénicos, moleculares y celulares, que subyacen a la neurodegeneración y realizar numerosos ensayos preclínicos (85).

2. Modelos animales de ELA

En la actualidad, existen numerosos modelos animales transgénicos que desarrollan enfermedades de las motoneuronas muy similares a las observadas en los pacientes con ELA. Estos animales presentan mutaciones puntuales en distintos genes asociados con el desarrollo de la enfermedad, y al igual que en la presentación en pacientes, desarrollan una muerte selectiva de motoneuronas y una respuesta neuroinflamatoria que llevan a la parálisis muscular progresiva y muerte (86,87). En 1994, Gurney y colaboradores desarrollaron un ratón transgénico que sobreexpresa (aproximadamente 20 copias) la SOD1 humana con una mutación puntual, en la que se cambia un residuo de Glicina en la posición 93 por una Alanina (84). Estos ratones hSOD1^{G93A} no presentan ningún tipo de sintomatología aparente durante los primeros 120 días de vida. A partir de ese momento, comienzan a desarrollar una parálisis de los miembros posteriores que avanza durante 6 semanas hacia los miembros anteriores hasta generar una parálisis completa. A nivel histopatológico, se observa degeneración y muerte progresiva de motoneuronas superiores e inferiores y un claro componente de reactividad glial y neuroinflamación a lo largo del neuroeje. En la vía motora periférica se observa

degeneración axonal, reactividad glial, infiltración de células inmunes y denervación de las placas motoras en las uniones neuromusculares, lo que lleva a la característica atrofia del músculo (84). Utilizando construcciones similares a las empleadas para desarrollar este modelo de ratón, en 2002, Howland y colaboradores, desarrollaron un modelo murino de ELA en ratas, las cuales, a partir de los 180 días de vida, desarrollan una enfermedad similar a la observada en ratones (52). En las ratas, la enfermedad presenta una progresión más rápida que en los ratones, y se observa una parálisis total del animal tres semanas después de comenzados los síntomas.

Hasta el día de hoy, los modelos murinos que sobreexpresan mutaciones de la SOD1 humana siguen siendo los modelos de ELA más utilizados y constituyen la principal herramienta en el desarrollo preclínico de estrategias terapéuticas (49), y han permitido dilucidar numerosos mecanismos moleculares y celulares patogénicos en la ELA.

2.1 Principales mecanismos patogénicos

La identificación de los mecanismos moleculares por los cuales se produce la degeneración y muerte de las motoneuronas en la ELA es fundamental para entender cómo se desencadena y ocurre la progresión de la enfermedad, así como para el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas. La figura 1 resume los principales mecanismos que subyacen a la neurotoxicidad asociada a la SOD1 mutada (88). Actualmente, se considera que es la sumatoria de varios de estos mecanismos lo que desencadena y contribuye a la neurodegeneración en la ELA, que debe ser comprendida como una enfermedad multifactorial (89,90).

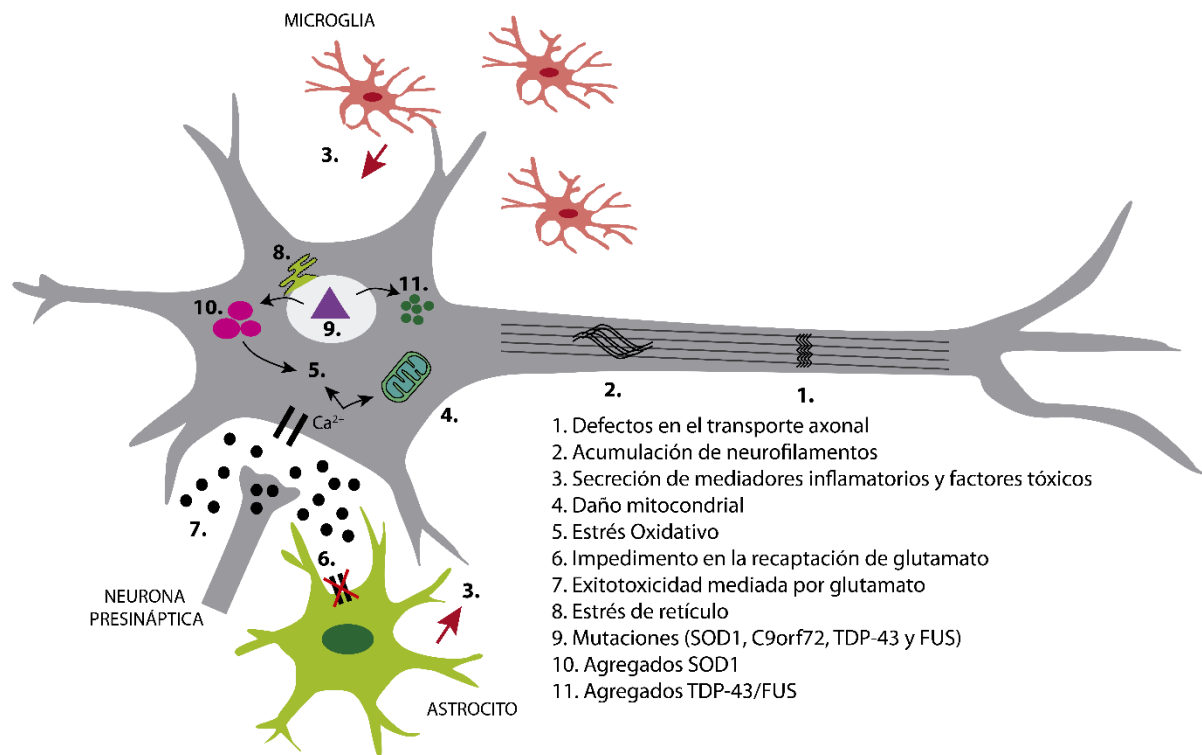


Figura 1. Mecanismos patogénicos involucrados en la ELA. Diversos mecanismos moleculares y celulares contribuyen al proceso neurodegenerativo en la ELA. Algunos de los más estudiados son: un aumento de la concentración de glutamato en la hendidura sináptica, debido al impedimento de su recaptación por los astrocitos, conduce a un aumento en la entrada de iones de Ca^{2+} en las motoneuronas. Este aumento en los niveles de Ca^{2+} , que en condiciones fisiológicas normales es removido por la mitocondria, permanecen elevados en el citoplasma debido a la disfunción mitocondrial y puede causar daño al activar vías enzimáticas dependientes de Ca^{2+} contribuyendo al estrés oxidativo. Las proteínas mutantes mal plegadas (SOD1, C9orf72, TDP-43 y FUS) forman agregados, los cuales contribuyen al aumento del estrés oxidativo, a la disfunción mitocondrial y pueden llevar a la acumulación de neurofilamentos y disfunción del transporte axonal. Además, la microglía y los astrocitos activados liberan mediadores inflamatorios y factores tóxicos que contribuyen a la neurotoxicidad. (Modificado de Bonafede et al., 2017 (88)).

El daño mitocondrial es una característica común de varias enfermedades neurodegenerativas, y en particular sus alteraciones han sido profundamente estudiadas en el contexto de la ELA (91–94). Alteraciones morfológicas como dilatación y vacuolización, fragmentación e hinchazón, de las mismas han sido observados en motoneuronas espinales y músculo esquelético tanto en pacientes con ELA familiar y esporádica, así como en el modelo murino de la enfermedad que expresa hSOD1^{G93A} (82,95,96). También se ha descrito la producción anormal de

ATP y especies reactivas del oxígeno (ROS), disfunción en la homeostasis energética y en la homeostasis de Ca^{2+} , alteraciones en el desencadenamiento de la apoptosis, así como alteraciones en el transporte de mitocondrias a lo largo de los axones (97–100). Estudios realizados por Cassina y colaboradores mostraron que la modulación farmacológica de la actividad mitocondrial por agentes antioxidantes como el MitoQ, previene la muerte de las motoneuronas inducida por astrocitos en cultivo (94), y la administración diaria con este compuesto a ratones transgénicos $\text{hSOD1}^{\text{G93A}}$ aumenta significativamente la sobrevivencia de los animales (16). Otros estudios realizados en modelos murinos $\text{hSOD1}^{\text{G93A}}$ mostraron que la modulación metabólica de las mitocondrias reduce la degeneración de motoneuronas, la gliosis, y la aparición de células gliales con fenotipo aberrante (15,101).

La excitotoxicidad mediada por glutamato fue una de las primeras hipótesis propuestas como mecanismo patogénico en la ELA (102). Tanto en la corteza motora como en la médula espinal de los pacientes, así como en modelos murinos, se identificó una reducción de los niveles de expresión de EAAT2 (52,102,103), un transportador astrocitario de glutamato cuya función es mantener los niveles del neurotransmisor por debajo de los niveles tóxicos en las hendiduras sinápticas. Esta reducción en la expresión de EAAT2 lleva a un aumento de la concentración de glutamato y una sobreestimulación de los receptores de glutamato post-sinápticos, lo que determina una toxicidad mediada por el neurotransmisor y daño neuronal (104). Para determinar si esta pérdida de expresión de EAAT2 y el aumento de los niveles de glutamato constituían un mecanismo patogénico significativo primario en el desarrollo y progresión de la ELA, o una consecuencia del daño neuronal y glial, se generó un ratón doble transgénico ($\text{SOD1}^{\text{G93A}}/\text{EAAT2}$), que sobreexpresa EAAT2 (105). Si bien estos ratones mostraron un retraso en la degeneración de las motoneuronas, no se evidenció una modificación de la sobrevivencia. Estos resultados sugieren que la excitotoxicidad mediada por glutamato puede contribuir de manera significativa a la degeneración en el contexto de la ELA, pero no constituir una causa primaria de la enfermedad.

Los radicales libres o ROS (del inglés “*Reactive Oxygen Species*”) son productos naturales del metabolismo del oxígeno. El término estrés oxidativo se utiliza cuando la producción de ROS es superior a la capacidad de las células para

eliminarlas, provocando daños irreversibles en estructuras celulares y macromoléculas, como proteínas, ADN y ARN (106). La SOD1 es la principal enzima para prevenir el daño oxidativo y reducir la liberación de superóxido de las mitocondrias (107,108). Las mutaciones en este gen pueden causar alteraciones en la actividad de la proteína que conducen a la citotoxicidad, pero no necesariamente por una pérdida de función, sino por una ganancia de función, o una función aberrante (82,109). Experimentos en cultivo demostraron que las proteínas SOD1 humanas mutantes (como la mutación G37R o la G93A) son activas y estables, promoviendo la apoptosis neuronal (110,111). Estos estudios sugieren que la patogenia de la ELA puede implicar no sólo una disminución/pérdida de la función enzimática de SOD1, sino que probablemente también se deba a una ganancia tóxica dominante de la función de la enzima. Se ha propuesto que la SOD1 mutante podría revertir su actividad antioxidante normal produciendo superóxido tóxico: la proteína mutada podría tomar electrones de otros antioxidantes celulares y donarlos al oxígeno molecular, produciendo superóxido y convirtiendo la SOD1 en la fuente del estrés oxidativo (112,113). Estos radicales pueden reaccionar con el óxido nítrico y generar especies nitrantes como el peroxinitrito, cuyo marcador biológico más caracterizado en la ELA, son los residuos de nitro-tirosina (114,115)

El estrés oxidativo en la ELA también puede derivar de una fosforilación oxidativa defectuosa, como se evidenció en los estudios de líquido céfalo-raquídeo (LCR) en ratones transgénicos y en pacientes, en los que las ROS producidas a partir de la fosforilación oxidativa defectuosa fueron encontradas en alta concentración (114,116–118). Además, estos estudios correlacionan el aumento de ROS con la disfunción mitocondrial y proporcionan un claro ejemplo de cómo los diferentes mecanismos patogénicos de la ELA pueden estar interrelacionados.

Los agregados de proteínas constituyen otra característica patológica relevante de muchas enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la ELA (119,120). Estos agregados derivan de la acumulación de proteínas mal plegadas, las cuales oligomerizan y se agregan, eventualmente adquiriendo propiedades tóxicas (121). Una corriente de investigación importante en el campo de la ELA, se ha dedicado a estudiar el mal plegamiento de la SOD1 y sus agregados en el tejido. Varios autores han evidenciado un gran número de inclusiones ricas en proteínas

SOD1 normal y mutada en tejido cerebral y espinal post-mortem de pacientes con ELA familiar y esporádica (122,123) así como en ratones transgénicos SOD1 mutantes (124). Para determinar la preponderancia de los agregados de SOD1 mal plegada en el comienzo y la progresión de la enfermedad, varios autores realizaron experimentos en donde la SOD1 mal plegada (humana y murina) fue inoculada en la médula espinal, el cerebro o la vía motora periférica de ratones SOD1 transgénicos (125,126), demostrando que la inoculación exógena de proteína SOD1 mal plegada es suficiente para inducir parálisis muscular de forma prematura, acelerando significativamente el comienzo de la enfermedad. Estos resultados apoyan la teoría de que la aparición de agregados proteicos como la SOD1 mal plegada y su capacidad de “contagio” de tipo priónico, podrían ser un desencadenante en el comienzo de la ELA (127).

Además de las especies agregadas de SOD1, otras proteínas relevantes en la patogenia de la enfermedad, por su capacidad para acumularse de forma agregada en el tejido, han sido estudiadas en la ELA, como TDP-43 o FUS (128–130). TDP-43, una proteína de unión a ARN, normalmente se encuentra en el núcleo, donde regula la transcripción, el empalme y el transporte de ARNm. Esta proteína es necesaria para la prevención de daños en el ADN (131–133). Se han encontrado inclusiones aberrantes de la proteína TDP-43 en el 80 % de los casos de ELA y parece que la acumulación citoplasmática se debe a mutaciones en la región 3' UTR del gen, lo que conduce a la sobreexpresión y la agregación citoplasmática de la proteína (74,134). Al igual que TDP-43, FUS es una proteína nuclear, y la acumulación de TDP-43 y FUS en el citoplasma probablemente se deba a mutaciones que impiden su transporte al núcleo (135).

3. Neuroinflamación y microambiente celular neurodegenerativo en la ELA

Como se mencionó anteriormente, un fenómeno patológico común que tienen las enfermedades neurodegenerativas es la neuroinflamación crónica (6). El término neuroinflamación hace referencia a la respuesta inflamatoria que se desencadena frente a estímulos nocivos, traumas, infecciones o neurodegeneración. La neuroinflamación se caracteriza por cambios fenotípicos y transcripcionales, principalmente de las células gliales, cambios en la actividad neuronal y sináptica,

aumento de la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica/espinal y el reclutamiento de células inmunológicas desde la periferia (136,137).

Estudios pioneros en ratones quiméricos, mostraron que la expresión del gen mutante SOD1 limitado a motoneuronas no es suficiente para causar enfermedad en el modelo de ratón transgénico de ELA (138), lo que llevó a sugerir que su degeneración requiere la participación de células no-neuronales. Las motoneuronas que no expresan el gen humano mutante de la SOD1, pero que están rodeadas por células gliales que sí lo expresan desarrollan el fenotipo patológico (139), mientras que las motoneuronas que expresan el gen humano mutante de la SOD1 rodeadas por glía que no lo expresan muestran un fenotipo saludable (138). Además, el reemplazo de células gliales que expresan la SOD1 humana mutante por glia normal retrasa la enfermedad y prolonga la supervivencia de ratones con ELA (140). Por lo tanto, la glía y las neuronas dañadas actúan de manera coordinada contribuyendo al proceso de neurodegeneración y a la progresión de la enfermedad (82). Estos hallazgos disruptivos apoyaron el concepto de mecanismos patogénicos no-autónomos celulares en la ELA. De la misma manera, demostraron cómo el microambiente celular que rodea a las motoneuronas puede ser protector o, por el contrario, detrimental promoviendo el desarrollo de la neurodegeneración.

Para poder comprender por qué degeneran y mueren las motoneuronas en la ELA, fue necesario profundizar en el conocimiento de las células del microambiente que las rodea y les da soporte, principalmente las células gliales. En los últimos años se ha mostrado evidencia de que las células gliales dialogan permanentemente entre sí, así como con otros tipos celulares, y en particular, durante la neurodegeneración, con células inmunes derivadas del linaje hematopoyético (10,136,141). Este diálogo intercelular es fundamental para la constitución de la neuroinflamación crónica. Este componente neuroinflamatorio comienza a formarse en etapas tempranas, incluso antes de que los síntomas se hagan presentes (142–145), y está caracterizado por activación de la microglía y astrocitos, infiltración de células inmunológicas y producción de citoquinas proinflamatorias. La progresión ineluctable y devastadora que caracteriza a la ELA puede deberse, en gran parte, a la constitución de un microambiente celular neurodegenerativo, que comienza formándose en secciones puntuales del SNC y

progresa hacia segmentos o compartimentos contiguos (146–148). Este concepto del microambiente celular neurodegenerativo puede ser comparable con el microambiente celular de tumores malignos y otras enfermedades inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoidea o incluso la obesidad, en donde el microambiente celular inflamatorio promueve el crecimiento, mantenimiento o invasividad de células tumorales, inflamatorias, etc (149–151). De la misma manera, en la neurodegeneración se comprueba una remodelación estructural del entorno celular, notablemente de las células gliales, precursores gliales, células inmunes infiltrantes y de los vasos sanguíneos, lo que resulta en el daño neuronal (Fig. 2) (21,40).

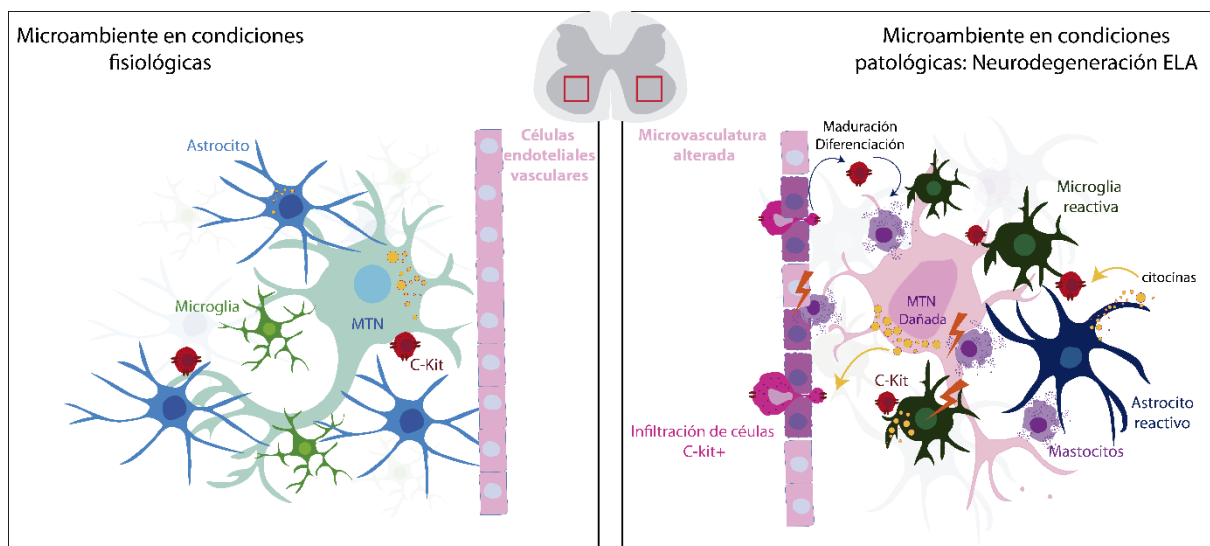


Figura 2. Microambiente celular neurodegenerativo en la ELA. En condiciones de daño de la motoneurona en la ELA, se observa el cambio en la morfología de astrocitos y microglías, así como un aumento en la proliferación de células gliales. Por otra parte, se ha descrito un aumento de la infiltración de células inmunes de origen sanguíneo (en este caso se muestran precursores de mastocitos que expresan el receptor c-Kit) y defectos en la permeabilidad celular en la microvasculatura. (Modificado de Kovacs y colaboradores, 2021 (40)).

3.1 Microglía

La microglía puede ser considerada como el “macrófago” del SNC. Se origina a partir de progenitores hematopoyéticos que ingresan al SNC durante el desarrollo (152,153). En condiciones normales las microglías aparecen como células pequeñas con proceso finos, ramificados y dinámicos, los cuales sensan el microambiente (154). En respuesta al daño, cambian su fenotipo y presentan

diversos estados de activación (154). Típicamente, la activación se caracteriza por morfología hipertrófica con retracción parcial de los procesos, y por la proliferación y transformación en células fagocíticas (155). Cuando la activación microglial ocurre de forma crónica, adquieren la capacidad de liberar citoquinas y factores pro-inflamatorios/os, como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), IL-6 e IL-1 β , especies reactivas de oxígeno (ROS) y excitotoxinas, incluido el glutamato (Fig. 3) (156–159).

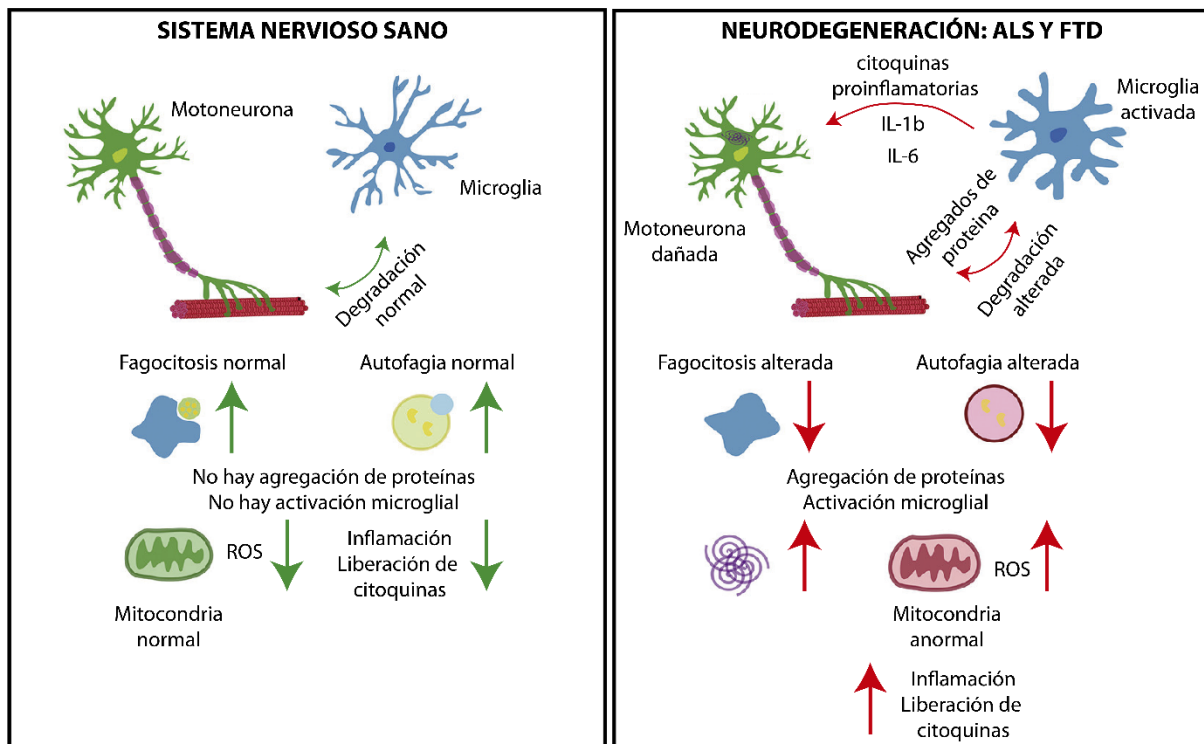


Figura 3. La microglía en la ELA. Como se puede observar en el panel de la derecha, comparado a condiciones fisiológicas normales (panel de la izquierda), en condiciones de neurodegeneración la microglía se encuentra activada, secretando citoquinas proinflamatorias, causando neuroinflamación y daño neuronal. A su vez la fagocitosis y la autofagia se encuentran alteradas, conduciendo al agregado de proteínas, disfunción mitocondrial, y al aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno, adquiriendo un fenotipo neurotóxico (Modificado de Haukedal et al., 2019 (160)).

El estado activado de la microglía ha sido ampliamente reportado en la ELA. Se han descrito cúmulos de microglías proliferantes en estado fagocítico adyacentes a las motoneuronas, tanto en la etapa asintomática como terminal de la ELA (29,161). En el 2006, utilizando un ratón transgénico hSOD1^{G37R}, Boillée y colaboradores demostraron que la microglía juega un rol preponderante en el microambiente celular degenerativo que rodea a las motoneuronas durante la

progresión de la ELA (162). Los ratones que tienen menores niveles de expresión de la SOD1 mutada en la microglía, presentan una progresión de la enfermedad más lenta (162). En la misma línea, otros autores han demostrado que la microgliosis contribuye de forma significativa a la muerte de las motoneuronas y la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, utilizando una aproximación farmacológica, Kriz y colaboradores administraron minociclina, un antibiótico capaz de inhibir la microgliosis y la neuroinflamación central, en la dieta de ratones hSOD1^{G93A} (163). Los ratones hSOD1^{G93A} tratados con el antibiótico, presentaron un retraso en el comienzo de los síntomas, y un enlentecimiento significativo de la progresión de la enfermedad (163). En otro estudio, Beers y colaboradores, observaron que el trasplante de microglía “*wild-type*” en ratones hSOD1^{G93A} logra modificar el curso de la enfermedad, disminuyendo la gliosis y enlenteciendo su progresión (164). Además, se demostró que la microglía que sobreexpresa las mutaciones de SOD1 produce y libera ROS y factores nitro-oxidativos con actividad neurotóxica para motoneuronas (164–166). Estos experimentos sugieren que la microglía tiene la potencialidad de ser neurotóxica en el ambiente celular que rodea a las motoneuronas, y que por lo tanto representa un blanco celular de relevancia para el desarrollo de estrategias terapéuticas. En la Tabla 1 se presenta un resumen del rol patogénico de la microglía en la ELA (20).

Los estudios sobre la conformación del microambiente celular neurodegenerativo, llevó a nuestro grupo a preguntarse si: *¿Existe un fenotipo glial aberrante que pueda provocar neurotoxicidad sobre las motoneuronas en el contexto de la ELA?* En 2011, Díaz-Amarilla y colaboradores (25), y más tarde Trías y colaboradores (167), aislaron y caracterizaron una subpoblación de células gliales, que denominaron “células gliales aberrantes”. Estas células fueron aisladas a partir de la médula espinal de ratas hSOD1^{G93A} en la fase sintomática de la enfermedad (25), y poseen muchas características de células microgliales, incluidos varios marcadores típicos de este linaje glial (167). Además, poseen una alta tasa proliferativa y son capaces de inducir la muerte de motoneuronas aisladas en cultivo (25). Incluso, el medio condicionado producido por estas células es altamente tóxico para las motoneuronas embrionarias en cultivo (25).

Para comprender si estas células aberrantes podían ser causantes de daño a motoneuronas *in vivo*, durante lo que constituyó mi trabajo de maestría, realizamos el trasplante de las células gliales aberrantes en la médula espinal ventral de ratas no transgénicas (168). Estos estudios mostraron que el trasplante de microglía con fenotipo aberrante induce una respuesta neuroinflamatoria a lo largo del neuroeje y daño a motoneuronas (168). Una semana luego de realizado el trasplante, las células microgliales trasplantadas producían una marcada microgliosis y astrogliosis, un efecto potenciador de la neuroinflamación que no se observó en los animales en donde se inyectó microglía no transgénica (168). A su vez, los animales que recibieron el trasplante de la glia aberrante mostraron una marcada microgliosis que se extendía bilateralmente hasta los segmentos cervicales más distales en la médula. Las motoneuronas lumbares cercanas a los sitios del trasplante mostraron agregados de ubiquitina y se encontraban rodeadas de células gliales activadas (168). Estos resultados mostraron por primera vez que las células gliales aberrantes tienen la potencialidad de inducir y propagar la neuroinflamación y ser tóxicas para motoneuronas cuando son trasplantadas en la médula espinal de ratas no transgénicas. La microglía aberrante no sólo indujo reactividad glial en sitios cercanos al que fueron trasplantadas, sino que fueron capaces de inducir una gliosis significativa a lo largo del neuroeje.

Estos descubrimientos sobre el rol neurotóxico de la microglía sobre las motoneuronas y sobre todo la identificación de la microglía aberrante con alta capacidad neurotóxica y pro-inflamatoria, estableció nuevas oportunidades en lo que refiere a las estrategias terapéuticas dirigidas a bloquear o inhibir estos fenotipos aberrantes e intentar enlentecer la muerte de las motoneuronas y la progresión de la enfermedad. En este sentido, uno de los principales receptores que regula la maduración y activación de la microglía, es el receptor 1 del factor estimulante de colonias (CSF-1R) (169). Este receptor pertenece a la familia de los receptores de tirosin-quinasa de Clase III, entre los que se encuentran además el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R), el receptor de tirosin-quinasa de tipo fms (CD135 o FLT-3), y el receptor del factor de crecimiento de células madre/mastocitos (CD117 o c-Kit), sobre el cual profundizaremos más adelante (170,171). Trías y colaboradores realizaron estudios en donde utilizaron un inhibidor de receptores de tirosin-quinasa de Clase III, el masitinib, para tratar ratas

hSOD1^{G93A} durante la fase sintomática de la enfermedad. El tratamiento diario con masitinib es capaz de inhibir la microgliosis masiva, enlenteciendo la emergencia de las células gliales aberrantes, protegiendo a las motoneuronas y enlenteciendo la progresión de la ELA (14). De manera similar, los trabajos realizados por Martinez-Muriana y colaboradores, también mostraron que el bloqueo de CSF1-R en un modelo murino de ELA, fue capaz de enlentecer la progresión de la enfermedad al reducir la microgliosis y la infiltración de macrófagos en el sistema nervioso periférico (172). Estos estudios demostraron que la inhibición de la glía aberrante en modelos murinos de ELA es suficiente para modificar el curso de la enfermedad, y posicionó a esta familia de fármacos como una novedosa estrategia terapéutica para combatir diversas enfermedades neurodegenerativas.

Además de su rol como integrante del microambiente celular neurodegenerativo y su contribución significativa a la neuroinflamación, la microglía puede jugar un papel central induciendo la muerte de las motoneuronas de forma directa. Los estudios realizados por Zhao y colaboradores mostraron que los radicales libres liberados por microglía activada pueden inducir daño a motoneuronas en cultivo al aumentar la susceptibilidad del receptor AMPA/kainato a los efectos excitotóxicos del glutamato (165). Posteriormente, Liao y colaboradores reportaron que la microglía aislada de ratones transgénicos hSOD1^{G93A} al inicio de la enfermedad, tiene un fenotipo protector de las motoneuronas, mientras que la microglía aislada en la etapa terminal de la enfermedad posee un fenotipo neurotóxico, apoyando la hipótesis de que la microglía sufre un cambio fenotípico y se vuelve tóxica para las motoneuronas (173). En concordancia con esta hipótesis, diversos autores han arrojado evidencia de que la microglía es capaz de inducir activamente la muerte de motoneuronas en el contexto de la ELA, adoptando fenotipos neurotóxicos y liberando citoquinas proinflamatorias (159,174–177). Además, la microglía puede contribuir a la característica progresiva e invasiva de la patología, estimulando la neuroinflamación a lo largo del neuroeje gracias a la batería de citoquinas pro-inflamatorias y factores neurotóxicos que es capaz de liberar en condiciones de degeneración.

Un mecanismo molecular a través del cual la microglía ejerce su efecto tóxico para motoneuronas es la activación de la vía NF- κ B (178). Como se expuso anteriormente, esta vía proinflamatoria se encuentra estrechamente asociada a la constitución de la neuroinflamación. Varios receptores pueden causar la activación de NF- κ B a través de la fosforilación de la subunidad p65, resultando en la translocación nuclear de NF- κ B y el aumento de factores proinflamatorios (179–182). En el trabajo llevado adelante por Frakes y colaboradores (178), se observó que la vía NF- κ B se activa durante la progresión de la patología en el modelo de ratón hSOD1^{G93A}, y la delección genética de esta vía específicamente en la microglía, aumenta significativamente la sobrevivencia de los ratones. Además, la inhibición de NF- κ B en microglía fue suficiente para prevenir la muerte de motoneuronas en co-cultivo, al impedir su activación proinflamatoria (178). Otros estudios han demostrado que TDP-43 interactúa con NF- κ B y genera su activación (183), y la inhibición de NF- κ B es suficiente para mejorar la supervivencia de las motoneuronas en un modelo de ratón que sobreexpresa TDP-43 (183). A su vez, Zhao y colaboradores mostraron que la incubación de microglía con TDP-43 exógeno es suficiente para activar la vía NF- κ B y provocar la muerte de motoneuronas en cultivo (184).

Tabla 1 Rol de la microglía en la ELA. Modificado de Clarke 2020

Gen/Modelo	Fenotipo microglial	Referencias
SOD 1		
SOD1 ^{G93A}	Aumento de la inmunorreactividad de MAC1/CD11b en la sustancia gris y blanca de la médula espinal en estadio sintomático	(185,186)
	Aumento de la proliferación de células CD11b ⁺ CD45 ^{low}	(28)
	Formación de cúmulos o racimos en estado fagocítico, rodeando a motoneuronas en degeneración	(29,161)
	La administración de minociclina, un antibiótico capaz de inhibir la microgliosis, retrasa el comienzo de los síntomas y la progresión de la enfermedad	(163)
	El inhibidor de CSF1R, masitinib, reduce la neuroinflamación y aumenta la sobrevivencia en un modelo hereditario de ELA	(14)
	El inhibidor de CSF1R, GW2580, reduce la proliferación de microglía, previene en parte la muerte de motoneuronas y enlentece la progresión de la enfermedad	(172)
	La eliminación de una parte de la población de microglía CD11b proliferante no tiene efecto sobre la degeneración de motoneuronas.	(187)
	El trasplante de médula ósea no transgénica en ratones mSOD1/PU.1 KO mejora parcialmente la pérdida de motoneuronas y enlentece la progresión de la enfermedad	(164)

	Estudios de transcriptómica espacial revelaron cambios en la microglía antes que en las motoneuronas en el asta ventral de la médula espinal.	(188)
	Cambios en los niveles de expresión de Iba1 previo al comienzo de síntomas	(189)
	Microglía con fenotipo aberrante asociada a la progresión de la enfermedad, induce muerte de motoneuronas en cultivo	(25,167)
	La microglía de ratones mSOD1 secretan mas ROS y NO que la microglía no transgénica, y producen la muerte de motoneuronas en co-cultivo.	(164–166)
	La microglía adulta, pero no la neonatal, matan motoneuronas en co-cultivo por un mecanismo dependiente de la vía NF-κB	(178)
SOD1 ^{G93A} , SOD1 ^{A4V}	Los agregados extracelulares de mSOD1 aumentan la producción de TNF-α en microglía primaria	(190)
SOD1 ^{G93A} , SOD1 ^{G85R}	Los agregados extracelulares de mSOD1 alteran la morfología de la microglía primaria, estimulan la liberación de superóxido y citoquinas e inducen neurotoxicidad	(191)
SOD1 ^{G37R}	La remoción de la mSOD1 de células CD11b prolongan la duración de la fase sintomática de la enfermedad	(82)
TARDBP		
TDP-43WT, TDP-43M337V, TDP-43A315T	Tanto la TDP-43 mutada como la normal estimulan la producción de citocinas en microglía.	(184)
TDP-43WT, TDP-43G348C, TDP-43A315T	Los ratones que sobreexpresan tanto la TDP-43 mutada como la normal muestran un aumento en la inmunorreactividad de Iba1 en el estadio sintomático de la enfermedad	(183)
FUS		
FUSWT	El medio condicionado de astrocitos de células FUSWT tratadas exacerba la inducción proinflamatoria de la microglía primaria.	(192)
	Los ratones que sobreexpresan FUS muestran un aumento en la inmunorreactividad de CD68 en la médula espinal	(193)
DFUS(1-359)	La secuenciación de ARN en ratones que sobreexpresan la FUS truncada sugiere un fenotipo neuroprotector en la fase presintomática y un fenotipo proinflamatorio en la fase sintomática en la microglía	(194)
C9orf72		
C9orf72 ^{-/-}	Los ratones KO para C9orf72 muestran un fenotipo inmune robusto que incluye lisosomas microgliales de gran tamaño y aumento en la expresión de citocinas	(195)
C9450C C9orf72 ^{-/-}	Aumento en la inmunorreactividad de Iba1 en ratones que expresan repetidos de C9orf72 y carecen de C9orf72 endógena	(196)

3.2 Astrocitos

Los astrocitos son células gliales altamente especializadas que cumplen funciones claves en el funcionamiento neuronal y en la homeostasis del SNC (197). Solían ser consideradas como células estáticas, simplemente apoyando la función y supervivencia neuronal, participando en la conformación de la barrera hematoencefálica y, en caso de lesión, en la formación de cicatrices gliales (197,198). Sin

embargo, investigaciones más recientes han demostrado que los astrocitos llevan a cabo funciones muy especializadas, incluyendo la formación y eficiencia sináptica (199), control vascular del flujo sanguíneo y de la circulación gliofática (200,201).

Los astrocitos forman una red sincicial altamente interconectada a través de uniones GAP o hemicanales, formados por un conjunto de proteínas llamadas conexinas, principalmente Cx43, que forman el poro para una unión entre el citoplasma de dos células adyacentes (202,203). Cuando no se oponen a un hemicanal contiguo, las conexinas pueden actuar como hemicanales para controlar la liberación de moléculas pequeñas como ATP y glutamato en el espacio extracelular, siendo este un mecanismo relevante de comunicación intercelular (204–206). De esta forma, los astrocitos participan activamente en la modulación de la excitabilidad neuronal y la neurotransmisión, ya que se encargan de controlar los niveles extracelulares de iones, del transporte de glucosa desde los vasos sanguíneos, así como de liberar y recaptar neurotransmisores (197,199,207). Además, juegan un papel importante en el metabolismo del SNC, aportando nutrientes claves para las neuronas, incluyendo una variedad de factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (208,209), el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) (210), y el factor de crecimiento nervioso (NGF) (211,212). Estos factores juegan un papel importante en el desarrollo y la plasticidad del SNC, regulando el crecimiento de los axones y dendritas, y modificando en muchos casos la plasticidad neuronal (213).

En las enfermedades neurodegenerativas, los astrocitos sufren cambios fenotípicos significativos, se vuelven disfuncionales y pueden provocar activamente la degeneración y muerte de neuronas (214–217) (Fig. 4). Los astrocitos responden a numerosas formas de daño del SNC mediante un proceso referido como astrogliosis reactiva o astrocitosis, caracterizada por aumento de la proliferación y la aparición de astrocitos “reactivos” (218). Morfológicamente, se caracterizan por ser hipertróficos, con procesos cortos y gruesos y una redistribución de la expresión de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (219). Los astrocitos reactivos sufren cambios en la respiración mitocondrial, producción de radicales libres y son capaces de liberar factores de crecimiento y citoquinas pro- y anti-inflamatorias (220–222). La activación de los astrocitos en la ELA se asocia con una mayor proliferación,

disminución en la expresión de los transportadores de glutamato (52,102,103), niveles elevados de NADPH oxidasa, especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y aumento de la producción de citocinas/mediadores pro-inflamatorios, como el interferón- γ y el TGF- β (223–225). Además, los astrocitos tienden a aumentar la expresión de Cx43, a disminuir las uniones GAP y a aumentar los hemicanales, contribuyendo de esta manera a la toxicidad de las motoneuronas (226).

