



Ministerio
**de Educación
y Cultura**



Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Metaloproteasas de matriz 2 y 9 como posibles marcadores tempranos de esclerosis lateral amiotrófica: un estudio en el modelo experimental SOD1G93A en ratas

Dra. M.V. María Noel Cuitiño

Orientadora: Dr. Silvia Olivera-Bravo

Co-orientadora: Dra. Marta Marco

Setiembre 2024

Contenido

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).....	5
<i>Generalidades</i>	5
<i>Genética y ELA</i>	7
<i>Mecanismos patológicos descritos en ELA</i>	8
<i>Modelos experimentales dependientes de SOD1</i>	13
Metaloproteasas de la matriz	14
<i>Definición, funciones y clasificación</i>	14
<i>Clasificación de las MMP</i>	16
<i>Inhibidores endógenos de las MMP</i>	17
<i>MMPs en el SNC</i>	18
<i>MMP2 y 9 en ELA</i>	18
Necesidad de biomarcadores en ELA.....	20
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
Aspectos éticos	23
Animales	23
<i>Colonia</i>	23
<i>Harenes</i>	23
<i>Marcado de las ratas</i>	23
Genotipado mediante PCR	24
Procesamiento de las muestras para zimografía y <i>dot blotting</i>	24
Zimografía en gel (Marco y cols. 2020)	24
Dot Blotting (Isasi y cols. 2019; Olivera-Bravo y cols. 2022)	24
Inmunofluorescencia	25
Análisis de datos	25
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	47
PERSPECTIVAS.....	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS.....	59

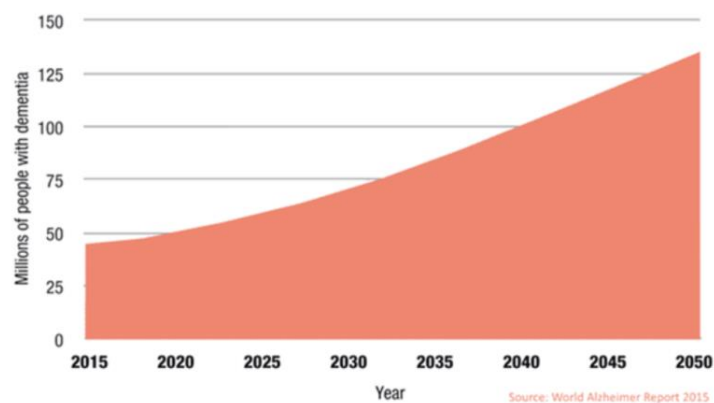
RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas, incluidas la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington, plantean desafíos importantes para los sistemas de salud mundiales. La detección temprana de estas condiciones es crucial para una intervención oportuna y mejores resultados para los pacientes para lo cual se necesitan biomarcadores diagnósticos y/o de progresión de cada condición. Las metaloproteasas de matriz (MMPs), una clase de enzimas implicadas en la proteólisis, han surgido como posibles marcadores tempranos de enfermedades neurodegenerativas dada las remodelaciones asociadas a su actividad que han sido observadas en el SNC de algunos pacientes. En la ELA, una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la muerte de motoneuronas superiores e inferiores, ocasionando la atrofia muscular progresiva y la muerte dentro de los 3 a 5 años posteriores al diagnóstico, se han propuesto algunas MMPs como desempeñando un papel en la enfermedad y como probables biomarcadores de la enfermedad. Esta tesis tiene como objetivo analizar los niveles de las MMPs 2 y 9 para evaluar su posible potencial como marcadores tempranos en un modelo preclínico de ELA, explorando su potencial diagnóstico y su relevancia en la progresión de la enfermedad. El análisis de la actividad de MMP-2 y MMP-9 fue realizado por zimografía en gel en muestras de suero, médula espinal lumbar y cervical y de músculos soleo y extensor digital largo en ratas transgénicas y no transgénicas del modelo SOD1G93A en etapa presintomática y sintomática/terminal de la enfermedad. Los resultados obtenidos indican que si bien hay algunos cambios en los niveles de actividad de MMP-2 y MMP-9 en los animales transgénicos sintomáticos, los mismos son de escasa entidad y al no observarse cambios en los niveles séricos de ninguna de estas MMPs, se impide el seguimiento y monitoreo en los animales portadores de la mutación. Estos resultados llevan a concluir que al menos en este modelo experimental, estas MMPs no pueden considerarse biomarcadores tempranos de la enfermedad, lo que podría atribuirse en parte a diferencias entre el modelo empleado en la tesis y las especies y los modelos reportados en la literatura.

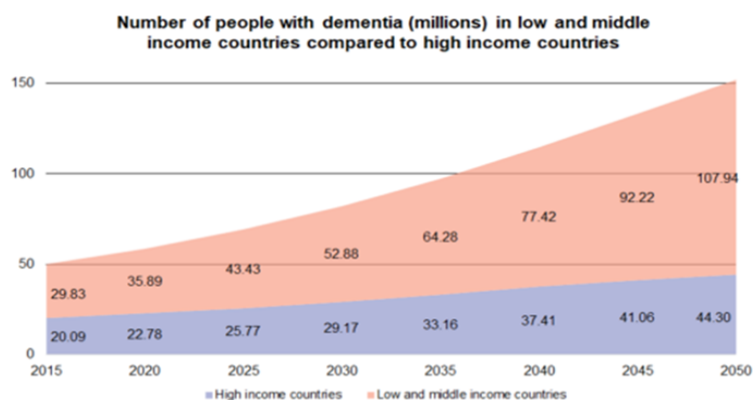
INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo muy variado de dolencias que se caracterizan por un proceso de deterioro progresivo de la estructura y la función del sistema nervioso central (SNC) o periférico (SNP). Se incluyen en la categoría de enfermedades neurodegenerativas condiciones incurables y debilitantes que tienen como resultado la degeneración progresiva o la muerte de las células nerviosas. Este fenómeno provoca problemas de movimiento (ataxias) o alteraciones del rendimiento mental (demencias), que son las que representan una mayor proporción (Al-Chalabi y Hardiman 2013; Brown y Al-Chalabi 2017). Algunas de las más comunes son la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, seguidas en prevalencia por la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) entre otras. Estas enfermedades afectan a millones de personas en todo el mundo y su prevalencia es creciente, fundamentalmente en países de bajos y medios ingresos como los de nuestra región (Figura 1). El riesgo de padecer una enfermedad neurodegenerativa también aumenta de forma drástica con la edad. De acuerdo con los expertos, una combinación de la herencia genética de una persona y ciertos factores ambientales (alcoholismo, tumores, ictus o infarto cerebral, exposición a ciertas toxinas o productos químicos y virus) acaba definiendo su perfil de riesgo.

A



B



<https://www.alzint.org/resource/numbers-of-people-with-dementia-worldwide/>

Figura 1. Tasa de demencia a lo largo del tiempo (A) y desglosada por ingresos (B). La gráfica superior muestra la tendencia de crecimiento de demencia en todo el mundo, mientras que la inferior desglosa por ingresos. Mientras que los países de ingresos altos han logrado atenuar la pendiente (azul), los países de ingresos bajos y medios (rojo) tienen una pendiente mucho más inclinada, indicando una tasa de crecimiento mucho mayor.

Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)

Generalidades

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa donde las motoneuronas superiores e inferiores se dañan y mueren lo que provoca una parálisis muscular implacablemente progresiva (Figura 2) y la muerte del paciente generalmente por insuficiencia respiratoria a los tres-cinco años de su aparición. Los primeros signos y síntomas de la enfermedad pueden incluir espasmos musculares, calambres, rigidez o debilidad. Las personas afectadas pueden desarrollar dificultad para hablar y más tarde disfagia. A medida que la enfermedad avanza los músculos se debilitan y los brazos y las piernas comienzan a presentar atrofas. Las personas con ELA pierden la fuerza y la capacidad para caminar, además, la respiración se hace difícil debido a que los músculos del sistema respiratorio se debilitan (Al-Chalabi y Hardiman 2013).

La entidad que afecta a las neuronas motoras fue reconocida formalmente como ELA por Charcot en 1869 (Charcot y cols. 1869) y es generalmente más común en los hombres que en las mujeres por un factor de entre 1,2 y 1,5. La incidencia de la ELA en las poblaciones europeas es de 2-3 personas por año por cada 100.000 personas de la población general mayores de 15 años, y el riesgo global de desarrollar la enfermedad a lo largo de la vida es de 1:350 para los hombres y de 1:400 para las mujeres. Esta disparidad se atribuye en gran medida a la mayor frecuencia de la ELA de inicio espinal en los hombres (Al-Chalabi y Hardiman 2013).

Los estudios poblacionales demuestran que la supervivencia media de los pacientes con "ELA clásica" (es decir que se ven afectadas tanto neuronas motoras superiores como inferiores) es de 2-5 años desde la aparición de los síntomas y la existencia de un retraso de 9-12 meses desde el primer síntoma hasta el diagnóstico. La mayoría de las personas con ELA mueren de insuficiencia respiratoria entre 2 y 10 años después de que se manifiesten los primeros síntomas y signos, aunque la progresión varía ampliamente entre individuos. La sobrevivencia reportada en países de Sudamérica (Uruguay, Argentina y Brasil) es en promedio nueve meses menos (Brooks y cols. 1994). Los factores que predicen una progresión rápida son la edad avanzada, el inicio en la zona bulbar, la corta duración desde el primer síntoma hasta el diagnóstico, la presencia de deterioro cognitivo y el genotipo. Las variantes simétricas con afectación dominante de las motoneuronas superiores o inferiores generalmente progresan lentamente, mientras que las variantes asimétricas (afectan un miembro superior e inferior ipsilateral) con afectación mixta de ambas poblaciones generalmente progresan más rápidamente. Los individuos con deterioro cognitivo, especialmente en los dominios ejecutivos, tienden a tener un peor pronóstico, con una rápida progresión y una menor supervivencia.

Hasta la década de 1950, se creyó que la ELA era una enfermedad esporádica, hasta que Kurland y Mulder en 1955 informaron que de una serie de casos de 58 pacientes, el 10% tenía ELA familiar. Por tanto, la separación de la ELA en subtipos familiares y esporádicos se ha basado tradicionalmente en la presencia de un historial de ELA en miembros de la familia, lo que ocurre en aproximadamente el 5-10% de los casos (Kurland y Mulder 1955). Por lo general, las personas con ELA de tipo esporádico desarrollan las características de la enfermedad a finales de los 50 o principios de los 60 años de edad. Entre el 5% y 10% de las personas con ELA con antecedentes familiares de esta enfermedad o de una afección relacionada denominada demencia frontotemporal (DFT), tienen signos y síntomas que suelen aparecer por primera vez alrededor de los 50 años de edad. En raras ocasiones las personas con ELA familiar desarrollan síntomas en la infancia o la adolescencia y las formas juveniles son poco frecuentes. Aunque casi todos los estudios

epidemiológicos de base poblacional se han llevado a cabo en individuos europeos, los resultados son relativamente consistentes (Al-Chalabi y Hardiman 2013).

Los criterios diagnósticos de ELA definidos en base a la certeza del diagnóstico clínico y acordados por la Federación Mundial de Neurología en los “Criterios de El Escorial” (1994) han sufrido una serie de ajustes, siendo los criterios Awaji-Shima (2006), los que han mejorado la sensibilidad diagnóstica de la enfermedad sin aumentar las tasas de falsos positivos. Los criterios diagnósticos asumen que las presentaciones clínicas se subdividen por el lugar de inicio (bulbar o espinal), y por el grado de afectación de la motoneurona superior y de la motoneurona inferior. Actualmente, estos criterios están siendo criticados, por suponer que la ELA es una degeneración homogénea del sistema motor con una trayectoria de la enfermedad reconocible y definida.

Por otra parte, hasta hace poco tiempo, se consideraba que la ELA era causada casi exclusivamente por una degeneración motora y la presencia de deterioro cognitivo no se reconoció plenamente hasta la última década del siglo XX (Key y cols. 1993). Con la llegada de las tecnologías modernas, actualmente hay suficientes evidencias que apoyan un considerable solapamiento entre la ELA y la degeneración frontotemporal. Aproximadamente el 20% de las personas con ELA desarrollan DFT y son diagnosticados como ELA-DFT (Goldstein y cols. 2013). Se reconoce la necesidad urgente de una subclasificación fiable, que debería incluir la afectación extra motora, incorporando el grado y tipo de deterioro cognitivo y conductual presente.

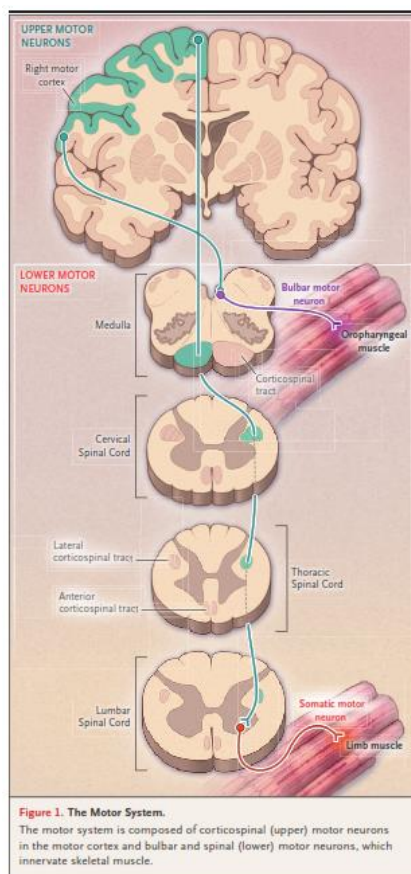


Figura 2: Esquema del sistema motor afectado en ELA: El dibujo muestra el sistema motor que inerva los músculos esqueléticos y que es afectado en la ELA, destacando en verde las regiones donde se encuentran las motoneuronas afectadas y en violeta o rojo su relación con los músculos esqueléticos de los miembros superiores o inferiores que estas motoneuronas inervan (Brown y Al Chalabi 2017; Zhou y cols. 2019).

Genética y ELA

Las mutaciones en varios genes pueden causar ELA familiar y contribuir al desarrollo de ELA esporádica. Se estima que el 60% de las personas con ELA familiar tiene una mutación genética identificada. La causa de la enfermedad en el resto de los individuos se desconoce. El patrón de herencia varía dependiendo del gen implicado, la mayoría de los casos se heredan con un patrón autosómico dominante lo que significa que una copia del gen alterado en cada célula es suficiente para expresar la enfermedad. Las mutaciones del gen C9orf72 (del inglés *chromosome 9 open reading frame 72*) son responsables del 30 al 40% de los casos de ELA familiar en EEUU y Europa. Este gen situado en el brazo corto del cromosoma 9 codifica una proteína de función desconocida que se encuentra en muchos tejidos, incluyendo el nervioso y parece estar situada en las terminales presinápticas. Las mutaciones, consistentes en expansiones de repetición hexanucleotídica, reducen la cantidad de proteína C9orf72 codificada. Algunas personas con esta mutación pueden desarrollar DFT o ELA-DFT (Andersen y cols. 2011).

A nivel mundial, las mutaciones del gen que codifica para la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1) representan entre el 15 al 20% de ELA familiar. El gen SOD1 está situado en el brazo largo del cromosoma 21 y codifica la SOD1 que es abundante en las células de todo el organismo y desempeña un papel en la descomposición de los radicales superóxido. Se han identificado al menos 200 mutaciones en el gen SOD1 en las personas con ELA, la mayoría consistentes en mutaciones que cambian aminoácidos. Salvo excepciones estas mutaciones son dominantes y los pacientes con ELA familiar heterocigotos tienen entre un 50 y un 60 % del nivel normal de actividad de la SOD1 en células sanguíneas y en el cerebro. Alrededor de la mitad de las personas con ELA en EEUU tienen una mutación particular de SOD1 que reemplaza el aminoácido alanina por el aminoácido valina en la posición 5 (Aa5Val o A5V) lo que da lugar a unas enzimas con función alterada y con frecuencia se asocia con los signos y síntomas más graves- (Al-Chalabi y Hardiman 2013).

Las mutaciones de los genes TARDBP (del inglés *TAR DNA binding protein*) y FUS (del inglés *FUS RNA binding protein*) representan cada uno aproximadamente el 5 % de los casos de ELA familiar. Hay mutaciones en otros genes que están presentes en un número muy menor de pacientes (Kwiatkowski y cols. 2009).

Aunque la ELA presenta muerte de motoneuronas aún no está claro porque estas células son particularmente sensibles a las mutaciones que se describen. Algunos de los mecanismos que se han sugerido incluyen aumento de los radicales superóxidos, aumento de la producción de otros tipos de radicales tóxicos, aumento de apoptosis, acúmulos proteicos que pueden ser tóxicos para las células, entre otras razones (Al-Chalabi y cols. 2013).

Mecanismos patológicos descritos en ELA

Los procesos patogénicos subyacentes a la ELA son multifactoriales y, en la actualidad, no está totalmente determinado si la patología resulta de la compleja interacción entre múltiples mecanismos, como factores genéticos, estrés oxidativo, excitotoxicidad y agregación de proteínas, así como alteraciones en el procesamiento del ARN, alteraciones en el transporte axonal y disfunción mitocondrial. También el papel cada vez más reconocido de las células gliales, la implicación de vías de señalización molecular en la supervivencia y muerte celular de las motoneuronas, y el concepto emergente de que alteraciones en la unión neuromuscular y en el compartimento axonal distal son aspectos tempranos e importantes de la fisiopatología de la enfermedad (Ferraïoulo y cols 2011).

Factores genéticos

Como se dijo anteriormente, la ELA suele ser una enfermedad esporádica con 5-10% de los casos familiares y mayoritariamente de herencia autosómica dominante. La identificación de los subtipos genéticos de ELA ha establecido mecanismos patogénicos claves. Las variantes genéticas asociadas a las formas familiares han proporcionado pistas importantes sobre los mecanismos operantes no sólo en los casos familiares sino también en los de ELA esporádica. En este mismo sentido, muchos de los mecanismos descritos se obtuvieron de modelos animales de la enfermedad con participación de mutaciones en la enzima SOD1 (Ferraïoulo y cols. 2011).

Estrés oxidativo

El estrés oxidativo que provoca daños estructurales y cambios en la señalización sensible al redox, surge de un desequilibrio entre la generación y la eliminación de especies reactivas del oxígeno (ROS) o del nitrógeno (RNS), y/o de una reducción de la capacidad del sistema biológico para eliminar o reparar el daño inducido por dichas especies. Se ha mostrado especial interés en el papel del estrés oxidativo en la ELA, porque los pacientes con mutaciones en SOD1, muestran una elevación de los marcadores de daño por ROS. Además, niveles elevados de daño oxidativo en proteínas, lípidos y el ADN en tejidos post mortem de pacientes con casos de ELA familiar y esporádica relacionados con SOD1. El daño oxidativo a especies de ARN también se ha documentado en modelos de ratón SOD1 y en el SNC (Rosen y cols. 1993). En el modelo en ratón, la oxidación del ARNm se encuentra principalmente en las motoneuronas y en oligodendrocitos, en las primeras fases presintomáticas de la enfermedad y se asocia a una menor expresión de las proteínas codificadas. En tanto, los modelos celulares de la proteína TDP-43 indican que su presencia induce la oxidación de las motoneuronas. Múltiples estudios han demostrado que el estrés oxidativo interactúa con otros procesos fisiopatológicos que contribuyen a la lesión de la motoneurona, incluida la excitotoxicidad, la alteración mitocondrial, la agregación proteica, el estrés del retículo endoplásmico (RE) y alteraciones en la señalización de los astrocitos y la microglía. Por tanto, el alivio eficaz del estrés oxidativo podría mejorar múltiples facetas de la patología de la degeneración de la motoneurona. Un metaanálisis de las intervenciones terapéuticas probadas en ratones mSOD1 llegó a la conclusión de que las terapias antioxidantes eran el tipo de fármaco más eficaz para mejorar la supervivencia (Brujin y cols. 2004).

Disfunción mitocondrial

Varias líneas de evidencia implican la disfunción mitocondrial en la patogénesis de la ELA. En los casos de mutaciones de la SOD1, la proteína mutada se agrega en vacuolas en el espacio intermembranal mitocondrial (Wong y cols. 1995), y muestra un aumento de la adherencia a la membrana externa mitocondrial dependiente de la edad, que se postula que conduce a la disfunción mitocondrial selectivamente en la médula espinal al impedir la importación de proteínas de la cadena respiratoria, sugiriendo que el metabolismo energético desregulado contribuye a la disfunción de la motoneurona en la ELA. La amortiguación del calcio está alterada en las

mitocondrias purificadas del SNC de ratones que expresan SOD1 mutada y podría aumentar la susceptibilidad de las motoneuronas a alteraciones de la homeostasis del calcio asociada a la excitotoxicidad mediada por glutamato. Además, en modelos experimentales de ELA, el estrés de retículo endoplásmico podría interrumpir el intercambio de calcio entre este organelo y las mitocondrias (Mattiazzi y cols. 2002).

Se propone además que la muerte de las motoneuronas en la ELA implica la activación de las caspasas y la apoptosis y es probable que el daño a la función mitocondrial pueda contribuir a este proceso. Se ha observado una morfología mitocondrial alterada en músculo esquelético y neuronas motoras espinales de pacientes con ELA. Curiosamente, en algunos modelos de ratón que sobreexpresan SOD1 mutada hay vacuolación mitocondrial durante la etapa presintomática de la enfermedad, lo que sugiere que la disfunción mitocondrial es un evento temprano en la cascada fisiopatológica de la lesión de la motoneurona. La morfología mitocondrial también está alterada en las motoneuronas primarias y en células NSC-34 (línea celular motoneuronal murina) que expresan SOD1 mutante. El transporte axonal de mitocondrias está alterado en modelos experimentales de ELA, y es posible que una reducción del contenido mitocondrial del axón distal, combinada con función mitocondrial alterada, conduzca a la axonopatía (De Vos y cols. 2007).

Excitotoxicidad

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC y ejerce sus efectos a través de una familia muy grande de receptores ionotrópicos y metabotrópicos. La señal excitatoria termina con la eliminación del glutamato de la hendidura sináptica por mecanismos de recaptación de glutamato donde el más abundante es el transportador de aminoácidos excitatorios 2 astrocitario (EAAT2; también conocido como SLC1A2 o GLT1) (Van Damme y cols. 2005). Las motoneuronas son especialmente vulnerables a la excitotoxicidad (resultante de la sobreactivación de receptores glutamatérgicos) mediada por los receptores AMPA, la baja expresión de la subunidad GluR2 y de proteínas amortiguadoras del calcio. En algunos pacientes con ELA, los niveles de glutamato en el LCR son elevados y la expresión y actividad de EAAT2 se reducen en las zonas patológicamente afectadas del SNC, aunque no está claro si esto es una causa o una consecuencia de la pérdida neuronal (Shaw y cols. 1995). Los estudios electrofisiológicos en humanos han mostrado hiperexcitabilidad de las motoneuronas en las fases presintomáticas o tempranas de la ELA. Además, una mutación de un gen recientemente identificado vinculado a la ELA que codifica la d-aminoácido oxidasa (DAO), la enzima responsable de la desaminación oxidativa de los d-aminoácidos, incluyendo la d-serina que es un activador y coagonista de los receptores NMDA, podrían contribuir a la lesión excitotóxica. La reducción de la excitotoxicidad fue la primera estrategia utilizada para ralentizar la progresión de la enfermedad. El Riluzol, que actúa mediante varios mecanismos, incluido la inhibición de la liberación presináptica de glutamato, ha demostrado un modesto incremento en la supervivencia de los pacientes.

Tráfico endosomal desagregado

La endocitosis es el proceso por el cual las moléculas extracelulares son captadas en la membrana de la superficie celular y se introducen en la célula, donde la carga llega a su destino final a través de un complejo sistema de organelos denominado red endosomal. La desregulación de este sistema se ha implicado en varios subtipos genéticos de ELA (Yang y cols. 2001). Las mutaciones en el gen alsina se asocian con una forma de ELA de inicio juvenil autosómica recesiva. Alsina es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina para la proteína GTPasa Rab5 que participa en la fusión y el tráfico endosomal así como en el crecimiento de las neuritas. En modelos celulares, la pérdida de la función de la alsina provoca una reducción de la movilidad endosomal, una mayor conversión de endosomas en lisosomas y una mayor degradación de receptores de glutamato internalizados. Las motoneuronas pueden ser especialmente susceptibles a las alteraciones de esta red porque sus

largos procesos axonales provocan una gran demanda de componentes de membrana (Lai y cols. 2006).

Defectos en el transporte axonal

Los defectos del transporte axonal, la disfunción axonal y la disfunción del citoesqueleto de variantes en los genes que codifican la proteína tau, la cadena pesada del neurofilamento pesado y periferina se han reportado en casos de ELA. Las pruebas obtenidas tanto de pacientes como de modelos sugieren que la ELA es una axonopatía retrógrada. Es probable que los defectos del transporte axonal contribuyan a este proceso y que el mismo pueda combinarse con la disfunción mitocondrial para causar un agotamiento energético en el axón distal (De Vos y cols. 2007).

Neuroinflamación

Los mediadores proinflamatorios, como la proteína 1 quimioatrayente de monocitos, la interleukina (IL) 8 e indicadores bioquímicos de activación de la respuesta inmunitaria están presentes en el LCR de pacientes con ELA. Los recuentos reducidos de células T reguladoras CD4+CD25 y monocitos (células CD14+) se detectan precozmente en la ELA, lo que sugiere el reclutamiento de estas células en el SNC al principio del proceso neurodegenerativo. Las células T reguladoras interactúan con la microglía del SNC y atenúan la neuroinflamación estimulando la secreción de citoquinas antiinflamatorias. En consonancia con este escenario, el fenotipo de ELA más agresivo (ratones dobles transgénicos portadores de SOD1 mutada y carentes de CD4) es reversible mediante trasplante de médula ósea. Un estudio reciente ha identificado al CD40L -un ligando expresado por las células T que activa la respuesta inmunitaria cuando se une al CD40 en las células presentadoras de antígenos- como una diana terapéutica prometedora. La inyección intraperitoneal de un anticuerpo monoclonal específico para CD40L, MR1, en ratones SOD1G93A, retrasó la aparición de la enfermedad, prolongó la supervivencia, redujo la astrogliosis del SNC y la activación microglial (Beers y cols. 2008).

La activación del sistema del complemento puede desencadenar una respuesta inmunitaria adaptativa, en la que participan células presentadoras de antígenos, células T y células B, que en última instancia conduce a la inflamación. La activación de los astrocitos desempeña un papel central en la inflamación, y los astrocitos que expresan SOD1 mutante secretan mediadores inflamatorios, entre ellos prostaglandina E2, leucotrieno B4 y óxido nítrico tanto en condiciones basales como activadas. Además, la sobrevida en los co-cultivos de motoneuronas embrionarias humanas y astrocitos de roedores o humanos que expresan SOD1 mutante podía mejorarse inhibiendo los receptores de prostaglandina. En conjunto, estos hallazgos sugieren que los astrocitos mSOD1 son intrínsecamente más propensos a entrar en un estado proinflamatorio activado que sus homólogos de tipo salvaje (Hensley y cols. 2006).