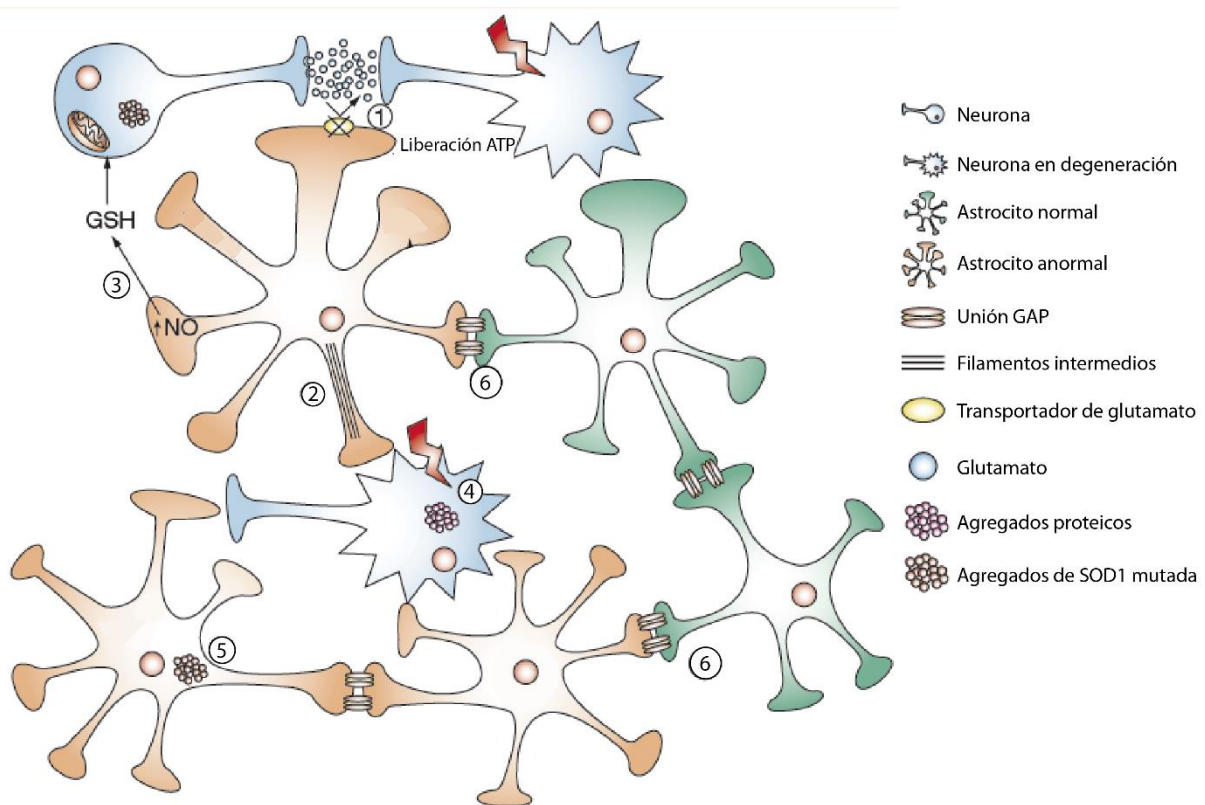


Figura 4. Disfunción de los astrocitos en la neurodegeneración. 1. La inhibición de los transportadores de glutamato, resulta en un aumento de la excitotoxicidad mediada por glutamato. 2. El aumento en la expresión de GFAP es una característica patológica consistente con la neurodegeneración. 3. El NO estimula la liberación de glutatión de los astrocitos a las neuronas, limitando el daño oxidativo neuronal. 4. Las neuronas rodeadas por astrocitos mutantes desarrollan agregados proteicos y patología axonal, y son más susceptibles a la muerte celular. 5. También se observan agregados de la SOD1 mutada en astrocitos. 6. La comunicación entre los astrocitos dañados puede afectar la biología y función de los astrocitos normales que los rodean, a través de los hemicanales o de mediadores solubles. (Modificado de Maragakis y Rothstein, 2006 (214)).

Nuestro grupo de investigación ha realizado contribuciones significativas a la comprensión del rol de los astrocitos en la ELA, principalmente dilucidando diversas vías moleculares a través de las cuales estas células gliales pueden modificar su fenotipo y volverse tóxicas para las motoneuronas (24,94,227–229). En el 2002, Cassina y colaboradores, y Pehar y colaboradores, mostraron que los astrocitos espinales en cultivo responden a la exposición a peroxinitrito, un compuesto nitro-oxidativo, con cambios fenotípicos permanentes que incluyen expresión de iNOS y la acumulación de daño nitro-oxidativo (223). Al cultivar motoneuronas embrionarias sobre estos astrocitos activados, se produce una muerte significativa de las mismas. Este fenómeno de toxicidad es prevenido cuando se realizan los ensayos en condiciones de inhibición específica de la iNOS o “scavengers” de superóxido y peroxinitrito (230). Estos estudios estuvieron apoyados en evidencias previas, que habían dilucidado una correlación positiva entre el estrés oxidativo mediado por el óxido nítrico (NO) y su metabolito tóxico, el peroxinitrito, con la degeneración de las motoneuronas en la ELA (231,232). En 2005, Cassina, Pehar y colaboradores profundizaron el estudio de estas vías patogénicas celulares y moleculares e identificaron nuevos mecanismos de muerte por apoptosis en motoneuronas, inducido por la activación de astrocitos. Observaron que estas células gliales pueden sufrir un proceso de activación crónica cuando son expuestos al factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF1) (227), producido y liberado por las motoneuronas durante el proceso degenerativo, y que actúa sobre el receptor FGFR1 en los astrocitos, dando lugar a una activación glial significativa (227). Esta activación lleva a una liberación de NGF y produce la muerte de las motoneuronas a través del receptor p75, el cual es re-expresado por las motoneuronas durante el proceso neurodegenerativo (227).

Los astrocitos establecen interacciones bidireccionales con las microglías. Trabajos realizados por Alami y colaboradores mostraron que la activación de la vía proinflamatoria NF- κ B en los astrocitos promueve la proliferación de la microglía y la infiltración de leucocitos en el modelo de ratón hSOD1^{G93A} (233). Si bien esta respuesta confiere a la microglía de un fenotipo neuroprotector, se vuelve detrimental en la fase sintomática acelerando la progresión (233). Esto se corresponde con un cambio del fenotipo microglial, pasando de ser neuroprotector a

neurotóxico. La transformación fenotípica de las células gliales hacia un fenotipo neurotóxico está influenciada por su entorno. Existen evidencias de que la toxicidad de los astrocitos es independiente de mutaciones de la SOD1, lo que sugiere que el fenotipo astrocitario está asociado al entorno neurodegenerativo y no necesariamente a la expresión de una mutación deletérea (225,234). Un estudio liderado por Lidell y colaboradores ha mostrado la existencia de un fenotipo astrocitario neurotóxico, denominado A1, que es inducido como consecuencia del microambiente neuroinflamatorio en el que se encuentran las células astrocitarias (235). El fenotipo A1 es inducido por la secreción de las citoquinas IL-1 α , TNF y C1q por parte de la microglía activada, y estas citoquinas en conjunto son suficientes para inducir un fenotipo astrocitario activado citotóxico (235). Los astrocitos con fenotipo A1 pierden la habilidad de promover la supervivencia de la motoneurona, el crecimiento, la sinaptogénesis y la fagocitosis, e inducen la muerte de neuronas y oligodendrocitos (235). El fenotipo A1, descrito originalmente en el contexto de la ELA, ha sido descrito durante la progresión de otras patologías neurodegenerativas (236–238), sugiriendo mecanismos fisiopatológicos comunes a este tipo de enfermedades.

Los astrocitos constituyen una pieza clave en la formación y mantenimiento de las barreras hemato-encefálica y hemato-espinal (239). Estas barreras son una interfaz estrictamente regulada en el SNC, que regulan el intercambio de moléculas dentro y fuera del SNC manteniendo así la homeostasis (240). Se componen principalmente de células endoteliales, pericitos y astrocitos que crean la unión neuro-vascular con las neuronas adyacentes. Los astrocitos secretan diversos factores que promueven la adecuada asociación entre las células de la barrera y la formación de uniones estrechas (241,242). En la fase sintomática de la ELA, ocurre una disrupción de dichas barreras, como consecuencia de la alteración morfológica y funcional de los astrocitos reactivos y las células endoteliales, lo que implica una pérdida de la permeabilidad selectiva de las barreras, permitiendo el pasaje de moléculas y células desde la periferia (243,244).

La evidencia sugiere que la emergencia de células gliales neurotóxicas aberrantes en la ELA se da como consecuencia del daño primario que padecen las motoneuronas, las cuales pueden producir y liberar al entorno diferentes moléculas

con capacidad inflamatoria que participan en la orquestación del microambiente celular neurodegenerativo, una respuesta neuronal primaria que se ve potenciada por la participación activa de las células gliales reactivas (24,245,246).

3.3 Células inmunitarias

Se reconoce que los pacientes con ELA tienen un aumento sistémico de marcadores inflamatorios (247,248), con una alteración en el número y distribución de células inmunes que incluyen monocitos, neutrófilos y linfocitos, entre otros (249,250). Si bien la penetración de células inmunes al SNC en condiciones no patológicas está limitada por la barrera hemato-encefálica y hemato-espinal, durante la progresión de la ELA, como se mencionaba anteriormente, dichas barreras se encuentran dañadas y se vuelven permeables (244,251). La evidencia muestra que las células provenientes del sistema inmune, como precursores de mastocitos, monocitos, células dendríticas, neutrófilos y linfocitos, son capaces de infiltrar el microambiente celular degenerativo de las motoneuronas, y participar activamente del proceso patogénico (40,252,253). En la Tabla 2 se muestra un resumen del rol patogénico que desempeñan algunos fenotipos inmunes en el contexto de la ELA.

Tabla 2. Células inmunes en la ELA

Célula	Gen/Modelo	Fenotipo	Referencias
Mastocitos	Pacientes		
		Aumento de IL-15 en suero y líquido cefalorraquídeo de pacientes con ELA	(254)
		Presencia de mastocitos en médula espinal, placas motoras, de pacientes con ELA, y no así en tejidos controles	(40,255–258);
	SOD1		
	SOD1 ^{G93A}	En el SNP los mastocitos interactúan con las terminales nerviosas motoras en degeneración y las placas motoras en el músculo esquelético de ratas hSOD1 ^{G93A}	(30,39)
		En el SNC los mastocitos se acumulan en el nicho vascular de la motoneurona en los modelos murinos de ELA	(40)
		La modulación farmacológica de los mastocitos en modelos murinos de ELA es capaz de reducir la denervación de las placas y los déficits motores	(30,39)
Monocitos	Pacientes		
		La activación de los monocitos se correlaciona con la progresión de la enfermedad. El perfil pro-inflamatorio de monocitos se observaba más exacerbado en pacientes de progresión rápida	(259–262)
	SOD1		

	SOD1 ^{G93A}	Monocitos con alta expresión de Ly6C (Ly6Chi) y CCR2, están polarizados hacia un fenotipo pro-inflamatorio (M1) e infiltra la médula espinal. Dicho pasaje se correlaciona con la pérdida significativa de motoneuronas	(263)
		El tratamiento con anticuerpos anti-Ly6C logra atenuar el perfil inflamatorio de los monocitos, reduciendo su reclutamiento hacia la médula espinal, así como la pérdida neuronal	(263)
Neutrófilos	Pacientes		
		Aumento en la proporción de neutrófilos/monocitos, de neutrófilos/linfocitos y en el número absoluto de neutrófilos circulantes se correlaciona con la rápida progresión de la enfermedad	(250,260,264)
		Infiltración de neutrófilos en músculo de pacientes	(30)
	SOD1		
	SOD1 ^{G93A}	En la fase sintomática hay una gran infiltración de estas células en la región que rodea los axones motores en el músculo EDL, en el nervio ciático, y en las raíces ventrales	(30)
Linfocitos	Pacientes		
		Presencia de linfocitos T colaboradores en el tracto corticoespinal en degeneración. Presencia de linfocitos T colaboradores y T citotóxicos en el asta ventral de la médula espinal	(265)
		Niveles significativamente más altos de linfocitos T CD8 citotóxicos y linfocitos NK circulantes en comparación con los controles	(266)
		Presentan linfocitos T reguladores (Treg) deficientes. La disfunción de los Treg se correlaciona directamente con la progresión y severidad de los síntomas	(267,268)
	SOD1		
	SOD1 ^{G93A}	Presencia de linfocitos T colaboradores en la médula espinal, íntimamente relacionadas con la microglía	(186)

3.3.1 Monocitos

Los monocitos se originan de células madre hematopoyéticas y circulan en la sangre entre 1-3 días, ingresando a distintos tejidos en donde se diferencian en células dendríticas mieloides o en macrófagos (269,270). Si bien en condiciones fisiológicas normales, el acceso al parénquima cerebral de monocitos/macrófagos es limitado, las evidencias muestran que los monocitos pueden infiltrar al SNC a través de la barrera hemato-encefálica y la barrera hemato-espinal (271,272). En los últimos años, muchos autores han profundizado en el rol de los monocitos en la patogenia de la ELA, y cómo su modulación farmacológica podría implicar novedosas estrategias terapéuticas para su tratamiento (259,262,273). Los estudios realizados por Butovsky y colaboradores demostraron la presencia de una población específica de monocitos, caracterizados por la alta expresión de Ly6C (Ly6C^{high}) y

del receptor de quimioquinas CCR2, que están polarizados hacia un fenotipo pro-inflamatorio (M1) e infiltran la médula espinal de los animales hSOD1^{G93A} (263). Dicha infiltración desde la sangre se correlaciona con la pérdida significativa de motoneuronas en la médula espinal. El tratamiento de ratones ELA con anticuerpos anti-Ly6C logró atenuar el perfil inflamatorio de los monocitos, reduciendo su reclutamiento hacia la médula espinal, así como la pérdida neuronal, prolongando la supervivencia (263). Por su parte, Zhao y colaboradores demostraron que en los pacientes con ELA, los monocitos presentan un perfil de expresión génica pro-inflamatorio en comparación con personas sanas, resaltando la expresión de IL-1 β , IL-8, FOSB, CXCL1 y CXCL2 entre otros (259). A su vez, Du y colaboradores, mostraron que los macrófagos diferenciados a partir de monocitos circulantes de pacientes con ELA producen más citocinas proinflamatorias, incluidas IL-6 y TNF- α , que los macrófagos derivados de donantes sanos (261). En suma, estos estudios sugieren que el reclutamiento de monocitos con perfil inflamatorio hacia los sitios de neurodegeneración de la médula espinal juega un papel significativo en la patogenia de la ELA.

3.3.2 Neutrófilos y Linfocitos

Los neutrófilos son leucocitos polimorfonucleares que se generan en la médula ósea a partir de precursores mieloides y constituyen la primera línea de defensa en el sistema inmune innato (274,275). Estas células tienen la habilidad de eliminar patógenos y de influir en la respuesta inmune a través de la secreción de gránulos formados durante su maduración (276,277) y de la formación de trampas extracelulares (276,278). Trabajos recientes han mostrado que los neutrófilos pueden ejercer efectos citotóxicos mediando el daño neuronal en patologías neurodegenerativas como la EA, la distrofia muscular de Duchenne o la Esclerosis Múltiple (279–282). En la ELA, se ha reportado un aumento en la proporción de neutrófilos/monocitos (250) y de neutrófilos/linfocitos (264) en sangre y en el número absoluto de neutrófilos circulantes en pacientes con ELA (260), los cuales se correlacionan significativamente con una progresión acelerada de la enfermedad. Trabajos realizados por nuestro grupo han reportado que estas células son capaces de infiltrar la vía motora periférica en degeneración, tanto en modelos murinos como en tejido post-mortem de pacientes (30).

Por su parte, Engelhardt y colaboradores reportaron la presencia de linfocitos T en la médula espinal de pacientes con ELA, describiendo la presencia de linfocitos T colaboradores en el tracto corticoespinal en degeneración, y de linfocitos T colaboradores y T citotóxicos en el asta ventral de la médula espinal (265). Estudios posteriores realizados en los modelos murinos de la enfermedad, también reportaron la presencia de estas células en la médula espinal (186), sugiriendo su contribución a la neuroinflamación crónica y el daño neuronal. Estudios más recientes han mostrado que los pacientes con ELA presentan niveles significativamente más altos de linfocitos T CD8 citotóxicos y linfocitos NK en comparación con los controles analizados (266). La eliminación de los linfocitos T CD8+ en el modelo de ratón hSOD1^{G93A} provoca un aumento significativo del número de motoneuronas en la médula espinal (253). A su vez, se ha reportado que durante el curso de la enfermedad, los pacientes con ELA presentan linfocitos T reguladores (Treg) deficientes, una alteración que se correlaciona directamente con la progresión y severidad de los síntomas (267,268). Un ensayo clínico Fase I demostró la seguridad y el beneficio potencial de las infusiones de Treg autólogas expandidas (283).

3.3.3 Mastocitos

Recientemente, se ha puesto especial énfasis en el papel que pueden desempeñar los mastocitos durante proceso degenerativo en la ELA. Los mastocitos representan una parte importante en la constitución de la inflamación crónica en el SNC, y su comunicación con las células gliales ha sido previamente estudiada (284–290). Su diferenciación comienza en la médula ósea bajo la influencia del ligando c-Kit (SCF, factor de células madre, del inglés “*stem cell factor*”) y la interleuquina-3 (IL-3) (291,292). Los progenitores inmaduros son liberados al sistema circulatorio para luego residir en las diferentes áreas vascularizadas del organismo. La diferenciación final ocurre en el lugar de residencia, dependiendo de un conjunto de factores de crecimiento y diferenciación (293). En el SNC pueden ser encontrados en las meninges, plexos coroideos, bulbo olfatorio, mesencéfalo y el parénquima de la región tálamo-hipotálamo (294). Los mastocitos funcionan como centinelas en el tejido, y se vuelven activas con la exposición a una amplia gama de estímulos, desde alérgenos y antígenos, hasta neuropéptidos, traumas y diversos fármacos (295–297). Una vez activados, son capaces de orquestar una respuesta inflamatoria

al liberar gránulos que contienen citoquinas, aminas biógenas, proteoglicanos, proteasas, leucotrienos y enzimas que pueden aumentar la permeabilidad vascular en los sitios de inflamación y modular la respuesta neuroinmune (298–300). Los mastocitos activados pueden provocar, directa o indirectamente, desmielinización e inducir apoptosis de los oligodendrocitos (301–303). También pueden liberar vesículas, trampas extracelulares y formar nanotubos (304,305) que permiten interacciones con células y estructuras vecinas, incluidos vasos sanguíneos y fibras nerviosas (300). Además, pueden actuar como células fagocíticas y presentadoras de antígenos, modulando la respuesta adaptativa del sistema inmune, liberando sustancias quimioatrayentes para reclutar eosinófilos y monocitos (306,307). Algunas patologías del sistema nervioso, como la esclerosis múltiple, están acompañadas por un aumento significativo del número de mastocitos en los sitios de lesión (308)

Uno de los primeros hallazgos de que los mastocitos podrían estar involucrados en la patogenia de la ELA, fueron aportados por Graves y colaboradores, que observaron la infiltración de mastocitos al parénquima de la médula espinal en degeneración en pacientes con ELA, acompañados de linfocitos y macrófagos, tanto en la sustancia gris como a lo largo de los tractos corticoespinales (255). Los mastocitos caracterizados por la expresión de Cox2, Triptasa, IgE e IL4, fueron observados en pequeños grupos o de manera aislada en la médula espinal de los pacientes, pero no en el tejido post-mortem de donantes sanos (255). De igual forma, Fiala y colaboradores observaron la presencia de mastocitos caracterizados por la expresión de IL17A, en la médula espinal post-mortem de 8 pacientes con ELA pero no en los controles analizados (256).

La infiltración de mastocitos al parénquima de la médula espinal podría producirse gracias a la mayor permeabilidad que presenta la barrera hemato-espinal durante la fase sintomática de la ELA, descrita anteriormente (243,244). Incluso varios autores han mostrado que los mastocitos pueden desempeñar un rol activo en la alteración de la integridad de las barreras, ya que son células capaces de producir y liberar factores que promueven el daño en las células endoteliales (309–311).

Estudios realizados recientemente por nuestro grupo, demostraron que los precursores de mastocitos infiltran desde la periferia el microambiente celular que rodea a las motoneuronas en degeneración en modelos murinos de ELA (40). Kovacs y colaboradores realizaron experimentos en ratones para demostrar que la infiltración de mastocitos se asocia con la degeneración de las motoneuronas espinales, y que su modulación farmacológica es suficiente para disminuir de manera significativa el daño neuronal, así como la permeabilidad de las barreras y la neuroinflamación (40). Se observaron mastocitos degranulantes en el nicho que rodea a las motoneuronas, en estrecho vínculo con las células gliales, principalmente astrocitos, los cuales, en condiciones de inflamación expresan “*stem cell factor*” (SCF), el principal ligando del receptor c-Kit, clave en el reclutamiento de los mastocitos a los sitios de lesión (40). A su vez, la administración sistémica de precursores de mastocitos en ratones hSOD1^{G93A} se asocia con una mayor infiltración de estas células al parénquima de la médula espinal, así como con una mayor permeabilidad de la barrera hemato-espinal (40). Para comprobar si la inhibición farmacológica de los mastocitos repercutía en una disminución del daño espinal, se trató un grupo de ratones hSOD1^{G93A} con masitinib, un inhibidor de receptores de tirosin-quinasa, que inhibe muy fuertemente al receptor c-Kit (40). En los animales tratados con masitinib, se observó una disminución de la infiltración de mastocitos en la médula espinal, así como una disminución de la permeabilidad de la barrera (40). Estudios previos habían demostrado que los tratamientos con masitinib en los modelos murinos de ELA, disminuyen la neuroinflamación asociada al daño neuronal, previenen la muerte de motoneuronas y enlentecen de manera significativa la progresión de la enfermedad (14,30,39).

Lo anteriormente expuesto muestra que las células del sistema inmune tienen un rol fundamental en el daño y progresión de la ELA, contribuyendo de manera significativa al mantenimiento de la neuroinflamación. Estas células no solo se infiltran en el SNC, sino que también infiltran el SNP en donde contribuyen a la degeneración de raíces, nervio y músculo.

4. Componente degenerativo en la vía motora periférica en la ELA y el papel de la neuroinflamación

Históricamente, varias líneas de investigación han considerado a la ELA como una axonopatía distal (312,313). Esta consideración estuvo parcialmente fundada en la observación de que tanto en los modelos murinos como en los pacientes, en algunos casos, la degeneración que ocurre en la vía motora periférica precede al daño que se observa en los cuerpos de las motoneuronas en la médula espinal (313). Uno de los estudios pioneros en este sentido, fue llevado a cabo por Kennel y colaboradores, quienes observaron que en los ratones hSOD1^{G93A}, la pérdida de función en las placas motoras en las uniones neuromusculares comienza varias semanas antes de que los síntomas clínicos se manifiesten y que ocurra una pérdida significativa de motoneuronas en el asta ventral de la médula espinal (314). Los autores observaron que la pérdida de función e integridad de las uniones neuromusculares en los modelos animales no es causa de la degeneración neuronal a nivel central, sino que es un fenómeno de comienzo distal, en donde se altera la integridad axonal y produciéndose una denervación prematura del músculo esquelético. Posteriormente, utilizando diferentes modelos murinos, Frey y colaboradores aportaron evidencia de una pérdida selectiva de conexiones sinápticas neuromusculares antes del comienzo de los síntomas motores (315). En particular, las fibras musculares que presentan mayor denervación son las fibras de contracción rápida, mientras que las fibras de contracción lenta, no lo hacen hasta estadios avanzados de la enfermedad (315). Otro de los estudios que apoyó fuertemente esta hipótesis fue el llevado adelante por Fischer y colaboradores, quienes estudiaron un paciente con parálisis muscular progresiva recién diagnosticado con ELA, pero que falleció repentinamente por otra causa. Los autores observaron, en el tejido post-mortem del paciente, que si bien no había una degeneración evidente de las motoneuronas de la médula espinal, existían signos de denervación y reinervación de las placas motoras en el músculo esquelético, sugiriendo un comienzo distal de la neurodegeneración (313). Otros estudios sugieren que un transporte axonal deficiente a lo largo de la vía motora periférica, en etapas tempranas de la vida, podría ser otra de las causas que lleve a la degeneración axonal paulatina en la ELA. Es así que Williamson y Cleveland observaron que el transporte de ciertas proteínas se ve significativamente enlentecido, incluso meses antes de que la patología pueda ser detectada

clínicamente (316). En este mismo sentido, otros autores han contribuido con observaciones similares, sugiriendo que el transporte defectuoso podría generar la agregación aberrante de proteínas a lo largo de la vía motora, induciendo procesos neurotóxicos que contribuyan a una degeneración temprana de los axones motores (317). El transporte axonal de mitocondrias a lo largo de la vía motora es otro proceso que se ve afectado en los modelos murinos de ELA, contribuyendo a la neurodegeneración distal (96). Estos resultados sugieren que los mecanismos de degeneración retrógrada, como consecuencia de la degeneración axonal temprana en la ELA, podrían explicar, en parte, la afectación de los somas de motoneuronas y el comienzo del proceso neurodegenerativo progresivo (318).

La degeneración axonal en la ELA se acompaña de una respuesta inflamatoria a lo largo de la vía motora periférica (Fig. 5). Los axones motores en vías de degeneración sufren un proceso de desmielinización por degradación de las vainas de mielina producidas por las células de Schwann, seguido de una gran activación y proliferación de estas células gliales periféricas, lo que se asocia a una gran infiltración de células hematopoyéticas proinflamatorias y la activación del complemento (28).

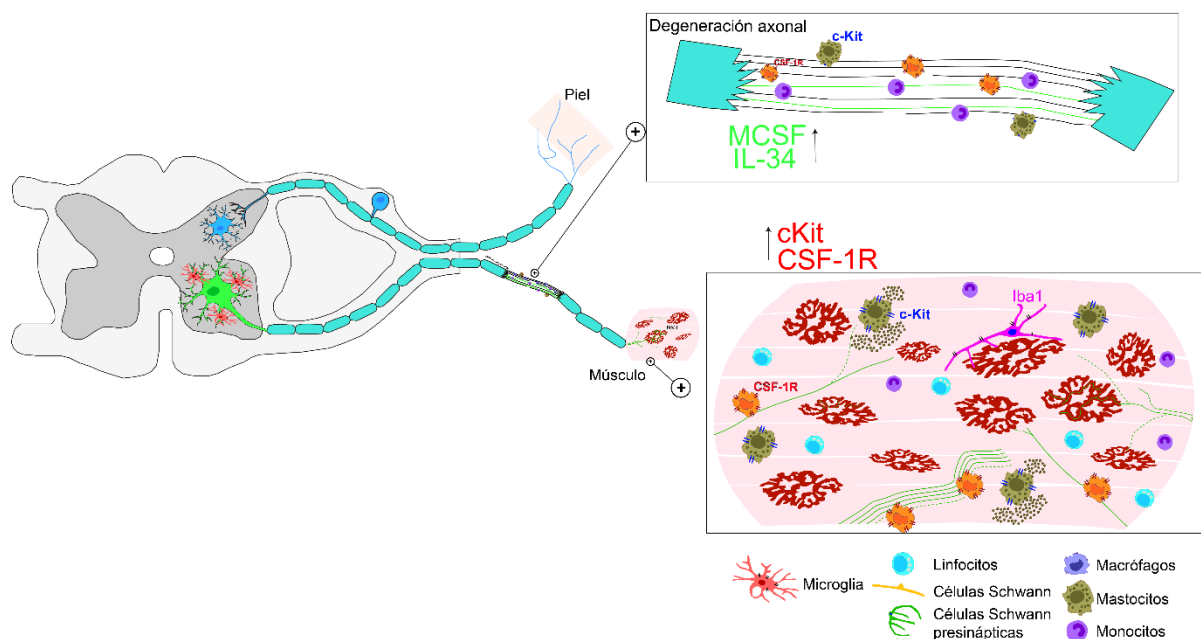


Figura 5. Microambiente neurodegenerativo en las vías motoras periféricas. Representación esquemática mostrando que la degeneración de axones motores lleva a una activación de las células de Schwann denervadas, a la acumulación de restos de mielina y a una respuesta inflamatoria

potente caracterizada por la acumulación de monocitos, macrófagos fagocíticos, neutrófilos, mastocitos y linfocitos. Una reacción parecida se observa en el endomisio y alrededor de las sinapsis neuromusculares del músculo esquelético denervado. (Modificado de Liberman y colaboradores (319))

A diferencia de lo que ocurre en el SNC, donde la sobreexpresión de SOD1 humana mutada en las células gliales desempeña una función neurotóxica (82,139,162,320), Lobsiger y colaboradores demostraron que su expresión en las células de Schwann podría tener un efecto protector (321). Inesperadamente, cuando se bloquea la expresión de SOD1 mutada en esta población glial, se produce una degeneración acelerada en un modelo murino de ELA (321). Más recientemente, los estudios de nuestro grupo arrojaron nuevas evidencias sobre el rol de las células de Schwann en la patogenia de la ELA, tanto en modelos murinos como en el tejido post-mortem de pacientes (26). Estas evidencias muestran que las células de Schwann son capaces de orquestar la infiltración de células inmunes que tiene lugar a lo largo de la vía motora periférica, especialmente en las raíces y los nervios (26). Los resultados muestran que las células Schwann expresan altos niveles de CSF1 e IL34, dos citoquinas responsables de la estimulación proliferativa y el reclutamiento de monocitos y macrófagos a los sitios de lesión (322). Además, las células de Schwann reactivas en los nervios producen elevados niveles de SCF, que como se mencionó con anterioridad, es una quimioquina responsable del reclutamiento de mastocitos a través vía c-Kit (26,292). Como consecuencia del rol de las células de Schwann como orquestadoras de la inflamación periférica en la vía motora, Trías y colaboradores reportaron que, durante la fase sintomática de la ELA, se produce una infiltración masiva de macrófagos, neutrófilos y mastocitos a lo largo de la vía motora, desde las raíces ventrales hasta las uniones neuromusculares en el músculo esquelético (30,39). Otros autores habían reportado anteriormente la infiltración de macrófagos en raíces ventrales, nervios y músculo esquelético, tanto en modelos murinos como en el tejido de pacientes (28,29,323). En los trabajos más recientes de nuestro laboratorio, los mastocitos y neutrófilos también fueron observados en las terminales presinápticas denervadas así como en los alrededores de las uniones neuromusculares y las células de Schwann terminales (30), tanto en las ratas hSOD1^{G93A} como en el tejido de pacientes con ELA (30). Finalmente, se observó que el tratamiento de ratas hSOD1^{G93A} con masitinib, que tiene un potente

efecto inhibitor sobre c-Kit y CSF1R, previno significativamente la infiltración de las células inmunes a lo largo de la vía, enlenteciendo la degeneración axonal y muscular de manera significativa (30,39). Esto sugiere que la inflamación crónica que se constituye en el sistema nervioso periférico en la ELA puede desempeñar un rol patogénico y contribuir de manera significativa a la progresión de la enfermedad.

Sin embargo, es importante notar que aún hoy en día, no se ha determinado si esta inflamación es completamente detrimental o bien podría tener un rol protector regenerativo en etapas tempranas de la enfermedad (31,324,325), lo que sugiere la complejidad de la respuesta inmune sobre el proceso de axonopatía distal

5. Estrategias terapéuticas que tienen como objetivo la neuroinflamación

Actualmente se cuenta con pocos fármacos aprobados para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, y los efectos terapéuticos de todos ellos son moderados y no constituyen una solución significativa para los pacientes. En el caso de la ELA, a octubre de 2022 existen dos fármacos aprobados por la FDA para su tratamiento. El primero, aprobado en 1995, es el Riluzole, cuyo mecanismo de acción es inhibir la liberación de glutamato, inhibiendo de forma significativa la excitotoxicidad mediada por la acumulación de dicho neurotransmisor en las hendiduras sinápticas (326). Sin embargo, décadas de uso de este fármaco han demostrado que sus efectos terapéuticos son modestos, y prolongan la supervivencia de los pacientes en aproximadamente 3 meses (47). El segundo fármaco aprobado recientemente (2017) por la FDA, es la Edaravona. Aunque se desconoce su mecanismo de acción, se considera que su efecto terapéutico podría estar mediado por sus propiedades antioxidantes (327). Sin embargo, al igual que lo que sucede con el Riluzole, los efectos terapéuticos de este segundo fármaco son modestos, y tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la progresión de la enfermedad en un limitado porcentaje de pacientes, lo que ha llevado a que su uso no se haya masificado en los últimos años (48).

En la última década, las estrategias terapéuticas que tienen como objetivo modular y disminuir la neuroinflamación crónica, han ganado protagonismo en el campo de la neurodegeneración (328–330). Un ejemplo fue el uso de la minociclina, una tetraciclina de segunda generación, que mostró tener el potencial de inhibir la

activación microglial y reducir la inflamación en modelos animales de ELA (163). Los trabajos realizados por Kriz y colaboradores en el modelo de ratón hSOD1^{G37R} reportaron que la administración de minociclina en la dieta de los animales retrasa el comienzo de los síntomas y enlentece la progresión de la enfermedad (163). Este efecto también fue reportado en trabajos realizados por Zhu y colaboradores en ratones hSOD1^{G93A} (331). En la misma línea, los trabajos de otros investigadores mostraron que la administración de minociclina en ratones hSOD1^{G93A} no solo retrasa el comienzo de los síntomas, sino que también extiende la supervivencia de manera dosis-dependiente (332). Sin embargo, a pesar de haber sido probado el potencial efecto terapéutico de la minociclina en modelos animales de ELA (163), su traslación a la clínica se vio interrumpida por la falta de resultados significativos en los ensayos realizados en pacientes, donde el fármaco mostró efectos secundarios no deseados (333).

Otro ejemplo de estrategia anti-inflamatoria lo constituye el compuesto NP001, una forma altamente purificada y estable de clorito de sodio, dirigido a disminuir la actividad de macrófagos pro-inflamatorios en la ELA (334). El NP001 media su efecto anti-inflamatorio produciendo intracelularmente en los macrófagos altos niveles de taurina cloramina, un factor conocido por inhibir de manera significativa la vía NF- κ B (335,336). En ensayos clínicos Fase I, el NP001 tuvo un efecto significativo sobre los monocitos activados y una tendencia a enlentecer el deterioro neurológico en pacientes con ELA (337). Sin embargo, NP001 no mostró eficacia clínica significativa en el estudio Fase IIb, lo que sugiere que las terapias dirigidas solamente sobre monocitos/macrófagos no son suficientes para detener el proceso neurodegenerativo (338).

Como se mencionó anteriormente, otro fármaco en fase de desarrollo clínico que tiene como blanco la neuroinflamación en la ELA es el masitinib (339,340). Los estudios preclínicos llevados a cabo por nuestro grupo muestran que masitinib inhibe la activación de la microglía y los mastocitos implicados en la progresión de la ELA, lo que redundaría en una disminución de la neuroinflamación, disminución de la muerte de motoneuronas, axonopatía periférica y denervación neuromuscular y aumento de la supervivencia de ratas y ratones con ELA. (14,26,30,39,40). El uso de

masitinib fue propuesto como nueva terapia prometedora con eficacia declarada en ensayos clínicos de pacientes con ELA, Enfermedad de Alzheimer y Esclerosis Múltiple (341–345).

6. NF- κ B como blanco terapéutico para modular la neuroinflamación

El factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN, así como la producción de citoquinas y la supervivencia celular (346). NF- κ B se encuentra en casi todas las células animales y su activación es regulada por estímulos celulares como estrés, citoquinas, radicales libres, antígenos virales o bacterianos, entre otros (347). Debido a que NF- κ B controla muchos genes involucrados en la inflamación, se encuentra crónicamente activo en muchas enfermedades inflamatorias, incluyendo la neuroinflamación (182,348). Está presente en distintos tipos celulares del sistema nervioso central, e implicado en varios procesos fisiológicos y patológicos (179,181,349). En mamíferos, la familia NF- κ B se compone de cinco factores de transcripción relacionados: p50, p52, RelA (p65), c-Rel y RelB (346). Se expresa constitutivamente como un dímero, formado usualmente por las subunidades p50 y p65. Normalmente, los dímeros de NF- κ B permanecen inactivos en el citosol unidos a miembros de una familia de inhibidores de proteínas NF- κ B (I κ B) (I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ) (346). La activación implica la fosforilación de los I κ B, seguido de la ubiquitinación y degradación por el proteasoma. Esto resulta en la exposición de la señal de localización nuclear de los dímeros NF- κ B, que ahora pueden translocar al núcleo y unirse a la secuencia de ADN para modular la transcripción de los genes asociados (180,346,347). Existen dos vías de activación distintas de este factor, la vía no canónica y la canónica (350,351). La activación de la vía no canónica se da en respuesta a miembros de la superfamilia de receptores de TNF. Dado que esta activación implica la síntesis de proteínas, la cinética de activación es lenta pero duradera, en concordancia con sus funciones biológicas en el desarrollo de células inmunes y órganos linfoides, homeostasis inmunológica y respuesta inmunitaria (351). Mientras tanto, la activación canónica se da en respuesta a una diversidad de estímulos externos involucrados en la inflamación, la respuesta inmune, la proliferación celular, la diferenciación y la supervivencia, y es una respuesta rápida pero transitoria (352). El

dímero NF- κ B que predomina en la activación canónica en respuesta a estímulos patológicos es el heterodímero p65/p50 (353).

La activación de la vía NF- κ B juega un rol fundamental en la regulación de la neuroinflamación asociada a enfermedades neurodegenerativas (182). Este factor, constitutivamente activo en neuronas, puede protegerlas frente al daño y regular la respuesta inflamatoria de la neurona (182). A su vez, NF- κ B abunda en las células gliales y en las células endoteliales de los vasos sanguíneos cerebrales, donde regula la respuesta inflamatoria que se desencadena en el microambiente que rodea a las neuronas (182). Si bien la activación de este factor en neuronas puede tener un rol protector (46), su activación en células gliales puede ocasionar daño y muerte a las neuronas (46). El aumento desproporcionado de p65 activado y la posterior transactivación de moléculas efectoras es parte integral de la patogénesis de muchas enfermedades crónicas como la artritis reumatoidea, la enfermedad inflamatoria intestinal, la esclerosis múltiple e incluso las patologías neurodegenerativas (353).