Estrés de retículo endoplásmico

Las inclusiones intracelulares relacionadas con la acumulación de proteínas mal plegadas o desplegadas son un sello patológico de la ELA. El mal plegamiento de proteínas provoca la vía de respuesta al estrés de retículo endoplásmico (RE). La respuesta inicial a las proteínas (UPR) (Kaufman y cols. 2002) implica el reconocimiento de las proteínas aberrantes por chaperonas residentes en el RE que corrigen el plegamiento proteico. Además, las proteínas no funcionales pueden causar la supresión de la traducción general y la degradación de proteínas asociada al RE) (Yamagishi y cols. 2007). Aunque estos mecanismos son inicialmente citoprotectores, su activación prolongada puede desencadenar señales apoptóticas (Hitomi y cols. 2004). Varias líneas de evidencia implican el estrés del RE como una de las lesiones de la motoneurona en la ELA. La proteína disulfuro isomerasa (PDI), una chaperona residente en el RE y un marcador de la UPR, se activa en ratones que sobreexpresan SOD1 mutada antes de la aparición de la enfermedad y se

colocaliza con inclusiones de SOD1 mutada en el líquido cefalorraquídeo y biopsias de pacientes con ELA esporádica. El alza diferencial de varios marcadores UPR precedió a la denervación muscular y la exposición de células NSC-34 y motoneuronas espinales primarias al líquido cefalorraquídeo de pacientes con ELA condujo a evidencias claras de estrés de RE, incluida la expresión de marcadores de la UPR, fragmentación de RE y activación de la caspasa-12 (Vijayalakshmi y cols. 2011).

Agregados proteicos

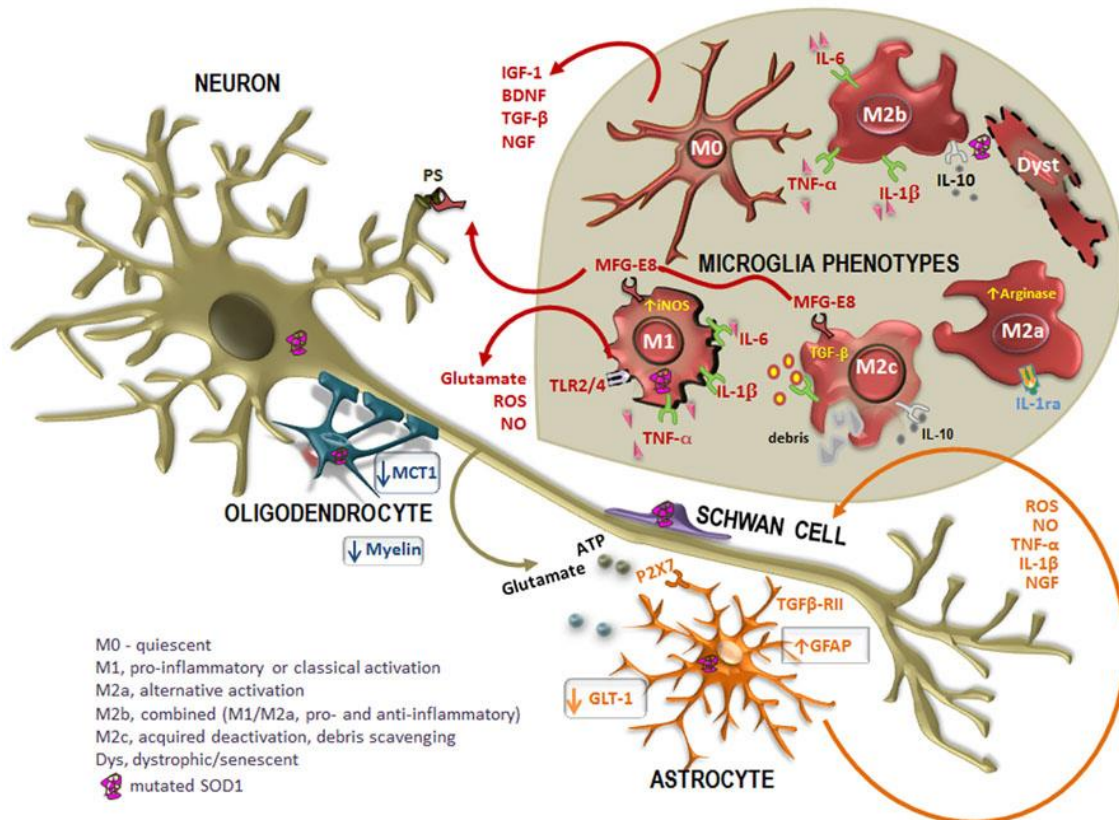
Como se dijo anteriormente, los agregados proteicos patológicos son una característica cardinal de la ELA. Hay abundantes inclusiones de SOD1 sin mutar y mal plegadas en las motoneuronas espinales y corticales de pacientes de ELA no portadores y portadores de mutaciones en SOD1 (Forsberg y cols. 2019). Además, las inclusiones citoplasmáticas positivas para TDP-43 están presentes en las células neuronales y gliales en los casos de ELA no relacionados con SOD1 o FUS150. En cuanto a FUS, las mutaciones se localizan en los exones 13-15 que codifican la región rica en RGG, interrumpen la localización nuclear del FUS e inducen la formación de gránulos de estrés citoplasmático. Además, TDP-43 y FUS contienen dos dominios de reconocimiento de ARN y pueden formar parte de los complejos de transporte de ARN y, cuando están mutados, podrían contribuir a la lesión de la motoneurona a través de la pérdida del transporte axonal de ARNm. Alternativamente, la disminución de la expresión y función nuclear de estas proteínas podría alterar varios aspectos del procesamiento del ARN, incluyendo el empalme, la exportación nuclear en distintos compartimentos citoplasmáticos y/o el procesamiento de ARN no codificantes. Otro estudio reciente indica que la mutación de TDP-43 desregula el splicing alternativo del ARNm lo que también podría contribuir a la fisiopatología de la ELA (Maragakis y Rothstein 2006; Sofroniew y Vinters 2010; Forsberg y cols. 2019). Las inclusiones de TDP-43 en el citoplasma y la falta de localización nuclear no se limitan a las motoneuronas, y sugieren que la redistribución citoplasmática de TDP-43 es un evento patogénico temprano en la ELA. Las inclusiones de conglomerado hialino ricas en neurofilamentos se observan en el pericario o en las dendritas proximales de las motoneuronas de la médula espinal en algunos casos de ELA, especialmente en aquellos con mutaciones en SOD1. La estequiometría y fosforilación alteradas de los neurofilamentos pueden tener un efecto crítico en el funcionamiento del compartimento axonal de la motoneurona (Neumann y cols. 2006).

El papel de las células no neuronales

En ratones quiméricos que sobreexpresan SOD1 mutada en tipos celulares específicos, las motoneuronas normales desarrollan signos de ELA cuando estuvieron rodeadas de glía que expresaba SOD1 mutada (Clement y cols. 2003). Para determinar la contribución de astrocitos y microglía a este hallazgo, se generan ratones dobles transgénicos que expresan el sistema de recombinación Cre-Lox para excluir la SOD1 mutada de las motoneuronas o de las células de linaje mieloide (Boillee y cols. 2006; Ilieva et al. 2009). Los ratones transgénicos en los que el alelo mutante SOD1G37R, es eliminado de las motoneuronas muestran un retraso en el curso de la enfermedad una vez iniciada. Cuando se elimina SOD1 mutada de la microglía, el inicio de la enfermedad no se retarda pero la progresión de la enfermedad se ralentiza. Aunque la expresión dirigida de SOD1 mutada en astrocitos no produce un fenotipo de ELA, el silenciamiento selectivo del gen mutante en astrocitos ralentiza sustancialmente la progresión de la enfermedad en ratones que sobreexpresan la enzima mutada (Yamanaka y cols. 2008). Este hallazgo indica que los astrocitos que expresan mSOD1 ejercen efectos tóxicos o son incapaces de proporcionar el apoyo trófico necesario para las motoneuronas. Una mejor comprensión de la interrelación entre la glía y las motoneuronas debería servir de base para mejorar la lesión de las motoneuronas en la ELA (Nagai y cols. 2007). A modo de ejemplo, un estudio reciente examina cómo las propiedades de los astrocitos cambian en presencia de SOD1 mutada y como contribuyen a la degeneración de las motoneuronas y demuestra que las alteraciones en el apoyo metabólico referido a la liberación de

lactato y la activación de la vía de señalización del factor de crecimiento NGF-receptor p75 parecen ser componentes claves de la toxicidad astrocitaria para las motoneuronas (Ferraiuolo y cols. 2011; Verkhratsky y cols. 2018).

Por otra parte, dado que se conocía que la microglía libera tres factores, IL-1 α , TNF α y C1q, que son capaces de inducir astrocitos neurotóxicos, el trabajo de Gutenplan y cols. (2017), mostró que la sola supresión de estos tres factores prolonga notablemente la supervivencia en el modelo de ELA en ratón SOD1G93A, lo que demuestra que la gliosis juega un papel patológico importante y que es una posible diana terapéutica de la ELA.



(Brites y Vaz 2014)

Figura 3. Contribución de las células gliales al daño de las motoneuronas. El resume los distintos fenotipos de la microglía: los neuroprotectores que liberan factores tróficos y citoquinas anti-inflamatorias y los fenotipos nocivos que poseen SOD1 agregada y producen la liberación de citoquinas proinflamatorias, glutamato y radicales libres. Por su parte los astrocitos portadores de la mutación, presentan disminución de los transportadores de glutamato y aumento de citoquinas proinflamatorias y radicales libres.

En suma, los mecanismos de degeneración de la motoneurona en la ELA son complejos y multifactoriales y la mayor parte de nuestro conocimiento actual de la biología de la enfermedad procede del estudio del subtipo de ELA asociado a mutaciones en SOD1, en el que una compleja interacción entre múltiples mecanismos fisiopatológicos culmina en una lesión de la motoneurona (Figura 3). Se necesitan más estudios para reproducir estos resultados y confirmar su especificidad para la ELA. La identificación de TDP-43 como componente principal de las inclusiones citoplasmáticas que se encuentran en la mayoría de los casos con ELA ha sido un paso importante hacia la conexión de la patología postmortem con los mecanismos fisiopatológicos (Forsberg y cols. 2019). Sin embargo, se necesitan más investigaciones para determinar la participación y la contribución de cada uno de los mecanismos patológicos propuestos en el inicio y progresión de la enfermedad.

Modelos experimentales dependientes de SOD1

Como se dijo anteriormente, hasta un 15-20% de las formas familiares de ELA pueden estar asociadas con mutaciones en la enzima SOD1 (Gurney y cols. 1994; Howland y cols. 2002; Maragakis y Rothstein 2006; Al-Chalabi y Hardiman 2013). Para explorar cómo las mutaciones en SOD1 pueden causar selectivamente la degeneración de motoneuronas, Gurney y cols. (1994) produjeron ratones transgénicos que expresan formas silvestres o mutantes de la enzima SOD1 humana. Los ratones que expresan SOD1 humana de tipo salvaje (NSOD) no muestran signos de enfermedad manifiesta, pero presentan leves cambios en la innervación del músculo que sugieren un envejecimiento prematuro. Los ratones de una de las líneas transgénicas de SOD1 (G93A) que expresan los mayores niveles de SOD1 mutante desarrollan un síndrome estereotipado sugestivo de enfermedad de la motoneurona. A los 3 o 4 meses de edad, los ratones G93A empiezan a mostrar signos de debilidad en las extremidades posteriores, baja generalizada de peso corporal y en un lapso de 2 semanas se paralizan una o más extremidades con signos evidentes de atrofia muscular en dichos miembros. Los autores comprueban que la enfermedad no se debe simplemente a la sobreexpresión de SOD1, porque los ratones que expresan cantidades comparables o mayores de SOD cerebral total no mutada no desarrollan la enfermedad. El análisis patológico de los ratones que sobreexpresan la mutación demuestra una grave pérdida de motoneuronas espinales que contienen colina acetiltransferasa (ChAT). Postulan también que la toxicidad por radicales libres es una explicación plausible de la muerte de las motoneuronas en los ratones transgénicos y, por extensión, en humanos con ELA familiar. Además exponen que este mecanismo podría implicar la formación de peroxinitrito ya que las mutaciones de la SOD1 pueden facilitar esta vía de daño oxidativo.

Ocho años después de la generación de los ratones transgénicos SOD1G93A (Gurney y cols. 1994); Howland y cols. (2002) reportaron la generación de ratas Sprague-Dawley transgénicas que expresan la misma mutación SOD1G93A humana a niveles 8 veces superiores a los de la SOD1 endógena. Este nivel de expresión fue suficiente para dañar las motoneuronas en forma similar a la ELA en ratas de 3-4 meses de edad. Los autores indican que la recapitulación de la enfermedad de la motoneurona en las ratas transgénicas utilizando el gen SOD1G93A depende de la capacidad de obtener una expresión transgénica de alto nivel en la médula espinal, como se informó previamente para los ratones transgénicos. Inicialmente, se observa la aparición de vacuolas en las motoneuronas, así como gliosis antes de la pérdida de motoneuronas y de los signos clínicos de la enfermedad en las ratas. La progresión a la parálisis terminal fue rápida (en torno de 30 días) y coincide con una pérdida sustancial de motoneuronas de la médula espinal, así como con un marcado aumento de la gliosis y degeneración de la integridad y función muscular, con atrofia muscular en los miembros donde la enfermedad comenzó a manifestarse. También se observa la pérdida de expresión del transportador astroglial de glutamato EAAT2 (GLT1 en ratas), el principal responsable de mantener bajos los niveles extracelulares de glutamato, en un momento en que las motoneuronas estaban intactas desde el punto de vista histológico y fisiológico, lo que sugiere que la pérdida de EAAT2 puede contribuir a la enfermedad de las motoneuronas. Con la disminución de la expresión de EAAT2, se observa un aumento marcado de la gliosis. Los autores concluyen que describieron un modelo de rata transgénica para la ELA basado en la mutación SOD1G93A, cuyos cambios clínicos y patológicos se asemejan a los ratones de 'alta expresión' de SOD1G93A descritos por Gurney et al. (1994). Además, los niveles de EAAT2 disminuyen en la médula espinal antes de los síntomas clínicos, correlacionándose con la reactividad glial, lo que sugiere un rol del glutamato y la disfunción glial en la patogénesis de la enfermedad tal como lo propusieron Gurney y cols. (1994).

Metaloproteasas de matriz

Definición, funciones y clasificación

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc que intervienen en la degradación de diversas proteínas de la matriz extracelular (MEC). (González Avila y cols. 2020). Típicamente, las MMP tienen una secuencia de propéptidos de unos 80 aminoácidos, un dominio catalítico de metaloproteinasa de unos 170 aminoácidos con zinc catalítico, una región bisagra o un péptido de enlace de longitud variable y un dominio de hemopexina de unos 200 aminoácidos (Figura 4). Esta estructura no se cumple en todas las MMP, siendo la MMP-7 (matrilisina 1), MMP-26 (matrilisina 2) y MMP-23 excepciones, ya que carecen del péptido enlazador y del dominio hemopexina y la MMP-23 tiene un dominio único C-terminal rico en cisteína y en inmunoglobulina inmediatamente después del extremo C-terminal del dominio catalítico.

Minimal-domain MMPs



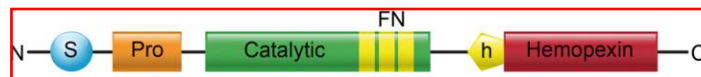
MMP-7,-26

Hemopexin-domain-containing MMPs



MMP-1, -3, -8, -10, -11, -12, -13, -18, -19, -20, -27, -28
MMP-21 (does not contain h)

Gelatinases



MMP-2,-9

Membrane-type MMPs



MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, MT5-MMP, MT6-MMP, MMP-23A, -23B

S = amino-terminal signal sequence

Pro = pro-peptide

Zn²⁺ = zinc-binding side

h = hinge (region)

FN = collagen-binding type II repeats of fibronectin

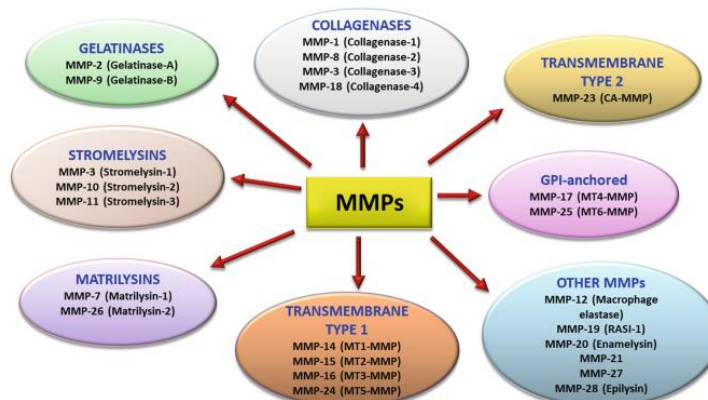
F = furin-cleavage site

MT-MMP = membrane-type MMP

N = N-Terminus

C = C-Terminus

Rempe y cols. 2016



González-Avila 2020

Figura 4. Estructura y clasificación de las distintas MMP. Las MMP se dividen en distintos grupos estructurales: MMP de dominio mínimo, MMP que contienen hemopexina, gelatinasas y MMP de tipo membrana. Las primeras contienen una secuencia señal aminoterminal (S) que las dirige al retículo endoplásmico, un propéptido (Pro) que las mantiene como zimógenos inactivos y un dominio catalítico con un sitio de unión al zinc (Zn^{2+}). Además de los dominios que se encuentran en las MMP de dominio mínimo, las MMP que contienen hemopexina tienen un dominio similar a la hemopexina que está conectado al dominio catalítico a través de una bisagra (h). Esta región bisagra media las interacciones con sustratos, inhibidores tisulares endógenos (TIMPs) y moléculas de la superficie celular. Las gelatinasas contienen inserciones que se asemejan a las repeticiones de tipo II de fibronectina (FN) que se unen al colágeno. Las MMP de tipo membrana (MT-MMP) tienen un dominio que interactúa con la membrana. Algunas MMP también tienen un sitio de escisión de furina (F). Las MMP que se encuentran en el cerebro están resaltadas en rojo

Las MMP son secretadas por muchas células, incluidos los fibroblastos, el músculo liso vascular (MLV), los leucocitos y las células neurales. A menudo, las MMP se secretan en forma de proMMP inactivas que son escindidas a la forma activa por varias proteinasas, incluidas otras MMP. Las MMP provocan la degradación de proteínas de la MEC como colágeno y elastina, pero podrían influir en la función de las células endoteliales, así como en la migración celular, proliferación, señalización de Ca^{2+} y contracción muscular (Murphy y Nagase 2008).

Las MMP están reconocidas actualmente como actores clave en la regulación de las interacciones célula-célula y célula-MEC. Otros estudios han demostrado que las MMP tienen funciones en la regulación del entorno celular y la modulación de muchas moléculas bioactivas en la superficie celular, y pueden actuar de forma concertada para influir en el comportamiento celular (Egeblad y Werb 2002). Estas enzimas están implicadas en la modificación estructural de la matriz, la disponibilidad de factores de crecimiento y la función de los sistemas de señalización de la superficie celular, con efectos sobre la diferenciación celular, la proliferación y la apoptosis. También desempeñan un papel fundamental en la morfogénesis, la cicatrización de heridas, la reparación y remodelación de tejidos en respuesta a lesiones y en la progresión de la enfermedad. Los procesos fisiológicos normales de remodelación, como el desarrollo, la morfogénesis y la reparación tisular, implican una degradación regulada con precisión de la MEC (Sánchez-Torres y cols. 2020).

Las MMP intervienen en la remodelación tisular durante diversos procesos fisiológicos como la angiogénesis, embriogénesis, morfogénesis y la reparación de heridas, así como en condiciones patológicas (infarto de miocardio, trastornos fibróticos, la osteoartritis y cáncer) (Cabral y Pacheco 2020). Los aumentos de MMP específicas podrían desempeñar un papel en la remodelación arterial, la formación de aneurismas, la dilatación venosa y los trastornos venosos de las extremidades inferiores. Las MMP también desempeñan un papel importante en la infiltración de leucocitos y la inflamación tisular.

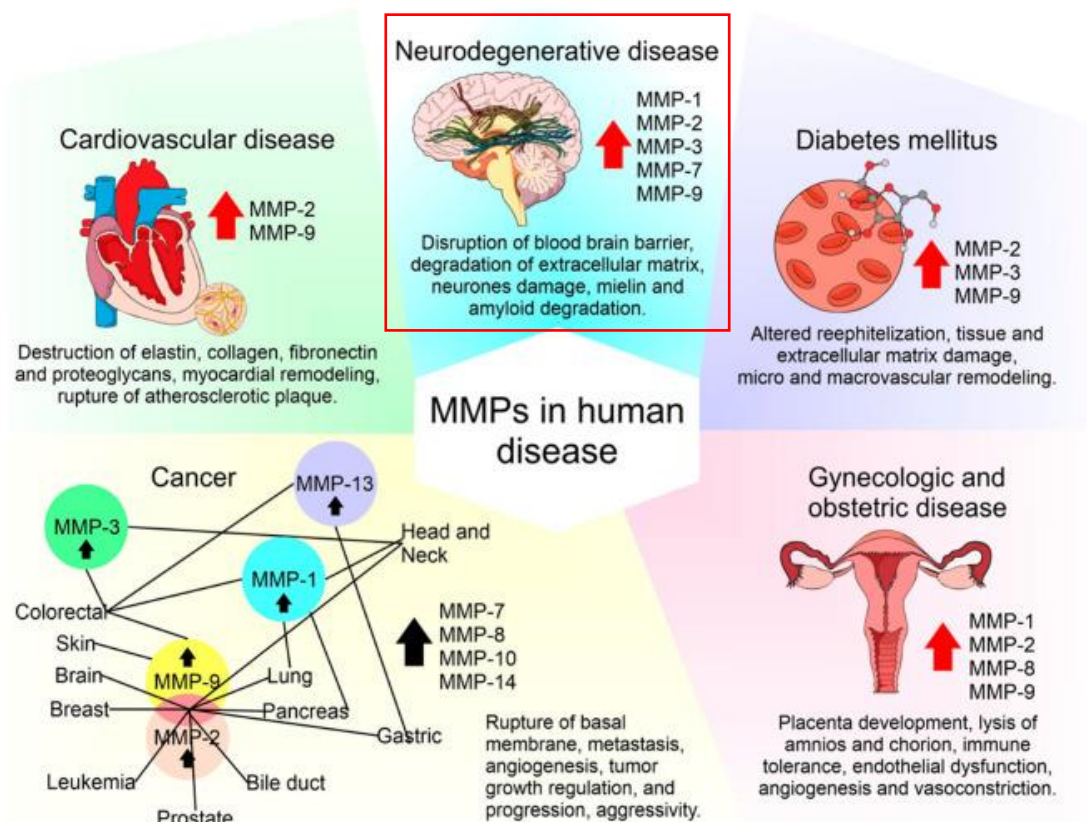


Figura 5. Funciones de las MMP en la patogénesis de múltiples enfermedades humanas. Las MMP-2 y MMP-9 son las MMP más comunes relacionadas con varias enfermedades. Las flechas rojas y negras indican sobreexpresión. Tomado de Cabral-Pacheco y cols. (2020).

Estas enzimas están estrictamente reguladas porque en su estado activo pueden ser perjudiciales. La modulación se realiza en diferentes etapas: niveles de transcripción del ARNm, activación por eliminación de la región del Pro dominio, interacción con componentes específicos de la MEC y acción de inhibidores endógenos como los TIMPs y la relación MMP/ TIMP suele determinar el grado de degradación de las proteínas de la MEC y la remodelación tisular. Además, las MMPs se han propuesto como biomarcadores de numerosas afecciones patológicas y se están examinando como posibles dianas terapéuticas en diversos trastornos cardiovasculares y musculoesqueléticos, y en el cáncer (Fang y cols. 2010; Cabral y Pacheco 2020).

Clasificación de las MMP

Las MMPs se pueden clasificar en función de su sustrato preferente, tal como se indica a continuación:

Colagenasas: Se han identificado tres colagenasas 1, 2 y 3 respectivamente (MMP-1, MMP-8 y MP-13) que poseen dominios propéptido, catalítico y hemopexina y desempeñan un papel importante en la escisión de colágeno fibrilar de los tipos I, II y III en fragmentos característicos de 3/4 y 1/4. Las colagenasas tienen actividad contra otras moléculas de la MEC y otras proteínas solubles. Sus dominios catalíticos pueden escindir sustratos no colágenos, pero son incapaces de escindir el colágeno fibrilar nativo en ausencia del dominio hemopexina, sugiriendo que la cooperación entre ambos dominios es importante para la expresión de su actividad colagenolítica (Chung y cols. 2004).

Gelatinasas: este grupo está formado por las gelatinasas A (MMP-2) y B (MMP-9). Ambas enzimas tienen tres repeticiones de un motivo de fibronectina tipo II insertado en el dominio catalítico,

comparten una actividad proteolítica similar y degradan colágenos desnaturalizados, gelatinas y una serie de moléculas de la MEC, incluidos los colágenos nativos de tipo IV, V y XI, la laminina y la fibronectina. La MMP-2 digiere el colágeno nativo de los tipos I, II y III de forma similar a las collagenasas (Aimes y Quigley 1995; Patterson y cols. 2001), pero su actividad colagenolítica es mucho más débil que las otras collagenasas. No obstante, debido a que la proMMP-2 es reclutada a la superficie celular y activada por las MT-MMP unidas a la membrana, puede acumularse pericelularmente y expresar una actividad colagenolítica local razonable. También puede actuar como actividad "colaboradora", digiriendo el colágeno recortado por las collagenasas en fragmentos más pequeños porque esos fragmentos se desnaturalizan a la temperatura corporal de 37 °C (Murphy y cols. 1985). La función normal de la MMP-9 incluye la descomposición de la MEC, un proceso que ayuda en procesos fisiológicos normales como el desarrollo embrionario y la angiogénesis, pero en ciertas condiciones patológicas aumentan sus niveles séricos y su actividades, llegando a ser postulada como un marcador de neuronas en degeneración (Fang y cols. 2010).

*Estromelisin*as: Las MMP-3, MMP-10 y MMP-11 son las estromelisin 1, 2 y 3, respectivamente. Tienen la misma disposición de dominios que las collagenasas, pero no escinden los colágenos intersticiales. Las MMP-3 y MMP-10 tienen sustrato y estructura similar, digieren varias moléculas de la MEC y participan en la activación de las pro-MMPs. La MMP-11, tiene una actividad muy débil hacia las moléculas de la MEC (Murphy y cols. 1993) y es activada intracelularmente por la furina y secretada como enzima activa (Pei y Weiss 1995).

*Matrilisin*as: incluye las MMP-7 y MMP-26. La MMP-7 es sintetizada por las células epiteliales y secretada apicalmente, degrada componentes de la MEC, pero también escinde moléculas de la superficie celular como el ligando Fas, el factor de necrosis tumoral α , el sindecán 1 y la cadherina E para generar formas solubles (Parks y cols. 2004). La MMP-26 se expresa en células normales y en algunos carcinomas y digiere varias moléculas de MEC (Marchenko y cols. 2004).

MMP unidas a la membrana (MT-MMP): son las MMP-14, -15, -16, -17, -24 y -25, tienen una secuencia de reconocimiento de proproteína convertasa similar a la furina, por lo tanto, se activan intracelularmente y es probable que las enzimas activas se expresen en la superficie celular. Todas las MT-MMP, excepto la MT4-MMP (MMP-17) (English y cols., 2001) pueden activar la proMMP-2. MT1-MMP (MMP-14) puede activar proMMP-13 en la superficie celular (Knäuper y cols. 1996). Sin embargo, la propia MT1-MMP tiene actividad colagenolítica contra los colágenos de tipo I, II y III (Ohuchi y cols. 1997).

Inhibidores endógenos de las MMP

En condiciones fisiológicas normales, la actividad de las MMP está regulada con precisión a cuatro niveles: (1) transcripción, (2) activación de precursores de zimógeno, (3) interacción con componentes específicos de la ECM e (4) inhibición por TIMPs (Cabral-Pacheco y cols. 2020).