La activación aberrante de NF- κ B en la ELA parece dotar a la microglía de un fenotipo neurotóxico, convirtiéndolo en un potencial blanco farmacológico. La expresión constitutiva de formas mutadas de la SOD1 produce una respuesta inflamatoria sistémica que promueve la neurodegeneración (253,354–358). Esta respuesta inflamatoria podría deberse, en parte, a cambios en la actividad de NF- κ B. Por ejemplo, la vía NF- κ B está activada principalmente en microglía y macrófagos durante la fase sintomática de la enfermedad, y su inhibición por vía de modificaciones genéticas repercute de manera positiva en la progresión de esta (359). De manera similar, la expresión de hSOD1^{G93A} y hSOD1^{G85R} en líneas celulares es suficiente para activar la vía NF- κ B (360), sugiriendo que los agregados de especies mutantes de la SOD1 pueden desencadenar una respuesta inmune significativa. Además, la agregación de la SOD1 mutante, puede desencadenar una respuesta de estrés de retículo y la activación de UPR, la cual también está asociada a la activación de NF- κ B (361), sugiriendo otro posible mecanismo para la activación de esta vía pro-inflamatoria en el contexto de la ELA. La agregación y la mutación puntual en otros genes asociados a la ELA también se han asociado, y

podrían desempeñar un papel importante, en la activación de NF- κ B y el desencadenamiento de la neuroinflamación, entre ellos, TDP-43, FUS, C9Orf, Optineurina, TBK1 (184,192,362–364).

Por tanto, la vía de señalización de NF- κ B-p65 se ha convertido en un blanco de interés para el descubrimiento y desarrollo de fármacos. Sin embargo, existen escasos fármacos inhibidores de NF- κ B específicamente dirigidos a la microglía neurotóxica en la ELA.

6.1 Aproximaciones farmacológicas para modular la vía proinflamatoria NF- κ B

En los últimos años se han desarrollado diversas aproximaciones farmacológicas para modular la vía NF- κ B (365). En una revisión reciente publicada por Giridharan y Srinivasan (353), se resumen una serie de compuestos que pertenecen a diferentes clases químicas, como natriuréticos, péptido-miméticos, moléculas pequeñas, ARN interferentes pequeños, y aquellos que inhiben la activación de la vía NF- κ B actuando sobre la subunidad p65 (353). Estos compuestos pueden actuar como: i) inhibidores que previenen la translocación nuclear de p65 (actúan sobre los dominios de importación nuclear), ii) inhibidores de la activación nuclear de p65 (actúan sobre el dominio de unión al ADN, o inhibiendo cofactores), iii) inhibidores de modificaciones post-transcripcionales (acetilación, inhibidores de la histona acetiltransferasa, inhibidores de la histona desacetilasa, metilación/desmetilación, e inhibidores de metiltransferasa), y iv), inhibidores del complejo NF- κ B actuando sobre las quinasas (353).

Si bien la asociación directa de NF- κ B con la neuroinflamación y la progresión de la ELA ha sido un tema estudiado durante décadas, aún no se cuenta con terapias que puedan inhibir específicamente esta vía central en la constitución de la inflamación sistémica. La búsqueda de fármacos para el tratamiento de la ELA y otras enfermedades neurodegenerativas todavía continúa, y es una rama de la neurociencia que gana terreno día a día. Por este motivo, en esta tesis de doctorado nos enfocamos en el desarrollo y ensayo preclínico de un fármaco diseñado por investigadores en nuestro país, que tiene la potencialidad de modular las vías pro-

inflamatorias que promueven la neuroinflamación y la degeneración de las vías motoras, y en particular inhibe fuertemente la vía NF- κ B. Este fármaco tiene la característica de ser un compuesto electrofílico, lo que le permite actuar potencialmente sobre varias vías neuroprotectoras y proinflamatorias presentes en patologías neurodegenerativas.

7. (E)-4-(2-nitrovinyl) ácido benzoico (BANA): un compuesto con el potencial de inhibir NF- κ B

En los últimos años han surgido los compuestos electrofílicos como candidatos para modular vías de señalización involucradas en procesos inflamatorios (366). Un ejemplo de estos es el dimetilfumarato, aprobado para su uso en la esclerosis múltiple, y que ha sido probado en ensayos clínicos en pacientes con ELA (65,66). Estos compuestos tienen la capacidad de unirse en forma covalente a otras moléculas nucleofílicas que tienen un par de electrones disponibles. Dos mecanismos de acción reconocidos para los electrófilos son: i) la activación de la vía citoprotectora Keap1/Nrf2, en donde el electrófilo es capaz de reaccionar con un tiol específico de Keap1, permitiendo la translocación del factor de transcripción Nrf2 al núcleo para activar genes de respuestas antioxidante (ARE) (367); y ii) inhibición de la vía proinflamatoria NF- κ B, en donde el electrófilo actúa alquilando cisteínas de las subunidades p65 y p50, inhibiendo la translocación y unión al ADN del factor de transcripción NF- κ B (368).

Publicaciones recientes aportan evidencia sobre la efectividad terapéutica de compuestos electrofílicos. A modo de ejemplo, tenemos los ácidos grasos nitrados endógenos, en particular los nitroalquenos, que son capaces de activar vías citoprotectoras e inhibir vías proinflamatorias como Nrf2 y NF- κ B respectivamente (13,60,369). Por otro lado, recientemente se reportó la síntesis, caracterización fisicoquímica y efecto terapéutico de compuestos análogos al tocoferol-nitroalqueno, en donde la adición de un grupo electrofílico nitroalqueno al tocoferol confirió a este compuesto híbrido, la capacidad de modular las vías NF- κ B y Nrf2-Keap1 teniendo efectos terapéuticos en un modelo de aterosclerosis (62,370).

En el presente trabajo nos propusimos caracterizar, en un modelo de neurodegeneración, los efectos terapéuticos de un compuesto con propiedades electrofílicas, desarrollado por investigadores del Institut Pasteur de Montevideo y de la Universidad de la República: el (E)-4-(2-nitrovinyl) ácido benzoico (BANA). Este compuesto fue sintetizado en una ruta sintética de un paso, por condensación de ácido formilbenzoico (disponible comercialmente) con nitrometano, en presencia de acetato de amonio. Es un compuesto híbrido formado por una molécula electrofílica (en este caso un nitroalqueno), unido al ácido benzoico utilizado como *scaffold* (Fig. 6a). El ácido benzoico, un compuesto que se utiliza como conservante de alimentos, ha sido utilizado farmacológicamente en grandes dosis para el tratamiento de trastornos del ciclo de la urea en niños (371). Además, se ha demostrado que ejerce efectos neuroprotectores en modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer (57) y la enfermedad de Parkinson (58), mediante un mecanismo de acción complejo que involucra indirectamente la inhibición de la vía NF-κB. Sin embargo, se requieren altas concentraciones para lograr efectos terapéuticos, lo que limita su uso en la clínica. En este contexto, nuestra hipótesis establecía que un derivado nitroalqueno del ácido benzoico podría potenciar los efectos protectores de este último, ejerciendo efectos antiinflamatorios y regular a la microglía reactiva a través de la inhibición de NF-κB en un modelo murino de ELA. El BANA tiene una clara actividad electrofílica reaccionando con nucleófilos como en β-mercapto etanol (Fig. 6b). Posibles nucleófilos endógenos con los cuales BANA podría reaccionar son el glutatión y residuos cisteínas de péptidos y proteínas.

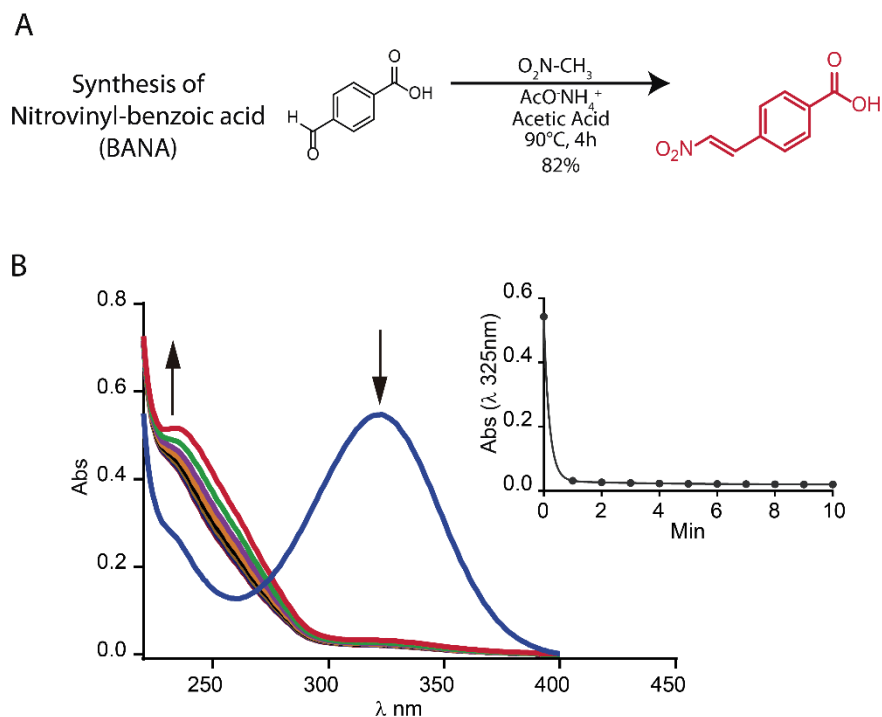


Figura 6. Síntesis de BANA. A. Representación esquemática de la síntesis del (E)-4-(2-nitrovinil) ácido benzoico (BANA, rojo). B. Caracterización de la propiedad electrofílica del BANA. El BANA (30 μ M) se disolvió en buffer fosfato (20 mM) y se incubó con β -mercaptoetanol (300 μ M). Los espectros de absorción de la reacción se obtuvieron en el rango 200 - 400 nm cada 60 segundos.

En virtud de que el ácido benzoico controla la neuroinflamación, surgió la iniciativa de determinar los efectos del derivado BANA que había sido sintetizado localmente, sobre células microgliales activadas. En este modelo, el BANA demostró un significativo efecto anti-inflamatorio que sugería un mecanismo mediado por NF- κ B. Este trabajo de tesis se enfoca en la caracterización de los efectos anti-neuroinflamatorios y neuroprotectores del BANA.

Hipótesis

Las investigaciones de nuestro grupo que dieron lugar al presente trabajo de tesis están basadas en la “hipótesis neuroinflamatoria de la ELA”, que actualmente es apoyada por una cantidad muy significativa de evidencia experimental y clínica. Esta hipótesis plantea que los defectos primarios de las motoneuronas y de sus proyecciones axonales, inducen una respuesta inflamatoria crónica en el microambiente celular adyacente, la cual, a su vez, adquiere actividad neurotóxica. La generación de este circuito auto-tóxico, mediado por células gliales activadas,

células inmunes infiltrantes y defectos de la barrera hemato-encefálica, propiciaría el desarrollo y la progresión ineluctable de la ELA, afectando a motoneuronas indemnes de segmentos continuos a lo largo del neuroeje. En este contexto, la modulación farmacológica de la neuroinflamación dependiente de NF- κ B por BANA, podría tener un efecto modificador de la enfermedad, retrasando su progresión lesional y aumentando la sobrevida.

Objetivo

En el presente proyecto nos propusimos determinar el mecanismo de acción y la eficacia preclínica del compuesto BANA en el modelo de rata transgénica hSOD1^{G93A} de ELA.

Objetivos específicos

1. Determinar si el BANA es capaz de inhibir la vía NF- κ B. Para ello se utilizaron células HT29 reporteras de NF- κ B y ratones transgénicos reporteros de la vía NF- κ B.
2. Caracterizar los efectos de BANA en la modulación de la vía proinflamatoria NF- κ B en células gliales. Para ello se evaluó el efecto del compuesto en la línea celular de microglía BV2, y en cultivos celulares primarios de microglías hSOD1^{G93A} aisladas de ratas sintomáticas.
3. Identificación y análisis de microglías espinales con activación de la vía NF- κ B en pacientes con ELA. Este objetivo apunta a confirmar que las microglías activadas que aparecen como el principal blanco celular de BANA en modelos murinos, también están presentes en humanos.
4. Determinar el potencial terapéutico de BANA en el modelo animal de ELA, utilizando criterios histopatológicos. El compuesto fue sometido a ensayos animales utilizando el modelo de rata transgénica hSOD1^{G93A} de ELA. Los animales fueron tratados con dosis terapéuticas del compuesto y el efecto se evaluó mediante el análisis histopatológico de las vías motoras en el sistema nervioso central y sistema nervioso periférico.
5. Determinar el efecto terapéutico de BANA en ratas transgénica hSOD1^{G93A}, determinando su capacidad de aumentar la sobrevida de los animales luego de un tratamiento con BANA post-parálisis.

Resultados

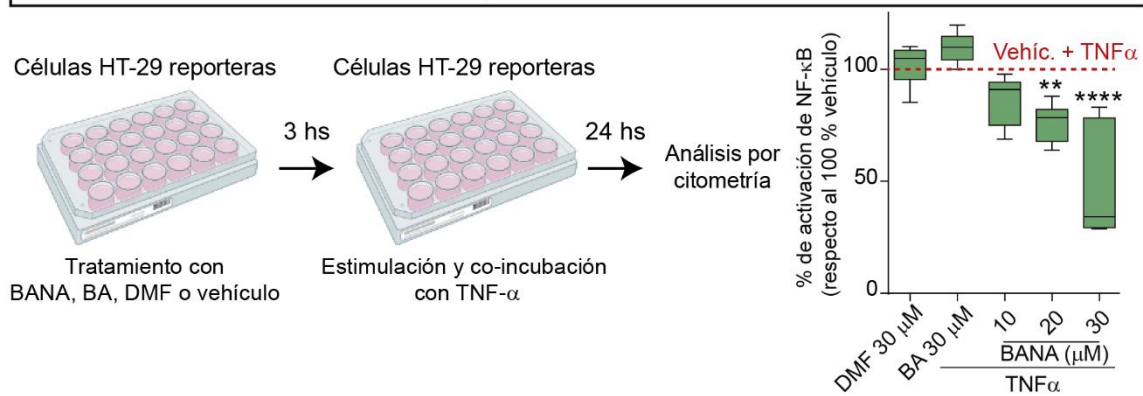
1. BANA inhibe la activación de la vía NF- κ B en modelos celulares y animales de inflamación.

Estudios previos han reportado que el tratamiento con altas dosis de ácido benzoico puede inhibir de manera significativa la activación de la vía NF- κ B en modelos celulares de inflamación (372). Por ende, nos planteamos la hipótesis de que el derivado nitroalqueno del ácido benzoico, BANA, podría tener la capacidad de inhibir la vía NF- κ B a menores dosis. Es por esto que nuestro primer objetivo en el proyecto de tesis fue determinar si BANA podía inhibir la activación de la vía NF- κ B a concentraciones terapéuticas más bajas. Como primera aproximación, realizamos ensayos en la línea celular HT-29 reportera de la activación de la vía NF- κ B (373). Esta es una línea celular epitelial humana modificada genéticamente para contener el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el control de elementos de unión de NF- κ B. En la Fig. 7a se observa que las células HT29 aumentaron significativamente la expresión de GFP luego de la activación inducida por exposición a 1 ng/ml de TNF- α y que el pretratamiento con BANA en concentraciones de 20 y 30 μ M previno significativamente, y de manera dosis-dependiente, la activación de NF- κ B. En comparación, ni el ácido benzoico (BA) ni el dimetilfumarato (DMF, fármaco que en ciertas condiciones estimula la vía Nrf2 e inhibe la vía NF- κ B), en concentraciones de 30 μ M, lograron inhibir la activación de la vía NF- κ B.

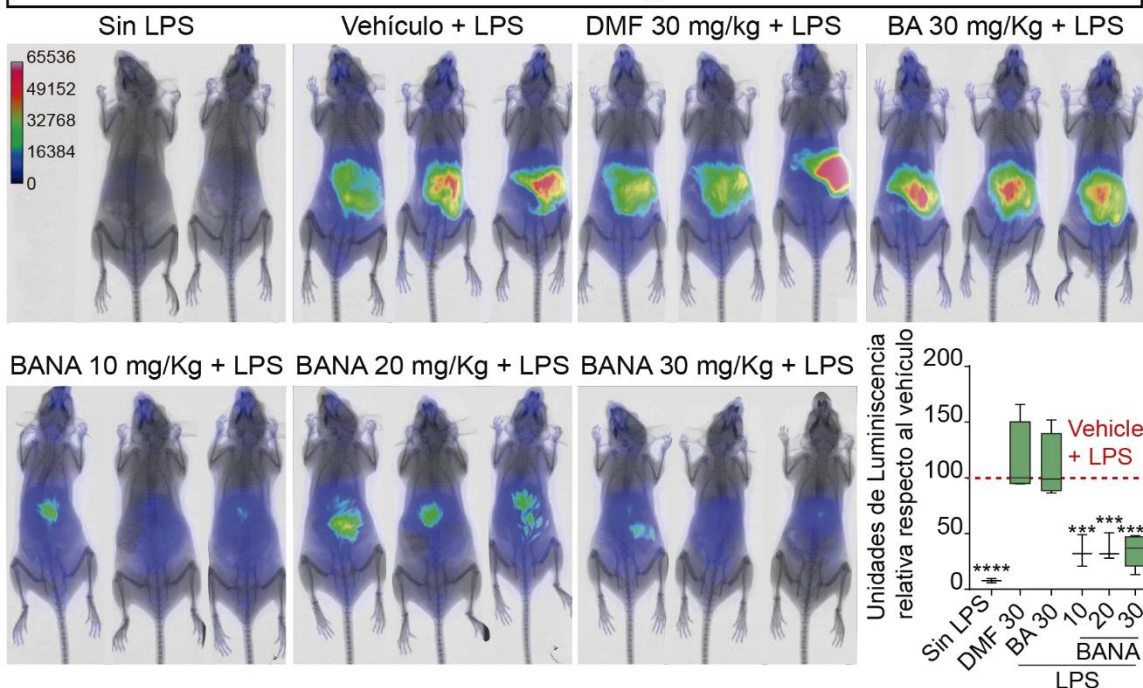
A continuación, nos planteamos realizar ensayos utilizando BANA en modelos de animales transgénicos reporteros de la activación de NF- κ B (374). En este modelo, la modificación genética acopla el promotor de NF- κ B a la expresión de la enzima luciferasa. El experimento realizado se denomina “desafío al LPS” (375), y consiste en la administración intraperitoneal de 1 mg/kg de LPS, y luego de 3 horas, determinar la activación intraperitoneal de NF- κ B mediante la emisión de luminiscencia en un equipo de imagenología *in vivo*, usando como sustrato la luciferina. Los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con BANA (10, 20 y 30 mg/kg), dimetilfumarato (30 mg/kg) o ác. benzoico (30 mg/kg) y a las 2 horas se les inyectó LPS (1 mg/kg) intraperitoneal. Luego de 3 horas se comparó la actividad luciferasa entre los grupos. En la Fig. 7b se muestra que los ratones tratados con

BANA presentan una disminución significativa de la activación de la vía NF- κ B en todas las dosis testadas. En comparación, tanto el DMF como el BA no mostraron efectos significativos sobre la activación de la vía NF- κ B en este modelo (Fig. 7b). A su vez, la administración de BANA previa al tratamiento con LPS (10 mg/kg), fue capaz de reducir de manera significativa la concentración de IL-1 β en plasma y peritoneo con respecto al control administrado con vehículo (Fig. 7c), confirmando un potente efecto anti-inflamatorio de BANA en un modelo murino de inflamación aguda.

a Línea celular HT-29 reportera de NF- κ B activada con TNF α



b Desafío con LPS en ratones transgénicos NF- κ B-RE-luc



c Desafío con LPS en ratones C57BL/6

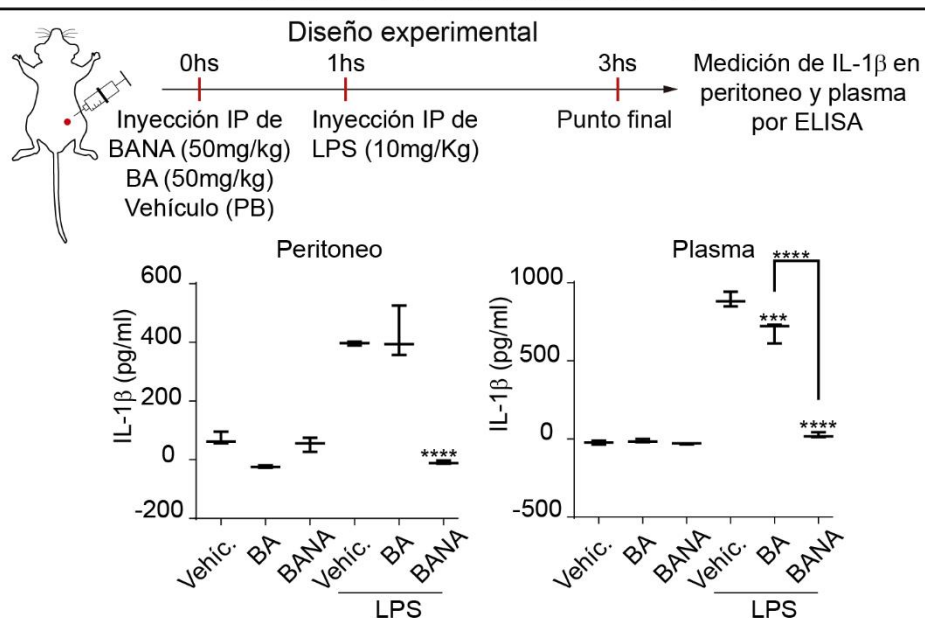


Figura 7. BANA inhibe la activación de la vía NF- κ B en células y ratones reporteros. a. La línea celular reportera HT-29 fue tratada con BANA (10, 20 y 30 μ M), BA (30 μ M) o DMF (30 μ M) durante 3 hs y luego se estimuló con TNF- α (1 ng/ml). A las 24 hs se realizó el análisis de la expresión de GFP por citometría de flujo. El gráfico muestra el análisis cuantitativo de la activación de NF- κ B en las diferentes condiciones experimentales. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM; los datos fueron analizados por Ordinary one-way ANOVA, seguido del test de Tukey's, $**p=0,0086$, $****p<0,0001$. Se realizaron 4 ensayos independientes con 3 réplicas cada uno. **b.** Ratones transgénicos NF- κ B-RE-Luc fueron administrados intraperitonealmente con BANA, BA, DMF o Vehículo, dos horas antes de la inyección intraperitoneal con LPS. El gráfico muestra el análisis cuantitativo de las diferentes condiciones experimentales. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM; los datos fueron analizados por Ordinary one-way ANOVA, seguido del test de Tukey's, $***p=0,0009$, $****p<0,0001$. N=4 animales por condición. **c.** Ratones C57BL/6 fueron administrados intraperitonealmente con BANA, BA, DMF o Vehículo, 1 hora antes de la inyección intraperitoneal con LPS. Luego de tres horas se midieron los niveles de IL-1 β en el peritoneo y plasma por ELISA. La administración de BANA disminuyó significativamente la concentración de IL-1 β en el peritoneo (gráfica a la izquierda) y plasma (gráfica a la derecha) en comparación al BA y al vehículo. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM; los datos fueron analizados por Ordinary one-way ANOVA, seguido del test de Tukey's $***p = 0.0002$, $****p<0,0001$. N=3 animales por condición.

2. BANA inhibe la activación de la vía NF- κ B en microglías en cultivo.

A continuación, buscamos responder la pregunta de si BANA era capaz de inhibir la vía NF- κ B en microglía activada. Como primera aproximación, utilizamos una línea celular de microglía de ratón conocida como BV2 (376), en donde la vía NF- κ B fue activada por exposición a LPS. La activación de la vía NF- κ B fue determinada mediante inmunocitoquímica, analizando la traslocación nuclear de la subunidad p65 del complejo NF- κ B. En la Fig. 8a se observa como el pre-tratamiento con BANA (10-30 μ M) fue suficiente para inhibir de manera significativa y dosis-dependiente la traslocación nuclear de la subunidad p65, en comparación con las mismas concentraciones de ácido benzoico y de dimetilfumarato. En segundo lugar, para determinar el efecto de BANA sobre la vía inflamatoria NF- κ B en un modelo celular de ELA, utilizamos cultivos de microglía hSOD1^{G93A} activada, aislada de ratas hSOD1^{G93A} durante el estadio sintomático de la enfermedad. Este modelo celular se encuentra muy bien caracterizado y presenta un perfil inflamatorio característico (14,167). Para potenciar la activación de la vía NF- κ B, las células microgliales aisladas de ratas sintomáticas adultas también fueron tratadas en

cultivo con LPS luego del pre-tratamiento con ácido benzoico y BANA. En la Fig. 8b se observa que el pre-tratamiento con BANA previno significativamente la activación de la vía NF- κ B al inhibir la translocación nuclear de la subunidad p65 inducida por LPS en microglía hSOD1^{G93A}, en comparación con dosis similares de ácido benzoico. Además, realizamos análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real, en la microglía hSOD1^{G93A} luego de inducir la activación de la vía NF- κ B con LPS, con el tratamiento previo con BANA. En particular, se analizó la expresión de los factores CCL2, IL6, IL1- β y TNF- α , cuya expresión está asociada a la activación de NF- κ B. En la Fig. 8c se observa cómo el tratamiento con BANA inhibió de manera significativa la expresión de estos genes de forma dosis dependiente.

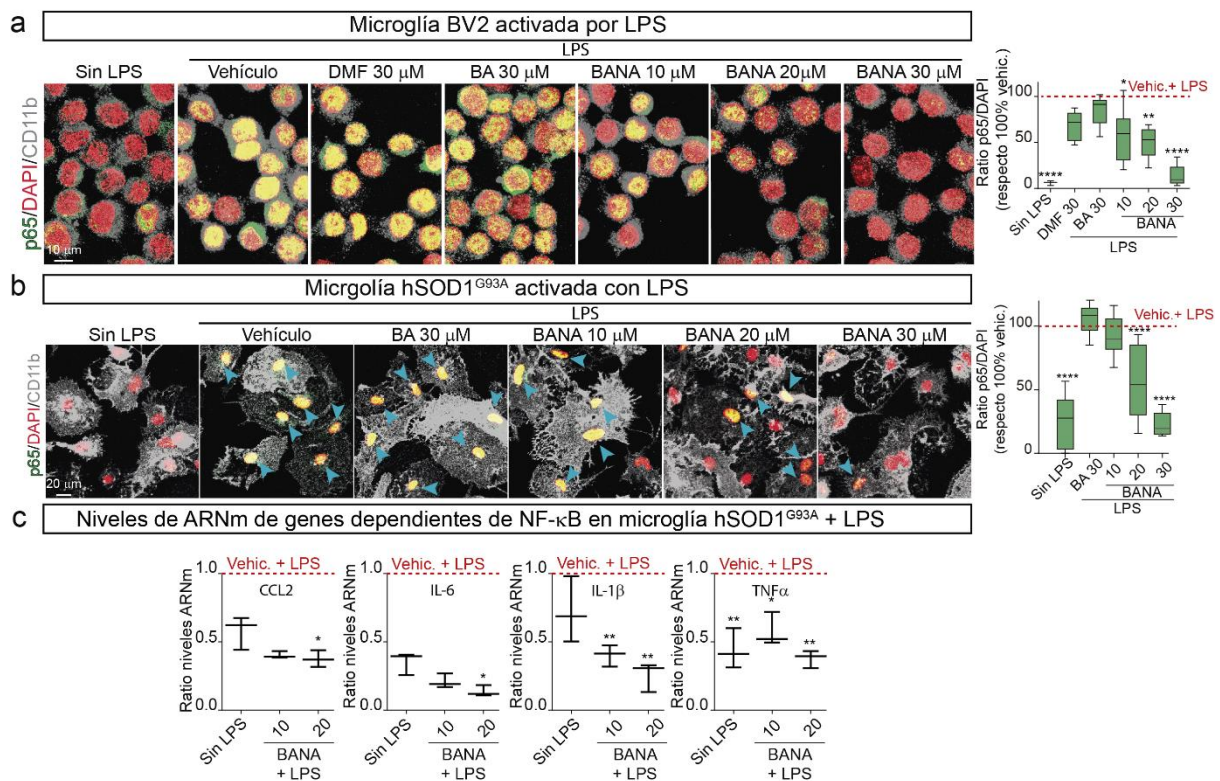


Figura 8. BANA inhibe la activación de la vía NF- κ B y la transcripción génica asociada en células microgliales. **a.** Imágenes de microscopía confocal de células microgliales BV2 tratadas con BANA, BA o DMF y estimuladas posteriormente con LPS. Como se observa en la figura el BANA inhibe la translocación nuclear de NF- κ B-p65 inducida por LPS. La colocalización nuclear de NF- κ B-p65 con DAPI se observa en amarillo. El gráfico muestra el análisis cuantitativo de la relación de NF- κ B-p65 nuclear/DAPI entre las distintas condiciones. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM; los datos fueron analizados por Ordinary one-way ANOVA, seguido del test de Tukey's, * $p=0,0148$ ** $p=0,0031$ **** $p<0,00001$. Se realizaron 3 ensayos independientes con 3 réplicas cada uno. **b.**

Imágenes de microscopía confocal de microglía hSOD1^{G93A} (gris) positiva para CD11b tratadas con BANA, BA o DMF y estimuladas posteriormente con LPS. Como se observa en la figura el BANA inhibe la translocación nuclear de NF-κB-p65 inducida por LPS en microglía hSOD1^{G93A}. La colocalización nuclear de NF-κB-p65 con DAPI se observa en amarillo. El gráfico muestra el análisis cuantitativo de la relación de NF-κB-p65 nuclear/DAPI entre las distintas condiciones. Los datos se expresan como la media ± SEM; los datos fueron analizados por Ordinary one-way ANOVA, seguido del test de Tukey's, ****p<0,00001. Se realizaron 4 ensayos independientes con 3 réplicas cada uno.

c. Análisis por RT-qPCR de los niveles de ARNm de citoquinas proinflamatorias asociadas a la activación de la vía NF-κB (CCL2, IL-6, IL-1β y TNF-α) en microglía hSOD1^{G93A} estimulada con LPS. Como se observa en los gráficos el BANA previene la transcripción de genes asociados a NF-κB. Los datos se expresan como la media ± SEM; los datos fueron analizados por Ordinary one-way ANOVA, seguido del test de Tukey's, *p=0,0395 (CCL2) *p=0,0409 (IL-6) **p=0,0049 (IL-1β) *p=0,0292 **p=0,0063 (TNF-α). Se realizaron 3 ensayos independientes con 2 réplicas cada uno.

3. La activación de la vía NF-κB se encuentra aumentada en la microglía de la médula espinal en pacientes con ELA.

La activación de la vía inflamatoria NF-κB en microglías peri-neuronales en la ELA ha sido poco estudiada. Por lo tanto, para determinar el potencial impacto que podría tener el BANA en el tratamiento de la ELA, analizamos la presencia de microglía peri-neuronal con la vía NF-κB activada en el tejido post-mortem de pacientes, mediante técnicas de inmunohistoquímica (Fig. 9a). Como se puede observar en la Fig. 9b, se identificaron numerosas microglías (Iba1 positivas) con p65 nuclear en el microambiente celular que rodea a las motoneuronas espinales del asta ventral de pacientes con ELA, un escenario que no se observó en el tejido de los donantes controles. La microglía que presenta traslocación nuclear de p65 está caracterizada por cuerpos celulares hipertróficos, y en algunos casos se organizan en *clusters* de células (Fig. 9c). Además, la expresión nuclear de p65 también se observó en otras células peri-neuronales que no eran positivas para Iba1.

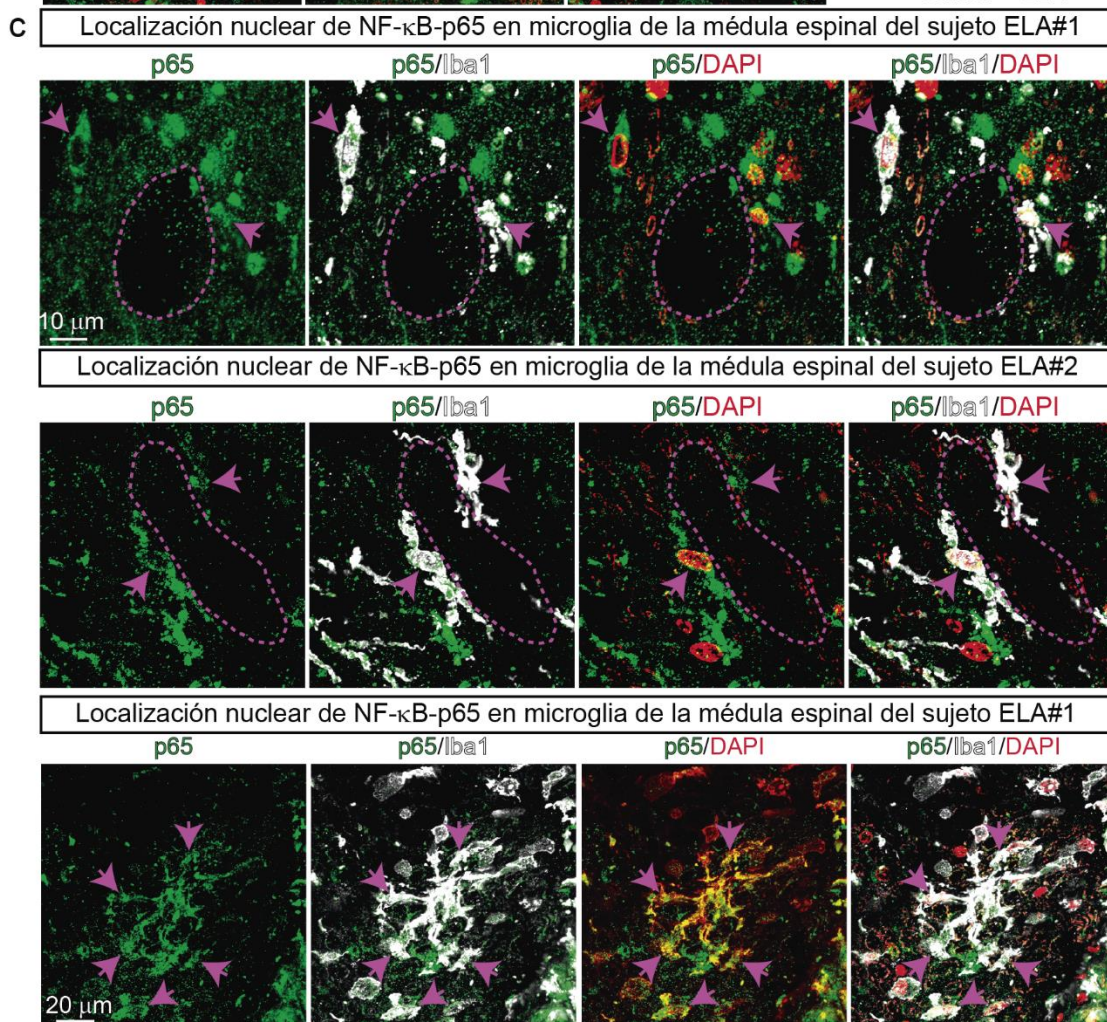
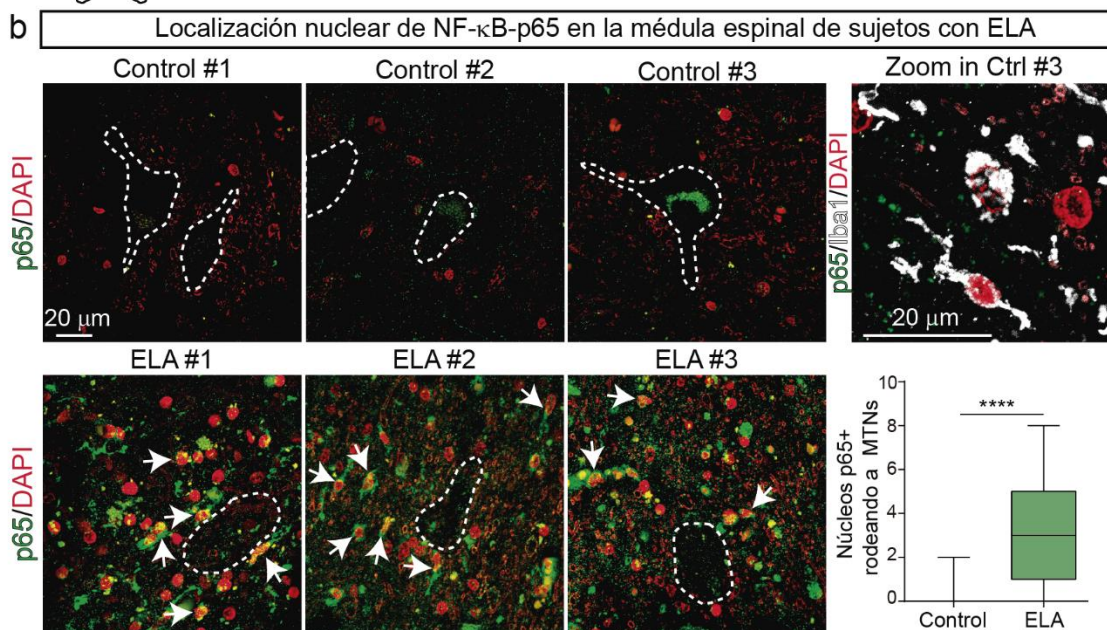
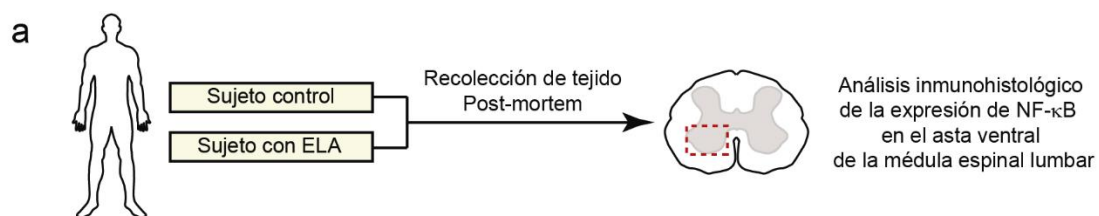


Figura 9. Expresión nuclear de NF- κ B-p65 en microglía peri-neuronal de la médula espinal de pacientes con ELA. **a.** Esquema del diseño experimental. **b.** Imágenes de microscopía confocal mostrando la expresión nuclear de NF- κ B-p65, en el microambiente celular que rodea a las motoneuronas de la médula espinal de sujetos con ELA y controles. Los paneles superiores muestran la marcación con NF- κ B-p65 (verde) y DAPI (rojo) de sujetos control en donde no hay expresión nuclear aparente de NF- κ B-p65. El panel a la derecha corresponde a una imagen aumentada mostrando microglía Iba-1 positiva (blanco) que carece de expresión nuclear de NF- κ B-p65 (verde). Los paneles inferiores muestran el aumento sistemático de la expresión nuclear de NF- κ B-p65 rodeando a las motoneuronas en 3 sujetos con ELA esporádica. Las flechas señalan los núcleos amarillos con NF- κ B-p65 colocalizado con DAPI. El gráfico muestra el análisis cuantitativo de núcleos NF- κ B-p65 positivos rodeando a las motoneuronas. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM; los datos fueron analizados por el test Mann-Whitney, ****p<0,00001. N=3 sujetos con ELA y n=3 sujetos control. **c.** Imágenes de microscopía confocal de mayor aumento, mostrando la expresión nuclear y citoplasmática de NF- κ B-p65 (flechas magenta) en microglía Iba-1 positiva en la médula espinal ventral de sujetos con ELA.

4. El tratamiento con BANA en ratas hSOD1^{G93A} sintomáticas disminuye la activación de la vía NF- κ B y la microgliosis en la médula espinal.

A continuación, nos propusimos evaluar los efectos anti-inflamatorios de BANA en el modelo de rata transgénica hSOD1^{G93A} de ELA. En primer lugar, nos enfocamos en evaluar el efecto del BANA sobre la activación de la vía NF- κ B en el microambiente celular neurodegenerativo que rodea a las motoneuronas. Luego, estudiamos el efecto del BANA sobre la activación glial y la proliferación celular, otra característica fundamental en los modelos animales de ELA (87,167). El objetivo central de estos experimentos fue determinar si el tratamiento con BANA era capaz de inhibir de manera significativa la neuroinflamación durante la etapa sintomática de la enfermedad en las ratas hSOD1^{G93A}. La dosis de 100mg/kg de BANA, fue definida en base a reportes previos que estudiaban los efectos anti-neuroinflamatorios del ácido benzoico (372) y a estudios preliminares de tolerancia. Además, para establecer una estrategia terapéutica traslacional a la clínica humana, se decidió administrar a los animales luego de comenzados los síntomas de la enfermedad, como se venía realizando en estudios previos en nuestro laboratorio (14,40). Los tratamientos diarios con 100 mg/kg de BANA logran concentraciones plasmáticas del nitroalqueno de aproximadamente 3,5 μ M (Tabla 3), una concentración que se encuentra dentro de los rangos terapéuticos esperados. Para determinar los efectos anti-inflamatorios de BANA, las ratas transgénicas

hSOD1^{G93A} fueron administradas diariamente vía oral (*gavage*) con 100 mg/kg de BANA o vehículo (buffer fosfato) luego del comienzo de los síntomas. Pasados 15 días de tratamiento, las ratas fueron eutanasiadas y se disecó la médula espinal para su análisis por inmunohistoquímica y microscopía confocal. Como se puede observar en la Fig. 10a, el tratamiento diario post-parálisis con BANA redujo significativamente el número de células que presentan inmunorreactividad nuclear para p65. Además, pudimos determinar que la mayor parte de las células gliales que expresan p65 en el núcleo son las células microgliales activadas (Fig. 10 b,c), en este caso identificadas por el marcador isolectina.

Posteriormente nos propusimos estudiar el efecto de BANA sobre la microgliosis en la médula espinal de las ratas hSOD1^{G93A}. En la Fig. 11 se observa que el tratamiento oral diario, durante 15 días, con 100 mg/kg de BANA en ratas hSOD1^{G93A} sintomáticas fue suficiente para reducir de manera significativa la microgliosis en la médula espinal. El tratamiento con BANA, en comparación con el vehículo, redujo un 70 % la reactividad microglial analizada mediante la inmunofluorescencia de Iba1, un marcador genérico de microglía (Fig. 11b). También se analizó la expresión de CD68, un marcador característico de microglía activada con capacidad fagocítica que se encuentra significativamente aumentado durante la fase sintomática de la enfermedad (377). El tratamiento con BANA redujo de manera significativa el número de células microgliales fagocíticas en la médula espinal, sugiriendo un potente efecto anti-inflamatorio en las ratas hSOD1^{G93A} sintomáticas (Fig. 11c). Además, en comparación con las ratas tratadas con el vehículo, el tratamiento con BANA redujo de manera significativa la expresión de CD34 (Fig. 11c), un marcador recientemente descrito en una sub-población de microglía activada en la ELA, pero también en precursores de mastocitos que infiltran el parénquima de la médula espinal durante el curso de la neurodegeneración (258) y que contribuyen significativamente a la neuroinflamación crónica.

Finalmente, estudiamos si el tratamiento con BANA tenía un efecto sobre el componente proliferativo en la médula espinal. Reportes previos han demostrado que, durante los primeros estadios de la fase sintomática de la enfermedad, se produce un aumento significativo de la proliferación de las células gliales,

principalmente en astrocitos y microglía, así como también en una población de células progenitoras gliales llamadas NG2 (378). En la Fig. 11d se puede observar que, en comparación con los tratamientos realizados con el vehículo, el tratamiento diario con 100 mg/kg de BANA redujo de forma significativa la tasa de proliferación celular analizada mediante la expresión de Ki67 en el microambiente celular que rodea a las motoneuronas en degeneración.

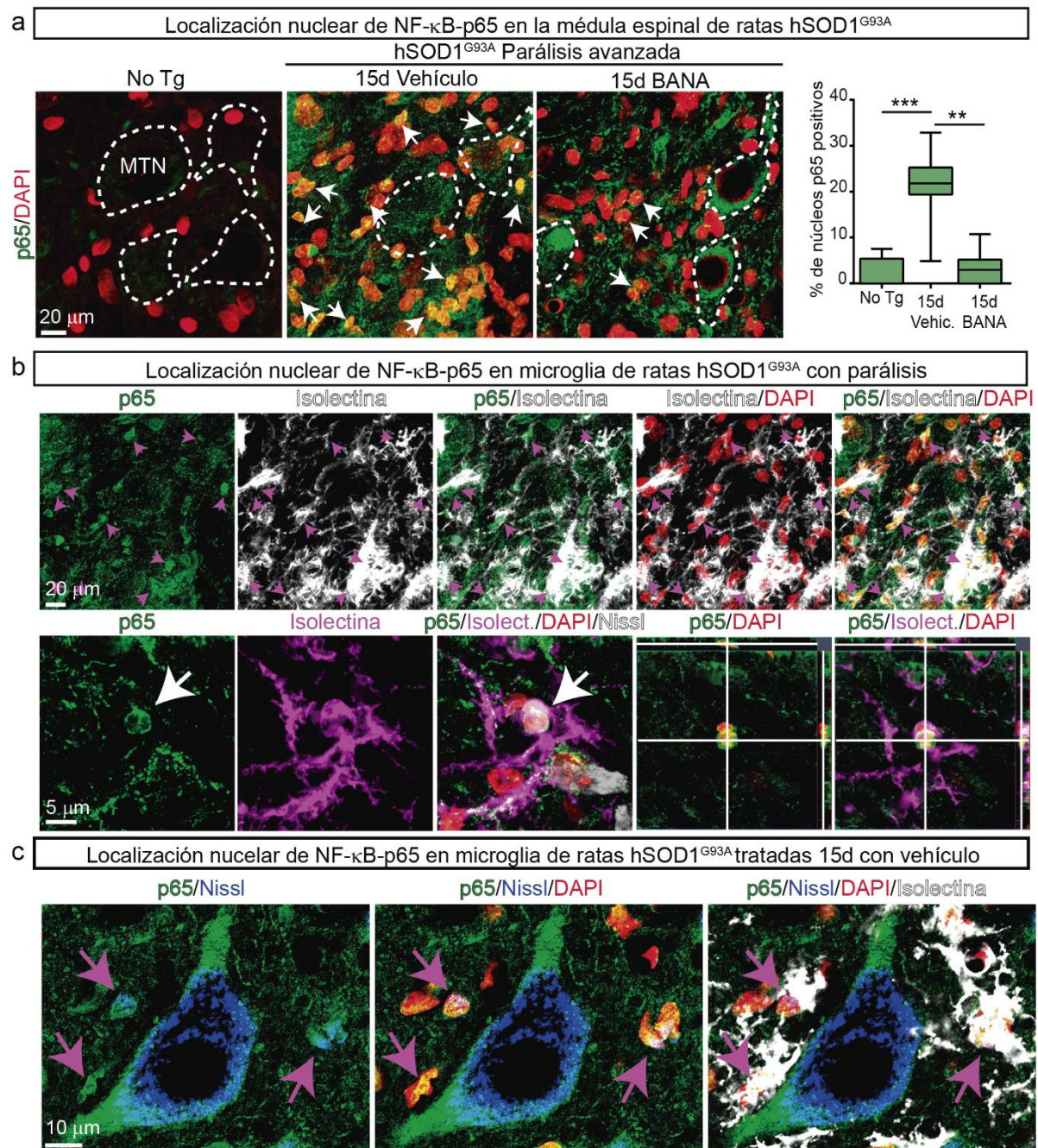


Figura 10. La administración de BANA disminuye la activación de la vía NF- κ B en microglía de la médula espinal de ratas hSOD1^{G93A}. **a.** Imágenes de microscopía confocal en donde se muestra

DAPI (rojo) y la localización de NF-κB-p65 (verde) rodeando a las motoneuronas (línea punteada blanca) en el asta ventral de la médula espinal de ratas no transgénicas y ratas sintomáticas hSOD1^{G93A} tratadas con vehículo o BANA. La colocalización nuclear de NF-κB-p65 con DAPI se observa en amarillo (flechas blancas). El gráfico muestra el análisis cuantitativo de la relación de NF-κB-p65 nuclear/DAPI rodeando a las motoneuronas. Los datos se expresan como la media ± SEM; los datos fueron analizados por el test Kruskal-Wallis seguido del test Dunn, **p=0,0018 ***p=0,0003. N=4 animales por condición. **b.** Análisis por inmunohistoquímica de la localización nuclear de NF-κB-p65 (verde) en microglía isoelectina positiva en la médula espinal de ratas hSOD1^{G93A} sintomáticas. Los paneles superiores muestran microglía con NF-κB-p65 nuclear (flechas magenta). Los paneles inferiores muestran imágenes de microscopía confocal a mayor aumento en donde se observa la localización nuclear de NF-κB-p65 (flechas blancas) en microglía isoelectina positiva (magenta) rodeando a motoneuronas Nissl positivas (blancas). Los dos paneles a la derecha muestran la proyección ortogonal para la visualización de la localización nuclear (DAPI, rojo) de NF-κB-p65 (verde). **c.** Imágenes de microscopía confocal a mayor aumento mostrando la localización nuclear de NF-κB-p65 en microglía isoelectina positiva (blanca) rodeando a las motoneuronas (Nissl, azul) que se encuentran en la médula espinal de ratas hSOD1^{G93A} sintomáticas.

Tabla 3 Concentración de BANA en plasma determinada por RP-HPLC.

Muestras de plasma de ratas hSOD1 ^{G93A} sintomáticas tratadas	[BANA] μM
Vehículo 1	No detectado
Vehículo 2	No detectado
BANA 1	0.69
BANA 1 + HgCl ₂	3.29
BANA 2	1.25
BANA 2 + HgCl ₂	3.65
BANA 3	1.29
BANA 3 + HgCl ₂	3.45
BANA 4	1.60
BANA 4 + HgCl ₂	3.58

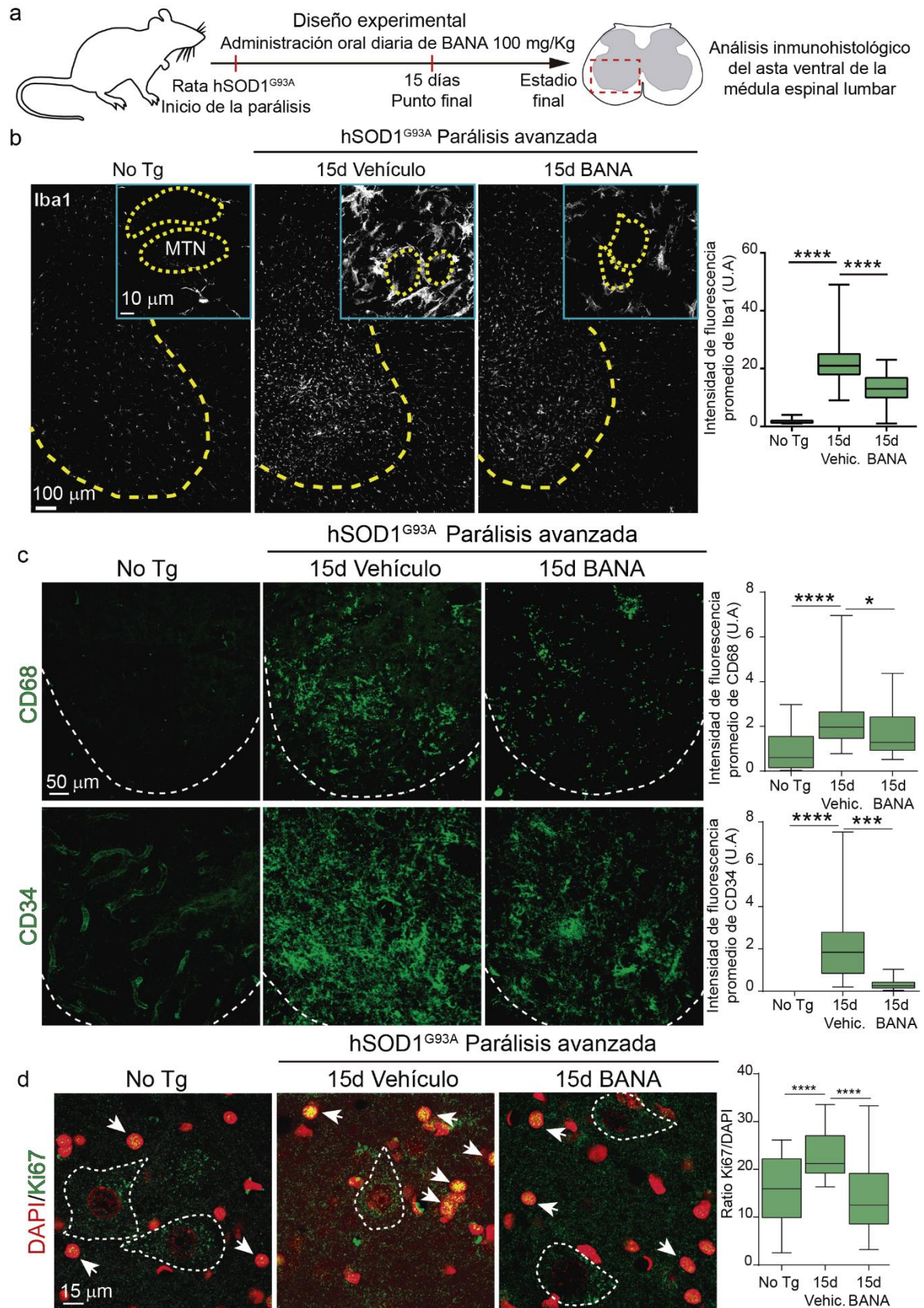


Figura 11. El tratamiento post-parálisis con BANA reduce la microgliosis en la médula espinal de ratas hSOD1^{G93A}. **a.** Esquema del diseño experimental. Ratas hembra hSOD1^{G93A} fueron tratadas

con 100 mg/kg/día de BANA o vehículo durante 15 días, comenzando al inicio de la parálisis de uno de sus miembros inferiores. Una vez finalizado el tratamiento se hizo análisis inmunohistológico de la médula espinal lumbar. **b.** Imágenes de microscopía confocal mostrando la microglía Iba-1 positiva (blanca) en el asta ventral de la médula espinal. Las líneas amarillas delimitan la sustancia gris de la blanca. Los recuadros muestran la microglía asociada a motoneuronas (línea punteada amarilla). El tratamiento post-parálisis con BANA disminuyó significativamente la microgliosis luego de 15 días de tratamiento, así como el número de microglía hipertrófica que rodea a las motoneuronas en el asta ventral de la médula espinal. El gráfico muestra el análisis cuantitativo de la microgliosis en el asta ventral de la médula espinal. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM; los datos fueron analizados por el test Kruskal-Wallis seguido del test Dunn, **** $p < 0,00001$. N=4 animales por condición. **c.** Imágenes de microscopía confocal mostrando microglía CD68 positiva (paneles superiores, verde) y CD34 positiva (paneles inferiores, verde). El tratamiento con BANA disminuyó significativamente la microglía CD68 y CD34 positiva en el asta ventral de la médula espinal (gráficas a la derecha). Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM; los datos fueron analizados por el test Kruskal-Wallis seguido del test Dunn, *** $p = 0,0001$ **** $p < 0,0001$. N=4 animales por condición. **d.** Imágenes de microscopía confocal mostrando la proliferación celular en los alrededores de las motoneuronas (Ki67, verde). El gráfico muestra el análisis cuantitativo de la relación Ki67/DAPI (verde/rojo) para cada condición. BANA redujo significativamente la proliferación celular en comparación al grupo tratado con vehículo. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM; los datos fueron analizados por Ordinary one-way ANOVA, seguido del test de Tukey's, **** $p < 0,0001$. N=4 animales por condición.

5. La administración de BANA disminuye la astrogliosis y la emergencia de células gliales aberrantes en ratas hSOD1^{G93A}

Como mencionamos anteriormente, la degeneración activa de motoneuronas durante la fase sintomática de la enfermedad en la rata hSOD1^{G93A} también se asocia con la acumulación de astrocitos reactivos (astrocitos) y con la emergencia de un fenotipo particular de células gliales que fueron denominadas 'astrocitos aberrantes' o glia aberrante (25). Mientras que los astrocitos reactivos se identifican por la sobre-expresión de GFAP, la glia aberrante se puede identificar por su morfología hipertrófica, localización peri-neuronal y expresión de S100 β entre otros marcadores. Por tanto, utilizamos estos marcadores para determinar el efecto de la administración de BANA sobre estas poblaciones gliales en el modelo de rata hSOD1^{G93A}. Como se muestra en la Fig. 12, 15 días de tratamiento con 100 mg/kg/BANA a partir del inicio de síntomas logró disminuir la astrogliosis en el asta ventral de la médula lumbar en más de un 50% con respecto a los animales tratados con vehículo. Si bien no fue cuantificado en profundidad, el efecto de BANA en los

astrocitos reactivos parece reducir el número de células GFAP+. En comparación, el BANA tuvo un efecto más marcado sobre la población de glías aberrantes peri-neuronales, con una disminución aproximada de 3 veces de cuerpos celulares S100 β + peri-neuronales. En virtud de que la glia aberrante S100 β + corresponde a células microgliales, estos resultados sugieren un mecanismo de BANA inhibiendo NF- κ B en la microglía, indirectamente evitando su cambio al fenotipo aberrante, considerado como neurotóxico.

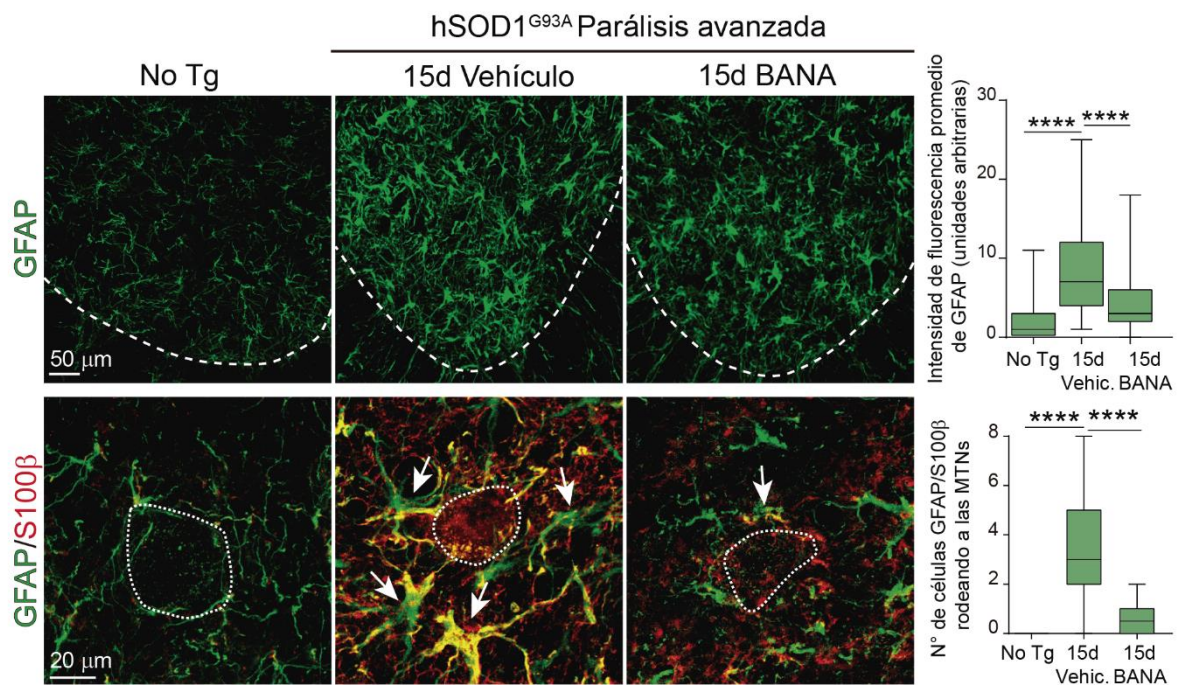


Figura 12. El tratamiento post-parálisis con BANA disminuye la reactividad glial y reduce el número de células gliales aberrantes en la médula espinal de ratas hSOD1^{G93A}. Análisis inmunohistoquímico de la reactividad de astrocitos y de la presencia de células gliales aberrantes en ratas no transgénicas y ratas transgénicas hSOD1^{G93A} tratadas con BANA o vehículo. Como se muestra en los paneles superiores, el tratamiento con BANA redujo significativamente la astrogliosis (GFAP, verde) en el asta ventral de la médula espinal lumbar. La línea blanca punteada delimita la sustancia gris de la blanca. Los paneles inferiores muestran la presencia de células GFAP/S100 β positivas rodeando a las motoneuronas. El tratamiento con BANA disminuyó significativamente la emergencia de células gliales aberrantes (flechas blancas) en los alrededores de las motoneuronas (línea blanca punteada). Los gráficos a la derecha muestran el análisis cuantitativo de la astrogliosis y la emergencia de células gliales aberrantes en la médula espinal lumbar. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM; los datos fueron analizados por el test Kruskal-Wallis seguido del test Dunn, ****p<0,00001. N=4 animales por condición.

6. La administración de BANA previene el aumento de la expresión de SCF en astrocitos reactivos, y la infiltración de mastocitos en la médula espinal en ratas hSOD1^{G93A}

Uno de los mecanismos tróficos y pro-inflamatorios de los astrocitos reactivos involucra la expresión de SCF (40). Este factor de crecimiento actúa a través del receptor c-Kit para estimular el crecimiento y diferenciación de varios tipos de células blanco, incluyendo los mastocitos (379). A su vez, los mastocitos son células inmunes con reconocido efecto patogénico en la ELA modulando el compartimento neurovascular y la reactividad de microglías (40,290). Teniendo en cuenta esto, nos preguntamos si la disminución de astrocitos reactivos provocada por BANA en la médula espinal de ratas hSOD1^{G93A} se correspondía con una disminución de la expresión de SCF e infiltración de mastocitos asociada. Como se muestra en la Fig. 13 a, la inmunorreactividad de SCF en las ratas controles es muy baja y no co-localiza con la inmunotinción para GFAP en astrocitos. En comparación, algunos astrocitos reactivos en ratas hSOD1^{G93A} sintomáticas expresan SCF el cual co-localiza con GFAP. Luego del tratamiento con BANA a partir del inicio de síntomas, la expresión de SCF disminuyó significativamente (Fig. 13 a). Por otra parte, también encontramos que los astrocitos SCF+ interactúan espacialmente con numerosos mastocitos c-Kit+ (Fig 13 b). El tratamiento con BANA resultó en una disminución significativa en el número de mastocitos identificados por c-Kit, Quimasa o COX2 que se acumulan en el microambiente celular que rodea las motoneuronas en ratas sintomáticas (Fig 13 c), sugiriendo un efecto quimiotáctico y diferenciador del SCF astrocitario en este nicho.

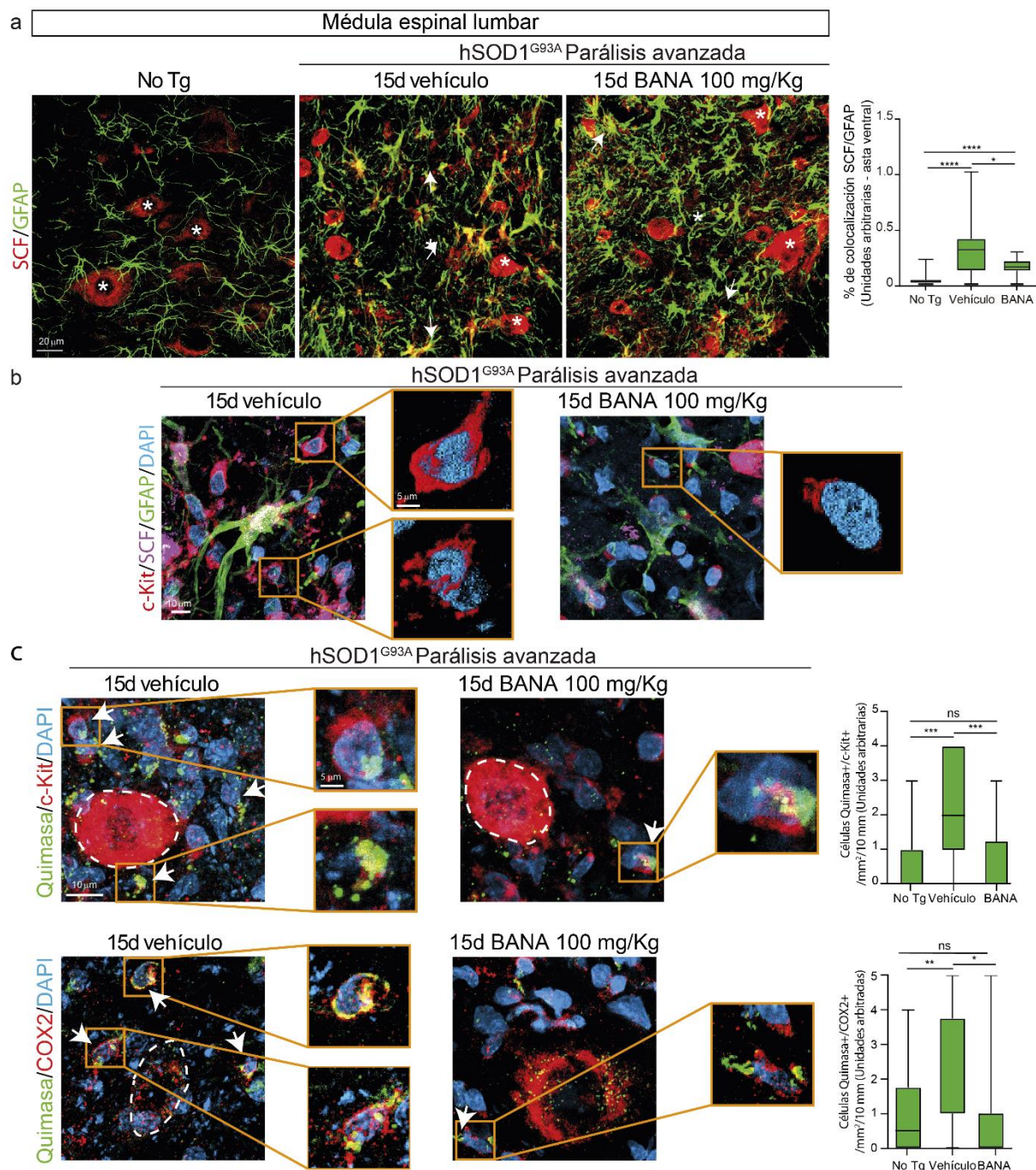


Figura 13. La administración de BANA previene la emergencia de astrocitos SCF+, y la infiltración de mastocitos c-Kit+. a. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de SCF en astrocitos GFAP positivos en el asta ventral de la médula espinal de ratas no transgénicas y ratas hSOD1^{G93A} sintomáticas tratadas con vehículo o BANA. El gráfico a la derecha muestra el porcentaje de colocación de SCF y GFAP en cada condición. El tratamiento con BANA disminuye la expresión de SCF por parte de astrocitos GFAP positivos. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM; los datos fueron analizados por el test Kruskal-Wallis seguido del test de comparación multiple de Dunn, * $p=0,0324$, **** $p<0,0001$. N=4 animales por condición. **b.** Imágenes representativas de microscopía confocal mostrando mastocitos c-Kit positivos rodeando astrocitos GFAP positivos, en el

asta ventral de la médula espinal de ratas hSOD1^{G93A} sintomáticas tratadas con vehículo o BANA. **c.** Imágenes de microscopía confocal mostrando mastocitos quimasa/c-Kit positivos (paneles superiores) y mastocitos quimasa/COX2 positivos (paneles inferiores) rodeando a las motoneuronas (delimitadas por línea blanca punteada). Los gráficos a la derecha muestran la cuantificación del número de mastocitos rodeando a las motoneuronas en el asta ventral de la médula espinal en las distintas condiciones. El tratamiento con BANA disminuyó significativamente el número de mastocitos en la médula espinal de ratas hSOD1^{G93A} sintomáticas respecto al vehículo. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM; los datos fueron analizados por el test Kruskal-Wallis seguido del test Dunn, *p=0,0298 **p=0,0086 ***p=0,0001 ***p=0,0004. N=4 animales por condición.

7. BANA previene la infiltración de mastocitos y enlentece la degeneración de la vía motora periférica

La degeneración de terminales de axones motores en el músculo esquelético y la acumulación de miofibras denervadas en la ELA, se acompaña de una reacción inflamatoria significativa, caracterizada por la remodelación vascular e infiltración de células del sistema inmune incluyendo monocitos, macrófagos, neutrófilos y mastocitos (28). En particular, la acumulación de mastocitos en las vías motoras periféricas se correlaciona positivamente con la progresión de la enfermedad (30,39). Sumado al hecho de que el BANA modula la infiltración de mastocitos en la médula espinal de ratas hSOD1^{G93A}, nos propusimos estudiar qué ocurría a nivel de la periferia cuando los animales eran tratados con BANA. A diferencia de la mayoría de los mastocitos en el sistema nervioso central, los mastocitos periféricos pueden ser identificados por los gránulos metacromáticos característicos luego de la tinción del tejido con azul de toluidina (40). Usando este marcador en tejidos de ratas hSOD1^{G93A} sintomáticas, encontramos que el tratamiento post-parálisis con BANA 100 mg/kg/día durante 15 días, redujo significativamente la infiltración de mastocitos en el músculo extensor de los dedos (EDL) y en el nervio ciático en comparación con los controles tratados con vehículo (Fig. 14 a y b). El tratamiento con BANA disminuyó el número de mastocitos aproximadamente en un 40% en el nervio ciático y un 30% en el músculo EDL con respecto al control tratado con vehículo. BANA también redujo significativamente, con respecto al control, el número de mastocitos con morfología ‘degranulante’, los que se caracterizan por estar rodeados de gránulos metacromáticos extracelulares (Fig. 14 a y b).

Para determinar si el tratamiento de BANA puede ralentizar la degeneración de los axones motores, procedimos a analizar la axonopatía en secciones longitudinales y transversales de nervio ciático y raíces ventrales, respectivamente, luego de la inmuno-tinción de neurofilamentos (sub-unidad pesada). Además, los cortes fueron marcados para visualizar las vainas de mielina. En acuerdo con publicaciones previas de nuestro grupo (26,30,39), las ratas hSOD1^{G93A} sintomáticas tratadas con vehículo muestran una marcada alteración morfológica de grupos de axones (principalmente fragmentación y pérdida axonal), acompañada de demielinización y acumulación de restos de mielina (Fig 15a). En comparación, los animales tratados con BANA mostraron una preservación estadísticamente significativa de los axones y la mielina. Los mismos efectos protectores se observaron en las raíces ventrales de la región lumbar, en donde el tratamiento con BANA disminuyó en más del 50% la pérdida de axones mielinizados (Fig 15a).

Finalmente, para comprobar que el tratamiento de ratas SOD1^{G93A} con BANA previene la atrofia de miofibras esqueléticas en el músculo EDL, analizamos la composición de las fibras musculares usando inmuno-tinción para cadenas de miosina que identifican las fibras tipo 1, 2A y 2B. Estudios previos han establecido que luego de la denervación hay un aumento de miofibras lentas tipo 1, y una pérdida de miofibras rápidas de tipo 2B (380), estas últimas caracterizadas por tener mayor calibre, alta capacidad glucolítica y generar movimientos muy rápidos e intensos. La Fig. 15b muestra secciones transversales representativas del músculo EDL, permitiendo analizar las miofibras lentas de tipo 1 (MyHC-1) y las rápidas del tipo 2A (MyHC-2A) y 2B (MyHC-2B), en los diferentes grupos experimentales. El tratamiento con BANA disminuyó significativamente (aprox. 30%) el aumento de miofibras de tipo 1, con respecto al grupo control. También se observó una tendencia de BANA a prevenir la pérdida de fibras de tipo 2B (Fig. 15b).

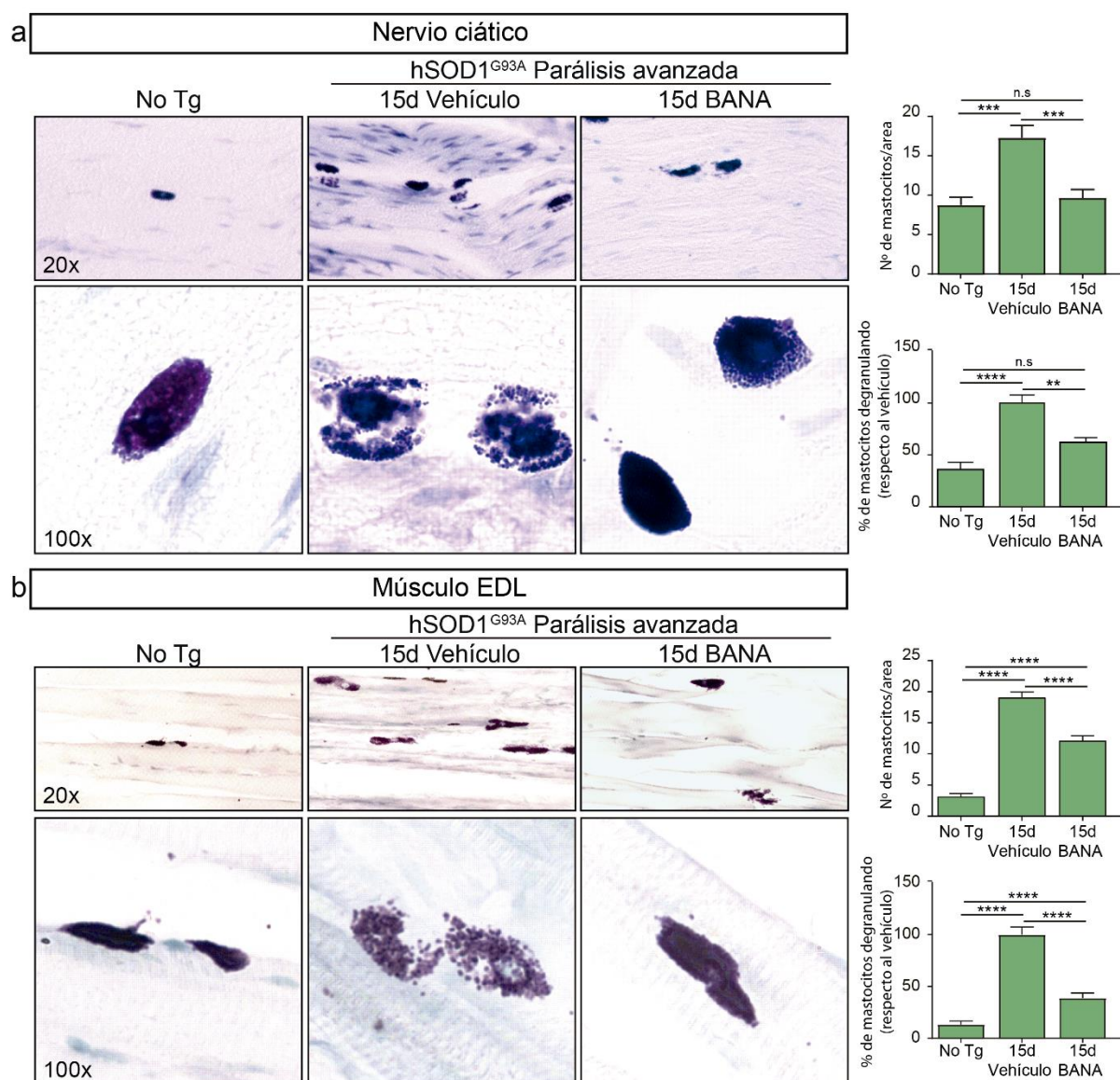


Figura 14. El tratamiento con BANA disminuye significativamente la infiltración y degranulación de mastocitos en la vía motora periférica. a. Imágenes representativas del nervio ciático teñido con azul de toluidina, mostrando el número (paneles superiores) y degranulación (paneles inferiores) de mastocitos, en ratas no transgénicas y ratas hSOD1^{G93A} sintomáticas tratadas con vehículo o BANA. Los gráficos a la derecha muestran la cuantificación del número de mastocitos y del porcentaje de mastocitos degranulados para cada condición. El BANA previno significativamente la infiltración y degranulación de mastocitos en el nervio ciático de ratas hSOD1^{G93A} sintomáticas. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM; los datos fueron analizados por el test Kruskal-Wallis seguido del test de comparación múltiple de Dunn, *** $p=0,0002$ *** $p=0,0001$ ** $p=0,0037$, **** $p<0,0001$. N=4 animales por condición. **b.** Imágenes representativas del músculo extensor (EDL) teñido con azul de toluidina, mostrando el número (paneles superiores) y degranulación (paneles inferiores) de mastocitos, en ratas no transgénicas y ratas hSOD1^{G93A} sintomáticas tratadas con vehículo o BANA. Los gráficos a la derecha muestran la cuantificación del número de mastocitos y del porcentaje de mastocitos degranulados para cada condición. El BANA

previno significativamente la infiltración y degranulación de mastocitos en el músculo de ratas hSOD1^{G93A} sintomáticas. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM; los datos fueron analizados por el test Kruskal-Wallis seguido del test de comparación múltiple de Dunn, ****p<0,0001. N=4 animales por condición.