La α 2-macroglobulina y los TIMP son dos de los principales inhibidores de las MMP. La α 2-macroglobulina humana, una glicoproteína de 725 kDa formada por cuatro subunidades idénticas de 180 kDa, actúa como inhibidor general de las proteinasas, se encuentra en la sangre y en los fluidos tisulares y como la mayoría de las endopeptidasas, estas se inhiben atrapando la enzima dentro de la macroglobulina (Barrett y Starkey 1973). A continuación, el complejo se elimina rápidamente mediante endocitosis mediada por la proteína-1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (Strickland y cols. 1990). Los TIMP bloquean reversiblemente a las MMP. Existen cuatro TIMPs en humanos que pesan entre 22-29 kDa. TIMP-1 y TIMP-3 son glicoproteínas y TIMP-2 y TIMP-4 no contienen carbohidratos. Inhiben todas las MMP probadas hasta la fecha, pero TIMP-1 es un inhibidor deficiente de MT1-MMP, que es la MMP más potente. Poseen amplio espectro inhibitorio y son importantes reguladores de las actividades metaloproteinasa in vivo. Se ha descrito que otras proteínas inhiben a determinadas MMP: una

forma secretada de la proteína precursora de β -amiloide inhibe la MMP-2, un fragmento C-terminal de la proteína potenciadora de la proteinasa-procolágeno C inhibe la MMP-2 (Mott y cols. 2000); y RECK, una glicoproteína anclada a GPI que suprime la angiogénesis inhibe la MMP-2, MMP-9 y MMP-14 (Oh y cols. 2001).

MMPs en el SNC

Las MMP son fundamentales para el desarrollo del cerebro debido a su correlación con procesos y funciones neurofisiológicos esenciales. Ellas y los TIMP participan en procesos fisiológicos como la neurogénesis, la oligodendrogénesis y la plasticidad cerebral (Cabral-Pacheco 2020). También tienen roles importantes durante el daño neuronal generado en condiciones agudas y crónicas, así como en procesos de reparación neuronal. MMP-2 y MMP-9 se expresan en neuronas, astrocitos y microglía en el SNC, y desempeñan un papel fisiopatológico en la alteración de la barrera hematoencefálica (BHE) mediante la activación de la microglía y una mayor progresión de las células inflamatorias.

La modulación anormal de las MMP participa en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas y su inhibición se ha propuesto como una posible estrategia terapéutica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. También se ha demostrado que las MMP participan en una vía común relacionada con los cambios patológicos en la homeostasis del SNC, es decir, la acumulación de moléculas proinflamatorias o agregados de proteínas y péptidos, lo que conduce al aumento de la permeabilidad de la barrera del SNC y, por tanto, a la muerte celular. En determinadas afecciones patológicas, como afecciones neuroinflamatorias y trastornos neurodegenerativos, incluida la enfermedad de Parkinson, la ELA, la enfermedad de Alzheimer y la de Huntington, MMP aumenta su expresión, lo que resulta en la exacerbación del daño cerebral inducido por la neuroinflamación (Sing y cols. 2015).

MMP-2 y -9 en ELA

La literatura describe que en la ELA, las MMPs están desreguladas y tienen la capacidad de lesionar las neuronas, penetrar en el SNC alterando la membrana basal vascular y provocando el deterioro de la BHE (Ilzecka et al. 2003; 2011; Fang y cols. 2010; Kaplan y cols. 2014). Además, el alto contenido de MMPs y su localización indiscriminada en el SNC dan lugar a la perpetuación de respuestas inflamatorias, contribuyendo así a la desmielinización, la muerte neuronal y de oligodendrocitos, la axotomía de nervios periféricos, destrucción tisular y la denervación (Sánchez-Torres y cols. 2020). Se ha reportado que los sueros de pacientes con ELA muestran una alta MMP-1, MMP-2, MMP-9 y TIMP-1. Sin embargo, se necesitan estudios más profundos sobre MMPs específicas para relacionarlas e implicarlas en la patogénesis y progresión de la enfermedad (Sánchez-Torres y cols. 2020). Otras fuentes muestran que en la ELA, MMP-2, MMP-9 y MMP-3 pueden ejercer efectos neurotóxicos directos a través de la degradación de proteínas de la MEC con la consiguiente alteración de la BHE y la promoción de procesos inflamatorios. Esto da como resultado la pérdida y el daño de células endoteliales y astrocitos, y todos ellos desempeñan un papel en la patogénesis de la degeneración de las neuronas motoras. Los niveles elevados de MMP y TIMP-1 en pacientes con ELA pueden reflejar los procesos de degeneración de las neuronas motoras y los músculos esqueléticos y/o estar asociados con la remodelación de los tejidos. Aunque el papel de los cambios en los niveles de MMP y TIMP en la patogénesis de la ELA no está claro, el análisis de estos compuestos en el suero puede usarse como factor pronóstico y marcador potencial para monitorear los efectos del tratamiento. Se ha informado de una disminución de TIMP-2 en el compartimento estromal de la médula ósea en pacientes con ELA. TIMP-3 se considera un mediador

ascendente de la apoptosis neuronal y probablemente contribuye a la pérdida neuronal en pacientes con ELA (Cabral y Pacheco 2020).

El análisis histopatológico en modelos de ELA en roedores reveló que la proteína Osteopontina (OPN) de la MEC se sobreexpresa selectivamente en las MN resistentes a la fatiga (FR), mientras que la MMP-9 se expresa selectivamente en las MN rápidamente fatigables (FF). Las diferencias en los perfiles de expresión de OPN/MMP-9 explicarían en parte la vulnerabilidad selectiva de las MNs (Baxter y cols. 2015). Por otro lado, se encontraron niveles significativamente más altos de MMP-9 en el líquido cefalorraquídeo y el suero de pacientes con ELA que en los de donantes sanos (Ilzecka y cols. 2003). Las diferencias en los niveles de MMP-9 podrían deberse a la regulación al alza de MMP-9 en músculos denervados o nervios periféricos degenerantes, lo que sugiere que los niveles de MMP-9 están relacionados con la degeneración neuromuscular. Además, sabiendo que la MMP-9 es un factor común en la ELA, la misma podría relacionar la neurodegeneración con los cambios cutáneos observados en la enfermedad. Se ha propuesto además que el estrés oxidativo y las citoquinas de la microglía conducen a la elevación de las MMP, especialmente en las últimas fases de la enfermedad. Esto sugiere que el daño cutáneo podría servir como biomarcador de características específicas de la patología de la ELA aunque debe obtenerse mayor cantidad de evidencia (Fang y cols. 2010; Sánchez-Torres y cols. 2020).

Los TIMPs podrían ser otro marcador de progresión de la enfermedad, ya que existe una correlación entre los niveles de MMPs y TIMPs en los pacientes de ELA (Fang y cols. 2010; Kaplan y cols. 2014; Sánchez Torres y cols. 2020). Como se dijo anteriormente, los niveles elevados de MMPs y TIMPs en casos de ELA y los sueros de pacientes con ELA muestran una alta expresión de MMP-1, MMP-2, MMP-9 y TIMP-1. Algunos autores proponen que el aumento de los niveles de MMPs y TIMP-1 en la ELA podría reflejar el proceso degenerativo de las motoneuronas y los músculos esqueléticos. Además, la MMP-9 ha sido implicada en la patogénesis de la ELA y la EP y su implicación en la pérdida neuronal selectiva podría constituir una característica significativa de estas enfermedades neurodegenerativas (Mogi y cols. 1999). Los estudios sobre el papel de la MMP-9 en ratones y pacientes con ELA han demostrado que la denervación muscular se debe principalmente a la actividad elevada de esta proteasa ya que los músculos de los pacientes mostraban niveles elevados y una denervación casi completa, mientras que los de los individuos sanos estaban mucho más innervados. Sin embargo, un hecho que merece mayor investigación, es el hallazgo de niveles disminuidos de MMP-9 en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con ELA (Sánchez-Torres y cols. 2020).

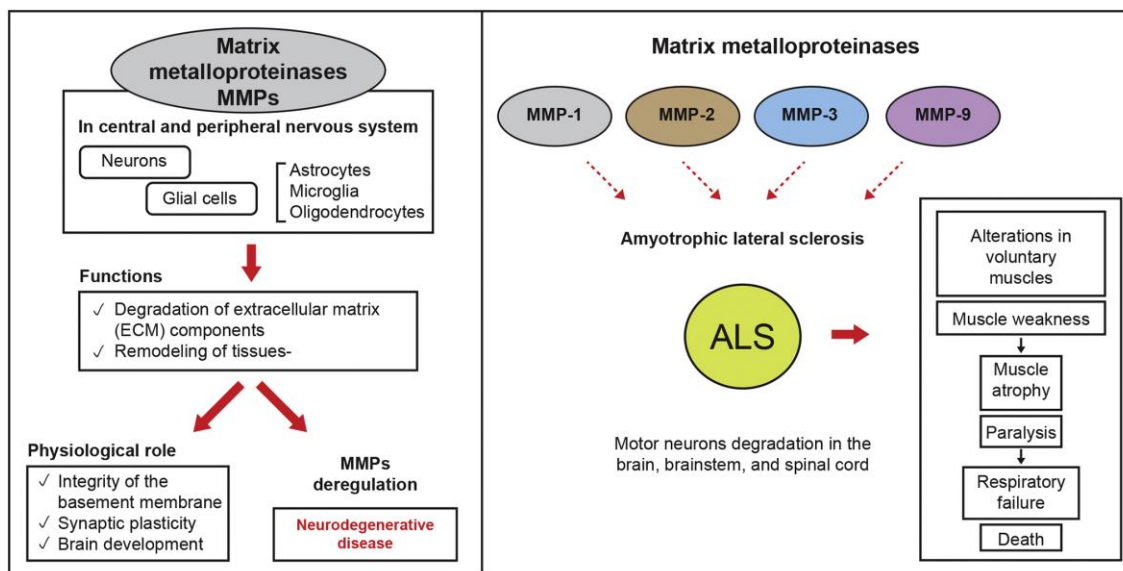


Figura 6. MMPs en la ELA. **Izquierda:** Las MMPs pueden ser producidas por células gliales (astrocitos, microglía y oligodendrocitos) y neuronas. Su función principal es la degradación y remodelación de una amplia gama de sustratos, incluidos los componentes de la MEC, controlando las interacciones célula-célula y célula-matriz. Estas acciones son importantes en la fisiología cerebral, pero también en las alteraciones en la expresión y actividad de las MMP pueden dar lugar a enfermedades degenerativas como la ELA. **Derecha:** MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MMP-9 son las principales MMPs asociadas a la ELA. Sus niveles elevados pueden inducir la degeneración neuronal en el cerebro, el tronco encefálico y la médula espinal, lo que repercute en la fisiología de los músculos voluntarios y conduce a la atrofia y la parálisis, así como a la insuficiencia respiratoria y la muerte. Figura tomada de Sánchez-Torres y cols. (2020).

Finalmente, algunos autores han propuesto que las gelatinasas u otras MMP en el plasma sanguíneo o el suero de pacientes con ELA podrían ser marcadores de la progresión de la enfermedad. En este sentido, las MMP-1 y MMP-2, se han encontrado elevadas en suero de pacientes con ELA y en modelos de la enfermedad en ratón (Murphy y Nagase 2008). Los niveles de MMP-9 son controversiales y se necesitan mayores estudios.

Necesidad de biomarcadores en ELA

El diagnóstico clínico de ELA es un proceso bien definido que puede ser llevado a cabo por médicos clínicos, aunque en algunos casos los signos clínicos pueden ser difíciles de descifrar al principio. El camino hacia un diagnóstico final se basa en el reconocimiento, logrado mediante pruebas clínicas y neurofisiológicas, de la extensión progresiva de los signos de afectación de las motoneuronas. Sin embargo, el énfasis en el reconocimiento temprano de la enfermedad ha cobrado protagonismo, formando la base para la revisión de los criterios de diagnóstico. El uso de biomarcadores es clave para un diagnóstico temprano, superando las incertidumbres diagnósticas y reduciendo el tiempo para el tratamiento de la enfermedad. Los biomarcadores también pueden ayudar en la identificación de una fase presintomática y/o prodrómica de la enfermedad, donde los enfoques terapéuticos tienen más posibilidades de atenuar o revertir el proceso patológico. Por esta razón, los estudios de sangre y/o líquido cefalorraquídeo (LCR) son importantes para identificar biomarcadores de inicio y progresión de la enfermedad, mejorar la precisión y la puntualidad del diagnóstico y además para seleccionar pacientes clínicamente más homogéneos para los ensayos clínicos (Sturme y Malaspina 2022; Raghunathan y cols. 2022).

La identificación y aplicación clínica de biomarcadores de fácil acceso en la ELA se han visto obstaculizados por la falta de estrategias analíticas en matrices complejas como la sangre. El LCR es el principal reservorio de subproductos de la pérdida neuroaxonal y de cambios sutiles en el

metabolismo de las neuronas sobrevivientes y degeneradas y, por lo tanto, una fuente importante de biomarcadores potenciales en la ELA. El LCR también es un biofluido de complejidad relativamente baja que simplifica todos los medios para analizar moléculas de baja abundancia. Sin embargo, las complicaciones surgen de la pérdida de movilidad de los pacientes, la reducción de su capacidad para comunicarse y la fragilidad en la enfermedad en etapa terminal. Estas complicaciones hacen que cualquier procedimiento invasivo en pacientes con ELA en deterioro, como la punción lumbar para la recolección de LCR, sea poco práctico. Colocar a las personas que viven con ELA avanzada dentro de un escáner de resonancia magnética también es difícil debido a la acumulación de secreciones y complicaciones respiratorias. Por lo tanto, el uso de LCR o de técnicas de imagen como fuentes de biomarcadores puede ser adecuado para lograr un diagnóstico temprano y para el pronóstico, pero los biomarcadores en sangre u orina para monitorear la progresión de la enfermedad pueden ser una opción más práctica (Sturmey y Malaspina 2022; Witzel y cols. 2022).

La sangre actúa como fuente de biomarcadores de degeneración neuroaxonal y muscular, que pueden ser más representativos de la patobiología de la ELA y de un biotipo de enfermedad más completo. La debilidad y atrofia del músculo esquelético definen la progresión de la ELA y, como el músculo es el mayor contribuyente a la masa corporal y es un tejido altamente vascularizado, la sangre es la reserva más importante de moléculas relacionadas con la destrucción neuromuscular que se observa en la ELA. Sin embargo, la biodisponibilidad y detectabilidad de los biomarcadores sanguíneos de ELA es un fenómeno complejo y poco comprendido. Si bien se puede acceder más fácilmente a estos biomarcadores, la sangre sigue siendo una matriz más compleja que el LCR. El análisis de péptidos en sangre, por ejemplo, se ve dificultado por el efecto de enmascaramiento y la interferencia de proteínas más abundantes como la albúmina y las inmunoglobulinas, así como por la formación de heteroagregados y de inmunocomplejos impulsados por respuestas humores endógenas. Además, el volumen sanguíneo y el índice de masa corporal pueden influir en la concentración general de un biomarcador, particularmente cuando la ingesta de líquidos y el estado nutricional se ven afectados, como se observa en la etapa avanzada de la ELA (Sturmey y Malaspina 2022; Raghunathan y cols. 2022).

Sin embargo, pese a todas estas dificultades presentadas para el análisis de sangre, entendemos que para las enfermedades neurodegenerativas, esta es la matriz por excelencia para realizar los análisis menos invasivos, especialmente durante la progresión de la enfermedad. Por otra parte, dado que existe un deterioro visible que se evidencia en la pérdida de peso, la parálisis y atrofia muscular progresiva, con implicación directa de las gelatinasas, y que la actividad de estas enzimas pueden determinarse en forma sensible y reproducible (Sturmey y Malaspina 2022; Witzel y cols. 2022), entendemos que es valioso entender si estas proteínas podrían señalar la progresión de la enfermedad para, en una instancia posterior analizar su valor como biomarcadores potenciales.

HIPÓTESIS

Dado que:

-la aparición y progresión de síntomas en el modelo SOD1G93A es muy rápida e implica una atrofia - muscular significativa

-dicha progresión puede estar asociada a niveles aumentados de enzimas proteolíticas

-algunos reportes muestran un aumento en los niveles de MMP-2 y MMP-9 en modelos experimentales y en pacientes de ELA,

Proponemos que:

La actividad de MMP-2 y/o MMP-9 podría servir como biomarcador de la enfermedad.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación de MMP-2 y MMP-9 durante la progresión de la ELA en el modelo SOD1G93A en ratas y su correlación con la neuroinflamación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Determinar los niveles de actividad y de expresión de MMP-2 y MMP-9 en muestras de suero, médula espinal y músculos soleo (fibras tipo 1) y extensor digital largo (fibras tipo 2) de animales asintomáticos y sintomáticos del modelo de ELA SOD1G93A en ratas.

2- Determinar los niveles de las citoquinas proinflamatorias $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL6 y de $\text{NF}\kappa\text{B}$ en las mismas muestras e identificar si existe una correlación con los niveles de MMP-2 y MMP-9.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El modelo de ELA seleccionado para realizar esta tesis fue el de ratas hemicigotas NTac: SD-TgN (hSOD1G93A)L26H (Taconic) desarrollado por (Howland y cols. 2002), que sobreexpresa la enzima SOD1 humana con la mutación G93A porque reproduce el fenotipo de la enfermedad humana y muestra pérdida de motoneuronas espinales y señales de daño a nivel de motoneuronas superiores (Howland y cols. 2002). En cada camada se obtuvieron animales transgénicos y no transgénicos ya que se empleó un macho positivo heterocigota y hembras negativas por el mejor cuidado de los animales, según la mejor experiencia del grupo.

Grupos experimentales

Genotipo	120 días	210 días	N
No transgénicos	NoTg 120	NoTg 210	N=5, 3 exp. indep., duplicados o triplicados
Transgénicos	Tgasint	Tgsint	N=5, 3 exp. indep., duplicados o triplicados

Para cumplir con el objetivo 1, se procesaron ratas macho SOD1G93A en dos etapas: asintomáticas (120 días, Tgasint) y sintomáticas/terminales (210 días, Tgsint), junto con ratas no transgénicas de las mismas edades, denominadas NoTg 120 y NoTg 210, respectivamente). Se recolectaron

muestras de suero, neocorteza, médula espinal cervical y lumbar, y de los músculos sóleo y EDL. La mitad de estas muestras se colocaron en buffer de lisis para realizar zimografías en gel, una técnica altamente sensible para evaluar la actividad de las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) (Oliver et al., 1997; Adair et al., 2004; Marco et al., 2020).

Para cumplir con el objetivo 2, utilizando los mismos tipos de muestras y siguiendo el mismo proceso de preparación, se realizaron dot blots (Olivera-Bravo et al., 2022) para determinar los niveles de algunas citoquinas proinflamatorias. La otra mitad de las muestras se fijó por inmersión en PAF al 4 % durante 24 horas a 4°C, para luego realizar técnicas de inmunofluorescencia (IF) para analizar la reactividad glial y la localización de las MMPs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aspectos éticos

Todos los procedimientos realizados con animales estuvieron de acuerdo con los códigos internacionales que regulan el uso de animales para experimentación y fueron aprobados por el Comité de Ética de Uso de Animales (CEUA) del IIBCE que actúa bajo la Ley de Experimentación Animal No 18.611. N° de protocolos aprobados: 001/01/2014, 004/09/2015 y 001/02/2018.

Animales

Los animales empleados en esta tesis pertenecen a la cepa Sprague-Dawley (SD), los transgénicos (de ahora en adelante Tg) sobreexpresan el transgen de la enzima humana SOD1 con la mutación puntual Glicina por Alanina en la posición 93 (hSOD1G93A). Los animales que no sobreexpresan la mutación son denominados no transgénicos y se abrevian como NoTg.

Colonia

Todos los animales empleados forman parte de una colonia cerrada originada con 2 ratas machos hemicigotos NTac: SD-TgN (hSOD1G93A)L26H desarrollados por Howland y cols. (2002) y 6 ratas hembras *wild type* compradas a Jackson Laboratory, empleándose animales desde la segunda y tercera generación de los padres fundantes. Esta estrategia se seleccionó para disminuir la influencia del background genético entre los distintos animales y disminuir la variabilidad debido a este factor (Olivera-Bravo y cols. 2022)

Harenes

Los harenes fueron realizados en el bioterio del IIBCE. Estuvieron compuestos por 1 macho Tg y 2 hembras NoTg, primíparas y de preferencia hermanas de la misma edad. En todos los casos, las condiciones de cría se mantuvieron en condiciones estables (temperatura controlada, 12 h de ciclo luz/oscuridad y acceso a agua y comida *ad libitum*). Una vez determinada la preñez, cada hembra fue mantenida en una caja sola, determinándose el número de crías y el sexo al día del nacimiento. El marcado y genotipado se realizó durante el primer mes. El mantenimiento de los animales estuvo a cargo del personal del bioterio institucional, mientras que el marcado y el genotipado de los mismos fue parte de las tareas desarrolladas para esta tesis.

Marcado de las ratas

La identificación mediante marcas en la oreja se realizó entre los 21 y 30 días, junto con la recolección de muestras para el genotipado. El marcado de las orejas se hizo según el protocolo de de Dahlborn y cols. (2013).

Genotipado mediante PCR

El genotipado permite la identificación de las ratas Tg y NoTg dado que los signos y síntomas de la enfermedad se manifiestan en animales adultos de 6 o 7 meses de edad. Para minimizar las probabilidades de confusión, cada animal fue previamente marcado de acuerdo a lo indicado más arriba.

El protocolo de genotipado fue diseñado por Marcelo Vargas y cols. (2006), se usa sin mayores cambios y está detallado en el Anexo N° I.

Procesamiento de las muestras para zimografía y *dot blotting*

A la edad establecida (120 o 210 días de vida), las ratas fueron decapitadas rápidamente con guillotina. En ese momento se tomó la sangre del animal, llevándola a 37°C durante 30 min para obtener el suero a analizar con el menor lisado celular posible. Luego el cuerpo y la cabeza del animal se sumergieron inmediatamente en hielo para disecar la médula espinal (en porciones lumbar, cervical y torácica) y los músculos sóleo y EDL (Olivera-Bravo y cols. 2022). Las muestras se colocaron en buffer de lisis de tejido (PBS 10 mM, pH 7.4 con 4 mM de EDTA 4 mM y una tableta de inhibidores de proteasa SIGMA-FAST™). Luego se congeló inmediatamente a -80°C hasta su uso en zimografía o en *dot blot*. Antes de estos ensayos se determinó la concentración de proteínas. Se detalla el método en Anexo N° I.

Zimografía en gel (Marco y cols. 2020)

Esta técnica es muy trabajosa pero es la única que permite evaluar la actividad de las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9). Se destaca además por su sensibilidad y posibilidad de evaluar simultáneamente varias réplicas de una misma muestra o distintas muestras. Los materiales y métodos de esta técnica se detallan en el Anexo N° II.

Dada la complejidad de la técnica, es necesario tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Las muestras no deben calentarse ni añadir agentes reductores como 2-mercaptoetanol ya que destruirán la actividad enzimática.
- Las MMPs digieren la gelatina dejando pequeños espacios en blanco luego de que se tiñe el gel. Se debe lo suficiente hasta reconocer esas áreas.
- Para conocer el peso molecular de las enzimas activas es necesario colocar una muestra control positivo que pueden ser las enzimas recombinantes o un suero con nivel conocido de gelatinasas.

PM: MMP-2, 72 KDa

MMP-9, 92 KDa

Los detalles del procedimiento se encuentran en el Anexo N° II.

Dot Blotting (Isasi y cols. 2019; Olivera-Bravo y cols. 2022)

El principio de la técnica de dot-blot es el reconocimiento y la unión de un anticuerpo a un antígeno dado presente en un homogeneizado de una muestra. Esta técnica inmunológica se destaca por su sencillez y rapidez y a la vez por permitir la detección de ADN, ARN o de proteínas. Sin embargo, solo detecta la presencia o ausencia de una molécula diana, ya que no se realiza separación y por tanto, las distintas moléculas no se pueden diferenciar por su tamaño. Entre las ventajas se cuenta que la muestra se añade directamente a la membrana, por lo que se ahorra un tiempo considerable. En concreto, la siembra consiste en la transferencia puntual de un volumen pequeño de la muestra a una membrana seca de nitrocelulosa o PVDF. Luego, la membrana se bloquea para evitar la unión no específica y se incuba con un anticuerpo primario específico a temperatura

ambiente. Luego, se procede a la incubación con un anticuerpo secundario acoplado a fluoróforo o cromóforo para permitir la detección visual y la cuantificación de la molécula diana. La técnica también proporciona una manera rápida de determinar la especificidad de un anticuerpo. El protocolo detallado se encuentra en el Anexo N° III.

Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es un método que permite analizar la presencia y ubicación de proteínas dentro de las células y en el contexto de los tejidos. Es una técnica inmunológica donde un anticuerpo primario se une específicamente a una proteína de interés presente en un tejido. Los sistemas de detección cromogénicos (inmunohistoquímica) o fluorescentes (inmunofluorescencia) permiten visualizar la interacción anticuerpo-antígeno. En la detección cromogénica, una enzima conjugada con el anticuerpo escinde un sustrato para producir un precipitado coloreado en la ubicación de la proteína, mientras que, en la detección fluorescente, se conjuga un fluoróforo con el anticuerpo y se puede visualizar mediante microscopía de fluorescencia. En esta tesis se procedió a realizar la IHC por flotación, en la cual los cortes de las muestras (que habían sido previamente fijadas por inmersión) se obtuvieron mediante vibrátomo 30-40 μm (Olivera-Bravo y cols. 2022). El protocolo se detalla en el Anexo N° IV

Toma de imágenes

Las imágenes de dot blots fueron tomadas en el equipo iBright 1500 de Thermo y analizadas en Fiji (NIH). Las imágenes de inmunofluorescencia y las que emplean sondas fluorescentes fueron tomadas en un microscopio confocal vertical directo FV300 Olympus provisto de láseres de 405, 488, 546 y 633 nm o en un Zeiss 800 invertido espectral. En ambos casos, se tomaron microfotografías de 2048 $\times$ 2048 de 5 a 7 áreas representativas de cada región analizada. Para evaluar la intensidad de la señal, se midió el valor de gris medio (MGV, intensidad por número de píxeles) con FIJI/ImageJ. Una señal se consideró positiva cuando al menos duplicó el valor del fondo. La fluorescencia normalizada se determinó restando el MGV del fondo al valor determinado para la señal positiva.

Análisis de datos

Se obtuvieron datos de 3 a 5 experimentos independientes cada uno con al menos 5 animales por cada condición experimental. Los datos de cada experimento se combinaron para obtener el valor promedio junto con la desviación estándar por experimento. El análisis estadístico y los gráficos se realizaron con el programa GraphPad Prism 8.3 y las columnas representan los valores promedios y la desviación estándar después de agrupar todos los experimentos independientes. La comparación entre los diferentes grupos experimentales se realizó con ANOVA ordinario de una cola y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. En algunos casos, se aplicaron pruebas no paramétricas. El valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos serán presentados en el siguiente orden: zimografías, dot blots e inmunohistoquímica. En cada figura se incluyó una imagen representativa de los datos obtenidos y la cuantificación de los parámetros de interés.

Zimografías

La figura 8 muestra un zimograma con la actividad de MMP-2 y MMP-9 en sueros de ratas Tg asintomáticas y sintomáticas y de animales no transgénicos de las mismas edades (NoTg 120 y NoTg

210), en las cuales se observa mayor actividad de MMP-2 que de MMP-9 en todas las condiciones y bandas cercanas a MMP-2 que fueron atribuidas a enzimas parcialmente procesadas. La cuantificación realizada no muestra diferencias significativas entre los 4 grupos experimentales analizados, ni para MMP-2 activa, MMP-2 total (suma de los resultados de MMP-2 y pro-MMP-2), ni para MMP-9.

En lo referente a la médula espinal, los resultados obtenidos en homogenatos de la porción lumbar mostraron bandas muy tenues, casi indetectables en algunos casos, en el lugar de MMP-9 y bandas tenues correspondientes a MMP-2 (Figura 9). Se encontraron valores significativamente más altos de MMP-2 en las muestras de las ratas Tgsint respecto de las asintomáticas y de los animales NoTg 120 y NoTg 210. Si bien las bandas de MMP-9 parecieron mayores o más brillantes en las muestras de ratas Tgsint, la cuantificación tiene errores mucho mayores que en MMP-2 debido a los valores tan pequeños obtenidos. Además, la comparación de muestras de médula espinal de la porción lumbar y cervical de animales Tgsint y sus correspondientes controles negativos (NoTg 210) (Figura 10), indica actividades menores en la porción cervical, lo que podría atribuirse, a que a pesar de los valores bajos, los niveles más altos de actividad de gelatinasa se encuentran donde se produce el daño. En los casos estudiados, ello ocurre a nivel de la médula lumbar, ya que solo se analizaron animales con los miembros inferiores paralizados. El análisis de animales Tgsint y de los negativos de su misma edad (NoTg 210), indicó ausencia de actividad gelatinasa MMP-9 significativa en los NoTg 210.

En cuanto al análisis de MMPs en homogenatos de músculo, en el músculo lento sóleo se observó aumento significativo de la actividad de MMP-2 en las muestras de Tg sintomáticos respecto de los demás grupos (Figura 11). La actividad de MMP-9 no fue evidenciada en los zimogramas realizados. Los valores obtenidos en homogenatos del músculo rápido EDL (Figura 12) fueron similares a los obtenidos en los homogenatos de sóleo, sugiriendo que en el estadio sintomático del modelo empleado, el daño que deriva o se asocia a MMP-2 podría ser similar en ambos tipos de músculos.

El análisis de niveles de expresión proteica se realizó mediante dotblots debido a la escasa disponibilidad de anticuerpos y de tiempos experimentales. Las determinaciones se realizaron simultáneamente para las distintas muestras y empleando los distintos anticuerpos específicos. La cuantificación se realizó tomando α -tubulina como control de carga y referencia. Los resultados de expresión proteica de las gelatinasas y de marcadores vinculados a inflamación obtenidos mediante dot blots revelan que en los homogenatos de médula espinal lumbar (MEL) se aprecia expresión significativa de MMP-2 y muy débil de MMP-9 en todas las condiciones (Figura 13). El análisis cuantitativo de la relación de la densidad integrada de cada marca de gelatinasa parametrizada con α -tubulina muestra valores similares de MMP-9 en todas las condiciones experimentales, un aumento significativo de MMP-2/ α -tubulina en muestras de Tgsint respecto de su control negativo de edad (NoTg 120) y una tendencia al aumento (sin alcanzar significación estadística) al comparar Tgsint vs NoTg 210.

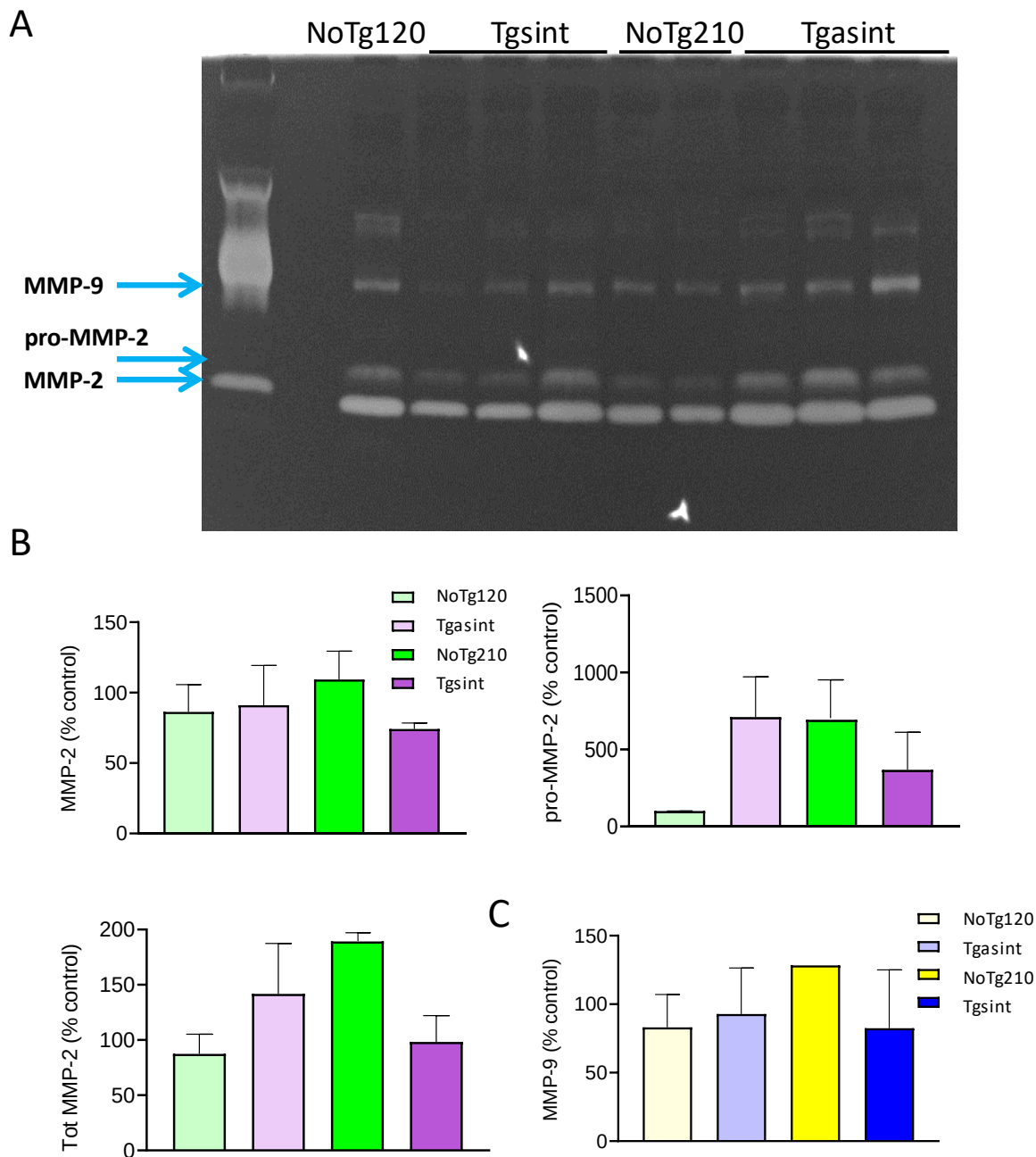


Figura 8. Resultados de zimografía en gel en muestras de suero. A: Zimograma que muestra las bandas blancas correspondientes a la degradación de gelatina en un control positivo consistente en cantidades iguales de proteína recombinante MMP-2 y MMP-9 (izquierda) y en muestras de suero de ratas negativas (NoTg 120 y NoTg 210) y Tg asintomáticas y sintomáticas. Las bandas más notorias son las de MMP-2 en todas las condiciones experimentales. B: Las gráficas muestran la cuantificación de las áreas de cada banda para los distintos grupos analizados. La actividad de MMP-2 es relativamente constante entre los grupos NoTgss y Tgsint, con valores que oscilan entre el 80% y 100% del valor del control, mientras que la actividad de pro-MMP2 es notoriamente inferior en muestras de NoTg 120d. La suma de pro-MMP-2 y MMP-2, muestra valores más altos en el NoTg 210d pero la diferencia no alcanza significación estadística con las otras condiciones experimentales. C: La actividad de MMP-9 es relativamente constante entre los diferentes grupos experimentales. Se hicieron 3 experimentos independientes con cada muestra por duplicado.

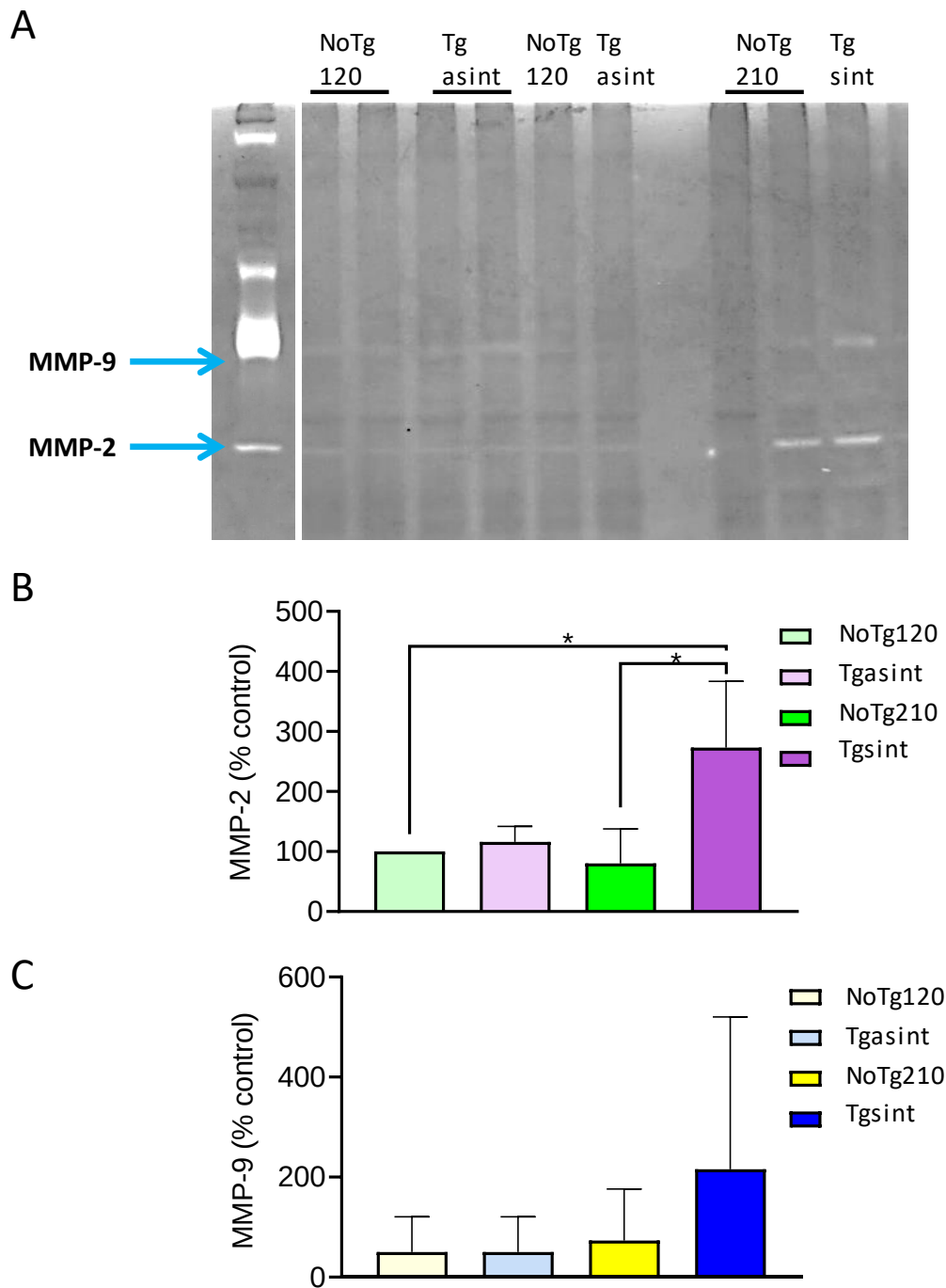


Figura 9. Zimografías en gel en homogenatos de médula espinal lumbar. **A:** Zimograma de gel que muestra bandas blancas que evidencian la degradación de la gelatina debido a las actividades de MMP-2 y MMP-9 en muestras de médula espinal lumbar de animales NoTg y Tg. En el caso de la MMP-2 y MMP-9 la imagen sugiere mayor actividad de la gelatinasa en animales viejos y Tg sintomáticos. **B:** El primer gráfico muestra la actividad de MMP-2 en la médula espinal lumbar como porcentaje del control (NoTg 120), indicando actividades similares en los tres primeros grupos y diferencias significativas con el grupo Tgsint con una actividad significativamente mayor (alrededor del 350% del control). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas para $p < 0.05$. **C:** Se muestra la actividad de MMP-9 en la médula espinal lumbar como porcentaje del control, evidenciando valores bajos y mantenidos de actividad de MMP-9 en los grupos NoTg 120, Tgasint y NoTg 210 y al grupo Tgsint con una actividad mayor, de alrededor del 300% del control, pero con una mayor variabilidad, como indican las barras de error.

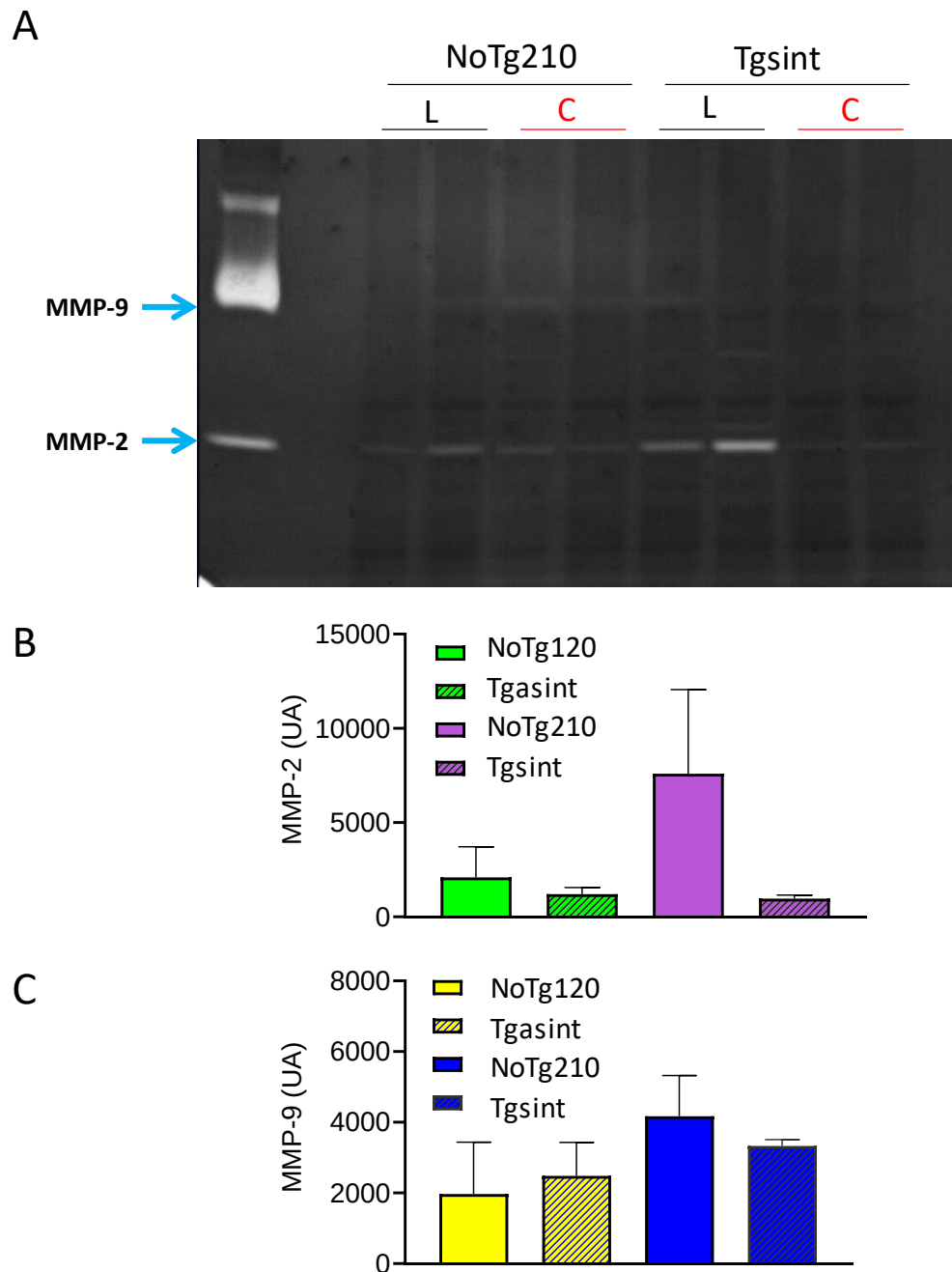


Figura 10. Zimografías en gel en homogenatos de médula espinal lumbar y cervical en estadios sintomáticos. **A:** Zimograma de gel que muestra bandas de gelatina degradada, atribuidas a las actividades de MMP-2 y MMP-9 en muestras de médula espinal lumbar y cervical de animales NoTg 210 y Tgsint, con bandas más tenues en las muestras de médula cervical y con MMP-9 sin actividad. **B:** El gráfico muestra la actividad de MMP-2 en la médula espinal lumbar (sólido) y cervical (rayas finas) como unidades absolutas arbitrarias (UA). **C:** Este gráfico representa la actividad de MMP-9. Las actividades mayores se observan en los animales Tgsint, pero no hay diferencias significativas, debido a la dispersión de datos. Debido a los bajos valores de MMP-9 controles, se decidió graficar en valores absolutos y no como porcentajes del control.

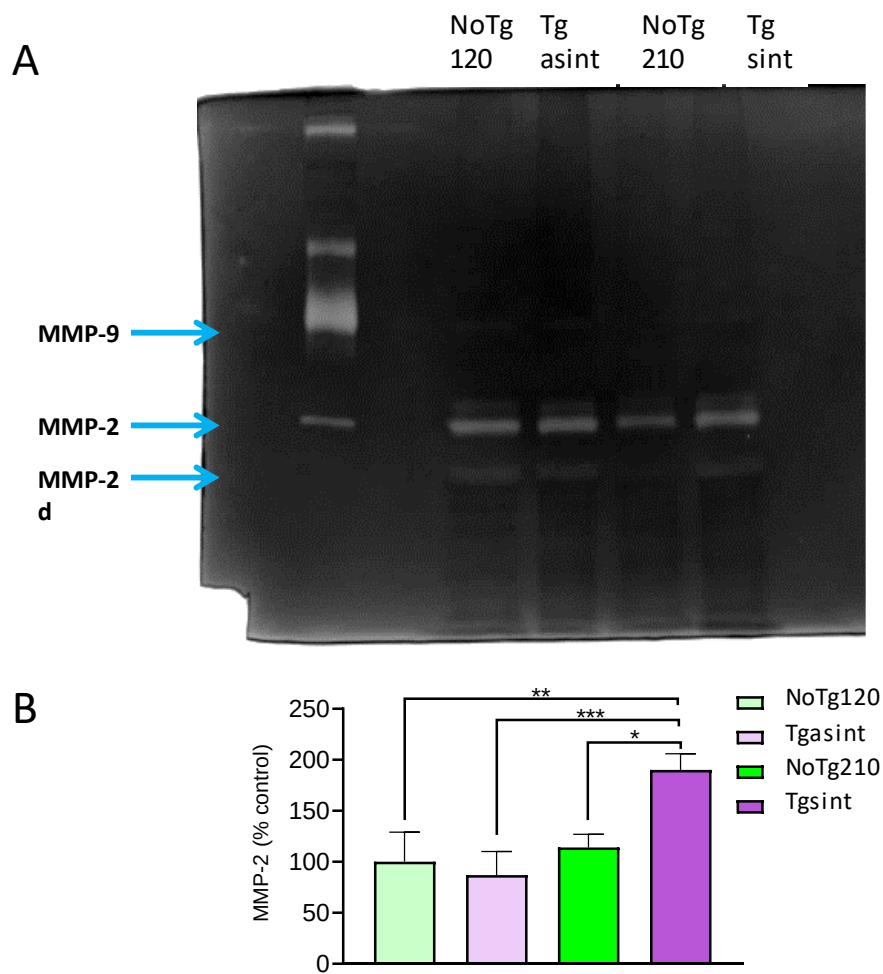


Figura 11. Zimografías en gel en homogenatos de músculo sóleo. A: El zimograma muestra actividad de MMP-2 en todas las condiciones experimentales y escasa actividad atribuida a MMP-2 degradada. No se observa actividad de MMP-9. El carril de la izquierda muestra el control positivo. **B:** La gráfica muestra aumentos de la actividad de MMP-2 en Tgsint respecto de los asintomáticos y de los NoTgs independientemente de su edad. Los números de asteriscos (*, **, ***) indican $p < 0.05$; 0.01 y 0.001, respectivamente. No se pudo cuantificar los valores de actividad de MMP-9 en estas muestras.

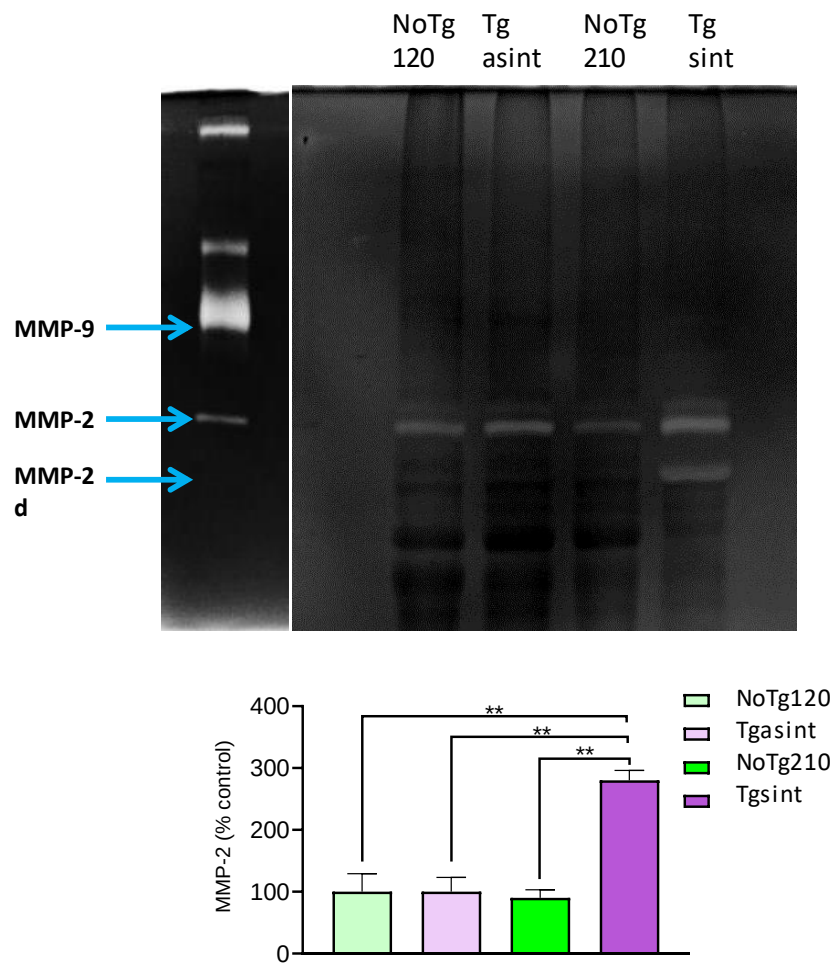


Figura 12. Zimografías en gel en homogenatos de músculo extensor longitudinal largo (EDL). A: El zimograma muestra actividad de MMP-2 en todas las condiciones experimentales y escasa actividad atribuida a MMP-2 degradada en las muestras de Tgsint. No se observa actividad de MMP-9 en ninguna condición experimental. El carril que está separado y a la izquierda muestra el control positivo. B: La gráfica muestra aumentos de la actividad de MMP-2 en Tgsint respecto de los asintomáticos y de los NoTgs independientemente de su edad. Los dos asteriscos (**) indican $p < 0.01$. No se pudo cuantificar los valores de actividad de MMP-9 en estas muestras.

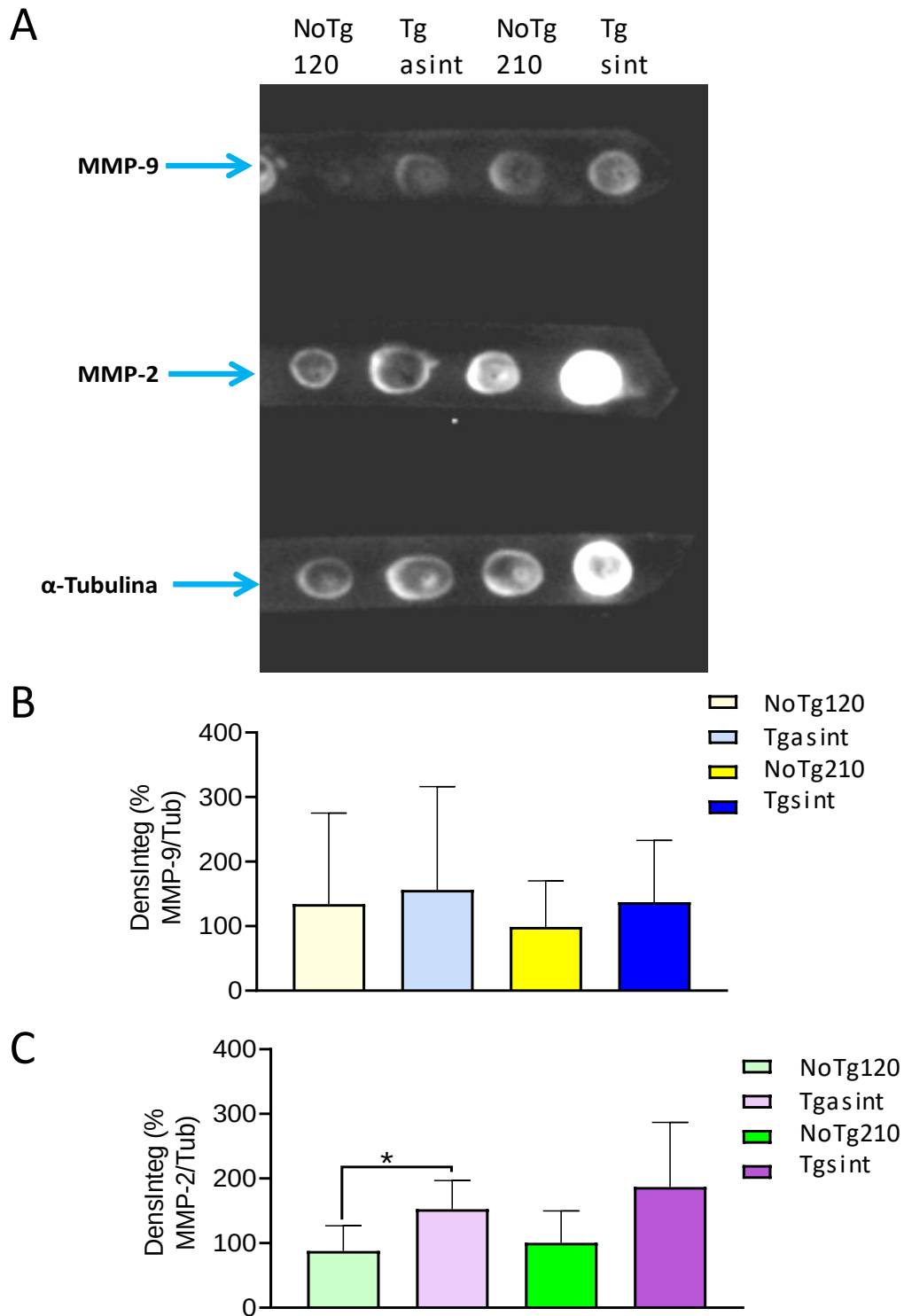


Figura 13. Dot blots de MMPs en homogenatos de médula espinal lumbar (MEL). **A:** Imagen que muestra las señales positivas para MMP-2, MMP-9 y α -tubulina en homogeneizados de MEL de animales Tgasint, Tgsint y hermanos NoTg de cada edad (NoTg 120 y NoTg 210). Las señales cada vez más brillantes y de área mayor se observan en MMP-2 y en el control de carga, mientras que las señales de MMP-9 son tenues y muy similares entre sí. **B:** Los gráficos muestran la densidad integrada de cada spot (intensidad por área) de MMP-2 o **C-** MMP-9 parametrizada a los valores de α -tubulina. El porcentaje de MMP-2 (o MMP-9)/ α -tubulina en las muestras de NoTg 120 se tomó como el 100%. Los datos muestran valores similares de MMP-9 en todas las condiciones experimentales y un aumento significativo de MMP-2/ α -tubulina en muestras de Tgasint respecto de su control negativo de edad (NoTg 120). Se observa una tendencia al aumento de esta relación al comparar Tgsint vs NoTg 210, pero no se alcanzó significación estadística. Todas las muestras sembradas tenían la misma cantidad de proteínas y los valores representados provienen de 5-9 determinaciones independientes.