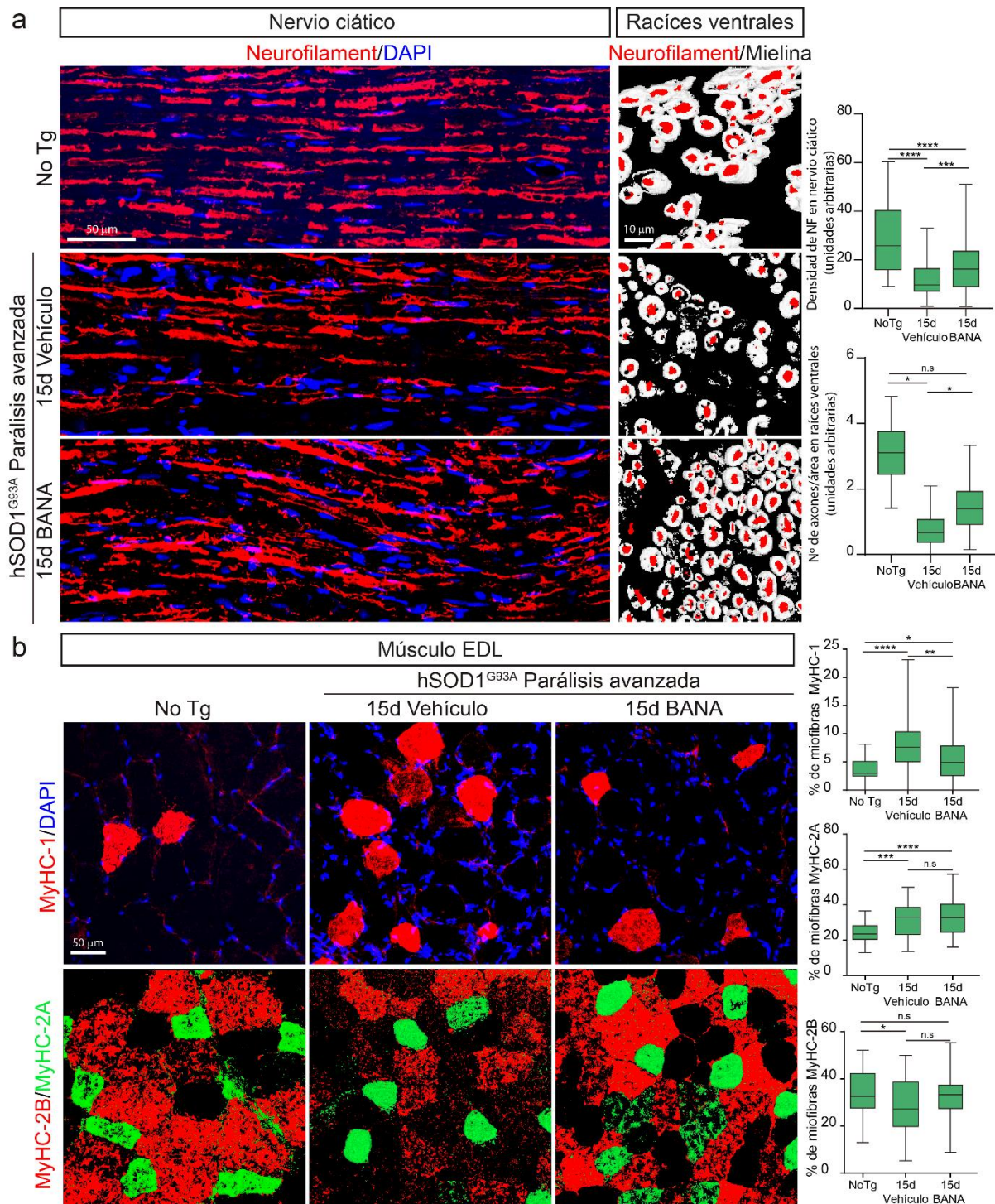


Figura 15. El tratamiento con BANA previene la degeneración de la vía motora periférica. a Imágenes de microscopía confocal de secciones de nervio ciático (paneles a la izquierda) y de raíces ventrales (paneles a la derecha) de ratas no transgénicas y ratas hSOD1^{G93A} tratadas con vehículo o

BANA. Se realizó inmunotinción con neurofilamento (sub-unidad pesada, rojo) o mielina (blanco) para analizar la estructura de los axones en las distintas condiciones. Los gráficos a la derecha muestran la densidad de axones en el nervio ciático y el número de axones en las raíces ventrales para cada condición. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM; los datos fueron analizados por el test Kruskal-Wallis seguido del test de comparación múltiple de Dunn, para la densidad de NF, ***p=0,0004 ****p<0,0001; y por Ordinary one-way ANOVA, seguido del test de comparación múltiple Tukey's, para el número de axones, *p=0,0497 *p=0,0127. N=4 animales por condición. **b.** Imágenes de microscopía confocal de cortes transversales de músculo EDL, marcado con anti-MyHC-1 (fibras musculares lentas, paneles superiores) y anti-MyHC-2 (fibras musculares rápidas, paneles inferiores). Los gráficos a la derecha muestran el porcentaje de miofibras de cada subtipo, respecto a las fibras totales, para cada condición. El tratamiento con BANA de ratas hSOD1^{G93A} al comienzo de los síntomas previene el recambio de fibras de tipo 2 por fibras de tipo 1. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM; los datos fueron analizados por el test Kruskal-Wallis seguido del test de comparación múltiple de Dunn, para fibras de tipo I, *p=0,0330 **p=0,0029 ****p<0,0001; y por Ordinary one-way ANOVA, seguido del test de comparación múltiple Tukey's, para fibras de tipo IIA y IIB, *p=0,0393 ***p=0,0008 ****p<0,0001. N=4 animales por condición.

8. La administración de BANA previene significativamente la patología de las motoneuronas espinales en ratas hSOD1^{G93A}

La pérdida de motoneuronas en pacientes y en modelos animales de ELA es una característica principal de la patología. Por esta razón, analizamos el efecto del tratamiento con BANA sobre el número y tamaño de motoneuronas, así como sobre marcadores de daño neuronal como son la marcación con nitrotirosina y la aparición de agregados de ubiquitina (381,382). Ratas transgénicas hSOD1^{G93A} fueron administradas diariamente vía oral con 100 mg/kg de BANA o vehículo al comienzo de los síntomas. A los 15 días de tratamiento, las ratas fueron eutanasiadas y se disecó la médula espinal para análisis por inmunohistoquímica. En los animales que fueron tratados con vehículo, el número de motoneuronas positivas para ChAT disminuyó en un 40% con respecto a los animales no transgénicos (Fig. 16a). En comparación, el BANA previno significativamente la pérdida de motoneuronas, aumentando el número en un 20-25% con respecto a los controles (Fig. 16a). A su vez el tratamiento con BANA previno significativamente la reducción en el tamaño de las motoneuronas (Fig. 16a) en comparación a las ratas tratadas con vehículo. Sumado a esto, la administración diaria de BANA redujo significativamente la marcación con nitrotirosina y los agregados de ubiquitina en motoneuronas (Fig. 16b).

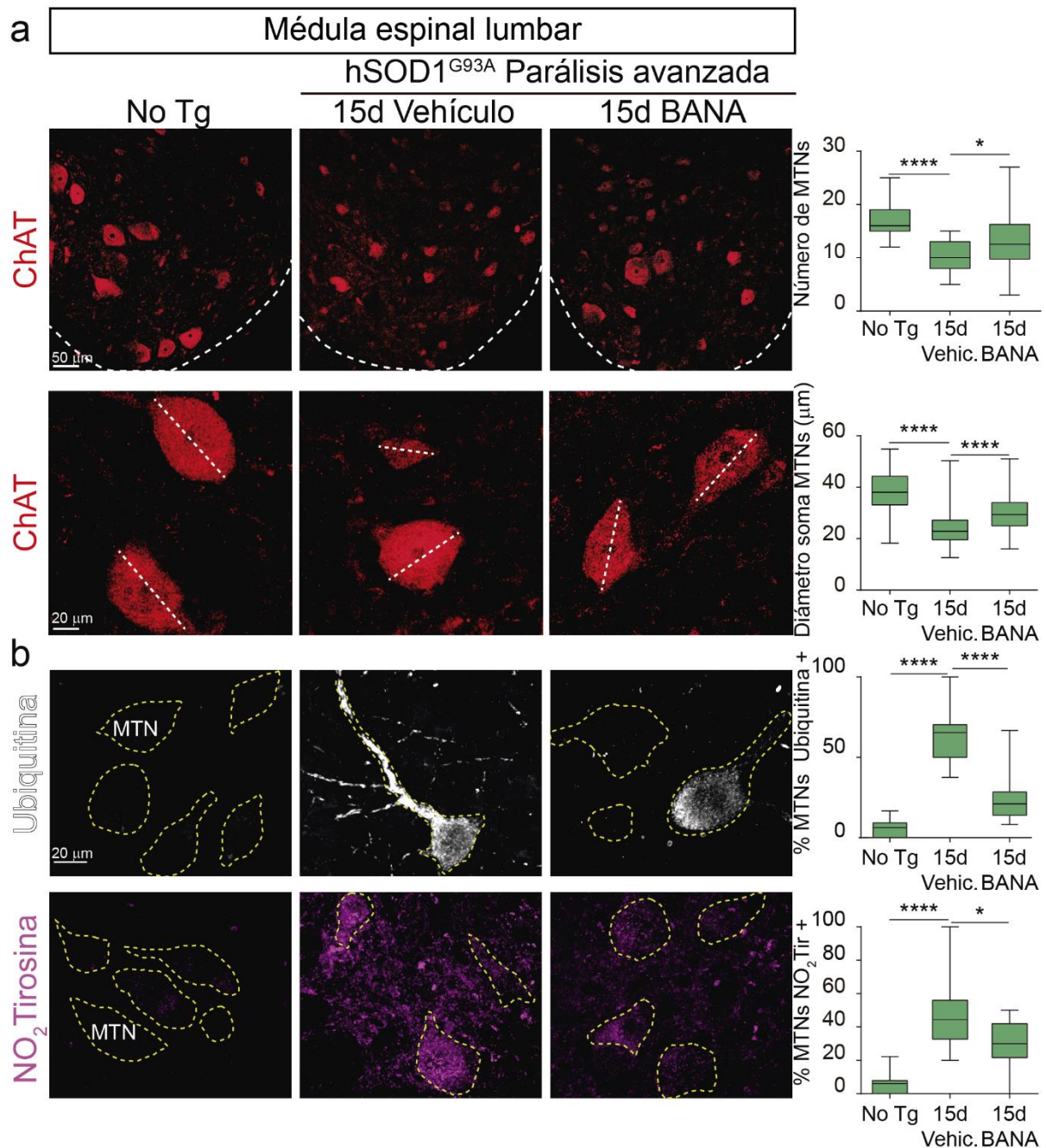


Figura 16. El tratamiento con BANA previene el daño a las motoneuronas. **a.** Los paneles superiores muestran imágenes de microscopía confocal de motoneuronas ChAT positivas en el asta ventral de la médula espinal lumbar de ratas no transgénicas y ratas transgénicas hSOD1^{G93A} tratadas con BANA 100 mg/kg/día o vehículo durante 15 días (la línea punteada delimita la sustancia gris de la blanca). Los paneles inferiores muestran imágenes representativas del análisis de los tamaños de los somas para cada condición experimental. Las gráficas representan el análisis cuantitativo del número (derecha, arriba) y tamaño (derecha, abajo) de motoneuronas para cada condición experimental. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM; los datos fueron analizados por el test Kruskal-Wallis seguido del test Dunn, * $p=0,0217$ **** $p<0,0001$. N=4 animales por

condición. **b.** Análisis por inmunohistoquímica de los agregados de ubiquitina y nitrotirosina en motoneuronas de la médula espinal lumbar. El tratamiento con BANA reduce significativamente los agregados respecto a los observados en los tratados con vehículo. Los gráficos a la derecha muestran el número de motoneuronas que presentan agregados de ubiquitina o nitrotirosina en el asta ventral de la médula espinal lumbar. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM; los datos fueron analizados por el test Kruskal-Wallis seguido del test Dunn, $*p=0,0219$ **** $p<0,0001$. N=4 animales por condición.

Para continuar investigando el efecto protector de BANA sobre la patología de las motoneuronas en ratas sintomáticas hSOD1^{G93A}, analizamos el número de terminales sinápticas contactando a los somas de las motoneuronas en el asta ventral de la médula espinal. El número de terminales sinápticas peri-neuronales ha sido asociado al compromiso funcional y daño de las motoneuronas en condiciones de daño axonal periférico y en la ELA (383,384). En el modelo de ratas hSOD1^{G93A}, el tratamiento post-parálisis con BANA, disminuyó significativamente la pérdida de botones sinápticos en aposición con el soma de motoneuronas en comparación con las ratas tratadas con vehículo (Fig. 17a). Estos fueron analizados mediante inmuno-tinción para las proteínas de vesículas sinápticas sinaptofisina y V-Glut1 (transportador vesicular de glutamato).

Por último, fuimos a evaluar la denervación de las uniones neuromusculares, que está reportado que se correlaciona con la progresión de la parálisis en la ELA (313). Una forma de estimar el grado de denervación es mediante la demostración, por inmunohistoquímica, de la pérdida de contacto entre las terminales motoras, incluyendo elementos presinápticos, y las placas motoras, ricas en receptores colinérgicos. La Fig. 17b muestra imágenes de microscopía confocal representativas del músculo EDL, mostrando que las ratas hSOD1^{G93A} con 15 días de síntomas tienen aproximadamente el 30 % de uniones neuromusculares inervadas (superposición de neurofilamentos y sinaptofisina con b-bungarotoxina). El tratamiento post-parálisis con BANA durante 15 días previno significativamente la denervación de las uniones neuromusculares, con aproximadamente un 50% de uniones neuromusculares inervadas, sugiriendo su efecto neuroprotector en la ELA.

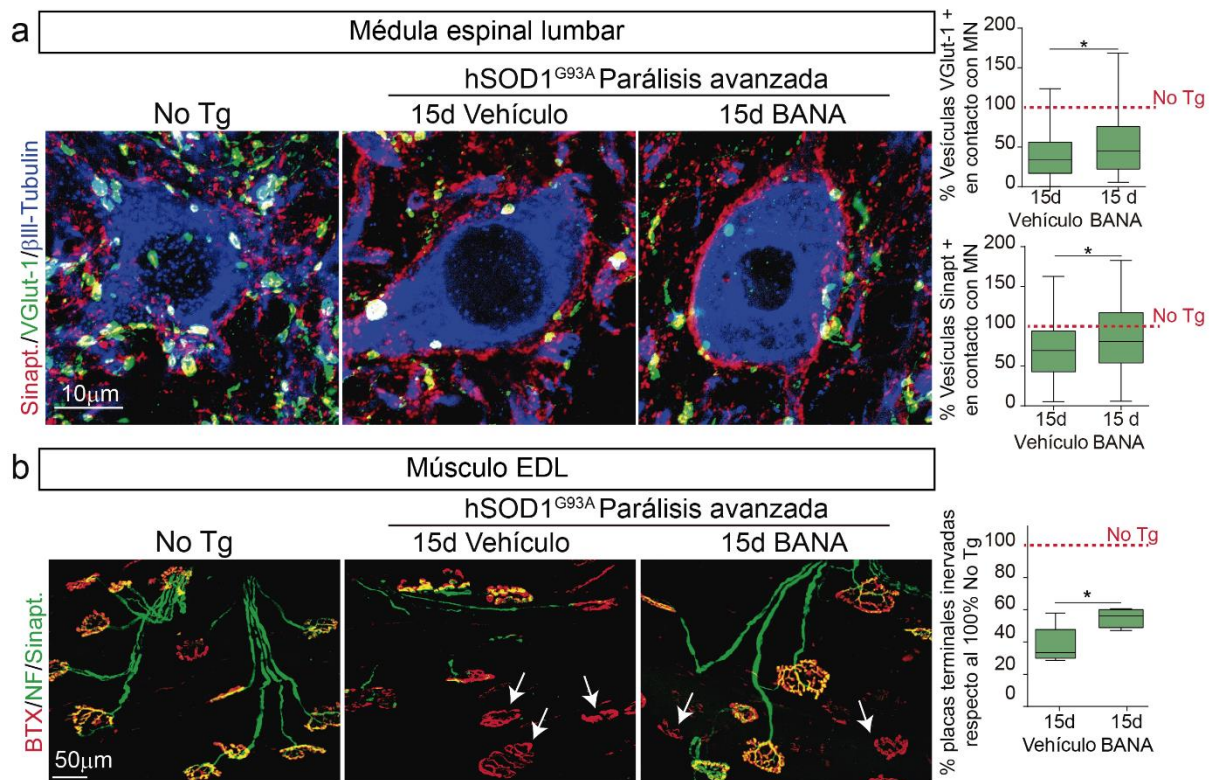


Figura 17. El tratamiento con BANA previene la pérdida de botones sinápticos, en motoneuronas espinales, y de uniones neuromusculares. a. Imágenes representativas mostrando motoneuronas positivas para β III-tubulina (azul) en el asta ventral de la médula espinal lumbar, en contacto con sinapsis identificadas por inmunotinción de vesículas sinápticas VGlut-1 (verde) y sinaptofisina (rojo) positivas. El tratamiento con BANA previno significativamente la pérdida de terminales sinápticas que estaban en contacto con los cuerpos neuronales. Los gráficos representan el análisis cuantitativo del área VGlut-1 y sinaptofisina en contacto con los cuerpos neuronales, expresada como porcentaje respecto a la condición no transgénica (línea roja punteada). Para todos los casos, los datos se expresan como la media $\pm$ SEM, los datos fueron analizados por el test Mann-Whitney o t-test entre los grupos BANA y vehículo, * $p=0,0474$ (VGlut-1), * $p=0,0447$ (sinaptofisina). N= 4 animales por condición. **b.** Análisis de la denervación de uniones neuromusculares en músculo EDL. Los paneles muestran imágenes representativas utilizadas para el análisis de los patrones de innervación de las uniones neuromusculares en las diferentes condiciones. La marcación con α -bungarotoxina-FITC (rojo) fue utilizada para analizar las placas motoras terminales. Las inmunotinciones con los anticuerpos sinaptofisina y neurofilamento (verde) conjugados a Alexa555 fueron utilizadas para visualizar las terminales presinápticas y los axones. Las flechas indican placas motoras denervadas. El gráfico muestra el análisis cuantitativo del área de las uniones, definida como la superposición de neurofilamento/sinaptofisina y α -bungarotoxina, expresada como porcentaje respecto a la condición no transgénica (línea roja punteada). Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM, los datos fueron analizados por Ordinary one-way ANOVA, seguido del test de comparación multiple Tukey's * $p=0.0383$. n = 4 animales por condición.

9. La administración de BANA enlentece significativamente la progresión de la parálisis en las ratas hSOD1^{G93A}.

Finalmente, se diseñó un ensayo de sobrevida de las ratas hSOD1^{G93A} hembras tratadas con BANA, o vehículo, luego del comienzo de la parálisis (Fig 18a). En nuestra colonia tratada con vehículo, el promedio de tiempo que transcurre entre el comienzo de los síntomas y la muerte o eutanasia cuando los animales no logran comer o beber agua, fue de 3 semanas aproximadamente. En comparación, el promedio en la sobrevida de las ratas tratadas con BANA (100 mg/Kg, n=10) desde el comienzo de los síntomas, fue 32% mayor que las ratas tratadas con vehículo. Las curvas de Kaplan-Miers muestran una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,0007$) en la probabilidad de sobrevida entre grupo BANA y vehículo (Fig. 18b). El tiempo medio de sobrevida post-parálisis fue de 21,8 y 29,2 días para los grupos tratados con vehículo y los grupos tratados con BANA respectivamente (Fig. 18c).

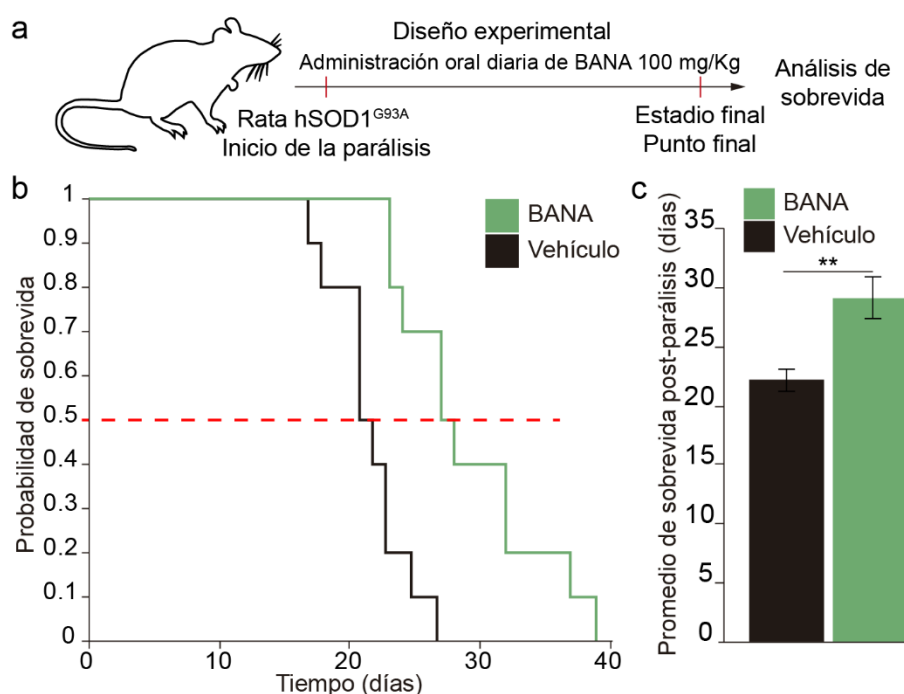


Figura 18. El tratamiento con BANA (100 mg/kg) luego del comienzo de los síntomas en ratas hSOD1^{G93A} aumenta la sobrevida. **a.** Esquema del diseño experimental. Ratas hembra hSOD1^{G93A} fueron tratadas con 100 mg/kg/día de BANA o vehículo desde el comienzo de la parálisis hasta el estadio final (n=10 por grupo). **b.** Curvas de sobrevida Kaplan-Meier de ratas tratadas con BANA o Vehículo. Se observa una diferencia significativa en la probabilidad de sobrevida de los animales tratados con BANA en comparación a los tratados con vehículo ($***p=0,0007$). **c.** Los gráficos

muestran la media de sobrevivencia para ambos grupos. Todos los datos se expresan como la media $\pm$ SEM; los datos fueron analizados por t-test **p=0,0018

Discusión

En el presente trabajo de tesis, analizamos la implicancia de los procesos neuroinflamatorios en la ELA y el potencial terapéutico que puede tener la modulación farmacológica de NF- κ B. Este trabajo estuvo apoyado por otros estudios llevados a cabo por nuestro grupo, en los que se describió la composición del microambiente neurodegenerativo que acompaña la degeneración y muerte de motoneuronas espinales en la ELA (26,30,40,258,385). El análisis del microambiente celular neurodegenerativo permitió postular mecanismos patogénicos que subyacen a la progresión y parálisis progresiva en la ELA, lo que en última instancia permitió identificar fármacos candidatos capaces de modificar la progresión de la enfermedad al modular la respuesta neuroinflamatoria deletérea mediada por microglía activada y mastocitos (14,25,30,39).

En este contexto, el objetivo del presente proyecto fue describir el efecto biológico y terapéutico del ácido (E)-4-(2-nitrovinil) benzoico (BANA) en modelos celulares y animales de ELA, enfocándonos principalmente en los efectos sobre la microglía activada y los mastocitos. Nuestros resultados indican que el BANA es un inhibidor de la vía pro-inflamatoria NF- κ B y que modula la respuesta neuroinflamatoria a lo largo de la vía motora central y periférica, enlenteciendo la progresión de la parálisis en el modelo de rata transgénica hSOD1^{G93A} de ELA, sugiriendo un potencial terapéutico de este compuesto (67).

En general, podemos resumir los aportes realizados durante el presente proyecto de la siguiente manera: i) descripción de microglías peri-neuronales con activación de la vía NF- κ B en un modelo animal de ELA y en muestras necrópsicas de pacientes con ELA; ii) identificación del compuesto BANA como un potente inhibidor de la activación de NF- κ B; iii) determinación del efecto anti-neuroinflamatorio y neuroprotector del BANA; iv) efecto del BANA sobre la infiltración de mastocitos; v) potencial terapéutico del BANA en un modelo de ELA.

i) En el presente trabajo hemos identificado microglías espinales peri-neuronales con activación de la vía NF- κ B, evidenciado por la translocación nuclear de la subunidad p65 de NF- κ B, en ratas hSOD1^{G93A} que cursan parálisis, y

no así en animales no transgénicos. Este hallazgo refuerza evidencias anteriores que indican que la activación de la vía NF- κ B en un número significativo de microglías del asta ventral está asociado a la degeneración de motoneuronas (41,178). La activación de NF- κ B también ha sido reportada en otros modelos de neurodegeneración como enfermedad de Alzheimer y Parkinson (386–388). A diferencia de estos estudios, en el presente trabajo identificamos un subgrupo de microglías hipertróficas con localización nuclear de p65 localizadas en la proximidad de los somas de las motoneuronas en degeneración de la médula espinal. La proximidad de estas células microgliales sugiere que esta población podría ser capaz de ejercer neurotoxicidad directa sobre las motoneuronas, inducida por ejemplo por secreción de factores pro-inflamatorios, radicales libres, o bien por fagocitosis de elementos neuronales. A su vez, la observación de esta población de microglía activada apoya reportes previos que muestran que las motoneuronas en degeneración expresan una extensa variedad de factores tróficos y citoquinas capaces de ser liberados al medio extracelular activando la vía NF- κ B en astrocitos y microglías (24). Mecanismos similares han sido recientemente caracterizados en modelos de sección de nervio periférico (389), aunque el fenotipo glial obtenido no es directamente neurotóxico.

Otra contribución original del presente trabajo es la identificación de microglías espinales peri-neuronales con activación de la vía NF- κ B (traslocación nuclear de la subunidad p65), en la medula espinal lumbar de pacientes con ELA. Nuestro hallazgo confirma estudios previos sobre la fuerte inducción de NF- κ B en la microglía de pacientes con ELA esporádica (178), y propone un subtipo particular de microglía con perfil inflamatorio con localización peri-neuronal que podría tener importancia para el diagnóstico neuropatológico y como blanco terapéutico.

Por lo tanto, la emergencia de microglías peri-neuronales, con activación de la vía NF- κ B, tanto en modelos animales como en pacientes con ELA, indica mecanismos de interacción neurona-microglía fuertemente conservados en diferentes especies (390,391). La interacción entre microglía con activación de la vía NF- κ B y motoneuronas podría ser un mecanismo patogénico central en la ELA (178), que explique en parte la progresión ineluctable de la misma.

ii) **El compuesto BANA** fue concebido con el fin de potenciar el efecto inhibidor del ácido benzoico sobre la vía NF- κ B, reportado previamente en modelos celulares y animales de neurodegeneración (372). La síntesis de BANA fue llevada a cabo por grupos del Institut Pasteur de Montevideo y Facultad de Química. La síntesis de esta molécula estuvo inspirada en estudios previos que muestran que ácidos grasos nitrados endógenos, en particular los nitroalquenos, son capaces de activar vías citoprotectoras e inhibir vías proinflamatorias, incluidas Nrf2-Keap1 y NF- κ B (13,60,369). Algunos de ellos tienen efectos protectores en modelos de ELA (13). De la misma manera, compuestos sintéticos análogos de nitroalqueno-tocoferol también tienen actividad dual anti-inflamatoria y citoprotectora a través de la inhibición de la señalización de NF- κ B y la activación de Nrf2-Keap1, respectivamente (62,370). En este contexto, nuestra hipótesis fue que el BANA podría ejercer efectos antiinflamatorios a dosis farmacológicas en la ELA y con baja toxicidad.

Como mencionamos anteriormente, el nitroalqueno confiere al ácido benzoico la propiedad de actuar como un electrófilo, pudiendo reaccionar en forma covalente y establecer aductos con el glutatión endógeno y residuos de cisteínas en proteínas (392,393). De esta forma, el BANA podría reproducir con mayor potencia los efectos neuroprotectores adjudicados al ácido benzoico en modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson mediante un mecanismo de acción complejo que involucra la inhibición de NF- κ B (57,58). También, otros derivados del ácido benzoico, como el derivado del ácido monohidroxibenzoico, el ácido salicílico, tienen efectos anti-inflamatorios en altas dosis, principalmente a través de la inhibición de NF- κ B (394,395).

Nuestros resultados en cultivos celulares muestran que BANA en concentraciones micromolares bajas, inhibe la activación de la vía NF- κ B tanto en una línea de microglía BV2 como en cultivos primarios de microglía obtenidas a partir de la médula espinal de ratas hSOD1^{G93A} sintomáticas. La activación de NF- κ B fue evidenciada por la translocación nuclear de la subunidad p65, la que fue inducida por exposición a LPS bacteriano que activa el receptor TLR4 (396).

También comprobamos que esta inhibición se correspondía con una inhibición de la transcripción de genes dependiente de NF- κ B, incluyendo los genes pro-inflamatorios MCP-1, IL-6, IL-1 β y TNF- α . Este efecto inhibidor de BANA también se observó en modelos animales de inflamación. Concentraciones comparables de ácido benzoico no tuvieron efectos inhibidores de la vía NF- κ B, tanto en los modelos celulares como animales, indicando que la adición del grupo nitroalqueno (y su reactividad como electrófilo) al ácido benzoico resulta en un aumento significativo del efecto farmacológico. A su vez, el efecto inhibidor del BANA sobre la vía NF- κ B, mostró ser significativamente mayor al fármaco dimetilfumarato, conocido por su reactividad electrofílica y por su actividad inhibitoria de NF- κ B en determinadas condiciones y tipos celulares (397). Este último dato resulta de interés teniendo en cuenta que el dimetilfumarato ha sido aprobado como inmodulador en Esclerosis Múltiple y está siendo evaluado terapéuticamente en pacientes con ELA (65,66,398). En su conjunto, estos resultados apoyan fuertemente que NF- κ B es un blanco molecular de BANA, lo que explica al menos en parte, su efecto anti-neuroinflamatorio en la ELA.

Si se tiene en cuenta que las subunidades que forman parte del dímero NF- κ B contienen un residuo cisteína (cys38 en la subunidad p65), y que el grupo tiol de las cisteínas pueden participar en reacciones enzimáticas como nucleófilos (399), es posible que el BANA reaccione con estas cisteínas impidiendo la disociación del complejo, su ingreso al núcleo y la consecuente actividad transcripcional de genes asociados a la inflamación. Igualmente, la inhibición de la vía podría no ser causada por la reacción directa del BANA con el dímero NF- κ B si no que este podría estar actuando sobre la proteína inhibidora del dímero, I κ B α , que tiene un residuo cisteína (cys179) (400). Incluso, el BANA podría estar modulando la activación de la enzima quinasa I κ B, encargada de fosforilar a I κ B α , reaccionando con los residuos cisteína de los receptores TLR (del inglés, "*toll liker receptors*") (401,402).

iii) El efecto anti-neuroinflamatorio y neuroprotector del BANA en ratas hSOD1^{G93A}, fue determinado en animales tratados durante 15 días a una dosis 100mg/kg/día al comienzo de los síntomas. El análisis inmunohistoquímico de la médula espinal mostró que el BANA disminuye drásticamente la activación de la vía

NF- κ B (traslocación nuclear de p65) y la microgliosis en la médula espinal, así como la astrogliosis y la emergencia de células gliales aberrantes. Por otro lado, el tratamiento con BANA se asoció a una preservación del número y tamaño de motoneuronas espinales y de las uniones neuro-musculares inervadas, así como de los botones sinápticos en aposición con el soma de motoneuronas, sugiriendo la protección integral de la vía motora. En su conjunto estos resultados sugieren que BANA modula la respuesta neuroinflamatoria, orquestada por las células gliales, que se encuentra asociada a la muerte de motoneuronas y a la rápida progresión de la enfermedad.

El efecto terapéutico de BANA observado en estos ensayos realizados en ratas hSOD1^{G93A} es compatible con la inhibición, al menos parcial, de NF- κ B, principalmente en la población de microglías activadas. La transcripción mediada por NF- κ B ocurre en neuronas y astrocitos, y en condiciones fisiológicas se considera que tiene el objetivo de mantener un estado regenerativo (349). Sin embargo, en el contexto de la neurodegeneración la activación exacerbada y mantenida en el tiempo de NF- κ B en microglías puede tener efectos deletéreos (178,386,403,404). Por lo tanto, consideramos que el potencial de BANA de inhibir preferentemente la activación de NF- κ B en microglías que rodean a las motoneuronas, resulta en una disminución de la microgliosis y particularmente de aquellos fenotipos de microglía neurotóxica que subyacen a la progresión de la parálisis en la ELA (14,21,168). El mecanismo de acción del BANA a nivel molecular, más allá de la inhibición de la traslocación nuclear de p65, ha sido muy difícil de precisar. Se debe tener en cuenta que a nivel transcripcional la vía NF- κ B controla la expresión de más de 500 genes asociados a respuestas inflamatorias, tanto de tipo neurotóxico como neuroprotectivos (405), lo que muestra la complejidad de esta vía y la variabilidad entre diferentes tipos celulares(353). El efecto anti-neuroinflamatorio del BANA en microglías podría deberse a efectos sinérgicos del fármaco incluyendo, por ejemplo, la inhibición de la vía NF- κ B conjuntamente con la activación de otras vías transcripcionales que son moduladas por fármacos electrofílicos, como es el caso de Nrf2-ARE y/o PPAR γ (369,370). Además, el BANA también podría tener como blanco otros residuos de cisteína relevantes que afecten el estado conformacional y la neurotoxicidad de la SOD1

mutada (406,407). Finalmente, debido a la administración sistémica de BANA, no podemos establecer que sus efectos sean principalmente a nivel del SNC, ya que también va a actuar sobre las células circulantes que se puedan estar reclutando a los distintos de degeneración a lo largo de toda la vía motora.

iv) El efecto de BANA sobre mastocitos, tanto en el nicho que rodea a las motoneuronas en la médula espinal como en el músculo esquelético y nervio ciático en ratas hSOD1^{G93A} fue determinado mediante inmunohistoquímica. La disminución de mastocitos en la médula espinal se correlacionó con una disminución significativa en el número de astrocitos expresando SCF, el ligando de c-Kit, que promueve la supervivencia, la migración y la diferenciación de mastocitos y que podría ser el factor trófico clave para el reclutamiento y diferenciación de los mastocitos en los sitios de daño (408). La presencia de mastocitos en el nicho entre los somas de las motoneuronas y la microvasculatura peri-neuronal ha sido reportado por nuestro grupo, tanto en modelos murinos como en pacientes con ELA (40). Estos mastocitos se encuentran estrechamente asociados a astrocitos que expresan SCF, y a la microvasculatura alterada, lo que sugiere una causalidad entre la infiltración de mastocitos, la expresión de SCF por parte de los astrocitos, y la permeabilidad de la barrera hemato-médula espinal (40). No es claro el mecanismo por el cual BANA disminuye la expresión de SCF astrocitario. En ausencia de una activación masiva de NF- κ B en los astrocitos espinales en la ELA, planteamos un efecto indirecto de BANA a través de la modulación de la microglía activada por NF- κ B. Estudios previos muestran que la activación exacerbada de la microglía es capaz de inducir un fenotipo activado y neurotóxico de astrocitos, denominados A1, en diversas enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la ELA (235,236,238).

Nuestros resultados muestran que la administración de BANA disminuye significativamente la infiltración y acumulación de mastocitos a lo largo de la vía motora periférica en ratas hSOD1^{G93A}, incluyendo raíces ventrales, el nervio ciático, y el endomisio. Este hallazgo confirma estudios previos, que señalan la correlación entre la infiltración de mastocitos y la progresión de la ELA (30,40,255). Además, este efecto protector del BANA se correlacionó con la preservación histopatológica de la degeneración. En este sentido, un mecanismo de acción de BANA a nivel

periférico podría estar mediado por la inhibición de NF- κ B en células mieloides que infiltran masivamente las fibras motoras y las musculares degenerantes en la ELA (26). Es interesante resaltar que los macrófagos periféricos activados expresan altos niveles de SCF (26), y su activación inflamatoria puede estar mediada por la vía NF- κ B (409), sugiriendo una vez más, un mecanismo indirecto por el cual el BANA podría inhibir la amplificación de la inflamación mediada por macrófagos, y el reclutamiento de mastocitos y neutrófilos (409,410).

Si bien los mastocitos forman parte integral del microambiente celular degenerativo, existe escaso conocimiento sobre los efectos neurotóxicos que estas células pueden ejercer sobre las motoneuronas. Los mastocitos tienen el potencial de liberar proteasas, citocinas, factores tróficos y mediadores vasoactivos con potentes efectos sobre el funcionamiento y supervivencia de neuronas (298–300,311). Los mastocitos también pueden liberar especies del factor de crecimiento nervioso (NGF) (411), lo que puede conducir a una señalización proapoptótica a través de receptores de neurotrofinas de 75 kD (p75^{NTR}), que se expresan de manera anormal en las motoneuronas en la ELA (412). A su vez, en los procesos neuroinflamatorios, el diálogo entre mastocitos y microglías ha sido reconocido como un mecanismo deletéreo que promueve la neuroinflamación y la neurodegeneración, siendo posiblemente la microglía y los defectos en la barrera hemato-encefálica los principales efectores de la neurodegeneración relacionada a la infiltración de mastocitos (290,413).

A nivel periférico, se reconoce que los mastocitos “degranulantes” pueden provocar efectos regresivos en el músculo, incluyendo fibrosis y depósito de colágeno a través de la liberación de varios mediadores, como citocinas y TGF β (414,415). Esta fibrosis podría afectar negativamente la plasticidad y el crecimiento del axón motor, así como la reinervación de las sinapsis neuromusculares. Por lo tanto, postulamos que los mastocitos en desgranulación tienen el potencial de desencadenar directa o indirectamente daños en las miofibras e indirectamente en las terminaciones nerviosas motoras y las células de Schwann asociadas a las uniones neuromusculares, un mecanismo patogénico que puede ser modulado por BANA.

En el presente trabajo nos enfocamos en estudiar el efecto de BANA sobre la vía NF- κ B en microglia y los efectos indirectos del fármaco sobre los mastocitos. Es reconocido que las microglías y mastocitos establecen interacciones bidireccionales (290), por lo que la inhibición de NF- κ B en microglia podría disminuir la infiltración de mastocitos y los daños microvasculares a lo largo de la vía motora. Alternativamente, existe la posibilidad de un efecto directo de BANA sobre precursores de mastocitos, a través de la inhibición de NF- κ B, lo que cambiaría directamente el comportamiento o la diferenciación de mastocitos, como sugieren algunos reportes (416,417). Pero un hallazgo significativo de nuestro trabajo ha sido la interacción espacial de mastocitos con astrocitos reactivos que expresan SCF, que sugiere que el BANA actúa de manera indirecta sobre los astrocitos para reducir la producción del principal factor trófico y quimiotáctico de mastocitos. En investigaciones futuras se podrá establecer los mecanismos por los cuales el BANA disminuye esta población de astrocitos SCF+.

v) El potencial terapéutico del BANA en la ELA fue puesto en evidencia en ensayos usando ratas hSOD1^{G93A}. Observamos un aumento significativo de la probabilidad de supervivencia de los animales tratados en comparación con el grupo control. Los animales tratados con BANA aumentaron en un 32% la probabilidad de supervivencia post-parálisis. Actualmente existen pocos reportes de fármacos que aumenten la supervivencia cuando son administrados luego del comienzo de la parálisis en modelos de ELA. En este sentido, el compuesto BANA puede ser comparado con masitinib, cuya capacidad terapéutica en este mismo modelo animal presenta un perfil similar en cuanto a la supervivencia (14,30,39,40). Si bien ambos fármacos son capaces de disminuir significativamente la inflamación neurotóxica desencadenada por microglía y mastocitos, estos lo hacen por mecanismos moleculares diferentes. En el caso del BANA nuestros resultados muestran una reducción significativa de la microglía peri-neuronal con expresión nuclear de NF- κ B-p65, lo que sugiere el potencial de BANA para prevenir la emergencia y los efectos neurotóxicos de este subconjunto particular de microglías. Por su parte, los efectos directos sobre la vía NF- κ B de masitinib no han sido estudiados en profundidad, pero sus mecanismos

de acción parecen enfocarse en otras vías (14,30,40), sugiriendo una potencial sinergia que podría establecerse con el uso combinado de estos dos fármacos.