En contraste con los resultados obtenidos de la cuantificación de MMP-2 y MMP-9 mediante dot blot, el análisis también por dot blot mostró un aumento en los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias prototípicas (TNF- α , IL-1 β) cuando se compararon los valores de muestras de los animales Tgsint con las de los Tgasint o de los NoTg 210 (Figura 14). Además, IL6 también aumentó cuando se compararon los resultados de las muestras de animales Tg asintomático con los de NoTg 120. En cambio, para NFkB, el factor de transcripción vinculado a cascadas inflamatorias, solo se encontró tendencia al aumento sin alcanzar significación estadística en ninguna de las condiciones experimentales.

Al analizar las relaciones entre los niveles de expresión de las gelatinasas y las tres citoquinas proinflamatorias que mostraron aumentos significativos, se observó una tendencia decreciente en todos los casos (Figura 15). Esto destaca un incremento notablemente mayor en las citoquinas en comparación con los valores de las gelatinasas, sugiriendo una desincronización en sus patrones de expresión.

Los resultados de expresión proteica de las gelatinasas y de marcadores vinculados a inflamación obtenidos mediante dot blots en los homogenatos de músculo soleo permitieron apreciar expresión significativa de MMP-2, pero no se observó expresión nítida de MMP-9 en todas las condiciones (Figura 16). El análisis cuantitativo de la relación de la densidad integrada de cada marca de MMP-2 parametrizada con α -tubulina muestra valores similares en todas las condiciones experimentales, con un aumento significativo de MMP-2/ α -tubulina en muestras de Tgasint respecto de su control negativo de edad (NoTg 120) y valores similares entre Tgasint, NoTg 210 y Tgsint. Sin embargo, a diferencia de MEL, los homogenatos de sóleo no mostraron valores significativamente diferentes entre los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y de NFkB entre las 4 condiciones experimentales y un aumento significativo en las relaciones MMP-2/TNF- α y MMP-2/IL-1 β probablemente debido a ausencia de cambios en los niveles de los factores vinculados a inflamación que fueron analizados.

En lo referente a la expresión proteica de las gelatinasas y de marcadores vinculados a inflamación obtenidos mediante dot blots realizados en homogenatos de músculo EDL evidenciaron niveles muy bajos de MMP-9 y marcas mucho más intensas de MMP-2 en todas las condiciones experimentales (Figura 17). El análisis cuantitativo de la relación de la densidad integrada de cada marca, permite observar que la relación parametrizada MMP-9/ α -tubulina muestra una tendencia al aumento (sin alcanzar significación estadística) en el siguiente orden NoTg 120, Tgasint, NoTg 210 y Tgsint. En cambio, para MMP-2, los valores parametrizados con α -tubulina, son similares en todas las condiciones experimentales.

A su vez, el análisis de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α ; IL-1 β e IL6 en los mismos homogenatos de EDL, muestra ausencia de diferencias entre las 4 condiciones experimentales y una tendencia al aumento de los niveles de NFkB en Tgsint sin alcanzar significación estadística debido a la dispersión de los datos obtenidos (Figura 18). En cuanto a la relación de las gelatinasas con las citoquinas pro-inflamatorias se observaron aumentos significativos en la relación de MMP-2/IL-1 β y valores similares en las relaciones MMP-2/ TNF- α y MMP-2/IL6. Respecto de MMP-9, su relación con los niveles de TNF- α e IL6 parece invertirse al comparar los animales NoTg 210 con los NoTg 120 (disminuye) mientras que aumenta al comparar los valores de las muestras de Tgsint con los Tgasint. En cambio para MMP-9/IL6 son similares en todas las condiciones experimentales.

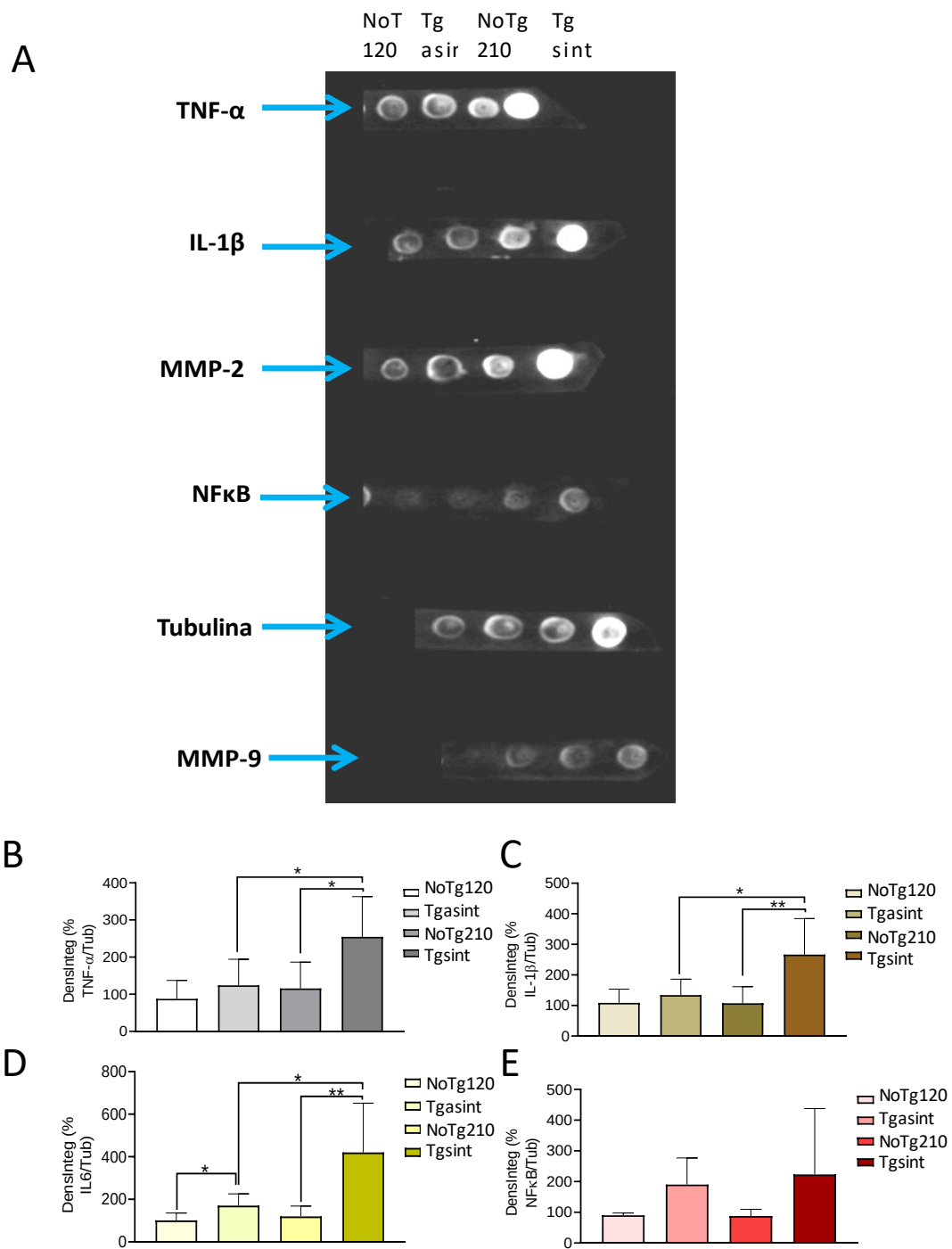


Figura 14. Dot blots de MMPs y marcadores vinculados a inflamación en homogenatos de MEL. A: Imagen que muestra las señales positivas para MMPs, α -tubulina, TNF- α , IL-1 β y NFκB en homogeneizados de MEL de animales, NoTg 120, Tgasint, NoTg 210 y Tgsint. Todas las muestras sembradas tenían la misma cantidad de proteínas y los valores representados provienen de 5-9 determinaciones independientes. Los gráficos muestran la densidad integrada de cada spot (intensidad por área) de TNF- α / α -tubulina (B); IL-1 β / α -tubulina (C); IL6/ α -tubulina (D) y NFκB/ α -tubulina (E) para cada grupo de animales. Se observan diferencias estadísticamente significativas al comparar muestras de Tgasint con Tgsint y muestras de NoTg 210 con Tgsint en las 3 citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL6). En esta última, también se observaron aumentos significativos al comparar NoTg 120 con Tgasint. Una tendencia al aumento, también se observó en el factor de transcripción NFκB, pero no se alcanzó significación estadística debido a la dispersión encontrada.

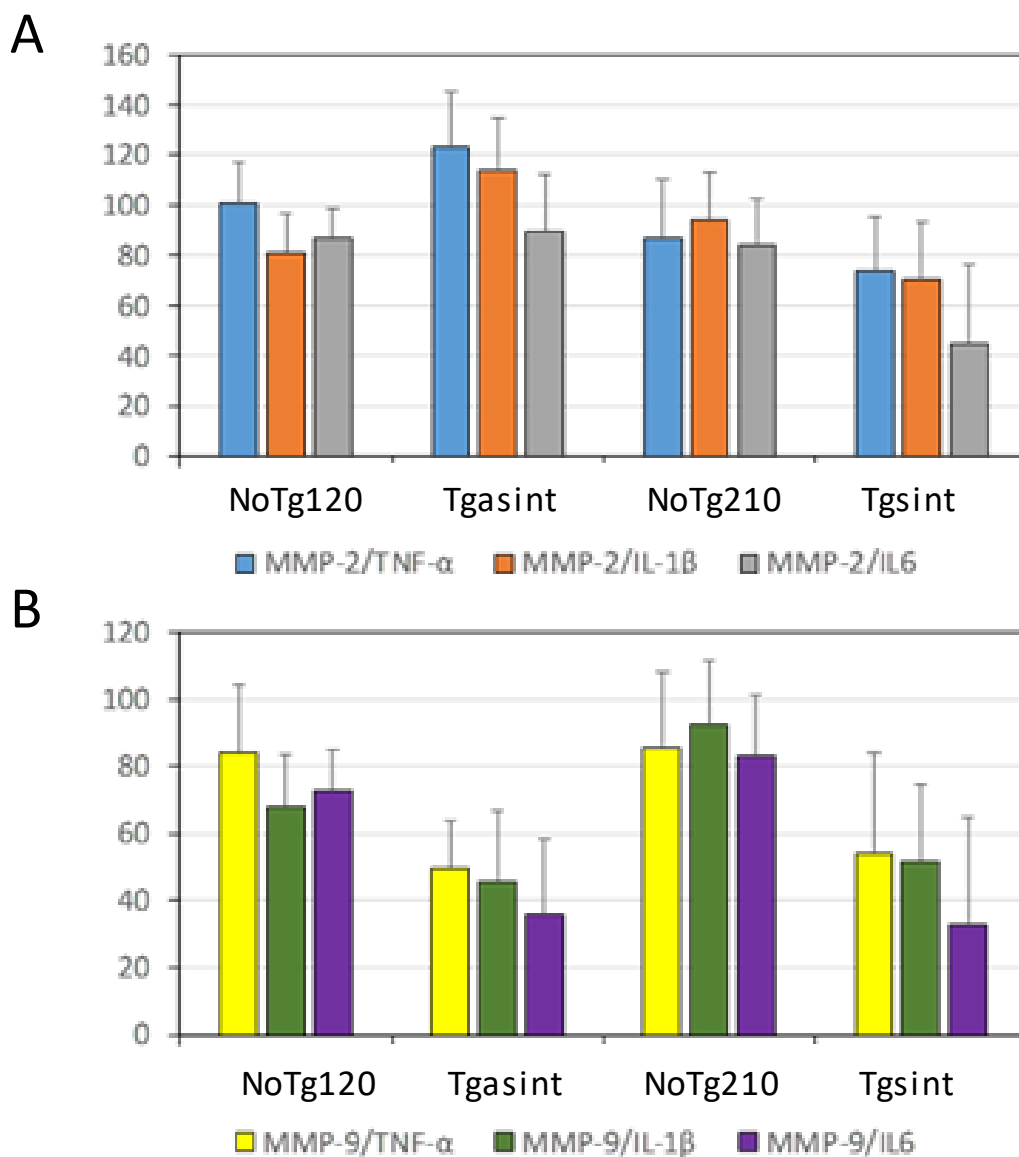


Figura 15. Relaciones porcentuales entre niveles de expresión de MMPs y citoquinas pro-inflamatorias en homogenatos de MEL. **A:** Se muestra que las relaciones de los niveles de expresión de MMP-2 con los marcadores inflamatorios tienden a ser mayores en Tgasint comparado con las otras condiciones, sugiriendo tal vez un aumento de expresión temprano de esta gelatinasa, antes de la aparición de síntomas. **B:** Estas relaciones no se observaron para MMP-9), con una disminución de los valores en los animales transgénicos, sugiriendo que los aumentos de las citoquinas pro-inflamatorias son superiores a los de MMP-9. Estos resultados sugieren una regulación diferencial y probablemente diferentes funciones de MMP-2 y MMP-9 en el establecimiento de la enfermedad o en la aparición de sus síntomas.

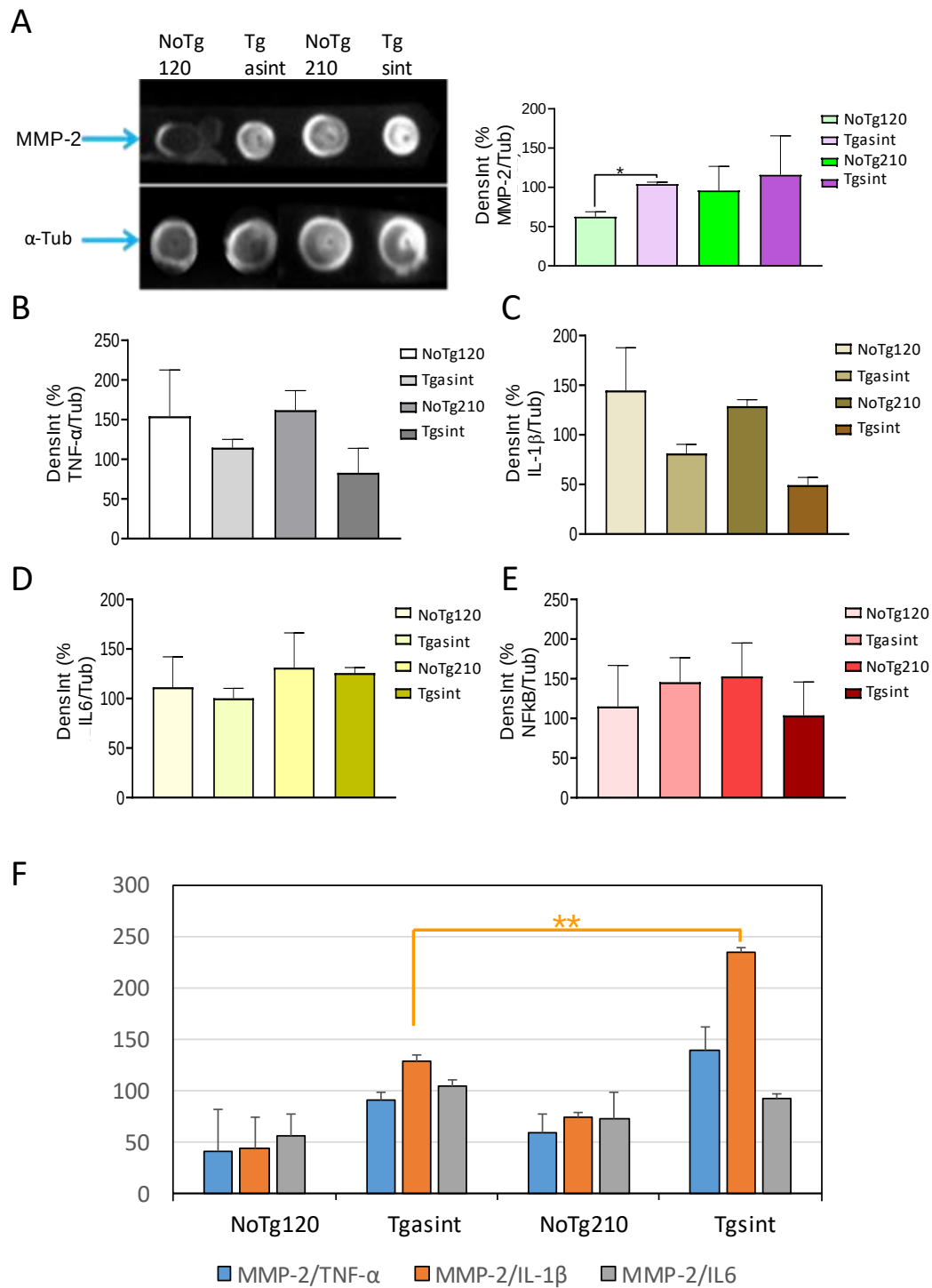


Figura 16. Relaciones porcentuales de los niveles de expresión de los marcadores vinculados a inflamación en homogenatos de músculo sóleo. A: La imagen superior izquierda muestra los niveles de expresión de MMP-2 en las 4 condiciones experimentales, mientras que la gráfica a la derecha muestra los niveles parametrizados respecto de α -tubulina, tomando como 100% los valores de NoTg 120. El valor del homogenato de Tgasint fue superior a NoTg 120 pero los demás pese a la tendencia creciente no muestran aumentos significativos. Los niveles de MMP-9 no pudieron ser cuantificados porque fueron muy bajos. En cuanto a los niveles de actividad de los marcadores pro-inflamatorios con respecto a α -tubulina (TNF- α / α -tubulina (B); IL-1 β / α -tubulina (C); IL6/ α -tubulina (D) y NF κ B/ α -tubulina (E)), no se observaron cambios significativos al comparar cada grupo de animales. F: La gráfica muestra las relaciones entre los niveles de MMP-2 y de citoquinas pro-inflamatorias con aumentos significativos en Tgsint en comparación con NoTg 120 y NoTg 210 en las relaciones con TNF- α ($p < 0.01$) y una tendencia al crecimiento en IL-1 β pero no con IL-6, sugiriendo posibles relaciones diferentes con las citoquinas pro-inflamatorias prototípicas.

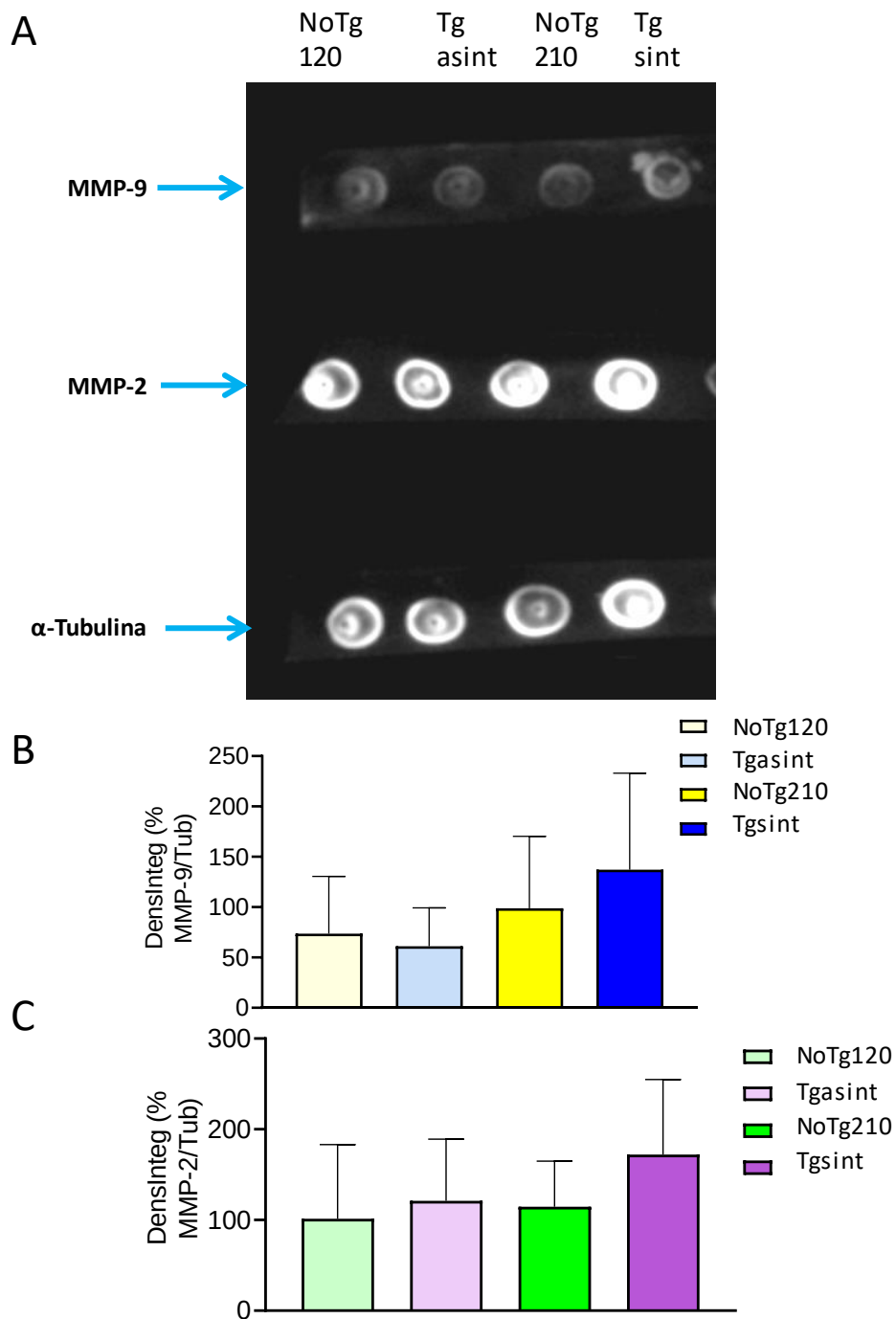


Figura 17. Dot blots de MMPs en homogenatos de músculo EDL. **A:** La imagen muestra las señales positivas para MMP-2, MMP-9 y α -tubulina en homogeneizados de músculo EDL de animales de las 4 condiciones experimentales estudiadas. Las señales cada vez más brillantes y de área mayor se observan en MMP-2, mientras que las señales de MMP-9 son tenues y muy similares entre sí. **B-C:** Los gráficos muestran la densidad integrada de cada spot (intensidad por unidad de área) de MMP-2 o MMP-9 parametrizadas a los valores de α -tubulina. El porcentaje de MMP-2/ α -tubulina en las muestras de NoTg 120 se tomó como el 100%. Los datos muestran valores más altos de MMP-9 en Tgsint y una tendencia al aumento que no alcanza significación estadística en muestras de Tgsint. Los valores representados provienen de 5-9 determinaciones independientes.

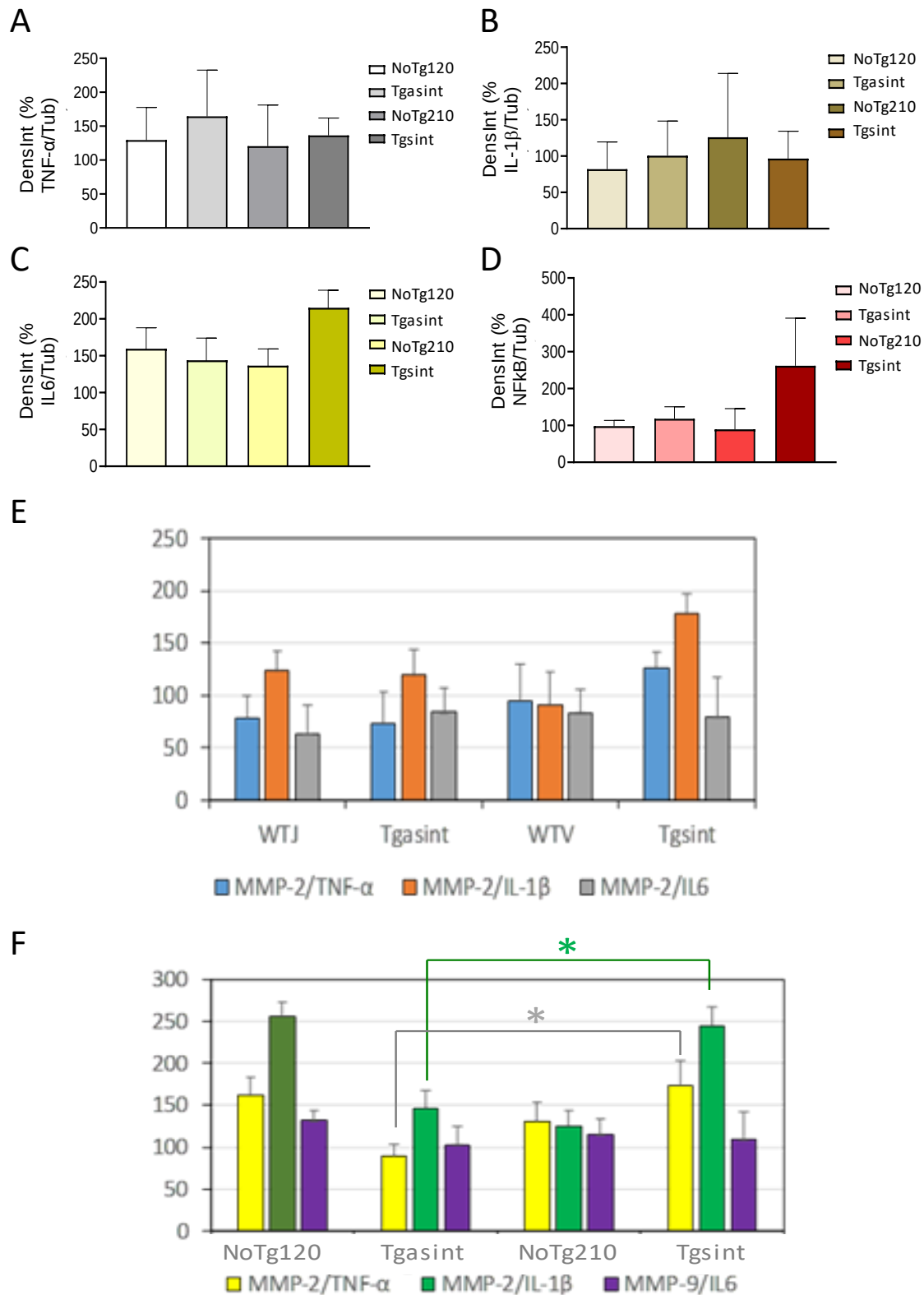


Figura 18. Relaciones porcentuales de los niveles de expresión de marcadores vinculados a inflamación en homogenatos de músculo EDL. A-D: se Los gráficos muestran los niveles de actividad de las tres citoquinas estudiadas con respecto a α -tubulina: TNF- α / α -tubulina (A); IL-1 β / α -tubulina (B); IL6/ α -tubulina (C) y de NF κ B/ α -tubulina (D) para cada grupo de animales. E: La relación de MMP-2 con las citoquinas pro-inflamatorias muestra valores mayores al 100% para MMP-2/IL-1 β con aumentos significativos en las muestras de animales Tgsint ($p < 0.05$), mientras que para las otras dos citoquinas no se observan diferencias respecto de la edad ni del genotipo. F: en cuanto a MMP-9, su relación con los niveles de TNF- α e IL-1 β es similar entre NoTg 120 y NoTg 210 y muestran una tendencia a aumentar al comparar Tgasint con Tgsint. En cambio, la relación MMP-9/IL6 no parece depender ni del tipo de animales ni de la edad. Los valores representados provienen de 5-9 determinaciones independientes.