Las ratas hSOD1^{G93A} que recibieron tratamiento diario con BANA no solo tuvieron una supervivencia significativamente más prolongada y una reducción en la microglía peri-neuronal con activación de la vía NF-κB, sino que también mostraron una preservación significativa de las estructuras neurales a lo largo de toda la vía motora. En primer lugar, se observó una prevención de la degeneración de motoneuronas, evaluado por la reducción de motoneuronas con inmunorreactividad para ubiquitina, un indicador de estrés del retículo endoplásmico y proteinopatía, y nitrotirosina, un marcador de estrés oxidativo y nitrativo que precede a la apoptosis en motoneuronas (381,382). Además, el tratamiento con BANA conservó el número y tamaño de las motoneuronas espinales, el número de uniones neuromusculares inervadas en el músculo EDL, y la estructura de nervio, raíces y músculo, lo que confirma con mayor robustez, el efecto neuroprotector de BANA en este modelo murino de ELA.

Actualmente existen pocos fármacos aprobados para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, y los efectos terapéuticos de todos ellos son de escaso impacto en la clínica (418–421). En el caso de la ELA, se cuenta con dos fármacos aprobados para su tratamiento, el riluzol y la edaravona, que tienen efectos terapéuticos modestos en la mayoría de los pacientes (47,48,422). Desde la aprobación del riluzol a comienzos de los 90, se han realizado ensayos preclínicos y clínicos con un amplio número de fármacos para el tratamiento de la ELA, y si bien varios de estos compuestos tuvieron resultados prometedores al ser ensayados en modelos animales, fracasaron una vez trasladados a la clínica (423). Esto refleja la complejidad de la enfermedad y destaca la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos para retrasar la progresión de la parálisis, con la esperanza de convertir esta enfermedad mortal en una condición crónica.

Si bien en los últimos años se ha profundizado en el conocimiento de la asociación directa que tiene el factor de transcripción NF-κB con la neuroinflamación y la progresión de la ELA (41), aún no se cuenta con terapias que puedan modular

específicamente la activación de dicho factor. En este sentido, en el presente trabajo describimos el efecto de un nuevo compuesto, el BANA, el cual aparece como un nuevo tipo de fármaco para el tratamiento de la ELA, actuando en forma multifacética inhibiendo la vía NF- κ B. Por un lado, este compuesto tiene la actividad propia derivada del ácido benzoico previamente descrita (57,58). Por otro lado, el grupo nitroalqueno le confiere la capacidad de reaccionar con grupos nucleofílicos como el glutatión o los grupos sulfhidrilo en los residuos de cisteína presentes en complejos proteicos que controlan vías de señalización (392,393). La reactividad con residuos de cisteína en complejos proteicos que controlan vías de señalización inflamatorias como NF- κ B, Keap1-Nrf2 y PPAR γ puede tener un valor terapéutico importante en enfermedades neurodegenerativas (367,404). En este contexto, BANA puede compararse con ácidos grasos nitrados electrofílicos endógenos que, además de inhibir NF- κ B a través de la reacción covalente con NF- κ B-p65, también inducen las vías Keap1/Nrf2 (60,369) y ejercen efectos neuroprotectores en modelos murinos de la enfermedad (13). Como nos referimos más arriba, BANA también podría compararse con el fármaco electrofílico dimetilfumurato, aprobado para el tratamiento de la esclerosis múltiple, aunque el mecanismo de acción del dimetilfumurato parece implicar principalmente la activación de Keap1/Nrf2 además de la inhibición de NF- κ B (65,398,424).

Conclusiones y Perspectivas

En conclusión, en este trabajo de tesis mostramos evidencia del efecto neuroprotector del derivado nitroalqueno del ácido benzoico (BANA) en un modelo de ELA hereditaria, cuando es administrado después del inicio de la parálisis. Si bien los efectos inhibitorios de BANA sobre la activación de NF- κ B son sistémicos y posiblemente involucran muchos tipos de células de linaje neural, inmune y muscular, nuestros resultados identifican un subconjunto de microglía NF- κ B positiva asociada a la ELA que rodea las motoneuronas espinales como blancos celulares relevantes del fármaco. En virtud de las interacciones reconocidas de las microglías con astrocitos y mastocitos, el BANA también parece actuar indirectamente sobre la acumulación de astrocitos reactivos SCF $^{+}$ y de mastocitos en la médula espinal. Sin embargo, queda por determinar en investigaciones futuras si, más allá del efecto anti-inflamatorio y la disminución de células gliales

neurotóxicas, el BANA puede actuar directamente protegiendo los somas de las motoneuronas espinales, la axonopatía periférica y la denervación de las placas motoras, como hemos observado en nuestras investigaciones.

Si bien el presente trabajo de tesis muestra evidencia pre-clínica contundente sobre el potencial efecto terapéutico de BANA en la ELA, la caracterización final de los efectos moleculares del fármaco deberá ser profundizada. Siendo el BANA una molécula electrofílica potencialmente capaz de activar sistemas transcripcionales citoprotectores como Keap1/Nrf2 y PPAR γ , como es el caso de otros compuestos electrofílicos (367,425,426), la contribución de estos mecanismos en los efectos terapéuticos deberá ser analizada en profundidad. BANA podría ser un modulador específico de varias poblaciones de células inmunes a nivel periférico que son disfuncionales en la ELA (30,255). También se podrían reconocer otros blancos moleculares de BANA, a través de estudios proteómicos que identifiquen proteínas relevantes -como receptores, transportadores, quinasas, proteínas mitocondriales, etc- que formen aductos con BANA a través de residuos de cisteína. Finalmente, otro requisito que deberá cumplirse para que BANA sea considerado como candidato para la terapéutica humana es que el fármaco conserve los efectos neuroprotectores en otros modelos animales de ELA, por ejemplo, en modelos transgénicos expresando mutaciones de TDP-43 o de FUS, así como en modelos de Enfermedad de Alzheimer y de Parkinson.

Métodos

1. Ensayo de citotoxicidad del BANA en cultivos celulares: sulforodamina B

En todos los casos la citotoxicidad de BANA fue determinada por el ensayo de sulforodamina B. Para ello, las células fueron colocadas en una placa de 96 pocillos y se incubaron con diferentes concentraciones del compuesto (5-110 μM) durante 24 horas. Posteriormente se removió el medio de cultivo, las células se lavaron dos veces con PBS pH = 7.4 y se fijaron con ácido tricloroacético durante una hora a 4°C. Luego se lavaron las células cinco veces con agua destilada se agregaron 50 μL de sulforodamina B 0.4% m/v en ácido acético 1% v/v a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurridos los 30 minutos, se lavó la placa al menos cinco veces con ácido acético 1% v/v. Finalmente se dejó secar la placa, se disolvió el colorante unido a proteína en Tris 10 mM, y se midió la absorbancia a 570 nm utilizando un espectrofotómetro de microplaca. La concentración que mató a la mitad de las células testeadas en cultivo (LC_{50}) fue determinada utilizando herramientas de análisis del software GraphPad Prism 7.03.

2. Estudio de la translocación nuclear de NF- κB :

a. en línea celular reportera HT-29.

El efecto de BANA sobre la translocación nuclear de NF- κB se estudió en células HT-29 reporteras (373). Las células fueron tratadas con dosis crecientes de BANA (10, 20 y 30 μM), ácido benzoico (30 μM), dimetilfumarato (30 μM) o vehículo (DMSO) durante 3 horas. Luego del tratamiento, las células fueron estimuladas y co-incubadas con TNF- α (1 ng/ml) por 24 horas. Finalmente, las células fueron tripsinizadas y resuspendidas para análisis por citometría. Las células fueron analizadas usando el citómetro de flujo Attune NxT equipado con los láser de 488 y 405 nm. El software Attune NxT se utilizó para la adquisición y el software FlowJo v.10 para análisis de datos. Las emisiones de fluorescencia de la proteína verde fluorescente y del yoduro de propidio fueron detectadas usando filtros de banda 530/30 y 695/40, respectivamente. Para cada muestra se registraron 10000 eventos delimitados en un diagrama de puntos de dispersión frontal vs dispersión lateral, excluyendo los dobletes. Sólo se tuvieron en cuenta células vivas (aquellas que excluyen al yoduro de propidio) para los resultados.

b. en la línea celular de microglía murina BV2.

El efecto del BANA sobre la translocación nuclear de NF- κ B fue estudiado por inmunocitoquímica utilizando la línea celular de microglía BV2. Para ello las células fueron tratadas con BANA a distintas dosis (10, 20 y 30 μ M), ácido benzoico (30 μ M), o dimetilfumarato (30 μ M) durante 3 horas. Luego del tratamiento las células fueron estimuladas con LPS (100 ng/ml) por 30 minutos. Una vez finalizado el estímulo, las células fueron fijadas con PFA 4% durante 20 minutos a 4°C. La inmunocitoquímica se realizó de la siguiente manera: las células fueron permeabilizadas usando tritón 0.5% (v/v) en PBS durante 15 minutos, y luego se realizó el bloqueo usando BSA 5% (v/v) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios anti-NF- κ B-p65 (Abcam, # ab16502) y anti-CD11b (BD Bioscience, #BD550219) se incubaron durante la noche a 4°C. Luego, se removieron los anticuerpos primarios, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS y se incubaron las células con los anticuerpos secundarios conjugados a Alexa fluor 488/546 durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar los con PBS, las células se cubrieron con glicerol 70% en PBS con tinción DAPI. Las células se analizaron mediante microscopía confocal utilizando el microscopio confocal ZEISS LSM 800. Se contaron los núcleos positivos NF- κ B-p65, se analizó la relación NF- κ B-p65/DAPI y se comparó entre grupos. Los datos se analizaron utilizando herramientas de análisis del software ImageJ y GraphPad Prism 7.03.

c. en microglía adulta hSOD1^{G93A} aislada de la médula espinal de ratas transgénicas sintomáticas.

El efecto del BANA sobre la translocación nuclear de NF- κ B fue estudiado por inmunocitoquímica en cultivos primarios de microglía hSOD1^{G93A} aislada de ratas transgénicas sintomáticas. Las células fueron tratadas con BANA a distintas dosis (10, 20 y 30 μ M), ácido benzoico (30 μ M), o dimetilfumarato (30 μ M) durante 3 horas. Luego del tratamiento las células fueron estimuladas con LPS (100 ng/ml) por 30 minutos. Una vez finalizado el estímulo, las células fueron fijadas con PFA 4% durante 20 minutos a 4°C. La inmunocitoquímica se realizó de la siguiente manera: las células fueron permeabilizadas usando Tritón X-100 0.5% (v/v) en PBS durante 15 minutos, y luego se bloquearon usando BSA 5% (v/v) en PBS durante 1 hora a

temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios anti-NF- κ B-p65 (Abcam, # ab16502) y anti-CD11b (BD Bioscience, #BD550219) se incubaron durante la noche a 4°C. Luego, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS y se incubaron las células con los anticuerpos secundarios Alexa fluor 488/546 durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS, las células se cubrieron con glicerol 70% en PBS con tinción DAPI. Las células se analizaron mediante microscopía confocal utilizando el microscopio confocal ZEISS LSM 800. Se contaron los núcleos positivos NF- κ B-p65, se analizó la relación NF- κ B-p65/DAPI y se comparó entre grupos. Los datos se analizaron utilizando herramientas de análisis del software ImageJ y GraphPad Prism 7.03.

3. Cultivo celular de microglía hSOD1^{G93A}.

Los cultivos primarios de microglía fueron obtenidos de la médula espinal de ratas hSOD1^{G93A} sintomáticas de acuerdo a los procedimientos descritos por Trias et al. 2013 (167) con algunas modificaciones. Los animales fueron eutanasiados por sobredosis con ketamina/xilacina, y la médula espinal fue disecada. Después de eliminar las meninges, la médula espinal se cortó finamente y se hizo una digestión enzimática con tripsina al 0,25% (v/v) en un buffer sin calcio durante 5 min a 37 ° C. El tratamiento con tripsina se detuvo agregando DMEM 10% de suero fetal bovino (vol/vol), en presencia de 50 mg / mL de DNasal y se continuó con disgregación mecánica del tejido por pipeteo repetido. El extracto resultante se filtró a través de una malla de 80 μ m para eliminar los restos de tejido y luego se centrifugó. El pellet resultante se resuspendió en medio de cultivo [DMEM 10% suero fetal bovino (vol/vol), Hepes (3.6 g / L), penicilina (100 UI / mL) y estreptomicina (100 mg / mL)] y luego se colocó en una placa de 24 pocillos o en placas de Petri p35. El medio de cultivo se retiró a las 24 h y posteriormente se reemplazó cada 24 o 48 horas según el procedimiento.

4. Análisis de la expresión de genes dependientes de la vía NF- κ B por RT-qPCR.

El efecto del BANA sobre la expresión génica dependiente de NF- κ B se estudió mediante RT-qPCR en cultivos primarios de microglía hSOD1^{G93A} adulta. Las células se trataron con BANA (10, 20 y 30 μ M) durante 3 horas. Después del

tratamiento, las células se estimularon con LPS (100 ng/ml, 30 minutos). Luego de recolectar las células, se realizó la extracción de ARNm con el kit RNeasy Micro (QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los rendimientos de ARNm se midieron en un dispositivo Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) y el ADNc se obtuvo a partir de 0,5 µg de ARN y 4 µl del supermix de retrotranscripción de iScript para RT-qPCR en un volumen final de 20 µl con agua libre de nucleasas. El termociclador se fijó de la siguiente manera: cebado 5 minutos a 25°C seguido de 30 minutos a 42°C para la transcripción inversa y 5 minutos a 85°C para inactivación de la RT. Se realizó RT-qPCR sobre el ADNc obtenido de la transcripción inversa utilizando SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (BIO-RAD) en un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch™. Para cada pocillo, se agregaron 5 µl de ADN diluido a 20 µl de la mezcla (que contenía 1 µl de cada cebador, 12,5 µl de SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix, 5,5 µl de agua libre de nucleasas). Cada muestra se corrió por duplicado. Los parámetros de los ciclos fueron los siguientes: 30 segundos a 95°C, luego 40 ciclos a 95°C durante 10 segundos, y 30 segundos a 60°C. Se obtuvieron valores de Cq para cada ciclo. Los cebadores se diseñaron en NCBI Primer-BLAST siguiendo las mejores pautas para excluir la amplificación del ADN genómico. El análisis se realizó utilizando BioRad CFX manager 3.1 con un umbral establecido en 650 RFU correspondiente a la porción lineal de las curvas de amplificación. Las variaciones entre las muestras se normalizaron utilizando dos genes internos, β-actina y HPRT. Todos los cebadores fueron validados por su especificidad y eficiencia. Se utilizaron los siguientes cebadores de rata:

TNF-α forward: 5´ - ATC CGA GAT GTG GAA CTG GC -3´;
 TNF-α reverse: 5´ - TGG GAA CTT CTC CTC CTT GTT G -3´;
 IL-6 forward: 5´ - TTC TCT CCG CAA GAG ACT TCC -3´;
 IL-6 reverse: 5´ - TCT CCT CTC CGG ACT TGT GAA -3´;
 MCP-1 forward: 5´ - TGT CTC AGC CAG ATG CAG TTA AT -3´;
 MCP-1 reverse: 5´ - TCC AGC CGA CTC ATT GGG AT -3´.
 IL-1β forward: 5´ - TAG CAG CTT TCG ACA GTG AGG -3´;
 IL-1β reverse: 5´ - CTC CAC GGG CAA GAC ATA GG -3´;
 HPRT forward: 5´ - GTC ATG TCG ACC CTC AGT CC -3´.
 HPRT reverse: 5´ - GCA AGT CTT TCA GTC CTG TCC -3´

5. Análisis de la activación de la vía NF- κ B *in vivo*.

a. Imagenología in vivo en ratones

Para el estudio de imagenología *in vivo* utilizamos el modelo de ratón transgénico NF- κ B-RE-Luc (Taconic, BALB/c-Tg(Rela-luc)31Xen). Estos animales portan un transgen que contiene 6 elementos de respuesta a NF- κ B (RE) del promotor CMV colocado arriba de un promotor basal SV40, y un ADNc de luciferasa de luciérnaga modificado (Promega pGL3). El reportero es inducible por la inyección intraperitoneal de LPS o TNF- α . Los animales fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos e inyectados vía intraperitoneal con dosis crecientes de BANA (10, 20 y 30 mg/kg), ácido benzoico (30 mg/kg), dimetilmumarato (30 mg/kg), o vehículo (DMSO 10% (v/v)/PEG 20% (v/v) en buffer fosfato). Luego de dos horas los animales fueron inyectados vía intraperitoneal con LPS (1 mg/kg). La diferencia en la actividad luciferasa entre grupos fue comparada a las 3 horas de haber realizado la inyección de LPS. Para lograr esto se inyectaron intraperitonealmente 150 mg/kg del sustrato D-luciferina (#K9918PE, XenoLight) disuelto en buffer fosfato salino a cada ratón. Los ratones fueron anestesiados con isoflurano (3,0% inducción, 2,5% mantenimiento), colocados en posición ventral en la cámara de imágenes hermética. Se tomaron imágenes a los 10 minutos de la inyección de luciferina, utilizando los modos bioluminiscencia y rayos X (adquisición de 5 segundos, realizada en el equipo In Vivo Xtreme II Optical/Xray Imaging system, Bruker, USA). Los cambios en la actividad NF- κ B fueron calculados luego de comparar las diferencias de luminiscencia entre grupos utilizando herramientas de análisis del software ImageJ y GraphPad Prism 7.03.

b. Desafío con LPS en ratones.

Ratones C57BL/6 fueron divididos aleatoriamente en 3 grupos (n=3 ratones por grupo e inyectados intraperitonealmente con BANA (50 mg/kg), ácido benzoico (50 mg/kg) o vehículo (DMSO 10 %v/v en buffer fosfato). A la hora los animales fueron inyectados vía intraperitoneal con LPS (10 mg/kg) o buffer fosfato salino. A las dos horas los animales fueron sacrificados, y luego del lavado intraperitoneal, se extrajo sangre y ambas muestras fueron almacenadas para medir IL-1 β con un kit de ELISA disponible comercialmente (BD OptEIA).

6. Inmunohistoquímica de médula espinal humana.

Las inmunohistoquímicas realizadas en médula espinal humana se llevaron a cabo en muestras de tejido postmortem de sujetos con ELA y sujetos control, de acuerdo a lo descrito anteriormente por Kovacs et. al. (258). Se realizaron cortes de la médula espinal en parafina de 10 μ m utilizando un micrótopo. Después de la desparafinación, los cortes se bloquearon y permeabilizaron en BSA al 5% (v/v) / Triton X-100 al 0,5% (v/v) en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios anti-Iba1 (Wako, # 019-19741), anti-Iba1 (Millipore, # MABN92) y anti-NF- κ B-p65 (Abcam, # ab16502), se incubaron en BSA al 1% (v/v) / Triton X-100 al 0,5% (v/v) en PBS a 4°C durante la noche. Después del lavado, los anticuerpos secundarios conjugados a AlexaFluor 488/546 junto con DAPI se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente. Después del lavado con PBS, se usó medio Mowiol (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) para el montaje. Sólo se analizaron cortes de la médula espinal lumbar ventral. Los somas de las motoneuronas se identificaron en la médula espinal ventral por la morfología y los núcleos típicos.

7. Inmunohistoquímica de médula espinal de ratas transgénicas hSOD1^{G93A}.

Al menos 4 ratas fueron analizadas para cada experimento de inmunohistoquímica. Se estudiaron tres condiciones diferentes: i) ratas no transgénicas (Non-Tg) de 160-180 días; ii) ratas transgénicas hSOD1^{G93A} sintomáticas de 195-210 días tratadas durante 15 días con vehículo; y iii) ratas transgénicas hSOD1^{G93A} sintomáticas de 195-210 días tratadas durante 15 días con 100 mg/kg/ día de BANA. Después del tratamiento, los animales fueron anestesiados y se realizó perfusión transcardial con paraformaldehído al 4% (v/v) en PBS. Se disecaron las médulas espinales fijadas, se post-fijaron mediante inmersión durante la noche en paraformaldehído al 4% (v/v) en PBS, y luego se seccionaron transversalmente (30 μ m) en un criostato Leica. Se recogieron los cortes seriados en PBS para inmunohistoquímica. Los cortes se bloquearon y permeabilizaron durante 1 hora a temperatura ambiente en Triton X-100 0,5% (v/v) / BSA 5% (v/v) en PBS, se pasaron a través de soluciones tamponadas de lavado y se incubaron durante la noche a 4 ° C en una solución de Triton X-100 0.5% (v/v) / BSA 1% (v/v)

en PBS conteniendo los siguientes anticuerpos primarios: anti-Iba1 (Wako, # 019-19741), anti-Iba1 (Millipore, # MABN92), anti-CD68 (Abcam, ab31630), anti-CD34 (Abcam, ab81289), Isolectina (I21414), anti-GFAP (Sigma, # G3893), anti-GFAP (Sigma, # G9269), anti-S100 β (Sigma, # S2532) , anti-NF- κ B-p65 (Abcam, # ab16502), anti-Ki67 (Abcam, # ab16667), anti-ChAT (Millipore, # AB143), anti-ubiquitina (Millipore, # 05-1307), anti-nitrotirosina de ratón (Millipore, nº 05233), anti-VGlut-1 (SySy, #135-303), anti-sinaptofisina (Abcam, #206870), anti- β III-Tubulina (Millipore, #MAB1637), anti-SCF (Fisher Scientific, #PA520746), anti-quimasa (Abcam, #ab2377), anti-c-Kit (biotina). La inmunotinción con anti-NF- κ B-p65, anti-Iba1, anti-Ki67, anti-CD68 y anti-ubiquitina requirió recuperación de antígeno en buffer citrato de sodio 10 mM, pH 6 a 95°C durante 5 minutos. También se utilizó tinción Nissl fluorescente NeuroTrace 530/615 (Thermo Fisher Scientific, nº B34650) para visualizar neuronas. Después de la incubación con anticuerpos primarios, los cortes se lavaron con PBS 3 veces durante 10 minutos, y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos secundarios: AlexaFluor 488/546/633 junto con DAPI y/o estreptavidina-AlexaFluor 405. Por último, los cortes fueron lavados con PBS 3 veces durante 10 minutos y se montó en medio de montaje DPX (Sigma, # 06522-100ML).

8. Análisis de la gliosis en el asta ventral de la médula espinal lumbar.

La microgliosis y la astrogliosis se evaluaron midiendo la intensidad de expresión de los diferentes marcadores en el asta ventral de la médula espinal lumbar de ratas no transgénicas y ratas transgénicas hSOD1^{G93A} sintomáticas que fueron tratadas con vehículo o BANA. La microgliosis se evaluó mediante el análisis de diferentes marcadores típicos de microglía como Iba1, CD68, CD34 e isolectina. El número de células gliales aberrantes que coexpresan los marcadores astrocíticos GFAP y S100 β se evaluó contando las respectivas células positivas para ambos marcadores en el asta ventral de la médula espinal lumbar entre los grupos, según lo descrito anteriormente por Díaz-Amarilla, et. al. (25). Todos los análisis se realizaron en al menos 10 secciones histológicas por animal (3-5 ratas diferentes para cada condición) utilizando herramientas de análisis del software ImageJ y GraphPad Prism 7.03.

9. Análisis de la infiltración de mastocitos en la médula espinal

Los mastocitos en el asta ventral de la médula espinal fueron identificados por la morfología granular típica y por la inmunomarcación con c-kit y quimasa. La cuantificación se realizó solo en el área que rodea los somas de motoneuronas dentro de un radio de 150 μ m. El conteo se realizó sobre las proyecciones de máxima intensidad de microfotografías confocales con un aumento de 63x. Se analizaron al menos quince secciones por médula espinal. Para el análisis se utilizaron herramientas de análisis del software ImageJ y GraphPad Prism 7.03.

10. Análisis de la expresión de SCF en astrocitos de la médula espinal

El análisis de la co-expresión de SCF con el marcador de astrocitos GFAP, y el conteo de número de células c-Kit⁺ que se encontraban rodeando a los astrocitos que expresan SCF se realizó sobre las proyecciones de máxima intensidad de microfotografías confocales con un aumento de 63x. Se analizaron al menos quince cortes por médula espinal por animal. Para el análisis se utilizaron herramientas de análisis del software ImageJ y GraphPad Prism 7.03.

11. Análisis de número y tamaño de motoneuronas.

El número de motoneuronas expresando ChAT fue determinado contando las células positivas para dicho marcador en la sustancia gris de la médula espinal lumbar de ratas no transgénicas y de ratas transgénicas sintomáticas hSOD1^{G93A} tratadas con vehículo o BANA. Las células ChAT-positivas se cuantificaron en 10 cortes de 30 μ m tomados de la médula espinal lumbar, comparando el número de células en las láminas VII y IX de Rexed, que muestran una densidad baja y alta de motoneuronas grandes, respectivamente. Para cuantificar el tamaño medio del soma de las motoneuronas se tuvo en cuenta el eje más largo de cada soma. El análisis se realizó manualmente en al menos 25 secciones histológicas por animal (4 ratas diferentes para cada condición) utilizando la herramienta de contador de células del software ImageJ. El análisis estadístico se realizó utilizando herramientas de análisis del software GraphPad Prism 7.03.

12. Análisis de terminales sinápticas contactando a las motoneuronas en la médula espinal.

El número de terminales sinápticas que contactan con los cuerpos celulares de las motoneuronas se evaluó mediante inmunohistoquímica contando los puntos VGlut-1-positivos y sinaptofisina-positivos en contacto con las motoneuronas en las láminas de Rexed VII y IX. Las terminales sinápticas se cuantificaron en al menos 20 motoneuronas por animal (4 ratas diferentes por condición) utilizando la herramienta Analizar partículas del software ImageJ. El análisis estadístico se realizó utilizando herramientas de análisis del software GraphPad Prism 7.03.

13. Histología y análisis de músculo de ratas transgénicas hSOD1^{G93A}

Se realizaron análisis histológicos para evaluar: a) infiltración de mastocitos, b) denervación de las uniones neuromusculares, c) preservación de fibras musculares. Al menos 4 ratas fueron analizadas para cada experimento de inmunohistoquímica. Se estudiaron tres condiciones diferentes: i) ratas no transgénicas (Non-Tg) de 160-180 días; ii) ratas transgénicas hSOD1^{G93A} sintomáticas de 195-210 días tratadas durante 15 días con vehículo; y iii) ratas transgénicas hSOD1^{G93A} sintomáticas de 195-210 días tratadas durante 15 días con 100 mg/kg/ día de BANA.

- a. *Infiltración de mastocitos.* Para estudiar la infiltración de mastocitos en el músculo se realizó tinción con azul de toluidina en cortes longitudinales de 10 um del músculo ELD fijado con paraformaldehído 4% montados en vidrios gelatinizados. Los cortes se lavaron 2 veces con agua destilada por 5 minutos y luego se sumergieron en solución de azul de toluidina 1% durante 1 minuto. Luego los cortes se lavaron en agua destilada dos veces y se deshidrataron durante 3 minutos en etanol 70%, 3 minutos en etanol 95% y finalmente 2 minutos en etanol 100%. Los cortes se limpiaron con xilol dos veces durante 3 minutos y finalmente se montaron con DPX (MilliporeSigma). Las imágenes (10×, 20×, 40× y 100×) se adquirieron usando un microscopio Olympus CX41. El número de mastocitos metacromáticos se contó usando el software ImageJ, en al menos 40 campos por músculo por animal usando un aumento de 20x. Los mastocitos en desgranulación, caracterizados por la liberación de gránulos metacromáticos por un mastocito aislado, se contaron utilizando un aumento de 20x en imágenes seriadas de cada sección

muscular. El análisis estadístico se realizó utilizando herramientas de análisis del software GraphPad Prism 7.03.

- b. *Denervación de las uniones neuromusculares.* Se realizó inmunohistoquímica en fibras de músculo extensor largo de los dedos fijado con paraformaldehído 4%. Los tejidos fueron bloqueados durante 2 horas a temperatura ambiente en BSA 5% v/v-Tritón 0,8% v/v en PBS 1x pH=7,4), y luego incubados con los anticuerpos primarios o las sondas fluorescentes: anti-neurofilamento conjugado a Alexa Fluor 555 (Millipore, #MAB5256A5) α -bungarotoxina FITC (Thermo Fisher Scientific, B13422), y anti-sinaptofisina conjugado a Alexa Fluor 555 (Abcam, #ab206870) durante la noche a 4°C. Luego de hacer 4 lavados de 15 minutos con PBS, se montaron las fibras utilizando DPX. La denervación de la unión neuromuscular se analizó sobre proyecciones de máxima intensidad de microfotografías confocales. El análisis se realizó teniendo en cuenta las placas terminales postsinápticas ocupadas por un terminal axónico presináptico, donde la inervación completa se definió como al menos el 80% de superposición entre presináptica y postsináptica. Se analizó un promedio de 100 uniones neuromusculares por animal usando el software ImageJ. El análisis estadístico se realizó utilizando herramientas de análisis del software GraphPad Prism 7.03.
- c. *Preservación de fibras musculares.* El estudio de la preservación de las fibras se realizó en el músculo extensor largo de los dedos sin fijar. El músculo fue congelado y luego se realizaron cortes transversales de 12 μ m utilizando un criostato. Los cortes se bloquearon durante 2 horas en BSA 5%-Tritón 0,5% en PBS 1x en frío, y luego se incubaron con los anticuerpos primarios anti-MyHC-1, anti-MyHC-2a y anti-MyHC-2b durante la noche a 4°C en BSA 1%-Tritón 0,3%. Después de lavar los anticuerpos primarios, se incubaron los anticuerpos secundarios en BSA 1%-Tritón 0,3% durante dos horas en frío. Por último, los cortes fueron montados utilizando DPX. Para evaluar la preservación del músculo se analizó el recambio de fibras motoras rápidas por lentas, cuantificando el número de fibras de tipo 2B-2A (fibras rápidas) y de tipo 1 (fibras lentas) en las distintas condiciones. Para el recuento se adquirieron al menos 20 campos por músculo utilizando un confocal Zeiss

LSM 800. El análisis cuantitativo se realizó utilizando el programa ImageJ y se representó gráficamente la proporción de miofibras de tipo 2 y de tipo 1 en relación con las miofibras totales. El análisis estadístico se realizó utilizando herramientas de análisis del software GraphPad Prism 7.03.

14. Histología y análisis de nervio ciático y raíces ventrales de ratas transgénicas hSOD1^{G93A}

Se realizaron análisis histológicos para evaluar: a) infiltración de mastocitos, y b) preservación de estructura de nervio ciático y raíces ventrales. Al menos 4 ratas fueron analizadas para cada experimento de inmunohistoquímica. Se estudiaron tres condiciones diferentes: i) ratas no transgénicas (Non-Tg) de 160-180 días; ii) ratas transgénicas hSOD1^{G93A} sintomáticas de 195-210 días tratadas durante 15 días con vehículo; y iii) ratas transgénicas hSOD1^{G93A} sintomáticas de 195-210 días tratadas durante 15 días con 100 mg/kg/ día de BANA.

a. *Infiltración de mastocitos.* Para estudiar la infiltración de mastocitos en el nervio ciático se realizó tinción con azul de toluidina en cortes longitudinales de 10 μ m de nervio ciático fijado con paraformaldehído 4% montados en vidrios gelatinizados. Los cortes se lavaron 2 veces con agua destilada por 5 minutos y luego se sumergieron en solución de azul de toluidina 1% durante 1 minuto. Luego los cortes se lavaron en agua destilada dos veces y se deshidrataron durante 3 minutos en etanol 70%, 3 minutos en etanol 95% y finalmente 2 minutos en etanol 100%. Los cortes se limpiaron con xilol dos veces durante 3 minutos y finalmente se montaron con DPX (MilliporeSigma). Las imágenes (10 $\times$, 20 $\times$, 40 $\times$ y 100 $\times$) se adquirieron usando un microscopio Olympus CX41. El número de mastocitos metacromáticos se contó utilizando el software ImageJ, en al menos 40 campos por ciático por animal usando un aumento de 20 $\times$. Los mastocitos en desgranulación, caracterizados por la liberación de gránulos metacromáticos por un mastocito aislado, se contaron utilizando un aumento de 20 $\times$ en imágenes seriadas de cada sección de nervio ciático. El análisis estadístico se realizó utilizando herramientas de análisis del software GraphPad Prism 7.03.

b. *Preservación de estructura de nervio ciático y raíces ventrales.* Los nervios ciáticos y las raíces ventrales, fijadas con paraformaldehído 4%, fueron

criopreservadas y luego se realizaron cortes transversales y longitudinales de 10 μ m utilizando un criostato. Los cortes fueron bloqueados durante 2 horas a temperatura ambiente en BSA 5%-Tritón 0,5% en PBS y luego incubados con los anticuerpos primarios anti-neurofilamento 200–Alexa 555 (Thermo Fisher Scientific, MAB5256A5), y Mielina-Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific, F34651) en BSA 1%-Tritón 0,3% durante la noche a 4°C. Por último, los cortes fueron montados con DPX. Para evaluar la preservación de la estructura de los axones, se midió la densidad de neurofilamentos utilizando el software ImageJ. Se analizaron al menos 20 secciones por nervio ciático por animal. También se cuantificó el número de axones por área en las raíces ventrales. Se contaron en al menos 20 cortes por animal. El número de axones en secciones transversales del nervio ciático y raíces ventrales se determinó utilizando microfotografías confocales. Los axones positivos para neurofilamentos se contaron como intactos si el marcaje de neurofilamentos era continuo y llenaba la mayor parte de la estructura axonal. La tinción de mielina se usó para analizar más a fondo la estructura del axón intacto. Se analizaron al menos 20 cortes de cada animal y se representó gráficamente el número de axones por área. El análisis estadístico se realizó utilizando herramientas de análisis del software GraphPad Prism 7.03.

15. Ensayo de sobrevida en ratas transgénicas hSOD1^{G93A}.

El ensayo pre-clínico se llevó a cabo de la siguiente manera: para reducir la variabilidad sexual, solo se seleccionaron ratas hembra transgénicas hSOD1^{G93A} que mostraban debilidad y alteraciones en la marcha de las extremidades traseras como primer síntoma clínico. Los animales fueron divididos aleatoriamente en dos grupos: BANA o vehículo. Un total de 10 ratas fueron asignadas para cada grupo experimental. El BANA se preparó diariamente en buffer fosfato, y se administró a una dosis de 100 mg/kg utilizando una sonda de acero inoxidable curva con punta de bola de 3 mm. Las ratas fueron tratadas desde el día 1 del comienzo de síntomas hasta el punto final cuando fueron sacrificadas.

16. Determinación del comienzo y final de la enfermedad.

Todas las ratas fueron pesadas y evaluadas diariamente para determinar actividad motora. El comienzo de los síntomas fue determinado para cada animal

cuando se observaba una atrofia muscular pronunciada acompañada de una marcha anormal, expresada como cojera o arrastre sutil de una extremidad trasera. El punto final se definió por la falta de reflejos de enderezamiento o la incapacidad de alcanzar la comida y el agua.

17. Determinación de los niveles plasmáticos de BANA.

Para la detección de BANA en plasma, realizamos un análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase inversa (RP-HPLC). Ratas transgénicas hSOD1^{G93A} fueron tratadas con 100 mg/kg/día de BANA o vehículo por 15 días. Una vez finalizado el tratamiento se realizó la extracción de plasma y los animales fueron sacrificados. Se incubaron 100 µl de plasma con HgCl₂ (20 mM) a 37°C durante 30 minutos. Luego, se realizó la extracción con 900 µl de acetonitrilo y se inyectó la muestra en HPLC en un gradiente de 20-40% de fase B durante 10 minutos. La concentración plasmática de BANA se calculó a partir de una curva estándar utilizando salicilato como estándar interno. (CPAK C-18, 4 mM, columna de 150 mm x 3.9 mm I.D.; fase A: H₂O 0.1 % ácido fórmico; fase B: acetonitrilo 0.1% ácido fórmico; detección a 300 nm)

18. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se procedió de la siguiente manera: en primer lugar, se aplicaron los test de normalidad D'Agostino & Pearson y Shapiro-Wilk para determinar si los datos, obtenidos en cada caso, se ajustaban a una distribución normal. Si los datos se ajustaban a una distribución normal se aplicaba el test paramétrico one-way ANOVA seguido del test Tukey de comparación múltiple, para determinar si había diferencias significativas entre las medias de las distintas muestras. En el caso de que los datos no se ajustaban a una distribución normal se aplicaba el test no paramétrico Kruskal-Wallis (alternativa no paramétrica del test ANOVA) seguido del test Dunn de comparación múltiple. Los datos cuantitativos fueron expresados como la media ± SEM. Se consideró una diferencia significativa con $p < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el GraphPad Prism 7.03.

Referencias

1. Dugger BN, Dickson DW. Pathology of neurodegenerative diseases. Vol. 9, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2017.
2. Przedborski S, Vila M, Jackson-Lewis V. Series Introduction: Neurodegeneration: What is it and where are we? *Journal of Clinical Investigation*. 2003 Jan 1;111(1):3–10.
3. Seeley WW. Mapping neurodegenerative disease onset and progression. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(8).
4. Zahra W, Rai SN, Birla H, Singh S sen, Dilnashin H, Rathore AS, et al. The Global Economic Impact of Neurodegenerative Diseases: Opportunities and Challenges. In: *Bioeconomy for Sustainable Development*. Singapore: Springer Singapore; 2020. p. 333–45.
5. Mason AR, Ziemann A, Finkbeiner S. Targeting the low-hanging fruit of neurodegeneration. *Neurology*. 2014 Oct 14;83(16):1470–3.
6. Chen WW, Zhang X, Huang WJ. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Mol Med Rep*. 2016 Apr 1;13(4):3391–6.
7. Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener*. 2020 Dec 26;9(1):42.
8. Streit WJ, Mrak RE, Griffin WST. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation*. 2004;1(1):14.
9. Kölliker-Frers R, Udovin L, Otero-Losada M, Kobiec T, Herrera MI, Palacios J, et al. Neuroinflammation: An Integrating Overview of Reactive-Neuroimmune Cell Interactions in Health and Disease. *Mediators Inflamm*. 2021 May 31;2021:1–20.
10. Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. Vol. 353, *Science*. 2016.
11. Craft JM, Watterson DM, van Eldik LJ. Neuroinflammation: a potential therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets*. 2005 Oct 27;9(5):887–900.
12. Singh A, Chokriwal A, Sharma MM, Jain D, Saxena J, Stephen BJ. Therapeutic Role and Drug Delivery Potential of Neuroinflammation as a Target in Neurodegenerative Disorders. *ACS Chem Neurosci*. 2017 Aug 16;8(8):1645–55.
13. Diaz-Amarilla P, Miquel E, Trostchansky A, Trias E, Ferreira AM, Freeman BA, et al. Electrophilic nitro-fatty acids prevent astrocyte-mediated toxicity to motor neurons in a cell model of familial amyotrophic lateral sclerosis via nuclear factor erythroid 2-related factor activation. *Free Radic Biol Med*. 2016 Jun 1;95:112–20.
14. Trias E, Ibarburu S, Barreto-Núñez R, Babdor J, Maciel TT, Guillo M, et al. Post-paralysis tyrosine kinase inhibition with masitinib abrogates neuroinflammation and slows disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2016 Jul 11;13(1).
15. Martínez-Palma L, Miquel E, Lagos-Rodríguez V, Barbeito L, Cassina A, Cassina P. Mitochondrial Modulation by Dichloroacetate Reduces Toxicity of Aberrant Glial Cells and Gliosis in the SOD1G93A Rat Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2019;16(1).
16. Miquel E, Cassina A, Martínez-Palma L, Souza JM, Bolatto C, Rodríguez-Bottero S, et al. Neuroprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2014;70.

17. Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. Longo DL, editor. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2017 Jul 13;377(2):162–72. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMr1603471>
18. Wijesekera LC, Leigh PN. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis*. 2009;4(1).
19. Yamanaka K, Komine O. The multi-dimensional roles of astrocytes in ALS. Vol. 126, *Neuroscience Research*. 2018.
20. Clarke BE, Patani R. The microglial component of amyotrophic lateral sclerosis. Vol. 143, *Brain*. Oxford University Press; 2020. p. 3526–39.
21. Trias E, Ibarburu S, Barreto-Núñez R, Barbeito L. Significance of aberrant glial cell phenotypes in pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*. 2017 Jan;636:27–31.
22. Trias E, Barbeito L, Yamanaka K. Phenotypic heterogeneity of astrocytes in motor neuron disease. *Clin Exp Neuroimmunol*. 2018 Nov 4;9(4):225–34.
23. Escartin C, Galea E, Lakatos A, O’Callaghan JP, Petzold GC, Serrano-Pozo A, et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci*. 2021 Mar 15;24(3):312–25.
24. Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Peluffo H, Viera L, et al. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. In: *Brain Research Reviews*. 2004. p. 263–74.
25. Díaz-Amarilla P, Olivera-Bravo S, Trias E, Cragolini A, Martínez-Palma L, Cassina P, et al. 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.
26. Trias E, Kovacs M, King PH, Si Y, Kwon Y, Varela V, et al. Schwann cells orchestrate peripheral nerve inflammation through the expression of CSF1, IL-34, and SCF in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia*. 2020 Jun 1;68(6):1165–81.
27. Angelini DF, de Angelis F, Vacca V, Piras E, Parisi C, Nutini M, et al. Very Early Involvement of Innate Immunity in Peripheral Nerve Degeneration in SOD1-G93A Mice. *Front Immunol*. 2020 Nov 20;11.
28. Chiu IM, Phatnani H, Kuligowski M, Tapia JC, Carrasco MA, Zhang M, et al. Activation of innate and humoral immunity in the peripheral nervous system of ALS transgenic mice [Internet]. Available from: www.pnas.org/cgi/content/full/
29. Graber DJ, Hickey WF, Harris BT. Progressive changes in microglia and macrophages in spinal cord and peripheral nerve in the transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2010 Jan 28;7.
30. Trias E, King PH, Si Y, Kwon Y, Varela V, Ibarburu S, et al. Mast cells and neutrophils mediate peripheral motor pathway degeneration in ALS. *JCI Insight*. 2018 Oct 4;3(19).
31. Nardo G, Trolese MC, de Vito G, Cecchi R, Riva N, Dina G, et al. Immune response in peripheral axons delays disease progression in SOD1G93A mice. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1).
32. Takata F, Nakagawa S, Matsumoto J, Dohgu S. Blood-Brain Barrier Dysfunction Amplifies the Development of Neuroinflammation: Understanding of Cellular Events in Brain Microvascular Endothelial Cells for Prevention and Treatment of BBB Dysfunction. Vol. 15, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2021.
33. Otani K, Shichita T. Cerebral sterile inflammation in neurodegenerative diseases. *Inflamm Regen*. 2020 Dec 8;40(1):28.

34. Knox EG, Aburto MR, Clarke G, Cryan JF, O'Driscoll CM. The blood-brain barrier in aging and neurodegeneration. *Mol Psychiatry*. 2022 Jun 31;27(6):2659–73.
35. Jeon MT, Kim KS, Kim ES, Lee S, Kim J, Hoe HS, et al. Emerging pathogenic role of peripheral blood factors following BBB disruption in neurodegenerative disease. *Ageing Res Rev*. 2021 Jul;68:101333.
36. Bowerman M, Vincent T, Scamps F, Camu W, Raoul C. The Neuroinflammation in the Physiopathology of Amyotrophic Lateral Sclerosis. In: *Current Advances in Amyotrophic Lateral Sclerosis*. InTech; 2013.
37. Béland LC, Markovinov A, Jakovac H, de Marchi F, Bilic E, Mazzini L, et al. Immunity in amyotrophic lateral sclerosis: blurred lines between excessive inflammation and inefficient immune responses. *Brain Commun*. 2020 Jul 1;2(2).
38. Liu J, Wang F. Role of Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Cellular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Front Immunol*. 2017 Aug 21;8.
39. Trias E, Ibarburu S, Barreto-Núñez R, Varela V, Moura IC, Dubreuil P, et al. Evidence for mast cells contributing to neuromuscular pathology in an inherited model of ALS. *JCI Insight*. 2017 Oct 19;2(20).
40. Kovacs M, Alamón C, Maciel C, Varela V, Ibarburu S, Tarragó L, et al. The pathogenic role of c-Kit⁺ mast cells in the spinal motor neuron-vascular niche in ALS. *Acta Neuropathol Commun*. 2021 Dec 1;9(1).
41. Källstig E, McCabe BD, Schneider BL. The links between als and nf-kb. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. 2021.
42. Maqbool A, Lattke M, Wirth T, Baumann B. Sustained, neuron-specific IKK/NF- κ B activation generates a selective neuroinflammatory response promoting local neurodegeneration with aging. *Mol Neurodegener*. 2013 Dec 12;8(1):40.
43. Li YX, Sibon OCM, Dijkers PF. Inhibition of NF- κ B in astrocytes is sufficient to delay neurodegeneration induced by proteotoxicity in neurons. *J Neuroinflammation*. 2018 Dec 11;15(1):261.
44. Singh S, Singh TG. Role of Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) Signalling in Neurodegenerative Diseases: An Mechanistic Approach. *Curr Neuropharmacol*. 2020 Nov 4;18(10):918–35.
45. Sun E, Motolani A, Campos L, Lu T. The Pivotal Role of NF- κ B in the Pathogenesis and Therapeutics of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2022 Aug 11;23(16):8972.
46. Mattson MP, Camandola S. NF- κ B in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. Vol. 107, *Journal of Clinical Investigation*. 2001.
47. Miller RG, Mitchell JD, Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012;
48. Abe K, Aoki M, Tsuji S, Itoyama Y, Sobue G, Togo M, et al. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*. 2017;16(7).
49. Ludolph AC, Bendotti C, Blaugrund E, Chio A, Greensmith L, Loeffler JP, et al. Guidelines for preclinical animal research in ALS/MND: A consensus meeting. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2010 Jan 26;11(1–2):38–45.
50. van Damme P, Robberecht W, van den Bosch L. Modelling amyotrophic lateral sclerosis: progress and possibilities. *Dis Model Mech*. 2017;10(5):537–49.
51. Pioro EP, Mitsumoto H. Animal models of ALS. *Clin Neurosci*. 3(6):375–85.
52. Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, et al. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated

- amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [Internet]. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.032539299
53. CARLOS B, LUIS B, CARLOS E, SOFÍA B, VIRGINIA LG, QUINTA P, et al. ELECTROPHILIC NITROALKENE BENZOIC ACID DERIVATES AS THERAPEUTIC DRUGS IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS (ALS) AND OTHER NEURODEGENERATIVE CONDITIONS [Internet]. WO: INST PASTEUR DE MONTEVIDEO; 2021. Available from: <https://lens.org/179-672-186-225-033>
 54. Davidson PM, Sofos JN, Branen AL, editors. Antimicrobials in Food. CRC Press; 2005.
 55. Johnson W, Bergfeld WF, Belsito D v., Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, et al. Safety Assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid and its Salts, and Benzyl Benzoate. *Int J Toxicol*. 2017 Nov 15;36(3_suppl):5S-30S.
 56. del Olmo A, Calzada J, Nuñez M. Benzoic acid and its derivatives as naturally occurring compounds in foods and as additives: Uses, exposure, and controversy. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017 Sep 22;57(14):3084–103.
 57. Modi KK, Roy A, Brahmachari S, Rangasamy SB, Pahan K. Cinnamon and its metabolite sodium benzoate attenuate the activation of p21^{rac} and protect memory and learning in an animal model of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2015 Jun 23;10(6).
 58. Khasnavis S, Pahan K. Sodium benzoate, a metabolite of cinnamon and a food additive, upregulates neuroprotective Parkinson disease protein DJ-1 in astrocytes and neurons. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2012 Jun;7(2):424–35.
 59. Baker LMS, Baker PRS, Golin-Bisello F, Schopfer FJ, Fink M, Woodcock SR, et al. Nitro-fatty Acid Reaction with Glutathione and Cysteine. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(42).
 60. Khoo NKH, Li L, Salvatore SR, Schopfer FJ, Freeman BA. Electrophilic fatty acid nitroalkenes regulate Nrf2 and NF- κ B signaling: A medicinal chemistry investigation of structure-function relationships. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1).
 61. Ray S, Kreitler DF, Gulick AM, Murkin AS. The Nitro Group as a Masked Electrophile in Covalent Enzyme Inhibition. *ACS Chem Biol*. 2018;13(6).
 62. Rodriguez-Duarte J, Dapuelto R, Galliussi G, Turell L, Kamaid A, Khoo NKH, et al. Electrophilic nitroalkene-tocopherol derivatives: synthesis, physicochemical characterization and evaluation of anti-inflammatory signaling responses. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1).
 63. Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(42).
 64. Bompreszi R. Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: An overview. Vol. 8, *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*. 2015. p. 20–30.
 65. Carlström KE, Ewing E, Granqvist M, Gyllenberg A, Aeinehband S, Enoksson SL, et al. Therapeutic efficacy of dimethyl fumarate in relapsing-remitting multiple sclerosis associates with ROS pathway in monocytes. *Nat Commun*. 2019 Dec 1;10(1).
 66. Vucic S, Henderson RD, Mathers S, Needham M, Schultz D, Kiernan MC, et al. Safety and efficacy of dimethyl fumarate in ALS: randomised controlled study. *Ann Clin Transl Neurol*. 2021;8(10).

67. Ibarburu S, Kovacs M, Varela V, Rodríguez-Duarte J, Ingold M, Invernizzi P, et al. A Nitroalkene Benzoic Acid Derivative Targets Reactive Microglia and Prolongs Survival in an Inherited Model of ALS via NF- κ B Inhibition. *Neurotherapeutics*. 2021;18(1).
68. Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chió A, Couratier P, Mitchell JD, et al. Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: New evidence and unsolved issues. Vol. 79, *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 2008.
69. Oskarsson B, Gendron TF, Staff NP. Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Update for 2018. *Mayo Clin Proc*. 2018 Nov;93(11):1617–28.
70. Al-Chalabi A, Hardiman O. The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol*. 2013 Nov 15;9(11):617–28.
71. Vázquez MC, Ketzoian C, Legnani C, Rega I, Sánchez N, Perna A, et al. Incidence and prevalence of amyotrophic lateral sclerosis in Uruguay: A population-based study. *Neuroepidemiology*. 2008 Apr;30(2):105–11.
72. CHARCOT, M J. Sur quelques arthropathies qui paraissent dependre d'une lesion du cerveau ou de la moelle epiniere. *Arch, physiol norm et pathol*. 1868;1.
73. Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, et al. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Dec;351(3):602–11.
74. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science (1979)*. 2006;314(5796).
75. Kwiatkowski TJ, Bosco DA, LeClerc AL, Tamrazian E, Vandenburg CR, Russ C, et al. Mutations in the *FUS/TLS* Gene on Chromosome 16 Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science (1979)*. 2009 Feb 27;323(5918):1205–8.
76. Lai SL, Abramzon Y, Schymick JC, Stephan DA, Dunckley T, Dillman A, et al. FUS mutations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*. 2011 Mar;32(3):550.e1-550.e4.
77. Lattante S, Rouleau GA, Kabashi E. *TARDBP* and *FUS* Mutations Associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis: Summary and Update. *Hum Mutat*. 2013 Jun;34(6):812–26.
78. Balendra R, Isaacs AM. C9orf72-mediated ALS and FTD: multiple pathways to disease. *Nat Rev Neurol*. 2018 Sep 17;14(9):544–58.
79. Rosen 1993 Mutations in CuZn sod gene are associated with ALS.
80. Valentine JS, Doucette PA, Zittin Potter S. COPPER-ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE AND AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS. *Annu Rev Biochem*. 2005 Jun 1;74(1):563–93.
81. Andersen PM. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2006 Feb;6(1):37–46.
82. Boillée S, vande Velde C, Cleveland DWW. ALS: A Disease of Motor Neurons and Their Nonneuronal Neighbors. Vol. 52, *Neuron*. 2006. p. 39–59.
83. Taylor JP, Brown RH, Cleveland DW. Decoding ALS: From genes to mechanism. Vol. 539, *Nature*. Nature Publishing Group; 2016. p. 197–206.
84. Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, et al. Motor Neuron Degeneration in Mice that Express a Human Cu,Zn Superoxide Dismutase Mutation. *Science (1979)*. 1994 Jun 17;264(5166):1772–5.

85. Bonifacino T, Zerbo RA, Balbi M, Torazza C, Frumento G, Fedele E, et al. Nearly 30 Years of Animal Models to Study Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Historical Overview and Future Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 12;22(22):12236.
86. McGoldrick P, Joyce PI, Fisher EMC, Greensmith L. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. Vol. 1832, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2013. p. 1421–36.
87. Philips T, Rothstein JD. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Protoc Pharmacol*. 2015;2015:5.67.1-5.67.21.
88. Bonafede R, Mariotti R. ALS pathogenesis and therapeutic approaches: The role of mesenchymal stem cells and extracellular vesicles. Vol. 11, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Research Foundation; 2017.
89. Chiò A, Mazzini L, D'Alfonso S, Corrado L, Canosa A, Moglia C, et al. The multistep hypothesis of ALS revisited. *Neurology*. 2018 Aug 14;91(7):e635–42.
90. Eisen A. Amyotrophic lateral sclerosis is a multifactorial disease. *Muscle Nerve*. 1995 Jul;18(7):741–52.
91. Muyderman H, Chen T. Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis - a valid pharmacological target? *Br J Pharmacol*. 2014 Apr;171(8):2191–205.
92. 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.
93. Smith EF, Shaw PJ, de Vos KJ. The role of mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*. 2019 Sep;710:132933.
94. Cassina P, Cassina A, Pehar M, Castellanos R, Gandelman M, de León A, et al. Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: Prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *Journal of Neuroscience*. 2008 Apr 16;28(16):4115–22.
95. Sasaki S, Iwata M. Mitochondrial alterations in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007;66(1).
96. Magrané J, Manfredi G. Mitochondrial function, morphology, and axonal transport in amyotrophic lateral sclerosis. Vol. 11, *Antioxidants and Redox Signaling*. 2009.
97. Pasinelli P, Houseweart MK, Brown RH, Cleveland DW. Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25).
98. Mattiazzi M, D'Aurelio M, Gajewski CD, Martushova K, Kiaei M, Flint Beal M, et al. Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(33).
99. Menzies FM, Cookson MR, Taylor RW, Turnbull DM, Chrzanowska-Lightowlers ZMA, Dong L, et al. Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 2002;125(7).
100. Damiano M, Starkov AA, Petri S, Kipiani K, Kiaei M, Mattiazzi M, et al. Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J Neurochem*. 2006;96(5).
101. Miquel E, Cassina A, Martínez-Palma L, Bolatto C, Trías E, Gandelman M, et al. Modulation of Astrocytic Mitochondrial Function by Dichloroacetate Improves Survival and Motor Performance in Inherited Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS One*. 2012 Apr 3;7(4):e34776.

102. Rothstein JD, van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncel RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 1995;38(1).
103. Vermeiren C, de Hemptinne I, Vanhoutte N, Tilleux S, Maloteaux JM, Hermans E. Loss of metabotropic glutamate receptor-mediated regulation of glutamate transport in chemically activated astrocytes in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*. 2006;96(3).
104. Foran E, Trotti D. Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. Vol. 11, *Antioxidants and Redox Signaling*. 2009.
105. Guo H, Lai L, Butchbach E.R. MER, Stockinger MP, Shan X, Bishop GA, et al. Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Hum Mol Genet*. 2003;12(19).
106. Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee RK. Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci*. 1999;77(5).
107. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology*. 2018 Jun 4;217(6):1915–28.
108. Eleutherio ECA, Silva Magalhães RS, de Araújo Brasil A, Monteiro Neto JR, de Holanda Paranhos L. SOD1, more than just an antioxidant. *Arch Biochem Biophys*. 2021 Jan;697:108701.
109. Bunton-Stasyshyn RKA, Saccon RA, Fratta P, Fisher EMC. SOD1 Function and Its Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathology: New and Renascent Themes. Vol. 21, *Neuroscientist*. 2015.
110. Borchelt DR, Leo MK, SLUNGT HS, GUARNIERI M, Wong PC, Brown RH, et al. Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. Vol. 91, *Neurobiology*. 1994.
111. Rabizadeh S, Gralla EB, Borchelt DR, Gwinn R, Valentine JS, Sisodia S, et al. Mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis convert superoxide dismutase from an antiapoptotic gene to a proapoptotic gene: Studies in yeast and neural cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(7).
112. Beckman JS, Estévez AG, Crow JP, Barbeito L. Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS. Vol. 24, *Trends in neurosciences*. 2001.
113. Liochev SI, Fridovich I. Mutant Cu,Zn superoxide dismutases and familial amyotrophic lateral sclerosis: Evaluation of oxidative hypotheses. Vol. 34, *Free Radical Biology and Medicine*. 2003.
114. Tohgi H, Abe T, Yamizaki K, Murata T, Ishizaki E, Isobe C. Remarkable increase in cerebrospinal fluid 3-nitrotyrosine in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 1999;46(1).
115. Beckman JS, Carson M, Smith CD, Koppenol WH. ALS, SOD and peroxynitrite [10]. Vol. 364, *Nature*. 1993.
116. Ihara Y, Nobukuni K, Takata H, Hayabara T. Oxidative stress and metal content in blood and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients with and without a Cu, Zn-superoxide dismutase mutation. *Neurol Res*. 2005 Jan 19;27(1):105–8.
117. Aoyama K, Matsubara K, Fujikawa Y, Nagahiro Y, Shimizu K, Umegae N, et al. Nitration of manganese superoxide dismutase in cerebrospinal fluids is a marker for peroxynitrite-mediated oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol*. 2000 Apr;47(4):524–7.

118. Bruijn LI, Beal MF, Becher MW, Schulz JB, Wong PC, Price DL, et al. Elevated free nitrotyrosine levels, but not protein-bound nitrotyrosine or hydroxyl radicals, throughout amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-like disease implicate tyrosine nitration as an aberrant *in vivo* property of one familial ALS-linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997 Jul 8;94(14):7606–11.
119. Soto C, Estrada LD. Protein Misfolding and Neurodegeneration. *Arch Neurol*. 2008 Feb 1;65(2).
120. Sweeney P, Park H, Baumann M, Dunlop J, Frydman J, Kopito R, et al. Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies. *Transl Neurodegener*. 2017 Dec 13;6(1):6.
121. Julien JP. Amyotrophic lateral sclerosis: Unfolding the toxicity of the misfolded. Vol. 104, *Cell*. 2001.
122. Paré B, Lehmann M, Beaudin M, Nordström U, Saikali S, Julien JP, et al. Misfolded SOD1 pathology in sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Sci Rep*. 2018;8(1).
123. Forsberg K, Graffmo K, Pakkenberg B, Weber M, Nielsen M, Marklund S, et al. Misfolded SOD1 inclusions in patients with mutations in C9orf72 and other ALS/FTD-associated genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019;
124. Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Cizewski Culotta V, Price DL, Wong PC, Rothstein JD. Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol Dis*. 2001;8(6).
125. Ayers JL, Fromholt S, Koch M, DeBosier A, McMahon B, Xu G, et al. Experimental transmissibility of mutant SOD1 motor neuron disease. *Acta Neuropathol*. 2014;128(6).
126. Ayers JL, Fromholt SE, O'Neal VM, Diamond JH, Borchelt DR. Prion-like propagation of mutant SOD1 misfolding and motor neuron disease spread along neuroanatomical pathways. *Acta Neuropathol*. 2016;131(1).
127. Grad LI, Fernando SM, Cashman NR. From molecule to molecule and cell to cell: Prion-like mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. Vol. 77, *Neurobiology of Disease*. 2015.
128. Schwartz JC, Podell ER, Han SSW, Berry JD, Eggan KC, Cech TR. FUS is sequestered in nuclear aggregates in ALS patient fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 2014 Sep;25(17):2571–8.
129. Zuo X, Zhou J, Li Y, Wu K, Chen Z, Luo Z, et al. TDP-43 aggregation induced by oxidative stress causes global mitochondrial imbalance in ALS. *Nat Struct Mol Biol*. 2021 Feb 4;28(2):132–42.
130. Hergesheimer RC, Chami AA, de Assis DR, Vourc'h P, Andres CR, Corcia P, et al. The debated toxic role of aggregated TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis: a resolution in sight? *Brain*. 2019 May 1;142(5):1176–94.
131. Avendaño-Vázquez SE, Dhir A, Bembich S, Buratti E, Proudfoot N, Baralle FE. Autoregulation of TDP-43 mRNA levels involves interplay between transcription, splicing, and alternative polyA site selection. *Genes Dev*. 2012 Aug 1;26(15):1679–84.
132. Ayala YM, Zago P, D'Ambrogio A, Xu YF, Petrucelli L, Buratti E, et al. Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *J Cell Sci*. 2008 Nov 15;121(22):3778–85.

133. Buratti E, Baralle FE. Characterization and Functional Implications of the RNA Binding Properties of Nuclear Factor TDP-43, a Novel Splicing Regulator of CFTR Exon 9. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 Sep;276(39):36337–43.
134. Coan G, Mitchell CS. An assessment of possible neuropathology and clinical relationships in 46 sporadic amyotrophic lateral sclerosis patient autopsies. *Neurodegener Dis*. 2015;15(5).
135. Dormann D, Haass C. TDP-43 and FUS: A nuclear affair. Vol. 34, *Trends in Neurosciences*. 2011.
136. Tian L, Ma L, Kaarela T, Li Z. Neuroimmune crosstalk in the central nervous system and its significance for neurological diseases. Vol. 9, *Journal of Neuroinflammation*. BioMed Central; 2012.
137. Ransohoff RM, Brown MA. Innate immunity in the central nervous system. Vol. 122, *Journal of Clinical Investigation*. 2012. p. 1164–71.
138. Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillée S, Rule M, et al. Wild-Type Nonneuronal Cells Extend Survival of SOD1 Mutant Motor Neurons in ALS Mice. *Science* (1979). 2003 Oct 3;302(5642):113–7.
139. Yamanaka K, Boillee S, Roberts EA, Garcia ML, McAlonis-Downes M, Mikse OR, et al. Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice [Internet]. 2008. Available from: www.pnas.org/cgi/content/full/
140. Lee JC, Seong J, Kim SH, Lee SJ, Cho YJ, An J, et al. Replacement of microglial cells using Clodronate liposome and bone marrow transplantation in the central nervous system of SOD1G93A transgenic mice as an in vivo model of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;418(2).
141. Linnerbauer M, Wheeler MA, Quintana FJ. Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation. *Neuron*. 2020 Nov;108(4):608–22.
142. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell*. 2010 Mar;140(6):918–34.
143. Brochard V, Combadière B, Prigent A, Laouar Y, Perrin A, Beray-Berthat V, et al. Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2008 Dec 22;
144. Wright AL, Zinn R, Hohensinn B, Konen LM, Beynon SB, Tan RP, et al. Neuroinflammation and Neuronal Loss Precede A β Plaque Deposition in the hAPP-J20 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLoS One*. 2013 Apr 1;8(4):e59586.
145. Frank-Cannon TC, Alto LT, McAlpine FE, Tansey MG. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Mol Neurodegener*. 2009 Dec 16;4(1):47.
146. Malaspina A, Puentes F, Amor S. Disease origin and progression in amyotrophic lateral sclerosis: an immunology perspective. *Int Immunol*. 2015 Mar 1;27(3):117–29.
147. Kanouchi T, Ohkubo T, Yokota T. Can regional spreading of amyotrophic lateral sclerosis motor symptoms be explained by prion-like propagation? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012 Jul;83(7):739–45.
148. Turner MR, Brockington A, Scaber J, Hollinger H, Marsden R, Shaw PJ, et al. Pattern of spread and prognosis in lower limb-onset ALS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2010 Aug 10;11(4):369–73.
149. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Vol. 19, *Nature Medicine*. 2013.

150. Kawai T, Autieri M v., Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2021 Mar 1;320(3):C375–91.
151. Cheng CF, Liao HJ, Wu CS. Tissue microenvironment dictates inflammation and disease activity in rheumatoid arthritis. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2022 Jun;121(6):1027–33.
152. Perry? VH, Hume\$ DA, Gorwn\$ S. IMMUNOHISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF MACROPHAGES AND MICROGLIA IN THE ADULT AND DEVELOPING MOUSE BRAIN. Vol. 15. 1985.
153. Cuadros MA, Navascue J. THE ORIGIN AND DIFFERENTIATION OF MICROGLIAL CELLS DURING DEVELOPMENT.
154. Colton CA, Wilcock DM. Assessing Activation States in Microglia. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2012;9(2).
155. Vilhardt F. Microglia: Phagocyte and glia cell. Vol. 37, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2005.
156. Henkel JS, Beers DR, Zhao W, Appel SH. Microglia in ALS: The good, the bad, and the resting. Vol. 4, *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2009.
157. Carniglia L, Ramírez D, Durand D, Saba J, Turati J, Caruso C, et al. Neuropeptides and Microglial Activation in Inflammation, Pain, and Neurodegenerative Diseases. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:1–23.
158. Bachiller S, Jiménez-Ferrer I, Paulus A, Yang Y, Swanberg M, Deierborg T, et al. Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. *Front Cell Neurosci*. 2018 Dec 18;12.
159. Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. Vol. 87, *Brain Research Bulletin*. 2012. p. 10–20.
160. Haukedal H, Freude K. Implications of Microglia in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. Vol. 431, *Journal of Molecular Biology*. Academic Press; 2019. p. 1818–29.
161. Sanagi T, Yuasa S, Nakamura Y, Suzuki E, Aoki M, Warita H, et al. Appearance of phagocytic microglia adjacent to motoneurons in spinal cord tissue from a presymptomatic transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res*. 2010 Sep;88(12):2736–46.
162. Boillée S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* (1979). 2006;312(5778).
163. Kriz J, Nguyen MD, Julien JP. Minocycline slows disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. 2002;10(3):268–78.
164. Beers DR, Henkel JS, Xiao Q, Zhao W, Wang J, Yen AA, et al. Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis [Internet]. 2006. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0607423103
165. Zhao W, Xie W, Beers DR, Henkel JS, Simpson EP, Yen AA, et al. Activated Microglia Initiate Motor Neuron Injury by a Nitric Oxide and Glutamate-Mediated Mechanism [Internet]. Vol. 63, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2004. Available from: <http://jnen.oxfordjournals.org/>
166. Xiao Q, Zhao W, Beers DR, Yen AA, Xie W, Henkel JS, et al. Mutant SOD1G93A microglia are more neurotoxic relative to wild-type microglia. *J Neurochem*. 2007;102(6).

167. Trias E, Díaz-Amarilla P, Olivera-Bravo S, Isasi E, Drechsel DA, Lopez N, et al. Phenotypic transition of microglia into astrocyte-like cells associated with disease onset in a model of inherited ALS. *Front Cell Neurosci.* 2013 Dec 24;7(DEC).
168. Ibarburu S, Trias E, Lago N, Peluffo H, Barreto-Núñez R, Varela V, et al. Focal Transplantation of Aberrant Glial Cells Carrying the SOD1G93A Mutation into Rat Spinal Cord Induces Extensive Gliosis. *Neuroimmunomodulation.* 2017 Nov 1;24(3):143–53.
169. Elmore MRP, Najafi AR, Koike MA, Dagher NN, Spangenberg EE, Rice RA, et al. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron.* 2014;82(2).
170. Rosnet O, Birnbaum D. Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases. Vol. 4, *Critical Reviews in Oncogenesis.* 1993.
171. Verstraete K, Savvides SN. Extracellular assembly and activation principles of oncogenic class III receptor tyrosine kinases. *Nat Rev Cancer.* 2012 Nov 18;12(11):753–66.
172. Martínez-Muriana A, Mancuso R, Francos-Quijorna I, Olmos-Alonso A, Osta R, Perry VH, et al. CSF1R blockade slows the progression of amyotrophic lateral sclerosis by reducing microgliosis and invasion of macrophages into peripheral nerves. *Sci Rep.* 2016 May 13;6.
173. Liao B, Zhao W, Beers DR, Henkel JS, Appel SH. Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Exp Neurol.* 2012 Sep;237(1):147–52.
174. Weydt P, Yuen EC, Ransom BR, Möller T. Increased cytotoxic potential of microglia from ALS-transgenic mice. *Glia.* 2004 Nov 1;48(2):179–82.
175. Zhao W, Xie W, Xiao Q, Beers DR, Appel SH. Protective effects of an anti-inflammatory cytokine, interleukin-4, on motoneuron toxicity induced by activated microglia. *J Neurochem.* 2006 Nov;99(4):1176–87.
176. Gowing G, Lalancette-Hébert M, Audet JN, Dequen F, Julien JP. Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) exacerbates ALS disease in a mouse model through altered responses of microglia expressing mutant superoxide dismutase. *Exp Neurol.* 2009 Dec;220(2):267–75.
177. Chiu IM, Morimoto ETA, Goodarzi H, Liao JT, O’Keeffe S, Phatnani HP, et al. A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Cell Rep.* 2013 Jul 25;4(2):385–401.
178. Frakes AE, Ferraiuolo L, Haidet-Phillips AM, Schmelzer L, Braun L, Miranda CJ, et al. Microglia induce motor neuron death via the classical NF- κ B pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron.* 2014 Mar 5;81(5):1009–23.
179. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. NF- κ B in the nervous system. Vol. 1, *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2009.
180. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. Vol. 2, *Signal Transduction and Targeted Therapy.* Springer Nature; 2017.
181. Tak PP, Firestein GS. NF- κ B: A key role in inflammatory diseases. Vol. 107, *Journal of Clinical Investigation.* 2001.
182. Shih RH, Wang CY, Yang CM. NF- κ B signaling pathways in neurological inflammation: A mini review. Vol. 8, *Frontiers in Molecular Neuroscience.* Frontiers Media S.A.; 2015.

183. Swarup V, Phaneuf D, Dupré N, Petri S, Strong M, Kriz J, et al. Deregulation of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis triggers nuclear factor κ B-mediated pathogenic pathways. *Journal of Experimental Medicine*. 2011 Nov 21;208(12):2429–47.
184. Zhao W, Beers DR, Bell S, Wang J, Wen S, Baloh RH, et al. TDP-43 activates microglia through NF- κ B and NLRP3 inflammasome. *Exp Neurol*. 2015;273.
185. Almer G, Vukosavic S, Romero N, Przedborski S. Inducible nitric oxide synthase up-regulation in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*. 1999;72(6).
186. Alexianu ME, Kozovska M, Appel SH. Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. 2001.
187. Gowing G, Philips T, van Wijmeersch B, Audet JN, Dewil M, van den Bosch L, et al. Ablation of proliferating microglia does not affect motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase. *Journal of Neuroscience*. 2008;28(41).
188. Maniatis S, Åijö T, Vickovic S, Braine C, Kang K, Mollbrink A, et al. Spatiotemporal dynamics of molecular pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Science* (1979). 2019;364(6435).
189. Gerber YN, Sabourin JC, Rabano M, Vivanco M d. M, Perrin FE. Early functional deficit and microglial disturbances in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*. 2012;7(4).
190. Roberts K, Zeineddine R, Corcoran L, Li W, Campbell IL, Yerbury JJ. Extracellular aggregated Cu/Zn superoxide dismutase activates microglia to give a cytotoxic phenotype. *Glia*. 2013;61(3).
191. Zhao W, Beers DR, Henkel JS, Zhang W, Urushitani M, Julien JP, et al. Extracellular mutant SOD1 induces microglial-mediated motoneuron injury. *Glia*. 2010;58(2).
192. Ajmone-Cat MA, Onori A, Toselli C, Stronati E, Morlando M, Bozzoni I, et al. Increased FUS levels in astrocytes leads to astrocyte and microglia activation and neuronal death. *Sci Rep*. 2019;9(1).
193. Mitchell JC, McGoldrick P, Vance C, Hortobagyi T, Sreedharan J, Rogelj B, et al. Overexpression of human wild-type FUS causes progressive motor neuron degeneration in an age- and dose-dependent fashion. *Acta Neuropathol*. 2013;125(2).
194. Funikov SY, Rezvykh AP, Mazin P v., Morozov A v., Maltsev A v., Chicheva MM, et al. FUS(1-359) transgenic mice as a model of ALS: pathophysiological and molecular aspects of the proteinopathy. *Neurogenetics*. 2018;19(3).
195. Zhou Q, Mareljic N, Michaelsen M, Parhizkar S, Heindl S, Nuscher B, et al. Active poly-GA vaccination prevents microglia activation and motor deficits in a C9orf72 mouse model. *EMBO Mol Med*. 2020;12(2).
196. Zhu Q, Jiang J, Gendron TF, McAlonis-Downes M, Jiang L, Taylor A, et al. Reduced C9ORF72 function exacerbates gain of toxicity from ALS/FTD-causing repeat expansion in C9orf72. *Nat Neurosci*. 2020;23(5).
197. Sofroniew M v., Vinters H v. Astrocytes: Biology and pathology. Vol. 119, *Acta Neuropathologica*. 2010. p. 7–35.
198. Kawano H, Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Yoshioka N, Li HP, Kawamura K, et al. Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. Vol. 349, *Cell and Tissue Research*. 2012.
199. Panatier A, Robitaille R. Astrocytic mGluR5 and the tripartite synapse. Vol. 323, *Neuroscience*. Elsevier Ltd; 2016. p. 29–34.

200. Macvicar BA, Newman EA. Astrocyte regulation of blood flow in the brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(5).
201. Mogensen FLH, Delle C, Nedergaard M. The glymphatic system (En)during inflammation. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences.* 2021.
202. Bennett MVL, Contreras JE, Bukauskas FF, Sáez JC. New roles for astrocytes: Gap junction hemichannels have something to communicate. Vol. 26, *Trends in Neurosciences.* 2003.
203. Kettenmann H, Ransom BR, editors. *Neuroglia.* Oxford University Press; 2004.
204. Sáez JC, Retamal MA, Basilio D, Bukauskas FF, Bennett MVL. Connexin-based gap junction hemichannels: Gating mechanisms. Vol. 1711, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes.* 2005.
205. Orellana JA, Sáez PJ, Shoji KF, Schalper KA, Palacios-Prado N, Velarde V, et al. Modulation of brain hemichannels and gap junction channels by pro-inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration. Vol. 11, *Antioxidants and Redox Signaling.* 2009.
206. Garré JM, Retamal MA, Cassina P, Barbeito L, Bukauskas FF, Sáez JC, et al. FGF-1 induces ATP release from spinal astrocytes in culture and opens pannexin and connexin hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(52).
207. Bezzi 2001 A neuron-glia signalling network in the active brain.
208. de Pins B, Cifuentes-Díaz C, Thamila Farah A, López-Molina L, Montalban E, Sancho-Balsells A, et al. Conditional BDNF delivery from astrocytes rescues memory deficits, spine density and synaptic properties in the 5xFAD mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of Neuroscience.* 2019 Jan 30;2121–18.
209. Giralt A, Friedman HC, Caneda-Ferrón B, Urbán N, Moreno E, Rubio N, et al. BDNF regulation under GFAP promoter provides engineered astrocytes as a new approach for long-term protection in Huntington's disease. *Gene Ther.* 2010 Oct 13;17(10):1294–308.
210. Duarte Azevedo M, Sander S, Tenenbaum L. GDNF, A Neuron-Derived Factor Upregulated in Glial Cells during Disease. *J Clin Med.* 2020 Feb 7;9(2):456.
211. Verkhratsky A, Butt A. *Glial Neurobiology: A Textbook.* Glial Neurobiology: A Textbook. 2007.
212. Domeniconi M, Hempstead BL, Chao M v. Pro-NGF secreted by astrocytes promotes motor neuron cell death. *Molecular and Cellular Neuroscience.* 2007 Feb;34(2):271–9.
213. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. Vol. 24, *Annual Review of Neuroscience.* 2001.
214. Maragakis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of Disease: Astrocytes in neurodegenerative disease. Vol. 2, *Nature Clinical Practice Neurology.* 2006. p. 679–89.
215. Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, et al. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci.* 2007 May 15;10(5):615–22.
216. Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Castellanos R, Viera L, Beckman JS, et al. Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 2004 Apr;89(2):464–73.
217. Kia A, McAvoy K, Krishnamurthy K, Trotti D, Pasinelli P. Astrocytes expressing ALS-linked mutant FUS induce motor neuron death through release of tumor necrosis factor-alpha. *Glia.* 2018 May;66(5):1016–33.

218. Sofroniew M v. Astroglisis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015 Feb;7(2):a020420.
219. Pekny M, Pekna M. ASTROCYTE REACTIVITY AND REACTIVE ASTROGLIOSIS: COSTS AND BENEFITS. *Physiol Rev* [Internet]. 2014;94:1077–98. Available from: www.prv.org
220. Ridet JL, Malhotra SK, Privat a, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function [published erratum appears in *Trends Neurosci* 1998 Feb;21(2):80]. *Trends Neurosci.* 1997;20(1988).
221. Dong Y, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia.* 2001;36(2):180–90.
222. Falsig J, Pörzgen P, Lund S, Schratzenholz A, Leist M. The inflammatory transcriptome of reactive murine astrocytes and implications for their innate immune function. *J Neurochem.* 2006;96(3):893–907.
223. Pehar M, Martinez-Palma L, Peluffo H, Kamaid A, Cassina P, Barbeito L. Peroxynitrite-induced cytotoxicity in cultured astrocytes is associated with morphological changes and increased nitrotyrosine immunoreactivity. *Neurotox Res.* 2002;4(2):87–93.
224. Mishra PS, Dhull DK, Nalini A, Vijayalakshmi K, Sathyaprabha TN, Alladi PA, et al. Astroglia acquires a toxic neuroinflammatory role in response to the cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neuroinflammation.* 2016;13(1).
225. Tripathi P, Rodriguez-Muela N, Klim JR, de Boer AS, Agrawal S, Sandoe J, et al. Reactive Astrocytes Promote ALS-like Degeneration and Intracellular Protein Aggregation in Human Motor Neurons by Disrupting Autophagy through TGF- β 1. *Stem Cell Reports.* 2017;9(2).
226. Almad AA, Taga A, Joseph J, Gross SK, Welsh C, Patankar A, et al. Cx43 hemichannels contribute to astrocyte-mediated toxicity in sporadic and familial ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022;119(13).
227. Cassina P, Pehar M, Vargas MR, Castellanos R, Barbeito AG, Estévez AG, et al. Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron apoptosis: Implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 2005;93(1):38–46.
228. Pehar M, Vargas MR, Robinson KM, Cassina P, England P, Beckman JS, et al. Peroxynitrite transforms nerve growth factor into an apoptotic factor for motor neurons. *Free Radic Biol Med.* 2006 Dec 1;41(11):1632–44.
229. Vargas MR, Pehar M, Díaz-Amarilla PJ, Beckman JS, Barbeito L. Transcriptional profile of primary astrocytes expressing ALS-linked mutant SOD1. *J Neurosci Res.* 2008;86(16):3515–25.
230. Cassina P, Peluffo H, Pehar M, Martinez-Palma L, Ressler A, Beckman JS, et al. Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. *J Neurosci Res.* 2002 Jan 1;67(1):21–9.
231. Dawson VL, Brahmabhatt HP, Mong JA, Dawson TM. Expression of inducible nitric oxide synthase causes delayed neurotoxicity in primary mixed neuronal-glial cortical cultures. *Neuropharmacology.* 1994;33(11).
232. Estévez AG, Spear N, Manuel SM, Radi R, Henderson CE, Barbeito L, et al. Nitric Oxide and Superoxide Contribute to Motor Neuron Apoptosis Induced by Trophic Factor Deprivation. *The Journal of Neuroscience.* 1998 Feb 1;18(3):923–31.
233. Ouali Alami N, Schurr C, Olde Heuvel F, Tang L, Li Q, Tasdogan A, et al. NF- κ B activation in astrocytes drives a stage-specific beneficial neuroimmunological response in ALS. *EMBO J.* 2018 Aug 15;37(16).