Para completar el análisis de la expresión de las gelatinasas, se realizó el inmunomarcado de estas proteínas en secciones de vibrátomo de médula espinal lumbar y músculo sóleo en animales de 210 días de edad (Tgsint y NoTg 210). Las inmunofluorescencias en rodajas de MEL incubadas con anticuerpos específicos contra MMP-2 y MMP-9 (verdes) mostraron señales positivas de MMP-2 y -9 en todo el parénquima medular con marcas de mayor intensidad en los cuerpos de las motoneuronas en ambas condiciones pero principalmente en las médulas provenientes de animales Tgsint (Figura 19). Además, el co-marcado de MMP-9 con neurofilamento (rojo) en secciones equivalentes del asta ventral de la MEL muestra como MMP-9 y NF colocan en ambas muestras pero que en el animal Tgsint, la señal de NF es mucho más débil y la morfología de las motoneuronas se simplifica apareciendo como células donde los procesos celulares no expresan NF. El análisis de las inmunofluorescencias de MMP-2 (verde) y MMP-9 (rojo) en secciones transversales del músculo sóleo (no se pudo obtener secciones de vibrátomo de EDL), evidenció señales positivas de MMP-2 en el sarcoplasma en forma difusa y en forma de parches intensos asociados probablemente al sarcolema y una marca de MMP-9 muy débil en las muestras de animales NoTg 210. En cambio, en las secciones de los animales Tgsint se observó señal generalizada y difusa de MMP-2 y un aumento heterogéneo de la señal de MMP-9 en todas las fibras. Ambos aumentos se evidenciaron cuando se compararon los valores de MGv de Tgsint con NoTg 210 (Figura 20). Además, cuando se realizó el co-marcado de MMP-2 y laminina (Figura 21) se observan los parches de MMP-2 cercanos a la señal de laminina que muestra una red bien definida alrededor de las fibras musculares, demarcando la membrana basal. En el caso del Tgsint, la señal de MMP-2 es notablemente más intensa dentro de las fibras musculares mientras que la laminina está presente alrededor de las fibras, evidencia sus distintos tamaños y aparece en zonas con diferencias en la distribución e intensidad. El gráfico de barras muestra el aumento significativo del MGv entre MMP-2 y LAM al comparar Tgsint con NoTg 210.

Finalmente, se analizó la inmunolocalización de MMP-2 con marcadores de células gliales y de inflamación. Al estudiar la inmunorreactividad de MMP-2 con marcadores de astrocitos (GFAP) y de microglía (lectina de tomate) (Figura 22), se observó en el animal NoTg 210 una marcación generalizada débil en el parénquima de la MEL, las marcas más intensas de MMP-2 se encuentran en los somas de las motoneuronas y las señales de GFAP y lectina de tomate marcan delicados procesos de astrocitos y microglías respectivamente. En cambio, en el animal Tgsint se observan señales más intensas de MMP-2 en el parénquima y en el soma de las motoneuronas que aparecen más brillantes, pero más dramáticos parecen los aumentos de la señal de GFAP y lectina de tomate. Las imágenes a mayor aumento muestran las señales de GFAP y lectina de tomate en células hinchadas e hipertrofiadas, la reactividad de marca de lectina es tan alta que forma una red entrecruzada e intrincada de procesos celulares positivos. Las gráficas de los niveles de MMP-2, GFAP y lectina de tomate en Tgsint vs. NoTg 210 mostraron aumentos significativos en todos los parámetros. Sin embargo, la relación MMP-2/GFAP y MMP-2/lectina de tomate disminuye en el Tgsint sugiriendo que el aumento de la reactividad glial a nivel de la médula fue mucho mayor que el aumento de la inmunoreactividad de MMP-2. En forma complementaria, también se estudió la inmunorreactividad de MMP-2 (rojo) con neurofilamento y con lectina de tomate (Figura 23) en secciones de MEL de animales NoTg 210 y Tgsint. Las imágenes muestran que en la MEL del animal NoTg 210 la señal de NF marca todas las motoneuronas y numerosos procesos celulares de las motoneuronas cuyos somas se observan y de otras cuyos cuerpos están en otros planos. MMP-2 se observa en zonas perinucleares de forma difusa y con mayor intensidad rodeando el núcleo en las mismas motoneuronas, mientras que las células microgliales positivas a lectina presentan cuerpos pequeños y procesos intrincados muy finos.

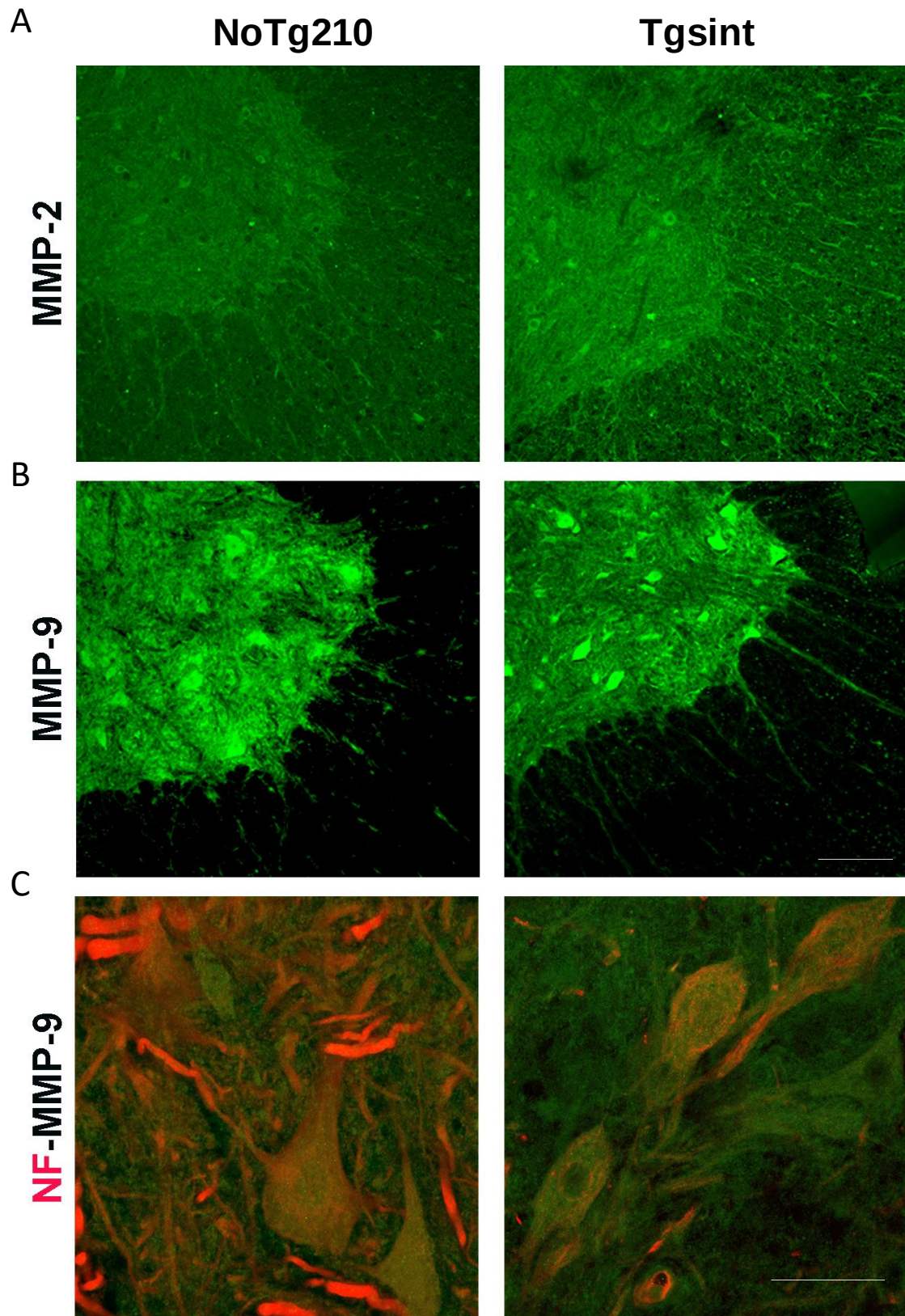


Figura 19. Inmunorreactividad de MMP-2 y MMP-9 (verdes) y co-marcado de MMP-9 con neurofilamento (rojo) en el asta ventral de la médula espinal lumbar de animales NoTg 210 y Tgsint. **A-B:** Las imágenes muestran señales positivas de MMP-2 y -9 en todo el parénquima medular con mayor intensidad en los cuerpos de las motoneuronas principalmente en Tgsint. **C:** La co-localización de MMP-9 y NF evidencia como en el animal Tgsint, la señal de NF es mucho más débil y como la morfología de las motoneuronas se simplifica perdiendo la inmunoreactividad en los procesos celulares. Barras de calibración: 50 y 20 μ m para las imágenes superiores e inferiores, respectivamente.

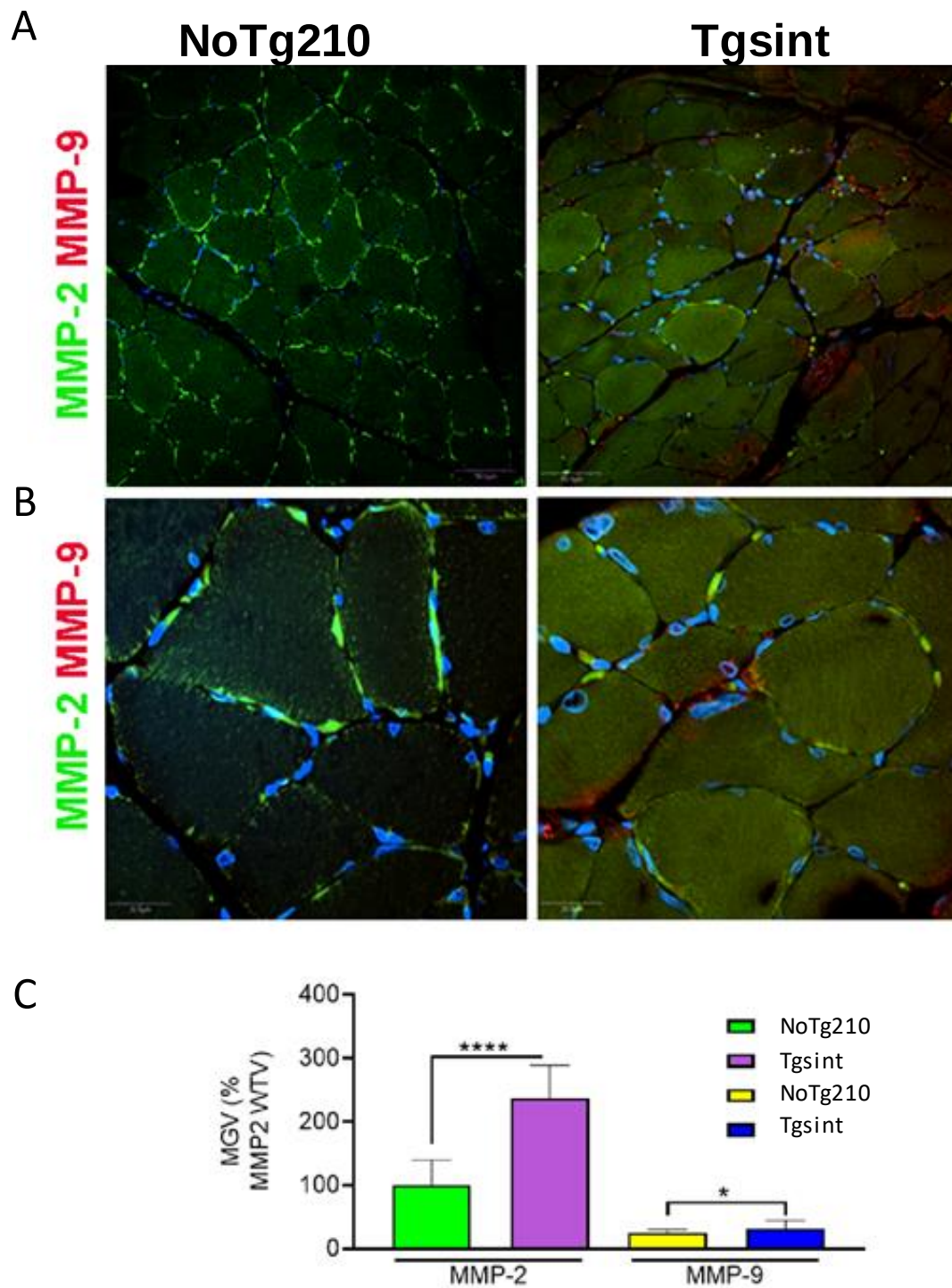


Figura 20. A-B: Inmunofluorescencias de MMP-2 (verde) y MMP-9 (rojo) en sesiones transversales del músculo sóleo evidenciando señales positivas de MMP-2 asociadas al sarcolema y sarcoplasma y señal casi ausente de MMP-9 en la muestra del animal NoTg 210. En el Tgsint se observa una señal generalizada y difusa de MMP-2 y un aumento heterogéneo de la señal de MMP-9. Barras de calibración: 50 y 20 μ m, respectivamente. **C:** La gráfica de MGV muestra los aumentos significativos de MMP-2 ($p < 0.001$) y MMP-9 ($p < 0.05$) al comparar Tgsint vs NoTg 210.

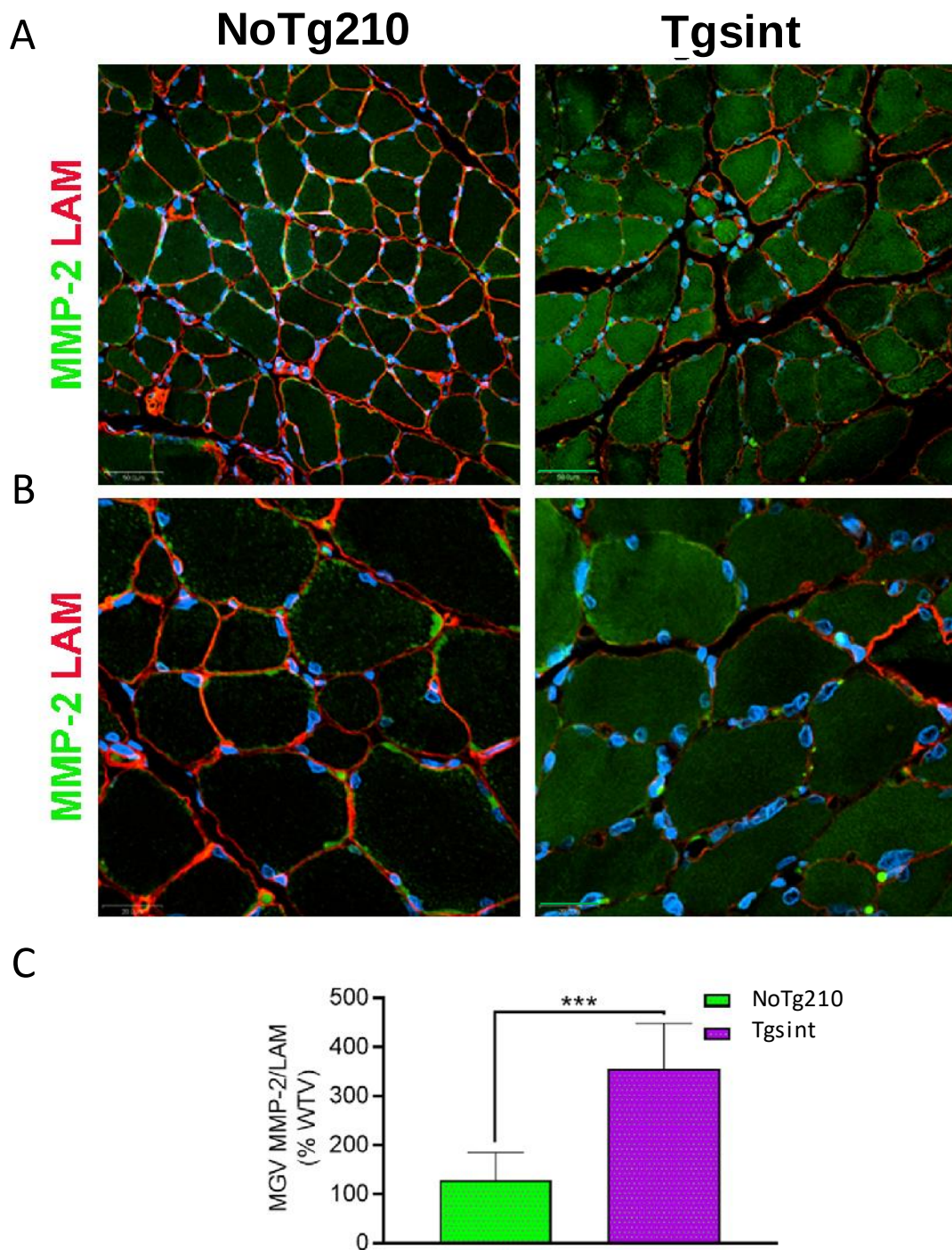


Figura 21. Inmunoreactividad de MMP-2 y laminina (LAM) en músculo sóleo. A-B: La imagen de inmunofluorescencia tomada en el microscopio confocal Zeiss 800 muestra la inmunoreactividad para MMP-2 (verde) y laminina (rojo) en secciones transversales del músculo sóleo de animales de 210 días de edad: NoTg 210 y Tgsint. Mientras que en las muestras de NoTg 210, la señal de MMP-2 es muy débil, difusa dentro de las fibras y aparece en forma de parches cercanos a la señal de laminina que muestra una red bien definida alrededor de las fibras musculares, demarcando la membrana basal. En el caso del Tgsint, la señal de MMP-2 es notablemente más intensa dentro de las fibras musculares mientras que la laminina está presente alrededor de las fibras musculares, evidenciando fibras de distintos tamaños y zonas con diferencias en la distribución e intensidad. **C:** El gráfico de barras muestra la cuantificación de la relación de la intensidad media de fluorescencia (MGV) entre MMP-2 y LAM como porcentaje. Note el incremento significativo al comparar los valores del Tgsint con los del NoTg 210 (***, $p < 0.001$).

En la imagen de Tgsint se observa un marcado descenso de la señal de NF, permaneciendo positivos muy pocos somas celulares a la vez que se observa un aumento generalizado de la señal de MMP-2 y de la señal de lectina de tomate mostrando células positivas con procesos y cuerpos más prominentes. La gráfica muestra los aumentos de los MGV de MMP-2 y MMP-2/NF y el dramático descenso de NF lo que probable sea la mayor influencia en el aumento de la relación MMP-2/NF en animales Tgsint comparados con NoTg 210.

Además, y como forma de corroborar los resultados anteriormente obtenidos, la reactividad glial exacerbada conjuntamente con el aumento de inflamación a nivel de la MEL fue mostrada con los aumentos de GFAP y de IL-1 β en muestras de animales NoTg 210 y Tgsint (Tg). Las imágenes confocales muestran que IL-1 β aumentó en el soma de las motoneuronas (asteriscos blancos) y extracelularmente en muestras de los animales Tg. Curiosamente, IL-1 β se expresó solo en unos pocos astrocitos reactivos que se ven en coloración amarillenta (triángulos naranjas) pero no en la mayoría de estas células a pesar de la astrogliosis extensa evidenciada por abundantes células con cuerpos hinchados y procesos celulares engrosados (fucsia, asteriscos amarillos) que a su vez son GFAP positivas. Las líneas blancas, delgadas y discontinuas, delimitan las regiones de materia gris y blanca en las secciones de médula espinal. La cuantificación de las señales mostró aumento significativo del número de núcleos positivos a DAPI que indica también reactividad glial, de células GFAP positivas (tanto en número como en área) y de la señal de IL-1 β , tanto en intensidad como en área. Esta figura fue publicada recientemente en Otero, Bolatto y cols. (2024).

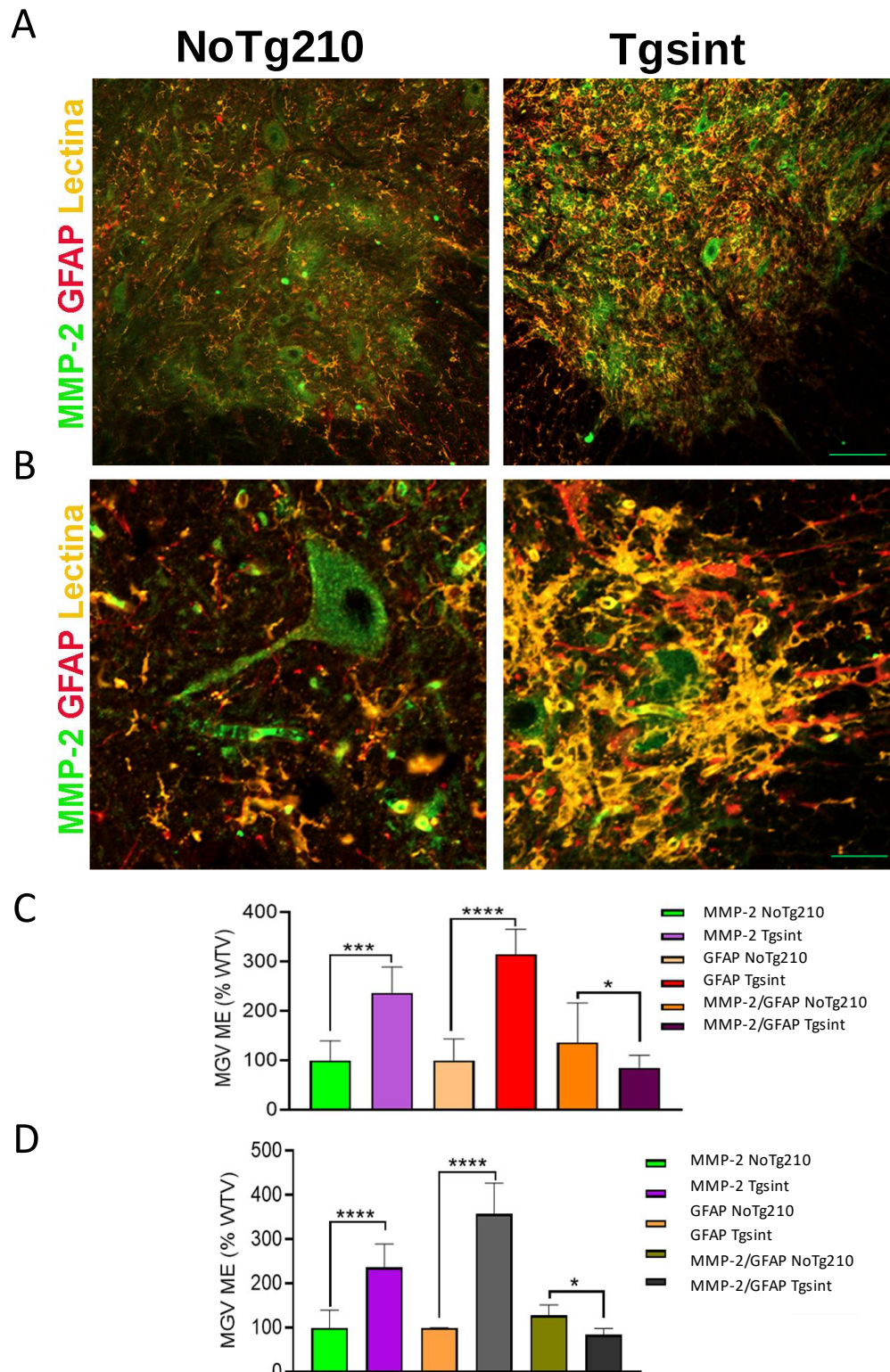


Figura 22. Inmunorreactividad de MMP-2 (verde) y GFAP (rojo) en médula espinal lumbar junto con marcado de lectina de tomate (naranja). **A-B:** Mientras que en las imágenes del animal NoTg 210 se observa que las marcas específicas de MMP-2 están restringidas a los somas de las motoneuronas y GFAP y lectina de tomate marcan delicados procesos de astrocitos y microglías respectivamente; en el animal Tgsint se observa el aumento dramático en la señal de GFAP y lectina de tomate. Las imágenes de abajo a mayor aumento muestran las señales de GFAP y lectina de tomate en células hipertrofiadas. Las células positivas a lectina forman como una red entrecruzada de procesos celulares positivos. También se ven positivos algunos perfiles de vasos sanguíneos. Barras de calibración: 50 y 15 μ m, respectivamente. **C-D:** Las gráficas muestran los niveles de MMP-2, GFAP y lectina de tomate en Tgsint vs. NoTg 210, con aumentos significativos ($p < 0.0001$) para todos los parámetros. Sin embargo, la relación MMP-2/GFAP y MMP-2/lectina de tomate disminuye en el Tgsint respecto del NoTg 210 ($p < 0.05$), indicando mayor aumento de la reactividad glial que de la inmunoreactividad de MMP-2.