234. Haidet-Phillips AM, Hester ME, Miranda CJ, Meyer K, Braun L, Frakes A, et al. Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat Biotechnol*. 2011 Sep 10;29(9):824–8.
235. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017 Jan 26;541(7638):481–7.
236. Yun SP, Kam TI, Panicker N, Kim S, Oh Y, Park JS, et al. Block of A1 astrocyte conversion by microglia is neuroprotective in models of Parkinson's disease. *Nat Med*. 2018 Jul 11;24(7):931–8.
237. Grimaldi A, Pediconi N, Oieni F, Pizzarelli R, Rosito M, Giubettini M, et al. Neuroinflammatory Processes, A1 Astrocyte Activation and Protein Aggregation in the Retina of Alzheimer's Disease Patients, Possible Biomarkers for Early Diagnosis. *Front Neurosci*. 2019 Sep 4;13.
238. Taylor X, Cisternas P, You Y, You Y, Xiang S, Marambio Y, et al. A1 reactive astrocytes and a loss of TREM2 are associated with an early stage of pathology in a mouse model of cerebral amyloid angiopathy. *J Neuroinflammation*. 2020 Dec 25;17(1):223.
239. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006 Jan 1;7(1):41–53.
240. Daneman R, Prat A. The blood–brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(1).
241. Janzer RC, Raff MC. Astrocytes induce blood–brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*. 1987 Jan;325(6101):253–7.
242. Heithoff BP, George KK, Phares AN, Zuidhoek IA, Munoz-Ballester C, Robel S. Astrocytes are necessary for blood–brain barrier maintenance in the adult mouse brain. *Glia*. 2021 Feb 21;69(2):436–72.
243. Winkler EA, Sengillo JD, Sullivan JS, Henkel JS, Appel SH, Zlokovic B v. Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte reductions in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2013;125(1).
244. Garbuzova-Davis S, Sanberg PR. Blood-CNS barrier impairment in ALS patients versus an animal model. Vol. 8, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2014.
245. Pekny M, Pekna M. Reactive gliosis in the pathogenesis of CNS diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2016 Mar;1862(3):483–91.
246. Burda JE, Sofroniew M v. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. Vol. 81, *Neuron*. 2014.
247. Zhang R, Gascon R, Miller RG, Gelinas DF, Mass J, Hadlock K, et al. Evidence for systemic immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). *J Neuroimmunol*. 2005;159(1–2).
248. Lu CH, Allen K, Oei F, Leoni E, Kuhle J, Tree T, et al. Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*. 2016;3(4).
249. Wei QQ, Hou YB, Zhang LY, Ou RW, Cao B, Chen YP, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neural Regen Res*. 2022;17(4):875.
250. Murdock BJ, Bender DE, Kashlan SR, Figueroa-Romero C, Backus C, Callaghan BC, et al. Increased ratio of circulating neutrophils to monocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2016;3(4).

251. Winkler EA, Sengillo JD, Sagare AP, Zhao Z, Ma Q, Zuniga E, et al. Blood-spinal cord barrier disruption contributes to early motor-neuron degeneration in ALS-model mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Mar 18;111(11).
252. Garofalo S, Cocozza G, Porzia A, Inghilleri M, Raspa M, Scavizzi F, et al. Natural killer cells modulate motor neuron-immune cell cross talk in models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Nat Commun*. 2020 Dec 14;11(1):1773.
253. Coque E, Salsac C, Espinosa-Carrasco G, Varga B, Degauque N, Cadoux M, et al. Cytotoxic CD8 + T lymphocytes expressing ALS-causing SOD1 mutant selectively trigger death of spinal motoneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(6).
254. Rentzos M, Rombos A, Nikolaou C, Zoga M, Zouvelou V, Dimitrakopoulos A, et al. Interleukin-15 and Interleukin-12 are elevated in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur Neurol*. 2010 May;63(5):285–90.
255. Graves MC, Fiala M, Dinglasan LA v., Liu NQ, Sayre J, Chiappelli F, et al. Inflammation in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord and brain is mediated by activated macrophages, mast cells and t cells. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders*. 2004;5(4).
256. Fiala M, Chattopadhyay M, la Cava A, Tse E, Liu G, Lourenco E, et al. IL-17A is increased in the serum and in spinal cord CD8 and mast cells of ALS patients. *J Neuroinflammation*. 2010 Nov 9;7.
257. Jones MK, Nair A, Gupta M. Mast cells in neurodegenerative disease. Vol. 13, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2019.
258. Kovacs M, Trias E, Varela V, Ibarburu S, Beckman JS, Moura IC, et al. CD34 identifies a subset of proliferating microglial cells associated with degenerating motor neurons in ALS. *Int J Mol Sci*. 2019 Aug 2;20(16).
259. Zhao W, Beers DR, Hooten KG, Sieglaff DH, Zhang A, Kalyana-Sundaram S, et al. Characterization of gene expression phenotype in amyotrophic lateral sclerosis monocytes. *JAMA Neurol*. 2017 Jun 1;74(6):677–85.
260. Murdock BJ, Zhou T, Kashlan SR, Little RJ, Goutman SA, Feldman EL. Correlation of peripheral immunity with rapid Amyotrophic lateral sclerosis progression. *JAMA Neurol*. 2017 Dec 1;74(12):1446–54.
261. Du Y, Zhao W, Thonhoff JR, Wang J, Wen S, Appel SH. Increased activation ability of monocytes from ALS patients. *Exp Neurol*. 2020 Jun 1;328.
262. McGill RB, Steyn FJ, Ngo ST, Thorpe KA, Heggie S, Ruitenberg MJ, et al. Monocytes and neutrophils are associated with clinical features in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Commun*. 2020;2(1).
263. Butovsky O, Siddiqui S, Gabriely G, Lanser AJ, Dake B, Murugaiyan G, et al. Modulating inflammatory monocytes with a unique microRNA gene signature ameliorates murine ALS. *Journal of Clinical Investigation*. 2012 Sep 4;122(9):3063–87.
264. Choi SJ, Hong YH, Kim SM, Shin JY, Suh YJ, Sung JJ. High neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts short survival duration in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Rep*. 2020 Dec 1;10(1).
265. Engelhardt JI, Tajti J, Appel SH. Lymphocytic Infiltrates in the Spinal Cord in Amyotrophic Lateral Sclerosis [Internet]. Available from: <http://archneur.jamanetwork.com/>
266. Rentzos M, Evangelopoulos E, Sereti E, Zouvelou V, Marmara S, Alexakis T, et al. Alterations of T cell subsets in ALS: A systemic immune activation? *Acta Neurol Scand*. 2012 Apr;125(4):260–4.

267. Henkel JS, Beers DR, Wen S, Rivera AL, Toennis KM, Appel JE, et al. Regulatory T-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival. *EMBO Mol Med*. 2013;5(1):64–79.
268. Beers DR, Zhao W, Wang J, Zhang X, Wen S, Neal D, et al. ALS patients' regulatory T lymphocytes are dysfunctional, and correlate with disease progression rate and severity. *JCI Insight*. 2017 Mar 9;2(5).
269. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: Development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. Vol. 27, *Annual Review of Immunology*. 2009.
270. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and Functions of Tissue Macrophages. Vol. 41, *Immunity*. 2014.
271. Floris S, Blezer ELA, Schreibelt G, Döpp E, van der Pol SMA, Schadee-Eestermans IL, et al. Blood-brain barrier permeability and monocyte infiltration in experimental allergic encephalomyelitis: A quantitative MRI study. *Brain*. 2004;127(3).
272. Reijerkerk A, Lakeman KAM, Drexhage JAR, van het Hof B, van Wijck Y, van der Pol SMA, et al. Brain endothelial barrier passage by monocytes is controlled by the endothelin system. *J Neurochem*. 2012;121(5).
273. Fyfe I. Proinflammatory monocytes might contribute to ALS progression. *Nat Rev Neurol*. 2017 Jul 12;13(7):385–385.
274. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Vol. 13, *Nature Reviews Immunology*. 2013. p. 159–75.
275. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. Vol. 210, *Journal of Experimental Medicine*. 2013. p. 1289–99.
276. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria [Internet]. Available from: www.sciencemag.org
277. Sheshachalam A, Srivastava N, Mitchell T, Lacy P, Eitzen G. Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. Vol. 5, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Research Foundation; 2014.
278. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. Vol. 18, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 134–47.
279. Baik SH, Cha MY, Hyun YM, Cho H, Hamza B, Kim DK, et al. Migration of neutrophils targeting amyloid plaques in Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol Aging*. 2014 Jun;35(6):1286–92.
280. Zenaro E, Pietronigro E, Bianca V della, Piacentino G, Marongiu L, Budui S, et al. Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nat Med*. 2015 Aug 8;21(8):880–6.
281. de Bondt M, Hellings N, Opdenakker G, Struyf S. Neutrophils: Underestimated players in the pathogenesis of multiple sclerosis (ms). *Int J Mol Sci*. 2020;21(12).
282. Tulangekar A, Sztal TE. Inflammation in duchenne muscular dystrophy—exploring the role of neutrophils in muscle damage and regeneration. Vol. 9, *Biomedicines*. 2021.
283. Thonhoff JR, Beers DR, Zhao W, Pleitez M, Simpson EP, Berry JD, et al. Expanded autologous regulatory T-lymphocyte infusions in ALS A phase I, first-in-human study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2018 Jul 1;5(4).
284. Yuan H, Zhu X, Zhou S, Chen Q, Zhu X, Xue M, et al. Role of mast cell activation in inducing microglial cells to release neurotrophin. *J Neurosci Res*. 2010;88(6).

285. Zhang S, Zeng X, Yang H, Hu G, He S. Mast cell tryptase induces microglia activation via protease-activated receptor 2 signaling. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2012;29(5–6).
286. Skaper SD, Facci L, Zusso M, Giusti P. Neuroinflammation, Mast Cells, and Glia: Dangerous Liaisons. *The Neuroscientist*. 2017 Oct 13;23(5):478–98.
287. Shalit M, Brenner T, Shohami E, Levi-Schaffer F. Interaction between mast cells and glial cells: an in vitro study. *J Neuroimmunol*. 1993 Mar;43(1–2):195–9.
288. McClain JL, Mazzotta EA, Maradiaga N, Duque-Wilckens N, Grants I, Robison AJ, et al. Histamine-dependent interactions between mast cells, glia, and neurons are altered following early-life adversity in mice and humans. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2020 Dec 1;319(6):G655–68.
289. Skaper SD, Facci L. Mast cell–glia axis in neuroinflammation and therapeutic potential of the anandamide congener palmitoylethanolamide. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2012 Dec 5;367(1607):3312–25.
290. Skaper SD, Facci L, Giusti P. Mast cells, glia and neuroinflammation: Partners in crime? Vol. 141, *Immunology*. 2014.
291. Haig DM, McMennamin C, Redmond J, Brown D, Young IG, Cohen SD, et al. Rat IL-3 stimulates the growth of rat mucosal mast cells in culture. *Immunology*. 1988 Oct;65(2):205–11.
292. Zsebo KM, Williams DA, Geissler EN, Broudy VC, Martin FH, Atkins HL, et al. Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell*. 1990 Oct;63(1):213–24.
293. Okayama Y, Kawakami T. Development, migration, and survival of mast cells. Vol. 34, *Immunologic Research*. 2006.
294. Dropp JJ. Mast cells in mammalian brain. *Cells Tissues Organs*. 1976;94(1).
295. Hendriksen E, van Bergeijk D, Oosting RS, Redegeld FA. Mast cells in neuroinflammation and brain disorders. Vol. 79, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Elsevier Ltd; 2017. p. 119–33.
296. Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front Immunol*. 2016 Jan 6;6.
297. ZHANG D, SPIELMANN A, WANG L, DING G, HUANG F, GU Q, et al. Mast-Cell Degranulation Induced by Physical Stimuli Involves the Activation of Transient-Receptor-Potential Channel TRPV2. *Physiol Res*. 2012 Feb 28;113–24.
298. Abonia JP, Friend DS, Austen WG, Moore FD, Carroll MC, Chan R, et al. Mast Cell Protease 5 Mediates Ischemia-Reperfusion Injury of Mouse Skeletal Muscle. *The Journal of Immunology*. 2005 Jun 1;174(11):7285–91.
299. Wernersson S, Pejler G. Mast cell secretory granules: Armed for battle. Vol. 14, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2014. p. 478–94.
300. Gupta K, Harvima IT. Mast cell-neural interactions contribute to pain and itch. Vol. 282, *Immunological Reviews*. Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. 168–87.
301. Medic N, Lorenzon P, Vita F, Trevisan E, Marchioli A, Soranzo MR, et al. Mast cell adhesion induces cytoskeletal modifications and programmed cell death in oligodendrocytes. *J Neuroimmunol*. 2010;218(1–2).
302. Costanza M, Colombo MP, Pedotti R. Mast cells in the pathogenesis of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. Vol. 13, *International Journal of Molecular Sciences*. 2012.

303. Elieh-Ali-Komi D, Cao Y. Role of Mast Cells in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Vol. 52, Clinical Reviews in Allergy and Immunology. 2017.
304. Weng Z, Zhang B, Tsilioni I, Theoharides TC. Nanotube Formation: A Rapid Form of 'alarm Signaling'? Clin Ther. 2016 May 1;38(5):1066–72.
305. Pertiwi KR, de Boer OJ, Mackaaij C, Pabittei DR, de Winter RJ, Li X, et al. Extracellular traps derived from macrophages, mast cells, eosinophils and neutrophils are generated in a time-dependent manner during atherothrombosis. J Pathol. 2019 Apr;247(4):505–12.
306. Nakamura Y, Kambe N, Saito M, Nishikomori R, Kim YG, Murakami M, et al. Mast cells mediate neutrophil recruitment and vascular leakage through the NLRP3 inflammasome in histamine-independent urticaria. Journal of Experimental Medicine. 2009;206(5).
307. Frenzel L, Hermine O. Mast cells and inflammation. Vol. 80, Joint Bone Spine. 2013. p. 141–5.
308. Conti P, Kempuraj D. Important role of mast cells in multiple sclerosis. Vol. 5, Multiple Sclerosis and Related Disorders. 2016.
309. Compton SJ, Cairns JA, Holgate ST, Walls AF. Interaction of human mast cell tryptase with endothelial cells to stimulate inflammatory cell recruitment. In: International Archives of Allergy and Immunology. 1999.
310. Heikkilä HM, Lätti S, Leskinen MJ, Hakala JK, Kovanen PT, Lindstedt KA. Activated mast cells induce endothelial cell apoptosis by a combined action of chymase and tumor necrosis factor- α . Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008;28(2).
311. Kunder CA, St John AL, Abraham SN. Mast cell modulation of the vascular and lymphatic endothelium. Vol. 118, Blood. 2011.
312. Moloney EB, de Winter F, Verhaagen J. ALS as a distal axonopathy: molecular mechanisms affecting neuromuscular junction stability in the presymptomatic stages of the disease. Front Neurosci. 2014 Aug 14;8.
313. Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, et al. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: Evidence in mice and man. Exp Neurol. 2004;185(2).
314. Kennel PF, Finiels F, Revah F, Mallet J. Neuromuscular function impairment is not caused by motor neurone loss in FALS mice: An electromyographic study. Neuroreport. 1996;7(8).
315. Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W, Caroni P. Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. Journal of Neuroscience. 2000;20(7).
316. Williamson TL, Cleveland DW. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. Nat Neurosci. 1999;2(1).
317. Ström AL, Gal J, Shi P, Kasarskis EJ, Hayward LJ, Zhu H. Retrograde axonal transport and motor neuron disease. Vol. 106, Journal of Neurochemistry. 2008.
318. Salvadores N, Sanhueza M, Manque P, Court FA. Axonal degeneration during aging and its functional role in neurodegenerative disorders. Vol. 11, Frontiers in Neuroscience. 2017.
319. Liberman AC, Trias E, da Silva Chagas L, Trindade P, dos Santos Pereira M, Refojo D, et al. Neuroimmune and Inflammatory Signals in Complex Disorders of the Central Nervous System. Neuroimmunomodulation. 2018;25(5–6):246–70.

320. Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. Vol. 187, *Journal of Cell Biology*. 2009. p. 761–72.
321. Lobsiger CS, Boillee S, McAlonis-Downes M, Khan AM, Feltri ML, Yamanaka K, et al. Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(11).
322. Lin W, Xu D, Austin CD, Caplazi P, Senger K, Sun Y, et al. Function of CSF1 and IL34 in Macrophage Homeostasis, Inflammation, and Cancer. *Front Immunol*. 2019 Sep 4;10.
323. Jensen L, Jørgensen LH, Bech RD, Frandsen U, Schrøder HD. Skeletal Muscle Remodelling as a Function of Disease Progression in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biomed Res Int*. 2016;2016.
324. Riva N, Chaabane L, Peviani M, Ungaro D, Domi T, Dina G, et al. Defining peripheral nervous system dysfunction in the SOD-1G93A transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2014;73(7).
325. Chiot A, Zaïdi S, Iltis C, Ribon M, Berriat F, Schiaffino L, et al. Modifying macrophages at the periphery has the capacity to change microglial reactivity and to extend ALS survival. *Nat Neurosci*. 2020;23(11).
326. Doble A. The pharmacology and mechanism of action of riluzole. Vol. 47, *Neurology*. Lippincott Williams and Wilkins; 1996.
327. Takei K, Watanabe K, Yuki S, Akimoto M, Sakata T, Palumbo J. Edaravone and its clinical development for amyotrophic lateral sclerosis. Vol. 18, *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*. 2017.
328. Zhang XW, Feng N, Liu YC, Guo Q, Wang JK, Bai YZ, et al. Neuroinflammation inhibition by small-molecule targeting USP7 noncatalytic domain for neurodegenerative disease therapy. *Sci Adv*. 2022 Aug 12;8(32).
329. Rizzo F, Riboldi G, Salani S, Nizzardo M, Simone C, Corti S, et al. Cellular therapy to target neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014 Mar 8;71(6):999–1015.
330. Ardura-Fabregat A, Boddeke EWGM, Boza-Serrano A, Brioschi S, Castro-Gomez S, Ceyzériat K, et al. Targeting Neuroinflammation to Treat Alzheimer's Disease. *CNS Drugs*. 2017 Dec 19;31(12):1057–82.
331. Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim BYS, Ona V, Li M, et al. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice [Internet]. 2002. Available from: www.nature.com
332. Van L, Bosch D, Tilkin P, Lemmens G, Robberecht W. Minocycline delays disease onset and mortality in a transgenic model of ALS.
333. Gordon PH, Moore DH, Miller RG, Florence JM, Verheijde JL, Doorish C, et al. Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomised trial. *Lancet Neurology*. 2007;6(12).
334. McGrath MS, Kahn JO, Herndier BG. Development of WF10, a novel macrophage-regulating agent. Vol. 3, *Current Opinion in Investigational Drugs*. 2002.
335. Giese T, McGrath MS, Stumm S, Schempp H, Elstner E, Meuer SC. Differential effects on innate versus adaptive immune responses by WF10. *Cell Immunol*. 2004;229(2).
336. Joo K, Lee Y, Choi D, Han J, Hong S, Kim YM, et al. An anti-inflammatory mechanism of taurine conjugated 5-aminosalicylic acid against experimental colitis: Taurine

- chloramine potentiates inhibitory effect of 5-aminosalicylic acid on IL-1 β -mediated NF κ B activation. *Eur J Pharmacol.* 2009;618(1–3).
337. Miller RG, Block G, Katz JS, Barohn RJ, Gopalakrishnan V, Cudkowicz M, et al. Randomized phase 2 trial of NP001-a novel immune regulator: Safety and early efficacy in ALS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2015;2(3).
 338. Miller RG, Zhang R, Bracci PM, Azhir A, Barohn R, Bedlack R, et al. Phase 2B randomized controlled trial of NP001 in amyotrophic lateral sclerosis: Pre-specified and post hoc analyses. *Muscle Nerve.* 2022;66(1).
 339. Dubreuil P, Letard S, Ciufolini M, Gros L, Humbert M, Castéran N, et al. Masitinib (AB1010), a potent and selective tyrosine kinase inhibitor targeting KIT. *PLoS One.* 2009;4(9).
 340. Anastassiadis T, Deacon SW, Devarajan K, Ma H, Peterson JR. Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol.* 2011 Nov 30;29(11):1039–45.
 341. Vermersch P, Brieva-Ruiz L, Fox RJ, Paul F, Ramio-Torrenta L, Schwab M, et al. Efficacy and Safety of Masitinib in Progressive Forms of Multiple Sclerosis. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation.* 2022;9(3).
 342. Mora JS, Bradley WG, Chaverri D, Hernández-Barral M, Mascias J, Gamez J, et al. Long-term survival analysis of masitinib in amyotrophic lateral sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord.* 2021;14.
 343. Folch J, Petrov D, Ettcheto M, Pedrós I, Abad S, Beas-Zarate C, et al. Masitinib for the treatment of mild to moderate Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother.* 2015 Jun 3;15(6):587–96.
 344. Ettcheto M, Cano A, Sanchez-López E, Verdaguer E, Folch J, Auladell C, et al. Masitinib for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis Manag.* 2021 Aug;11(4):263–76.
 345. Mora JS, Genge A, Chio A, Estol CJ, Chaverri D, Hernández M, et al. Masitinib as an add-on therapy to riluzole in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomized clinical trial. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2020 Jan 2;21(1–2):5–14.
 346. Napetschnig J, Wu H. Molecular Basis of NF- κ B Signaling. *Annu Rev Biophys.* 2013 May 6;42(1):443–68.
 347. Sun Z, Andersson R. NF- κ B Activation and Inhibition: A Review. *Shock.* 2002 Aug;18(2):99–106.
 348. Baldwin AS. The NF- κ B and I κ B proteins: New discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 1996;14.
 349. Dresselhaus EC, Meffert MK. Cellular specificity of NF- κ B function in the nervous system. Vol. 10, *Frontiers in Immunology.* 2019.
 350. Shih VFS, Tsui R, Caldwell A, Hoffmann A. A single NF κ B system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res.* 2011 Jan 23;21(1):86–102.
 351. Sun SC. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2017 Sep 5;17(9):545–58.
 352. Yu H, Lin L, Zhang Z, Zhang H, Hu H. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. Vol. 5, *Signal Transduction and Targeted Therapy.* Springer Nature; 2020.
 353. Giridharan S, Srinivasan M. Mechanisms of NF- κ B p65 and strategies for therapeutic manipulation. Vol. 11, *Journal of Inflammation Research.* Dove Medical Press Ltd; 2018. p. 407–19.

354. Schram S, Chuang D, Schmidt G, Piponov H, Helder C, Kerns J, et al. Mutant SOD1 prevents normal functional recovery through enhanced glial activation and loss of motor neuron innervation after peripheral nerve injury. *Neurobiol Dis.* 2019;124.
355. Meissner F, Molawi K, Zychlinsky A. Mutant superoxide dismutase 1-induced IL-1 β accelerates ALS pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(29).
356. Sargsyan SA, Blackburn DJ, Barber SC, Monk PN, Shaw PJ. Mutant SOD1 G93A microglia have an inflammatory phenotype and elevated production of MCP-1. *Neuroreport.* 2009;20(16).
357. Johann S, Heitzer M, Kanagaratnam M, Goswami A, Rizo T, Weis J, et al. NLRP3 inflammasome is expressed by astrocytes in the SOD1 mouse model of ALS and in human sporadic ALS patients. *Glia.* 2015;63(12).
358. Liu Y, Hao W, Dawson A, Liu S, Fassbender K. Expression of amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutant increases the neurotoxic potential of microglia via TLR2. *Journal of Biological Chemistry.* 2009;284(6).
359. Dutta K, Thammisetty SS, Boutej H, Bareil C, Julien JP. Mitigation of ALS Pathology by Neuron-Specific Inhibition of Nuclear Factor Kappa B Signaling. *Journal of Neuroscience.* 2020;40(26).
360. Nivon M, Fort L, Muller P, Richet E, Simon S, Guey B, et al. NF κ B is a central regulator of protein quality control in response to protein aggregation stresses via autophagy modulation. *Mol Biol Cell.* 2016;27(11).
361. Prell T, Lautenschläger J, Weidemann L, Ruhmer J, Witte OW, Grosskreutz J. Endoplasmic reticulum stress is accompanied by activation of NF- κ B in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2014;270(1–2).
362. Masrori P, Beckers J, Gossye H, van Damme P. The role of inflammation in neurodegeneration: novel insights into the role of the immune system in C9orf72 HRE-mediated ALS/FTD. Vol. 17, *Molecular Neurodegeneration.* 2022.
363. Akizuki M, Yamashita H, Uemura K, Maruyama H, Kawakami H, Ito H, et al. Optineurin suppression causes neuronal cell death via NF- κ B pathway. *J Neurochem.* 2013;126(6).
364. Oakes JA, Davies MC, Collins MO. TBK1: a new player in ALS linking autophagy and neuroinflammation. *Mol Brain.* 2017;10(1).
365. Roberti A, Chaffey LE, Greaves DR. NF- κ B Signaling and Inflammation—Drug Repurposing to Treat Inflammatory Disorders? *Biology (Basel).* 2022 Feb 26;11(3):372.
366. Piesche M, Roos J, Kühn B, Fettel J, Hellmuth N, Brat C, et al. The Emerging Therapeutic Potential of Nitro Fatty Acids and Other Michael Acceptor-Containing Drugs for the Treatment of Inflammation and Cancer. Vol. 11, *Frontiers in Pharmacology.* 2020.
367. Satoh T, Okamoto SI, Cui J, Watanabe Y, Furuta K, Suzuki M, et al. Activation of the Keap1/Nrf2 pathway for neuroprotection by electrophilic phase II inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(3).
368. O'brien J, Wendell SG. Electrophile modulation of inflammation: A two-hit approach. Vol. 10, *Metabolites.* 2020.
369. Taixing Cui S, Schopfer FJ, Zhang J, Chen K, Ichikawa T, S Baker PR, et al. Nitrated Fatty Acids: Endogenous Anti-inflammatory Signaling [Internet]. Vol. 281, *J Biol Chem.* 2006. Available from: <http://www.jbc.org>

370. Rodriguez-Duarte J, Galliussi G, Dapuelto R, Rossello J, Malacrida L, Kamaid A, et al. A novel nitroalkene- α -tocopherol analogue inhibits inflammation and ameliorates atherosclerosis in Apo E knockout mice. *Br J Pharmacol*. 2019;
371. Leonard J v., Morris AAM. Urea cycle disorders. *Seminars in Neonatology*. 2002;7(1):27–35.
372. Brahmachari S, Jana A, Pahan K. Sodium Benzoate, a Metabolite of Cinnamon and a Food Additive, Reduces Microglial and Astroglial Inflammatory Responses. *The Journal of Immunology*. 2009 Nov 1;183(9):5917–27.
373. Mastropietro G, Tiscornia I, Perelmuter K, Astrada S, Bollati-Fogolín M. HT-29 and Caco-2 reporter cell lines for functional studies of nuclear factor kappa B activation. *Mediators Inflamm*. 2015;2015.
374. Miller SA, White JA, Chowdhury R, Gales DN, Tameru B, Tiwari AK, et al. Effects of consumption of whole grape powder on basal NF- κ B signaling and inflammatory cytokine secretion in a mouse model of inflammation. *J Nutr Intermed Metab*. 2018;11.
375. Haziot A, Ferrero E, Köntgen F, Hijiya N, Yamamoto S, Silver J, et al. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity*. 1996;4(4).
376. Henn A, Lund S, Hedtjärn M, Schrattenholz A, Pörzgen P, Leist M. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. Vol. 26, *Altex*. 2009.
377. Henkel JS, Engelhardt JI, Siklós L, Simpson EP, Kim SH, Pan T, et al. Presence of Dendritic Cells, MCP-1, and Activated Microglia/Macrophages in Amyotrophic Lateral Sclerosis Spinal Cord Tissue. *Ann Neurol*. 2004;55(2).
378. Magnus T, Carmen J, Deleon J, Xue H, Pardo AC, Lepore AC, et al. Adult glial precursor proliferation in mutant SOD1G93A mice. *Glia*. 2008;56(2).
379. Lennartsson J, Rönnstrand L. Stem cell factor receptor/c-Kit: From basic Science to clinical implications. *Physiol Rev*. 2012;92(4).
380. Hegedus J, Putman CT, Tyreman N, Gordon T. Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Physiology*. 2008;586(14).
381. Beal MF, Ferrante RJ, Browne SE, Matthews RT, Kowall NW, Brown RH. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 1997;42(4).
382. Leigh PN, Whitwell H, Garofalo O, Buller J, Swash M, Martin JE, et al. Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis: Morphology, distribution, and specificity. *Brain*. 1991;114(2).
383. Zang DW, Lopes EC, Cheema SS. Loss of synaptophysin-positive boutons on lumbar motor neurons innervating the medial gastrocnemius muscle of the SOD1G93A G1H transgenic mouse model of ALS. *J Neurosci Res*. 2005;79(5).
384. Gudi V, Gai L, Herder V, Tejedor LS, Kipp M, Amor S, et al. Synaptophysin is a reliable marker for axonal damage. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2017;76(2).
385. Trias E, Beilby PR, Kovacs M, Ibarburu S, Varela V, Barreto-Núñez R, et al. Emergence of microglia bearing senescence markers during paralysis progression in a rat model of inherited ALS. *Front Aging Neurosci*. 2019;10(FEB).
386. Ju Hwang C, Choi DY, Park MH, Hong JT. NF- κ B as a Key Mediator of Brain Inflammation in Alzheimer's Disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2017;18(1).

387. Bellucci A, Bubacco L, Longhena F, Parrella E, Faustini G, Porrini V, et al. Nuclear Factor- κ B Dysregulation and α -Synuclein Pathology: Critical Interplay in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. Vol. 12, *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2020.
388. Wang C, Fan L, Khawaja RR, Liu B, Zhan L, Kodama L, et al. Microglial NF- κ B drives tau spreading and toxicity in a mouse model of tauopathy. *Nat Commun*. 2022;13(1).
389. Salvany S, Casanovas A, Piedrafita L, Tarabal O, Hernández S, Calderó J, et al. Microglial recruitment and mechanisms involved in the disruption of afferent synaptic terminals on spinal cord motor neurons after acute peripheral nerve injury. *Glia*. 2021;69(5).
390. Correa FG, Hernangómez M, Guaza C. Understanding Microglia–Neuron Cross Talk: Relevance of the Microglia–Neuron Cocultures. In 2013. p. 215–29.
391. Marinelli S, Basilico B, Marrone MC, Ragozzino D. Microglia-neuron crosstalk: Signaling mechanism and control of synaptic transmission. *Semin Cell Dev Biol*. 2019 Oct;94:138–51.
392. Vinogradova E v., Zhang X, Remillard D, Lazar DC, Suciú RM, Wang Y, et al. An Activity-Guided Map of Electrophile-Cysteine Interactions in Primary Human T Cells. *Cell*. 2020 Aug;182(4):1009-1026.e29.
393. Jobbagy S, Vitturi DA, Salvatore SR, Turell L, Pires MF, Kansanen E, et al. Electrophiles modulate glutathione reductase activity via alkylation and upregulation of glutathione biosynthesis. *Redox Biol*. 2019 Feb;21:101050.
394. Grilli M, Pizzi M, Memo M, Spano PF. Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF- κ B activation. *Science* (1979). 1996;274(5291).
395. Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(κ)B kinase- β [see comments]. *Nature*. 1998;396(6706).
396. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Vol. 42, *Cytokine*. 2008.
397. Gillard GO, Collette B, Anderson J, Chao J, Scannevin RH, Huss DJ, et al. DMF, but not other fumarates, inhibits NF- κ B activity in vitro in an Nrf2-independent manner. *J Neuroimmunol*. 2015;283.
398. Albrecht P, Bouchachia I, Goebels N, Henke N, Hofstetter HH, Issberner A, et al. Effects of dimethyl fumarate on neuroprotection and immunomodulation. *J Neuroinflammation*. 2012;9.
399. LoPachin RM, Gavin T. Reactions of electrophiles with nucleophilic thiolate sites: Relevance to pathophysiological mechanisms and remediation. Vol. 50, *Free Radical Research*. 2016.
400. Pandey MK, Sung B, Kunnumakkara AB, Sethi G, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Berberine modifies cysteine 179 of I κ B α kinase, suppresses nuclear factor- κ B-regulated antiapoptotic gene products, and potentiates apoptosis. *Cancer Res*. 2008;68(13).
401. Youn HS, Saitoh SI, Miyake K, Hwang DH. Inhibition of homodimerization of Toll-like receptor 4 by curcumin. *Biochem Pharmacol*. 2006;72(1).
402. Youn HS, Lee JK, Choi YJ, Saitoh SI, Miyake K, Hwang DH, et al. Cinnamaldehyde suppresses toll-like receptor 4 activation mediated through the inhibition of receptor oligomerization. *Biochem Pharmacol*. 2008;75(2).
403. Sako W, Ito H, Yoshida M, Koizumi H, Kamada M, Fujita K, et al. Nuclear factor κ B expression in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis and hereditary amyotrophic lateral sclerosis with optineurin mutations. *Clin Neuropathol*. 2012;31(6).

404. Srinivasan M, Lahiri DK. Significance of NF- κ B as a pivotal therapeutic target in the neurodegenerative pathologies of Alzheimer's disease and multiple sclerosis. *Expert Opin Ther Targets*. 2015;19(4).
405. Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, Aggarwal BB. Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy. Vol. 1799, *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. 2010.
406. Nagano S, Takahashi Y, Yamamoto K, Masutani H, Fujiwara N, Urushitani M, et al. A cysteine residue affects the conformational state and neuronal toxicity of mutant SOD1 in mice: Relevance to the pathogenesis of ALS. *Hum Mol Genet*. 2015;24(12).
407. Williams JR, Trias E, Beilby PR, Lopez NI, Labut EM, Bradford CS, et al. Copper delivery to the CNS by CuATSM effectively treats motor neuron disease in SODG93A mice co-expressing the Copper-Chaperone-for-SOD. *Neurobiol Dis*. 2016;89.
408. Meininger CJ, Yano H, Rottapel R, Bernstein A, Zsebo KM, Zetter BR. The c-kit receptor ligand functions as a mast cell chemoattractant. *Blood*. 1992 Feb 15;79(4):958–63.
409. Dorrington MG, Fraser IDC. NF- κ B Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration. *Front Immunol*. 2019 Apr 9;10.
410. de Filippo K, Dudeck A, Hasenberg M, Nye E, van Rooijen N, Hartmann K, et al. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood*. 2013 Jun 13;121(24):4930–7.
411. Leon A, Buriani A, Dal Toso R, Fabris M, Romanello S, Aloe L, et al. Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(9).
412. Lowry KS, Murray SS, McLean CA, Talman P, Mathers S, Lopes EC, et al. A potential role for the p75 low-affinity neurotrophin receptor in spinal motor neuron degeneration in murine and human amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders*. 2001;2(3).
413. Skaper SD, Facci L, Zusso M, Giusti P. An inflammation-centric view of neurological disease: Beyond the neuron. Vol. 12, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018.
414. Lee SB, Kalluri R. Mechanistic connection between inflammation and fibrosis. In: *Kidney International*. 2010.
415. Levi-Schaffer F, Micera A, Zamir E, Mechoulam H, Puxeddu I, Piliponsky AM, et al. Nerve growth factor and eosinophils in inflamed juvenile conjunctival nevus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(6).
416. Peschke K, Weitzmann A, Heger K, Behrendt R, Schubert N, Scholten J, et al. I κ B Kinase 2 Is Essential for IgE-Induced Mast Cell De Novo Cytokine Production but Not for Degranulation. *Cell Rep*. 2014;8(5).
417. Maldonado MD, García-Moreno H, González-Yanes C, Calvo JR. Possible Involvement of the Inhibition of NF- κ B Factor in Anti-Inflammatory Actions That Melatonin Exerts on Mast Cells. *J Cell Biochem*. 2016;117(8).
418. Callegari I, Derfuss T, Galli E. Update on treatment in multiple sclerosis. *Presse Med*. 2021 Jun;50(2):104068.
419. Kim A, Lalonde K, Truesdell A, Gomes Welter P, Brocardo PS, Rosenstock TR, et al. New Avenues for the Treatment of Huntington's Disease. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 4;22(16):8363.
420. Briggs R, Kennelly SP, O'Neill D. Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clinical Medicine*. 2016 Jun 1;16(3):247–53.

- 421. Kulisevsky J, Oliveira L, Fox SH. Update in therapeutic strategies for Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*. 2018 Aug;31(4):439–47.
- 422. Jaiswal MK. Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. *Med Res Rev*. 2019 Mar 12;39(2):733–48.
- 423. Petrov D, Mansfield C, Moussy A, Hermine O. ALS clinical trials review: 20 years of failure. Are we any closer to registering a new treatment? Vol. 9, *Frontiers in Aging Neuroscience*. Frontiers Research Foundation; 2017.
- 424. Kastrati I, Siklos MI, Calderon-Gierszal EL, El-Shennawy L, Georgieva G, Thayer EN, et al. Dimethyl fumarate inhibits the nuclear factor κ B pathway in breast cancer cells by covalent modification of p65 protein. *Journal of Biological Chemistry*. 2016;291(7).
- 425. Bright JJ, Kanakasabai S, Chearwae W, Chakraborty S. PPAR regulation of inflammatory signaling in CNS diseases. *PPAR Research*. 2008.
- 426. Corona JC, Duchen MR. PPAR γ as a therapeutic target to rescue mitochondrial function in neurological disease. Vol. 100, *Free Radical Biology and Medicine*. 2016.