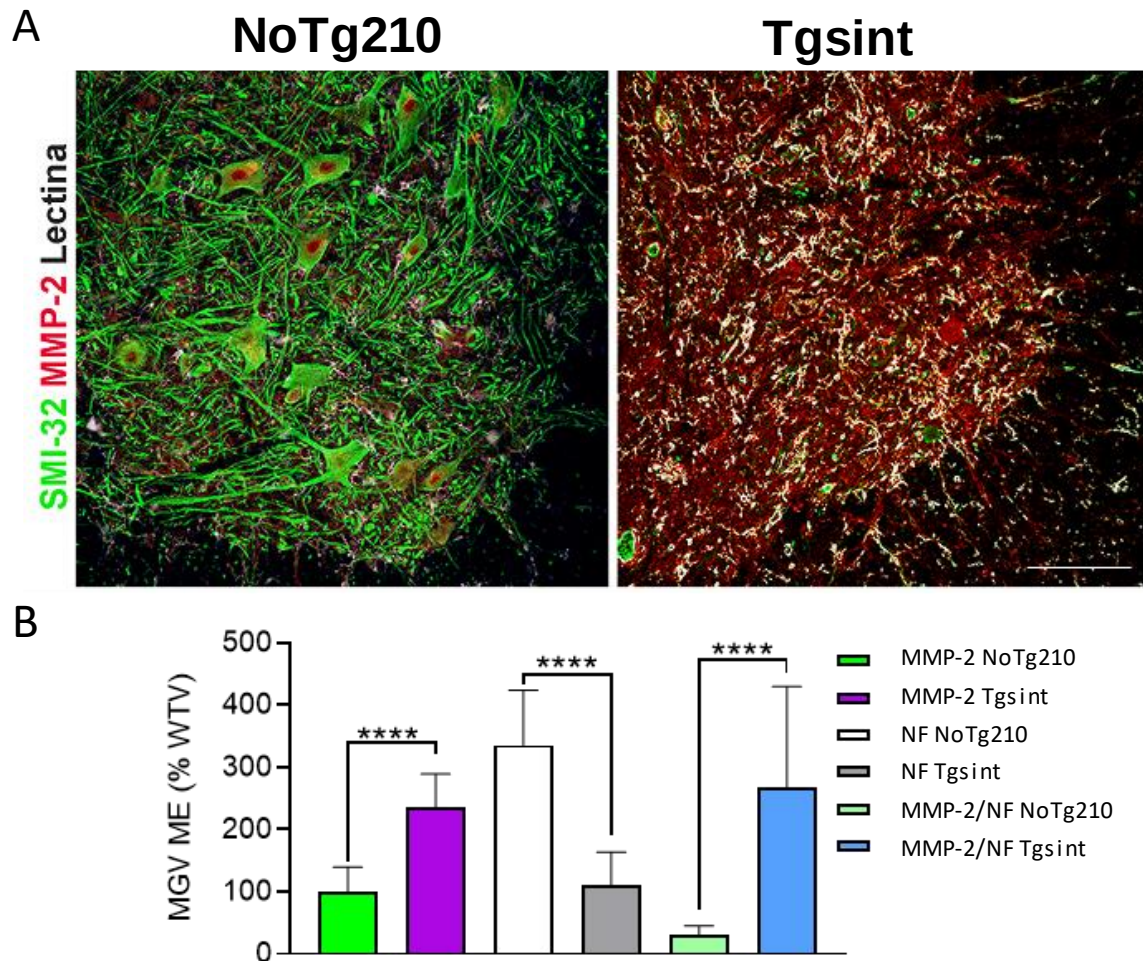


Figura 23. Inmunorreactividad de MMP-2 (rojo), Neurofilamento (verde) y marcado con lectina de tomate (blanco) en secciones de MEL de animales NoTg 210 y Tgsint. A: Las imágenes muestran que en la MEL del animal NoTg 210 la señal de NF marca todas las motoneuronas y a profusos procesos celulares de las mismas, mientras que MMP-2 se observa perinuclear y nuclear en las mismas neuronas y la lectina marca microglías de cuerpos pequeños y proceso. En la muestra de Tgsint en cambio, se observa un marcado descenso de la señal verde, con pocos cuerpos celulares remanentes positivos a NF que contrasta con el aumento generalizado de la señal roja de MMP-2 y de la señal blanca en células con procesos y cuerpos más prominentes. Curva de calibración: 50 μ m. **B:** La gráfica muestra las relaciones de MGv de MMP-2, NF y la relación MMP-2/NF en animales Tgsint comparados con NoTg 210. Se notan los aumentos significativos en MMP-2 y en la relación MMP-2/NF así como el marcado descenso de la marca de NF.

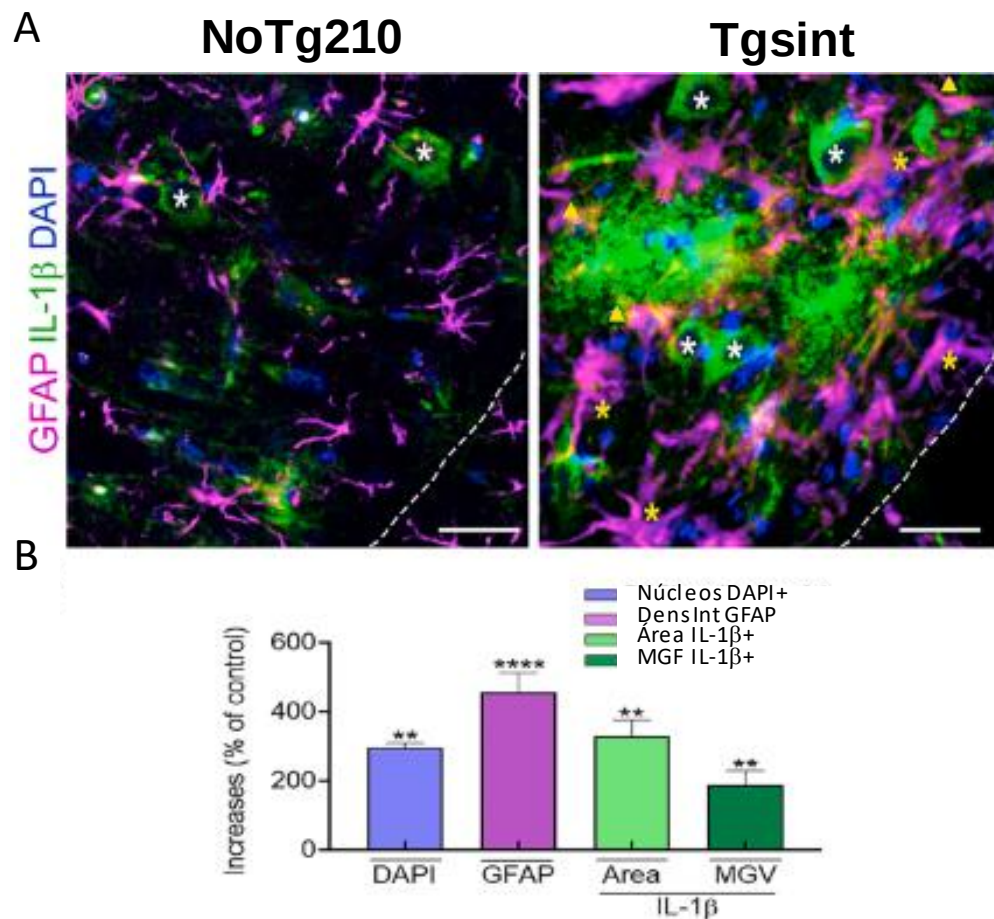


Figura 24. Inmunoreactividad para GFAP e IL-1 β en secciones de médula espinal de animales no transgénico (NoTg 210) y transgénico sintomático/terminal (Tgsint). **A:** Imágenes confocales de apilados en Z mostrando la inmunoreactividad de IL-1 β (verde) y la co-marcación con GFAP (fucsia). Los núcleos se marcaron con DAPI. Note que la señal de IL-1 β aumentó en el soma de las motoneuronas (asteriscos blancos) y extracelularmente en muestras de animales Tg. Curiosamente, IL-1 β se expresó solo en unos pocos astrocitos reactivos que se ven en coloración amarillenta (triángulos naranjas) pero no en la mayoría de estas células a pesar de la astrogliosis extensa evidenciada por abundantes células con cuerpos hinchados y procesos celulares engrosados (fucsia, asteriscos amarillos). Las líneas blancas, delgadas y discontinuas, delimitan las regiones de materia gris y blanca en las secciones de médula espinal. Barras de calibración 30 μ m. **B:** Cuantificación de las señales de IL-1 β y GFAP en secciones de médula espinal como las que se observan en A. Es significativo el aumento del número de núcleos positivos a DAPI, de células positivas a GFAP (tanto en número como en área) y de la señal de IL-1 β , tanto en intensidad como en área. Los números de asteriscos indican $p < 0.01$ (**) y $p < 0.0001$ (****). Figura publicada en Otero, Bolatto y cols. (2024).

DISCUSIÓN

En esta tesis, en primer lugar se evaluó la actividad de las gelatinasas en muestras de suero, médula espinal y músculos de animales Tg asintomáticos (Tgasint) y sintomáticos (Tgsint) y hermanos no transgénicos de las mismas edades (NoTg 120 y NoTg 210), respectivamente). Al comparar las muestras de suero obtenidas de dichos animales no se encontraron cambios significativos. Estos datos no están de acuerdo con lo reportado en la literatura que muestra niveles elevados de varias MMPs incluyendo las gelatinasas en sueros de pacientes con ELA (Łukaszewicz-Zajac y cols. 2014; Sánchez-Torres y cols. 2020; Cabral y Pacheco 2020), fundamentalmente en los casos más graves (Beuche y cols. 2000; Demestre y Parkin-Smith 2005; Renaud y Leppert 2007; Fang y cols. 2010; Niebroj-Dobosz y cols. 2010; Kaplan y cols. 2014; Łukaszewicz-Zajac y cols. 2014). Tampoco concuerdan con los aumentos encontrados en modelos murinos de la enfermedad (Murphy y Nagase 2008), aún en aquellos que se obtuvieron empleando un ratón SOD1G93A con un bajo número de copias del transgen, lo que posibilitó una progresión lenta de la enfermedad en forma análoga a la humana (Soon y cols. 2010). Soon y cols. 2010 también reportaron que la actividad sérica de MMP-9 estaba significativamente elevada en los animales que mostraban signos tempranos de la enfermedad en comparación con los animales más jóvenes y presintomáticos, sugiriendo que las MMPs podrían elevarse muy lentamente durante la etapa sintomática.

Si esto fuera así, podría explicar por qué no se observaron aumentos de MMPs en suero proveniente de las ratas SOD1G93A empleadas en esta tesis ya que sobreexpresan entre 7-10 copias de la SOD1 humana mutada en G93A, pero la etapa sintomática es muy brusca (comienzan a evidenciar los síntomas a los 7-8 meses de vida y luego llegan al estadio terminal en torno a los 30 días). Tampoco se puede descartar que la posible existencia de cambios sutiles en las MMPs pudiera haber sido enmascarada por la complejidad de la sangre como matriz y por la interferencia de sus proteínas más abundantes o por formación de agregados proteicos como proponen Sturme y Malaspina (2022). En resumen, los resultados obtenidos no nos permiten proponer ni preliminarmente que las gelatinasas en el suero de los animales transgénicos empleados podrían ser marcadores de la progresión de la enfermedad.

En lo referente al análisis de muestras de médula espinal, los homogenatos de la porción lumbar mostraron bandas claras de MMP-2 con los valores más altos en las muestras de ratas Tgsint y casi total ausencia de MMP-9 en todos los animales excepto en el Tgsint. Se observó una mayor actividad en la porción lumbar en comparación con la cervical, lo que sugiere un incremento, o tendencia al incremento, de la actividad gelatinasa en la región donde ocurre el daño neuronal, que en los casos estudiados corresponde a la médula lumbar.

De acuerdo con estos datos de actividad, los dot blots realizados evidencian que los homogenatos de médula espinal lumbar muestran expresión significativa de MMP-2 y muy débil de MMP-9 en todas las condiciones. El análisis cuantitativo de los resultados parametrizados a α -tubulina mostró valores similares de MMP-9 en todos los casos y aumento significativo de MMP-2 en muestras de Tgasint respecto de su control negativo de igual edad (NoTg 120) y una tendencia al aumento (sin alcanzar significación estadística) al comparar Tgsint vs NoTg 210. Estos datos muestran una concordancia entre los niveles de expresión y de actividad de las gelatinasas, sugiriendo que al menos la proporción entre la proteína que se expresa y la que se procesa convirtiéndose en la forma activa se mantiene al comparar el estadio asintomático con el sintomático (Rempe y cols. 2016; González-Avila y cols. 2020).

Por lo tanto, en el modelo de ELA empleado no se observaron los aumentos de gelatinasas que la literatura reporta en pacientes y en modelos murinos de ELA, descartando así el papel preponderante que sugieren para las gelatinasas durante el transcurso de la enfermedad (Beuche y cols. 2000; Lorenz y cols. 2006; Fang y cols. 2010; Niebroj-Dobosz y cols. 2010; Kaplan y cols. 2014;

Łukaszewicz-Zajac y cols. 2014; Cabral-Pacheco y cols. 2020; Sánchez-Torres y cols. 2020). En otras palabras, en este modelo de ELA, si las gelatinasas tienen un papel en el daño observado, el mismo no está relacionado con cambios en la expresión o en la actividad, pero podría eventualmente producirse por una disminución de los inhibidores endógenos como fue sugerido por Cabral-Pacheco y cols. (2020), los cuales no fueron cuantificados en las muestras obtenidas de los animales utilizados en esta tesis.

Otra explicación podría referirse a la localización de las gelatinasas en la médula espinal. La inmunohistoquímica de las gelatinasas en la médula espinal lumbar muestra que en los animales Tgsint hay un aumento de la marca a nivel del tejido y particularmente en las motoneuronas del asta ventral. Entonces, aunque no se observen aumentos en los homogenatos debido a que en los estadios sintomáticos de la enfermedad las motoneuronas van muriendo, podría ocurrir lo que Kaplan y cols. (2014) y Baxter y cols. (2015) proponen. Estos dos grupos mostraron que en los pacientes con ELA, la MMP-9, se expresa únicamente en neuronas motoras rápidas, que son las selectivamente vulnerables. También reportaron que la MMP-9 expresada por las propias motoneuronas que inervan fibras musculares de contracción rápida, promueve la activación de estrés de RE y es suficiente para desencadenar la muerte regresiva axonal y que al reducir la actividad de MMP-9 por diversos medios, la denervación muscular se retrasó significativamente (Kaplan y cols. 2014).

Otros autores también proponen que las MMPS tienen la capacidad de dañar las motoneuronas promoviendo procesos inflamatorios (Sánchez-Torres y cols. 2020). Esa correlación no fue observada en los resultados obtenidos ya que los dot blots mostraron aumentos de los niveles de TNF- α , IL-1 β e IL6 en los animales Tgsint comparados con los Tgasint o los NoTg 210. Estos aumentos quedan más claros al relacionar los niveles de expresión de las gelatinasas con los valores correspondientes de TNF- α , IL-1 β e IL6. Esta relación disminuyó en los animales Tgsint por el aumento del estado inflamatorio, descartando la retroalimentación entre las citoquinas proinflamatorias, particularmente TNF- α e IL-1 β , con la conversión de proMMP-2 y -9 a sus formas activas como algunos autores proponen como base para mantener crónicamente los procesos inflamatorios (Fang y cols. 2010; Kaplan y cols. 2014).

La actividad y expresión de gelatinasas en la médula espinal lumbar tampoco se correspondió con los niveles aumentados de reactividad glial (astrocitaria y microglial) observada en los animales Tgsint, donde disminuyen las relaciones entre MMP-2/GFAP y MMP-2/lectina de tomate, indicando que el aumento de la reactividad glial a nivel de la médula fue mucho mayor que el aumento de la inmunoreactividad de MMP-2. Esto lleva a proponer una vez más que las gelatinasas parecen tener poca incidencia en el establecimiento o mantenimiento de la neuroinflamación y de la reactividad glial observada en el modelo empleado. Estos resultados tampoco están de acuerdo con la literatura que sostiene que las gelatinasas pueden facilitar la reactividad glial alterando su señalización y sus propiedades homeostáticas (Fang y cols. 2010; Kaplan y cols. 2014; Olivera-Bravo y cols. 2022). Los datos obtenidos destacan de manera consistente la presencia de reactividad glial y un aumento de los marcadores proinflamatorios analizados, lo que sugiere una retroalimentación entre ambos eventos. La neuroinflamación crónica fomenta la reactividad glial (Ilieva et al., 2009; Kaplan et al., 2014), lo que puede inducir fenotipos gliales neurotóxicos que, a su vez, liberan moléculas proinflamatorias, amplificando y perpetuando el daño en el sistema nervioso central (SNC). (Díaz-Amarilla y cols. 2011; Verkhratsky y Nedergaard 2018). A su vez, la reactividad glial es un actor muy importante para acelerar la progresión de la enfermedad en los modelos SOD1G93A, ya que la sola eliminación de SOD1G93A en la microglía o en los astrocitos ralentizó la progresión de la enfermedad (Ilieva y cols. 2009) y que la supresión de factores solubles de la microglía que activan a los astrocitos prolonga significativamente la supervivencia del ratón SOD1G93A (Gutenplan y cols. 2017).

En cuanto a los análisis de actividad y expresión de gelatinasas en los homogenatos de músculos sóleo y EDL, se observó un aumento significativo de la actividad de MMP-2 en las muestras de Tgsint respecto de los demás grupos, sugiriendo que en el estadio sintomático del modelo empleado, el daño que deriva o se asocia a MMP-2 podría ser similar en ambos músculos. Los niveles de MMP-9 solo se detectaron en forma clara en los estadios sintomáticos. En consonancia con los valores de actividad, las inmunofluorescencias de MMP-2 y MMP-9 en músculo sóleo evidenciaron aumentos significativos en los animales Tgsint y alteraciones en la señal de laminina. En conjunto, estos resultados concuerdan con la baja actividad y expresión de MMPs a nivel muscular en condiciones normales (Lambert 2004; Kessenbrock 2010). La detección de MMP-9 en muestras de Tgsint preferencialmente podría estar de acuerdo con el papel reportado para esta gelatinasa en la denervación muscular observada en pacientes de ELA (Sánchez-Torres y cols. 2020) y en este modelo como se ha reportado anteriormente (Olivera-Bravo y cols. 2022).

Sin embargo, no se pudo observar una relación entre la actividad de las MMPs y los niveles de citoquinas pro-inflamatorias (Łukaszewicz-Zajac y cols. 2014), ya que a nivel del músculo no se observaron cambios en los niveles de las tres citoquinas pro-inflamatorias estudiadas, sugiriendo que en este modelo, la neuroinflamación en el músculo, si se produce, no está directamente relacionada con las mismas. En otras palabras, no se pudo observar en las muestras de músculo que las MMPs pudieran promover procesos inflamatorios dependientes de las citoquinas analizadas en esta tesis, que han sido reportados como participantes en la remodelación de la lámina basal y eventualmente en la alteración de la estabilidad y la estructura de la unión neuromuscular (Łukaszewicz-Zajac y cols. 2014). En resumen, los cambios observados en las gelatinasas no parecen explicar los cambios observados a nivel muscular, por lo que no parecen explicar la atrofia sistémica y significativa que presenta el modelo en los estadios asintomáticos.

En esta investigación se ha abordado de manera exhaustiva el análisis de la actividad y del nivel de expresión de las gelatinasas en un modelo de ELA, lo que ha permitido obtener resultados relevantes que aportan una nueva perspectiva a la comprensión de la enfermedad. A pesar de que no se observaron aumentos significativos de las gelatinasas en el suero de los animales transgénicos, se logró identificar un patrón claro de actividad en la médula espinal y los músculos, donde se evidenció un incremento en la actividad de MMP-2 en el contexto sintomático. Estos hallazgos resaltan la importancia de realizar estudios más profundos sobre la relación entre las gelatinasas y la progresión de la enfermedad, así como su papel en la dinámica del daño neuronal.

Además, la identificación de la reactividad glial y los marcadores proinflamatorios sugiere que, aunque las gelatinasas no sean los principales mediadores del daño, pueden estar involucradas en un entorno inflamatorio que afecta la progresión de la ELA. Esto abre la puerta a nuevas líneas de investigación que podrían explorar el papel indirecto de las gelatinasas en la neuroinflamación y su interacción con otros factores en la patología de la enfermedad.

Por lo tanto, aunque este estudio no respalde la hipótesis de que las gelatinasas sean biomarcadores efectivos para la progresión de la ELA, sí proporciona una base sólida para investigar otros aspectos de su actividad y su posible influencia en los procesos inflamatorios que acompañan a esta compleja enfermedad. En consecuencia, estos resultados son un paso importante hacia una comprensión más profunda de los mecanismos involucrados en la ELA, lo que podría contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en el futuro.

PERSPECTIVAS

Explorar métodos alternativos de obtención y procesamiento del suero que puedan mejorar la sensibilidad y precisión en la detección de biomarcadores, incluyendo técnicas de purificación avanzadas o protocolos que reduzcan la interferencia de proteínas abundantes o agregados que pudieran enmascarar los resultados.

Ampliar el estudio de los efectos de la edad y la mutación SOD1G93A en la actividad y expresión de las gelatinasas: Incluir edades intermedias, como 150 y 180 días, entre los 120 y 210 días, así como etapas claramente asintomáticas (por ejemplo, 60 y 90 días), permitiría un análisis más detallado de los posibles cambios tempranos en los niveles de gelatinasas que precedan la muerte de motoneuronas y la reactividad glial. Este enfoque podría revelar momentos críticos en la progresión de la enfermedad.

Investigar la actividad de las gelatinasas en diferentes tipos de músculo: realizar un análisis exhaustivo de los niveles y la actividad de las gelatinasas en músculos lentos y rápidos, como el sóleo y el EDL, durante un curso temporal más prolongado y con la inclusión de edades intermedias. Este enfoque permitiría identificar variaciones específicas en la respuesta muscular a la enfermedad y contribuiría a una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes en diferentes tipos de fibras musculares.

Examinar los niveles de inhibidores endógenos de MMP (TIMP): evaluar los niveles y actividad de los inhibidores de las metaloproteinasas de matriz (TIMP) podría proporcionar información valiosa sobre su papel en la patología de la ELA. Investigar cómo sus niveles se correlacionan con la actividad de las gelatinasas y su posible influencia en los procesos patológicos ayudará a esclarecer las dinámicas de regulación en la enfermedad.

Analizar la relación entre gelatinasas e inflamación: realizar un estudio más detallado sobre la correlación entre las gelatinasas y los marcadores de inflamación en las edades propuestas inicialmente, permitiendo así una evaluación más precisa del papel de las gelatinasas en la neuroinflamación asociada a la ELA. Este análisis podría proporcionar una visión más completa de cómo la inflamación y la actividad de las gelatinasas interactúan en el contexto de la enfermedad.

Estas perspectivas mejoradas buscan ofrecer una dirección más clara y detallada para futuros estudios, enfatizando la importancia de abordar aspectos específicos y complejos de la enfermedad para una comprensión más integral de la ELA.

Explorar el análisis de MMPs en tejidos adicionales, como muestras de piel. Considerar la evaluación de la actividad y expresión de MMPs en tejidos más accesibles como la piel podría proporcionar información relevante sobre su papel sistémico en la progresión de la enfermedad. Esto podría facilitar la identificación de biomarcadores alternativos, ya que el tejido cutáneo también refleja alteraciones en la matriz extracelular y en procesos inflamatorios asociados a patologías neurodegenerativas. Además, su obtención es menos invasiva, lo que podría abrir la posibilidad de realizar estudios longitudinales y dinámicos en etapas más tempranas y avanzadas del proceso patológico

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aimes R T & Quigley J P (1995). Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase: An enzyme capable of cleaving native type I collagen fibrils and soluble type I collagen, generating specific $\frac{3}{4}$ and $\frac{1}{4}$ length fragments (*). *The Journal of Biological Chemistry*, 270(11), 5872-5876.
- Andersen P M & Al-Chalabi A (2011).. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat. Rev. Neurol.* 7, 603–615
- Al-Chalabi A, Hardiman O (2013). The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol.* 2013 Nov;9(11):617-28. doi: 10.1038/nrneurol.2013.203.
- Al-Chalabi A, van den Berg LH & Veldink J (2017). Gene discovery in amyotrophic lateral sclerosis: implications for clinical management. *Nat. Rev. Neurol.* 13, 96–104.
- Apolloni S, D'Ambrosi N (2022). Fibrosis as a common trait in amyotrophic lateral sclerosis tissues. *Neural Regen Res.* 17(1):97-98. doi: 10.4103/1673-5374.314302.
- Apostolski S, Nikolić J, Bugarski-Prokopljević C, Miletić V, Pavlović S, Filipović S (1991). Serum and CSF immunological findings in ALS. *Acta Neurol Scand.* Feb;83(2):96-8. doi: 10.1111/j.1600-0404.1991.tb04656.x.
- Barrett AJ & Starkey PM (1973). The interaction of α 2-macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochemical Journal*, 133(4), 709–724. <https://doi.org/10.1042/bj1330709>
- Baxter AA, Leach JK & Tirrell M (2015). Human articular cartilage chondrocytes display matrix remodeling in dynamic culture with RGD peptide-functionalized PEG hydrogels. *Soft Matter*, 11(5), 917-925. <https://doi.org/10.1039/C4SM02430A>
- Beers DR, Henkel JS, Zhao W, Wang J & Appel SH (2008). CD4+ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105,15558–15563.
- Beuche W, Yushchenko M, Mäder M, Maliszewska M, Felgenhauer K, Weber F. Matrix metalloproteinase-9 is elevated in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis (2000). *Neuroreport*. Nov 9;11(16):3419-22. doi: 10.1097/00001756-200011090-00003.
- Boillée S, Vande Velde C, Cleveland DW (2006). ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron*. 52(1):39-59. doi: 10.1016/j.neuron.2006.09.018. PMID: 17015226.
- Brites D, Vaz AR. Microglia centered pathogenesis in ALS: insights in cell interconnectivity (2014). *Front Cell Neurosci.* 8:117. doi: 10.3389/fncel.2014.00117. PMID: 24904276; PMCID: PMC4033073.
- Brown RH, Al-Chalabi A (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med.* 377(2):162-172. doi: 10.1056/NEJMra1603471. PMID: 28700839.
- Brooks BR (1994). El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial “Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis” workshop contributors. *Journal of Neurological Sciences*, 124(Suppl.), 96–107
- Bruijn LI, Miller TM, Cleveland DW (2004). Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci.* 27:723-49. doi: 10.1146/annurev.neuro.27.070203.144244. PMID: 15217349

Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, Martinez-Avila N, Martinez-Fierro ML (2020). The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 21(24):9739. doi: 10.3390/ijms21249739. PMID: 33419373; PMCID: PMC7767220.

Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillée S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH Jr, Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW (2003). Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science*302(5642):113-7. doi: 10.1126/science.1086071

Charcot JM & Joffroy A (1869). Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance grise et des faisceaux antero-latéraux de la moelle epiniere [French]. *Arch. Physiol. Neurol. Pathol.* 2, 744.

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

Chung L, Dinakarbandian D, Yoshida N & Lauer-Fields JL (2004). Matrix metalloproteinase-2 membrane type 1 matrix metalloproteinase synergy promotes human osteosarcoma invasion. *Cancer Research*, 64(23), 8608-8614.

Dahlborn K, Bugnon P, Nevalainen T, Raspa M, Verboost P, Spangenberg E (2013). Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification. *Laboratory Animals*, 47(1), 2-11. <https://doi.org/10.1177/002367712473290>.

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

De Vos KJ, Chapman AL, Tennant ME, Manser C, Tudor EL, Lau KF, Brownlees J, Ackerley S, Shaw PJ, McLoughlin DM, Shaw CE, Leigh PN, Miller CCJ, Grierson AJ (2007) Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Hum. Mol. Genet.* 16, 2720–2728.

Egeblad M, Werb Z (2002). Nuevas funciones de las metaloproteinasas de la matriz en la progresión del cáncer. *Nat Rev Cáncer* 2, 161–174. <https://doi.org/10.1038/nrc745>

English WR, Velasco G, Stracke JO, Knäuper V, Murphy G (2001). Catalytic activities of membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MMP25). *FEBS Letters*, 491(1–2), 137-142. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02150-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02150-0).

Fang L, Teuchert M, Huber-Abel F, Schattauer D, Hendrich C, Dorst J, Zettlmeissel H, Wlaschek M, Scharffetter-Kochanek K, Kapfer T, Tuman H, Ludolph AC, Brettschneider J (2010). MMP-2 and MMP-9 are elevated in spinal cord and skin in a mouse model of ALS. *J Neurol Sci.* 294:51–56. doi: 10.1016/j.jns.2010.04.005.

Ferraiuolo L, Kirby J, Grierson AJ, Sendtner M, Shaw PJ (2011). Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 7(11):616-630. doi: 10.1038/nrneurol.2011.152.

Forsberg K, Andersen PM, Marklund SL & Brännström T (2019). Pathological aggregates in amyotrophic lateral sclerosis: Form, function, and toxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(12), 4582-4598. <https://doi.org/10.1074/jbc>

- González-Ávila G, Sommer B, García-Hernández AA & Ramos C (2020). Role of matrix metalloproteinases in the tumor microenvironment. In A. Birbrair (Ed.), *Tumor microenvironment (Advances in Experimental Medicine and Biology,)* vol. 1245, pp. 91-110. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-40146-7_5
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, y cols (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*. 264(5166):1772-5. doi: 10.1126/science.8209258.
- Guttenplan KA, Weigel MK, Adler DI, Couthouis J, Liddel SA, Gitler AD, Barres BA. (2020). Reactive astrocyte activating factors deletion slows disease progression in an ALS mouse model. *Nature Communications*, 11, 3753. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17514-9>
- Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A y cols (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17071. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.71>
- Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD (2002). Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(3):1604-9. doi: 10.1073/pnas.032539299.
- Goldstein LH, Abrahams S. (2013). Changes in cognition and behaviour in amyotrophic lateral sclerosis: Nature of impairment and implications for assessment. *The Lancet Neurology*, 12(4), 368–380. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70026-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70026-7)
- Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW (2009). Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol*. 187(6):761-72. doi: 10.1083/jcb.200908164. PMID: 19951898; PMCID: PMC2806318.
- Iłżecka J (2011). EMMPRIN levels in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 124(6):424-8. doi: 10.1111/j.1600-0404.2011.01519.x.
- Iłżecka J, Stelmasiak Z, Dobosz B. (2003). Matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) and their tissue inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in the serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology*, 250(6), 721-724. <https://doi.org/10.1007/s00415-003-1071-z>
- Kaplan A, Spiller KJ, Towne C, Kanning KC, Choe GT, Geber A, Akay T, Aebischer P, Henderson CE (2014). Neuronal matrix metalloproteinase-9 is a determinant of selective neurodegeneration. *Neuron*. 81(2):333-48.
- Kaufman RJ (2002). Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *Journal of Clinical Investigation*, 110(10), 1389–1398. <https://doi.org/10.1172/JCI16886>
- Kaur SJ, McKeown SR, Rashid S (2016). Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene*. 577(2):109-18. doi: 10.1016/j.gene.2015.11.049.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 141(1):52-67. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015.
- Kew JJ, Goldstein LH, Leigh PN, Abrahams S, Cosgrave N, Passingham RE, Frackowiak RS, Brooks DJ (1993). The relationship between abnormalities of cognitive function and cerebral activation in amyotrophic lateral sclerosis. A neuropsychological and positron emission tomography study. *Brain* 116, 1399–1423.

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

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

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

Knäuper V, López-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. (1996). Biochemical characterization of human collagenase-3 (*). *Journal of Biological Chemistry.* 271(3): 1544-1550. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.3.1544>

Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Horvitz HR, Landers JE, Brown RH Jr. (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 323:1205–1208. doi: 10.1126/science.1166066.

Lai C, Xie C, McCormack SG, Chiang HC, Michalak MK, Lin X, Chandran J, Shim H, Shimoji M, Cookson MR, Hagan RL, Rothstein JD, Price DL, Wong PC, Martin LJ, Zhu JJ, Cai H (2006). Amyotrophic lateral sclerosis 2-deficiency leads to neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis through altered AMPA receptor trafficking. *J. Neurosci.* 26: 11798–11806.

Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E (2004). TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol.* 49(3):187-198. doi: 10.1016/j.critrevonc.2003.09.008.

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

Lorenzl S, Albers DS, LeWitt PA, Chirichigno JW, Hilgenberg SL, Cudkowicz ME, Beal MF (2003). Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases are elevated in cerebrospinal fluid of neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci.* 207(1-2):71-76. doi: 10.1016/s0022-510x(02)00398-2.

Lorenzl S, Narr S, Angele B, Krell HW, Gregorio J, Kiaei M, Pfister HW, Beal MF (2006). The matrix metalloproteinases inhibitor Ro 28-2653 [correction of Ro 26-2853] extends survival in transgenic ALS mice. *Exp Neurol.*200(1):166-171. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.01.026.

Ludolph A, Drory V, Hardiman O, Nakano I, Ravits J, Robberecht W (2015). A review of the El Escorial criteria—2015. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration.* 16(5–6): 291–292. <https://doi.org/10.3109/21678421.2015.1049183>

Łukaszewicz-Zajac M, Mroczko B, Słowik A. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (2014). *J Neural Transm (Vienna)*121(11):1387-1397. doi: 10.1007/s00702-014-1205-3.

Maragakis N, Rothstein JD (2006). Disease mechanisms: Astrocytes in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neurology.* 2: 679–689. <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0355>

Marchenko ND, Marchenko GN, Weinreb RN, Lindsey JD, Kyshtoobayeva A, Crawford HC, Strongin AY. (2004). β -Catenin regulates the gene of MMP-26, a novel matrix metalloproteinase expressed

both in carcinomas and normal epithelial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 36(5): 942-956. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.12.007>.

Marco M, Boragno D, Rodríguez P, Mestre Cordero V, Pereira N, Berasain P, Cadenas F, Rodríguez C, Moreira A, Simoff X, Bianchi V, Barindelli A, Fielitz P, Olivera-Bravo S (2020). Gelatinases as markers of chronic alcohol consumption: A pilot study in Uruguay. *Anales de la Facultad de Medicina*, 7(1). [Internet]. <https://doi.org/10.32541/analesfm.2020.v7.n1.1024> [Accessed April 2022].

Mattiazzi M, D'Aurelio M, Gajewski CD, Martushova K, Kiaei M, Beal MF, Manfredi G. (2002). Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*. 277(29): 29626–29633. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202285200>

McGookin RK (1988). Polyacrylamide gel electrophoresis of proteins: Methods and applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 10(5):503-511. <https://doi.org/10.1111/j.1470-8744.1988.tb00922.x>

Mogi M, Harada M, Kondo T, Riederer P, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T. (1999). Interleukin-1 β , interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor- α are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neuroscience Letters*. 267(1): 61-64. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(99\)00356-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00356-3)

Mott JD, Werb Z, (2000). Inhibitors of matrix metalloproteinases in cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute*. 92(12):, 979–981. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.12.979>

Murphy G& Nagase H (2008). Progress in matrix metalloproteinase research. *Molecular Aspects of Medicine*. 29(5):290-308. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.002>

Murray LM, Talbot K, Gillingwater TH (2010). Review: neuromuscular synaptic vulnerability in motor neurone disease: amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol*. 36: 133–156.

Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S (2007). . Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat. Neurosci*. 10: 615–622.

Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 314: 130–133.

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

Oh K, Ko E, Kim HS, Lee J, Han S, Park KH, ... & Kim BY (2001). Inhibitors of matrix metalloproteinase-1 suppresses the migration of human dermal fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*, 117(6), 1677-1681. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01598.x>

Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. (1997). Membrane-type matrix metalloproteinase-1 digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *Journal of Biological Chemistry*. 272(4): 2446. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.4.2446>

Olivera-Bravo S, Bolatto C, Otero Damianovich G, Stancov M, Cerri S, Rodríguez P, Boragno D, Hernández Mir K, Cuitiño MN, Larrambembere F, Isasi E, Alem D, Canclini L, Marco M, Davyt D, Díaz-

Amarilla P (2020). Neuroprotective effects of violacein in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Rep.*12(1):4439. doi: 10.1038/s41598-022-06470-7. PMID: 35292673; PMCID: PMC8924276.

Pasinelli P, Brown RH (2006). Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci.* 7(9):710-723. doi: 10.1038/nrn1971.

Patterson ML, Atkinson SJ (2001). A novel isoform of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) generated by alternative mRNA splicing. *Journal of Biological Chemistry.* 276(49):43948-43954. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106351200>

Pei, D., & Weiss, S. (1995). Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature*, 375(6529), 244-247. <https://doi.org/10.1038/375244a0>

Philips T, Rothstein JD (2015). Rodent models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Protoc Pharmacol.*69:5.67.1-5.67.21. doi: 10.1002/0471141755.ph0567s69.

Raghunathan, R., Turajane, K., & Wong, L. C. (2022). Biomarkers in Neurodegenerative Diseases: Proteomics Spotlight on ALS and Parkinson's Disease. *International journal of molecular sciences*, 23(16), 9299.

Rempe RG, Hartz AMS, Bauer B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers (2016). *J Cereb Blood Flow Metab.* 36(9):1481-1507. doi: 10.1177/0271678X16655551. Epub 2016 Jun 20. PMID: 27323783; PMCID: PMC5012524.

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

Robelin L, Gonzalez De Aguilar JL (2014). Blood biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis: myth or reality? *Biomed Res Int.* 2014:525097. doi: 10.1155/2014/525097.

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

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 362: 59–62. <https://doi.org/10.1038/362059a0>

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

Rosenfeld Jeffrey, Strong Michael J (2015). Challenges in the Understanding and Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis/Motor Neuron Disease, *Neurotherapeutics*, 12(2): 317-325, <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0332-8>

Sánchez-Torres JL, Yescas-Gómez P, Torres-Romero J, Espinosa OR, Canovas LL, Tecalco-Cruz AC, Ponce-Regalado MD, Alvarez-Sánchez ME (2020). Matrix metalloproteinases deregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.*;419:117175, doi: 10.1016/j.jns.2020.117175.

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

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

Singh D, Srivastava SK, Chaudhuri TK, Upadhyay G. (2015). Multifaceted role of matrix metalloproteinases (MMPs) *Front. Mol. Biosci.*2:19. doi: 10.3389/fmolb.2015.00019.

Shaw PJ, Forrest V, Ince PG, Richardson JP, Wastell HJ. (1995). CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: Elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration*, 4, 209–216.

Sokolowska B, Jozwik A, Niebroj-Dobosz I, Janik P, Kwiecinski H. (2009). Evaluation of matrix metalloproteinases in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis with pattern recognition methods. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 60(Suppl 5): 117–120. PMID: 20134051.

Soon CP, Crouch PJ, Turner BJ, McLean CA, Loughton KM, Atkin JD, Masters CL, White AR, Li QX. (2010). Serum matrix metalloproteinase-9 activity is dysregulated with disease progression in the mutant SOD1 transgenic mice. *Neuromuscular disorders: NMD* 20(4): 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2009.11.015>

Stellwagen NC (2009). DNA gel electrophoresis using polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 30(5): 862-873. <https://doi.org/10.1002/elps.200800328>

Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Burgess WH, Migliorini M, Argraves WS (1990). Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 265(29): 17401-17404. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)38172-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)38172-9)

Sturmey E & Malaspina A (2022). Blood biomarkers in ALS: challenges, applications and novel frontiers. *Acta Neurologica Scandinavica*. 146(4): 375-388. <https://doi.org/10.1111/ane.13698>. PMID: 36156207; PMCID: PMC9828487

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

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

Van Damme P, Dewil M, Robberecht W, Van Den Bosch L. (2005). Excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegenerative Diseases*, 2, 147–159. <https://doi.org/10.1159/000085760>

Vijayalakshmi K, Alladi PA, Ghosh S, Prasanna VK, Sagar BC, Nalini A, Sathyaprabha TN, Raju TR. (2011). Evidence of endoplasmic reticular stress in the spinal motor neurons exposed to CSF from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiology of Disease*, 41, 695–705. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.12.013>

Witzel, S., Mayer, K., & Oeckl, P. (2022). Biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Current opinion in neurology*, 35(5), 699–704. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000001094>

Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL. (1995). An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron*, 14, 1105–1116. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90110-5](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90110-5).

Yamagishi S, Koyama Y, Katayama T, Taniguchi M, Hitomi J, Kato M, Aoki M, Itoyama Y, Kato S, Tohyama M (2007). An in vitro model for Lewy body-like hyaline inclusion/astrocytic hyaline inclusion: Induction by ER stress with an ALS-linked SOD1 mutation. *PLoS ONE*, 2(10), e1030. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001030>

Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW (2008). Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neuroscience*, 11, 251–253. <https://doi.org/10.1038/nn0208-251>

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

Yang Y, Hentati A, Deng HX, Dabbagh O, Sasaki T, Hirano M, Hung WY, Ouahchi K, Yan J, Azim AC, Cole N, Gascon G, Yagmour A, Ben-Hamida M, Pericak-Vance M, Hentati F, Siddique T. (2001). The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Genetics*, 29, 160–165. <https://doi.org/10.1038/ng1001-160>

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

ANEXOS

ANEXO I: PROTOCOLO PARA GENOTIPADO POR PCR

Muestras: fragmentos de colas de ratas de 30 d

PROTOCOLO

- 1- Prender UV de campana durante 30 min y bajo campana preparar los tubos necesarios para genotipar toda una camada (generalmente entre 12 y 18 animales);
- 2- Agregar a cada tubo Eppendorf: 300 μ L de buffer de digestión de cola TBD (50 mM de Tris pH 8, 50 mM de EDTA y 0.5% de SDS);
- 3- Limpiar la cola de cada animal con etanol 70% y cortar 5 mm de cola con bisturí estéril;
- 4- Colocar el trozo de cola limpio en tubo Eppendorf conteniendo TBD, agregar 185 μ L de TBD y 15 μ L de proteinasa K 20 mg/mL (New England BioLabs Inc. #P8102S);
- 5- Incubar 15 min a 65°C para inactivar posibles ADNasas y posteriormente a 50°C toda la noche (temperatura cercana a la temperatura óptima de la proteinasa K);
- 6- Inactivar la proteinasa K incubando las muestras a 95°C durante 15 min;
- 6- Centrifugar 10 min a 12000g y 4°C para sedimentar los restos de tejido sin digerir;
- 7- Tomar 10 μ L del sobrenadante y realizar una dilución 1:20 en agua, de la cual se tomará 1 μ L para agregarlo a la mezcla de reacción de PCR;
- 8- Preparar la mezcla de reacción de PCR calculando para el número de tubos más 1 (n + 1), teniendo en cuenta la inclusión de un blanco:

Stock	Concentración de trabajo	Volumen empleado
H ₂ O para PCR	--	14,2
PCR buffer (Perkin Elmer) 10X	1X	2
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	0,6
dNTP's 5 mM (Invitrogen)	0,2 mM	0,8
Cebadores 10 μ M	0,2 μ M	0,4
Taq Polimerasa 5U/ μ L	0,25 U/ μ L	1
Volumen Final	--	19

Los cebadores utilizados que reconocen parte de la secuencia de la hSOD1G93A fueron comprados a Integrated DNA Technologies (IDT, USA) y su secuencia es la siguiente:

Forward: 5' GTG GCA TCA GCC CTA ATC CA 3'

Reverse: 5' CAC CAG TGT GCG GCC AAT GA 3'

Nota: Mantener los tubos en hielo para inhibir la actividad de la Taq polimerasa (Vargas y cols. 2006).

- 9- Agregar 1 μ L de la suspensión conteniendo ADN genómico e introducir los tubos en el termociclador Biometra® T1.

La configuración de temperaturas y tiempos establecidos para cada paso de la amplificación es el siguiente:

Temperatura	Tiempo (min)	Finalidad
95	2	Activación de Taq polimerasa
95	0,5	Desnaturalización del ADN
60	0,5	Unión del cebador
72	0,5	Elongación
72	5	Completar amplicones de ADN de hebra simple

Los pasos de desnaturalización, hibridación y elongación se repitieron 35 veces.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Para visualizar los amplicones generados en la PCR se decidió realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida 6% en buffer Tris Borato EDTA (TBE, cuya composición es: 90 mM Tris, 89 mM de ácido bórico, 2 mM EDTA), corriendo a 80 V y 40 mA máximos durante 40 min. La técnica se basa en que, en las condiciones de corrida y debido a su carga negativa, el ADN migra dependiendo del tamaño de la molécula, por lo que es posible visualizar los amplicones. Los geles de poliacrilamida fueron empleados porque permiten caracterizar proteínas y ADN de bajo peso molecular (de entre 80pb y 300pb, McGookin 1988; Stellwagen 2009), por lo que son adecuados para reconocer los amplicones generados en la PCR que son de 160pb (Vargas y cols., 2006).

El protocolo empleado fue el siguiente:

- 1- Armar el dispositivo de electroforesis y preparar 10 ml de gel de poliacrilamida 6%: 8 mL de TBE 1X, 2 mL de stock de bis-acrilamida (30:1), 100 µL de persulfato de amonio 10% y 10 µL de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina);
- 2- Emplear peines de 1.5 mm;
- 3- Cargar 5 µL del producto de PCR más 1,5 µL de buffer de carga 6X (0,25% azul de bromofenol, 0,25% de xilen-cianol FF, 30% de glicerol en H₂O destilada);
- 4- Realizar la corrida en las condiciones y tiempos estipulados (80 V, 40 min).

REVELADO EN PLATA

El revelado de la PCR permite identificar los animales Tg de los No Tg, ya que los primeros tendrán amplicones mientras que los segundos no.

El procedimiento empleado fue el siguiente:

- 1- Desmontar el gel en solución de fijación (500 µL de ácido acético y 13,7 mL de etanol 100% en 100 mL de H₂O destilada);
- 2- Mantener en agitación suave durante 10 min;
- 3- Recuperar el fijador e incubar el gel en una solución 0.2% de AgNO₃ en H₂O destilada durante 10 min;
- 4- Recuperar la solución de plata, lavar el gel rápidamente 3 veces con H₂O destilada (para quitar el exceso de plata no unido al ADN);
- 5- Incubar con solución de revelado: 3 g de NaOH y 500 µL de formaldehído en 100 mL de H₂O destilada;

6- Mantener el gel en la solución de revelado con agitación suave hasta divisar nítidamente las bandas que indiquen los animales positivos (Tg) y la ausencia de las mismas en los no positivos.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DEL ÁCIDO BICINCONÍNICO (BCA)

Se determinó la concentración de proteínas de cada muestra para asegurar que la cantidad sembrada de proteína sea la misma en cada muestra analizada por zimografía o dotblots. Brevemente, se realizó una curva del estándar (BSA) con concentraciones desde 0.25 mg/mL hasta 2 mg/mL. Se colocó el mismo volumen final de todas las muestras diluidas por duplicado o triplicado y dos blancos a los cuales se agregó buffer de lisis solamente. A cada pocillo se agregó una solución de BCA: sulfato cúprico (50:1, Novagen) manteniendo una relación 8:1 respecto del volumen de las muestras. La placa se colocó en estufa a 37°C durante 30 min y luego se midió la absorbancia a 562 nm en un lector de microplacas (Varioskan® Flash, Thermo Scientific). Se graficaron los datos de la absorbancia en función de las concentraciones conocidas del estándar de BSA, se ajustaron los puntos a una recta y se determinó el coeficiente de regresión, estimándose una aceptabilidad mínima con un R^2 mayor o igual a 0.98. Con esta curva y con los valores de absorbancia de cada muestra problema se determinó la concentración de proteína de cada muestra problema.

ANEXO II: PROTOCOLO PARA ZIMOGRFÍA EN GEL

Muestras: Suero y homogenatos de médula espinal lumbar y cervical y de músculos sóleos y EDL

Materiales

- Aparatos de gel de electroforesis completo
- Buffer de gel de corrida: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
- Buffer de gel concentrador: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
- Gelatina: 4 mg/mL en agua destilada (Preparar la suspensión y calentar a 60°C hasta disolver)
- Dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%: 20 g en 200 mL. Controlar disolución completa
- Acrilamida al 30%: 30 g y diluir en 100 mL de agua destilada. Mantener a 4°C
- Persulfato de amonio (APS) al 10%: 5 g en 50 mL de agua destilada. Alicuotar y mantener a -20°C
- Buffer de muestra (5x): Tris 0,4 M, pH 6,8, SDS al 5%, glicerol al 20% y 0,03% de azul de bromofenol
- Buffer de corrida (10 x): 30,3 g de Tris, 144,1 g de glicina, 10 g de SDS, todo disuelto en 1 L de agua destilada
- Stock de renaturalización (10 x): 25 µL Tritón X-100 en 100 mL agua destilada
- Stock de desarrollo de actividad: 60,55 g de Tris-HCl, pH 7,5, 117,1 g de NaCl, 35 g CaCl₂ deshidratado, 2 ml Brij 0,2 %, en un volumen final de 1 L de agua destilada
- Solución de tinción de gel: metanol 50 mL, ácido acético 100 mL, 5 g de Coomassie azul brillante R-250 en 850 mL de agua miliQ. Filtrar antes de usar
- Solución decolorante de gel: metanol 40%, ácido acético al 10% en H₂O
- Solución de secado previo en gel: metanol al 30% (v/v), glicerol al 5% (v/v)

Procedimiento

A) Preparación de los geles:

1. Ensamblar las placas de electroforesis y sellar el extremo inferior del gel;
2. Preparar la mezcla de gel de corrida (poliacrilamida al 8%) y del gel concentrador (4%) sin agregar persulfato de amonio o TEMED como se indica a continuación:

Gel de corrida 8%	Volumen	Gel Concentrador 4 %	Volumen
Gelatina 4 mg/mL	4,6 mL	H ₂ O	4,1 mL
Tris 1,5 M, pH 8,8	2,5 mL	Tris 0,5 M, pH 6,8	750 µL
SDS 10%	100 µL	SDS 10%	60 µL
Acrilamida 30 %	2,7 mL	Acrilamida 30%	1 mL
APS 10%	100 µL	APS 10%	60 µL
TEMED	6 µL	TEMED	6 µL

3. Agregar el persulfato de amonio y el TEMED a la solución del gel de corrida y mezclar. Verter rápidamente la solución del gel en el casete dejando 1.5-2.0 cm de espacio para el gel concentrador y el peine;

Nota: No permitir que la solución burbujee mientras se mezcla, ya que puede resultar en polimerización desigual.

4. Luego colocar isopropanol suavemente sobre la parte superior del gel de corrida. Dejar que el gel polimerice durante al menos 30 min;
5. Retirar el isopropanol de la superficie de la capa inferior y lavar suavemente con agua destilada;
6. Agregar el APS y el TEMED a la solución del gel concentrador y verterlo rápidamente sobre el gel de corrida. Añadir el peine cuidadosamente. Esperar que el gel concentrador polimerice (20-30 min).

B) Preparación para la corrida electroforética y corrida:

- 1- Colocar los geles en el soporte de electroforesis que va dentro de la cuba;
- 2- Ajustar el vidrio chico de manera que quede mirando hacia el centro y retirar los peines;
- 3- Llenar el espacio entre los dos geles con buffer de corrida 1x hasta cubrir los pocillos y el resto de la cuba hasta donde se indica según la cantidad de geles;
- 4- Realizar el esquema de siembra identificando cada muestra en cada gel y la posición de los controles positivos y proceder a la siembra de las distintas muestras;
- 5- Tapar la cuba, prender la fuente de poder y ajustar el voltaje a 70 V;
- 6- Dejar correr las muestras hasta que el frente de corrida (línea azul) pase el gel concentrador (aproximadamente 15 min) y ajustar el voltaje a 100 V;
- 7- Dejar correr las muestras hasta que el frente de corrida salga del gel completamente;
- 8- Desmontar el sándwich, sacar cada gel (identificar cada lado) y lavar con abundante agua destilada;
- 9- Colocar cada gel en 100 mL de solución renaturalizante 1x (0.01% Tritón X-100) durante 30 min en agitador a temperatura ambiente;
- 10- Descartar y repetir el paso anterior;
- 11- Descartar y lavar con agua destilada (2 veces, 10 min cada lavado);
- 12- Descartar y realizar tres lavados con solución de desarrollo 1x durante 30 min, con agitación y a temperatura ambiente;
- 13- Descartar e incubar a 37°C en estufa con 100 mL de solución de desarrollo durante 18-20 h.

C) Revelado de geles:

- 1- Sacar geles de la estufa e incubar con colorante en agitador a temperatura ambiente durante 30 min;
- 2- Cambiar el colorante por solución decolorante e incubar durante 20 min a temperatura ambiente en agitador;
- 3- Descartar y colocar en agua hasta visualizar las áreas de degradación de la gelatina. Las bandas positivas fueron medidas con la herramienta *Gel analysis tool* del programa FIJI (NIH).

ANEXO III: PROTOCOLO DE DOT BLOTTING

Muestras: Suero y homogenatos de médula espinal lumbar y cervical y de músculos sóleos y EDL

Protocolo

- 1- Dibujar una cuadrícula de 1 cm en la membrana de nitrocelulosa o PVDF indicando con un punto en el centro dónde se añadirá cada muestra;
2. Añadir 2 μ L de muestra (asegurando que tengan la misma concentración de proteínas) a cada uno de los puntos dibujados en el paso anterior y dejar que la membrana se seque por completo;
3. Preparar una placa de Petri pequeña con 5% BSA en TBS-T. Solución de TBS 10x: 24 g Tris y 88 g NaCl en 900 mL de agua ajustado a pH 7.6 y 1L de volumen final; TBS-T: 100 mL de TBS 10x y 1 mL de Tween® 20 en 900 mL de agua;
- 4- Sumergir la membrada en BSA/TBS-T para bloquear los sitios no específicos durante 30 a 60 min, a temperatura ambiente;
- 5- Incubar directamente la membrada con la dilución del anticuerpo primario específico durante 30 min, a temperatura ambiente;
- 6- Lavar la membrana con TBS-T durante 5 min. Repetir el lavado 3 veces;
- 7- Incubar la membrana con el anticuerpo secundario durante 30 min a temperatura ambiente;
- 8- Lavar la membrana con TBS-T durante 15 min. Repetir el lavado 3 veces;
- 9- Lavar con TBS durante 5 min;
- 10- Cubrir la membrana con plástico y añadir el reactivo sustrato (ECL, Thermo Fisher, 34577);
- 11- Incubar la membrana durante 1 min;
- 12- Leer en un sistema de imágenes (Thermo, iBright FL1500);
- 13- Determinar la densidad neta integrada para todas las condiciones empleando FIJI-Image J.

ANEXO IV: PROTOCOLO DE INMUNOFLUORESCENCIA

Muestras: Secciones de médula espinal lumbar y cervical y de músculos sóleos y EDL

Protocolo

- 1- Permeabilizar los cortes con Tritón X-100 al 0,3% durante 20min;
- 2- Lavar con PBS 1x (10 mM, pH 7.4) 3 veces durante 5 min cada lavado;
- 3- Incubar con la dilución de cada anticuerpo primario (ver Tabla 1) en cámara húmeda a 4°C;
- 4- Lavar con PBS 1x (3 lavados de 5 min c/u)
- 5- Incubar con anticuerpo secundario conjugado a fluoróforo a una dilución de 1:800, durante 2 h a temperatura ambiente, en oscuridad y con agitación leve;
- 6- Lavar 3 veces con PBS 1x; montar en glicerol-DAPI (1 µg/mL);
- 7- Observar en microscopio confocal.

Tabla 1: Anticuerpos y sondas empleadas en dot blot e inmunohistoquímica

Anticuerpos primarios (antígeno, tipo, animal, fabricante, código)	Dilución
Anti-MMP-2, monoclonal, ratón, Thermo Fisher Scientific, 436000	1:300
Anti-MMP-9, policlonal, conejo, Thermo Fisher Scientific, PA5-13199	1:500
Anti-IL-1β, policlonal, abcam, ab234437, o Peprotech, 500-P21BG	1:500
Anti-IL-6, monoclonal, conejo, ab233706	1:500
Anti-TNF-α, policlonal, conejo, abcam, ab 234437, o Peprotech, 500-P31A	1:500
Anti-Tubulina 1, monoclonal, ratón, Sigma, T6199	1:2000
Anti-β actina, monoclonal, ratón, Sigma, A5316	1:2000
Anti-S100β, monoclonal, ratón, Sigma, S2532	1:600
Anti-GFAP, policlonal, conejo, Sigma, G4546	1:500
Anti-IbA1, policlonal, conejo, abcam, ab178846	1:300
Anti-SMI32, monoclonal, ratón, Covance, #SMI32-P	1:800
Anticuerpos secundarios (animal, fabricante, código)	Dilución
Cabra anti-mouse 488, Invitrogen, A11029	1:800
Cabra anti-rabbit 546, Invitrogen, A11035	1:800
Cabra anti-rabbit 633, A21070	1:800
Sondas (fabricante, código)	Dilución
Hoechst 33342 o diamino-fenil-indol, Fluka, 1298375	1 µg/mL
Lectina de tomate, Sigma, L0651	1:300